

目次

コンファレンスプログラム	1
発表演題及び講演時間	2
特別講演要旨	9
シンポジウム講演要旨	10
一般講演要旨	18
ポスター発表講演要旨	28
人名索引	71
糸状菌分子生物学研究会会則	75
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿	76

第4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16年11月4日(木)-5日(金)
会場：仙台市民会館（青葉区桜ヶ岡公園4-1）
主催：糸状菌分子生物学研究会
後援：糸状菌遺伝子研究会

11月4日（木）

12:30-14:45 一般講演（O-1～O-9）

14:45-15:00 休憩

15:00-16:30 ポスター発表（奇数番号）

16:30-17:30 特別講演 Dr. Geoffrey Turner (Univ. Sheffield, UK)

Understanding secondary metabolism and growth in filamentous fungi – what can we learn from genomics?

17:30-17:40 総会

17:45- 懇親会

11月5日（金）

9:30-11:50 シンポジウム「糸状菌の代謝制御研究の新展開」

S-1 糸状菌の嫌気的なエネルギー獲得機構の多様性
高谷直樹（筑波大・生命環境）

S-2 転写因子を介しない新規な糸状菌の遺伝子発現制御機構
窪寺隆文（白鶴酒造）

S-3 糸状菌の二次代謝産物生産に関する転写因子の活性制御
清水公德（千葉大・真菌研）

S-4 糸状菌の効率的遺伝子ターゲティングのための宿主開発
井上弘一（埼玉大・理）

11:50-12:50 昼休み

12:50-14:20 ポスター発表（偶数番号）

14:20-16:50 一般講演（O-10～O-19）

16:50-17:00 閉会の辞

発表演題及び講演時間

特別講演 11月4日(木) 16:30-17:30

Understanding secondary metabolism and growth in filamentous fungi – what can we learn from genomics?

Dr. Geoffrey Turner

Dept. Molecular Biology and Biotechnology, Univ. Sheffield, Sheffield S10 2TN, UK

シンポジウム 11月5日(金) 9:30-11:50

- S-1 糸状菌の嫌気的なエネルギー獲得機構の多様性
高谷直樹 (筑波大・生命環境)
- S-2 転写因子を介しない新規な糸状菌の遺伝子発現制御機構
窪寺隆文 (白鶴酒造)
- S-3 糸状菌の二次代謝産物生産に関する転写因子の活性制御
清水公德 (千葉大・真菌研)
- S-4 糸状菌の効率的遺伝子ターゲティングのための宿主開発
井上弘一 (埼玉大・理)

一般講演 (O-1~O-9) 11月4日(木) 12:30-14:45

- 12:30 O-1 植物病原糸状菌 *Magnaporthe oryzae* における RNA サイレンシング経路には二つの Dicer 様タンパク質のうち一つが主に関与する
角谷直樹、中屋敷均、土佐幸雄、眞山滋志 (神戸大・自然科学)
- 12:45 O-2 植物病原糸状菌 *Alternaria alternata* において G 蛋白質 α サブユニット遺伝子 (AGAI) は形態形成および病原性に関与する
山岸大輔、尾谷 浩、児玉基一朗 (鳥取大・農)
- 13:00 O-3 分裂酵母 dikaryon の分裂に働く因子
岡崎孝映、丹羽修身 (かずさ DNA 研究所)
- 13:15 O-4 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) における Codon usage 最適化による異種タンパク質生産の効率化
徳岡昌文¹、高木忍¹、小埜和久²、五味勝也 (東北大院・生物産業創生、¹ノボザイムスジャパン、²広島大院先端物質・分子生命)
- 13:30 O-5 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の浸透圧応答 MAPK 経路の解析
古川健太郎、星由紀子、前田達哉*、阿部敬悦、中島佑 (東北大院農・応生科、*東大・分生研)
- 13:45 O-6 麹菌の *kexB* 遺伝子破壊は cell integrity signaling pathway の構成的活性化を引き起こす。
水谷治、藤岡智則、山形洋平、阿部敬悦、中島佑 (東北大院農・応生科)
- 14:00 O-7 糸状菌 *Aspergillus nidulans* のミオシン様ドメインを持つ二つのキチン合成酵素 (CsmA, CsmB) の機能的相関関係の解析
竹下典男、堀内裕之、太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- 14:15 O-8 Putative role for protein kinase C and / or calmodulin in the regulation and assembly of the Woronin body protein, AoHex1, in *Aspergillus oryzae*
Praveen Rao JUVVADI, Jun-ichi MARUYAMA and Katsuhiko KITAMOTO (Department of Biotechnology, University of Tokyo, Tokyo)
- 14:30 O-9 麹菌 *A. oryzae* における小胞体の局在および動態解析
丸山潤一、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

一般講演 (O-10~O-19) 11月5日(金) 14:20-16:50

- 14:20 O-10 ヒラタケのスフィンゴミエリン特異的2成分サイトリシンの膜孔形成
冨田敏夫¹、野口桂代子²、三室仁美²、冨田(菅原)典子¹、橋本洋一² (東北大院農・生物産業創成、埼玉大理・分子生物)
- 14:35 O-11 シイタケ子実体における *Le.recQ* 遺伝子の局在性
勝川志穂、穴戸和夫 (東工大・生命理工)
- 14:50 O-12 シイタケ(*Lentinula edodes*)の *exo*-グルカナーゼ遺伝子(*exg1,exg2*)の単離
坂本裕一、入江俊一、湊健一郎*、川上佐知子*、水野雅史*、佐藤利次 (岩手生工研・* 神戸大農)
- 15:05 O-13 *Polyporus brumalis* によるプタレートエステル類分解における初期脱エステル化後のリグニン分解酵素の役割
Lee, Soo-Min, Kim, Myung-Kil, Lee, Sung-Suk, Choi, In-Gyu (KFRI, Seoul National Univ., Korea)
- 15:20 O-14 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が生産する多様な菌体外糖質関連酵素に対するポストゲノミックアプローチ
五十嵐圭日子、吉田誠、鮫島正浩 (東大院・農生科)
- 15:35 O-15 糸状菌が行う異化的硫黄還元代謝
安部剛史、星野貴行、中村顕、高谷直樹 (筑波大・応生化)
- 15:50 O-16 クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* 由来 alternative oxidase 遺伝子(*aox1*)の転写解析
服部貴澄、草井啓、木野邦器、桐村光太郎 (早大・理工・応化)
- 16:05 O-17 糸状菌転写活性化因子 AmyR の誘導的核局在化機構
牧田智裕、加藤雅士、小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)
- 16:20 O-18 麹菌 *Aspergillus oryzae nmtA* 遺伝子の5'-UTR内イントロンに存在するリボスイッチ様配列による遺伝子発現抑制
清水広之、窪寺隆文*、五味勝也 (東北大院農・生物産業創成、*白鶴・研開)
- 16:35 O-19 麹菌のアルコール代謝に関わる遺伝子の発現制御
八巻裕一、五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

ポスター発表 奇数番号 11月4日(木) 15:00-16:30
偶数番号 11月5日(金) 12:50-14:20

- P-1 イネいもち病菌の感染過程で特異的に発現する遺伝子 *B19,B48,B59*
齋藤憲一郎、石井ふみ、金森正樹、有江 力、鎌倉高志*、寺岡 徹 (農工大・農、*東京理科大・理工)
- P-2 麹菌 *Aspergillus oryzae* の新規 endo- β -1,3-グルカナーゼの解析
砂川美佐緒、佐野元昭、高瀬久美子、戸田智美、新聞陽一、町田雅之 (産総研)
- P-3 麹菌 hydrophobin の PBSA 分解における役割
高橋徹¹、前田浩²、米田幸世¹、大滝真作¹、山形洋平^{1,3}、阿部敬悦^{1,3}、長谷川史彦³、町田雅之⁴、石岡領治⁵、五味勝也^{3,6}、中島佑^{1,3} (東北大院農・応生科¹、千葉県産技研²、NICHe³、産総研⁴、昭和高分子⁵、東北大院農・生物産業創成⁶)

