

# 目次

コンファレンスプログラム		1
発表演題及び公演時間	(11月6日)	2
	(11月7日)	6
特別講演要旨		10
シンポジウム講演要旨		16
一般講演要旨		22
ポスター発表要旨	(1P-1~1P-37)	33
	(2P-1~2P-36)	52
人名索引		70
糸状菌分子生物学研究会会則		74
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿		75

# 第3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15年11月6日(木)～7日(金)

会場：東京大学弥生講堂(文京区弥生1-1-1)

主宰：糸状菌分子生物学研究会

後援：糸状菌遺伝子研究会

11月6日(木)

10:30 - 12:30 一般講演 (O-1～O-10)

12:30 - 12:40 総会

12:40 - 14:00 昼休み

14:00 - 16:00 ポスター発表 (1P-1～1P-37)

16:00 - 16:45 特別講演1 Dr. H. C. Kistler

Genomics of *Fusarium graminearum*: Priorities and plans for genome annotation, functional analysis and integration of the genetic map with the draft genome sequence assembly.

16:45 - 17:30 特別講演2 Dr. S. Ottonello

A family of phospholipases A2 unique to filamentous microorganisms

17:30 - 17:40 休憩

17:40 - 18:25 特別講演3 Dr. M. Penttilä

Regulatory mechanisms involved in expression and secretion of enzymes by *Trichoderma reesei*.

18:30 - 懇親会 (農学部生協食堂)

11月7日(金)

10:00 - 11:30 シンポジウム「新技術・新手法を用いた糸状菌研究の進展」

S-1 *Aspergillus oryzae* cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子転写解析

阿部敬悦 (東北大学大学院農学研究科)

S-2 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) 分泌タンパク質のプロテオーム解析

岩下和裕 (酒類総合研究所)

S-3 GFP を用いた麹菌(*Aspergillus oryzae*)のオルガネラの動態解析

丸山潤一、北本勝ひこ (東京大学大学院農学生命科学研究科)

11:30 - 12:15 特別講演4 Dr. N. D. Read

Imaging the dynamics and organization of organelles at high spatial resolution at high spatial resolution in living hyphae

12:15 - 13:30 昼休み

13:30 - 15:30 ポスター発表 (2P-1～2P-36)

15:30 - 17:42 一般講演 (O-11～O-21)

17:42 - 閉会の辞

ポスターは初日と2日目で全て貼り替えとなります

11月6日(木)

一般講演 (O-1~O-10) 10:30~12:30

- 10:30 O-1 *Aspergillus saitoi* 1,2- $\alpha$ -D-mannosidase の基質特異性変換  
多田羅洋太, 一枚田史子, 李秉魯, 吉田孝<sup>1</sup>, 一島英治  
(創大院・工, <sup>1</sup>弘前大・農学生命)
- 10:42 O-2 Aorsin はなぜ酸性領域でトリプシン様の特異性を示すのか  
山下浩一郎, 李秉魯, 平井伸明, 一島英治 (創価大院・工)
- 10:54 O-3 担子菌 RecQ 型 DNA ヘリカーゼ遺伝子の構造と転写発現  
勝川志徳, 山崎丘, 梶原将, 宍戸和夫 (東工大・生命理工)
- 11:06 O-4 担子菌 P450 分子多様性におけるマイクロエキソンの役割  
平塚宣博, 一瀬博文, 栗原宏征, 松崎美美子, 志水元亨, 割石博之 (九大院・農)
- 11:18 O-5 白色木材腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* のセルロース/キシラン  
混合炭素源培養系において特異的に検出された新規タンパク質  
住吉剛史, 吉田誠, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)  
片山映, 西野武士 (日医大・一生化)
- 11:30 O-6 分裂酵母 dikaryon の成立と septation initiation network の関わり  
岡崎孝映, 丹羽修身 (かずさDNA研究所)
- 11:42 O-7 CCAAT 配列結合因子 HAP 複合体の核内移行に関する研究  
合田秀矢, 田上新次郎, 小林哲夫, 塚越規弘, 加藤雅士 (名大院・生命農)
- 11:54 O-8 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, 山田修\*, 秋田修\*, 佐藤利次 (岩手生工研, 酒総研)
- 12:06 O-9 麹菌ゲノム解析  
佐野元昭<sup>1</sup>, 田中敏広<sup>2</sup>, 五十嵐理恵<sup>2</sup>, 澤野寿彦<sup>2</sup>, 熊谷俊高<sup>1</sup>, 楠本憲一<sup>3</sup>, 有馬寿英<sup>4</sup>,  
秋田修<sup>4</sup>, 阿部敬悦<sup>5</sup>, 柏木豊<sup>3</sup>, 北本勝ひこ<sup>6</sup>, 小林哲夫<sup>7</sup>, 五味勝也<sup>5</sup>, 竹内道雄<sup>8</sup>,  
堀内裕之<sup>6</sup>, 穴澤秀治<sup>9</sup>, 小出芳直<sup>10</sup>, 小森隆<sup>11</sup>, 小山泰二<sup>12</sup>, 田中昭光<sup>13</sup>, 秦洋二<sup>14</sup>,  
峰時俊貴<sup>15</sup>, Jiujiang Yu<sup>16</sup>, 小笠原直毅<sup>17</sup>, 久原哲<sup>18</sup>, 菊池久<sup>2</sup>, 浅井潔<sup>6</sup>,  
町田雅之<sup>1</sup> (<sup>1</sup>産総研, <sup>2</sup>製品評価技術基盤機構, <sup>3</sup>食総研, <sup>4</sup>酒類総研, <sup>5</sup>東北大, <sup>6</sup>東大,  
<sup>7</sup>名大, <sup>8</sup>農工大, <sup>9</sup>協和発酵, <sup>10</sup>天野エンザイム, <sup>11</sup>インテック W&G, <sup>12</sup>キッコーマン,  
<sup>13</sup>ヒゲタ醤油, <sup>14</sup>月桂冠, <sup>15</sup>大関, <sup>16</sup>SRRC USA, <sup>17</sup>奈良先端大, <sup>18</sup>九大)
- 12:18 O-10 麹菌ゲノムの遺伝子予測  
熊谷俊高<sup>1</sup>, 佐野元昭<sup>1</sup>, 田中敏広<sup>2</sup>, 五十嵐理恵<sup>2</sup>, 澤野寿彦<sup>2</sup>, 楠本憲一<sup>3</sup>, 有馬寿英<sup>4</sup>,  
秋田修<sup>4</sup>, 阿部敬悦<sup>5</sup>, 柏木豊<sup>3</sup>, 北本勝ひこ<sup>6</sup>, 小林哲夫<sup>7</sup>, 五味勝也<sup>5</sup>, 竹内道雄<sup>8</sup>,  
堀内裕之<sup>6</sup>, 穴澤秀治<sup>9</sup>, 小出芳直<sup>10</sup>, 小森隆<sup>11</sup>, 小山泰二<sup>12</sup>, 田中昭光<sup>13</sup>, 秦洋二<sup>14</sup>,  
峰時俊貴<sup>15</sup>, Jiujiang Yu<sup>16</sup>, 小笠原直毅<sup>17</sup>, 久原哲<sup>18</sup>, 菊池久<sup>2</sup>, 町田雅之<sup>1</sup>,  
浅井潔<sup>6,1</sup> (<sup>1</sup>産総研, <sup>2</sup>製品評価技術基盤機構, <sup>3</sup>食総研, <sup>4</sup>酒類総研, <sup>5</sup>東北大, <sup>6</sup>東大,  
<sup>7</sup>名大, <sup>8</sup>農工大, <sup>9</sup>協和発酵, <sup>10</sup>天野エンザイム, <sup>11</sup>インテック W&G, <sup>12</sup>キッコーマン,  
<sup>13</sup>ヒゲタ醤油, <sup>14</sup>月桂冠, <sup>15</sup>大関, <sup>16</sup>SRRC USA, <sup>17</sup>奈良先端大, <sup>18</sup>九大)

ポスター発表 (1P-1~1P-37) 14:00~16:00

- 1P-1 植物病原菌 *Alternaria alternata* における conditionally dispensable (CD) 染色体  
赤木靖典, 赤松 創, 尾谷 浩, 児玉基一郎 (鳥取大・農)
- 1P-2 植物病原菌 *Alternaria alternata* が普遍的に保有する環状ペプチド合成酵素  
遺伝子の機能解析  
森本泰介, 赤松 創, 尾谷 浩, 児玉基一郎 (鳥取大農)
- 1P-3 植物病原菌 *Alternaria alternata* tomato pathotype における宿主特異的 AAL 毒素生合  
成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)
- 1P-4 *Alternaria solani* 還元型ポリケタイド合成酵素遺伝子のクローニングと  
機能解析  
笠原 堅<sup>1</sup>, 藤井 勲<sup>1</sup>, 海老塚豊<sup>1</sup>, 及川英秋<sup>2</sup> (<sup>1</sup>東大院薬, <sup>2</sup>北大院理)
- 1P-5 *Alternaria solani* の還元型ポリケタイド合成酵素遺伝子 *PKSN* の機能解析  
下牧重樹<sup>1</sup>, 吉田奈央<sup>1</sup>, 藤井 勲<sup>1</sup>, 海老塚豊<sup>1</sup>, 及川英秋<sup>2</sup> (<sup>1</sup>東大院薬, <sup>2</sup>北大院理)
- 1P-6 植物病原菌 *Alternaria alternata* apple pathotype (リンゴ斑点落葉病菌) に  
おける G タンパク質  $\alpha$  サブユニット遺伝子の病理学的役割  
山岸大輔\*, 松井英樹\*, 赤松 創\*, 振木昌成\*\*, 尾谷 浩\*, 児玉基一郎\*  
(\*鳥取大農, \*\*株)日立サイエンスシステムズ)
- 1P-7 スエヒロタケにおける、dominant active heterotrimeric G-Proteins  
(*ScGP-A*, *ScGP-C*)発現による細胞内 cAMP レベル上昇効果  
山岸賢治, 木村俊之, 鈴木雅博, 八巻幸二 (東北農業研究センター), 新本洋士 (食総研)
- 1P-8 アカパンカビ adenylyl cyclase 突然変異を抑圧する形態的突然変異  
神崎誠一, 工藤倫子, 村山肇子 (関東学院大・工)
- 1P-9 *Aspergillus oryzae* の新規ポリケタイド合成遺伝子のクローニングと機能解析  
勢ノ康代, Pravven Rao Juvvadi, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- 1P-10 *Phoma* sp.の芳香族型ポリケタイド合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析  
柏 延之, 藤井 勲, 海老塚豊 (東大院薬)
- 1P-11 *Rhizopus oligosporus* の生産する抗菌性ペプチド(ABP)遺伝子のクローニング  
山田 修, 坂本和俊, 中山 祐, 小関卓也, 藤田晃子, 秋田 修 (酒総研)
- 1P-12 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の高温誘導性遺伝子とそのプロモーター解析  
松下真由美, 鈴木 聡, 楠本憲一, 柏木 豊 ((独)食総研)
- 1P-13 *Aspergillus nidulans eglA* 発現誘導への MCM1p 結合配列の関与  
遠藤良知, 加藤雅士, 塚越規弘, 小林哲夫 (名大院・生命農)
- 1P-14 *Aspergillus oryzae thiA* のチアミンによる発現制御機構  
窪寺隆文<sup>1)</sup>, 渡辺 睦<sup>1)</sup>, 吉内くみ<sup>1)</sup>, 山下伸雄<sup>1)</sup>, 西村 顕<sup>1)</sup>, 中井 進<sup>1)</sup>, 五味勝也<sup>2)</sup>,  
花本秀生<sup>1)</sup> (白鶴・研開<sup>1)</sup>, 東北大院農・生物産業創成<sup>2)</sup>)
- 1P-15 醤油麹菌 *Aspergillus sojae* のアミラーゼ遺伝子の解析  
北本則行, 藤野恵美, 松井淳子, 安田 (吉野) 庄子 (愛知産技研・食工技セ)
- 1P-16 麹菌のエノラーゼプロモーター (*PenoA*)へのシスエレメント導入効果  
坪井宏和<sup>1</sup>, 戸田智美<sup>2</sup>, 峰時俊貴<sup>1</sup>, 広常正人<sup>1</sup>, 町田雅之<sup>2</sup> (<sup>1</sup>大関総研, <sup>2</sup>産総研)
- 1P-17 麹菌の新規強力プロモーター *sodM* の単離とタンパク質生産  
石田博樹, 秦 洋二, 川戸章嗣, 安部康久, 柏木 豊<sup>1</sup> (月桂冠総研・<sup>1</sup>食総研)
- 1P-18 誘導シグナルに応答した *AmyR* の核局在化  
牧田智裕, 加藤雅士, 塚越規弘, 小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)
- 1P-19 グルコースによる *AmyR* 核局在化の誘発とアミラーゼ誘導  
村越有里子, 牧田智裕, 加藤雅士, 塚越規弘, 小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)
- 1P-20 麹菌キシラナーゼ遺伝子特異的発現制御因子 *XlnR* の機能ドメイン解析  
田中寿基, 丸井淳一郎, 塚越規弘, 加藤雅士, 小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)
- 1P-21 糸状菌 CCAAT-box 結合複合体と相互作用する因子 *HapX* の機能解析  
長瀬 崇, 田中昭光\*, 小林哲夫, 塚越規弘, 加藤雅士 (名大院・生命農 \*ヒゲタ醤油)

- 1P-22 麹菌(*A.oryzae*)の固体培養において発現する転写制御因子遺伝子 *atfB* の解析  
坂本和俊, 山田 修, 秋田 修 (酒総研)
- 1P-23 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の cell integrity pathway に関与する転写制御因子をコードする *rlmA* 遺伝子の単離と機能解析  
藤岡智則, 古川健太郎, 水谷 治, 阿部敬悦, 山形洋平, 中島 佑(東北大院・農・応生科)
- 1P-24 麹菌の *KexB* 遺伝子破壊は形態形成シグナル伝達経路に異常を及ぼす  
水谷治, 椎名松子, 藤岡智則, 山形洋平, 阿部敬悦, 中島佑 (東北大院農・応生科)
- 1P-25 *Aspergillus nidulans* のクラス II キチン合成酵素 ChsA の菌糸内局在部位の解析  
一宮維幸, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- 1P-26 糸状菌 *Aspergillus nidulans* のクラス I キチン合成酵素 ChsC の菌糸内局在部位に関する解析  
山田絵美, 一宮維幸, 堀内裕之, 太田明德 (東大・農生科・応生工)
- 1P-27 白麹菌の GPI アンカー型細胞壁タンパク質  
中村洋二郎<sup>1</sup>, 下飯 仁<sup>1,2</sup>, 伊藤 清<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>広大院・先端研 <sup>2</sup>酒類総合研究所)
- 1P-28 Woronin body 形成に関与する *A. oryzae* HexA の機能および局在解析  
丸山潤一, Juvvadi Praveen Rao, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- 1P-29 EGFP を用いた *A. oryzae* ペルオキシソームタンパク質の局在解析  
三並正芳, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- 1P-30 麹菌 *Aspergillus oryzae* は液胞膜 ATPase サブユニット VMA3 相同遺伝子を 2 つ持つ  
奈良秀徳, Praveen Rao Juvvadi, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- 1P-31 麹菌 *Aspergillus oryzae* における *Aovam3* 遺伝子の機能解析  
正路淳也, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- 1P-32 麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるオートファジーの可視化  
大根田守, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- 1P-33 麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連遺伝子 *Aoaut7* の単離および解析  
菊間隆志, 大根田守, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- 1P-34 *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)
- 1P-35 麹菌 *Aspergillus oryzae* の分生子形成過程における核移動の追跡  
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)
- 1P-36 *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)
- 1P-37 *Aspergillus nidulans* におけるアミノ酸代謝系と分生子発芽の制御機構との関連  
水谷真也, 伊藤建夫, 伊藤靖夫 (信州大・理)

**特別講演 1      16:00-16:45**

**Genomics of *Fusarium graminearum*: Priorities and plans for genome annotation, functional analysis and integration of the genetic map with the draft genome sequence assembly.**

H. Corby Kistler<sup>1</sup>, L. R. Gale<sup>1</sup>, Jin-Rong Xu<sup>2</sup>, Frances Trail<sup>3</sup>, Bruce Birren<sup>4</sup>, and the *Gibberella zeae* International Genome Initiative (GIGI).

<sup>1</sup>USDA ARS Cereal Disease Laboratory and University of Minnesota, St. Paul, MN, USA; <sup>2</sup>Purdue University, West Lafayette, IN, USA; <sup>3</sup>Michigan State University, East Lansing, MI, USA; <sup>4</sup>Whitehead Institute, Center for Genome Research, MIT, Cambridge, MA, USA.

**特別講演 2      16:45-17:30**

**A family of phospholipases A2 unique to filamentous microorganismus**

S. Ottonello

Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Parma, I-43100 Parma, Italy

**特別講演 3      17:40-18:25**

**Regularory mechanisms involved in expression and secretion of enzymes by *Trichoderma reesei*.**

Merja Penttilä, Markku Saloheimo, Tiina Pakula and Mari Valkonen

VTT Biotechnology, FIN-02044 VTT, Finland

11月7日(木)

シンポジウム「新技術・新手法を用いた糸状菌研究の進展」 10:00-11:30

**S-1**

*Aspergillus oryzae* cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子転写解析  
阿部敬悦 (東北大学大学院農学研究科)

**S-2**

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) 分泌タンパク質のプロテオーム解析  
岩下和裕 (酒類総合研究所)

**S-3**

GFP を用いた麹菌 (*Aspergillus oryzae*) のオルガネラの動態解析  
丸山潤一、北本勝ひこ (東京大学大学院農学生命科学研究科)

特別講演 4 11:30-12:15

**Imaging the dynamics and organization of organelles at high spatial resolution at high spatial resolution in living hyphae**

Nick D. Read

Fungal Cell Biology Group, Institute of Cell and Molecular Biology, Rutherford Building, University of Edinburgh, Edinburgh EH9 3JH, Scotland

ポスター発表 (2P-1~2P-36) 13:30~15:30

- 2P-1 イネごま葉枯病菌におけるメラニン合成系遺伝子群の近紫外光による転写調節  
木原淳二, 森脇明弘, 田中千尋<sup>1</sup>, 荒瀬 栄, 本田雄一<sup>2</sup> (島根大生資・<sup>1</sup>京大院農・<sup>2</sup>島根大)
- 2P-2 ウリ類炭そ病菌の *CMR2* (*Colletotrichum melanin regulator 2*) 遺伝子は付着器  
のメラニン合成制御に関与している  
辻 元人・藤井 聡・廣瀬知華・白石友紀・久保康之 (岡山大農・京府大院農)
- 2P-3 *Fusarium oxysporum* の孢子形成遺伝子 *RENI* および *FoSTUA* の機能  
小原敏明, 柘植尚志 (名大院生農)
- 2P-4 REMI 法による *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* 病原性変異株の作出  
須賀晴久, 森崎陽一, 百町満朗\* (岐阜大・生命科学総合実験セ, \*岐阜大・農)
- 2P-5 *Fusarium oxysporum* の *Ras* 遺伝子のクローニングと解析  
吉田隆延・澤田宏之・高橋真美・有江 力\*・土屋健一 (農環研・\*農工大農)
- 2P-6 *Fusarium oxysporum* より単離したセロピオース：キノン酸化還元酵素様遺伝子の  
解析  
川部眞登, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大・農)
- 2P-7 イネいもち病菌の lysophospholipase 遺伝子(*LPLI*)の単離と解析  
金森正樹, 夏目雅裕, 有江 力, 寺岡 徹, 鎌倉高志\* (農工大農・\*東理大)
- 2P-8 Detection of distinct subpopulations of *Fusarium graminearum* lineage 7  
Liane Rosewich Gale<sup>1</sup>, Todd Ward<sup>2</sup>, Virgilio Balmas<sup>3</sup>, and H. Corby Kistler<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>USDA-ARS, Univ. Minnesota, MN 55108, <sup>2</sup>USDA-ARS Microbial Genomics Research Unit, Peoria,  
IL 61604, <sup>3</sup>Universita degli Studi di Sassari, I-07100 Sassari.)
- 2P-9 Genetics of Host Specificity of *Ascochyta* spp. Infecting Legumes  
Tobin L. Peever, M. Hernandez-Bello and W.J. Kaiser  
(Dept. of Plant Pathology, Washington State Univ., Pullman, WA 99164-6430, USA)
- 2P-10 いもち病菌日本産菌株のゲノム構造解析  
曾根輝雄, 富田房男 (北大院農・応用菌学)
- 2P-11 *Rhizopus* 属菌株の分子遺伝学的分類  
阿部 歩, 曾根輝雄, \*斎藤勝一, \*小田有二, 浅野行蔵 (北大院農・応用菌学, \*北海道農業セ)
- 2P-12 酒総研保有 *Aspergillus oryzae* のアフマトキシン生合成遺伝子群の解析  
富永美穂子, 李 允恵, 林 梨咲, 山田 修, 坂本和俊, 秋田 修 (酒総研)
- 2P-13 黒麹菌 *Aspergillus niger* No. 12 株由来の細胞外  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼの性質  
とコードする遺伝子の解析  
森山 聡, 重 隆人, 川崎荘志, 六車三治男, 太田一良 (宮崎大・農・応生科)
- 2P-14 ヒゲカビキチンデアセチラーゼ遺伝子のクローニング及び発現  
石橋靖洋, 村山肇子 (関東学院大学・工)
- 2P-15 糸状菌由来リシルオキシダーゼの発現  
結城健介<sup>1</sup>, 鈴木哉子<sup>1</sup>, 東本篤樹<sup>1</sup>, 北本則行<sup>2</sup>, 小出芳直<sup>1</sup>  
(天野エンザイム(株) 岐研<sup>1</sup>, 愛知産技研・食工技セ<sup>2</sup>)
- 2P-16 *Aspergillus oryzae* プロリダーゼ遺伝子のクローニング  
仲原丈晴, 伊藤考太郎, 小山泰二 (キッコーマン・研究本部)
- 2P-17 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の ER 型マンノシダーゼ遺伝子(*manE*)の解析  
矢原明典<sup>1,2</sup>, 赤尾 健<sup>1,3</sup>, 吉田 孝<sup>4</sup>, 坂本和俊<sup>1</sup>, 山田 修<sup>1</sup>, 秋田 修<sup>1,2</sup>  
(1 酒総研 微生物, 2 広島大院・先端研, 3 現・国税庁, 4 弘前大 農学生命科学部)
- 2P-18 Molecular characterization of two secretory phospholipases A<sub>2</sub> in  
*Aspergillus oryzae*.  
Yoshito Nakanishi, Tomoyuki Nakahama, Angelo Bolchi\*, Simone Ottonello\*, Manabu Arioka, and  
Katsuhiko Kitamoto  
(Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, \*Dept. of Biochem. Mol. Biol., Univ. of Parma, Italy)
- 2P-19 *Aspergillus awamori* 由来フェルロイルエステラーゼの Lid 様ドメインの機能解析  
高橋健二\*, 小関卓也, 橋爪克己 (\*広大生物圏, 酒類総研)



- 2P-20 *Aspergillus fumigatus* の産生する低分子型金属プロテアーゼ(Mep20)の多様性  
河村健志, 小瀬 愛, 今尾一郎, 山形洋平, 阿部敬悦, 中島 佑 (東北大院・農・応生科)
- 2P-21 褐色腐朽担子菌イドタケ (*Coniophora puteana*) 由来セロビオース脱水素酵素の  
キャラクタライズ  
加治佐 平, 吉田 誠, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)
- 2P-22 白色木材腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来セロビオース脱水素酵素  
における分子内および分子間電子伝達機構  
五十嵐圭日子, 吉田 誠, 鮫島正浩 (東大院・農生科) 西野武士 (日医大・一生化)
- 2P-23 白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の糖結合部位を持つ  
新規ヘムタンパク質  
吉田 誠, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)
- 2P-24 白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来のエンドグルカナーゼ  
遺伝子のクローニングとその発現挙動  
小川那瑠, 吉田 誠, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)
- 2P-25 *Phanerochaete chrysosporium* における分泌タンパク質の発現ダイナミクス解析  
湯田直樹, 志水元亨, 割石博之 (九大院・農)
- 2P-26 白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* のセルロース分解系における  
菌体外酵素のプロテオーム解析  
柳川邦子, 住吉剛史, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)  
片山 映, 西野武士 (日医大・一生化)
- 2P-27 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* 分生子発芽時に分泌される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)
- 2P-28 ストレス条件下における黄麹菌 *Aspergillus oryzae* 分生子発芽時の  
プロテオーム解析  
Nguyen Cong Ha, 竹内道雄 (農工大・農・応生)
- 2P-29 麹菌(*Aspergillus oryzae*)分泌タンパク質のプロテオーム解析  
織田 健\*, 柿菌ダララット, 家藤治幸, 秋田 修, 岩下和裕 (生研機構\*, 酒類総研)
- 2P-30 白色腐朽菌における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加にตอบสนองしたタンパク質発現ダイナミクスの解析  
志水元亨, 三浦大典, 湯田直樹, 寺本 寛, 割石博之 (九大院・農)
- 2P-31 ダイオキシシン存在下で発現する *Pleurotus pulmonarius* の遺伝子解析  
中村雅哉, 宮崎安将, 砂川政英 (森林総合研究所)
- 2P-32 Gateway システムを用いた麹菌 *A. oryzae* における有用タンパク質発現系の構築  
馬橋由佳, 菊間隆志, 大根田守, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- 2P-33 蛍光色素を用いた糸状菌菌体定量法とハイスループット変異株スクリーニング  
鈴木 聡, 竹谷博子, 松下真由美, 木村多江, 楠本憲一, 柏木 豊 (食総研)
- 2P-34 ファージディスプレイによる麹菌 *Aspergillus oryzae* の DNA 結合因子の探索  
戸田智美<sup>1</sup>, 萩原央子<sup>1</sup>, 國廣澄子<sup>1</sup>, 佐野元昭<sup>1</sup>, 桑原一郎<sup>2</sup>, 丸山一郎<sup>2</sup>, 町田雅之<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>産総研・糖鎖センター, <sup>2</sup>The Scripps Research Institute)
- 2P-35 固定化 *Aspergillus oryzae* 菌体によるキラル化合物の繰り返し光学分割  
海江田優<sup>1</sup>, 近藤昭彦<sup>2</sup>, 福田秀樹<sup>1</sup> (神戸大院・自然科学<sup>1</sup>, 神戸大・工<sup>2</sup>)
- 2P-36 担子菌ウシグソヒトヨタケの BAC ライブラリー構築と BAC DNA を用いた形質転換  
村口 元, 柳 園江 (秋田県立大・生物資源)

一般講演 (O-11~O-21) 15:30~17:42

- 15:30 O-11 Biochemical analysis and visualization of Woronin body in *A. oryzae*  
Praveen Rao Juvvadi, Kazutomo Ishi, Jun-ichi Maruyama and Katsuhiko Kitamoto  
(Dept.of Biotechnology, Univ. of Tokyo)
- 15:42 O-12 麹菌 *A.oryzae* における  $\beta$ -N-Acetylgulucosaminidase の局在機構と機能の解析  
岩崎琢磨、丸山潤一、中島春紫、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工、)
- 15:54 O-13 *Aspergillus nidulans* のプロセッシング酵素遺伝子 *kexB* 破壊株の解析  
古川健太郎、水谷 治、藤岡智則、徳岡昌文、五味勝也、阿部敬悦、山形洋平、中島 佑  
(東北大院農・応生科)
- 16:06 O-14 糸状菌 *Aspergillus nidulans* のキチン合成酵素 CsmA のミオシン様  
ドメインがその局在化、機能に果たす役割の解析  
竹下典男、堀内裕之、太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- 16:18 O-15 いもち病菌 *Magnaporthe oryzae* における RNA サイレンシング  
角谷直樹、中屋敷均、土佐幸雄、眞山滋志 (神戸大・自然科学)
- 16:30 O-16 *Pyricularia* 属菌集団における染色体構造の多様性  
中馬いづみ、磯部千尋、土佐幸雄、中屋敷均、眞山滋志 (神戸大農)
- 16:42 O-17 *Aspergillus nidulans* における遺伝的形質転換の制御  
夏目豊彰、中岡 源、江草真由美\*, 児玉基一朗\*, 伊藤靖夫 (信州大・理, \*鳥取大・農)
- 16:54 O-18 麹菌 *Aspergillus oryzae* における翻訳機構  
—5'非翻訳領域 (5'-UTR) の改変による高翻訳系の構築—  
幸田明生, 峰時俊貴, 尾関健二, 広常正人 (大関総研)
- 17:06 O-19 *Aspergillus oryzae* のマルトース資化遺伝子クラスターの発現および  
機能解析  
長谷川祥子, 巢山治彦, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- 17:18 O-20 タカアミラーゼ高生産麹菌株の cDNA マイクロアレイ解析  
丹野丈記, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- 17:30 O-21 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の固体培養における発現プロファイリング  
有馬寿英<sup>1</sup>, 赤尾 健<sup>2,3</sup>, 坂本和俊<sup>2</sup>, 岩下和裕<sup>2</sup>, 山田 修<sup>2</sup>, 秋田 修<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>生研機構, <sup>2</sup>酒総研, <sup>3</sup>国税庁)

# **Special Lectures**

## 特別講演 1

### **Genomics of *Fusarium graminearum*: Priorities and plans for genome annotation, functional analysis and integration of the genetic map with the draft genome sequence assembly.**

H. Corby Kistler<sup>1</sup>, L. R. Gale<sup>1</sup>, Jin-Rong Xu<sup>2</sup>, Frances Trail<sup>3</sup>, Bruce Birren<sup>4</sup>, and the *Gibberella zea* International Genome Initiative (GIGI).

<sup>1</sup>USDA ARS Cereal Disease Laboratory and University of Minnesota, St. Paul, MN, USA; <sup>2</sup>Purdue University, West Lafayette, IN, USA; <sup>3</sup>Michigan State University, East Lansing, MI, USA; <sup>4</sup>Whitehead Institute, Center for Genome Research, MIT, Cambridge, MA, USA.

During the past decade, *Fusarium* head blight (FHB), has emerged as a plant disease with great negative impact of the dependable and profitable production of wheat and barley. FHB, also known as “scab,” is caused by the filamentous fungus *Fusarium graminearum* (sexual state *Gibberella zea*), and has reached epidemic proportions in the North America, Europe and Asia, causing yield losses and price discounts resulting from reduced seed quality. In addition to being an important pathogen on wheat and barley, *F. graminearum* also causes stalk and ear rots of maize and infects other small grains. The pathogen poses a two-fold threat: first, infested cereals are significantly reduced in seed quality and yield, and second, scabby grain is contaminated with trichothecene and estrogenic mycotoxins, making it unsuitable for food or feed.

Pathogenesis and toxin production may be viewed as developmental events, amenable to study by genomic approaches. We have been part of an international effort to develop genomic resources for the fungus in order to advance studies on processes essential to its pathogenicity. Over 10,000 ESTs of *F. graminearum* have been sequenced from cDNA libraries constructed with RNAs isolated from developing perithecia and mycelia grown in complete medium, or nitrogen- or carbon-starved cultures. We have also sequenced over 2000 clones from four subtraction libraries enriched for genes expressed during wheat head infection. These libraries have played an indispensable role in *ab initio* gene identification. A 10X whole genome shotgun sequence assembly of the *F. graminearum* genome has been obtained at the Whitehead Institute, Center for Genome Research from random plasmid (4 kb insert), fosmid (40 kb average), and BAC (110 kb average) libraries of *F. graminearum* wild-type strain PH-1 (FGSC 9075, NRRL 31084). The draft assembly is of high quality and remarkably complete owing to the paucity of middle repetitive elements and low complexity DNA in the genome. The entire 36 Mb assembly consists of only 511 contigs contained within 43 supercontigs (scaffolds). Approximately 98% of all *F. graminearum* ESTs available in GenBank have significant alignment when searched against the genome sequence assembly. Using the gene prediction software, FGENESH, using organism-specific parameters for *Neurospora crassa*, 11,629 protein-coding genes have been identified and a set of predicted protein sequences have been obtained.

A genetic map linked to the sequence assembly has been constructed using a cross between the type strain PH-1 and another *F. graminearum* lineage 7 strain from Minnesota, 00-676 (NRRL 34097). A total of 112 random ascospore progeny were analyzed for 122 genetic loci. Genetic markers consist of single nucleotide polymorphisms (n=66), RFLPs (n= 29), and microsatellites (n=27). Most SNPs and RFLPs were identified by sequencing alleles derived from EST loci for both parental strains; others were based on sequences at the ends of

smaller scaffolds. Microsatellites were obtained from a genome-wide scan for simple tandem repeats and then screening for polymorphism at selected loci.