- P-4 麹菌が産生する新規疎水表面吸着タンパク質 HsbA の性質決定
大滝真作¹, 前田浩³, 高橋徹¹, 山形洋平^{1,4}, 阿部敬悦^{1,4}, 長谷川史彦⁴, 町田雅之⁵, 石岡領治⁶, 五味勝也^{2,4}, 中島佑^{1,4} (¹東北大学院農・応生化, ²東北大学院農・生物産業創成, ³千葉県産技研, ⁴Niche, ⁵産総研, ⁶昭和高分子)
- P-5 麹菌のクチナーゼホモログ (CutB) の遺伝子構造と生分解性プラスチックの分解活性
伊藤竹久¹, 前田浩^{2,3}, 山形洋平^{2,3}, 長谷川史彦³, 阿部敬悦^{2,3}, 中島佑^{2,3}, 五味勝也^{1,3} (¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大院農・応生科, ³東北大 NICHe)
- P-6 麹菌オリゴアレイを用いた各種培養条件下での発現解析
佐野元昭、山根倫子*、大箸信一、町田雅之* (金沢工大、*産総研)
- P-7 トマト萎凋病菌の非病原性決定領域はキュウリモザイクウイルス (CMV) 外被タンパク質遺伝子と部分的に相同性を示す
中村巨宏, 岡部明子, 川部眞登*, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大農・*農環研)
- P-8 麹菌 *A. oryzae* を用いた魚類生理活性タンパク質の生産
馬橋由佳, 有岡学, 末武弘章*, 鈴木讓*, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工、*附属水産実験所)
- P-9 黄麹菌分生子、発芽分生子のプロテオーム解析
ゲン・コン・ハ、竹内道雄 (東京農工大学、農学部、応用生物化学)
- P-10 *Rhizopus oryzae* のキチン合成酵素遺伝子の解析
阿部 歩, *小田有二, 曾根輝雄, 浅野行蔵 (北大院農・応用菌学, *北海道農業セ)
- P-11 誘導シグナルに応答した *Aspergillus nidulans* AmyR の構造変化
伊東達雄, 加藤雅士, 小林哲夫 (名大院・生命農学)
- P-12 *Aspergillus oryzae* の細胞壁構造の改変による細胞質タンパク質生産系の構築
一宮維幸, 池田佳広, 北本勝ひこ, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- P-13 *Aspergillus nidulans* のプロセッシング酵素遺伝子 *kexB* 破壊株の解析
一柳俊介、古川健太郎、水谷治、藤岡智則、徳岡昌文、五味勝也、阿部敬悦、中島佑(東北大院農・応生科)
- P-14 *Alternaria solani* 還元型ポリケタイド合成酵素遺伝子の発現と機能解析
笠原堅¹、藤井勲¹、海老塚豊¹、及川英秋² (¹東大院薬、²北大院理)
- P-15 ウシグソヒトヨタケの青色光受容体をコードしている遺伝子 *dst1* : 遺伝子構造、発現、変異株の解析
寺島和寿, 幸克行, 秋山匡史, 村口元¹, 鎌田堯 (岡大・理,¹秋田県大・生物資源)
- P-16 ウシグソヒトヨタケの青色光受容体 Dst1 と相互作用するタンパク質の two-hybrid 法による検索
嘉屋重雅幸, 寺島和寿, 宮本奈緒,¹村口 元, 鎌田 堯 (岡山大・理, 秋田県大・生物資源)
- P-17 *Amylomyces rouxii* のシュクロース分解酵素について
鬼頭英樹, 斉藤勝一, 小田有二 (農研機構・北海道農研)
- P-18 プロモーターのデリーション解析とゲルシフト解析を用いた迅速なシスエレメントの同定方法の開発
久田博元¹, 佐野元昭², 石田博樹¹, 秦 洋二¹, 町田雅之², 川戸章嗣¹, 安部康久¹ (¹月桂冠総研, ²産総研)
- P-19 アフラトキシン生産阻害物質の研究
近藤竜彦, 多田倫子, 坂神洋次 (名大院・生命農学)
- P-20 *Neurospora crassa* の *het-c* vegetative incompatibility における温度感受性変異体 *vib-2* の解析
金子 功*, Qijun Xiang, N. Louise Glass (U.C. Berkeley・Dept. Plant and Microbial Biology、*現・農環研)

- P-21 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の class V キチン分解酵素 ChiB の酵素学的性質の解析
金子純一、山崎晴丈、福田良一、堀内裕之、太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- P-22 *Aspergillus aculeatus* におけるセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の発現調節機構
金政真¹、川口剛司²、荒井基夫³、梶原将¹ (¹東工大・院生命理工, ²阪府大院・農生科, ³中部大・応生)
- P-23 麹菌 *A. oryzae* によるヒトリゾチームの高生産
金鋒杰、渡辺泰祐、丸山潤一、Praveen Rao Juvvadi, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-24 麹菌 *A. oryzae* によるヒトリゾチーム生産におけるプロテアーゼ遺伝子破壊の効果
金鋒杰、渡辺泰祐、丸山潤一、Praveen Rao Juvvadi, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-25 *Trichoderma reesei* PC-3-7 株由来キシラナーゼIII遺伝子の誘導発現機構の解析
古川隆紀、島田龍一、中川志穂、小笠原渉、岡田宏文、森川 康 (長岡技大・工・生物)
- P-26 複数の触媒ドメインを持つ高機能キメラセルラーゼの作成
戸田 弘¹、梶沢幸絵¹、天野良彦²、神田鷹久²、岡崎光雄¹、下坂 誠¹ (¹信州大・繊維・応生科、²信州大・工・物質工)
- P-27 植物根圏糸状菌 *Trichoderma harzianum* の MAP キナーゼ ThPmk1 の機能解析
向坂由貴¹、小野大輔^{1,2}、本山高幸¹、河合良夫²、工藤俊章¹ (¹理研・中央研、²東洋大・生命科学)
- P-28 優性阻害変異 HapB サブユニットを用いた Hap 複合体依存遺伝子の発現抑制
合田秀矢、杉山純也、小林哲夫、加藤雅士 (名大院・生命農)
- P-29 *Neurospora crassa* の NER 遺伝子 *mus-43* の解析
佐藤正仁、一石昭彦 (東洋大・生命科学部)
- P-30 乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子による *Rhizopus oryzae* 菌株の系統解析
斎藤勝一、小田有二 (農研機構・北海道農研)
- P-31 *Aspergillus nidulans* AmyR のシグナル応答領域に関する解析
坂口 孝、牧田智裕、加藤雅士、小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)
- P-32 麹菌(*A.oryzae*)の転写制御因子 ATFB は固体培養後期の遺伝子発現を制御する
坂本和俊、有馬寿英、山田修、秋田修 (酒総研)
- P-33 スエヒロタケ cAMP-dependent protein kinase A 遺伝子のクローニング
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)
- P-34 ランダムプラスミド導入による麹菌(*Aspergillus oryzae*)遺伝子破壊株の作成
山田 修、池田涼子、林 梨咲、坂本和俊、秋田 修 (酒総研)
- P-35 糸状菌 *Trichoderma reesei* における *egl3* の誘導発現機構の解析
志田洋介、小笠原渉、岡田宏文、森川康 (長岡技科大・生物)
- P-36 *Aspergillus awamori* 由来フェルロイルエステラーゼの基質認識に関わるアミノ酸残基の解析
高橋健二¹、伏信進矢²、橋爪克己³、小関卓也^{1,3} (¹広島大院・生物圏, ²東大院農生科・応生工, ³酒総研)
- P-37 *Aspergillus kawachii* 由来 α -L-アラビノフラノシダーゼ B の Asn 結合糖鎖が酵素活性及び安定性に及ぼす影響
三輪陽三¹、宮永顕正²、伏信進矢²、橋爪克己³、小関卓也^{1,3} (¹広島大院・生物圏, ²東大院農生科・応生工, ³酒総研)
- P-38 *Pichia pastoris* で発現させた *Aspergillus kawachii* 由来エンドグルカナーゼ(AkCel61)の酵素化学的性質
米原由希¹、橋爪克己²、伊藤清^{2,3}、小関卓也^{1,2} (¹広島大院・生物圏, ²酒総研, ³広島大院・先端研)
- P-39 植物根圏糸状菌 *Trichoderma harzianum* の植物根圏環境への適応における MAP キナーゼ ThMps1 の機能解析
小野大輔^{1,2}、向坂由貴¹、本山高幸¹、河合良夫²、工藤俊章¹ (¹理研・中央研、²東洋大・生命科学)

- P-40 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の AoHSP30 遺伝子プロモーターの解析と外来遺伝子の発現制御
松下真由美、鈴木 聡、楠本憲一、柏木 豊 ((独) 食総研)
- P-41 *Aspergillus oryzae* 分泌タンパク質の培養環境による分泌変動解析
織田 健、柿菌ダララット、有馬寿英、坂本和俊、山田 修、秋田 修、岩下和裕 (酒総研)
- P-42 麹菌 *A. oryzae* の新規ポリケタイド合成酵素遺伝子 *csyA* の機能解析
勢ノ康代¹、藤井勲²、Praveen Rao Juvvadi¹、北本勝ひこ¹ (¹東大院・農生科・応生工、²東大院・薬)
- P-43 アカパンカビ DNA 修復遺伝子 *ncRAD4* 破壊株の作製と解析
星野正幸、都甲 建、一石昭彦 (東洋大・生命科学部)
- P-44 ロイシン要求性を利用した麹菌の新規な宿主ベクター系の開発
石田博樹、小島泰弘、秦 洋二、川戸章嗣、安部康久、柏木 豊¹ (月桂冠総研・¹食総研)
- P-45 いもち病菌ミニクロモソーム由来の3種の新規レトロトランスポゾン
曾根輝雄、*小口晃央、*菊池 久、**妹尾彰宏、**中川 智、冨田房男 (北大院農・*NITE・**ザナジェン)
- P-46 糸状菌 *Aspergillus nidulans* における形態形成に關与する新規転写制御因子
倉持太一、藤岡智則、山形洋平、阿部敬悦、中島佑 (東北大院・農・応生科)
- P-47 麹菌 *A. oryzae* における SNARE タンパク質の網羅的解析
倉都将宏、正路淳也、有岡 学、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-48 糸状菌 *Aspergillus niger* におけるシアン非感受性呼吸系酵素遺伝子(*aox1*)の破壊によるクエン酸生産性の激減
草井啓、服部貴澄、木野邦器、桐村光太郎 (早大・理工・応化)
- P-49 ウシグソヒトヨタケにおけるゲノム情報を利用した BAC contigs の作成
村口 元、柳 園江 (秋田県立大・生物資源)
- P-50 *Aspergillus saitoi* 1,2- α -mannosidase のシステイン残基の熱安定性への寄与
多田羅洋太、吉田孝¹、一島英治 (創価大院・工、¹弘前大・農学生命)
- P-51 不完全菌 *Aureobasidium pullulans* における GH ファミリー10 キシラーゼ遺伝子の発現量は培養の pH に依存する
田中秀典、長澤真由子、六車三治男、太田一良 (宮崎大・農・応生科)
- P-52 糸状菌 *Trichoderma reesei* PC-3-7 由来 *exo- β -D-glucosaminidase* 遺伝子の cDNA の Cloning および Northern 分析
池 正和、勇 光治、小笠原涉、岡田宏文、森川 康 (長岡技大・生物)
- P-53 *Aspergillus oryzae* のグルカナーゼ遺伝子の機能解析
池田佳広、一宮維幸、北本勝ひこ、堀内裕之、太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- P-54 *Aspergillus* 属 Hap 複合体アセンブリ機構の *in vitro* 解析
中村麻里子、合田秀矢、伊東達雄、小林哲夫、加藤雅士 (名大院・生命農)
- P-55 麹菌 *A. oryzae* における2つの分泌型ホスホリパーゼ A₂ の生理機能の解析
中濱智之、Angelo Bolchi^{*}、Simone Ottonello^{*}、有岡 学、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工、^{*}Dept. of Biochem. Mol., Univ. of Parma, Italy)
- P-56 *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、五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-57 プロセッシングプロテアーゼ (KexB) の欠損が麹菌細胞壁合成に及ぼす影響
椎名松子、水谷治、山形洋平、阿部敬悦、中島佑 (東北大・応生科)
- P-58 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* の菌体内 β -グルコシダーゼの機能解析
塚田剛土、吉田 誠、五十嵐圭日子、鮫島正浩 (東大院・農生科)

- P-59 アカパンカビにおける DNA 修復遺伝子 *mus-44* の機能解析
都甲 建, 仁木孝治, 一石昭彦 (東洋大・生命科学)
- P-60 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞壁構築シグナル伝達に関する転写制御因子遺伝子 *rlmA* の機能解析
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)
- P-61 担子菌シイタケから単離した分裂酵母 *cdc5+* 相同遺伝子とその発現産物の解析
宮崎安将 (森林総研), 城島 透 (理研), 小野 剛, 山崎 丘, 宍戸和夫 (東工大院)
- P-62 芳香族繰返し型タイプ I ポリケタイド合成酵素の発現と機能解析
森口智美, 藤井 勲, 海老塚豊 (東大院薬)
- P-63 イネいもち病菌における *StuA* ホモログ(*MstuA*)欠損株の形質
深田純司, 林長生, 西村麻里江 (生物研)
- P-64 *Aspergillus oryzae* チロシナーゼのオリゴマー化とシステイン残基の関与
難波剛, 多田羅洋太, 一島英治 (創大院・工)
- P-65 リンゴ斑点落葉病菌の AM 毒素生合成遺伝子クラスターの同定
播本佳明, 八田理恵子, 児玉基一朗¹, 山本幹博², 尾谷 浩¹, 柘植尚志 (名大院生農・¹鳥取大農・²岡山大農)
- P-66 イチゴ黒斑病菌の conditionally dispensable 染色体にコードされる遺伝子群の同定
八田理恵子, 播本佳明, 山本幹博¹, 秋光和也², 柘植尚志 (名大院生農・¹岡山大農・²香川大農)
- P-67 *Fusarium oxysporum* の分生孢子形成時における発現遺伝子群の同定
飯田祐一郎, 小原敏明, 柘植尚志 (名大院生農)
- P-68 *Gibberella fujikuroi* 子嚢胞子における形質の分離
富壱加奈, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大・農)
- P-69 *Aspergillus oryzae* の安全性に関する研究 -A. *oryzae* Group 2 株のアフラトキシン生合成遺伝子ホモログクラスターの解析-
冨永美穂子, 李 允恵, 林 梨咲, 山田 修, 坂本和俊, 秋田 修 (酒総研)
- P-70 糸状菌 *Aspergillus nidulans* のクラス III キチン合成酵素 *ChsB* の菌糸内局在化部位の解析
福田一治, 出岡顕, 竹下典男, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- P-71 醤油麹菌新規セルラーゼ遺伝子 (*celE*) のクローニングと高発現
安田 (吉野) 庄子, 北本則行 (愛知産技研・食工技セ)
- P-72 イネいもち病菌由来ヒスチジンキナーゼの発現による、糸状菌特異的農業感受性の出芽酵母の作成
本山高幸¹, 藤村真², 工藤俊章¹ (¹理研・中央研, ²東洋大・生命科学)
- P-73 *Aspergillus tamarii* の R E M I 法による形質転換
木村多江¹, 楠本憲一¹, 北本則行², 鈴木聡¹, 柏木豊¹ (¹独法・食総研, ²愛知産技研・食品工技)
- P-74 *Aspergillus oryzae* 由来タカアミラーゼ及びグルコアミラーゼにおける *Bacillus* sp.no.195 株由来デンプン結合領域の付加効果
柳谷真理, 炭谷順一, 荒井基夫, 川口剛司 (阪府大院・農生科)
- P-75 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¹, 赤尾 健¹, 山田 修¹, 岩下和裕¹, 坂本和俊¹, 阿部敬悦², 五味勝也², 秋田 修¹ (¹酒総研, ²東北大院農)
- P-76 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来糖加水分解酵素ファミリー74 遺伝子のクローニング
李 載源, 加治佐平, 吉田 誠, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)

- P-77 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* IAM2640 株 カルボキシペプチダーゼ遺伝子の解析
龍宏一, 竹内道雄 (東農工大・農・応生科)
- P-78 糸状菌ハイブリッド型 histidine kinase の機能解析
鈴木沙也香, 丸井淳一朗, 松林良博, 東信宏, 古川健太郎¹, 萩原大祐, 阿部敬悦¹, 水野猛, 加藤雅士, 小林哲夫 (名大院生命農・生物機構、¹東北大院農・応生科)
- P-79 麹菌の受容体様タンパク質コード遺伝子の解析
鈴木聡, 竹谷博子, 木村多江, 松下真由美, 楠本憲一, 柏木豊 (食総研)
- P-80 麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連遺伝子 *Aoatg8* の機能解析
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)
- P-81 adenylyl cyclase 突然変異を抑圧する突然変異体
工藤愛子, 村山肇子 (関東学院大・工・物質生命科)
- P-82 担子菌エノキタケの子実体形成期に発現する遺伝子群に関する研究
山田雅人¹, 柴田 航¹, 櫻庭 壮¹, 稲富 聡², 岡崎光雄¹, 下坂 誠¹ (¹信州大・織・応生科、²ホクトきのこ総研)
- P-83 麹菌 *Aspergillus oryzae* の GPI アンカー型アスパラギン酸プロテアーゼ (oryzapsin) の機能解析
松田吉彦, 水谷治, 山形洋平, 阿部敬悦, 中島佑 (東北大院・農・応生科)
- P-84 Analysis of the tip cell specific expression of genes in the *Aspergillus oryzae* mycelium
Kumiko Masai¹, Jun-ichi Maruyama¹, Harushi Nakajima¹, Kazutoshi Sakamoto², Osamu Akita², Katsuhiko Kitamoto¹ (¹ Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, ² NRIB)
- P-85 *Aspergillus niger* を用いた植物起源遺伝子発現における DNA 全合成の効果
 幸田明生, 坪井宏和, 坊垣隆之, 峰時俊貴, 尾関健二, 広常正人 (大関総研)
- P-86 遺伝子組換え麹菌のモデル土壌環境における生存性
楠本憲一¹, 古川育代¹, 北本則行², 鈴木聡¹, 柏木豊¹ (¹食総研、²愛知産技研・食工技セ)

Special Lecture

Understanding secondary metabolism and growth in filamentous fungi – what can we learn from genomics?