Genes suspected to be involved in plant pathogenicity for *F. graminearum*, such as MAP kinase *MGVI*, have been disrupted and demonstrated to be essential for pathogenesis. We also have constructed gene disruption vectors for *F. graminearum* homologs of the *Cercospora kikuchii*, toxin transporter *CFP*, and other suspected pathogenicity factors. We have transformed linearized vectors into PH-1 and identified putative knockout mutants by PCR screening of transformants. Preliminary data indicates that the *CFP* homolog is dispensable for fungal pathogenicity in wheat infection assays.

Random plasmid insertion mutagenesis also has been used for forward genetic screens in order to identify genes important for pathogenicity. In the past four years, thousands of transformants of *F. graminearum* strain PH-1 carrying random insertion of transforming vectors have been individually isolated and preserved. Recently several mutants that show a range of pathogenicity defects have been identified. Some of them are tagged in novel genes or known genes previously not associated with disease progression. For example, one mutant shows no ability to induce plant cell death or cause necrotic symptoms on the plant; the gene for 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase (*HCRI*), a key enzyme involved in isoprenoid biosynthesis, is disrupted in this mutant. Further characterization of genes disrupted in insertional mutants is in progress.

The goal of future research is to further identify and characterize genes important for disease expression in *F. graminearum* using microarray analyses and targeted mutation of selected genes. To this end, plans are underway to utilize genomic resources presently available for *F. graminearum* to develop GeneChip microarrays. Gene expression profiles (*in planta* and *in vitro*) will be obtained for different infection and developmental stages, in mutants defective in plant infection and during toxin production. We plan to build upon these resources to develop an understanding of gene networks operative during the complex interactions between plants and *F. graminearum*.

## 特別講演 2

### A FAMILY OF PHOSPHOLIPASES A2 UNIQUE TO FILAMENTOUS MICROORGANISMS

S. Ottonello

Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Parma, I-43100 Parma, Italy

Following the identification in the symbiotic ascomycete *Tuber borchii* of TbSP1, the first phospholipase A2 (PLA2) to be described in microorganisms, various approaches have been utilized to try to better define the expression profile, mode of regulation, microorganism distribution and possible physiological significance of this enzyme. TbSP1 identified a novel group of Ca<sup>2+</sup>-dependent PLA2s, named group XIII, with molecular masses ranging from 19 to 29 kDa, a catalytic histidine/aspartate diad, four to six cysteines and the active site consensus sequence CX(3)PX(2)PXGFXFX(3)CXRHDFGYXN (where underlined residues indicate amino acids that are similarly conserved in a wide range of animal PLA2s). The only unique feature of the *Tuber* enzyme, compared to its homologs from other microorganisms, is a putative cell adhesion motif RGD, previously found in a few fungal adhesins, including the Symbiosis-Regulated Acidic Proteins (SRAP<sub>31-32</sub>) from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. The presence of this motif might explain the dual localization of TbSP1, which is both released into the culture medium and associated with the chitin-rich, inner layer of the fungal cell wall. TbSP1 is constitutively expressed in all three stages of the *Tuber* life-cycle (vegetative mycelia, mycorrhizae, fruitbodies). However, similarly to *Pisolithus* SRAPs, it is expressed at somewhat higher levels in mycorrhizae, with a marked preference for extraradical hyphae compared to symbiotic hyphae in contacts with the roots. This suggests that TbSP1 expression is preferentially associated with apical growth and the nutrient-poor environment typically experienced by extraradical hyphae rather than with fungus-plant interaction and symbiosis establishment. Indeed, nutrient limitation (either nitrogen or carbon, but not phosphate) is the main stimulus causing a strong and fast upregulation of TbSP1 in free-living mycelia. A substantial increase in *TbSP1* mRNA levels is, in fact, detected at an early time of nitrogen deprivation (when only glutamine levels start to be depressed) and precedes by at least 2/3 days the compensatory upregulation of true N assimilation mRNAs such as those coding for a high-affinity ammonium transporter, a nitrate transporter and glutamine synthetase. The same is true for the TbSP1 protein, whose total levels and phospholipid hydrolyzing activity are both higher in nutrient-starved than in nutrient-sufficient mycelia. It thus appears that one of the earliest events accompanying nutrient starvation in *Tuber* is the enhancement of a very specific lipolytic activity.

Group XIII PLA2s appear to be restricted to filamentous microorganisms. Besides in three different *Streptomyces* species, homologues of the *Tuber* PLA2 have been found in the ascomycetes *Helicosporium* and *Fusarium*, in the deuteromycete *Verticillium dahliae*, and in the wholly sequenced genomes of the ascomycetes *Neurospora crassa* and *Magnaporthe grisea*, both of which contain two paralogous PLA2 sequences. This fairly restricted distribution contrasts with the widespread occurrence of phospholipase/lisophospholipase enzymes (PLBs), and it raises interesting questions as to the functional link between *sn*-2 position-specific hydrolysis of glycerophospholipids and multicellularity-related phenomena (such as apical growth) as well as to the possible existence of novel lipid-mediated signalling pathways, and to the functional specialization of the two PLA2 paralogs that are likely to be present in all filamentous fungi. To begin to address these questions, we are

conducting an LC-MS analysis of the free fatty acid pool of recombinant TbSP1-treated (yet nutrient-sufficient) or nitrogen-deprived *Tuber* mycelia. In both cases, we observe the preferential release of polyunsaturated fatty acids (in particular linoleic and linolenic acid) as well as the appearance, in nitrogen-starved mycelia, of their di- and tri-hydroxy derivatives (oxylipins). Results will also be presented concerning the functional analysis of the two *Neurospora* PLA2s (named NcPL1 and NcPL2), which are characterized by distinct pH optima (4 and 8, respectively) and seem to be differentially expressed in response to nutrient starvation and other types of stress.

*Work supported by the Ministry of University and Research of Italy (FIRB Program) and by the Regione Emilia-Romagna.*

### 特別講演 3

#### **Regularory mechanisms involved in expression and secretion of enzymes by *Trichoderma reesei*.**

Merja Penttilä, Markku Saloheimo, Tiina Pakula and Mari Valkonen

VTT Biotechnology, FIN-02044 VTT, Finland

The filamentous fungus *Trichoderma reesei* is an industrial fungus that produces in particular cellulose and hemicellulose hydrolysing enzymes used in various industrial applications. Production of these enzymes is repressed by glucose but in inducing conditions the fungus can secrete several tens of grams of cellulases into the culture medium. The strong cellobiohydrolase (CBHI) promoter has also been used for heterologous protein production in this fungus and the CBHI coding region as a fusion partner.

We have studied the signalling pathways occurring in response to overloading the secretory pathway or production of heterologous proteins in *T.reesei*. Several *sec* genes and folding factor genes have been isolated, as well as the UPR (unfolded protein response) pathway regulator *hac1* and the kinase *ire1*. As in *Saccharomyces cerevisiae*, upon UPR induction active HAC protein is generated through unconventional splicing but in addition it seems that also mRNA start site selection and translational control are involved. We have shown that overexpression of the active form of HAC leads to increased protein secretion in both yeast and filamentous fungi. An other novel signalling pathway (RESS, repression under secretion stress) that appears to function in *T.reesei* is controlling transcription of the endogenous secreted proteins. Under secretion stress conditions, provoked by drugs or expression of foreign proteins, transcription of secreted proteins is down-regulated. Subtraction libraries and proteomics methods are used to analyse further cellular responses to secretion stress.



## 特別講演 4

### **Imaging the dynamics and organization of organelles at high spatial resolution at high spatial resolution in living hyphae**

Nick D. Read

Fungal Cell Biology Group, Institute of Cell and Molecular Biology, Rutherford Building, University of Edinburgh, Edinburgh EH9 3JH, Scotland

A new perspective on the organisation and dynamics of organelles in fungal cells is arising from studies involving live-cell imaging at high spatial resolution. We have developed 'lose-dose' imaging techniques using laser scanning confocal microscopy and two-photon microscopy which allow the analysis of living fungal hyphae using a range of fluorescent probes without significantly compromising cell growth or organisation. Vital fluorescent dyes, or recombinant GFP specifically targeted to organelles, have been used. Organelles that we are routinely imaging in living hyphae, and the best dyes we have found to stain these organelles, are: the Spitzenkörper (FM4-64), mitochondria (Rhodamine 123, FM1-43 and DASPMI), vacuoles (DFFDA, FM4-64) and the endoplasmic reticulum (ER-tracker). We have also used targeted GFP to image nuclei, mitochondria, ER, Golgi, vacuoles and perioxisomes. Double labelling of living cells has proved very successful with certain probe combinations. Besides showing the organisation and dynamics of a range of different organelles in this presentation, emphasis will be placed on our understanding of how these organelles are integrated into the vesicle trafficking network during hyphal tip growth. Examples of movies showing organelles in living hyphae can be found at <http://www.fungalcell.org/> and are available on CD-ROM as an educational resource from this website.

# Symposium

新技術・新手法を用いた糸状菌研究の進展

## *Aspergillus oryzae* cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子転写解析

阿部敬悦 (東北大学大学院農学研究科)

### 1.はじめに - 麹菌 EST 解析から DNA マイクロアレイへ

麹菌は糸状菌類(カビ)の中で特異な存在である。多くのカビが生物学のモデルや動植物の感染菌として研究されてきたが、麹菌は産業利用が先行した菌種であり、伝統的醸造産業において1000年以上にも渡って利用されてきたことから国菌とも呼ばれている。麹菌産業が農産加工として発展する過程で長期に渡るインフラ投資が行われた結果、日本は世界最大のカビ生産国となった。醸造発酵産業は麹菌の有する高いタンパク質-酵素分泌能力を利用したもので、現在では酵素工業・遺伝子組み換え技術によるタンパク質生産工業にまで発展し、関連産業を含めた麹菌産業の規模は数兆円に達すると考えられている。麹菌にはこのような産業応用の事例がありながら、有性世代が観察されないことや多核である事に起因する技術的な障害のために、モデル生物では可能な古典的遺伝解析が適用できず、菌株の遺伝的育種改良は遅延要因していた。近年になり、この障害はむしろ麹菌の網羅的遺伝解析(全ゲノム解析)を行うことを促す要因となった<sup>1)</sup>。

1996年から国際的に糸状菌のゲノム解析の動きが始まり、1998年夏には米国企業が *A. nidulans* のゲノムドラフト解析完了の発表を行ったことから、国内産業界より早急な麹菌ゲノム解析の要望が出された。そこで全ゲノム解析実施に先立ち、より少ない労力と資金で短期間に多くの価値ある遺伝子情報が取得できる EST(Expressed sequence tag)解析プロジェクトを先行させた。EST 解析は、麹菌産業界の支援を受けて、旧国研及び大学の公的研究機関の協力により、2000年末までに約17,000個のクローンの解析が終了し、5,000個程度の遺伝子の部分塩基配列が取得された<sup>1)</sup>。これらのデータは、産業技術総合研究所において公開されている(<http://www.aist.go.jp/RIODB/ffdb/index.html>)。これらの成果を受けて、我々は2000年度に麹菌 cDNA クローンを搭載した第1世代麹菌 DNA マイクロアレイの開発を行った。

### 2.第1世代麹菌 DNA マイクロアレイの作製

EST 解析並びに、現在進行中の麹菌全ゲノム解析から明らかになりつつある麹菌の全遺伝子について<sup>1)</sup>、様々な条件におけるそれら遺伝子の発現様式を網羅的に把握することは、カビの多様な生命現象の解明に寄与するのみならず、産業的にも培養過程や育種菌株を解析する新たな手法を提供し、産業プロセスの最適化を可能とするものである。EST 解析の結果から示されるように、液体培養と固体培養では発現する遺伝子種に大きな違いが認められることから、異なる培養条件での発現を網羅的に解析することが望まれていた。EST 解析情報をもとにして得られた EST 独立クローンは、cDNA ライブラリーとして保存されている。今回は5,000を越える EST クローンのうち EST データベース中で重複頻度の高いクローンを主に約2,000個を選択して PCR で増幅し、DNA マイクロアレイを作製した。

### 3. 第1世代麹菌 DNA マイクロアレイの評価

本マイクロアレイの評価を目的に、EST 解析の AC 条件(グルコース存在条件)と AN 条件(貧栄養条件 - グルコース非存在条件)での発現頻度上位20~30位の遺伝子と、同様の条件で培養した麹菌菌体の DNA マイクロアレイ解析の結果を比較したところ、AC, AN 両条件ともに、EST 頻度情報とマイクロアレイによる相対発現強度の結果は概ね一致しており、本マイクロアレイの有効性が確認された<sup>2)</sup>。両条件における麹菌解糖系遺伝子群の遺伝子発現はノーザン法により解析されているが<sup>3)</sup>、今回は解糖系と TCA サイクルの遺伝子群の遺伝子発現を DNA マイクロアレイを用いて解析した。その結果、フラクトース-1,6-ビスホスファターゼ遺伝子を除き、ヘキソース輸送体遺伝子を含む解糖系全遺伝子群の発現量は、AC 条件では高く、AN 条件では低いことが明らかとなり、ノーザン解析の結果とも一致した。この結果からも本マイクロアレイの信頼性が認められた。ピルビン酸からエタノールの生成に関わるピルビン酸脱炭酸酵素、アルコール脱水素酵素 A(異化的)の遺伝子も、AC 条件で高い発現を示し、AN 条件で低い発現を示した。逆にエタノール資化に関与するアルコール脱水素酵素 B、アセトアルデヒド脱水素酵素、アセチル CoA 合成酵素の各遺伝子は AN 条件で高い発現を示し、AC 条件では発現が強く抑制されていた。

本マイクロアレイには TCA サイクルの8個の遺伝子のうちフマレート脱水素酵素を除く7個の遺伝子が搭載されており、2-ケトグルタール酸脱水素酵素とアコニターゼを除く、クエン酸合成酵素からサクシニル CoA 合成酵素までの遺伝子発現は AC 条件で比較的高かったが、逆にアコニターゼとリンゴ酸脱水素酵素の遺伝子発現ではやや抑制されていた。TCA は全体的には構成的な発現様式を示している

ようである。これらの結果は、出芽酵母の TCA 関連遺伝子の発現がグルコースで抑制される様式や、クエン酸合成酵素遺伝子の発現がグルコースで抑制される糸状菌 *Trichoderma reesei* とも異なり、麹菌が好気条件においてグルコースを解糖系と TCA サイクルで、良好に代謝し得ることを示唆している。この事例は、マイクロアレイの代謝推定への有効性を示すものである<sup>2)</sup>。

#### 4. 麹菌 DNA マイクロアレイを用いた研究開発事例

##### 1) 固体培養における加水分解酵素遺伝子群とエネルギー代謝系遺伝子群の発現解析

固体バイオマスである小麦麩、米糠、オカラの3種を基質とする固体培地に麹菌を生育させ、代表的な加水分解酵素群の遺伝子発現を先述のグルコース液体培地と比較した。その際に解糖系-TCA サイクルの遺伝子発現様式も比較した。3種のバイオマス培地の中で小麦麩が最も多種類の加水分解酵素遺伝子の発現を示した。興味深いことに、3種のバイオマス固体培地の中では小麦麩の解糖系-TCA系遺伝子群の発現が最も低かった。我々は、小麦麩培地の低水分・低デンプン量条件が菌体へのグルコース供給の制約条件となりグルコース抑制解除が起こり、酵素発現多様性の一因となっていると想像している。酵素生産時の代謝酵素活性自体を測定してはいないが、遺伝子発現レベルでエネルギー供給系の状態を把握し酵素生産パターンと関連付けることは、プロセス開発、菌株育種に新たな視点を与える可能性がある<sup>2)</sup>。

##### 2) 生分解性プラスチック分解促進因子の探索

我々は麹菌生産インフラの活用を目的に、麹菌を用いた生分解性プラスチックの大規模分解リサイクルシステムの開発を行っている。従来、生分解性プラスチックの分解は分解酵素のみに着目したものが殆どであったが、DNA マイクロアレイを利用して、新規の生分解性プラスチック分解促進因子の探索を行った。麹菌 RIB40 株に生分解性プラスチックであるポリブチレンサクシネート(PBS)の分解能を認め、PBS 乳化液分解時の DNA マイクロアレイ解析を行った結果、液体培養条件にも関わらずハイドロホーピン遺伝子が高発現していることが明らかとなった<sup>4)</sup>。そこでハイドロホーピン高発現株を作出したところ、その株は固形 PBS 表面に旺盛に生育した。この事例では、簡単なアッセイ系を利用できない因子の探索にも DNA マイクロアレイが有効であることが示している。

##### 3) 麹菌プロセッシングプロテアーゼ遺伝子 *kexB* 遺伝子破壊株の解析

我々は、麹菌の *kexB* 遺伝子の機能解析を目的に野生型の RIB40 株より遺伝子破壊株(*kexB* Δ)を作製した。*kexB* Δ株は、寒天培地において孢子形成能低下・多分岐の菌糸・菌糸成長の低下などの形態異常の表現型を示した。この表現型はソルピトールや NaCl の添加により高浸透圧にすることで回復した。*kexB* Δ株を通常培地と高浸透圧培地で、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った結果、*kexB* Δ株では野生株と比較し 200 以上の遺伝子の転写が有意に変化し、高浸透圧下においては、その形態異常が回復すると同時に遺伝子の転写異常も回復していた。転写異常を示した遺伝子群の中で、β-グルカン合成酵素、キチン合成酵素群の細胞壁関連遺伝子群の発現上昇は cell integrity シグナル伝達系経路の活性化によるものと推定され、形態変化との関係について更に解析を進めている<sup>5)</sup>。この事例は、転写制御のプロファイル解析からシグナル伝達も含む、制御ネットワークを抽出した例である。

以上、DNA マイクロアレイは麹菌を多数の遺伝子から成る生物として理解する新手法を提供すると同時に、産業プロセス開発に新たな視点を提供することが明らかとなった。最近、酒類研が残り 3000EST クローンを搭載した DNA マイクロアレイも開発しており、さらなる高密度アレイの企画と安定供給が期待されている。

本マイクロアレイの EST クローンは主に酒類研と産総研より分譲を受け、その開発は東北大学未来科学技術共同研究センターにおいて、NEDO の支援により中島研究室、五味研究室の共同で行ったものである。

#### 参考文献

- 1)五味,阿部,町田: 化学と生物 40,802-812 (2002)
- 2)Maeda H. et al.: submitted
- 3)Nakajima K. et al.: Curr. Genet. 37, 322-327 (2000)
- 4)米田,高橋,前田,山形,阿部,長谷川,五味,中島: H14 年度生物工学会講演要旨集, p267 (2002)
- 5)Mizutani O. et. al.: submitted

#### Transcriptional analysis of *Aspergillus oryzae* genes using cDNA microarrays.

Keietsu Abe (Graduate Sch. of Agricultural Sciences, Tohoku University)

## 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) 分泌タンパク質のプロテオーム解析

酒類総合研究所 岩下和裕

はじめに

黄麹菌(*Aspergillus oryzae*)をはじめとする麹菌は、酒類、醤油、味噌など、我が国の伝統発酵産業に広く利用されてきた重要な菌類で、まさに「国菌」に相応しい微生物である。麹菌の最大の魅力は、多種多量なタンパク質の並はずれた生産能である。伝統的発酵産業では、この麹菌が生産する酵素が重要な働きを有している事は言うまでもない。また、その高い酵素生産性から、他の産業でも様々な酵素の供給源としても利用され、その安全性から異種タンパク質生産のホストとしても利用されている。このように、麹菌の持つ並はずれたタンパク質生産能は、産業上もっとも重要なキャラクターである。

このため、酵素遺伝子のクローニング、発現解析や、異種タンパク質生産を中心に数多くの遺伝子レベルの研究がなされている。しかし、発現制御系や分泌経路については個々の遺伝子についての研究が主であり、発現制御系全体、分泌経路全体等については、十分な知見が得られていると言うにはほど遠い。また、麹菌では生産されない異種タンパク質が数多くあるなど、実用面での理解も十分であるとはいえない。しかしここ数年、EST解析やゲノム解析など、基礎的な遺伝情報が急速に蓄積し、比較ゲノミクスや DNA マイクロアレイの利用など、体系的なポストゲノムレベルの研究を行う基盤が整ってきている。

麹菌は固体培養を行うことで、最もそのタンパク質生産能を発揮する。この麹造りには、長年の経験に基づいたノウハウが非常に多く盛り込まれており、現象論的な研究や培養工学的な研究も数多くなされている。また、1998年に固体培養特異的なグルコアミラーゼ (*glaB*) 遺伝子がクローニングされたのをきっかけに、米麹でのプロテアーゼ遺伝子の発現解析やサブトラクションによる固体培養特異的遺伝子の単離など、分子生物学的研究が盛んになっている。

このような流れの中、演者らは麹菌のもっとも重要な特徴であるタンパク質生産性について、直接かつ体系的に研究を行うことを目的とし、EST情報、ゲノム情報およびマススペクトロメトリーを利用した麹菌タンパク質の同定システムを構築した。また、効率的にタンパク質の同定を行うための In gel deglycosylation 法の開発を行った。さらに、固体培養でのタンパク質生産について体系的な研究を行うために、固体培養、液体培養間での分泌タンパク質のプロテオーム解析を行ったので、ここで紹介させていただきたい。

### In gel deglycosylation 法の開発

麹菌のタンパク質同定システムを構築するに当たって、我々は、操作の簡便性、メンテナンスの簡便性から、2D-PEGEによるディスプレイ法とマトリクス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間質量分析装置 (MALDI-TOF MS) を利用する事とした。一般に、マススペクトロメトリーを利用したタンパク質の解析法では、トリプシン等の部位特異的プロテアーゼにより消化をし、得られたペプチドの解析を行う。しかし、麹菌は多種多様なプロテアーゼ、ペプチダーゼを生産することから、多くの分泌タンパク質がプロテアーゼ耐性を獲得している。さらに、分泌タンパク質の多くは、様々な糖鎖の修飾を受けている。特に N-結合型糖鎖は分子量が大きく、多様性を有するために、解析の妨げとなり、また、タンパク質のプロテアーゼ耐性の一因にもなっている。そこで、分子量が小さいグリコペプチダーゼ F による In gel deglycosylation 法の開発を行った。比較的糖鎖修飾量の多い白麹菌の  $\beta$ -グルコシダーゼ EX-2 をモデルタンパク質として、酵素濃度等の検討を行い、反応条件を決定した。In gel deglycosylation 法を利用することで、sequence coverage が 12.4% から 20.9% へと大幅に上昇し、タンパク質同定ソフト Mascot による同定スコアも 72 から 104 へと大幅に上昇した。このことから、In gel deglycosylation 法は、麹菌分泌タンパク質のマス解析に有効であることが明らかとなった。

### 固体培養、液体培養分泌タンパク質のディファレンシャルディスプレイとタンパク質同定

まず、麹菌のタンパク質生産の概要について明らかとするために、小麦フスマおよび小麦フスマ抽出液を用い、固体、液体培養での麹菌分泌タンパク質の経時的なプロファイル解析を行った。その結果、固体培養、液体培養ともに多くのタンパク質が pI 3.5~5.0 の範囲に分布することが明らかとなった。また、培養開始からおよそ 24 時間でフスマ由来のタンパク質が消失し、麹菌由来のタンパク質がメイン

となることが明らかとなった。培養 36 時間では、高分子のタンパク質が多く見られたが、培養 40 時間では低分子側にもスポットが観察された。しかし、タンパク質スポットの分布については、固体培養、液体培養間で大きく異なっていた。

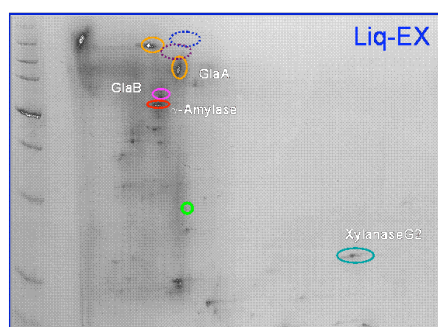
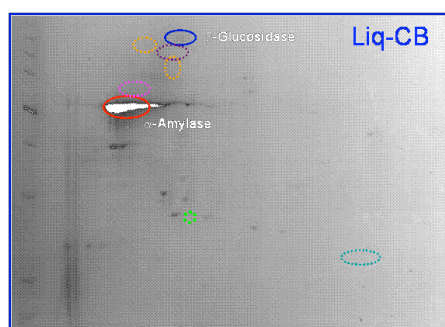
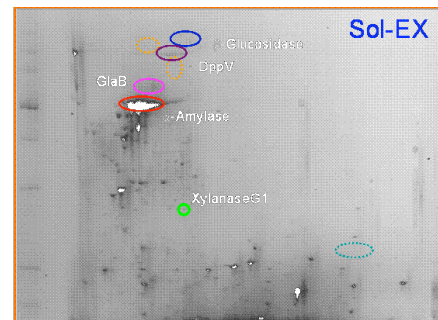
続いて最も差が顕著であった培養 40 時間目でのディファレンシャルディスプレイと網羅的なタンパク質の同定を行った。CBB 染色により可視化されたタンパク質について、In gel deglycosylation 法を併用した PMF

(Peptide mass fingerprinting) 解析を行い、 Mascot により、複数回の実験で再現性良く score が 60 以上であったものを同定タンパク質とした。結果、液体培養で 110 spots、固体培養で 85 spots の解析を行い、それぞれ 37 spots (21 タンパク質) と 43 spots (24 タンパク質) の同定を行うことが出来た。(図 1) 液体培養特異的に同定されたものが 12 タンパク質、固体培養特異的に同定されたものが 15 タンパク質、固体培養、液体培養ともに見られたものが 9 タンパク質であった。液体培養では、既知のタンパク質が数多く見いだされたのに対し、

固体培養では未知のタンパク質が数多く同定された。さらに、固体培養では、 $\alpha$ -アミラーゼのスポットが非常に大きく、生産されるタンパク質量の約 50%は  $\alpha$ -アミラーゼによることが明らかとなった。これに加えて、液体培養を行い調整した細胞壁タンパク質 (SDS 可溶性画分) についても解析を行ったところ、 $\alpha$ -アミラーゼや  $\beta$ -グルコシダーゼなど、固体培養で多量に、あるいは特異的に見られるタンパク質が同定された。

図1 麹菌分泌タンパク質のディ  
ファレンシャルディスプレイ  
Sol-EX: 固体培養分泌タンパク質, Liq-EX: 液体  
培養分泌タンパク質, Liq-CB 液体培養細胞壁タン  
パク質

- $\alpha$ -Amylase
- glucoamylase A (GlaA)
- Xylanase G1
- Alanyl dipeptidyl peptidase (DppV)
- $\beta$ -Glucosidase
- glucoamylase B (GlaB)
- Xylanase G2



### まとめ

従来から経験的に言われていたとおり、固体培養、液体培養間では、分泌タンパク質の挙動が大きく異なり、非常に多彩なタンパク質分泌発現制御を行っていることが明らかとなった。固体培養特異的なタンパク質としては、GlaB のほかに、DppV など、液体培養特異的なタンパク質としては GlaA, Xylanase G2 など、細胞壁に見られた固体培養特異的なタンパク質としては  $\alpha$ -アミラーゼや  $\beta$ -グルコシダーゼ等、発現に特徴のあるタンパク質、実際に同定された。今回同定されたタンパク質について、当研究所で作成した麹菌 3000 チップにより、同条件でのトランスクリプトーム解析を行うことで、遺伝子発現レベル、転写後のレベル等との段階でタンパク質の発現制御がなされているのか、網羅的に研究を行うことが出来るものと考えられる。さらに、今回発現に特徴が見られたタンパク質について、GFP 等のタグを付けることで、麹菌のタンパク質分泌生産についてより詳細に解析可能となるものと考えられる。今後は、これまでの研究により得られた情報と、ゲノム解析の結果得られた情報等を活用して、より体系的な研究を行っていく予定である。

**Proteome analysis of secreted proteins from *Aspergillus oryzae*.**  
Kazuhiro Iwashita (National Research Institute of Brewing)

## GFP を用いた麴菌(*Aspergillus oryzae*)のオルガネラの動態解析

東京大学大学院農学生命科学研究科

丸山潤一、北本勝ひこ

### はじめに

麴菌 (*Aspergillus oryzae*) は清酒、醤油、味噌などの醸造に古くから使用されているとともに、異種タンパク質生産の有望な宿主として期待されている。その形態的特徴として、同じ真核微生物である酵母が卵型の単細胞であるのに対し、麴菌は多数の細胞が菌糸状に連なって生育する多細胞生物であることがあげられる。このような形態形成は、オルガネラなどの様々な細胞内構造が菌糸に沿って適切な空間的配置をすることにより可能になると考えられる。しかし、これまでの麴菌研究では酵素生産や生育特性などに関する研究が多いものの、細胞レベルで内部構造を観察する細胞生物学的解析はほとんど進んでいなかった。

GFP (green fluorescent protein) は、オワンクラゲから発見された緑色蛍光タンパク質であり、紫外線照射により緑色の蛍光を発する性質をもつ。GFP を発現した細胞は固定をする必要がなく、生きたまま蛍光顕微鏡下で観察することができる。このことから、動物・植物・微生物とあらゆる細胞で、タンパク質の局在・挙動を可視化し、時間的・空間的な動態を解析するのに利用されている。演者らのグループでは、麴菌を細胞生物学的に理解することが、基礎生物学的にも、醸造や酵素生産などの応用の面からも重要であるとの認識から、GFP で可視化した麴菌のオルガネラの動態について研究を進めてきた。演者らが使用している EGFP (enhanced GFP) は青色光照射下で緑色の蛍光を発するよう改変されたものの1つであり、またこの励起波長は 488 nm であることから FACS (Fluorescence-activated cell sorter) による解析に適している。

### 1. 核の動態解析

オルガネラのなかでも、核は遺伝情報を保持するとともに、その適切な局在は菌糸状の生育、分生子形成に重要な役割を果たしている。さらに、麴菌は多核の分生子を形成するため、変異株の取得に多大な労力と時間を要するという問題があった。逆に捉えれば、醸造利用において麴菌が遺伝的安定性をもつことが重要であり、麴の品質の保持のために、多核の分生子をもつものが長年にわたり選抜されてきたと考えられる。これらのことから、演者は麴菌の形態形成における核の役割に注目し、EGFP で可視化することによりその動態を解析した。

ヒストン H2B はヌクレオソームを構成するタンパク質のひとつであり、これをコードする *Aspergillus nidulans* の遺伝子 *h2b* の下流に *egfp* 遺伝子を連結し、*h2b-egfp* 融合遺伝子を作成した。本融合遺伝子を、*A. oryzae* niaD300 株に導入した形質転換体を蛍光顕微鏡で観察すると、菌糸に H2B::EGFP 融合タンパク質の蛍光が観察され、DNA 染色試薬 DAPI による核の位置と一致することが確認された。

試料像の撮影は、弱い励起光下で細胞にダメージを与えない状態の暗い蛍光でも検出できる冷却 CCD カメラを用いて行った。顕微鏡およびカメラのシステムはコンピューターによる制御が可能なので、一定時間毎に撮影し画像を取り込む経時的(Time-lapse) 観察ができる。麴菌が菌糸成長をしているときの核動態を経時的に観察したところ、菌糸成長に伴い多数の核が伸長方向に移動する像が得られた。H2B::EGFP の蛍光は少し細長い形をしており、その動きは先端方向、基部方向と不規則な動きをしながら、最終的には菌糸先端に向かって移動した。一方で、核輸送に関与する遺伝子の破壊株を作成し、H2B::EGFP を発現したところ、菌糸成長が遅いととも野生株に見られるダイナミックな核動態は観察されなかった。このことから、麴菌の菌糸先端細胞は多数の核が存在し、ダイナミックな核動態をとることにより旺盛な菌糸成長を可能にすると考えられた。また、EGFP により可視化した核の分裂も経時的に観察することができ、H2B::EGFP 融合タンパク質発現系が、核動態を詳細に解析するうえで優れていることが示された。

FACS は個々の細胞にレーザービームを当て、散乱光と蛍光を検出し、数値として測定する装置である。H2B::EGFP 発現株の分生子を FACS により解析し、分生子内の核数をヒストグラムで表したところ、主に2つのピークが検出された。また、FACS のソーティングの機能により、指定した蛍光強度をもつ細胞集団を単離することができる。そこで、これらのピークよりソーティングした分生子の核数を調べた結果、2つのピークはそれぞれ単核、2核の分生子に対応するものであり、その分布は2個が最も多く次いで1個、3個の順であり、単核分生子の割合は予想以上に高かった。さらに、FACS により回収した単核分生子よりコロ