Geoffrey Turner
Department of Molecular Biology and Biotechnology
University of Sheffield
Sheffield S10 2TN
UK

Special characteristics of filamentous fungi such as *Aspergillus* species include their capacity to make a wide range of small molecules such as antibiotics and toxins, and their ability to maintain polar growth in more than one axis. This polar growth is also associated with secretion of many different proteins to the cell exterior. These properties are reflected in the more complex genomes that are now revealed in the genome sequences of *Aspergillus* species, compared to that of *S. cerevisiae*.

Since the domain architecture of several types of multienzyme complex such as non-ribosomal peptide synthetases and polyketide synthetases is known, and pathway genes tend to be clustered, bioinformatic analysis of the completed genome can help us identify gene clusters which encode the complex metabolic pathways required for secondary metabolism. However, in most cases, it is not possible from bioinformatics alone to predict the exact nature of the pathway products, or know if the genes are expressed, and functional analysis is still essential. There is extensive literature on secondary metabolites identified in *A. fumigatus* cultures, and we can begin to make some predictions about which genes/gene clusters might be involved. The availability of genome sequences from 3 *Aspergillus* species may also help us to understand more about the evolution of secondary metabolism genes.

S. cerevisiae is the best paradigm for polar growth and secretion in eukaryotic cells, and we can readily find putative homologues of many of relevant yeast genes which appear to be conserved in filamentous fungi. However, there are some key differences, notably the limited polar growth, budding, and cytokinesis of yeast, compared to the sustained polar growth of filamentous fungi. We require more rapid approaches for testing gene function, and some possible approaches will be discussed. Though it will be possible to test the function of conserved genes, it is clear that certain polar growth genes found in yeast are absent from filamentous fungi, and some of the polar growth genes isolated by complementation of fungal mutants are absent from yeast, so that we cannot solve the mechanisms of hyphal growth by yeast/*Aspergillus* comparisons alone.

Symposium

S-1

糸状菌の嫌氣的なエネルギー獲得機構の多様性

高谷 直樹 (筑波大・生命環境科学研究科)

従来、ほとんどの糸状菌は好氣的に生育すると考えられていたが、1991年に祥雲博士ら(東京大学)によって、糸状菌が、あたかも通性嫌氣性細菌が行うように、低酸素条件下で硝酸塩を還元し亜酸化窒素を生成し、その反応が、細菌のそれと同様に、嫌氣的なエネルギー獲得機構(硝酸呼吸)としての生理的意義をもつことが報告された。また、興味深いことに、もっと極端な嫌氣条件に曝されると糸状菌は硝酸呼吸せずアンモニア発酵し生育することも見出された。これらの発見は、糸状菌が環境中の酸素濃度の低下に適応して様々な嫌氣的なエネルギー代謝を使い分けて生き残っていることを意味する。本講演では、糸状菌の硝酸呼吸とアンモニア発酵についてのこれまでの知見をレビューするとともに、最近明らかとしたこれらの分子機構やこれらとは異なる新規な嫌氣代謝系について報告したい。

1. 糸状菌の硝酸呼吸: 糸状菌 *Fusarium oxysporum* は、通性嫌氣性脱窒細菌と同様に、硝酸を順次還元し亜酸化窒素を生成し硝酸呼吸する(図1)。これらの反応を触媒する酵素のうち、硝酸還元酵素(Nar)と亜硝酸還元酵素はミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系と共役した嫌氣呼吸を担う。また、NO還元酵素(Nor)には翻訳開始点が異なる2種のアイソザイムがあり、それぞれミトコンドリアおよび細胞質に局在化し効率的にNOを還元する。Nor遺伝子の遺伝子破壊株の解析から、Norが脱窒に必須であることが示された。Norの発現は低酸素条件下で硝酸塩の存在下に誘導されるが、これは、P450nor遺伝子プロモーター上のNirAおよびRox1結合コンセンサス配列通して転写レベルで制御されることを示した。一方、長い間、Narの詳細については不明であったが、最近、硝酸同化に必須なniaD遺伝子が硝酸呼吸を担うNarと深くかかわることが見出され、現在、詳細な解析を進めている。

図1 脱窒細菌と糸状菌脱窒菌の脱窒系の比較
Nar、硝酸塩還元酵素; Nir、亜硝酸塩還元酵素; Nor、NO還元酵素; N₂Or、亜酸化窒素還元酵素; NOD、flavo-hemoglobin (NOジオキシゲナーゼ)

2. 糸状菌のNO防御機構: 通常脱窒細菌のNorとは異なり、糸状菌のNorは可溶性のシトクロムP450norであり呼吸鎖とはリンクせずNADHにより直接還元されることから、その生理的な役割については非常に興味深い。一方、*F. oxysporum*が硝酸呼吸に際して、P450norとともにNOジオキシゲナーゼ(flavo-hemoglobin (fhb))を誘導合成することを発見した。fhbおよびP450nor遺伝子の変異株を作製し詳細に解析したところ、fhbとP450norは硝酸呼吸に伴って生じる細胞傷害性ラジカルであるNOを協調して解毒することを見出した(図1)。通常好氣性生物は酸素呼吸の副産物として生じる活性酸素種の消去系を持つが、糸状菌の脱窒(硝酸呼吸)においても副産物として生じる活性ラジカル種を消去する系を持つという共通性は、呼吸系の進化を考える上でも興味深い。fhbは広範囲の微生物に分布するのに対して、P450norは糸状菌のみに見出される。おそらく、糸状菌は進化の過程でP450norを獲得することによって、硝酸呼吸条件に適応したと考えている。

3. アンモニア発酵: *F. oxysporum*の嫌氣条件下での硝酸のアンモニアへの還元反応は、細胞質でのNADHの酸化とATP生成とを伴うことから、発酵(アンモニア発酵)としての生理的意義をもつと考えら

れている。真菌が、絶対嫌気性細菌の *Clostridium* だけで報告されていたアンモニア発酵能を持つことは驚くべき発見である。*Aspergillus nidulans* をモデルとして各種変異株を解析した結果、図2のような代謝遺伝子が同定された。興味深いことに、この代謝系の鍵酵素である acetate kinase (ACK) は、多くの生物がもつ acetyl CoA synthetase (ACS) の逆反応による。さらに、ACK と ACS の反応の方向性はリシン残基のアセチル化によって酵素レベルで制御されていた。即ち、嫌気的なアンモニア発酵条件下では ACS はアセチル化され通常とは反対方向の ACK 活性を触媒する酵素となるのである。これは、翻訳後修飾により、可逆酵素の反応の方向性が制御される例としても興味深い。

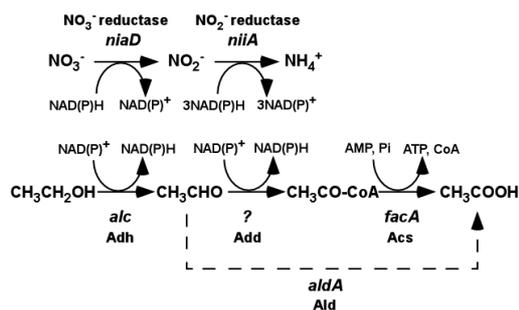


図2 *A. nidulans* のアンモニア発酵に関する遺伝子

4. 硫黄呼吸：最近、糸状菌が嫌気条件下で元素状硫黄 (S^0) を還元し硫化水素を生成することを見出した。*F. oxysporum* の無細胞抽出液のミトコンドリア画分内に NADH 依存的に S^0 を H_2S に還元する sulfur reductase (SR) 活性が再構成できたこと、この反応がミトコンドリア電子伝達系と共役した ATP 生成を伴うことから、糸状菌が異化的に S^0 を還元 (硫黄呼吸) する可能性が考えられた。

近年、糸状菌と同様に好気性微生物と考えられてきた放線菌や枯草菌が硝酸呼吸をおこなうことも報告された。好気性微生物の低酸素条件下での嫌気代謝系には、まだまだ新たな発見の余地が残されているかもしれない。また、嫌気的な硝酸や硫黄の還元能は広く糸状菌に分布する。これは、微生物が主役である地球規模での窒素・硫黄サイクルについての再考を促すものとしても興味深いものかもしれない。

Anaerobic energy metabolisms of filamentous fungi – More anoxic mitochondria?