ニーを形成させ、再び単核分生子を形成するかを調べたが、最初と同様に1~3核の分布を示した。このことは、麹菌は様々な核数をもつ分生子を形成するように、遺伝的にプログラムされていることを示唆している。そこで、H2B::EGFP 発現株の分生子を変異処理し、FACS を用いて単核分生子を多く形成する変異株のスクリーニングを行った。現在までに分生子の80%以上が単核である変異株を取得している。この実験系を利用することにより、多核分生子形成の機構解明へ貢献するにとどまらず、実用的には変異株取得の効率化をもたらすことが期待される。

## 2. Woronin body の可視化

Woronin body は、19世紀、ロシアの Woronin により発見されたオルガネラであり、子囊菌類および不完全菌類の一部に存在する。これらの糸状菌細胞では細胞と細胞の間は隔壁で仕切られているが、その中央部は隔壁孔と呼ばれる直径約 0.1~0.5  $\mu\text{m}$  の穴があいており、細胞質が互いに連絡している。植物細胞で見られるプラスモデスムと似たシステムを、麹菌などの糸状菌はもっているといえる。Woronin body は通常、隔壁近傍に局在し、菌糸が損傷した際に他の細胞に溶菌が伝播しないように隔壁孔をふさぐ働きを有する。これまで分子レベルでの解析は全くなされていなかったが、最近アカパンカビ *Neurospora crassa* において *hex-1* 遺伝子が Woronin body の形成に関与することが報告された。演者はそのホモログ *hexA* 遺伝子を *A. oryzae* よりクローニングし、HexA が C 末にペルオキシソーム局在配列(PTS1 : peroxisomal targeting signal) を有することを見出した。また、遺伝子破壊株の解析から、*hexA* 遺伝子は Woronin body 形成に必要なことを明らかにした。EGFP-HexA 融合タンパク質を発現させたところ、隔壁近傍にドット状の蛍光が見られ、様々な溶菌条件において、損傷した菌糸に隣接する隔壁の中央に蛍光が集中している像が観察された。さらに、溶菌条件において HexA が隔壁孔に局在していることを示すために、隔壁を可視化する分泌酵素 RNase T1-EGFP 融合タンパク質、および赤色蛍光タンパク質 DsRed2-HexA 融合タンパク質を同時に発現した。そして、共焦点レーザー顕微鏡により取得した2重染色像を3次元構築したところ、EGFP 蛍光で可視化された隔壁の中心の空白部分に、DsRed2-HexA が入り込んでいることが確認された。このことから、HexA は溶菌したコンパートメントに隣接する隔壁孔をふさぐことが、初めて立体的に証明された。

## 終わりに

演者らのグループでは、その他、液胞、小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリア、ペルオキシソームを GFP により可視化し、麹菌の菌糸状の形態に特徴的な動態を観察している。現在麹菌のゲノム解読がほぼ完了し、GFP を用いて遺伝子産物の局在および動態を可視化する手法は、未知遺伝子の機能解析において重要な情報を提供することは間違いないであろう。一方で、演者らのグループは、GFP を用いて可視化された株を親株として変異株を取得するなかで、FACS やマイクロプレート用蛍光リーダーなどの機器の導入により、多数の変異処理株から効率的に目的の変異株を単離することも行っている。以上のように、最近の分子生物学・細胞生物学に関連する機器・技術の進歩により、今まで隠れていた麹菌細胞の内なるミクロな宇宙を我々の眼前に投影することが可能となっている。近い将来、麹菌の一つ一つの分子の動態・挙動を操作する、分子細胞生物学的育種の時代が到来することを期待したい。

## 参考文献（総説等）

- 1) 丸山潤一、北本勝ひこ：化学と生物、**39** : p. 187-192 (2001)
- 2) 丸山潤一、北本勝ひこ：日本醸造協会誌、**97** : p. 751-759 (2002)  
(分子麹菌学—麹菌研究の進展—、日本醸造協会(編) : p. 110-118 に転載)
- 3) J. Maruyama, H. Nakajima, and K. Kitamoto : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1504-1510 (2001)
- 4) J. Maruyama, H. Nakajima, and K. Kitamoto : *FEMS Microbiol. Lett.*, **206**, 57-61 (2002)

## Analysis of dynamics of GFP-visualized organelles in *Aspergillus oryzae*

Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto  
(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)



# **Oral Session**

## O-1

### *Aspergillus saitoi* 1,2- $\alpha$ -D-mannosidase の基質特異性変換

多田羅洋太, 一枚田史子, 李 秉魯, 吉田 孝<sup>1</sup>, 一島英治 (創大院・工, <sup>1</sup>弘前大・農学生命)

*A. saitoi* 1,2- $\alpha$ -mannosidase はハイマンノース型糖鎖を基質として、Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-から Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-を生成する。一方、酵母や哺乳類などの小胞体型の 1,2- $\alpha$ -mannosidase は Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-から Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-を生成する基質特異性を持つ。酵母の 1,2- $\alpha$ -mannosidase では 1 残基のアルギニン(R273)がこの基質特異性に関わっていることが報告されている。この R273 に相当する残基は *A. saitoi* ではグリシン残基となっていることから G267R の部位特異的変異を行い、麹菌の発現系を用いて変異遺伝子の発現を行った。

G267R 変異酵素について Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA を基質として用いたときの、生成物 Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA のアイソマーについて解析を行い、野生型酵素との比較を試みた。この結果、G267R 変異酵素では野生型酵素と比較して M8B が減少し、M8A が増加した。この結果から G267R の変異により、*A. saitoi* 1,2- $\alpha$ -mannosidase の基質特異性が小胞体型の酵素の基質特異性に近づいたことが示唆された。

本研究ではさらに基質の結合に関わる他のアミノ酸残基を探索し、基質認識の様式について考察する。糖鎖は非常に多様な構造をとり得るため、酵素の厳密な基質認識についての研究から、有用な知見が得られることが期待される。

参考文献・ Tatara, Y. *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 25289-94

### Alternation of the substrate specificity of 1,2- $\alpha$ -D-mannosidase from *Aspergillus saitoi*.

Yota Tatara, Fumiko Ichimaida, Byung Rho Lee, Takashi Yoshida<sup>1</sup>, Eiji Ichishima

(Graduate School of Bioeng., Soka Univ., <sup>1</sup>Faculty of Agric. and Life Sci., Hirosaki Univ.)

## O-2

### Aorsin はなぜ酸性領域でトリプシン様の特異性を示すのか

山下浩一郎, 李 秉魯, 平井申明, 一島英治 (創価大院・工)

【目的】*Aspergillus oryzae* が生産するセリンプロテアーゼ aorsin は、Ser-Glu-Asp を触媒残基に有し、酸性領域下においてトリプシン様の基質特異性を示すユニークな新規プロテアーゼである<sup>1)</sup>。aorsin のように酸性領域下で塩基性アミノ酸を好むプロテアーゼは珍しく、とても興味深い。そこで本研究では部位特異的変異および反応速度論的解析により基質結合部位の同定を試みた。

【方法および結果】aorsin の基質との親和性を示す  $K_m$  の pH に対する依存性は、pH の上昇に従い  $K_m$  が減少することから、酵素の酸性アミノ酸と基質の塩基性アミノ酸との静電的な親和性により相互作用することが考えられた。そこで aorsin の酸性アミノ酸に着目し、部位特異的変異による  $K_m$  の変化を調べたところ、Glu39, Glu40, Asp148 の三残基に関して  $K_m$  の上昇が認められた。更にこの三残基に対して、P1 部位にアルギニン類似体をもつ阻害剤ロイペプチンを用いて阻害定数  $K_i$  を求めたところ Asp148 のみに  $K_i$  の大幅な上昇が起こったことから Asp148 残基は S1 サブサイトであると同定された。一方 Glu39, Glu40 は S2 サブサイトを構成すると推測される。またホモロジー検索の結果から Asp148 は、他の相同体には存在しない挿入配列に位置することが示された。この挿入配列を欠失させた変異体酵素では基質特異性の大幅な変換が認められ、また特異的阻害剤ロイペプチンに対する阻害定数が 3 桁上昇したことから、この挿入配列が aorsin の基質特異性を決定付ける大きな要因であることが明らかとなった。

1) B.R.Lee *et al.*, *Biochem.J.*, **371**, 541-548(2003)

### An evidence for trypsin-like specificity acquisition of aorsin active at acidic pH

Koichiro Yamashita, Byung Rho Lee, Nobuaki Hirai, Eiji Ichishima (Graduate School of Eng., Soka Univ.)

## O-3

### 担子菌 *RecQ* 型 DNA ヘリカーゼ遺伝子の構造と転写発現

勝川志穂, 山崎 丘, 梶原 将, 穴戸和夫 (東工大・生命理工)

*RecQ* 型 DNA ヘリカーゼ(以下 *RecQ* ヘリカーゼ)は主に DNA の複製や修復に関わり、染色体を不変的に保つ機構の一端を担っていると考えられている。大型の子実体を形成する真正担子菌における *RecQ* ヘリカーゼの機能を解明することを目指し、シイタケ(*Lentinula edodes*)を用いて以下の研究を行った。まず、シイタケより *RecQ* ヘリカーゼ遺伝子および cDNA をクローニングしその塩基配列を決定した。その結果、この遺伝子(*Le.recQ* と命名)は 945 アミノ酸をコードし、*RecQ* ヘリカーゼで保存されている 7 個のヘリカーゼモチーフからなるヘリカーゼドメインを有することが分かった。また、サザンブロット法および PCR 法により相同遺伝子の存在を検討したところ *Le.recQ* がシイタケの唯一、あるいは主要な *RecQ* ヘリカーゼ遺伝子であると考えられた。*Le.recQ* 遺伝子産物の転写発現を調べるため、シイタケの子実体形成過程の各ステージの菌糸体から精製した RNA を用いて、ノーザンハイブリダイゼーションおよび RT-PCR 法による転写産物の解析を行った。その結果、各ステージにおいてほぼ同程度量の転写産物が見られた。成熟子実体を柄、髷、傘、に分けて同様に転写産物量を比較したところ、それらは各部位で同程度であった。以上、*Le.recQ* は子実体形成過程および子実体各部位において構成的に発現していることがわかった。

#### Structure and transcriptional expression of the basidiomycete *Le.recQ* gene

Shiho Katsukawa, Takashi Yamazaki, Susumu Kajiwara, Kazuo Shishido (Dept. of Life sci., Tokyo inst. of Tech.)

## O-4

### 担子菌 P450 分子多様性におけるマイクロエキソンの役割

平塚宣博, 一瀬博文, 栗原宏征, 松崎美美子, 志水元亨, 割石博之 (九大院・農)

木材腐朽担子菌は地球上で最も難分解性の芳香族高分子であるリグニンを単独で無機化できる唯一の生物であり、この代謝機構には多くの興味が生かされている。細胞外にて強力な一電子酸化酵素によりリグニンを断片化(ラジカル開裂)し、生じた様々な芳香族断片を細胞内に取り込む。細胞内では多岐にわたる芳香族断片に対し代謝応答を行うものと考えられている。細胞内外代謝反応の制御機構については未だ不明であるが、シトクロム P450 に関する興味深い知見が得られている。*Phanerochaete chrysosporium* ゲノム全塩基配列が JGI により決定され、公開されている。*P. chrysosporium* ゲノムのブラストサーチから、150 を越える P450 部分配列の存在が見出された。今回、アノテーションにより、P450 分子種と推定される 107 の完全長塩基配列を得た。この 107 配列中、26 配列においてアミノ酸 10 残基以下で構成される短いエキソン(マイクロエキソン)の存在が推定された。このうち 13 配列については cDNA を獲得し、その配列中にマイクロエキソンの存在を確認できた。現在、他の配列についても確認を急いでいる。このようなマイクロエキソンの存在は他生物由来 P450 では確認されておらず、担子菌 P450 の特徴と考えられる。P450 分子は非常に厳密な基質特異性を有することが知られており、基質特異性の違いは基質認識部位(Substrate recognition sites; SRS)に蓄積した変異により生み出される。そこで、*P. chrysosporium* P450 遺伝子のアライメント解析を行い、SRS とマイクロエキソンとの関係について検討した。その結果、多くのマイクロエキソンが SRS とオーバーラップすることが明らかとなった。多様な機能を生み出すため、基質認識に関わる構造をマイクロエキソンにより変化させ、多様な P450 分子種を獲得した分子進化的機構への関与が推察される。

#### A possible role of microexons found in *Phanerochaete chrysosporium* cytochrome P450 genes

Nobuhiro Hiratsuka, Hirofumi Ichinose, Hiroyuki Kurihara, Fumiko Matsuzaki, Motoyuki Shimizu, Hiroyuki Wariishi (Faculty of Agriculture, Kyushu Univ.)

## O-5

### 白色木材腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* のセルロース/キシラン混合炭素源培養系において特異的に検出された新規タンパク質

住吉剛史、吉田 誠、五十嵐圭日子、鮫島正浩（東大院・農生科）

片山 映、西野武士（日医大・一生化）

白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の多糖分解酵素はこれまで、単一の基質を炭素源とした培養系において生産される酵素を対象に研究されてきた。しかし、麴菌における最近の研究ではキシラン分解酵素群の転写因子がいくつかのセルラーゼ遺伝子を制御することが明らかとなっている。そこで我々はセルロースとキシランを混合して炭素源とした培地で *P. chrysosporium* を培養したところ、混合炭素源の系でのみ特異的に検出されるタンパク質があることを明らかとした。よって本研究においては、このタンパク質の N 末端アミノ酸配列を解析し、遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、推定されるアミノ酸配列は GH Family 61 signature を持つ新規タンパク質であることが分かった。これまでに報告されている GH Family 61 に属する酵素は全てセルラーゼであることから、このタンパク質もセルラーゼの一種と予想された。現在、このタンパク質の酵素機能を解析するために、酵母を用いた異宿主発現系による組換えタンパク質の生産を進めている。

#### A novel protein from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* grown on cellulose /xylan culture

Takeshi Sumiyoshi, Makoto Yoshida, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima (Univ. of Tokyo)

Akira Katayama, Takeshi Nishino (Nippon Medical School)

## O-6

### 分裂酵母 dikaryon の成立と septation initiation network の関わり

岡崎孝映、丹羽修身（かずさ DNA 研究所）

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* も糸状菌、キノコ類に見られるような dikaryon として増殖できることを我々は前年度本大会で報告した。今回はどのような条件で 2 核になった場合に、細胞がその後 dikaryon として増殖を続けることができるかを検討した。septation initiation network (SIN) の一員である *cdc7*, *cdc14*, *cdc11*, *sid4* などの温度感受性変異により 2 核になった細胞は、allele によってその安定性に差はあったが 2 核のまま増殖した。それに対し、latrunculin B によるアクチン重合阻害や、*cdc3*(プロフィリン)、*cdc4*(ミオシン軽鎖)、*cdc8*(トロポミオシン)などの温度感受性変異によって、F-アクチン収縮環の形成が阻害されて 2 核になった細胞は、ほとんど dikaryon 型の分裂をすることはなく、2 核の間に隔壁を形成した。そのような 2 核細胞では Cdc7(SIN の一員で分裂期特異的にスピンドル極体に局在する蛋白質リン酸化酵素)が片方の核上 (Cdc7 は分裂後期に片方の娘核上から消え、もう片方からは隔壁形成が終了した時に消える) に留まったままになっていることが GFP-Cdc7 を使った実験で示された。このことは Cdc7 が片方のスピンドル極体にあるかぎり、隔壁形成を誘導しつづけるということを示唆している。*Aspergillus* の SEPH(Cdc7 homolog)は F-アクチン収縮環の形成に必要なので、すでに形成された F-アクチン環の収縮の開始を誘導する分裂酵母の Cdc7 とは機能が異なることが報告された(Bruno et al., 2001, Mol. Microbiol. 42:3-12)が、この新たな Cdc7 の機能は SEPH と共通している。SIN は細胞分化の過程で細胞質分裂を核分裂と共役させるか否かを制御する保存されたシステムとして注目される。

#### Establishment of the fission yeast dikaryon: importance of the septation initiation network.

Koei Okazaki, Osami Niwa

(Kazusa DNA Res. Inst.)

## O-7

### CCAAT 配列結合因子 HAP 複合体の核内移行に関する研究

合田秀矢, 田上新次郎, 小林哲夫, 塚越規弘, 加藤雅士 (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くの遺伝子プロモーターに存在するシスエレメント CCAAT-box に特異的に結合し転写を顕著に増加させることが明らかとなっている。糸状菌 *Aspergillus* 属 CCAAT 配列結合因子は Hap 複合体と呼ばれ、少なくとも3種類のサブユニット HapB/C/E から形成している。本研究では、HapB,C,E 各々と GFP の融合タンパク質を HapB,C,E 各サブユニット欠失株内で発現させることで、可視的に HapB,C,E 各サブユニットの核内移行を解析した。

[方法及び結果] 各サブユニット欠失株内に GFP::HapB,C,E をコードする遺伝子を導入し、合計9種類の形質転換株を取得した。蛍光顕微鏡観察の結果、Hap 複合体は HapB 依存的に核に移行することが明らかとなった。次に HapB の核内移行シグナルを同定するために、部分欠失 HapB と GFP との融合タンパク質をコードする遺伝子を作成し、*hapB* 欠失株内に導入し核移行能の解析を行った。その結果、1) C 末端部分の 309 – 342 AA の領域に主要な核内移行シグナルが存在すること 2) 真核生物を通じてアミノ酸配列が保存された領域内(237-290AA)にも弱い核内移行シグナルが存在していることが示された。

#### Studies on the nuclear import mechanisms of the Hap complex in aspergilli

Hideya Goda, Shinjiro Tanoue, Tetsuo Kobayashi, Norihiro Tsukagoshi, Masashi Kato

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

## O-8

### 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、山田 修\*、秋田 修\*、佐藤利次 (岩手生工研、酒総研)

麹菌(*A.oryzae*)は清酒の潜在的な着色原因となっているフェリクリシンを分泌する。フェリクリシンはシデロフォアの種類であり鉄欠乏時に誘導的に分泌生産される。すでに、我々は麹菌のフェリクリシン生産制御因子遺伝子(*sreAo*)を単離し、*sreAo* が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することを報告した。しかし、SreAo による *dffA* 転写の ON/OFF の制御機構には不明な点が多い。今回我々は、大腸菌で生産させた組換え SreAo を用いて、*dffA* プロモータに対する作用領域の探索を行い、同プロモータ上に SreAo が高い親和性を示す領域が3箇所存在することを明かにした。これらの内、最も上流に位置する SreAo 親和性領域には、糸状菌 *Ustilago maydis* における Sre ホモログである Urbs1 の被結合領域と類似した配列が存在していた。この点から、この領域が *dffA* プロモータの調節領域である可能性が示唆された。

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

Hisayuki Watanabe, Osamu Yamada\*, Osamu Akita\*, Toshitsugu Sato (Iwate Biotech. Res. Center, \*NRIB)

## O-9

### 麹菌ゲノム解析

佐野元昭<sup>1</sup>、田中敏広<sup>2</sup>、五十嵐理恵<sup>2</sup>、澤野寿彦<sup>2</sup>、熊谷俊高<sup>1</sup>、楠本憲一<sup>3</sup>、有馬寿英<sup>4</sup>、秋田 修<sup>4</sup>、阿部敬悦<sup>5</sup>、柏木 豊<sup>3</sup>、北本勝ひこ<sup>6</sup>、小林哲夫<sup>7</sup>、五味勝也<sup>5</sup>、竹内道雄<sup>8</sup>、堀内裕之<sup>6</sup>、穴澤秀治<sup>9</sup>、小出芳直<sup>10</sup>、小森 隆<sup>11</sup>、小山泰二<sup>12</sup>、田中昭光<sup>13</sup>、秦 洋二<sup>14</sup>、峰時俊貴<sup>15</sup>、Jiujiang Yu<sup>16</sup>、小笠原直毅<sup>17</sup>、久原 哲<sup>18</sup>、菊池 久<sup>2</sup>、浅井 潔<sup>6</sup>、町田雅之<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>産総研、<sup>2</sup>製品評価技術基盤機構、<sup>3</sup>食総研、<sup>4</sup>酒類総研、<sup>5</sup>東北大、<sup>6</sup>東大、<sup>7</sup>名大、<sup>8</sup>農工大、<sup>9</sup>協和発酵、<sup>10</sup>天野エンザイム、<sup>11</sup>インテック W&G、<sup>12</sup>キッコーマン、<sup>13</sup>ヒゲタ醤油、<sup>14</sup>月桂冠、<sup>15</sup>大関、<sup>16</sup>SRRC USA、<sup>17</sup>奈良先端大、<sup>18</sup>九大)

糸状菌は産業的にも重要な微生物で、我国では、伝統的発酵産業やタンパク質の分泌生産などに麹菌 *Aspergillus oryzae* が広く利用されている。麹菌については、我が国において、2000年にEST解析が完了し、2001年より全ゲノム解析が開始され、ホールゲノムショットガン法により7X以上のcoverageでの大規模シーケンスを完了した。今回、麹菌ゲノム解析の現状について報告する。

#### Analysis of the *Aspergillus oryzae* genome

Motoaki Sano<sup>1</sup>, Toshihiro Tanaka<sup>2</sup>, Rie Igarashi<sup>2</sup>, Toshihiko Sawano<sup>2</sup>, Toshitaka Kumagai<sup>1</sup>, Ken-Ichi Kusumoto<sup>3</sup>, Toshihide Arima<sup>4</sup>, Osamu Akita<sup>4</sup>, Keietsu Abe<sup>5</sup>, Yutaka Kashiwagi<sup>3</sup>, Katsuhiko Kitamoto<sup>6</sup>, Tetsuo Kobayashi<sup>7</sup>, Katuya Gomi<sup>5</sup>, Michio Takeuchi<sup>8</sup>, Hiroyuki Horiuchi<sup>6</sup>, Hideharu Anazawa<sup>9</sup>, Yoshinao Koide<sup>10</sup>, Takashi Komori<sup>11</sup>, Yasuhi Koyama<sup>12</sup>, Akimitsu Tanaka<sup>13</sup>, Yoji Hata<sup>14</sup>, Toshitake Minetoki<sup>15</sup>, Jiujiang Yu<sup>16</sup>, Naotake Ogasawara<sup>17</sup>, Satoru Kuhara<sup>18</sup>, Hisashi Kikuchi<sup>2</sup>, Kiyoshi Asai<sup>6</sup>, Masayuki Machida<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>AIST, <sup>2</sup>NITE, <sup>3</sup>NFRI, <sup>4</sup>NRIB, <sup>5</sup>Tohoku Univ., <sup>6</sup>Univ. of Tokyo, <sup>7</sup>Nagoya Univ., <sup>8</sup>Tokyo Univ. of Agriculture & Technology, <sup>9</sup>KYOWA HAKKO Co., Ltd., <sup>10</sup>Amano Enzyme Inc., <sup>11</sup>Intec Web & Genome Informatics, <sup>12</sup>Kikkoman Co., <sup>13</sup>Higeta Shoyu Co., Ltd., <sup>14</sup>Gekkeikan Sake Co., Ltd., <sup>15</sup>Ozekie Co., <sup>16</sup>SRRC USA, <sup>17</sup>NAIST, <sup>18</sup>Kyushu Univ.)

## O-10

### 麹菌ゲノムの遺伝子予測

熊谷俊高<sup>1</sup>、佐野元昭<sup>1</sup>、田中敏広<sup>2</sup>、五十嵐理恵<sup>2</sup>、澤野寿彦<sup>2</sup>、楠本憲一<sup>3</sup>、有馬寿英<sup>4</sup>、秋田 修<sup>4</sup>、阿部敬悦<sup>5</sup>、柏木 豊<sup>3</sup>、北本勝ひこ<sup>6</sup>、小林哲夫<sup>7</sup>、五味勝也<sup>5</sup>、竹内道雄<sup>8</sup>、堀内裕之<sup>6</sup>、穴澤秀治<sup>9</sup>、小出芳直<sup>10</sup>、小森 隆<sup>11</sup>、小山泰二<sup>12</sup>、田中昭光<sup>13</sup>、秦 洋二<sup>14</sup>、峰時俊貴<sup>15</sup>、Jiujiang Yu<sup>16</sup>、小笠原直毅<sup>17</sup>、久原 哲<sup>18</sup>、菊池 久<sup>2</sup>、町田雅之<sup>1</sup>、浅井 潔<sup>6,1</sup> ( <sup>1</sup>産総研、<sup>2</sup>製品評価技術基盤機構、<sup>3</sup>食総研、<sup>4</sup>酒類総研、<sup>5</sup>東北大、<sup>6</sup>東大、<sup>7</sup>名大、<sup>8</sup>農工大、<sup>9</sup>協和発酵、<sup>10</sup>天野エンザイム、<sup>11</sup>インテック W&G、<sup>12</sup>キッコーマン、<sup>13</sup>ヒゲタ醤油、<sup>14</sup>月桂冠、<sup>15</sup>大関、<sup>16</sup>SRRC USA、<sup>17</sup>奈良先端大、<sup>18</sup>九大)

麹菌の全ゲノム解析により、約37 Mbの全ゲノムの塩基配列が明らかにされつつあり、麹菌が有する遺伝子をその機能を解析する必要があるが、多くの麹菌の遺伝子はイントロンを含むことが分かっており、全ゲノム塩基配列より麹菌が有する遺伝子を予測することは容易ではない。本研究では、これまでに解析された麹菌のEST、麹菌の遺伝子と相同性の高い機知の他種生物の遺伝子、および既知配列を用いない統計的予測方法を用いることにより（それぞれ、SIM4、ALN、Gene Decoderによる）、約14000の遺伝子を検出した。

#### Gene finding from the *Aspergillus oryzae* genome

Toshitaka Kumagai<sup>1</sup>, Motoaki Sano<sup>1</sup>, Toshihiro Tanaka<sup>2</sup>, Igarashi Rie<sup>2</sup>, Sawano Toshihiko<sup>2</sup>, Ken-Ichi Kusumoto<sup>3</sup>, Toshihide Arima<sup>4</sup>, Osamu Akita<sup>4</sup>, Keietsu Abe<sup>5</sup>, Yutaka Kashiwagi<sup>3</sup>, Katsuhiko Kitamoto<sup>6</sup>, Tetsuo Kobayashi<sup>7</sup>, Katuya Gomi<sup>5</sup>, Michio Takeuchi<sup>8</sup>, Hiroyuki Horiuchi<sup>6</sup>, Hideharu Anazawa<sup>9</sup>, Yoshinao Koide<sup>10</sup>, Takashi Komori<sup>11</sup>, Yasuhi Koyama<sup>12</sup>, Akimitsu Tanaka<sup>13</sup>, Yoji Hata<sup>14</sup>, Toshitake Minetoki<sup>15</sup>, Jiujiang Yu<sup>16</sup>, Naotake Ogasawara<sup>17</sup>, Satoru Kuhara<sup>18</sup>, Hisashi Kikuchi<sup>2</sup>, Masayuki Machida<sup>1</sup>, Kiyoshi Asai<sup>6</sup> ( <sup>1</sup>AIST, <sup>2</sup>NITE, <sup>3</sup>NFRI, <sup>4</sup>NRIB, <sup>5</sup>Tohoku Univ., <sup>6</sup>Univ. of Tokyo, <sup>7</sup>Nagoya Univ., <sup>8</sup>Tokyo Univ. of Agriculture & Technology, <sup>9</sup>Kyowa Hakkō, <sup>10</sup>Amano Enzyme, <sup>11</sup>Intec Web & Genome Informatics, <sup>12</sup>Kikkoman, <sup>13</sup>Higeta Shoyu, <sup>14</sup>Gekkeikan Sake, <sup>15</sup>Ozekie, <sup>16</sup>SRRC, <sup>17</sup>NAIST, <sup>18</sup>Kyushu Univ.)

## O-11

### Biochemical analysis and visualization of Woronin body in *A. oryzae*

Praveen Rao Juvvadi, Kazutomo Ishi, Jun-ichi Maruyama and Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

Woronin bodies are known to plug septal pores in response to hyphal damage and prevent excessive loss of cytoplasmic contents. While in *Neurospora crassa* the Hex1 protein has been reported as the major constituent of the Woronin body and its crystal structure contributing to its plugging function, the molecular mechanisms involved in the assembly of Hex1 and the signals that trigger the plugging of septal pore by Woronin body remain elusive. In *Aspergillus oryzae* the *hexA* gene homologous to *hex1*, encoding HexA was earlier characterized (Maruyama et al 2002). In the present study the GST-HexA fusion protein was expressed in *Escherichia coli*. The antibodies raised against HexA recognized the spliced (~19 kDa) and non-spliced (~24 kDa) forms of HexA. Search for functional sites on the HexA revealed the presence of a putative phosphorylatable site for protein kinase C within a putative calmodulin-binding domain. *In vitro* binding assay supported by calmodulin overlay assay and calmodulin affinity chromatography revealed the calmodulin binding property of HexA. In addition the 5' upstream region of *hexA* gene contained 2 putative CDRE (Calcineurin Dependent Regulatory Element) motif sequences that are known to have regulatory function in cell wall repair mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. We hypothesize a coordinated role of calmodulin binding and or phosphorylation by protein kinase C in the regulation of disassembly/assembly of the HexA. Results obtained in this regard in addition to visualization of the septum and the septal pore plugging by Woronin body in *A. oryzae* strain expressing the RntA-EGFP and DsRed-HexA fusion proteins will be presented.

Maruyama J et al. (2002) Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biochemistry & Biotechnology., pp170

## O-12

### 麹菌 *A.oryzae* における $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase の局在機構と機能の解析

岩崎琢磨、丸山潤一、中島春紫、北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工、）

（目的）キチンは糸状菌の細胞壁主要構成成分であるため、糸状菌においてキチン分解酵素系は菌糸先端成長や分生子分離などにおいて重要な役割を果たしていると考えられる。 $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase はキトオリゴマーを GlcNAc に分解する。本酵素は様々な糸状菌における自己溶菌時や寄生性糸状菌の宿主への着生時に発現すること、および最終産物である GlcNAc により発現誘導されることなどが報告されている。本研究では酵素生産など産業上重要な *A.oryzae* において本酵素の分泌過程や局在について解析し、この機能を明らかにすることを目的としている。

（方法と結果）EGFP を C 末端に結合して発現させることにより、*A.oryzae* の  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase (NagA) の可視化を試みたところ、GlcNAc を炭素源として加えたときに強く誘導されていることが確認された。NagA-EGFP は、菌糸表層や隔壁への局在が観察されたのに加え、菌糸表層のやや内側にドット状に局在すること、および菌糸内部の中空の構造体への局在が観察された。現在、飢餓および固体培養などさまざまな培養条件における NagA-EGFP の局在について解析を行っている。

### Analysis of localization and function of $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase in *Aspergillus oryzae*

Takuma Iwasaki, Jun-ichi Maruyama, Harushi Nakajima, Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

## O-13

### ***Aspergillus nidulans* のプロセッシング酵素遺伝子 *kexB* 破壊株の解析**

古川健太郎、水谷 治、藤岡智則、徳岡昌文、五味勝也、阿部敬悦、山形洋平、中島 佑 (東北大院農・応生科)

我々は、糸状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、これまで麹菌のスブチリシン様プロセッシング酵素遺伝子 *kexB* 破壊株を用いたトランスクリプトーム解析を行ってきた。麹菌 *kexB* 破壊株は、cell integrity 経路 (PKC 経路) に異常をもたらし、この表現型が高浸透圧条件下では抑制されることを見出した。今回、この高浸透圧による表現型抑制機構の遺伝学的解明を目的とし、遺伝学的解析の容易な *A. nidulans* において新たに *kexB* 破壊株を造成した。予想に反し、この破壊株は麹菌の場合と異なり、分生子形成能の著しい低下は見られず、1 M ソルビトール存在下でも表現型は抑制されなかった。この破壊株において麹菌 *kexB* を過剰発現させた結果、通常培地において表現型が抑制されたことから、両者の KexB の機能そのものには差はないと考えられた。また、*kexB* 破壊株において *A. nidulans* の高浸透圧応答に関与する AnHOG 経路 (酵母 HOG 経路の相同経路) を高浸透圧非存在下で活性化させた場合の影響、高浸透圧条件下でのプロセッシング能力の復帰の有無についても併せて報告したい。

### **Characterization of the disruption mutant of protein-processing enzyme gene *kexB* from *Aspergillus nidulans***

Kentaro Furukawa, Osamu Mizutani, Tomonori Fujioka, Masafumi Tokuoka, Katsuya Gomi, Keietsu Abe, Youhei Yamagata and Tasuku Nakajima (Tohoku Univ., Grad. Sch. Agri. Sci.)

## O-14

### **糸状菌 *Aspergillus nidulans* のキチン合成酵素 CsmA のミオシン様ドメインがその局在化、機能に果たす役割の解析**

竹下典男、堀内裕之、太田明德 (東大院・農生科・応生工)

キチンは糸状菌の細胞壁の主要構成成分であり、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末端側約半分にミオシン様ドメイン(MMD)を持つ1852アミノ酸からなるタンパク質 (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、菌糸の中に新たに菌糸が生じる菌糸内菌糸の形成などが観察される。すでに我々は *csmA* の ORF の C 末端側に HA tag がつながった形のタンパク質 CsmA-HA を発現する株を作製し、CsmA-HA が菌糸先端、隔壁形成部位の特にアクチンが集中する部位近傍に局在化することを示した。CsmA-HA の正常な局在化に MMD が必須であること、MMD がアクチンとの結合能を持つことから、CsmA-HA は MMD とアクチンとの相互作用を介して局在化することが予想された。このことを検証するため、MMD のアクチン結合領域と予想される部位のアミノ酸を置換、欠損した変異型 MMD を *in vitro* で発現させ、アクチンフィラメントとの共沈実験により、変異型 MMD がアクチンフィラメントとの結合能を失っていることを示した。このような変異を持つ CsmA または CsmA-HA を発現する株をそれぞれ作製し解析を行ったところ、破壊株と同様の表現型を示し、また正常な局在化が観察されなかった。これらのことから、CsmA の局在化、機能における MMD とアクチンとの相互作用の重要性が強く示唆された。

### **Role of the myosin motor-like domain of CsmA (chitin synthase with a myosin motor-like domain) of *Aspergillus nidulans* for its localization and function**

Norio Takeshita, Hiroyuki Horiuchi, and Akinori Ohta

(Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)



## O-15

### いもち病菌 *Magnaporthe oryzae* における RNA サイレンシング

角谷直樹, 中屋敷均, 土佐幸雄, 眞山滋志 (神戸大・自然科学)

RNA interference (RNAi) は二本鎖の RNA が細胞内に導入されるとそれと相同な遺伝子の産物が抑制される現象であり、線虫をはじめ幅広い真核生物で報告されている。近年、RNAi の機構が植物や糸状菌などで見られる転写後抑制型ジーンサイレンシング (PTGS) と類似していることが報告され、現在ではこれらを総称して RNA サイレンシングと呼ばれている。我々はコムギから分離されたいもち病菌に GFP 遺伝子を導入し、強い GFP 蛍光を示す株を作成した。この形質転換体に GFP RNA をセンス、アンチセンス、ヘアピンなど様々な形で転写するコンストラクトを導入し、GFP 蛍光の増減を調査した。その結果、ヘアピン構造をとる GFP RNA を転写するコンストラクトが最も高頻度で GFP 蛍光の減少を誘導することが明らかとなった。GFP の発現が抑制された株では GFP mRNA の蓄積が顕著に抑制されており、またサザン解析を行ったところ、これらの株ではヘアピン RNA のコンストラクトに相当する 3.2kb のバンドが観察され、両者の間に相関が認められた。サイレンシング株の GFP 遺伝子コーディング領域およびプロモーター領域における DNA のメチル化の状態を調査したが、メチル化はいずれの領域においても観察されず、本菌における GFP のサイレンシングに DNA のメチル化は関与していないことが示唆された。さらに、RNA サイレンシングで特徴的に検出される small interfering RNAs (siRNAs) の検出を試みたところ、サイレンシングが起こっている株でのみ GFP siRNAs の蓄積が認められた。以上の結果は、いもち病菌に RNA サイレンシング機構が存在することを示し、ゲノム解析が進展している本菌の逆遺伝学的解析に有用な手法となることが期待される。

#### RNA silencing in a phytopathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*

Naoki Kadotani, Hitoshi Nakayashiki, Yukio Tosa, Shigeyuki Mayama

(Graduate School of Science and Technology, Univ. of Kobe)

## O-16

### *Pyricularia* 属菌集団における染色体構造の多様性

中馬いづみ, 磯部千尋, 土佐幸雄, 中屋敷均, 眞山滋志 (神戸大農)

イネ科植物いもち病菌は *Pyricularia oryzae* (イネいもち病菌, アワいもち病菌, コムギいもち病菌などを含む栽培植物寄生菌群, 完全世代 *Magnaporthe oryzae*), *P. grisea* (メヒシバいもち病菌, 完全世代 *M. grisea*) およびその他の菌群 (*Pyricularia* spp.) といった複数の種に分化している。中でも *P. oryzae* は、宿主の種レベルで明確に寄生性が分化しており、それに関与するいくつかの遺伝子が存在することが明らかとなっている。しかしながら、種分化および寄生性分化の機構は解明されていない。本研究では、本菌における種分化および寄生性分化機構をゲノム構造から解明することを目的に、様々な寄生性を有するいもち病菌の染色体構造をパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) により調査した。各菌株における染色体相同性の検索には、コムギいもち病菌 x アワいもち病菌の連鎖地図から選抜した複数の染色体特異的マーカーを用いた。計 84 菌系の染色体バンドを比較したところ、*P. oryzae*, *P. grisea* およびその他の菌群 (*Pyricularia* spp.) が、核型により明確に区別できることが明らかとなった。特に、*P. grisea* では、*P. oryzae* と比べて、第 3 染色体と第 4, 5 染色体のサイズが逆転していた。このような染色体構造変異は、本菌の種分化と密接に関連して起こったと考えられる。一方、*P. oryzae* においては、同じ寄生性を有する菌株ごとに染色体構造の類似性が見られたが、例外的に、イネいもち病菌には高頻度で常染色体および過剰染色体に構造変異が起こっていた。

#### Karyotypic diversity of the blast fungus *Pyricularia* spp.

Izumi Chuma, Chihiro Isobe, Yukio Tosa, Hirotshi Nakayashiki, Shigeyuki Mayama (Fac. of Agri., Kobe Univ.)

## O-17

### *Aspergillus nidulans* における遺伝的形質転換の制御

夏目豊彰, 中岡 源, 江草真由美\*, 児玉基一郎\*, 伊藤靖夫 (信州大・理, \*鳥取大・農)

*A. nidulans* では、*uvsC* の転写量が変化すると、遺伝的形質転換時の細胞外 DNA の染色体への組込み様式も変化する。つまり、*argB* 座を用いた検定系において、*uvsC* の欠失系統では相同的組込みによる遺伝子ターゲティングが検出されず、また、異所的組込みの様式も有意に変化する。逆に、転写量を約 200 倍高めた系統では、ターゲティングによる形質転換体の出現頻度が数倍上昇する。今回、異所的組込みと相同的組込みの割合を定量的に測定するために、*yA* および *wA* 座を用いた検定系を構築した。その結果、*uvsC* の転写量が上昇した系統では、相同的組込みの占める割合が 2-4 倍上昇した。これらの結果は、組換え修復系の活性を調節することによって、細胞外 DNA の染色体への組込みを直接制御できる可能性を示唆するものである。しかし、*uvsC* の転写量が約 600 倍上昇したときには菌糸伸長が阻害されることから、実際に応用することは難しい。したがって、ターゲティング効率の改善には、マーカーを工夫することによって適当な選択系を構築する方が、現実的な戦略であると考えられる。しかし、その場合にも、形質転換の操作自体がゲノムの恒常性に与える影響について、十分な検討が必要である。特に、組込みの基質となる染色体 DNA の二重鎖切断 (DSB) は、形質転換頻度の制限要因である可能性が間接的に示されており、ゲノムの安定性にも深く関わっていることから、その量的変動についての知見は重要である。そこで、DSB と染色体への組込みを定量的に関連づけるモデル系として、制限酵素を添加して行う形質転換時の DSB の定量的検出を試みている。

#### Controlling the genetic transformation of *Aspergillus nidulans*

Toyoaki Natsume, Hajime Nakaoka, Mayumi Egusa\*, Motoichiro Kodama\*, Yasuo Itoh

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

## O-18

### 麹菌 *Aspergillus oryzae* における翻訳機構

#### —5'非翻訳領域 (5'-UTR) の改変による高翻訳系の構築—

幸田明生, 峰時俊貴, 尾関健二, 広常正人 (大関総研)

【目的】タンパク質の機能発現は様々なプロセスで調節されているが、多くの真核生物において翻訳過程における制御系の存在が確認されている。これまで麹菌において翻訳プロセスを詳細に解析した報告はなく、その機構はほとんど解明されていない。本研究では遺伝子発現における効率的な翻訳系の構築を目的に、5'-UTR の翻訳に及ぼす影響を検討した。

【方法と結果】高発現プロモーターP-No8142 の下流にレポーターとして pBI221(clontech 社)由来の GUS 遺伝子を 5'-UTR を含んだかたちで連結し、GUS 高発現ベクター(pNANG8142)を構築、コントロールベクターとした。次に、麹菌 EST 情報より数種類の遺伝子を抽出し、その推定 5'-UTR を PCR 増幅により取得した。コントロールベクターの 5'-UTR を、取得した *A.oryzae* 由来の各種 5'-UTR に置換(部分置換および全置換)したベクターを構築し、*A.oryzae niaD300* 株を形質転換した。得られた *niaD* 座位 1 コピー導入株を比較した結果、5'-UTR 改変後高いもので約 10 倍の GUS 活性を示した。ノザン解析より mRNA 量は同等であることから、GUS 活性の上昇は翻訳レベルで生じており、単位 mRNA あたりの翻訳効率が上昇したものであることが示唆された。さらに、得られた多コピー導入株の中には、蓄積した GUS タンパク質が菌体内全可溶性タンパク質の 50%以上を占めるものも存在し、異種タンパク質生産系として非常に有望であることが確認された。

#### Analyses of translation in *Aspergillus oryzae*-the effect of the 5'-UTR on translational efficiency-

Akio Koda, Toshitaka Minetoki, Kenji Ozeki, Masato Hirotsune

(Gen.Res.Lab.,Ozeki Co.)

## O-19

### *Aspergillus oryzae* のマルトース資化遺伝子クラスターの発現および機能解析

長谷川祥子, 巢山治彦, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

【目的】 麹菌の菌体外にマルトースが存在すると、転写因子 AmyRp が活性化される。この AmyRp の機能解析の過程で見出された、酵母マルトース資化遺伝子群 MAL クラスターに高い相同性を持つ新たなマルトース資化系 MAL クラスターについて、構成している遺伝子の発現ならびに機能解析を目的とした。

【結果】 酵母 MAL クラスターのマルトースパーミアーゼ遺伝子 *Mal61* に相同性の高い配列 *malP*、菌体内マルターゼ遺伝子 *Mal62* に相同性の高い配列 *malT*、転写因子遺伝子 *Mal63* に相同性の高い配列 *malR* について、種々の炭素源での発現プロファイルを観察したところ、グルコースに対しマルトースを炭素源とする培地で *malP*、*malT* の発現が強く、マルトースによる発現誘導が行われていることが示唆された。*MalR* はどの培地条件でも同様に発現が見られた。*AmyR* 破壊株でも同様の発現プロファイルを観察したところ、コントロール株と発現に差が見られなかった。また、酵母マルトースパーミアーゼ欠損株に対し *malP* による相補試験を行ったところ、マルトースを炭素源とする培地で生育、発酵が見られ、*malP* はマルトースパーミアーゼ活性を持つことがわかった。さらに、*malP* 破壊株にグルコアミラーゼプロモーターの制御下にある大腸菌  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を導入し、菌体内 GUS 活性を測定したところ、いずれの培地においても *malP* 破壊株での活性が低かった。これは、 $\alpha$ -アミラーゼの活性測定結果においても同様であった。現在、麹菌ゲノム解析により見出された複数の MAL クラスターに相同性が高い配列群について、その発現機構や機能解析を行っている。

#### Expression and functional analyses of gene clusters involved in maltose

##### utilization in *Aspergillus oryzae*

Sachiko Hasegawa, Haruhiko Suyama, Katsuya Gomi

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

## O-20

### タカアミラーゼ高生産麹菌株の cDNA マイクロアレイ解析

丹野丈記, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

【目的】 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は安全性とタンパク質分泌能の高さから異種有用タンパク質生産の有望な宿主として期待されている。しかし、麹菌のタンパク質分泌に関しては、酵母と同様な分泌系が働いていることが推定されているものの、その分泌能の高い要因などの詳細についてはほとんど解明されていない。本研究では、将来的な異種タンパク質の高生産株の育種に応用するための基盤として、cDNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現プロファイル解析により、麹菌自身が分泌するタンパク質であるタカアミラーゼの高生産株において特長的な発現を示す遺伝子を明らかにすることを目的とした。

【方法及び結果】 タカアミラーゼ高生産麹菌株は、タカアミラーゼ遺伝子 (*amyB*) のコード領域を高発現用ベクター pNGA142 の Pgl142 の下流に連結して、宿主株の *niaD* 部位にタンデムに 2 コピー導入した株を造成して用いた。pNGA142 を 2 コピー導入した株を対照株として用い、両株をマルトースを炭素源とする培地で培養した菌体から調整した mRNA をそれぞれ Cy3-と Cy-5UTP で蛍光ラベルしてマイクロアレイ解析を行った。2000 遺伝子が搭載された cDNA マイクロアレイを用いて解析を 3 回繰り返した結果、高生産株では対照株に比べて 2 倍以上の発現を示した遺伝子が 8 個見出された。その中には、*bipA* や HSP30 などが存在し、これらのシャペロン遺伝子がタカアミラーゼ高分泌生産時に高発現していることが示された。

1) 丸山ら：2002 年度日本農芸化学会講演要旨集, p.192

#### cDNA microarray analyses of TAKA-amylase overproducing strains of *Aspergillus oryzae*

Takeki Tanno, Katsuya Gomi

(Div. Bioscil. Biotech. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ)

## O-21

### 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の固体培養における発現プロファイリング

有馬寿英<sup>1</sup>, 赤尾 健<sup>2,3</sup>, 坂本和俊<sup>2</sup>, 岩下和裕<sup>2</sup>, 山田 修<sup>2</sup>, 秋田 修<sup>2</sup> (<sup>1</sup>生研機構,<sup>2</sup>酒総研,<sup>3</sup>国税庁)

この地球に住む多種多様な民族にはそれぞれに固有の文化が培われている。その文化の最たる物の一つが、食文化である。日本に住む我々日本人にも独自の食文化が古来より根付いており、その食の土台を支えているのは醤油、味噌、そして清酒等の醗酵食品であると考えられる。これら醗酵食品の生産に用いられる主たる方法は、麹菌 (*Aspergillus oryzae*) を様々な穀類で生育させる固体培養 (麹づくり) と呼ばれている培養方法である。この培養方法は、簡易な装置で培養可能であり、かつ有用な酵素が大量に分泌・生産される等の産業的において重要な特性を有していると考えられる。固体培養では、先人の知恵と経験に負うところが大きく、その詳細な解析が非常に困難であったが、近年の分子生物学の発展と共に固体培養における分子生物学的解析が徐々にではあるが進展しつつある。すなわち、固体培養で特異的に発現する遺伝子が幾つか単離・解析され、固体培養における遺伝子発現制御機構がほんの僅かではあるが明らかにされつつある。

本研究では、昨年山田等によって発表された NRIB3000 (第二回糸状菌分子生物学コンファレンス 59 P-58) を用いて、固体培養における発現プロファイリングを行い、得られた結果について紹介する。

#### Transcription profiling in solid-state fermentation of *Aspergillus oryzae*

Toshi-Hide Arima<sup>1</sup>, Takeshi Akao<sup>2,3</sup>, Kazutoshi Sakamoto<sup>2</sup>, Kazuhiro Iwashita<sup>2</sup>, Osamu Yamada<sup>2</sup>, Osamu Akita<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>BRAIN, <sup>2</sup>NRIB, <sup>3</sup>NTA)

# Poster Session

## 1P-1

### 植物病原菌 *Alternaria alternata* における conditionally dispensable (CD) 染色体

赤木靖典, 赤松 創, 尾谷 浩, 児玉基一郎 (鳥取大・農)

宿主特異的毒素 (HST) を生産する各種 *A. alternata* (Aa) 病原型菌は, 非病原性 Aa では認められない 1.7 Mb 以下の小型染色体 (SC) を保有し, リンゴ病原型 (A), トマト病原型 (T) では, それぞれの SC 上に HST 生合成遺伝子 *AMT*, *ALT1* が座乗している。A および T の SC プローブによるサザン解析の結果, 本染色体は Aa 菌群が共通的に保有する他の染色体とは異なる特異的配列から主に構成され, これら SC が supernumerary 染色体であるとともに CD 染色体 (CDC) であることが示唆された。PFGE による核型分析の結果, T の SC は菌株の由来には関わらず, 全て共通のサイズ (1 Mb) を示したことから, T 菌における CDC の起源について検討した。その結果, 世界各地で分離された T 菌株間において, CDC 以外の染色体の PFGE 核型, ITS 領域, 交配型 (MAT),  $\beta$ -tubulin, メラニン生合成 PKS 遺伝子など CDC 以外の染色体に座乗する遺伝子のシーケンスで違いが認められた。一方, CDC 上の *ALT1*, *MSAS* では 100% の相同性が認められた。さらに, T 菌の類縁性を Aa の反復配列およびテロメア配列の finger printing (FP) で比較すると共に, rare cutting enzyme (RCE) 処理による RFLP 解析を行った。その結果, T 菌株間において, 明確な多型が見出され, これら菌株の遺伝的バックグラウンドが異なっていることが示された。また, 染色体 DNA の RCE サザン解析において, 中型染色体に座乗する PKS 遺伝子をプローブとした場合菌株間で多型がみられるのに対し, CDC 上の *ALT1* の場合, バンドサイズは全ての T 菌で一致した。これらの結果から CDC は水平移動により T 菌株集団中に拡散した可能性が示唆された。そこで次に T 菌と他の病原型菌株間で融合株を作製し, CDC の菌株間における移行と保持の可能性に関して検討した。その結果 T 菌-ナン病原型 (J) 間で得られた融合株は, T 菌の遺伝的バックグラウンドのもとで J 菌の HST 生合成遺伝子, *AKT1* が座乗する 1.8 Mb CDC を安定して保持し, 両宿主に病原性を示すようになり, 宿主範囲の拡大が可能となることが示された。

#### Conditionally dispensable (CD) chromosomes in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*

Yasunori Akagi, Hajime Akamatsu, Hiroshi, Otani, Motoichiro Kodama (Tottori Univ. Fac. of Agric.)

## 1P-2

### 植物病原菌 *Alternaria alternata* が普遍的に保有する環状ペプチド合成酵素遺伝子の機能解析

森本泰介, 赤松 創, 尾谷 浩, 児玉基一郎 (鳥取大農)

宿主特異的毒素である AM 毒素や HC 毒素, *Alternaria* 属菌の非特異的毒素 tentoxin などは環状ペプチド様構造を有し, 生合成には環状ペプチド合成酵素 (CPS) が関与する。このような環状ペプチド化合物の生合成は, それぞれの生産菌が保有する特定の CPS 遺伝子が支配している。一方, 本研究では各種 CPS 遺伝子の保存領域よりデザインしたディジェネレートプライマーを用いた PCR 法により, 種々の植物病原菌を含む *A. alternata* 病原菌群において普遍的に分布する CPS 遺伝子 (*ACPI*) をクローニングした。ジーンターゲットングにより *ACPI* 破壊株を作出し, *A. alternata* apple pathotype (リンゴ斑点落葉病菌), *A. alternata* Japanese pear pathotype (ナシ黒斑病菌) などにおいて各種表現型と本 CPS 遺伝子との関連を調査した。その結果, コロニー形態, 菌糸伸長, 感染行動, 病原性および毒素生産能に関しては, 野生株と大差が認められなかった。一方, 孢子形成培地に DW を加えた後, 一定時間震盪して, 分生子柄からの離脱孢子数を比較したところ, *ACPI* 破壊株では野生株と比較して 1/20 程度に減少しており, 孢子離脱阻害が認められた。この場合, 培地上に形成された孢子数自体には大差がなかった。以上の結果, *ACPI* は分生子柄からの孢子の離脱に関与している可能性が示唆された。

#### Functional Analysis of a Cyclic Peptide Synthetase-Encoding Gene (*ACPI*) Generally Found in *Alternaria alternata*

Taisuke Morimoto, Hajime Akamatsu, Hiroshi Otani and Motoichiro Kodama

(Tottori Univ.)

### 1P-3

#### 植物病原菌 *Alternaria alternata* tomato pathotype における宿主特異的 AAL 毒素生合成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 (*A. alternata* tomato pathotype, 茎枯病菌) は, 宿主特異的 AAL 毒素を生産する。先に, 本毒素生合成に関与するポリケチド合成酵素遺伝子 *ALT1* が, シトクロム P450 融合蛋白質, アルコール脱水素酵素, アミノ基転移酵素をコードする *ALT2*, *ALT3*, *ALT4* と遺伝子クラスター (*ALT* クラスター) を構成していることについて報告した。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遺伝子クラスター (*FUM* クラスター) は, *Gibberella moniliformis* において解析されており, *ALT1*, *ALT2*, *ALT3*, *ALT4* は *FUM* クラスター中の *FUM1*, *FUM6*, *FUM7*, *FUM8* と高い相同性を有している。今回, 茎枯病菌のゲノムライブラリーを用いて, さらに広範囲の *ALT1* フランキングゲノム領域を解析した結果, *FUM* クラスターを構成する 5 遺伝子, すなわち ABC トランスポーター, カルボニル還元酵素, LAG 蛋白質, シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ, トリカルボン酸トランスポーターをコードする *FUM19*, *FUM13*, *FUM18*, *FUM15*, *FUM11* にそれぞれ相同性の高い ORF の存在を見出した。これら 5 遺伝子を *ALT5*, *ALT6*, *ALT7*, *ALT8*, *ALT10* とし, *A. alternata* 各種病原型における分布を調べたところ, 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。また, *ALT1* の上流約 30 kb の位置に, *FUM* クラスターには存在しないトレオニアルドラーゼと高い相同性を有する遺伝子 *ALT9* が存在し, 本遺伝子も茎枯病菌に特異的であった。以上より, 茎枯病菌および *G. moniliformis* がそれぞれ保有する *ALT* および *FUM* クラスターの類似性が示された。

Analysis of a gene cluster involved in biosynthesis of host-specific AAL toxin in phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* tomato pathotype

Hajime Akamatsu, Hiroshi Otani, Motochiro Kodama

(Fac. of Agriculture, Lab. of Plant Pathology, Tottori Univ.)

### 1P-4

#### *Alternaria solani* 還元型ポリケチド合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析

笠原 堅<sup>1</sup>, 藤井 勲<sup>1</sup>, 海老塚豊<sup>1</sup>, 及川英秋<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>東大院薬, <sup>2</sup>北大院理)

バレイシヨ夏疫病菌 *Alternaria solani* は還元型オクタケチドである植物毒素 solanapyrone を生産するが, この solanapyrone は prosolanapyrone より酵素的分子内 Diels-Alder 反応により生成する興味深い化合物である。そこで, *A. solani* より還元型ポリケチド合成酵素遺伝子のクローニングを試み, prosolanapyrone とは異なる新規デカケチド alternapyrone の合成酵素遺伝子 *PKSN* を得た。*A. solani* よりさらに還元型 PKS 遺伝子をクローニングするため, ゲノム DNA を鋳型とし, 既知の還元型 PKS の縮合酵素領域の保存アミノ酸配列からデザインしたプライマーを用い, 諸条件を再検討して PCR を行なった。増幅した断片の塩基配列を決定し, 新たに 2 種の新規 PKS 遺伝子断片を得た。ゲノムウォーキングにより PKS 全長の塩基配列を決定し, 各機能ドメインの配置, 全体のホモロジーからいずれも還元型タイプ I 型 PKS をコードすると推定した。そのうちの 1 つの PKS を *Aspergillus oryzae* を宿主として  $\alpha$ -アミラーゼプロモーター下に発現させたところ, コントロールの形質転換体には見られない黄色の色素の生産が認められた。現在, この色素の単離・構造解析をすすめている。

Cloning and Functional Analysis of *Alternaria solani* Reduced-Complex Type PKS Genes

Ken Kasahara<sup>1</sup>, Isao Fujii<sup>1</sup>, Yutaka Ebizuka<sup>1</sup>, Hideaki Oikawa<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>Graduate School of Science, Hokkaido Univ.)

## 1P-5

### *Alternaria solani* の還元型ポリケタイド合成酵素遺伝子 *PKSN* の機能解析

下牧重樹<sup>1</sup>, 吉田奈央<sup>1</sup>, 藤井 勲<sup>1</sup>, 海老塚豊<sup>1</sup>, 及川英秋<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>東大院薬, <sup>2</sup>北大院理)

<目的>バレイショ夏疫病菌 *Alternaria solani* の生産する植物毒素 solanapyrone は還元型ポリケタイドである prosolanapyrone から酵素的分子内 Diels-Alder 反応により合成されることが知られている。我々は、糸状菌の還元型ポリケタイド合成酵素 (PKS) の機能解析を目的として、これまでに *A.solani* より還元型 PKS 遺伝子 *PKSN* のクローニングに成功しているが、今回、この *PKSN* 遺伝子を異種糸状菌で発現させ、その生産化合物の同定を行なったので報告する。

<実験および結果>*A.solani* よりクローニングした *PKSN* 遺伝子 (全長 7.8kb) を PCR により増幅後、Gateway システムを用いて糸状菌発現ベクター pTAex3 に組み込み、これを protoplast-PEG 法により *Aspergillus oryzae* に形質転換、導入した。得られた形質転換体をデンプンを含む誘導培地で培養したところ、導入遺伝子特異的な化合物の生産が認められた。これを単離、構造決定し、新規化合物 alternapyrone と命名した。本化合物は、その構造から 10 個の酢酸単位の縮合によるデカケタイド鎖に 8 個のメチル基が導入されて合成されることが示唆されたが、実際、[1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]酢酸ナトリウム、[methyl-<sup>13</sup>C]メチオニンを用いて alternapyrone に取り込ませて <sup>13</sup>C-NMR 測定および 2D-INADEQUATE 測定を行なうことでこれを確認した。現在、*PKSN* 遺伝子を含む合成遺伝子クラスター全体の塩基配列決定を進めており、その機能、最終産物の同定についても検討中である。

#### Functional analysis of the reduced complex type polyketide synthase gene *PKSN*

from *Alternaria solani*

Shigeki Shimomaki<sup>1</sup>, Naho Yoshida<sup>1</sup>, Isao Fujii<sup>1</sup>, Yutaka Ebizuka<sup>1</sup>, Hideaki Oikawa<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>Graduate School of Science, Hokkaido Univ.)

## 1P-6

### 植物病原菌 *Alternaria alternata* apple pathotype (リンゴ斑点落葉病菌) における G タンパク質 $\alpha$ サブユニット遺伝子の病理学的役割

山岸大輔\*, 松井英樹\*, 赤松 創\*, 振木昌成\*\*, 尾谷 浩\*, 児玉基一朗\*

(\*鳥取大農, \*\* (株)日立サイエンスシステムズ)

宿主特異的毒素(HST)を生産する *A. alternata* 病原菌の病原性発現機構を解明する一環として、多くの植物病原糸状菌において病原性に関与すると報告されている三量体 G タンパク質  $\alpha$  サブユニット ( $G\alpha$ ) 遺伝子のクローニングと機能解析を試みた。*Cochliobolus heterostrophus* の  $G\alpha$  遺伝子 *CGAI* など各種糸状菌  $G\alpha$  遺伝子配列からデザインしたディジェネレートプライマーによる PCR, さらにリンゴ斑点落葉病菌 (*A. alternata* apple pathotype, 落葉病菌) ゲノムライブラリーのスクリーニングにより  $G\alpha$  遺伝子 *AGAI* をクローニングした。サザン解析により、*AGAI* が病原性および非病原性 *A. alternata* 各菌株に広く分布していることが明らかとなった。また、本遺伝子は *CGAI* および他の病原糸状菌の  $G\alpha$  遺伝子と高い相同性を示した。そこで次に、遺伝子ターゲッティングにより *AGAI* 遺伝子破壊株を作出し、その性状を解析した。破壊株の PDA 培地上での生育は、野生株に比べて僅かに劣っており、培地上でのコロニー形態も野生株と異なっていた。さらに、培地上での孢子形成能が著しく低下しており、孢子当たりの発芽管数も減少していた。人工セルロース膜上において、破壊株の付着器および侵入菌糸形成率は野生株と同様であったが、宿主リンゴ葉に対する病原性は若干低下していた。以上の結果より、*AGAI* は本菌の形態形成過程に特に関与していることが示唆された。

#### Pathological Role of G-Protein Alpha Subunit Gene in *Alternaria alternata* Apple Pathotype

Daisuke Yamagishi\*, Hideki Matsui\*, Hajime Akamatsu\*, Masanari Furiki\*\*, Hiroshi Otani\* and Motoichiro Kodama\*

(\*Tottori Univ., \*\*Hitachi Science Systems, Ltd.)



## 1P-7

### スエヒロタケにおける、dominant active heterotrimeric G-Proteins (*ScGP-A*, *ScGP-C*) 発現による細胞内 cAMP レベル上昇効果

山岸賢治、木村俊之、鈴木雅博、八巻幸二（東北農業研究センター）、新本洋士（食総研）

キノコにおいては、cAMP は子実体原基形成、Lip, Mnp などの酵素誘導等、細胞の増殖、分化、機能発現に深く関与すると考えられている。菌類においては、例えば *S.cerevisiae* では低分子量 G タンパク質である RAS 遺伝子が、*S.pombe* においては heterotrimeric G protein  $\alpha$  subunits が adenylate cyclase を活性化することにより、細胞内 cAMP レベルを上昇させる。しかし、Homobasidiomycetes であるキノコにおいては、細胞内 cAMP レベルを上昇させる分子機構は明らかでない。そこで本研究では、過去に報告したスエヒロタケ heterotrimeric G protein  $\alpha$  subunits (*ScGP-A, B, C*) 及び、今回検討したスエヒロタケ RAS 遺伝子に dominant active 変異を導入し、スエヒロタケで発現させることによって、これらの G タンパク質群と細胞内 cAMP レベルの関係を検討した。活性型 RAS 遺伝子を発現している monokaryon では、菌糸コロニーが小さく、気中菌糸が高密度になるという変化が観察されたが、細胞内 cAMP レベルは変化しなかった。一方、*ScGP-A, C* 両遺伝子は、monokaryon において気中菌糸をやや薄くすると共に、細胞内 cAMP レベルを対照株と比べ 160%-200% まで上昇させた。dikaryon においては、変異遺伝子の発現量が全体的に減少したため、monokaryon ほどには顕著な cAMP レベル上昇は観察されなかった。しかし、dominant active RAS 遺伝子は、*ScGP-A, C* 遺伝子同様、dikaryon における子実体、子実体原基形成を明らかに遅延させた。

### Elevation of intracellular cAMP levels by dominant active heterotrimeric G protein $\alpha$ subunits *ScGP-A* and *ScGP-C* in homobasidiomycete, *Schizophyllum commune*.

Kenji Yamagishi<sup>1</sup>, Toshiyuki Kimura<sup>1</sup>, Masahiro Suzuki<sup>1</sup>, Hiroshi Shinmoto<sup>2</sup> and Ko-ji Yamaki<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>National Agricultural Research Center for Tohoku Region, <sup>2</sup>National Food Research Institute)

## 1P-8

### アカパンカビ adenylyl cyclase 突然変異を抑圧する形態的突然変異

神崎誠一、工藤倫子、村山肇子（関東学院大・工）

菌糸成長の著しく遅いアカパンカビ形態的突然変異体 cr-1 は adenylyl cyclase クローンにより野生型の形態に戻ることから形態の異常の原因が adenylyl cyclase 遺伝子の突然変異によるものであることが示された。cr-1 は成長を回復させる抑圧突然変異が spontaneous に高頻度で起こるが、そのうちの 1 株から back cross により抑圧突然変異体 hah が単離された。hah は気中菌糸を高く形成するが分生子を形成しない形態的突然変異体であった。この突然変異の原因となる遺伝子を調べたところ protein kinase A の regulatory subunit (mcb) であることが分かったが、報告されている mcb 突然変異体とは形態が異なっていた。hah 突然変異体と mcb 突然変異体とから PCR により mcb 遺伝子をクローニングしそれらの塩基配列解析を行ったところ、mcb 突然変異体では推定上の開始コドンの直前に 18 塩基の欠失があり、hah 突然変異体では推定上の mcb 蛋白質における 87 番目のアルギニン (cgg) がグルタミン (cag) に変化していることがわかった。mcb 遺伝子内における突然変異部位と形態とについて検討する。

### A Morphological Mutation Which Suppresses an Adenylyl Cyclase Mutation in *Neurospora*

Sei-ichi Kanzaki, Michiko Kudo, Tadako Murayama

(College of Engineering, Kanto-Gakuin Univ.)