Naoki Takaya

Graduate School of Life and Environmental Science, University of Tsukuba

S-2

転写因子を介しない新規な糸状菌の遺伝子発現制御機構

窪寺隆文 (白鶴酒造)

はじめに

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は我が国の伝統的な醸造産業である清酒、醤油、味噌などの醸造において無くてはならない重要な微生物である。さらに近年においては多様な有用蛋白質を大量に分泌生産するという特性と世界的に認められた安全性から、工業的な物質生産にも応用されており、まさに”国菌”と称されるのにふさわしい。先人達は長年の試行錯誤から固体培養、いわゆる「麹造り」により酵素の生産量が飛躍的に増えることを経験的に知っていた。近年の麹菌における分子生物学的手法の進歩により、現在この伝統的な麹造りや、麹菌の遺伝子発現制御に関する分子レベルでの解析が進められている。

これまで真核微生物では、主に trans 因子である蛋白質とプロモーター上の cis 因子との相互作用による転写段階の発現制御機構の解析が進められてきた。しかし遺伝子の発現は転写の段階ばかりではなく、翻訳過程や mRNA のプロセッシングや安定性によっても制御されており、遺伝子発現の転写後調節 (post-transcriptional control) と総称されている。これらの調節については特に原核微生物において研究が進められており、蛋白質因子と mRNA との相互作用による制御機構の他、mRNA の二次構造の変化や特定の領域を相補する si (small interference) RNA による転写後調節がよく知られている。

最近、原核微生物における新たな制御因子の一つとしてリボスイッチ (riboswitch)^{1, 2)} が報告されたが、演者らは真核微生物である *A. oryzae* のチアミン合成遺伝子 (*thiA*³⁾, *nmtA*⁴⁾) においてもこの riboswitch が関与する発現制御機構の存在を見出した。これにより真核生物においても riboswitch が発現制御因子として機能していることが初めて確認されたので、以下にその詳細について示す。

麹菌 (*A. oryzae*) のチアミン合成遺伝子 (*thiA*) の発現特性と遺伝子の構造

当初、清酒醸造において主に発酵中のチアミン欠乏によって発生するオフフレーバーである木香様臭 (アセトアルデヒド) やつわり香 (ダイアセチル) の発生防止を目的として、麹菌 (*A. oryzae*) のピリチアミン (チアミンのアナログ) 耐性変異株からチアミン高生産株の取得を試みた。その際、耐性変異株よりクローニングした *A. oryzae* ピリチアミン耐性遺伝子 (*ptrA*) は、本来 *ptrA* の野生型アレル (*thiA*) が有しているチアミンによる発現抑制を失っていた。*A. oryzae* の *thiA* は *S. cerevisiae* の *THI4* ファミリーに属するチアミン合成遺伝子の一つであり、一つの構造遺伝子と三つのイントロン (構造遺伝子内に1つ、5'非翻訳領域 (5'-UTR) 内に2つ) から構成される (図1)。また *ptrA* は *thiA* の 5'-UTR が一塩基置換 (A -68 G) した変異遺伝子であり、興味深いことにこの変異点はいくつかのチアミン合成関連遺伝子の 5'-UTR で高度に保存された領域 (region A, region B) に含まれていた。これらの領域は 5'-UTR の 0.3-kb という非常に長いイントロン2に含まれるという特徴的な配置を示していたことから、*thiA* の発現制御への関与が強く示唆された。

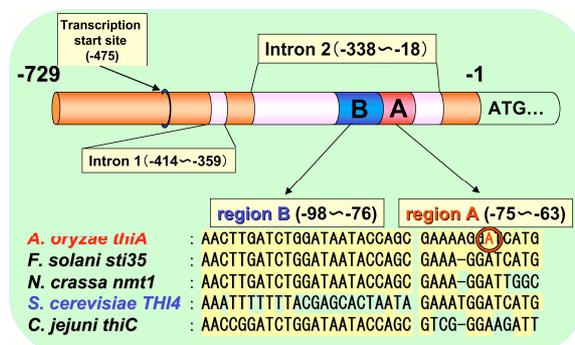


図1 *thiA* 5'-UTR の構造

○ *A. oryzae ptrA* の変異点

チアミンにより調節される選択的スプライシングによる発現制御機構

GUS レポーター遺伝子 (*uidA*) を利用した、高度保存領域 region A と B の機能解析をおこなった結果、*thiA* の 5'-UTR から region A または B を欠失させたプロモーターではチアミンによる発現制御が完全に失われた。したがって region A および B はチアミンによる発現抑制に関与する領域であることが確認された。一方 *uidA* プロローブを用いたノザン解析の結果、*thiA* の 5'-UTR 全長を有するプロモーターにおいてのみ、環境中のチアミンの有無によって転写産物の大きさが異なっていた。これはチアミン存在下では region A と B を含むイントロン2のスプライシングが阻害され、成熟 mRNA ではなくイントロン2を含んだ未成熟な mRNA が転写されるためであることが確認された。

次にスプライシングの阻害が発現制御におよぼす影響を確認するため、スプライシングができないようにイント

ロン2の保存領域に変異を導入した、またはあらかじめイントロン2を欠失した変異遺伝子を作製し、GUS レポーター遺伝子を利用した解析を行った。イントロン2がスプライシングできない変異遺伝子では未成熟 mRNA のみが転写され、転写および発現レベルともに著しく低下し、チアミンによる発現制御も失われた。一方あらかじめイントロン2を欠失した変異遺伝子では成熟 mRNA のみが転写され、チアミンの有無に関わらず転写量および発現量ともにチアミン非存在下における *thiA* 5'-UTR 全長を有するプロモーターの場合と同程度であった。これらはスプライシングがチアミンによる発現制御に必須であることを示していた。さらに *thiA* の 5'-UTR 全長を有するプロモーターによる転写物の詳細を RT-PCR により確認した結果、チアミン存在下における転写物の多くはイントロン2全長を含んだ未成熟 mRNA ではなく、イントロン2の 5'スプライシング位置が下流へ 85 b シフトした転写物であることが確認された。したがってチアミンによってイントロン2の正常なスプライシングが阻害され、5'スプライシング位置が下流へシフトする調節を受けることが示された。

糸状菌の RNA 制御因子 (riboswitch)

上記のチアミンによる発現制御に必須な region A と B はその後、原核微生物において発見されたチアミンニリン酸 (TPP) と特異的に結合する RNA 制御因子 (riboswitch)²⁾と同様の構造に含まれていることを確認した。Riboswitch とは mRNA 上の制御因子で、転写後に特殊な二次構造を形成 (図2) することによって蛋白質を介さず直接標的となる小分子を特異的に認識して結合し、遺伝子発現を転写または翻訳段階で調節する機能を有している。さらに網羅的な遺伝子配列情報の検索により、麹菌を含む真核生物である糸状菌や植物のチアミン合成遺伝子においても TPP 結合型 riboswitch 様配列の存在が報告された⁵⁾。

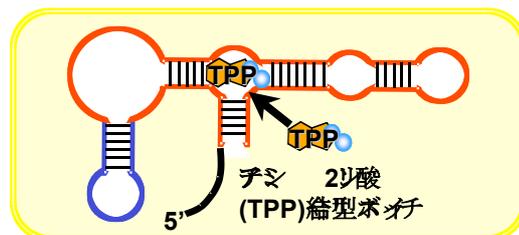


図2 TPP 結合型 riboswitch の二次構造⁵⁾

thiA 5'-UTR の配列を参考にした相同配列の検索結果から、新たにいくつかの糸状菌から riboswitch 様配列が見出された。これらの配列は全てイントロン内に存在し、推定 ORF 領域のアミノ酸配列から、殆どがチアミン合成遺伝子のホモログに分類された。特に *Neurospora crassa nmt-1* および *A. oryzae nmtA* はチアミンによる制御を受けることが既に確認されており、TPP 結合型 riboswitch による制御機構が糸状菌において広汎に存在することを強く示唆している。