## 1P-9

### *Aspergillus oryzae* の新規ポリケタイド合成遺伝子のクローニングと機能解析

勢ノ康代, Pravven Rao Juvvadi, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】ポリケタイドは構造の多様性と幅広い生物活性を有する化合物であり医薬品資源として重要な地位を占めている。細菌、高等植物の生産するポリケタイド合成酵素(PKS)はタイプ I、II、III と分類されており機能解析が進んでいる一方で、多種多様な二次代謝産物を生産する糸状菌の PKSs の研究は発展途上にありタイプ III PKS の報告はこれまでにない。本研究ではわが国の発酵産業に大きく貢献してきた *Aspergillus oryzae* のゲノムデータベースを利用し、新規 PKS 合成遺伝子の発見と機能解析を目的とし、タイプ III PKS 合成遺伝子の検索とクローニングを試みた。

【方法および結果】放線菌の生産するタイプ III PKS をコードする *rppA* 遺伝子配列を用いて *A. oryzae* ゲノムデータベース上で検索を行ったところ、2つの相同遺伝子の存在が示唆された。両遺伝子の推定アミノ酸配列は植物のタイプ III PKS であるカルコン合成酵素とも相同性を有しており、触媒に関与する3アミノ酸が保存されていた。現在、両遺伝子のクローニングを行い、高発現株および破壊株の作成を行っている。

### Cloning and characterization of a novel polyketide synthase gene from *Aspergillus oryzae*.

Yasuyo Seshime, Pravven Rao Juvvadi, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto

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

## 1P-10

### *Phoma* sp. の芳香族型ポリケタイド合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析

柏延之, 藤井 勲, 海老塚豊 (東大院薬)

糸状菌 *Phoma* sp. BAUA 2861 株は、DNA トポイソメラーゼ I 阻害物質 topopyrone 類を生産する (Y. Kanai *et al.*: *J. Antibiot.* 53, 863-872 (2000))。topopyrone 類は抗腫瘍活性、抗ウイルス活性、抗菌活性など様々な活性が報告されている。また、この化合物は C<sub>2</sub> ユニット 9 つからなるノナケタイドであるが、糸状菌からの芳香族型ノナケタイド合成酵素遺伝子のクローニングはこれまでのところ報告例はない。そこで、本研究においては、topopyrone 生合成に関与する PKS 遺伝子の機能解析を目的にそのクローニングを試みた。糸状菌芳香族ポリケタイド合成酵素においてよく保存された縮合酵素領域から縮重入りプライマーをデザインし、BAUA2861 株のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、三種類のコア配列 (約 750 bp) を得た。その相同性から、topopyrone の生合成に関与する可能性があると考えられた 2 つのコア配列それぞれについて PKS の全長塩基配列を決定した。両者は共にクライゼン閉環型のタイプ I 芳香族 PKS をコードするものと考えられ、*pnk1* および *pnk2* と命名した。これらを発現用ベクター pTAex3 にサブクローニングし、異種糸状菌 *A. oryzae* に形質転換、導入し、生産化合物を HPLC で分析した。その結果、*pnk2* の形質転換体から topopyrone と考えられる特異的な化合物の生産が確認された。現在、その単離精製および構造決定を行っている。

### Cloning and Functional Analysis of PKS Genes from the Topopyrone Producing Strain of *Phoma* sp.

Nobuyuki Kashiwa, Isao Fujii, Yutaka Ebizuka

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Tokyo)

## 1P-11

### ***Rhizopus oligosporus* の生産する抗菌性ペプチド(ABP)遺伝子のクローニング**

山田 修, 坂本和俊, 中山 祐, 小関卓也, 藤田晃子, 秋田 修 (酒総研)

*Rhizopus oligosporus* は、大豆を原料としたインドネシアの伝統的発酵食品「テンペ」の製造に用いられている有用糸状菌である。我々は、*R. oligosporus* NBRC8631 株が、テンペ製造における主要な汚染菌である納豆菌に対する抗菌性物質を生産することを見だし既に報告している (Kobayashi *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 94 (1992))。この抗菌性物質は、納豆菌の他数種のグラム陽性細菌にのみ活性を示し、精製の結果、分子量約 5,500 の単純ペプチドであった。また、pH 及び温度に対して高い安定性を有しており、アミノ酸組成分析から、そのシステイン含量は 20% におよぶものと推定された。そこで今回、このユニークな抗菌性ペプチド (ABP) の作用機作の解明、立体構造解析及び食品等への応用を視野に、ABP 遺伝子をクローニングすることとした。

精製 ABP より N 末端及び C 末端アミノ酸配列解析により ABP 一次構造を推定し、degenerate PCR により *R. oligosporus* NBRC8631 株ゲノム DNA より ABP 遺伝子断片を取得した。興味深いことに、得られた ABP 遺伝子断片をプローブとしたサザン解析の結果、ABP 遺伝子はゲノム中に 2 コピー存在するものと予想された。そこでゲノムウォーク法により 2 種類の ABP 遺伝子全長のクローニングを行い、それぞれ ABP1 及び ABP2 と命名した。両遺伝子は全領域にわたり高い相同性を有するとともに、231 塩基からなる ORF を 1 つ含んでいた。これらの ORF は、28 アミノ酸からなるシグナル配列の直後に長さ 49 アミノ酸の ABP 配列が続く、全長 77 アミノ酸からなるペプチドをコードしていると推定され、ABP1 及び ABP2 遺伝子における成熟 ABP 一次構造は完全に一致していた。また、ノーザン解析より、これら ABP 遺伝子のうち少なくとも 1 つは発現していることが確認された。現在、ABP 遺伝子の酵母における発現系の構築を試みている。

#### **Cloning of the Antibiotic peptide (ABP) gene from *Rhizopus oligosporus***

Osamu Yamada, Kazutoshi Sakamoto, Tasuku Nakayama, Takuya Koseki, Akiko Fujita and Osamu Akita (NRIB)

## 1P-12

### **黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の高温誘導性遺伝子とそのプロモーター解析**

松下真由美, 鈴木聡, 楠本憲一, 柏木 豊 ((独) 食総研)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* はわが国の伝統食品であるみそ、醤油、清酒などの製造に必須であるとともに、酵素生産にも用いられ、産業上重要な糸状菌である。製麹においては工程終期の高温により、糖化酵素等の生産が促進するが、高温時に発現する遺伝子については、ほとんど知られていない。そこで我々は、EST 解析及びサブトラクション法を用いて、高温誘導性遺伝子を取得した (1)。本研究では、高温誘導性遺伝子のひとつについてプロモーター領域の解析を行うことを目的とした。

[結果] 培養温度 37°C 及び 42°C におけるサブトラクション法により得られた遺伝子から、ノーザン解析により、培養温度が 30°C 以下ではほとんど転写されず、37°C 以上にて大量に転写される高温誘導性遺伝子を取得した。さらに、ベクトレット PCR 法により、本遺伝子の 5' 上流域約 2kb を取得した。この領域には、ストレス応答配列に類似の塩基配列が存在することがわかった。また、GUS アッセイ法を用いて、高温による遺伝子発現の増強を調べた結果、培養温度を 30°C から 42°C に上昇することにより、β-グルクロニダーゼ活性が 50 倍以上高発現した。現在、高温誘導に必要なプロモーター領域を解析している。

(1) 松下ら、日本農芸化学会 2003 年度大会講演要旨集、p180

#### **Analysis of a heat induced protein gene from *Aspergillus oryzae*.**

Mayumi Matsushita, Satoshi Suzuki, Ken-Ichi Kusumoto, Yutaka Kashiwagi

(Natl. Food Res. Inst.)

## 1P-13

### *Aspergillus nidulans eglA* 発現誘導への MCM1p 結合配列の関与

遠藤良知、加藤雅士、塚越規弘、小林哲夫（名大院・生命農）

【目的】 *Aspergillus nidulans* における、endo- $\beta$ -1,4-glucanase A 遺伝子 (*eglA*) の発現は CMC、セロピオースにより誘導され、グルコースをはじめとした様々な炭素源で抑制される。*eglA* プロモーター上には転写促進因子 HAP complex の結合配列 CCAAT box や転写抑制因子 CreA 結合配列が複数存在し、実際 *eglA* の転写促進、グルコース抑制にそれぞれ関与していることが明らかとなっている。

*eglA* のプロモーター解析から、現在 220~81 領域中に転写誘導配列の存在が示唆されている。しかし、この領域をさらに小断片化すると有意な誘導能が認められない。これは複数の配列が誘導に必須であるためと考えられる。本研究では 220~81 について内部欠失などの手法を用いてより詳細に機能解析を行なった。

【方法と結果】 220~81 領域をさらに 5'、3' 欠失及び内部欠失し、*Aoryzae* 由来タカアミラーゼ A 遺伝子 (*taa*) プロモーター上流に導入した。ここで用いた *taa* は 138 から上流を欠失しており、転写促進、誘導、抑制に関わる制御配列は存在しない。

-148 ~ -124 の 25bp 内部欠失によりレポーター遺伝子の発現が消失した。これは本領域が転写に必須であることを示している。この領域中には CCTTTTAGG という酵母転写因子 MCM1p の結合配列が存在する。MCM1p は酵母内において、他の転写制御因子をリクルートする機能を有することが報告されている。従って、*eglA* の誘導にはセルラーゼ特異的転写因子に加え、MCM1p 様タンパク質が必須であることが示唆される。

### Possible involvement of MCM1p binding site in induction of the *A.nidulans eglA* gene

Yoshikazu endo, Masashi Kato, Norihiro Tukagoshi, Tetsuo Kobayashi

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

## 1P-14

### *Aspergillus oryzae thiA* のチアミンによる発現制御機構

窪寺隆文<sup>1)</sup>、渡辺 睦<sup>1)</sup>、吉内くみ<sup>1)</sup>、山下伸雄<sup>1)</sup>、西村 顕<sup>1)</sup>、中井 進<sup>1)</sup>、五味勝也<sup>2)</sup>、花本秀生<sup>1)</sup>（白鶴・研開<sup>1)</sup>、東北大院農・生物産業創成<sup>2)</sup>）

*thiA* はチアミン(Th)生合成に関連する遺伝子の 1 つで、培地中の Th による発現制御を受ける。GUS レポーター遺伝子を用いたプロモーター解析により、発現制御に関わるシス因子(region A と B)を同定した。region A と B は 5'-上流領域のイントロン中に存在していた。このイントロンのスプライシングは、region A の欠失や Th の添加により阻害され、遺伝子発現に必須であった。これらのことから、Th が region A を介してスプライシングを制御し、遺伝子発現を調節する新たな機構の存在が示唆された。また region A と B は、Sudarsan らによって報告された Th ニリン酸に特異的な riboswitch<sup>1)</sup>(mRNA 制御因子)に含まれていた。

文献： 1) RNA, 9: 644-647 (2003)

### Regulation mechanism of Thiamine-regulated gene *Aspergillus oryzae thiA*.

Kubodera Takafumi<sup>1)</sup>, Watanabe Mutsumi<sup>1)</sup>, Yoshiuchi Kumi<sup>1)</sup>, Yamashita Nobuo<sup>1)</sup>, Nishimura Akira<sup>1)</sup>, Nakai Susumu<sup>1)</sup>, Gomi Katsuya<sup>2)</sup>, Hanamoto Hideo<sup>1)</sup>

(Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd.<sup>1)</sup>, Dep. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.<sup>2)</sup>)

## 1P-15

### 醤油麹菌 *Aspergillus sojae* のアミラーゼ遺伝子の解析

北本則行、藤野恵美、松井淳子、安田（吉野） 庄子（愛知産技研・食工技セ）

【目的】醤油麹菌 *Aspergillus sojae* は麹菌 *Aspergillus oryzae* と非常に近縁であるが、そのアミラーゼ活性は *A. oryzae* と比較すると非常に低い。*A. oryzae* のタカアミラーゼA遺伝子及びその遺伝子誘導発現機構については詳細な解析が行われ、多くの基礎的知見が蓄積しつつある。一方、*A. sojae* のアミラーゼ遺伝子及びその遺伝子誘導発現機構についてはほとんど解析がなされていない。本研究では、*A. sojae* のアミラーゼ遺伝子誘導発現機構に関する知見を得るために、*A. sojae* 及び *A. oryzae* のアミラーゼ遺伝子の比較を行った。

【方法及び結果】*A. oryzae* *taaG2* 遺伝子をプローブとするゲノムサザン解析の結果より、*A. sojae* KBN1340 株には1個の *taa* 遺伝子 (*Astaa* 遺伝子) が存在することが示された。*Astaa* 遺伝子の解析を行ったところ、その遺伝子は8個のイントロンを含み498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。*Astaa* 遺伝子及び *AotaaG1* 遺伝子の塩基配列は93.1%の一致が見られ、そのアミノ酸配列は98.2%の一致が見られた。*A. sojae* KBN1340-P2 株から取得した *Astaa* 遺伝子破壊株はアミラーゼ生産能を消失することから *Astaa* 遺伝子産物が *A. sojae* KBN1340 株の主要なアミラーゼであると考えられた。*Astaa* 遺伝子プロモーター配列中の-264には AmyR 結合配列が存在し、*Astaa* 遺伝子の誘導発現には *A. oryzae* と同様に AmyR が関与していることが推定された。*Astaa* 遺伝子プロモーター配列中の-378に存在する CCAAAT 配列を CCAATT 配列に変更することによって、プロモーター活性が約4倍上昇した。

#### Molecular analysis of an amylase gene (*Astaa*) from *Aspergillus sojae*

Noriyuki Kitamoto, Emi Fujino, Junko Matsui, Shoko Yoshino-Yasuda

(Food Res. Center, Aichi Ind. Technol. Inst.)

## 1P-16

### 麹菌のエノラーゼプロモーター (*PenoA*)へのシスエレメント導入効果

坪井宏和<sup>1</sup>、戸田智美<sup>2</sup>、峰時俊貴<sup>1</sup>、広常正人<sup>1</sup>、町田雅之<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>大関総研、<sup>2</sup>産総研)

(目的)我々は既に、シスエレメント(RegionIII)を任意のプロモーターに導入することによる蛋白質高発現システムの開発に成功している<sup>1)</sup>。今回は、更なる高発現プロモーターの構築のために、解糖系の中でも特に高発現している *enoA*<sup>2)</sup> に着目し、そのプロモーターへの RegionIII の導入効果について報告する。

(方法と結果) *PenoA* の異なる2ヶ所に RegionIII 繰返し配列を両方向に導入し、4種類の改変プロモーターを構築した。次に、改変プロモーター下で発現する *uidA* 遺伝子の相同的1コピー導入株の菌体内 GUS 活性を測定したところ、高いものでは、改変前の20倍以上の活性(15000U/mg-protein以上)を示した。さらに、多コピー株の中には、10万U/mg-protein以上のGUS高生産株も取得できた。この結果は、RegionIIIが *PenoA* でも強力に機能していることを示唆すると共に、本方法はプロモーター改良に非常に有効であることが改めて証明できた。

1)峰時：化学と生物 38, 831-838(2000)

2)Machida et.al. :Curr. Genet. 30, 423-431(1996)

#### Improvement of enolase promoter (*PenoA*) by introduction of cis-element in *Aspergillus oryzae*

Hirokazu Tsuboi<sup>1</sup>, Tomomi Toda<sup>2</sup>, Toshitaka Minetoki<sup>1</sup>, Masato Hirotsune<sup>1</sup>, Masayuki Machida<sup>2</sup>

(Gen. Res. Lab., Ozeki Co.<sup>1</sup>, Natl. Inst. Of Adv. Ind. Sci. Tech. (AIST)<sup>2</sup>)

## 1P-17

### 麹菌の新規強力プロモーター*sodM*の単離とタンパク質生産

石田博樹、秦 洋二、川戸章嗣、安部康久、柏木 豊<sup>1</sup> (月桂冠総研・<sup>1</sup>食総研)

我々は麹菌 *A. oryzae* において、液体培養特異的に高発現するチロシナーゼ遺伝子プロモーター*melO* を用いた麹菌の遺伝子高発現系を構築した<sup>1</sup>。*melO* プロモーターは培養後期に発現するため目的生産物の純度が高くなるという利点はあるものの、長時間の培養が必要など生産性に課題を有している。我々は麹菌 EST ライブラリーの発現情報に基き、より強力なプロモーターの取得を目的として、GUS を用いたレポーターアッセイによるプロモータースクリーニングを行った<sup>2</sup>。その結果、麹菌のマンガン型スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子(*sodM*)由来のプロモーターが液体培養で特異的に高発現することが判明した。またレポーター解析やノザン解析から当該プロモーターは、既知の麹菌由来のプロモーターと比較しても発現能は高く、活性酸素存在化や高温などストレス条件下で誘導されることも明らかとなった。

次に当該プロモーター支配下でグルコアミラーゼとフコースレクチンの麹菌での組み換え生産を検討した。その結果、培養後期に高発現するプロモーター*melO* と異なり、*sodM* プロモーターは培養初期から良好なグルコアミラーゼ生産性を示した。具体的には *sodM* プロモーター下流にグルコアミラーゼ遺伝子 *glaB* の ORF を連結した融合遺伝子を、*niaD* をマーカーとして1コピー導入した形質転換体において、培養3日間で約1 g/L-broth のグルコアミラーゼが菌体外に分泌生産された。またレクチンの生産においても菌体内タンパク質の主要タンパク質として過剰生産させることに成功した。以上より、*sodM* プロモーターが麹菌を用いた物質生産において非常に有用かつ汎用性があることが示唆された。

<sup>1</sup> Ishida H et al., (2001) Appl Microbiol Biotechnol 57: 131-137, <sup>2</sup>特開 2001 - 224381

**Development of a strong gene expression system in *A. oryzae* based on the *sodM* promoter derived from Mn superoxide dismutase gene.**

Hiroki Ishida, Yoji Hata, Akitsugu Kawato, Yashuhisa Abe, Yutaka Kashiwagi<sup>1</sup> (Gekkeikan sake.co.ltd., <sup>1</sup>National Food Research Institute)

## 1P-18

### 誘導シグナルに応答した AmyR の核局在化

牧田智裕、加藤雅士、塚越規弘、小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)

(目的)AmyR は糸状菌アミラーゼ遺伝子群の発現誘導に関わる転写活性化因子であり、Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>型の DNA 結合モチーフを有している。Gal4 に代表される Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>型の転写因子は、現在までの10例弱の報告ではいずれも構成的に核に局在し核内で誘導シグナルに応答すると考えられている。本研究では、AmyR に GFP を融合し、誘導シグナル存在、非存在下での細胞内局在部位を解析した結果、AmyR は誘導シグナルに応答して核に移行する初めての Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>型転写因子であることが明らかとなった。

(方法及び結果) GFP::AmyR 融合遺伝子を *alcA* プロモーターの下流に連結し、*A.nidulans* 内で発現させた。アミラーゼ遺伝子群の発現誘導物質であるイソマルトースの存在、非存在下における GFP::AmyR の細胞内局在部位を解析した結果、非存在下では核と細胞質に蛍光が見られたが、存在下では核に蛍光が集中していた。従って、AmyR は誘導シグナルに応答して核に移行することが明らかとなった。さらに C 末欠損変異体が構成的に核に局在したことから、C 末端に核局在化の制御領域が存在していることが示唆された。また推定核移行シグナルの変異体の解析結果から、AmyR の核移行シグナルは DNA 結合領域内二ヶ所に存在する RRRK、RRK 配列であることが明らかとなった。

**Inducer-dependent nuclear entry of AmyR.**

Tomohiro Makita, Masashi Kato, Norihiro Tsukagoshi, Tetsuo Kobayashi

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

## 1P-19

### グルコースによる AmyR 核局在化の誘発とアミラーゼ誘導

村越有里子、牧田智裕、加藤雅士、塚越規弘、小林哲夫（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の発現はマルトース、イソマルトースを始めとした様々な少糖により誘導され、グルコースにより抑制される。アミラーゼ遺伝子の転写活性化因子 AmyR の核局在化は誘導物質イソマルトースにより誘発されることから、転写誘導は誘導物質依存的な AmyR の核移行により引き起こされると考えられる。本研究では様々な少糖について核局在化誘発能を検討した結果、グルコースも誘導物質であることが明らかとなったので報告する。

【方法・結果】 発現誘導物質であるコージビオース、マルトースはイソマルトースと同様、GFP::AmyR の核局在化を誘発した。また、マルトースによる核局在化は  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤により阻害された。これらの結果はアミラーゼ活性を指標とした誘導物質の解析結果と一致するものであり、マルトースはイソマルトースに変換されてから AmyR の核局在化を誘発すると考えられる。一方、転写抑制物質グルコースも核局在化を誘発したことから、グルコースが誘導物質として機能する可能性が考えられた。そこで、カーボンカタボライト抑制が解除された CreA 変異株を用いて検討したところ、グルコースによるアミラーゼ誘導が観察され、さらに低濃度グルコースでは野性株においても誘導が認められた。以上から、グルコースは AmyR 依存的な誘導と CreA 依存的な抑制を同時に引き起こし、そのバランスにより野性株においてもアミラーゼ誘導を引き起こすことが示された。

#### Glucose can trigger nuclear entry of AmyR to activate transcription of the amylolytic genes in *A. nidulans*.

Yuriko Murakoshi, Tomohiro Makita, Masashi Kato, Norihiro Tsukagoshi, Tetsuo Kobayashi (Dept. of Biological Mechanisms and Functions, Grand. Sch. of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.)

## 1P-20

### 麹菌キシラナーゼ遺伝子特異的発現制御因子 XlnR の機能ドメイン解析

田中寿基、丸井淳一郎、塚越規弘、加藤雅士、小林哲夫（名大院生命農・生物機構）

XlnR は麹菌に存在するキシラン・セルロース分解酵素遺伝子群の誘導発現を広く制御する転写因子である。現在までの解析により、本因子はキシラン、セルロースに由来するシグナルを認識し、支配下遺伝子の転写を誘導することが明らかにされている。今回、XlnR の転写の活性化・シグナルの受容に関わる機能ドメインについての知見を得ることを目的とし XlnR と *Aspergillus nidulans* のアミラーゼ生産に関わる転写因子 AmyR とのキメラ転写因子を作成し、解析を行った。

AmyR::XlnR キメラ転写因子は AmyR の DNA 結合ドメインを含む N 末端部分(1~68 aa) と XlnR の DNA 結合ドメイン直後から C 末端部分にかけての領域(159~971 aa) をつなげることで構築した。これを amyR 破壊株に導入し、タカアミラーゼ A 遺伝子をレポーターとしてアミラーゼ活性測定を行ったところキシランの添加に依存したアミラーゼ活性が確認された。この結果より XlnR のシグナル認識や転写活性化に関わるドメインは XlnR の 159 から 971 番目のアミノ酸領域内に存在しており、DNA 結合ドメインとは独立して機能しうることが明確に証明された。さらに、同キメラ転写因子を C 末端側より順次欠失させた部分欠失変異因子を構築し、解析を行ったところ、いずれの因子もアミラーゼ活性が激減していることが明らかになった。以上の結果より、XlnR の C 末端部分に転写活性化に重要な領域があることが示唆された。

#### Domain analysis of a transcriptional activator, *Aspergillus oryzae* XlnR, mediating xylanolytic expression

Hisaki Tanaka, Junichiro Marui, Norihiro Tsukagoshi, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi  
(Dept. of Biological Mechanisms/fun, Nagoya Univ.)

## 1P-21

### 糸状菌 CCAAT-box 結合複合体と相互作用する因子 HapX の機能解析

長瀬 崇, 田中昭光\*, 小林哲夫, 塚越規弘, 加藤雅士 (名大院・生命農 \*ヒゲタ醤油)

CCAAT-box 結合複合体 (Hap 複合体) は多くの糸状菌遺伝子の転写を促進していることが知られているが、具体的な転写促進のメカニズムは殆ど明らかになっていない。我々は Hap 複合体の転写促進機構を解明することを目的として、酵母内において Hap 複合体との相互作用能及び転写促進能を有する因子の検索系を確立し、糸状菌 *Aspergillus nidulans* から推定転写因子 HapX をコードする遺伝子の取得に成功した<sup>1)</sup>。HapX は N 末端より Hap 複合体との推定相互作用ドメイン(39~55 aa)、bZIP 構造(63~78 aa; 推定 DNA 結合ドメイン)を有していたが、どのような遺伝子の転写促進に関わるかは現在のところ不明である。今回、HapX の DNA 結合特性を調べることを目的として、N 末端部分のリコンビナントタンパク質を調製し生化学的な解析を行った。

推定 DNA 結合ドメインを含む N 末端部分(1~158 aa)と MalE (マルトース結合タンパク質)との融合タンパク質 MalE-HapX(1~158)を取得し、上記の検索系に用いたレポーター遺伝子のプロモーター DNA をプローブとして DNA 結合アッセイ(EMSA)を行ったところ、MalE-HapX(1~158)は特異的にプローブ DNA に結合することが明らかとなった。この結果より、予想通り HapX は DNA 結合タンパク質であり、N 末端領域に DNA 結合ドメインが存在することが示された。現在、HapX の結合する DNA 配列の特定を進めている。

1) A.Tanaka et al.*BBA* 1576,176-182 (2002)

### Analysis of HapX, a transcriptional factor which interacts with the fungal CCAAT-binding complex.

Takashi Nagase, Akimitsu Tanaka\*, Tetsuo Kobayashi, Norihiro Tsukagoshi, and Masashi Kato

(Dept. of Biological Mechanisms and Functions, Grad. Sch. of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.,\*R&D Dept.

Higeta Shoyu Co., Ltd)

## 1P-22

### 麹菌(*A.oryzae*)の固体培養において発現する転写制御因子遺伝子 *atfB* の解析

坂本和俊, 山田 修, 秋田 修 (酒総研)

麹菌は固体培養において液体培養よりも有用酵素等の分泌能が高いことが知られている。これは培養方法の違いにより遺伝子発現レベルの大きな差異が生じるためと予想されており、実際、赤尾らによりサブトラクション法で固体・液体培養において遺伝子発現パターンに差異が生じる遺伝子が数多く単離されている<sup>1)</sup>。今回我々は、この遺伝子発現の差異をコントロールする遺伝子を単離することを目的として、麹菌 EST データベース中の転写制御因子様遺伝子に着目して研究を行った。

固体培養条件 (ふすま、米麹、醤油麹) から単離された EST クローンのうち、配列やホモロジーから転写制御因子をコードすると考えられる 20 遺伝子について RT-PCR により固体・液体での遺伝子発現を確認した。この中から固体培養で特に発現が強い bZIP タイプに属する転写制御因子様タンパク質をコードする遺伝子を見出し、分裂酵母の *atf1* 遺伝子との相同性から *atfB* と名付けた。また本遺伝子とは別に *atf1* とさらに高い相同性を示す別遺伝子が EST データベース中に存在しており、これを *atfA* と名付けた。

固体、液体培養における両遺伝子の発現パターンを定量性 RT-PCR によりさらに詳細に解析した結果 *atfA* は発現量の変動が少なかったのに対して *atfB* は固体培養初期及び固体培養後期において発現が上昇していることが分かった。現在 *atfA*、*atfB* 遺伝子産物により遺伝子発現が制御される「ターゲット遺伝子」を探索するため、両遺伝子の高発現株を作成して、マイクロアレイによる解析を行っている。

1) Akao, Gomi, Okazaki, Akita (2002) *Curr. Genet.* 41, 275-281

### Analysis of *atfB* gene which encodes transcription factor like protein and is expressed in solid-state culture

Kazutoshi Sakamoto, Osamu Yamada, Osamu Akita (NRIB)



## 1P-23

### 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の cell integrity pathway に関与する転写制御因子をコードする *rlmA* 遺伝子の単離と機能解析

藤岡智則, 古川健太郎, 水谷 治, 阿部敬悦, 山形洋平, 中島 佑 (東北大院・農・応生科)

糸状菌は、培養・環境条件によって様々な細胞の分化を伴う多細胞生物であり、細胞壁合成の制御はその複雑な形態形成に不可欠なものである。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) では、高温や低浸透圧ストレスによるシグナルが cell integrity pathway によって核に伝達され、転写制御因子 Rlm1p により細胞壁合成関連酵素遺伝子の発現が制御される。本研究では、糸状菌の cell integrity pathway による細胞壁合成機構の解明のため、モデル生物 *Aspergillus nidulans* における *S. cerevisiae* Rlm1p ホモログ (RlmA) の機能解析を目的とした。*A. nidulans* のゲノムデータベースを基に、*S. cerevisiae* Rlm1p の DNA 結合ドメインに対して高い相同性を有する推定 *RLM1* ホモログを *A. nidulans* の cDNA ライブラリーから PCR によりクローニングし、*rlmA* と名付けた。*rlmA* は酵母 *rlm1* Δ 株の caffeine 感受性を相補したことから、*A. nidulans rlmA* は *S. cerevisiae RLM1* と同様の機能を有することが明らかになった。また、*A. nidulans rlmA* 遺伝子破壊株 (*rlmA* Δ) を造成し、表現型解析を行ったところ、*rlmA* Δ は細胞壁合成阻害剤に対し感受性を示した。以上より、*rlmA* は細胞壁合成に関与していることが示唆された。現在、*rlmA* Δ における細胞壁合成関連酵素遺伝子のノーザン解析を行っている。

#### Isolation and functional analysis of *Aspergillus nidulans rlmA* gene encoding a transcription factor involved in fungal cell integrity.

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

## 1P-24

### 麹菌の *KexB* 遺伝子破壊は形態形成シグナル伝達経路に異常を及ぼす

水谷治, 椎名松子, 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、破壊株の造成を行ってきた。*kexB* 遺伝子破壊株の表現型は、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。しかし、破壊株は高浸透圧条件下で野生株と同様の表現型を示した。また、麹菌 *KexB* 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、*kexB* 遺伝子破壊株と野生株の固相培養における転写の様子を DNA マイクロアレイを用いて解析した。その結果、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。特に、細胞壁合成酵素遺伝子、*chsB*, *chsC*, *gel2* などが破壊株で高発現していた。この結果と浸透圧で表現型が復帰することから、*kexB* 遺伝子破壊は cell integrity シグナル伝達経路に異常を引き起こしているのではないかと仮説を立てた。そこで、この仮説を検証するために、経時的にこれら遺伝子とこの経路の MAPK である *mpkA* の遺伝子発現解析を行なった。その結果、破壊株において、これらの遺伝子が経時的に高発現していることが明らかになった。これらの結果から、*kexB* 遺伝子破壊は cell integrity シグナル伝達経路に異常をもたらすことが間接的に示唆された。現在、この経路の MPKA が実際に活性化されているか確認している。

#### Disruption of *kexB* gene in *A. oryzae* caused disorder to signal transduction pathway of cell integrity.

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



## 1P-25

### *Aspergillus nidulans* のクラス II キチン合成酵素 ChsA の菌糸内局在部位の解析

一宮維幸, 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の一つである。我々のグループではこれまでに、*Aspergillus nidulans* のクラス II、クラス I に属するキチン合成酵素をコードする遺伝子 *chsA* または *chsC* の単独欠失株 ( $\Delta A$  株、 $\Delta C$  株) が顕著な表現型の変化を示さないのに対し、*chsA chsC* 二重欠失株 ( $\Delta AC$  株) は分生子形成能の大幅な低下や細胞壁構造の異常などを示すことを明らかにしていた。本研究では ChsA の機能を推定するために、その菌糸内局在部位の解析を行った。ChsA の N 末端付近に 6 コピーの HA タグを挿入し (HA-ChsA)、これを  $\Delta AC$  株および  $\Delta A$  株の *argB* 部位において *chsA* プロモーター下で発現させた。 $\Delta AC$  株の分生子形成能は HA-ChsA を発現させることで大きく回復しており、また回復の度合は *argB* 部位で ChsA を発現させた場合と同程度であった。従って、HA-ChsA は ChsA と同様に機能していると考えられた。ウェスタン解析の結果、HA-ChsA の推定分子量である 121 kDa に近い約 123 kDa と、それより大きい約 146 kDa の位置にバンドが検出された。間接免疫蛍光法で HA-ChsA の菌糸内局在部位を検討した結果、弱い蛍光が細胞質にドット状に観察され、また強い蛍光が隔壁に観察された。この強い蛍光は一部の隔壁でのみ観察されたことから、ChsA が菌糸中の隔壁形成に関わっており、隔壁形成後にはそこにとどまらないことが示唆された。

#### Localization of a class II chitin synthase ChsA in *Aspergillus nidulans*

Masayuki Ichinomiya, Hiroyuki Horiuchi and Akinori Ohta

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

## 1P-26

### 糸状菌 *Aspergillus nidulans* のクラス I キチン合成酵素 ChsC の菌糸内局在部位に関する解析

山田絵美, 一宮維幸, 堀内裕之, 太田明徳 (東大・農生科・応生工)

*Aspergillus nidulans* の細胞壁の主要構成成分はキチンであり、キチンは堅い構造をとることから、その合成や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と考えられる。当研究室ではキチン合成酵素遺伝子を 6 種 (*chsA*~*D*、*csmA*、*csmB*) 単離し、その機能解析を行ってきた。現在までの解析により、クラス II とクラス I に属するキチン合成酵素をコードする *chsA* と *chsC* の単独破壊株は野生型株と比較して顕著な表現型の変化を示さないが、*chsA chsC* の二重破壊株 ( $\Delta AC$  株) では細胞壁の肥厚化や分生子柄の形態異常、分生子形成効率の大幅な低下などが観察され、*chsA* と *chsC* が菌糸生長や分生子柄形成において重複した機能を有することが示唆されていた。今回、*chsC* の果たす機能についてさらなる知見を得るために、その遺伝子産物 ChsC の細胞内における局在の観察を試みた。ChsC の N 末端側に 6 コピーの FLAG タグを連結した FLAG-ChsC を発現するためのコンストラクトを作製し、 $\Delta AC$  株に導入した。その結果得られた株では分生子形成効率の大幅な回復が見られ、FLAG-ChsC が細胞内で機能していることが確認された。抗 FLAG 抗体を用いてウェスタン解析を行ったところ、予想される分子量である約 120 kDa の位置にバンドが検出された。また、間接免疫蛍光法によって FLAG-ChsC の細胞内での局在を観察した結果、FLAG-ChsC のシグナルは主に菌糸先端と隔壁に観察され、ChsC が菌糸の先端生長や隔壁形成において機能していることが示唆された。

#### Localization of a class I chitin synthase(ChsC) in *Aspergillus nidulans*

Emi Yamada, Masayuki Ichinomiya, Hiroyuki Horiuchi and Akinori Ohta

(Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

## 1P-27

### 白麹菌の GPI アンカー型細胞壁タンパク質

中村洋二郎<sup>1</sup>, 下飯 仁<sup>1,2</sup>, 伊藤 清<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup> 広大院・先端研 <sup>2</sup> 酒類総合研究所)

【目的】 細胞表層は、細胞が外界と最初に接触する部分であり、そこには細胞外界の情報や、物質の内部への取り込み、細胞間認識・接触等に関わるタンパク質が多数存在している。また培地に直接アクセスできるのは細胞表層であり、細胞表層の機能は醸造・発酵のような実用的な面においても大きな意味を持つ。麹菌のような糸状菌の細胞表層についてはあまり解析されていないが、細胞壁タンパク質と思われるものを数種取得し、それらの局在性等を検討したので報告する。

【方法及び結果】 白麹菌(*A.kawachii* IFO 4308)を使用した。細胞壁タンパク質の候補(CwpA,CwpB)は、T/Sに富み、N 末端には典型的なシグナルペプチド配列が、C 末端には脂肪族アミノ酸のみで構成される疎水性領域が存在することがわかった。これは GPI アンカー型細胞壁タンパク質の典型的な特徴である。そこで、*cwpA* 遺伝子にタグ遺伝子である 3×HA を付加して融合遺伝子を作成し、これを白麹菌に導入した。この形質転換株の細胞壁、細胞膜、細胞外分泌画分を取得し、ウェスタン解析を行うことによって CwpA の局在性を検討した。その結果、形質転換株の細胞膜画分にのみ顕著な抗原抗体反応が認められた。よって、CwpA は GPI アンカー型細胞壁タンパク質であるが、細胞壁ではなく細胞膜にアンカリングしていると考えられた。

### Cell wall proteins of *Aspergillus kawachii*

Yojiro Nakamura<sup>1</sup>, Hitoshi Shimoi<sup>1,2</sup>, Kiyoshi Ito<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Grad.Sch.Adv.Sci.Matter,Hiroshima Univ. <sup>2</sup>Natl.Res.Inst.Brewing)

## 1P-28

### Woronin body 形成に関与する *A. oryzae* HexA の機能および局在解析

丸山潤一、Juvvadi Praveen Rao、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

[目的] 糸状菌のオルガネラ Woronin body は、菌糸損傷時に隔壁孔をふさぎ溶菌の伝播を防ぐ役割をもつ。その形成に関与する *A. oryzae hexA* 遺伝子は、ORF 内の選択的スプライシングにより 2 つの転写産物を発現する。これまでに、*hexA* 遺伝子破壊株において Woronin body が消失したことから、HexA がその形成に必要であることを明らかにした。今回は、溶菌条件における *hexA* 遺伝子破壊株での溶菌の伝播と、選択的スプライシングにより発現した 2 つの HexA の局在変化を解析した。

[方法と結果] 溶菌条件の検討のなかで、寒天培地上に生育させた菌体に水を添加し低浸透圧ショックを与えると、先端のコンパートメントから細胞質が飛び出して溶菌することを *A. oryzae* で初めて発見した。この際に隣接する 2 番目のコンパートメントを観察したところ、野生株では細胞質が維持され、溶菌が防がれたのに対し、*hexA* 遺伝子破壊株では溶菌が伝播していることが確認された。さらに、低浸透圧ショックによる溶菌時での HexA の局在を解析した。このとき、選択的スプライシングの有無の影響を検討するために、*egfp* 遺伝子の下流に、スプライシングされた *hexA* cDNA またはスプライシングされない変異型 *nshexA* 遺伝子を in frame で融合した遺伝子を、野生型 *niaD300* 株に発現させた。低浸透圧ショックにより溶菌を誘導した結果、両融合遺伝子発現株において、溶菌した先端のコンパートメントに隣接する隔壁の中心に、ドット状の EGFP 蛍光が観察された。以上の結果から、低浸透圧ショックによる先端のコンパートメントの溶菌時には、選択的スプライシングにより発現した 2 つの HexA が隔壁孔をふさぎ、他の細胞に溶菌が伝播するのを防ぐ役割をもつことを明らかにした。

### Functional and localization analysis of *A. oryzae* HexA involved in Woronin body formation

Jun-ichi Maruyama, Praveen Rao Juvvadi, Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

## 1P-29

### EGFP を用いた *A. oryzae* ペルオキシソームタンパク質の局在解析

三並正芳, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

[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全体に伝播するのを防ぐため、隔壁孔をふさぐ役割をもつ。その形成に関与する HexA はペルオキシソーム局在配列(PTS1) を含むことから、Woronin body とペルオキシソームとの関係が示唆されている。麹菌における EGFP を用いた解析により、HexA はドット状の構造として観察され、損傷した細胞に隣接する隔壁孔に局在することが示された<sup>1)</sup>。本研究では、EGFP に PTS1 あるいはペルオキシソームタンパク質を融合して発現することにより、Woronin body とペルオキシソームとの関係を解析している。

[方法と結果] これまでに、EGFP-カタラーゼ C (CatC) 融合タンパク質を発現したところ、炭素源がオレイン酸の場合はペルオキシソームと考えられるオルガネラに局在したが、グルコースでは細胞質に観察された<sup>2)</sup>。そこで、CatC の PTS1 を EGFP に融合したところ、炭素源がグルコースでもドット状の局在が見られたことから、これらの局在の違いは PTS1 以外の CatC の構造に起因していることが明らかになった。また、損傷した細胞に隣接する隔壁を観察したところ、EGFP-PTS1 の蛍光は確認されなかった。このことから、PTS1 のみでは機能的な Woronin body に局在することができないことがわかった。現在、脂肪酸のβ酸化に関するタンパク質およびペルオキシソーム膜タンパク質について、局在解析を行っている。

1) 丸山ら、日本農芸化学会 2002 年度大会要旨集 p.170

2) 三並ら、日本農芸化学会 2003 年度大会要旨集 p.183

### Localization analysis of *A. oryzae* peroxisomal proteins by using EGFP

Masayoshi Minami, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

## 1P-30

### 麹菌 *Aspergillus oryzae* は液胞膜 ATPase サブユニット VMA3 相同遺伝子を 2 つ持つ

奈良秀徳, Praveen Rao Juvvadi, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・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<sub>1</sub> ドメインと膜内在性の疎水性サブユニット群 V<sub>0</sub> ドメインが結合してプロトンポンプを形成する。また V<sub>0</sub> ドメインは液胞同士の homotypic な融合に関与していることも報告されている。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<sub>0</sub> 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(Aovma3-1 / vmaC)が単離、解析されていたが、*A. oryzae* Genome Database を検索した結果、さらに別の VMA3 遺伝子ホモログ(Aovma3-2)と思われる塩基配列を発見し、単離した。本研究は、「Aovma3-2 は Aovma3-1 と同様に VMA3 と相同な機能を有するのか否か」、「Aovma3-1 と Aovma3-2 の機能の違いは何であるのか」を解明することを目的としている。

[方法と結果] AoVma3-1 が液胞膜上に局在し<sup>1)</sup>、*S.cerevisiae* VMA3 遺伝子破壊株の表現型を相補することは既に証明済みであるが、AoVma3-2 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 *A. oryzae* に導入し、共焦点顕微鏡を用いて EGFP 蛍光を観察した結果、AoVma3-1 と同様に液胞膜上に局在することが明らかになり、また、*S.cerevisiae* VMA3 遺伝子破壊株の表現型を相補することも証明された。現在、これら 2 つの遺伝子について RT-PCR を用いた発現条件の差異についての検討を行っている。

1) 奈良ら、第 2 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集, p48

### Functional analyses of two homologues of VMA3, subunits of vacuolar ATPase in *Aspergillus oryzae*.

Hidenori NARA, Praveen Rao Juvvadi, Manabu ARIOKA, Katsuhiko KITAMOTO

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

## 1P-31

### 麹菌 *Aspergillus oryzae* における *Aovam3* 遺伝子の機能解析

正路淳也、有岡 学、北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）

【目的】出芽酵母における液胞への小胞輸送の過程で、プレ液胞コンパートメント膜上の Pep12p および液胞膜上の Vam3p の二つの t-SNARE が機能している。これに対し麹菌を含む糸状菌においては、この両者に相当する遺伝子のうち一つしかゲノム配列中に存在しない。これは糸状菌において、液胞ネットワークが出芽酵母と異なる側面を持つことを示唆している。さらに麹菌においては産業上の理由からも、液胞機能に関する研究が期待されている。このような観点から麹菌 *A. oryzae* における *PEP12*、*VAM3* 両者の相同遺伝子 *Aovam3* の機能解析を行った。

【方法及び結果】何らかの理由により *Aovam3* の遺伝子破壊株を取得できなかったため、*A. oryzae thiA* promoter の制御下で *Aovam3* を発現する条件発現株を作成した。取得された条件発現株は *Aovam3* 抑制条件下で野生株と同等の生育速度を示したものの、気中菌糸を全く形成しないという特異な形質を示した。この形質は EGFP-AoVam3 融合タンパク質の発現によって相補され、この時 EGFP 蛍光は主に液胞膜に局在した。融合タンパク質が機能的であることが示されたことから、アーティファクトを可能な限り排除した条件下での液胞膜の動態、融合の観察実験系が構築できた。

#### Functional analysis of *Aovam3* gene of *A. oryzae*.

Jun-ya SHOJI, Manabu ARIOKA, Katsuhiko KITAMOTO

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

## 1P-32

### 麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるオートファジーの可視化

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】麹菌 *Aspergillus oryzae* は、醸造や酵素生産に用いられる産業上重要な微生物である。我々はこれまでに、*A. oryzae* において液胞酵素カルボキシペプチダーゼ Y (CPY) と緑色蛍光タンパク質 EGFP の融合タンパク質 CPY-EGFP を発現することにより液胞を可視化し\*、菌体内外の EGFP 蛍光を指標として液胞タンパク質の輸送に欠損を持つ *vps* (vacuolar protein sorting) 変異株を取得してきた。出芽酵母ではいくつかの *vps* 変異株が、栄養源飢餓にตอบสนองして細胞質成分を液胞で分解するオートファジーに欠損を持つことが知られている。本研究は、*A. oryzae vps* 変異株におけるオートファジーへの影響を検討することを目的とした。

【方法と結果】細胞質に赤色蛍光タンパク質 DsRed2 を発現するプラスミドを用いて、*A. oryzae* CPY-EGFP 発現株を形質転換した。得られた形質転換体の菌糸を蛍光顕微鏡で観察したところ、DsRed2 は細胞質に局在しており、液胞に見られる EGFP 蛍光と明確に区別することができた。一方、形質転換体を窒素源飢餓培地で培養したところ、DsRed2 と CPY-EGFP の局在が微分干渉像で観察される液胞と一致しており、オートファジーを可視化することに成功した。更に、様々な生育時期において観察を行ったところ、通常の栄養条件であっても分生子柄形成や分生子発芽の際にオートファジーが誘導されることが示唆された。また、これまでに取得した麹菌 *vps* 変異株に DsRed2 発現プラスミドを導入したところ、窒素源飢餓状態でも DsRed2 を液胞に取り込まないオートファジー欠損株が含まれていることが示唆された。

\* Ohneda *et al.*, 2002. Fung. Genet. Biol. Vol. 37, pp. 39-48.

#### Visualization of autophagy in koji mold, *Aspergillus oryzae*.

Mamoru Ohneda, Manabu Arioka, and Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

## 1P-33

### 麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連遺伝子 *Aoaut7* の単離および解析

菊間隆志, 大根田守, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】オートファジーは栄養飢餓により誘導される細胞内分解機構であり、液胞（リソソーム）内の様々な加水分解酵素によって細胞質成分が分解される。*AUT7* は *S. cerevisiae* のオートファジー関連遺伝子であり、preautophagosomal structure(PAS)に局在し、オートファゴソーム形成に関与することが知られている。本研究では、*Aspergillus oryzae* におけるオートファジーに関する知見を得ることを目的として、*AUT7* ホモログ遺伝子 *Aoaut7* を麹菌 *Aspergillus oryzae* より単離し、機能解析を行った。

【方法及び結果】麹菌ゲノム情報を元にプライマーを設計し、麹菌野生株 RIB40 のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、*Aoaut7* のプロモーター領域 1722bp および、ORF とターミネーター領域、計 890bp を単離した。これらを用いて、AoAut7 の N 末端に赤色蛍光タンパク質 DsRed2 を付加した DsRed2-AoAut7 を発現するプラスミドを構築し、麹菌 *niaD300* 株に形質転換した。得られた形質転換体を DPY 培地で一晚培養し、N 源を欠いた CD 培地に置換することによってオートファジーを誘導した。この形質転換体を蛍光顕微鏡で観察した結果、誘導後 30 分において、すでに液胞への局在が観察された。コントロールでは細胞質において蛍光が観察された。これらの結果は AoAut7 が、オートファジーの誘導により液胞内に輸送されることを示唆している。現在、CPY-EGFP を発現する株に DsRed2-AoAut7 を発現させ、液胞内酵素の挙動と AoAut7 の細胞内局在の関連を検討中である。

#### Isolation and characterization of *Aoaut7*, a gene involved in autophagy, from

#### *Aspergillus oryzae*.

Takashi Kikuma, Mamoru Ohneda, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

## 1P-34

### *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* より見出された *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繫留する(tethering)役割を担っていると考えられている。演者らは、*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するとともに *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ている。今回は *usoA* 発現抑制下での菌糸の形態観察、及び分泌タンパク質の挙動解析を行った。

【方法と結果】*usoA* 発現抑制培地上でプロモーター置換株分生子を発芽させたところ、菌糸先端が膨潤し多数の核が観察され、ミトコンドリアの異常な形態が観察されるとともにやがて生育が停止した。このプロモーター置換株において、細胞外に分泌される酵素( $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase)に GFP を融合させて高発現し、*usoA* 発現誘導培地から抑制培地に移行したところ、小胞体と考えられる構造体に蛍光が蓄積するのが観察された。また、このときの細胞内タンパク質を抽出し GFP 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の蓄積が認められた。

#### Analysis of *usoA* gene in *Aspergillus nidulans*

Shizuka ASANO, Takashi IJIMA, Katsuhiko KITAMOTO, Harushi NAKAJIMA

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

## 1P-35

### 麹菌 *Aspergillus oryzae* の分生子形成過程における核移動の追跡

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）

麹菌 *Aspergillus oryzae* は多核の分生子をもつ。透過型電子顕微鏡を用いた像により、多核の分生子や分生子柄のヴェシクルやフィアライドに多くの核が集合している様子が示されていた。これらの一部を支持するデータとして、我々はヒストン H2B と蛍光タンパク質である EGFP との融合タンパク質で核を可視化した *A.oryzae* を用いて、分生子柄上の分生子が多核であることを示した<sup>1)</sup>。今回、この実験系を用いて分生子柄の核の局在を観察し、分生子柄のヴェシクルとフィアライドも分生子同様に多核であることを確認した。また、*A.oryzae* と比較するために、*A.nidulans* の単核分生子形成過程の核も観察した。*A.oryzae* の分生子や分生子柄が多核であることは示されているが、多核分生子の形成過程における核の動きはほとんど知られていない。そこで、共焦点レーザー顕微鏡を用いることで、気中で形成される *A.oryzae* 分生子形成過程を経時的に観察し、これらから核の立体像を構築することで、ストークからヴェシクル、ヴェシクルからフィアライドに核が移動する様子を捉えることに成功した。これらは、気中という 3 次元での分生子形成過程における核移動を追跡した初めての例である。現在、フィアライドから分生子への核動態の可視化を試みている。

- 1) 石ら、第 1 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p26

### Tracing of nuclear movement during conidiation in koji mold, *Aspergillus oryzae*

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

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

## 1P-36

### *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）

遺伝的形質転換は、現在の遺伝子工学の基盤かつ日常的な技術である。しかし、形質転換時の細胞内での分子機構については不明な点が多い。本研究では、異所的組込みの基質である染色体上の DNA 二重鎖切断 (DSB) 部位に着目した。DSB 量の増加が予想される REMI (Restriction Enzyme-Mediated Integration) 法や、DSB 修復系の欠失系統を用いた形質転換では、それぞれ、形質転換頻度の上昇、あるいは形質転換体あたりの組込み部位数の増加が観察される。これらの結果は、DSB 量が細胞外 DNA 組込みの制限要因であることを示唆している。そこで、両者の関係を定量的に関連づけるために、形質転換操作時の DSB 量の推定を試みている。通常の形質転換操作時のランダムな DSB を定量することは困難なため、REMI 法によって起こる染色体上の制限酵素消化部位に着目し、DSB の定量を試みた。昨年の本会において、PEG を用いた REMI 法による形質転換頻度、ベクターの組込み様式および PCR による *wA* 座における DSB の検出結果について報告した。今回、DSB 検出に用いるアダプター断片の改良、ライゲーション反応および PCR の条件の再検討により、DSB の検出感度が上昇した。また、染色体上の他の部位においても同様に DSB を検出した。それらの定量性に関して、現在検討中である。

### Double strand-break of DNA and extra-cellular DNA integration during the genetic transformation of *Aspergillus nidulans*

Hajime Nakaoka, Yasuo Itoh

(Fac. of Science, Shinshu Univ.)



## 1P-37

### ***Aspergillus nidulans* におけるアミノ酸代謝系と分生子発芽の制御機構との関連**

水谷真也, 伊藤建夫, 伊藤靖夫 (信州大・理)

*A. nidulans* のアミノ酸要求性変異株の多くは、メチルメタンスルホン酸(MMS)等の突然変異誘発剤や過酸化水素および高温の処理によって、生存率が野生株に比べて有意に低下することが報告されている。このような感受性の分子機構は明らかにされていないが、異なる遺伝子座の変異に対し、共通のサプレッサー変異が同定されている。*A. nidulans* における MMS 感受性は、分生子発芽時とコロニー形成時において異なる表現型として観察される。アルギニン要求性変異である *argB2* を含む系統では、分生子発芽時に強い MMS 感受性を示すが、一端発芽した菌糸の伸長は MMS の影響を受けない。また、DNA 二重鎖切断の修復に関わる *uvrC* との二重変異系統では、*argB2* の表現型が優性である。これは、アミノ酸代謝系と DNA 損傷時における分生子発芽の制御機構との関連を示唆している。そこで、様々なアミノ酸要求性変異株において、分生子発芽時およびコロニー形成時における MMS 感受性を再検討した。その結果、*argB2* と同様に発芽率の低下をもたらす変異として、*argD11*、*lysA1* が確認されたが、一方で、*phenA2*、*phenB6*、*ileA3* を含む系統では、コロニー形成時にのみ MMS 感受性が観察された。すなわち、アミノ酸要求性変異によって付与される MMS 感受性は、分生子発芽時とその後の菌糸伸長時に対する効果で大別できることが示唆された。現在、分生子発芽時に MMS 感受性となるアミノ酸要求性変異と、分生子発芽の決定に関わる *nimA5* との二重変異系統の構築を試みている。

### **Involvement of amino acid requiring-mutations in regulation of conidial polarization in *Aspergillus nidulans***

Shinya Mizutani, Tateo Itoh, Yasuo Itoh

(Fac. of Science, Shinshu Univ.)

## 2P-1

### イネごま葉枯病菌におけるメラニン合成系遺伝子群の近紫外光による転写調節

木原淳一, 森脇明弘, 田中千尋<sup>1</sup>, 荒瀬 栄, 本田雄一<sup>2</sup> (島根大生資・<sup>1</sup>京大院農・<sup>2</sup>島根大)

イネごま葉枯病菌 (*Bipolaris oryzae*) の分生胞子形成は、近紫外光 (300-400nm) 照射によって誘導される。このような糸状菌の光形態形成を遺伝子レベルで解析するため、本菌のメラニン合成系遺伝子群に着目した。はじめに、イネごま葉枯病菌から、polyketide synthase 遺伝子 (*PKSI*), scytalone dehydratase 遺伝子 (*SCD1*) 及び 1,3,8-THN reductase 遺伝子 (*THRI*) をクローニングし、相同置換による遺伝子破壊実験により、これら 3 つの遺伝子が本菌のメラニン合成に必須であることを確認した。次に、これら遺伝子の発現解析を行なった結果、太陽光照射により、3 つの遺伝子の発現が顕著に増加した。そこで、波長の異なる光源を用いて調査した結果、3 つの遺伝子はすべて近紫外光照射特異的に増加することが明らかとなった。また、近紫外光照射後の遺伝子発現パターンも類似していたことから、3 つの遺伝子の発現には共通の転写調節系が関与していることが考えられた。そこで、メラニン合成系遺伝子群の転写制御遺伝子 (*BMRI*) をクローニングし、解析を行なった。*BMRI* 遺伝子破壊株は、メラニンを合成せず、*PKSI*, *SCD1*, *THRI* 遺伝子の発現が認められなかった。*BMRI* 遺伝子の発現に及ぼす近紫外光の影響を RT-PCR を用いて解析した結果、*BMRI* 遺伝子も、近紫外光照射によりその発現量が増加することが明らかとなった。さらに、*BMRI* 遺伝子を恒常的に発現する形質転換体では、菌糸におけるメラニン化が促進し、*PKSI*, *SCD1*, *THRI* 遺伝子の発現量も増加していた。以上の結果から、近紫外光照射による 3 つのメラニン合成系遺伝子の発現量の増加には、少なくとも、近紫外光照射によって発現量が増加する *BMRI* 遺伝子が関与していることが明らかとなった。

#### Transcriptional regulation of the melanin biosynthesis genes by near-ultraviolet radiation

##### in *Bipolaris oryzae*

Junichi Kihara, Akihiro Moriwaki, Chihiro Tanaka<sup>1</sup>, Sakae Arase, Yuichi Honda<sup>2</sup>

(Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., <sup>1</sup>Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., <sup>2</sup>Shimane Univ.)

## 2P-2

### ウリ類炭そ病菌の *CMR2* (*Colletotrichum melanin regulator 2*) 遺伝子は付着器のメラニン合成制御に関与している

辻 元人・藤井 聡・廣瀬知華・白石友紀・久保康之 (岡山大農・京府大院農)

本研究室ではこれまでに、アグロバクテリウムを用いた遺伝子タギング法によりウリ類炭そ病菌から 8 株の色素合成能変異株を単離している。今回、変異株 pd3 におけるタギング遺伝子 *CMR2* を同定したので報告する。まず *CMR2* の全塩基配列を決定し、その構造解析を行った。その結果、本遺伝子は 410 アミノ酸からなる推定読み枠を有することが明らかとなった。また、その N 末端領域には糸状菌類の転写制御因子に典型的な Zn(II)2Cys6 型 DNA 結合モチーフが認められた。次に相同組換えを利用して *cmr2* 破壊株を作出し、その性状解析を行った。破壊株の菌糸生育、胞子形成量は野生株とほぼ同等であったが、菌そうにおけるメラニン化の程度は有意に低かった。またメラニン合成酵素遺伝子破壊株に特徴的に認められるメラニン中間産物の蓄積が、*cmr2* 破壊株では認められなかった。つづいて *cmr2* 破壊株胞子は無傷キュウリ葉に接種したところ、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 *cmr2* 破壊株の感染器官形成能について調べた。ガラス面、セルロース人工膜上のいずれにおいても破壊株胞子は正常に発芽し、付着器を形成した。しかしながら付着器メラニン化の程度は低く、側部発芽率は野生株と比較して有意に高かった。これらの結果から *cmr2* 破壊株における病原性欠損が、メラニン合成量低下による付着器機能の低下に起因していると考えられた。以上より *CMR2* が本菌のメラニン合成量を制御する転写制御因子をコードしている可能性が強く示唆された。

#### The *Colletotrichum lagenarium CMR2* (*Colletotrichum melanin regulator*) gene regulates melanin biosynthesis in appressoria

Gento Tsuji, Sotoshi Fujii, Chika Hirose, Tomonori Shiraishi and Yasuyuki Kubo

(Univ. of Okayama, Univ. of Kyoto Pref.)

## 2P-3

### *Fusarium oxysporum* の胞子形成遺伝子 *RENI* および *FoSTUA* の機能

小原敏明, 柘植尚志 (名大院生農)

*Fusarium oxysporum* は、小型胞子、大型胞子および厚膜胞子の3種の無性胞子を形成する。これまでに、*F. oxysporum* の胞子形成遺伝子として *RENI* および *FoSTUA* を単離・同定した。*RENI* 変異株は、厚膜胞子を形成するが、小型胞子と大型胞子を形成せず、棍棒状の胞子様細胞を連鎖して形成した。*FoSTUA* 変異株は、小型胞子と厚膜胞子を形成するが、大型胞子を形成するための分生子柄を形成できず、大型胞子形成数が著しく減少した。また、*RENI* と *FoSTUA* の二重変異株は、小型胞子および大型胞子を形成せず、棍棒状細胞を形成した。以上の結果は、*RENI* が小型胞子と大型胞子形成に、*FoSTUA* が分生子柄形成にそれぞれ必要な遺伝子であること、さらに、本菌の胞子形成において *RENI* がより中心的な役割を果たしていることを示した。*RENI* および *FoSTUA* は、*Aspergillus nidulans* の胞子形成関連遺伝子 *medA* および *stuA* とそれぞれ有意な相同性を示す。*medA* または *stuA* の変異は、他の胞子形成関連遺伝子群の転写レベルに影響することから、これら遺伝子は転写制御因子をコードすると推定されているが、直接的な証明はなされていない。*Ren1* と *FoStuA* が転写制御因子であれば、これらタンパク質は核に局在すると推定される。そこで、緑色蛍光タンパク質 (GFP) と *Ren1* または *FoStuA* との融合タンパク質発現ベクターを作製し、野生株に導入した。形質転換体の菌糸における GFP 蛍光を観察したところ、*Ren1* または *FoStuA* との融合タンパク質はすべて核に局在した。以上の結果は、*Ren1* と *FoStuA* が *F. oxysporum* の胞子形成関連遺伝子群の転写制御因子であることを強く示唆した。

### Function of *RENI* and *FoSTUA* in conidiation of *Fusarium oxysporum*

Toshiaki Ohara, Takashi Tsuge

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

## 2P-4

### REMI 法による *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* 病原性変異株の作出

須賀晴久, 森崎陽一, 百町満朗\* (岐阜大・生命科学総合実験セ, \*岐阜大・農)

*Fusarium solani* は各種作物に根腐病を起こす土壌伝染性植物病原菌として知られている糸状菌である。この菌には寄生する植物種に特異性を持つ群 (分化型: forma specialis) が存在し、*F. solani* f. sp. *phaseoli* はインゲンのみに根腐病を起こす分化型とされている。本研究では、この分化型菌における病原性関連遺伝子の解明を目的とし、Restriction Enzyme Mediated DNA Integration (REMI) 法による病原性変異株の作出を試みた。まず、インゲンに安定した病原性を示す S3 株をハイグロマイシン耐性マーカーを含むプラスミドベクター pCSN43 で形質転換した。ここでは形質転換の際に制限酵素 *Hind* III を加え、全部で 725 株の形質転換株を得た。次に、インゲンのもやし下胚軸を用いた簡易的試験によりこれら全ての株について病原性を調べた。その結果、4 株 (010220*Hind*III-125, -298, -719, -725) において病原性の低下が見られた。これら 4 株については更に、自然の感染状態により近いポット試験で病原性を調べた。その結果、簡易試験の結果同様、これら 4 株がインゲンに引き起こす根腐れの程度は元株に比べて低下していることが確認された。010220*Hind*III-125 株はジャガイモ煎汁寒天培地上で元株と全く同様のコロニー形態を示したが、それ以外の 3 株は菌糸伸長速度がわずかに遅く、色素沈着も弱まっている傾向が見られた。プラスミドベクターの挿入様式を調べるため、pCSN43 をプローブとしたサザンブロットハイブリダイゼーションを行った結果、010220*Hind*III-125 株と -298 株はゲノム中の 2 カ所に、-719 株と -725 株には 1 カ所にそれぞれプラスミドベクターが挿入されていると予想された。但し、010220*Hind*III-125 株以外の 3 株については複数コピーのプラスミドベクターがタンデム状に存在していることが予想された。

### Production of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* pathogenicity mutants by REMI

Haruhisa Suga, Yoichi Morisaki, Mitsuro Hyakumachi\* (LSRC, Gifu Univ., \*Fac. of Agriculture, Gifu Univ.)

## 2P-5

### *Fusarium oxysporum* の Ras 遺伝子のクローニングと解析

吉田隆延・澤田宏之・高橋真美・有江 力\*・土屋健一（農環研・\*農工大農）

Ras は各種シグナル伝達に関与する低分子量 GTP 結合蛋白質であり、その重要性から詳細な研究が行われてきたが、植物病原糸状菌における Ras の機能についてはまだ不明な点が多い。そこで、キャベツ萎黄病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* について Ras の機能を解析するために、本菌より PCR を用いて Ras 遺伝子と相同性の高い遺伝子 *foras1* をクローニングした。この *foras1* は 216 個のアミノ酸をコードし、植物病原糸状菌である *Colletorichum trifolii* や *Botryotinia fuckeliana* の Ras 遺伝子とアミノ酸レベルで非常に相同性が高かった。さらに、*foras1* の遺伝子破壊ベクター pFDRAS1 を構築し、野生株の *foras1* の遺伝子破壊を行った結果、60 菌株中 6 菌株の遺伝子破壊株が得られた。これらの遺伝子破壊株は野生株と比較して各種培地での生育が遅く、菌糸が太くて短い等の形態異常が確認された。また、培養菌体をキャベツに接種しても萎黄病は起こらなかった。以上より、*foras1* はキャベツ萎黄病菌において、生育や菌糸の形態形成等に関与している可能性が示唆された。

#### Cloning and analysis of Ras gene from *Fusarium oxysporum*.

Takanobu Yoshida, Hiroyuki Sawada, Mami Takahashi, Tsutomu Arie\*, Kenichi Tuchiya.  
(Natl. Inst. Agro-Environ. Sci., \* Tokyo Univ. Agric. and Tech.)