まとめ

現在予想される riboswitch による *thiA* の発現制御モデル図を示した (図3)。RNA の転写が始まると、イントロン内に riboswitch 二次構造が形成される。チアミン非存在下ではイントロンがスプライシングされて蛋白質の発現が誘導されるが、チアミン存在下では、riboswitch に TPP が結合し、正常なスプライシングが阻害されるとともに、転写効率も著しく減少する。わずかながら転写された mRNA にはイントロン2の一部または全長が残っており、正常な蛋白質への翻訳が妨げられ、発現が抑制される。

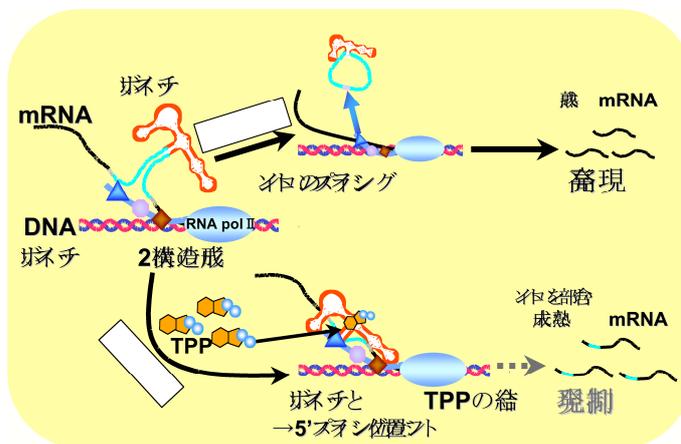


図3 *A. oryzae thiA* の発現制御モデル

- 1) Winkler, W. *et al.*: *Nature*, 419, 952 (2002)
- 2) Mironov, A.S. *et al.*: *Cell* 111, 747 (2002)
- 3) Kubodera, T. *et al.*: *FEBS Lett.*, 555, 516 (2003).
- 4) 清水: 日本農芸化学大会講演要旨集, p.155 (2004).
- 5) Sudarsan, N. *et al.*: *RNA*, 9, 644 (2003).

A novel gene expression regulatory mechanism of filamentous fungi without the aid of transcription factor.

Kubodera Takafumi

HAKUTSURU SAKE BREWING CO., LTD. Research & Development DEPT.

S-3

糸状菌の二次代謝産物生産に關与する転写因子の活性制御

清水公德（千葉大学 真菌医学研究センター）

糸状菌類は様々な二次代謝産物と呼ばれる天然化合物を生産する。これらの物質は医学的、産業的あるいは農業的に重要なものをしばしば含む。例えば、*Aspergillus* 属菌や *Penicillium* 属菌が生産するペニシリンは抗生物質として、また、*Aspergillus terreus* によって生産されるロバスタチンはコレステロール合成阻害剤として利用されている。これらとは逆に、好ましくない物質、例えば *Aspergillus* 属菌の作るアフラトキシンや、多くの植物病原糸状菌の生産する宿主特異的毒素も二次代謝産物の一例である。このような特性から、二次代謝産物生産の機構を理解することは人間生活にとって重要である。

Aspergillus nidulans はアフラトキシンの前駆体であるステリグマトシスチンを生産する。アフラトキシン、ステリグマトシスチンいずれもポリケチドを基本骨格とする二次代謝産物である。*A. nidulans* は糸状菌の遺伝学的研究の材料として長く用いられ、近年の分子生物学的ツールも非常に充実したモデル微生物である。ステリグマトシスチンの生産に關与する遺伝子は、26 遺伝子を含む ST クラスタと呼ばれる約 50 kb の領域に座乗している。これらの遺伝子はステリグマトシスチンの合成経路の各反応ステップに關与する酵素をコードすると考えられており、複数の遺伝子と反応ステップの關係が解明されているが、全てが明らかになったわけではない。また、クラスタ内には AfIR と名付けられた転写因子遺伝子も含まれている。AfIR は糸状菌によく見られる Zn(II)₂Cys₆ 型転写因子タンパク質であり、クラスタ内の遺伝子のプロモーター領域に結合し、それらの転写を促進すると考えられている。AfIR を欠損した株では、クラスタ内の遺伝子発現が行われず、ステリグマトシスチンの生産も見られない。現在多くの糸状菌のポリケチド系二次代謝産物に關する遺伝子クラスタが見つかっており、このような構造は糸状菌に普遍的なものであることが類推される。

さらに、*A. nidulans* では、ステリグマトシスチンの生産に關するシグナル伝達系との關連が明らかとなっている。その中心は FadA という三量体 G タンパク質 α サブユニットであり、その活性状態により、ステリグマトシスチン生産を制御する。FadA が活性化状態にあるとき、下流の cAMP 依存タンパク質リン酸化酵素 PkaA が活性化され、AfIR の転写が抑制されるとともにステリグマトシスチン生産は停止する。また、FadA の活性は RGS ドメインタンパク質 F1bA により制御され、F1bA 遺伝子の欠損した株では FadA が常に活性化状態におかれるため、結果として AfIR の転写、ステリグマトシスチンの生産は検出されない。FadA およびそのホモログに關する研究で、他の糸状菌でも似たような現象は報告されており、G タンパク質系シグナル伝達系は広く糸状菌二次代謝産物を制御する機構であると考えられる。

シグナル伝達系は二次代謝産物の生産だけでなく、糸状菌の他の生命現象も幅広く制御する。例えば、分生胞子形成、菌糸伸長などである。これに対し、二次代謝産物の生産のみを制御する機構も徐々に理解されるようになってきた。*A. nidulans* のステリグマトシスチン合成に關する転写因子 AfIR は、PkaA によるリン酸化によりその活性状態が抑制される。AfIR の被リン酸化セリンを欠損させたもので

は、ステリグマトシスチンの生産量が著しく上昇し、AfIR の翻訳後修飾がその活性に大きく影響することが示唆された。また、AfIR はリン酸化により核への局在性が減少することが観察された。

A. nidulans から近年新たに見出された制御因子 LaeA は、二次代謝産物生産をグローバルに制御する。*A. nidulans* の LaeA は AfIR の発現を促進するのに必須な因子であり、LaeA 欠損株では AfIR の転写、ステリグマトシスチンの生産が抑制される。シグナル伝達系関連の遺伝子欠損株とは異なり、分生孢子形成、菌糸伸長などに変異は見られない。LaeA およびそのホモログを遺伝子破壊または過剰発現させる実験により、本遺伝子は *A. nidulans* のステリグマトシスチン、ペニシリン、分生孢子的色素、*A. terreus* のロバスタチン、*A. fumigatus* のグリオトキシシンなどの生産をそれぞれ制御することが明らかとなった。

多くのシグナル伝達系分子が AfIR の発現に関与していること、AfIR は転写時、翻訳後の複数の段階で制御されていること、グローバル制御因子の存在などから、糸状菌の二次代謝産物の生産は非常に綿密な制御機構により統制されていることが推測される。

Regulation of transcription factor activity involved in secondary metabolisms of filamentous fungi.

Kiminori Shimizu

Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University

S-4

糸状菌の効率的遺伝子ターゲティングのための宿主開発

井上 弘一 (埼玉大学)

アカパンカビの研究材料としての基礎は1930年代から1940年代にかけて B.O.Dodge や C.C.Lindgren によって築かれた。以後、この材料の特性から遺伝学者の注目を浴び、一方、G.W.Beadle と E.L.Tatum の一遺伝子一酵素説の実験に使用されたことでも明らかのように、生化学的な研究材料としても注目された。そのため、遺伝生化学という分野が研究の最先端分野であった。その後、ファージやバクテリアの研究が盛んになり、さらに、1960年後半から1970年代には酵母が真核微生物研究の中心となり、アカパンカビは1960年頃のような華やかな舞台で語られることは少なくなった。しかしながら、アカパンカビを材料として仕事を続けていた研究者のグループは、Neurospora Information Conference を中心に引き続き研究情報の交換を続けてきた。1980年代に分子生物学が盛んになり、遺伝子のクローニングやシーケンシングが行われるようになった。そこで遺伝学的なバックグラウンドをもち、遺伝子組換え等の技術を使って研究ができる材料として、あらためてアカパンカビが見直されるようになった。アカパンカビは、生体内リズムや DNA メチル化など、ある種の研究テーマにおいては優れたモデル生物となることが示された。2000年にはアカパンカビの研究者たちの要望により糸状菌では最初にゲノムの解析が行われ、それらは公開され、アカパンカビ研究者だけではなく多くの糸状菌研究者の情報として役立っていることは、ご存じの通りである。2003年にアカパンカビゲノム解析の情報が公開され、現在、それをもとにしたポストゲノムの研究が進められている。ポストゲノムの研究手法は、例えばマイクロアレイであったりプロテオミクスであったり、コンピューターによるインフォーマティクスであったりするが、やはり中心になるのは遺伝子破壊による機能解析であろうと考えられる。最も理想的な破壊法はホモログスな遺伝子を用いての gene replacement であることは、一般に認められている所ですが、多くの生物では、ターゲット効率が悪く、そのためターゲットベクターに種々の工夫を加えられているが、それでも効率は低く、多くの労力と時間を必要としている。アカパンカビも例外でなく、通常のトランスフォーメーションではターゲット効率はたかだか数%にすぎない。そこでアカパンカビでは RIP(repeat induced point mutations)現象を用いて目的の遺伝子の破壊を行ってきた。この方法は実に有効で、確実にねらった遺伝子に突然変異を導入できる。しかし RIP は減数分裂前でおきかないので交雑して子嚢胞子を回収するステップが必須であり、これに約1か月の時間を要するところが欠点である。