## 2P-6

### *Fusarium oxysporum* より単離したセロビオース:キノン酸化還元酵素様遺伝子の解析

川部眞登, 寺岡 徹, 有江 力（農工大・農）

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* はトマト萎凋病を引き起こす土壌伝染性植物病原子嚢菌である。我々は REMI 法により得られた病原性変異株 r120 から病原性関連遺伝子 *FPD1* を単離した。*FPD1* は、細胞の Cl<sup>-</sup> を介した浸透圧調整に関与するアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の chloride conductance regulatory protein (ICln) と部分的相同性をもっていたが（第 1 回コンファレンス）、*F. oxysporum* の病原性発現における明瞭な機能は未同定である。*FPD1* 周辺領域を解析した結果、その約 1 kb 上流に子嚢菌 *Humicola insolens*, 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 等のセロビオース脱水素酵素 (CDH) フラビン含有ドメインと高い相同性を示す遺伝子の存在が示唆され、RACE-PCR によって ORF を確定すると共に、それを *FCD1* とした。本菌をセルロース含有最少液体培地で培養すると *FCD1* の発現がみられた。また、*FCD1* は既報のセロビオース脱水素酵素が持つヘム含有ドメインを持たず、フラビン含有ドメインのみから構成される、セロビオース:キノン酸化還元酵素 (CBQ) と同様の構造をしていた。この構造は GMC オキシドリダクターゼファミリーに属する酵素とも類似するため、現在、*FCD1* 破壊株を作出し、病原性や酵素活性の解析を行っている。

#### Isolation of a cellobiose:quinone oxydoreductase (CBQ)-like gene, *FCD1*, in *Fusarium oxysporum*

Masato Kawabe, Tohru Teraoka, Tsutomu Arie  
(Tokyo Univ. of Agric. & Tech.)

## 2P-7

### イネいもち病菌の lysophospholipase 遺伝子(LPLI)の単離と解析

金森正樹, 夏目雅裕, 有江 力, 寺岡 徹, 鎌倉高志\* (農工大農・\*東理大)

イネいもち病菌の付着器は、内部のグリセロール濃度を上昇させることで生じる膨圧により侵入糸をイネ組織内へ貫入する侵入に必須な器官である。これまでに、本菌の付着器形成条件下で発現している遺伝子の単離・解析を目的に構築されたディファレンシャル cDNA ライブラリーより、lysophospholipase と相同性を示す遺伝子(LPLI)を取得し、解析を進めている。lysophospholipase は哺乳類の各組織や器官から多くの種類が見出されているものの、植物病原糸状菌における生理機能や病原性との関連についての詳細は明らかとされていない。イネいもち病菌の LPLI 遺伝子は LPLIa(244aa)と LPLIb(252aa)をコードすると予想され、そのアミノ酸配列からは lysophospholipase で高度に保存された GxSxG モチーフならびに触媒残基(S, D, H)の存在が確認された。そこで、LPLI の lysophospholipase 活性を調べる目的で、LPLIa cDNA を大腸菌発現ベクターに導入・発現後、精製した LPLIa タンパク質とリゾリン脂質を反応させて、遊離脂肪酸量をガスクロマトグラフィーにより測定した結果、LPLIa は lysophospholipase 活性を有することが確認された。一方、本菌の LPLI 遺伝子破壊株は、野生株と比較してイネへの侵入能に若干の低下を示し、付着器内の膨圧も低下していた。さらに、付着器内で生成されるグリセロール源の一つとされる脂滴(Lipid droplet)の挙動を観察したところ、付着器形成期の脂滴の消失時期に遅延が認められた。これらの結果は、LPLI が付着器内における脂滴分解に由来するグリセロール生成に少なからず関与している可能性を示唆していた。

### Molecular cloning and characterization of lysophospholipase (LPLI) from *Magnaporthe grisea*

Masaki Kanamori, Natsume Masahiro, Tsutomu Arie, Tohru Teraoka, Takashi Kamakura\*

(Tokyo Univ. Agric. & Tech., \*Tokyo Univ. Sci.)

## 2P-8

### Detection of distinct subpopulations of *Fusarium graminearum* lineage 7

Liane Rosewich Gale<sup>1</sup>, Todd Ward<sup>2</sup>, Virgilio Balmas<sup>3</sup>, and H. Corby Kistler<sup>1</sup> (<sup>1</sup>USDA-ARS, Univ. Minnesota, MN 55108, <sup>2</sup>USDA-ARS Microbial Genomics Research Unit, Peoria, IL 61604, <sup>3</sup>Università degli Studi di Sassari, I-07100 Sassari.)

A collection of the cereal head blight pathogen *Fusarium graminearum* from nine U.S. states, representing 86 fields in 53 counties, was characterized using ten single-copy RFLP probes, a telomeric probe and RFLP probes diagnostic for species and lineage. In addition, isolates were assigned to one of three profiles of trichothecene metabolites (chemotypes) using a PCR-based approach. All 708 isolates determined to be *F. graminearum* were confirmed as lineage 7. The telomeric probe was used for clone determination, leaving 587 isolates for subsequent data analyses. Most lineage 7 isolates (94.6%) from the U.S. were of 15acetyl deoxynivalenol (15ADON) chemotype. The 3acetyl deoxynivalenol (3ADON) chemotype was found at 5% and was only identified in samples from North Dakota and Minnesota. The nivalenol chemotype was infrequent at 0.4%. Gene flow analysis demonstrates that the 15ADON population in the U.S. is genetically isolated from the 3ADON population ( $N_m = 0.5$ ). In comparison, a representative collection consisting of 19 isolates of lineage 7 from Italy was genetically similar to the 3ADON population from the U.S. ( $N_m > 2$ ), though the Italian collection consisted of all three chemotypes. These results would indicate that lineage 7 consists of at least two distinct subpopulations.

## 2P-9

### Genetics of Host Specificity of *Ascochyta* spp. Infecting Legumes

Tobin L. Peever, M. Hernandez-Bello and W.J. Kaiser (Dept. of Plant Pathology, Washington State Univ., Pullman, WA 99164-6430, USA)

*Ascochyta* spp. (teleomorphs: *Didymella* spp.) infect a number of commercially important legumes including chickpea (*Cicer arietinum*), faba bean (*Vicia faba*), lentil (*Lens culinaris*), pea (*Pisum sativum*) and hairy vetch (*Vicia villosa*). The results of laboratory crosses indicated fertility barriers among the fungi infecting faba bean, lentil and chickpea and that these fungi should be considered distinct biological species (Kaiser, Wang, and Rogers 1997). We have demonstrated that these species can also be considered phylogenetic species as they were strongly supported by phylogenetic analysis of DNA sequence data. However, phylogenies estimated from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, translation elongation factor alpha, and chitin synthase revealed a clade of closely related isolates from lentil, hairy vetch, faba bean and pea whose specific status is unclear. Within this clade, isolates from lentil were more closely related to isolates from hairy vetch and isolates from faba bean were more closely related to isolates from pea. *In vitro* crosses between both pairs of isolates were completely fertile and the hybrid status of the progeny was verified using molecular markers. Greenhouse inoculations revealed that the faba bean isolate and pea isolate are specific for faba bean and pea, respectively. We are currently developing a dense genetic map for the cross of these isolates which will be used to elucidate the genetics of host specificity and to map and clone pathogenicity determinants.

Kaiser, W.J., B.-C. Wang, and J.D. Rogers. 1997. *Ascochyta fabae* and *A. lentis*: Host specificity, teleomorphs (*Didymella*), hybrid analysis and taxonomic status. *Plant Dis.* 81:809-816.

## 2P-10

### いもち病菌日本産菌株のゲノム構造解析

曾根輝雄, 富田房男 (北大院農・応用菌学)

イネの最重要病害いもち病の病原菌いもち病菌(*Magnaporthe grisea*)のドラフトゲノムシーケンスが, Whitehead Institute Center for Genome Research (<http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/magnaporthe/>)から, 公開されている. 本菌の圃場分離株は交配能を失っているものがほとんどであり, Map-based cloning などには不向きである. 上記ドラフトシーケンスも, 例外的に交配能をもつイネ病原性株である Guy11 への度重なる戻し交配を行って得た実験室株 70-15 を用いて行われている.

実際の圃場では, 本菌の病原性レース変異が問題となっている. これまでの研究から, 本邦の圃場に於いては, ごく少数の clonal lineage に属する菌株が変異を繰り返し, 多様な病原性レースに分化したことが示唆されている. また, 染色体長多型や, 非病原性遺伝子の欠失, 重複, トランスポゾンの転移などが報告されており, 圃場でのレース変異機構の解明のためには, 本邦産菌株のゲノム配列の解析が非常に重要である.

本研究では, 本邦産イネいもち病菌株 Ina168 を用い, 公開されているゲノム配列との比較を行った. Ina168 株のコスミドゲノムライブラリーの 2832 クローンのインサート両端の配列を決定し, データベース化した公開ゲノム配列に対して BLAST 解析を行った. 多くのクローンで, それぞれの末端配列が公開配列とヒットしたが, 同一クローンの両末端配列が同一コンティグにヒットすることはほとんど稀であった. 以上のことから, 本邦産菌株のゲノム構造は, 公開されたゲノム配列とは大きく異なることが示唆された.

### Genomic Structure of a *Magnaporthe grisea* Japanese Isolate

Teruo Sone and Fusao Tomita

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

## 2P-11

### **Rhizopus 属菌株の分子遺伝学的分類**

阿部 歩, 曾根輝雄, \*斎藤勝一, \*小田有二, 浅野行蔵 (北大院農・応用菌学, \*北海道農業セ)

我々は、農産加工副産物であるポテトパルプ（デンプンかす）の飼料としての利用価値を高める目的で、*Rhizopus oryzae* による乳酸発酵（サイレージ化）を行っている。その過程で、*R. oryzae* には糖を発酵して多量に乳酸を生成する菌株とそうでない菌株があることが明らかになった。そこで、乳酸生成能と遺伝学的特徴の比較検討を行ったところ、rDNA ITS 領域の塩基配列中に乳酸生成能との関連性がある 5 塩基の配列の相違点を見つけた。

この ITS 配列の差異の分類学的意義を明確にするために、ITS 配列による *Rhizopus* 属全体の分子的分類を試みた。系統解析の結果、大きく 3 つのグループに分けられ、それぞれが SCHIPPER らによる形態学的分類における 3 つのグループ、すなわち、複数種からなる *stolonifer* グループ、*microsporus* グループ、と *R. oryzae* 単一種に対応した。複数種からなる *microsporus* グループの配列の多様度が小さかったのに対し、*R. oryzae* 単一種内での配列の多様度は大きく、さらに *Amylomyces rouxii* の ITS 塩基配列は、*R. oryzae* の乳酸生成型菌と一致していた。このことから、*R. oryzae* と *A. rouxii* の再分類の可能性が示唆された。

再分類には、ゲノム全体の比較が必要である。そこで、AFLP を用いた *R. oryzae*, *A. rouxii* の分類学的解析を行った。10 種類の選択的プライマーの組み合わせ、450 以上の DNA 多型による解析の結果、大きく 2 群に分けられ、*R. oryzae* 乳酸生成型、非生成型は全ゲノムレベルで明確に異なり、*A. rouxii* は乳酸生成型菌株群に含まれることが明らかになった。

### **Molecular Taxonomic Study of Genus *Rhizopus***

Ayumi Abe, Teruo Sone, \*Katsuichi Saito, \*Yuji Oda, and Kozo Asano

(Grad. Sch. Agr., Hokkaido Univ., \*Nat. Agric. Res. Cent. Hokkaido Region)

## 2P-12

### **酒総研保有 *Aspergillus oryzae* のアフラトキシン生合成遺伝子群の解析**

富永美穂子, 李 允恵, 林 梨咲, 山田 修, 坂本和俊, 秋田 修 (酒総研)

麹菌、*A. oryzae* は清酒、味噌などの醸造産業に伝統的に使用されており、歴史的に安全性が証明されている。しかしながら、アフラトキシン (AF) 生産菌である *A. flavus* との類縁性も非常に高いことが知られており、AF 生合成遺伝子群を保存する菌株も存在することが報告されている<sup>1)</sup>。加工食品製造に麹菌を利用する場合には、AF 生合成遺伝子群をできるだけ含まない菌株を選択することが望ましく、そのためには比較的簡便にそれら遺伝子群の有無が確認できる方法を確立する必要がある。そこで本研究では、酒総研保有菌株の AF 生合成遺伝子群保存の有無について検討し、菌株の分類およびその特徴付けを試みた。

保有 210 株のゲノムを取得し、Kusumoto ら<sup>1)</sup>の分類を参考に AF 生合成遺伝子群のうち、*aflT*, *norI*, *aflR*, *norA*, *avnA*, *verB*, *omtA*, *vbs* の 8 つの遺伝子を特異的に増幅するプライマーを設計し、PCR による増幅の有無を調べた。その結果、4 種のグループに分類できたが、AF 生合成遺伝子群をすべて保存する株 (122/210, 58.1%)、*vbs*~*avnA* まで保存する株 (75/210, 35.7%) に大別され、*norA* が保存されている場合、AF 生合成遺伝子群がすべて保存されている可能性の高いことが示唆された。また、Murakami<sup>2)</sup>の特徴分類基準により、大別された 2 グループの比較をしたところ、AF 生合成遺伝子群をすべて保存する株の方が、stalk が長い、麴酸の生産が多い、MCA 培地培養時のコロニーのピンク色が薄いなど、いくつかの特徴区分で統計的に有意差が認められた。

1) Kusumoto et al.; *Curr. Genet.*, **37**, 104(2000).

2) Murakami; *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **17**, 281(1971)

### **Analysis of aflatoxin biosynthetic pathway genes cluster of *Aspergillus oryzae* RIB strains**

Mihoko Tominaga, Lee Yun Hae, Risa Hayashi, Osamu Yamada, Kazutoshi Sakamoto, Osamu Akita (NRIB)

## 2P-13

### 黒麹菌 *Aspergillus niger* No. 12 株由来の細胞外 $\beta$ - フルクトフラノシダーゼの性質とコードする遺伝子の解析

森山 聡、重 隆人、川崎 荘志、六車三治男、太田一良（宮崎大・農・応生科）

【目的】 *A. niger* No. 12 株が細胞外に生産する  $\beta$  - フルクトフラノシダーゼの構造解析を目的として、本酵素の性質を明らかにするとともにコードする遺伝子を解析した。

【方法・結果】 スクロースを炭素源とする液体培地で本菌株を 30℃、5 日間振とう培養した。その培養ろ液から、分子量 104 kDa の  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼを電気泳動的に単一に精製した。PAS 染色法により本酵素は糖タンパク質であった。その比活性は 13.9 U/mg、最適温度は 45℃、最適 pH は 6.0 であった。本酵素はスクロースに作用し、フルクトース転移活性により、グルコース、1-kestose (GF<sub>2</sub>)、ニストース (GF<sub>3</sub>) および 1-フルクトシルニストース (GF<sub>4</sub>) を生成した。ところが、決定した N 末端 17 残基と内部 17 残基のアミノ酸配列は、既報の *A. niger* 由来のカタラーゼ (*catR*) のアミノ酸配列と一致した。本酵素を過酸化水素に作用させたところカタラーゼ活性も検出され、吸収スペクトルもヘムタンパク質に固有の 410 nm 付近に吸収のピークを示した。本酵素遺伝子は 16 残基のシグナル・ペプチドと 714 残基の成熟タンパク質をコードした。その推定分子量は 78,845、等電点は 5.31 であった。本酵素と *A. niger* 由来のカタラーゼの推定アミノ酸配列は 99.5 % の相同性を示した。

#### Properties of a $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* and sequence analysis of the encoding gene

Satoshi Moriyama, Takato Shige, Soushi Kawasaki, Michio Muguruma, Kazuyoshi Ohta

(Dept. Biochem. Appl. Biosci., Miyazaki Univ.)

## 2P-14

### ヒゲカビキチンデアセチラーゼ遺伝子のクローニング及び発現

石橋靖洋, 村山肇子（関東学院大学・工）

キトサンは利用範囲の広さにより需要が高まっている。現在、工業的にはキチンの脱アセチル化によりキトサンを生産しているが、この際に生じる高濃度アルカリの廃液が大きな問題である。そこで、この脱アセチル化を酵素を用いて行うことを考えた。ヒゲカビはキトサンを豊富に含有し、そのキトサンはキチンから chitin deacetylase (CDA) により合成されると考えられており、この CDA 遺伝子をクローニングし、そのクローンで大量発現系を開発し、これを工業的にキトサンを生産するために用いることを目的としている。ヒゲカビ cDNA ライブラリーを作成し、PCR により増幅した断片をプローブとしてスクリーニングし、ヒゲカビ CDA 遺伝子と思われる 1 種類のクローンが分離された。このクローンの塩基配列から推定されるタンパク質は 459 アミノ酸から成り、配列がヒゲカビの CDA と似ていることから、これはヒゲカビの CDA であろうと考えられた。現在、このクローンを発現ベクターに連結し、その発現と酵素活性を検討中である。

#### Cloning and Expression of chitin deacetylase gene from *Phycomyces blakesleeanus*

Yasuhiro Ishibashi, Tadako Murayama

(Dept. of Engineering, Univ. of Kantogakuin)



## 2P-15

### 糸状菌由来リシルオキシダーゼの発現

結城健介<sup>1</sup>, 鈴木哉子<sup>1</sup>, 東本篤樹<sup>1</sup>, 北本則行<sup>2</sup>, 小出芳直<sup>1</sup>

(天野エンザイム(株) 岐研<sup>1</sup>, 愛知産技研・食工技セ<sup>2</sup>)

アミノキシダーゼの一種であるリシルオキシダーゼは、タンパク中のリジン残基を酸化することによりリジン残基どうしを架橋させる作用を持つ。古くから動物由来リシルオキシダーゼはその存在が知られており、エラスチンやコラーゲンに作用して表皮構造の形成に関わるとされている。これまでに微生物群の中から酵母 *Pichia pastoris* のリシルオキシダーゼが見出されており、これが微生物由来として知られている唯一のリシルオキシダーゼであった。これは哺乳動物由来のものと同様にリジンペプチド中のリジン残基を基質とする事から類似した基質特異性を持つと考えられている。

麹菌ゲノムプロジェクトによって明らかになったドラフトシークエンスデータからこの *Pichia pastoris* 由来リシルオキシダーゼとホモロジーの高い遺伝子が *Aspergillus oryzae* のゲノム中に存在する事が明らかとなり、ゲノム情報を利用してこの遺伝子のクローニングを実施した。同遺伝子を *Aspergillus nidulans* の系に導入して発現させリジンを基質として反応させたところ、リジン分子どうしが架橋し 2 量体を形成している事が LC-MS を用いた系で確認された。

### Expression of Lysyl Oxidase from Filamentous fungi

Kensuke Yuuki, Kanako Suzuki, Atsuki Toumoto, \*Noriyuki Kitamoto, Yoshinao Koide

(Amano Enzyme Inc. Gifu R&D Center, \*Food Res. Center, Aichi Ind. Technol. Inst.)

## 2P-16

### *Aspergillus oryzae* プロリダーゼ遺伝子のクローニング

仲原丈晴、伊藤考太郎、小山泰二 (キッコマン・研究本部)

【目的】プロリダーゼは、Xaa-Pro のジペプチドを加水分解する酵素である。プロリダーゼを増強することにより、しょうゆに残存しやすいと考えられる Xaa-Pro のジペプチドを分解し、しょうゆのアミノ酸量を向上させることが可能となる。また、プロリンが甘味を呈するアミノ酸であるため、呈味の改善も期待できるが、これまで麹菌のプロリダーゼに関する報告はなかった。そこで本研究では、プロリダーゼを麹菌 EST データベースから探索した。

【方法および結果】麹菌 EST データベースに対しキーワード検索を行い、ヒットした 2 つの EST の部分配列をもとにプライマーを作製し、RACE-PCR を行うことにより、全長 cDNA を取得した。これらを酵母発現用ベクターに挿入し、*S. cerevisiae* に導入した。形質転換体を誘導培地に植菌して振盪培養したところ、ベクターのみを導入した場合と比較して 21 倍のプロリダーゼ活性が菌体抽出液に見られた。さらに、基質特異性を調べたところ、種々の Xaa-Pro に対する活性は示したが、トリペプチドや C 末端側がプロリンでないジペプチドに対してはほとんど活性を示さなかった。これらの結果から、今回クローニングした遺伝子はプロリダーゼ遺伝子であると結論した。

### Cloning of prolidase genes from *Aspergillus oryzae*

Takeharu Nakahara, Kotaro Ito, Yasuji Koyama

(R&D Division, Kikkoman)

## 2P-17

### 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の ER 型マンノシダーゼ遺伝子(*manE*)の解析

矢原明典<sup>1,2</sup>、赤尾 健<sup>1,3</sup>、吉田 孝<sup>4</sup>、坂本和俊<sup>1</sup>、山田 修<sup>1</sup>、秋田 修<sup>1,2</sup>

(1 酒総研 微生物、2 広島大院・先端研、3 現・国税庁、4 弘前大 農学生命科学部)

麹菌は、そのタンパク質分泌能の高さから、異種タンパク質生産の宿主として非常に有望である。近年、分泌タンパク質の品質管理にはN結合型糖鎖とそのトリミングを担うマンノシダーゼが重要な役割を果たしていることが報告されている。動物細胞等における分泌蛋白質のN結合型糖鎖はERからゴルジ体へと通過する過程で数回のトリミングが行われ、特にERにおける反応は基質と産物が厳密に決定されており、分泌タンパク質の品質管理上重要なステップと指摘されている。一方、糸状菌におけるER型反様式のマンノシダーゼについては、これまで吉田ら<sup>1)</sup>により麹菌膜画分にて活性が確認されているのみで、遺伝子の同定には至っていない。そこで我々は麹菌からER型マンノシダーゼをコードする遺伝子の同定をすべく研究を行った。

麹菌 EST library から他生物のER型マンノシダーゼとの相同性を有するcDNAクローンを探索して配列を解析した結果、翻訳産物の推定アミノ酸配列は出芽酵母やヒトER型マンノシダーゼと約20-30%の相同性を有していた。また、活性部位のアミノ酸配列もよく保存されていたことから、この遺伝子を *manE* と命名した。*manE* の遺伝子破壊株を構築し、宿主株と膜画分におけるER型マンノシダーゼ活性を比較したところ、破壊株で活性が大きく低下しており、*manE* がER型マンノシダーゼをコードすることが強く示唆された。

1)Glycoconjugate Journal 17, 745-748,2000

#### Cloning and molecular analysis of ER type mannosidase encoding gene(*manE*) in *Aspergillus oryzae*

Akinori Yahara, Takeshi Akao, Takashi Yoshida, Kumi Yoshiuchi, Kazuhiro Sakamoto, Osamu Yamada, Osamu Akita

(National Research Institute of Brewing, Hiroshima Univ., Hirosaki Univ., NTA)

## 2P-18

### Molecular characterization of two secretory phospholipases A<sub>2</sub> in *Aspergillus oryzae*.

Yoshito Nakanishi, Tomoyuki Nakahama, Angelo Bolchi\*, Simone Ottonello\*, Manabu Arioka, and Katsuhiko

Kitamoto (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, \*Dept. of Biochem. Mol. Biol., Univ. of Parma, Italy)

Secretory phospholipases A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>s) belong to a large family of Ca<sup>2+</sup>-dependent enzymes that hydrolyze glycerophospholipids to release fatty acids and 2-lysophospholipids. In mammals approximately 10 different sPLA<sub>2</sub> isoforms with distinct enzymatic properties and tissue distributions have been identified. They are thought to represent overlapping, but to a large extent unique physiological functions in various cellular processes, such as food digestion, inflammatory response and bactericidal activity. Filamentous fungi and *Streptomyces* spp. each contain two sPLA<sub>2</sub> genes in their genomes, but little is known about their physiological roles. In this study we characterized two sPLA<sub>2</sub> gene products (SpaA and SpaB) in *A. oryzae* to better understand their roles in filamentous fungi.

We previously reported the cloning of *spaA* and *spaB*. More recently, SpaA- and SpaB-overproducing strains of *A. oryzae* were generated. Culture supernatants of the *spaA*-transformed strain exhibited PLA<sub>2</sub> activity as well as the occurrence of a 15.9 kDa protein that was not detected in the corresponding vector- or *spaB*-transformed strains. This protein was purified to homogeneity and was shown to be endowed with PLA<sub>2</sub> activity. The enzymatic properties (specific activity, pH- and Ca<sup>2+</sup>-dependence) were essentially the same as those of renatured, recombinant His<sub>6</sub>-SpaA produced in *E. coli*. In contrast, in the *spaB*-transformed strain an increase in PLA<sub>2</sub> activity was only detected in the total cell lysates, but not in the culture supernatants, thus suggesting that SpaA and SpaB differ in their subcellular localization. In addition, PLA<sub>2</sub> activity in crude cell lysates derived from the *spaB*-transformed strain was evident at neutral-to-alkaline pH, in marked contrast to SpaA with an optimal activity at acidic pH, further suggesting that the two *spa* gene products are not redundant. Disruption of *spaA* and *spaB* genes in *A. oryzae* and a phenotypical analysis of the resultant disruptants are under way.

## 2P-19

### *Aspergillus awamori* 由来フェルロイルエステラーゼの Lid 様ドメインの機能解析

高橋健二\*, 小関卓也, 橋爪克己 (\* 広大生物圏, 酒類総研)

【目的】多くの糸状菌リパーゼの立体構造が X 線結晶構造解析により明らかにされ、Lid と呼ばれるドメインが基質の認識に深く関わっている。Swiss-Model を用いた構造モデリングにより *Aspergillus awamori* フェルロイルエステラーゼは *Rhizomucor miehei* リパーゼの構造と類似しており、Lid 様ドメインを有することが示唆された。しかしながら、フェルロイルエステラーゼはリパーゼ活性を有しない。そこで、本ドメインに位置するアミノ酸の部位特異的変異により、本ドメインと基質認識との関連について検討した。

【方法及び結果】*Aspergillus awamori* フェルロイルエステラーゼと *Rhizomucor miehei* リパーゼのアライメントから部位特異的変異により D71I, T72R, D77I, Y80F 及び D71I/T72R の置換体を作成した。発現は *Pichia pastoris* を用いて行い、酵母  $\alpha$  ファクター分泌シグナルを利用し酵素を培地中に分泌させ、それぞれの酵素を精製し、酵素化学的性質を検討した。野生型及び変異型のリコンビナント酵素は活性のある形で発現し、野生型で 30mg/l 程度培地中に分泌された。D71I, D71I/T72R 及び Y80F 変異酵素は野生型酵素にはない C16 の長鎖脂肪酸エステルに対する活性が見出され、逆に D77I 変異酵素は比活性が減少した。また、アラビノキシランからのフェルラ酸遊離量に及ぼす影響も見られ、*Aspergillus awamori* フェルロイルエステラーゼの基質認識は Lid 様ドメインが関わっていることが示唆された。

#### Functional analysis of lid-like domain in the feruloyl esterase from *Aspergillus awamori*

Kenji Takahashi\*, Takuya Koseki, Katsumi Hashidume (\*Hiroshima Univ., Natl.Res.Inst.Brewing)

## 2P-20

### *Aspergillus fumigatus* の産生する低分子型金属プロテアーゼ(Mep20)の多様性

河村健志, 小瀬 愛, 今尾一郎, 山形洋平, 阿部敬悦, 中島 佑 (東北大院・農・応生科)

【目的】*Aspergillus fumigatus* が、侵襲性肺アスペルギルス症を引き起こす際に、肺組織のエラスチン分解には Mep20 が関与すると考えられている。我々がクローニングした国内及び、欧州で分離された株の Mep20 は、互いに 70%程度の相同性しか示さなかったが、米国で分離された株と国内株の間では 90%の相同性を示した。そこで、これらの違いが酵素にどのような影響を与えているのかを明らかにすることとした。

【結果】公開された *A. fumigatus* のゲノム DNA database を検索したところ、Mep20 をコードする遺伝子が 2 つ存在することが分かった。それぞれの配列は日本-米国型と欧州型であった。国内で分離された *A. fumigatus* の日本-米国型 Mep20 遺伝子は全長を含み、その Mep20 はエラスチンをほとんど分解できなかった。一方、欧州型 Mep20 は、C-末端領域が欠損した活性を持たない形でしかコードされていなかった。これらから、国内で分離された *A. fumigatus* の Mep20 は、肺侵襲には関与していないことが示された。

#### Variety of low molecular type metalloproteases (Mep20s) from *Aspergillus fumigatus*

Takeshi Kawamura, Ai Ose, Ichirou Imao, Youhei Yamagata, Keietsu Abe, Tasuku Nakajima (Tohoku Univ., Grad. Sch. Agri. Sci.)

## 2P-21

### 褐色腐朽担子菌イドタケ (*Coniophora puteana*) 由来セロビオース脱水素酵素の キャラクターライズ

加治佐 平、吉田 誠、五十嵐圭日子、鮫島正浩 (東大院・農生科)

木材腐朽菌は腐朽後の材色の違いによって白色腐朽菌と褐色腐朽菌に分類されるが、これら二種類の腐朽菌ではセルロース分解機構に大きな差異があると考えられている。我々はこれまで、白色腐朽菌によるセルロース分解過程でセロビオース脱水素酵素 (CDH) というフラボヘムタンパク質が重要な働きをしていることを明らかにしてきたが、褐色腐朽菌によるセルロース分解過程における本酵素の機能に関しては不明な点が多い。そこで本研究では、褐色腐朽菌イドタケ (*Coniophora puteana*) のセルロース分解培養系から CDH を単離し、その酵素的性質を調べるとともに、本酵素をコードする cDNA の塩基配列を決定し、推定されたアミノ酸配列を他の白色腐朽菌由来 CDH のそれと比較した。

セルロースを炭素源としてイドタケを培養して得られた菌体外液から、カラムクロマトグラフィーを用いて CDH を精製したところ、SDS-PAGE 上で分子量約 115kDa の単一なバンドを与えた。また、その酵素的な性質を調べたところ、吸収スペクトルや基質特異性は白色腐朽菌由来の CDH とほぼ同様であった。さらに本培養系における菌体から mRNA を抽出後、RT-PCR 法を用いて CDH をコードする cDNA の塩基配列を決定した。推定されたアミノ酸配列を解析したところ、フラビン結合モチーフ、GMC 酸化還元酵素モチーフ、ヘムのリガンドと考えられるメチオニンとヒスチジンを含み、白色腐朽菌由来の CDH との相同性が非常に高いことが明らかになった。

#### Characterization of cellobiose dehydrogenase from the brown-rot basidiomycete *Coniophora puteana*

Taira Kajisa, Makoto Yoshida, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima (Univ. of Tokyo)

## 2P-22

### 白色木材腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来セロビオース脱水素酵素における 分子内および分子間電子伝達機構

五十嵐圭日子、吉田 誠、鮫島正浩 (東大院・農生科) 西野武士 (日医大・一生化)

多くのセルロース分解性糸状菌は、セルラーゼに加えてセロビオース脱水素酵素 (CDH) という酸化還元酵素を菌体外に生産することが知られている。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し、その際に様々な電子受容体を還元するが、この触媒反応を司っているのは補欠分子族として含まれるフラビンとヘムである。最近、両補欠分子族を含む二つのドメインの三次元構造が明らかにされたが、両補欠分子族間における分子内電子伝達機構、および CDH と電子受容体分子間の電子伝達機構に関しては依然不明な点が多い。そこで本研究では、stopped-flow 分光光度計を用いて前定常状態における補欠分子族、および電子受容体の一つである cytochrome *c* の酸化還元状態の経時変化を観測し、CDH による電子伝達の全体像を明らかにすることを試みた。CDH をセロビオースと混合したところ、フラビンが二電子還元状態に変化し、続いてヘムが還元された。その際にフラビンラジカルの生成とヘムの還元が同時に起こっていたことから、二電子還元されたフラビンから一電子がヘムに移っていると考えられた。さらに、還元された CDH から cytochrome *c* への電子伝達を調べたところ、ヘムの再酸化と cytochrome *c* の還元が同時に観察されたため、CDH が electron chain 型の電子伝達を行っていることが明らかとなった。

#### Inter-domain and inter-molecular electron transfer of cellobiose dehydrogenase from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*

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

Takeshi Nishino (Nippon Medical School)

## 2P-23

### 白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の糖結合部位を持つ新規 ヘムタンパク質

吉田 誠, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)

木材腐朽担子菌はリグニン分解酵素としてリグニンペルオキシダーゼやマンガンペルオキシダーゼなどのヘムタンパク質を菌体外に生産することが知られている。さらにセルロース分解過程においては、補欠分子属としてヘムとフラビンを含む二つのドメインからなるセロビオース脱水素酵素 (CDH) が菌体外に生産されることも知られてきている。最近、白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来 CDH のヘムおよびフラビン両ドメインの三次元構造が明らかにされ、ヘムドメインはこれまでに報告された他のヘムタンパク質とは全く異なるユニークな構造であることが明らかとなった。しかし、*P. chrysosporium* のゲノム情報に対して、CDH のアミノ酸配列を用いた BALST 検索を行ったところ、新たに CDH のヘムドメインのみに高い相同性を示す領域が見出されたことから、本研究ではその情報を用いて、この遺伝子の cDNA をクローニングすることを試みた。その結果、この遺伝子は *P. chrysosporium* 由来 CDH ヘムドメインとアミノ酸配列で 46.8 % の相同性を示し、CDH 同様ヘムのリガンドと考えられるヒスチジンおよびメチオニンが見られた。さらに、この遺伝子には、C 末端側に CBM Family 1 に帰属する糖結合部位が存在していた。また、この遺伝子は CDH 遺伝子同様、セルロース培地では発現が確認されたが、グルコース培地では発現は見られなかった。現在、このタンパク質の性質を明らかにするため、酵母菌 *Pichia pastoris* を宿主とした異種発現系を用いて、組換えタンパク質の生産を試みている。

#### A novel hemoprotein containing carbohydrate-binding module from the wood rotting basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*

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

## 2P-24

### 白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来のエンドグルカナーゼ遺伝子のクローニングとその発現挙動

小川那瑠, 吉田 誠, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)

*Phanerochaete chrysosporium* によるセルロース分解機構を理解するためにはセロビオヒドロラーゼ (CBH) やエンドグルカナーゼ (EG) 等の多様なセルラーゼの相互作用を理解することが重要である。このためには個々のセルラーゼの cDNA クローニングを行い、それを利用した遺伝子の発現解析や組み換え酵素生産を行うことが必要となる。ごく最近、米国エネルギー省ジョイントゲノム研究所 (JGI) によって、担子菌初の試みとして *P. chrysosporium* のゲノム解読が行われた。このゲノム情報を利用することで、本菌の生産する様々な酵素遺伝子をクローニングすることが従来より短時間で確実にできるようになった。そこで本研究では、ゲノム情報を用いて *P. chrysosporium* が生産する EGII および EGIII の cDNA をクローニングすることを試みた。また、それらの cDNA から遺伝子特異的プライマーを設計し、各遺伝子の発現挙動を調べた。

今回クローニングした EGII および EGIII の cDNA の塩基配列から推測されたアミノ酸配列は *T. reesei* 由来の EGII および EGIII とそれぞれ 49.2%, 36.0% の相同性を示した。また、セルロースおよびグルコースを炭素源とした培養系における発現を解析したところ、両遺伝子ともに、セルロース培地では顕著な発現が見られたのに対し、グルコース培地での発現量が極端に少なくなっていた。

#### Molecular cloning and differential expression of endoglucanases genes from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*

Naru Ogawa, Makoto Yoshida, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima (Univ. of Tokyo)

## 2P-25

### *Phanerochaete chrysosporium* における分泌タンパク質の発現ダイナミクス解析

湯田直樹, 志水元亨, 割石博之 (九大院・農)

【目的】白色腐朽菌はリグニンを単独で完全に無機化することが可能な唯一の生物である。また、白色腐朽菌はリグニン分解酵素として、リグニンペルオキシダーゼ (LiP)、マンガンペルオキシダーゼ (MnP)、ラッカーゼを分泌することが知られており、リグニン生分解研究はこれらの酵素を中心に進んできた。しかしながら、リグニンを培地に添加してもリグニン分解酵素は誘導されないことが示されている。このことから、既知リグニン分解酵素以外のリグニン分解への関与、未知のリグニン分解酵素の存在が予想された。リグニンは高分子であることから、そのまま細胞内に取り込まれず、細胞外においてフラグメント化された後、細胞内に取り込まれる。そこで、本研究では細胞外タンパク質に対して、プロテオーム解析法を用いたリグニン分解関連未知タンパク質の探索を開始した。

【方法および結果】ブナ木粉または合成リグニンを培地に添加し、白色腐朽菌の細胞外タンパク質分泌にどのような影響を持つのか検討した。既知リグニン分解酵素である LiP、MnP の酵素活性を追跡した。木粉または合成リグニンを添加すると LiP、MnP とともに酵素活性の低下が確認された。さらにプロテオーム解析法を用いて白色腐朽菌が分泌する細胞外タンパク質の同定、および未知タンパク質の探索を行った。その結果、木粉添加により細胞外タンパク質の発現挙動が顕著に変化することが明らかとなった。また、合成リグニン添加により特異的に発現するスポットを確認した。現在、それらの同定を行っている。

### Extracellular proteomic analysis of *Phanerochaete chrysosporium*

Naoki Yuda, Motoyuki Shimizu, Hiroyuki Wariishi

(Faculty of Agriculture, Kyushu Univ.)

## 2P-26

### 白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* のセルロース分解系における菌体外酵素のプロテオーム解析

柳川邦子, 住吉剛史, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)

片山 映, 西野武士 (日医大・一生化)

白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* は、セルロースを炭素源とした培養系において様々な菌体外酵素を生産することが知られている。これまで、このような菌体外酵素に関する研究では、酵素の生産性や作業性の良さから、一般的に液体振とう培養系が用いられてきた。しかしながら、液体振とう培養系は菌が自然界において成育する環境と大きくかけ離れていることから、本菌によるセルロースの生分解機構を明らかにするためには固体表面において培養を行う必要性が示唆される。そこで本研究では、多孔質セルローススポンジを基質として固体静置培養と液体振とう培養をそれぞれ行い、培養過程におけるセルロースの状態を観察するとともに、菌体外に分泌される酵素について二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析を行った。本菌をセルローススポンジを基質として培養した結果、振とう培養系では培養初期においてセルローススポンジがバルブ状に分散するのに対して、静置培養系ではセルローススポンジが形状を保ったまま溶解していた。さらに二次元電気泳動の結果から、二つの培養系では生産される菌体外酵素のパターンが異なっていることが明らかになった。現在 MALDI-TOF/MAS によって両培養系で特徴的に生産されてきたタンパク質の同定を行っている。

### Proteome analysis of extracellular enzymes from cellulose degrading culture of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*

Kuniko Yanagawa, Takeshi Sumiyoshi, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima (Univ. of Tokyo)

Akira Katayama, Takeshi Nishino (Nippon Medical School)

## 2P-27

### 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* 分生子発芽時に分泌される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)

本研究では、麹菌 *A.oryzae* 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て解析し、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。

前回、*A.oryzae* の分生子を液体培地中で発芽し、分泌蛋白質を調べた結果、培地中にタカアミラーゼ A とグルコアミラーゼの他に、未知蛋白質を分泌していることを明らかにした<sup>1)</sup>。今回、未知蛋白質についての同定を peptide mass finger print 法と MS-Fit を用いて検討した。その結果、発芽後 4-6 時間目に現れる分子量 42 kDa のバンドは、11 個のペプチド断片が PEPA (aspergillopepsin A) のものと一致したことから PEPA と同定した。このペプチド断片中には、プロ配列を含む断片も存在することから、42 kDa のバンドはプロ PEPA と推定された。分生子発芽と培地の pH の関係についても合わせて検討した。その結果、培地の pH が pH 3.5 以下になると、タカアミラーゼ A も断片化してくることが明らかになった。以上の結果、*A.oryzae* は発芽初期にプロ型の PEPA を分泌し、pH の低下とともに、自媒的に活性化され、その活性型 PEPA が他の分泌蛋白質を分解しているものと推定した。

1) 朱ら、第 2 回糸状菌分子生物学コンファレンス講演要旨集 p60

#### Proteome analysis of *Aspergillus oryzae* extracellular proteins during germination

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

## 2P-28

### ストレス条件下における黄麹菌 *Aspergillus oryzae* 分生子発芽時のプロテオーム解析

Nguyen Cong Ha, 竹内道雄 (農工大・農・応生化)

黄麹菌は様々なストレス条件下で発芽することが知られている。本研究では、発芽の制御機構を明らかにするために高 pH、高塩濃度、及び高温条件下で発芽した麹菌体内タンパク質について 2 次元ゲル電気泳動法及びペプチドマスフィンガープリント法を用いて比較検討した。対照とし SP 培地で pH5.6、28℃ で発芽した菌体内タンパク質を用いた。pH 9.0 で発芽した場合は、16 個のスポット濃度が対照に比べて増加していることが明らかになった。また、oxoprolinase 及び thiamine biosynthesis related enzyme と推定されるスポットが減少していた。8%NaCl 条件下では対照に比べて大きな違いは認められなかった。低温条件下 25℃ で発芽した菌体内タンパク質についても対照と大きな違いは認められなかったが、thiamine biosynthesis related enzyme は減少する傾向が認められた。一方、高温条件下 40℃ で発芽した場合には、6 個のスポット濃度が増加し、10 個が減少していた。現在、これら違いのあったスポットについて解析を進めている。

#### Proteome analysis of germinated conidia from *Aspergillus oryzae* in stress conditions.

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

## 2P-29

### 麹菌(*Aspergillus oryzae*)分泌タンパク質のプロテオーム解析

織田 健\*, 柿菌ダララット、家藤治幸、秋田 修、岩下和裕 (生研機構\*, 酒類総研)

伝統的醸造産業に利用されている麹菌は、多種多様なタンパク質を多量に生産する能力を有すことから、近年では、異種タンパク質生産の宿主としても利用されている。そのような麹菌の重要性から、様々な分泌タンパク質の研究が行なわれているが、現在までに解析されている麹菌分泌酵素はごく一部であると考えられ、網羅的なプロテオーム解析が必要とされている。前年度は効果的な In gel deglycosylation 法を伴った PMF 解析での麹菌分泌タンパク質の同定法を発表した。本カンファレンスにおいては、その手法を用い小麦ふすままでの固体培養、小麦ふすま抽出液での液体培養条件での菌体外タンパク質の粗酵素液を調製し、経時的なプロテオーム解析を行なったので報告する。

小麦ふすまおよび小麦ふすま抽出液を培地として、30℃一定で40時間に至るまで *A. oryzae* RIB40 株の経時的な培養を行い、国税庁所定分析法に従い分泌粗酵素液を調製した。2次元電気泳動による分画後、各スポットについてPMF解析を行いタンパク質の同定を行った。培養40時間でのパターンを比較したところ、固体培養と液体培養では、非常に異なったスポットの分布を示すことが明らかとなった。また、 $\alpha$ -amylase、 $\beta$ -glucosidase および xylanase F3 などの少数のスポットのみが共通することが確認された。経時的なディファレンシャルディスプレイの結果、麹菌は、両培養条件下共に24時間以降に酵素生産を行なうことが明らかとなった。

### Proteome analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae*.

Ken Oda\*, Kakizono Dararat, Haruyuki Iefuji, Osamu Akita, Iwashita Kazuhiro  
(NRIB, BRAIN\*)

## 2P-30

### 白色腐朽菌における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加に応答したタンパク質発現ダイナミクスの解析

志水元亨、三浦大典、湯田直樹、寺本 寛、割石博之 (九大院・農)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は多くの生物において酸化ストレスを引き起こし、過酸化脂質の生成や細胞死の誘導など生命活動に障害を与えることが知られている。酵母では、5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下において生育が顕著に阻害されることが報告されている。しかしながら、白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* においては、100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下においても、ほとんど生育が阻害されないことが明らかとなった。これは、白色腐朽菌が、優れた細胞応答機構を有しているためと考えられた。また、リグニンやセルロースの分解など白色腐朽菌の有する様々な生物活性に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が必須であることから、他の生物とは異なるユニークな制御機構を有していることも考えられた。そこで本研究では、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加による *Phanerochaete chrysosporium* のタンパク質発現ダイナミクスをプロテオーム解析法により追跡した。

HCLN 条件下で3日間培養後、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加し、さらに培養を継続した。所定時間後、得られた菌体からタンパク質を抽出し、二次元電気泳動に供した。コントロール (HCLN) と泳動パターンを比較したところ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加により発現量が変化するタンパク質が確認された。MALDI-TOF-MS によるペプチドマスフィンガープリントから発現量が変化したタンパク質の同定を行った。その結果、glutathione peroxidase, thioredoxin peroxidase, thioredoxin reductase, catalase, ペントースリン酸回路に関与する酵素をはじめ、種々のタンパク質の発現量が増加していた。

### Oxidative stress response in *Phanerochaete chrysosporium* exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Motoyuki Shimizu, Daisuke Miura, Naoki Yuda, Hiroshi Teramoto, Hiroyuki Wariishi  
(Faculty of Agriculture, Kyushu Univ.)



## 2P-31

### ダイオキシン存在下で発現する *Pleurotus pulmonarius* の遺伝子解析

中村雅哉, 宮崎安将, 砂川政英 (森林総合研究所)

ダイオキシン分解能を示す *Pleurotus pulmonarius*(ウスヒラタケ)をダイオキシン存在下で培養し、ダイオキシン存在下でのみに発現している遺伝子を cDNA-RDA 法により濃縮した。得られた subtracted clone の塩基配列、推定アミノ酸配列をデータベースにより比較、解析した結果、ストレス誘導タンパク質 (*Pleurotus sajor-caju* heat-induced catalase)、転写因子類 (Yeast Eukaryotic translation initiation factor 4E、Putative yeast skp1 homolog)、傷害誘導タンパク質 (Potato Wounding-induced protein)、硫黄代謝関連因子 (*Neurospora crassa* Negative regulator sulfur controller-3)、P 4 5 0 (Cytochrome P450 2D11) 等が見出された。以上のことからダイオキシンがストレスとして認識された後、水酸化等により分解・代謝されて行くことが示唆された。

### Identification of genes involved in 2,3,7,8-TCDD representational difference analysis of *Pleurotus pulmonarius*.

Masaya Nakamura, Yasumasa Miyazaki, Masahide Sunagawa

(Forestry and Forest Products Research Institute)

## 2P-32

### Gateway システムを用いた麹菌 *A. oryzae* における有用タンパク質発現系の構築

馬橋由佳, 菊間隆志, 大根田守, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は大量のタンパク質を菌体外に分泌する能力を有しており、有用タンパク質を工業的に生産するため、あるいは、機能未知なタンパク質の機能解析を行うためのタンパク質生産の宿主として注目されてきた。特にポストゲノム時代が到来した現在、高純度かつ大量の生産が望まれるタンパク質の種類は今後更に増加することが予想され、それに伴って麹菌で目的のタンパク質を発現するためのプラスミドを構築する、迅速かつ容易な遺伝子クローニング技術が求められている。

我々は特定の発現ベクターに対し、複数の遺伝子を迅速にクローニングすることを可能にする技術である Gateway テクノロジーに注目した。このシステムではライゲーション作業をすることなく、挿入方向とリーディングフレームを維持したまま、複数の遺伝子フラグメントを一度に一つのベクターに移し変えることが可能であり、これによって条件発現用のプロモーターおよびフュージョンタグ双方を伴うタンパク質発現ベクターなどを迅速に構築できる。そこで麹菌でのタンパク質発現に利用できるシステムを作製することを目的に、条件発現用プロモーターとして、*A. oryzae* の *amyB*, *pgkA*, *thiA* プロモーターを、N 末端あるいは C 末端フュージョンタグとして EGFP, DsRsd, GST, HA-His<sub>6</sub> を、*A. oryzae* 形質転換用マーカーとして *A. oryzae niaD*, *sC* および *A. nidulans sC* マーカーを選び、これらを組み合わせて目的遺伝子から任意の融合タンパク質を発現することを可能にするベクター 14 種を構築した。現在これらのベクターを用いて、目的融合タンパク質を迅速かつ容易に発現可能であることの確認を行っている。

### Construction of Gateway-based versatile vectors for useful protein expression in *A. oryzae*.

Yuka Mabashi, Takashi Kikuma, Mamoru Ohneda, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

## 2P-33

### 蛍光色素を用いた糸状菌菌体量定量法とハイスループット変異株スクリーニング

鈴木 聡, 竹谷博子, 松下真由美, 木村多江, 楠本憲一, 柏木 豊 (食総研)

我々はEGFPをレポーターに用いたジーントラップ形質転換により網羅的な麹菌未知遺伝子機能の解析を行っている。本発表では、1. 宿主ゲノム内のプロモーターをトラップしEGFPを発現している株を高効率に選抜するためのスキャナー型蛍光画像測定装置を用いた方法、2. その方法の開発途上で開発した蛍光色素による菌体量定量法、の2点について述べる。麹菌は画像解析装置の緑色蛍光用フィルターで選別される波長の自家蛍光を持つため、単に緑色蛍光のみを定量してもそれがEGFP由来なのか自家蛍光によるものかを判別することはできない。そこで我々は、一定の菌体量当りの緑色蛍光強度を比較して、EGFP発現株を選抜する方法を検討した。そのためには蛍光測定時における菌体量を定量することが必須である。我々は蛍光による菌体量定量法を開発するため10種類の蛍光色素によって*Aspergillus oryzae* RIB40の細胞を染色し、染色による蛍光強度と菌体乾燥重量が相関する色素を見出した。また、この蛍光色素による蛍光強度と菌体乾燥重量の相関を示す検量線を用いることにより、蛍光強度から菌体重量を推定することが可能であることを示した。さらに、*Trichoderma viride*, *Penicillium roqueforti*についても検討した。その結果、これらの糸状菌についても検量線を作成できることが判り、本方法により菌体量を推定できることを示した。また本色素を用いた染色法により一定菌体量当りの緑色蛍光強度の強い株を96穴タイタープレート上に培養したジーントラップ形質転換株から選抜した。

**Quantitation of fungal cell mass and high-throughput screening for isolation of transformants by using fluorescent image analyzer**

SATOSHI SUZUKI, HIROKO TAKETANI, MAYUMI MATSUSHITA, TAE KIMURA, KEN-ICHI KUSUMOTO, AND YUTAKA KASHIWAGI

(Natl. Food Res. Inst.)

## 2P-34

### ファージディスプレイによる麹菌 *Aspergillus oryzae* の DNA 結合因子の探索

戸田智美<sup>1</sup>, 萩原央子<sup>1</sup>, 國廣澄子<sup>1</sup>, 佐野元昭<sup>1</sup>, 桑原一郎<sup>2</sup>, 丸山一郎<sup>2</sup>, 町田雅之<sup>1</sup> (<sup>1</sup>産総研・糖鎖センター、<sup>2</sup>The Scripps Research Institute)

ファージディスプレイベクターであるλfooベクターは、提示する外来遺伝子由来のタンパク質を細胞外へ分泌する必要がなく、多量体でのタンパク質の提示も可能であることなど、DNA結合因子の発現・探索に有効な特性を持っている。本研究では、麹菌から転写制御因子をはじめとするDNA結合因子を網羅的に効率よく検出・獲得することを目的とし、改良型λfooベクターを用いた麹菌遺伝子ライブラリーの構築並びにファージディスプレイ法によるDNA結合因子の濃縮を試みた。

ライブラリー構築のための挿入断片は、ファージの生育およびファージ表面へのタンパク質の提示におけるバイアスを考慮し、制限酵素処理により0.5-1 kb程度の比較的鎖長の短い断片を調製した。更に、構築時の効率を確保するために、λfooベクターのMCS部分を改変した改良型λfooベクター<sup>1)</sup>を用い、独立した10<sup>5</sup>以上のクローンからなるファージライブラリーを作製した。現在、このライブラリーを用いて、磁気微粒子によるDNA結合能を指標としたaffinity selectionを行い、DNAと特異的に結合する因子の濃縮ならびに探索に取り組んでいる。

1) Hagiwara *et al.* (2002) *J. Biochem.* 132, 975-982

**Affinity selection of *Aspergillus oryzae* DNA-binding proteins by phage display**

Tomomi Toda<sup>1</sup>, Hiroko Hagiwara<sup>1</sup>, Sumiko Kunihiro<sup>1</sup>, Motoaki Sano<sup>1</sup>, Ichiro Kuwabara<sup>2</sup>, Ichiro Maruyama<sup>2</sup>, Masayuki Machida<sup>1</sup> (AIST, <sup>2</sup>TSRI)

## 2P-35

### 固定化 *Aspergillus oryzae* 菌体によるキラル化合物の繰り返し光学分割

海江田優<sup>1</sup>, 近藤昭彦<sup>2</sup>, 福田秀樹<sup>1</sup> (神戸大院・自然科学<sup>1</sup>, 神戸大・工<sup>2</sup>)

分子内に不斉原子を持つキラル化合物は光学異性体間で生理活性等が異なり、一方の異性体のみが目的の生理活性を有する場合が多い。そこで、医薬品や農薬などの原料として用いられる生理活性物質の生産では、求める活性を有する片方の異性体だけを選択的に生産することが望ましく、リパーゼの持つ高いエナンチオ選択性を利用したキラル化合物の光学分割が注目されている。本研究では、リパーゼ生産菌である *Aspergillus oryzae* を多孔質担体に固定化した固定化菌体触媒 (whole cell biocatalyst) を用いて酵素法による光学分割を検討した。我々は *A. oryzae niaD300* 株を宿主とし、これに自らの持つリパーゼ遺伝子 (tg1A) を染色体組込みにより導入、発現させ、リパーゼを生産する菌体の育種を行った。光学分割反応のモデル系として、反応基質となるラセミ体の 1-フェニルエタノール 30mg と酢酸ビニル 21.2mg を混合し、ヘキササン 3ml、whole cell biocatalyst 10 個を加え、(R)-メチルベンジルアセテート((R)-MBA)を合成する反応を行った。30℃、150rpm の条件で振とう反応を行った結果、48h で 90%以上の(R)-MBA 生成率と 90%以上のエナンチオマー過剰率を達成した。また、whole cell biocatalyst は上記条件で 10 回以上の繰り返し利用が可能であった。

### Repeated Use of Immobilized *Aspergillus oryzae* Cell for Enantioselective Esterification of Chiral Compound

Masaru Kaieda<sup>1</sup>, Akihiko Kondo<sup>2</sup>, Hideki Fukuda<sup>1</sup>

(Graduate School of Science and Technology<sup>1</sup>, and Faculty of Engineering<sup>2</sup>, Univ. of Kobe)

## 2P-36

### 担子菌ウシグソヒトヨタケの BAC ライブラリー構築と BAC DNA を用いた形質転換

村口 元, 柳 園江 (秋田県立大・生物資源)

担子菌ウシグソヒトヨタケ (*Coprinus cinereus*) のゲノムサイズは 37.5 Mbp であり、本年、その全塩基配列が解読され公開された。塩基配列からは機能の推定できない遺伝子の解析が今後の課題である。本研究では、BAC DNA を直接、*C. cinereus* に形質転換できる BAC ライブラリーの構築を行った。まず、BAC ベクターとして、pBeloBAC11 に *C. cinereus* の形質転換マーカーである *trp1* を組み込んだ pBACTZ (10.4 kb) を構築した。次に、連鎖地図作成に用いたマッピング集団中の野生型一核菌糸株、PM#2 のゲノム DNA を *HindIII* で部分消化し、pBACTZ の *HindIII* サイトにつなぎ、大腸菌 DH10B に導入し、96 穴プレート 16 枚に単離した。平均インサートサイズ (130 kb) から見積ると、このライブラリーは *C. cinereus* ゲノムの約 5 倍をカバーしている。170 kb および 185 kb のインサートを持つ 2 つの BACs を用いて、*C. cinereus* の #292 株 (*trp1-1,1-6*) を PEG-Ca<sup>2+</sup>法により形質転換したところ、プロトプラスト当たりでは通常のコスミド DNA に比べ、1/10 程度の効率で形質転換が起きた。170 kb の BAC DNA による形質転換体 (4 株) について、CHEF 電気泳動により染色体 DNA を調べたところ、それぞれの株で新たなサイズを持つ染色体 DNA が現れており、それぞれ違った染色体に BAC DNA が組み込まれていることが分かった。今後は、様々な突然変異体を利用して、突然変異形質を相補する DNA 断片として遺伝子をクローニングし、遺伝子の機能解析を進めたい。

### Construction of a BAC library and transformation with BAC DNAs in *Coprinus cinereus*

Hajime Muraguchi, Sonoe O. Yanagi

(Fac. Bioresource Sci., Akita Pref. Univ.)

## 人名索引

Balmas, Virgilio .....	55	飯島 隆.....	49
Birren , Bruce .....	10	家藤治幸.....	66
Bolchi, Angelo .....	60	五十嵐圭日子.....	24, 62, 63, 64
Gale, L. R. ....	10, 55	五十嵐理恵.....	26
Ha, Nguyen Cong.....	65	石 一智.....	27, 50
Hernandez-Bello, M. ....	56	石田博樹.....	41
Juvvadi, Praveen Rao .....	27, 37, 46, 47	石橋靖洋.....	58
Kaiser, W.J. ....	56	磯部千尋.....	29
Kistler, H. Corby .....	10, 55	一島英治.....	22
Nakahama, Tomoyuki .....	60	一瀬博文.....	23
Nakanishi, Yoshito .....	60	一宮維幸.....	45
Ottonello, S. ....	12, 60	一枚田史子.....	22
Pakula, Tiina .....	14	伊藤 清.....	46
Peever, Tobin L. ....	56	伊藤考太郎.....	59
Penttilä, Merja .....	14	伊藤建夫.....	51
Read, Nick D. ....	15	伊藤靖夫.....	30, 50, 51
Saloheimo, Markku .....	14	今尾一郎.....	61
Trail, Frances.....	10	岩崎琢磨.....	27
Valkonen, Mari .....	14	岩下和裕.....	18, 32, 66
Ward, Todd .....	55	江草真由美.....	30
Xu, Jin-Rong .....	10	海老塚豊.....	34, 35, 37
Yu, Jiujiang .....	26	遠藤良知.....	39
赤尾 健.....	32, 60	及川英秋.....	34, 35
赤木靖典.....	33	太田一良.....	58
赤松 創.....	33, 34, 35	太田明德.....	28, 45
秋田 修.....	25, 26, 32, 38, 43, 57, 60, 66	大根田守.....	48, 49, 67
浅井 潔.....	26	岡崎孝映.....	24
浅野 静.....	49	小笠原直毅.....	26
浅野行蔵.....	57	小川那瑠.....	63
穴澤秀治.....	26	小瀬 愛.....	61
阿部 歩.....	57	尾関健二.....	30
阿部敬悦.....	16, 26, 28, 44, 61	織田 健.....	66
安部康久.....	41	尾谷 浩.....	33, 34, 35
荒瀬 栄.....	52	小田有二.....	57
有江 力.....	54, 55	小原敏明.....	53
有岡 学.....	47, 48, 49, 60, 67	海江田優.....	69
有馬寿英.....	26, 32	柿菌ダララット.....	66

角谷直樹.....	29	小森 隆.....	26
笠原 堅.....	34	小山泰二.....	26, 59
加治佐 平.....	62	近藤昭彦.....	69
梶原 将.....	23	斎藤勝一.....	57
柏 延之.....	37	坂本和俊.....	32, 38, 43, 57, 60
柏木 豊.....	26, 38, 41, 68	佐藤利次.....	25
片山 映.....	24, 64	佐野元昭.....	26, 68
勝川志穂.....	23	鮫島正浩.....	24, 62, 63, 64
加藤雅士.....	25, 39, 41, 42, 43	澤田宏之.....	54
金森正樹.....	55	澤野寿彦.....	26
鎌倉高志.....	55	椎名松子.....	44
川崎荘志.....	58	重 隆人.....	58
川戸章嗣.....	41	宍戸和夫.....	23
川部眞登.....	54	志水元亨.....	23, 64, 66
河村健志.....	61	下飯 仁.....	46
神崎誠一.....	36	下牧重樹.....	35
菊池 久.....	26	朱 立穎.....	65
菊間隆志.....	49, 67	正路淳也.....	48
北本勝ひこ.....	20, 26, 27, 37, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 67	白石友紀.....	52
北本則行.....	40, 59	新本洋士.....	36
吉内くみ.....	39	須賀晴久.....	53
木原淳一.....	52	鈴木哉子.....	59
木村多江.....	68	鈴木 聡.....	38, 68
木村俊之.....	36	鈴木雅博.....	36
楠本憲一.....	26, 38, 68	砂川政英.....	67
工藤倫子.....	36	住吉剛史.....	24, 64
久原 哲.....	26	巢山治彦.....	31
窪寺隆文.....	39	勢 康代.....	37
久保康之.....	52	曾根輝雄.....	56, 57
熊谷俊高.....	26	高橋健二.....	61
栗原宏征.....	23	高橋真美.....	54
桑原一郎.....	68	竹内道雄.....	26, 65
小出芳直.....	26, 59	竹下典男.....	28
幸田明生.....	30	竹谷博子.....	68
合田秀矢.....	25	多田羅洋太.....	22
國廣澄子.....	68	田中昭光.....	26, 43
小関卓也.....	38, 61	田中寿基.....	42
児玉基一朗.....	30, 33, 34, 35	田中千尋.....	52
小林哲夫.....	25, 26, 39, 41, 42, 43	田中敏広.....	26
五味勝也.....	26, 28, 31, 39	田上新次郎.....	25

丹野丈記.....	31	廣瀬知華.....	52
中馬いづみ.....	29	広常正人.....	30, 40
塚越規弘.....	25, 39, 41, 42, 43	福田秀樹.....	69
柘植尚志.....	53	藤井 勲.....	34, 35, 37
辻 元人.....	52	藤井 聡.....	52
土屋健一.....	54	藤岡智則.....	28, 44
坪井宏和.....	40	藤田晃子.....	38
寺岡 徹.....	54, 55	藤野恵美.....	40
寺本 寛.....	66	振木昌成.....	35
東本篤樹.....	59	古川健太郎.....	28, 44
徳岡昌文.....	28	堀内裕之.....	26, 28, 45
土佐幸雄.....	29	本田雄一.....	52
戸田智美.....	40, 68	牧田智裕.....	41, 42
富田房男.....	56	町田雅之.....	26, 40, 68
富永美穂子.....	57	松井淳子.....	40
中井 進.....	39	松井英樹.....	35
中岡 源.....	30, 50	松崎芙美子.....	23
中島 佑.....	28, 44, 61	松下真由美.....	38, 68
中島春紫.....	27, 49, 50	馬橋由佳.....	67
長瀬 崇.....	43	眞山滋志.....	29
仲原丈晴.....	59	丸井淳一朗.....	42
中村雅哉.....	67	丸山一郎.....	68
中村洋二郎.....	46	丸山潤一.....	20, 27, 37, 46, 47, 50
中屋敷均.....	29	三浦大典.....	66
中山 祐.....	38	水谷 治.....	28, 44
夏目雅裕.....	55	水谷真也.....	51
夏目豊彰.....	30	三並正芳.....	47
奈良秀徳.....	47	峰時俊貴.....	26, 30, 40
西野武士.....	24, 62, 64	宮崎安将.....	67
西村 顕.....	39	六車三治男.....	58
丹羽修身.....	24	村口 元.....	69
萩原央子.....	68	村越有里子.....	42
橋爪克己.....	61	村山肇子.....	36, 58
長谷川祥子.....	31	森崎陽一.....	53
秦 洋二.....	26, 41	森本泰介.....	33
花本秀生.....	39	森山 聡.....	58
林 梨咲.....	57	森脇明弘.....	52
百町満朗.....	53	安田庄子.....	40
平井伸明.....	22	柳川邦子.....	64
平塚宣博.....	23	柳 園江.....	69

矢原明典.....	60	湯田直樹.....	64, 66
山形洋平.....	28, 44, 61	吉田 孝.....	22, 60
八巻幸二.....	36	吉田 誠.....	24, 62, 63
山岸賢治.....	36	吉田隆延.....	54
山岸大輔.....	35	吉田奈央.....	35
山崎 丘.....	23	李 秉魯.....	22
山下浩一郎.....	22	李 允惠.....	57
山下伸雄.....	39	渡辺 睦.....	39
山田 修.....	25, 32, 38, 43, 57, 60	渡辺久敬.....	25
山田絵美.....	45	割石博之.....	23, 64, 66
結城健介.....	59		

## 糸状菌分子生物学研究会 会則

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

以上

### 補則

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



## 糸状菌分子生物学会運営委員会名簿

### 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3回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集

平成 15 年 10 月 10 日印刷

平成 15 年 10 月 15 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