私どもの研究室では、これまでアカパンカビの DNA 修復機構と突然変異の生成機構について研究を続けてきた。特に、DNA の二本鎖切断を修復する機構である組換え修復に関わる遺伝子の働きを明らかにすることを研究の目的の一つとしてきた。組み換え修復には、相同組換え、非相同組換え、それに相同、非相同の両方において働く計3つの系があり、これらが DNA の二本鎖切断修復するために共に働いている。遺伝子ターゲットはこれら3つの修復系のうち、相同組換えによって遺伝子破壊を行うもので、非相同組換え機構が働くと DNA はエクソピックにゲノムに挿入されるためターゲットを起こすことができない。私どもは、極めてシンプルに考えた。「非相同組換え機構を働かないようにすれば、相同組換え機構が優先的に働き、ターゲット効率が上昇するだろう」と。本シンポジウムではこの考えにもとづいた実験結果について紹介する。

私どもは、アカパンカビは有用カビでもなく、また病原カビでもないが、糸状菌のすぐれたモデル生物

であると考えている。基本的な遺伝学、分子生物学、細胞学などの研究をこのカビでおしすすめることで、糸状菌における新たな普遍的な発見ができると期待している。

Gene replacement in Neurospora

Hirokazu Inoue (Saitama University)

Oral Session

O-1

植物病原糸状菌 *Magnaporthe oryzae* における RNA サイレンシング経路には二つの Dicer 様タンパク質のうち一つが主に関与する

角谷直樹、中屋敷均、土佐幸雄、眞山滋志（神戸大・自然科学）

RNA silencing において Dicer は dsRNA を siRNA と呼ばれる 21~25 nt の短い RNA に分解する。真核生物の大部分は Dicer 様タンパク質を保持していることが明らかとなっているが、生物によって 1~4 つのホモログがゲノム中にあり、複数のホモログを持つ生物ではどの遺伝子が関わっているのか興味深い。

我々はこれまで植物病原糸状菌 *Magnaporthe oryzae* に RNA silencing 機構が存在することを示してきた¹⁾。本菌はゲノム解析から Dicer 様タンパク質を 2 つ持つことが明らかとなり、それらを *Magnaporthe Dicer-like* (MDL)-1、-2 と名付けた。これらの破壊株 (*mdl-1*, *mdl-2*) を作成し RNA silencing に対する影響を調査した結果、野生型と二つの破壊株のうち *mdl-2* のみがヘアピン型の RNA によって誘導されるサイレンシングが観察されなくなった。さらに *mdl-2* では二本鎖 RNA の蓄積が見られるのにもかかわらず siRNAs が全く検出されなくなった。このことは MDL-2 が siRNAs を生成する主要因子であり、RNA silencing 経路で重要な役割を果たしていることを示唆している²⁾。

1) Kadotani, N. *et al.* (2003) *Mol Plant Microbe Interact.* **16**, 769-776

2) Kadotani, N. *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* (in press)

One of the two Dicer-like proteins in the filamentous fungi *Magnaporthe oryzae* genome is responsible for hairpin RNA-triggered RNA silencing and related siRNA accumulation

Naoki Kadotani, Hitoshi Nakayashiki, Yukio Tosa, Shigeyuki Mayama

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

O-2

植物病原糸状菌 *Alternaria alternata* において G 蛋白質 α サブユニット遺伝子 (*AGAI*) は形態形成および病原性に関与する

山岸大輔、尾谷 浩、児玉基一郎（鳥取大・農）

宿主特異的毒素を生産する *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ヘテロ三量体 G タンパク質 α 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。リンゴ斑点落葉病菌 (*A. alternata* apple pathotype, 落葉病菌) より $G\alpha$ 遺伝子 *AGAI* をクローニングし、*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を明らかにした。さらに、遺伝子ターゲティングにより *AGAI* 破壊株を作出し、その性状を解析した結果、破壊株ではコロニー形態、胞子形成能および形態が野生株と異なっていた。また、感染器官形成に関して、野生株では胞子周縁からランダムに形成される発芽管が、胞子両端から 1~2 本形成されたのみであった。さらに、破壊株は野生株と同等の宿主特異的 AM 毒素生産を示したが、胞子接種の結果、病原性の低下が認められた。以上の結果より、*AGAI* は本菌の形態形成過程に関与し、病原性にも影響を及ぼすことが明らかとなった。次に、*AGAI* によって制御されるシグナル伝達系路を明らかにするために、アデニル酸シクラーゼ (AC) との関連を検討した。まず、胞子発芽過程における細胞内 cAMP 濃度を定量した結果、破壊株では細胞内 cAMP 濃度が上昇しており、本遺伝子はヒトにおける $G\alpha_i$ と同様に cAMP 合成をネガティブに制御している可能性が示唆された。現在、落葉病菌 AC のクローニングを行い、遺伝子ターゲティングを進めている。

The *Alternaria alternata* *AGAI* gene encodes a G protein α subunit that is involved in growth, development and virulence

Daisuke Yamagishi, Hiroshi Otani and Motoichiro Kodama (Fac. Agric., Tottori Univ.)

O-3

分裂酵母 dikaryon の分裂に働く因子

岡崎孝映, 丹羽修身 (かずさ DNA 研究所)

糸状菌 dikaryon の分裂機構を解明するためのモデル系として、我々は分裂酵母の dikaryon の解析を進めてきている。今回は dikaryon の分裂に働く以下の因子を見いだしたので報告する。

- 1) キノコにおいても黒穂菌などにおいても dikaryon の 2 核は近接して存在することが観察されており、そのことが dikaryon を維持する分裂に必要であろうと考えられている。微小管の関与が示唆されているがメカニズムは不明である。分裂酵母の dikaryon においても 2 核は近接して存在する。分裂直後に離れていた 2 核は、Spindle Pole Body (SPB, 中心体) を牽引の支点の一つとして徐々に近づく。近接した 2 核の SPB も近接している場合が多い。SPB は細胞質微小管に接しており、近接する SPB は同一の微小管束で繋がれている。微小管マイナス端指向性キネシン Klp2 の遺伝子を破壊すると 2 核は離れて存在した。その結果、細胞質分裂が離れた 2 ヶ所で起こる為に monokaryon を生じ、dikaryon としては増殖できなくなった。
- 2) 2 つの核のそれぞれの娘核を娘細胞に正しく伝えるためには、分裂に際して娘核の片方同士を入れ替えずなくてはならない。また dikaryon を維持するためには核の融合も完全に阻止しなくてはならない。我々は細胞質分裂制御系である Septation Initiation Network (SIN) の活性が不十分だと、娘核の入れ替わりや、核融合の阻止に欠損が見られることを観察した。なぜ SIN が細胞質分裂ではなく dikaryon の核分裂の制御に働くのかメカニズムは不明で、今後の課題である。

Factors of the fission yeast involved in division as a dikaryon.

Koei Okazaki, Osami Niwa

(Kazusa DNA Res. Inst.)

O-4

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) における Codon usage 最適化による異種タンパク質生産の効率化

徳岡昌文, 高木忍¹ 小埜和久² 五味勝也 (東北大院・生物産業創生、¹ノボザイムスジャパン、²広島大院先端物質・分子生命)

我々は麹菌を宿主としてダニアレルギーの主要抗原の一つと考えられている Derf7 の分泌生産に成功したが、高発現を試みたにもかかわらず分泌量は非常に少なく、転写以降の過程に障害があると考えられた。そこでコドン最適化による異種タンパク質生産効率の改善について検討した。〈結果〉全合成したコドン最適化 derf7 配列 (OD) と Native な derf7 配列 (ND) を高発現ベクターに挿入し、1 コピー導入された形質転換体について比較を行った。ND では Derf7 の分泌及び mRNA はほとんど検出できなかったが、OD では分泌量及び mRNA 量ともに著しい増加が認められた。キャリアタンパク質との融合遺伝子による発現においても分泌量は改善され、多コピー化した株では ND を 1 コピーもつ株の 100 倍以上の生産量が認められた。以上より糸状菌でもコドンの最適化が異種タンパク質生産効率の改善に非常に効果的であることが示された。

Codon optimization improves expression of recombinant mite allergen, Der f7, in *Aspergillus oryzae*.

Masafumi Tokuoka, Shinobu Takagi¹, Kazuhisa Ono², Katuya Gomi

(Dep. Biosci. Biotech. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., ¹Univ. of Tohoku, Novozymes Japan, ²Dep. of Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. of Mat., Hiroshima Univ.)

O-5

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の浸透圧応答 MAPK 経路の解析

古川健太郎、星由紀子、前田達哉*、阿部敬悦、中島佑（東北大院農・応生科、*東大・分生研）

糸状菌 *A. nidulans* は、酵母の HOG 経路相同遺伝子をすべて有することがゲノム解析より明らかとなっている。ヒスチジンキナーゼ TcsB、リン酸基伸介因子 YpdA、レスポンスレギュレーター SskA は、それぞれ酵母の *sln1*、*ypd1*、*ssk1* の欠損を抑制したことから、これらは *A. nidulans* 内において Sln1p-Ypd1p-Ssk1p と類似の機構で働いていることが示唆された。しかしながら、*sskA* 遺伝子を欠損しただけで、HogA MAPK は浸透圧刺激で活性化されなかった。酵母 Pbs2p MAPKK は、Sln1p 経路 (Ssk2p/Ssk22p MAPKKs) と Sho1p 経路 (Ste11p MAPKK) の 2 経路から活性化を受けて Hog1p MAPK を活性化することから、*A. nidulans* HOG 経路 (AnHOG 経路) の MAPKK の活性化機構が酵母の Pbs2p の場合と異なると予想した。本研究では、AnHOG 経路の活性化機構を調べるため、Pbs2p オルソログをコードする *pbsB* 遺伝子について解析を行った。PbsB は酵母 *pbs2* 欠損株の高浸透圧感受性を抑制したが、Sln1p 経路 (Ssk2p/Ssk22p) 依存的であった。驚いたことに、Pbs2p の Pro-rich 配列を挿入した変異体 PbsB(Pro) は、*ssk2 ssk22 pbs2* 欠損株の高浸透圧感受性を抑制することができたことから、PbsB は Sho1p の SH3 ドメインと結合するための典型的な Pro-rich 配列を持たないことが示唆された。しかしながら、*sskA* 欠損株で PbsB(Pro) を発現させても、HogA は浸透圧刺激で活性化されなかった。一方、*A. nidulans* の ShoA (Sho1p オルソログ) は、酵母の *sho1* 欠損を抑制した。これらの結果から、ShoA は酵母内で浸透圧センサーとして働くことができるのにも関わらず、*A. nidulans* 内においては高浸透圧応答における AnHOG 経路の活性化には関与しないことが示唆された。以上の結果を踏まえ、AnHOG 経路と酵母 HOG 経路の違いについて議論したい。

Analysis of the high-osmolarity response MAPK pathway of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*

Kentaro Furukawa, Yukiko Hoshi, Tatsuya Maeda*, Keietsu Abe and Tasuku Nakajima (Tohoku Univ., Grad. Sch. Agri. Sci., *Tokyo Univ., Inst. of Mol. and Cell. Biosci.)

O-6

麴菌の *kexB* 遺伝子破壊は cell integrity signaling pathway の構成的活性化を引き起こす。

水谷治、藤岡智則、山形洋平、阿部敬悦、中島佑（東北大院農・応生科）

我々は、麴菌のサチライシン様プロセッシング酵素 KexB の菌体内での役割を解明するために、*kexB* 遺伝子破壊株を造成し、その表現型及びトランスクリプトーム解析から以下の事を明らかにしてきた。*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。トランスクリプトーム解析から、通常条件下では破壊株の遺伝子発現種、発現量とも野生株と比較して非常に多く、特に、細胞壁合成酵素遺伝子、*chsB*、*chsC*、*gelB* さらに cell integrity シグナル伝達経路の MAPK である *mpkA* などが破壊株で経時的に高発現していた。一方高浸透圧条件下で、破壊株は、遺伝子発現種、発現量が野生株と同等になることが明らかになった。以上の結果から、*kexB* 遺伝子破壊株は 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。次に、この異常が構成的活性化であることを直接的に示すために、破壊株と野生株の固相培養における MpkA の構成的リン酸化を、リン酸化抗体を用いて解析した。その結果、通常条件下において、破壊株は野生株と比較して有意に MpkA の経時的リン酸化が確認された。この結果から、麴菌の *kexB* 遺伝子破壊は cell integrity シグナル伝達経路の構成的活性化を引き起こすことが明らかになった。

Disordered cell integrity signaling caused by disruption of the *kexB* gene in *Aspergillus oryzae*.

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

O-7

糸状菌 *Aspergillus nidulans* のミオシン様ドメインを持つ二つのキチン合成酵素 (CsmA, CsmB) の機能的相関関係の解析

竹下典男、堀内裕之、太田明徳 (東大院・農生科・応生工)

キチンは糸状菌の細胞壁の主要構成成分の一つであり、その生合成は形態形成、分化に重要な役割を果たしていると予想される。*Aspergillus nidulans* の *csmA* 遺伝子は、キチン合成酵素ドメインのN末端側にミオシンと相同性を示すミオシン様ドメインを持つ構造をしたタンパク質をコードしている。これまでの解析により CsmA はミオシン様ドメインを介してアクチン細胞骨格依存的に細胞壁合成を行うことが示唆されている。一方、現在ゲノム配列が公開されている子のう菌類の糸状菌は全てミオシン様ドメインを持つキチン合成酵素をコードする遺伝子を2つ持ち、*A. nidulans* のゲノムにも *csmA* の他にもう一つの遺伝子 (*csmB*) が存在する。本研究では CsmB の機能、また CsmA と CsmB の機能的相関を解明することを目的とした。まず *csmB* 破壊株を作製し、その表現型を解析したところ、*csmA* 破壊株で見られるようなバルーン構造が観察され、また *csmB* 破壊株に特徴的な表現型も見られた。また、*csmA*, *csmB* 二重変異株では、それぞれの単独破壊株では見られないような先端生長における著しい欠損が見られた。これらのことから、CsmA と CsmB は特に先端生長において少なくとも一部重複した機能を持つことが示唆された。

Functional relationship between two chitin synthases with myosin motor-like domains in *Aspergillus nidulans*

Norio Takeshita, Hiroyuki Horiuchi, and Akinori Ohta

(Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

O-8

Putative role for protein kinase C and / or calmodulin in the regulation and assembly of the Woronin body protein, AoHex1, in *Aspergillus oryzae*

Praveen Rao JUVVADI, Jun-ichi MARUYAMA and Katsuhiko KITAMOTO

(Department of Biotechnology, University of Tokyo, Tokyo)

Woronin bodies are specialized peroxisomes known to act in response to hyphal damage by sealing the septal pores and preventing loss of cytoplasmic constituents in filamentous fungi. *Aspergillus oryzae* *Aohex1* gene (encoding the major protein of Woronin body) homologous to *Neurospora crassa hex1*, was characterized previously. Sequence analysis of AoHex1 showed a putative protein kinase C (PKC) phosphorylatable site with a highly conserved phosphorylatable “serine” residue at its C-terminal end (148-GHGSVR-153). In vitro phosphorylation assays revealed the phosphorylation of recombinant AoHex1 by PKC which was also inhibited by H-7 (an inhibitor of PKC). In addition, the treatment of *A. oryzae* cytosolic extracts with lambda-phosphatase caused the disappearance of AoHex1 multimer (~85 kDa), implicating the probability of phosphorylation as an important step for the multimerization/assembly of AoHex1. Interestingly, a calmodulin (CaM) binding domain was also predicted overlapping the putative PKC phosphorylatable site on AoHex1. In support of this observation, biotinylated-CaM overlay assay and CaM-affinity chromatography revealed the potential CaM-binding nature of AoHex1. Further studies to examine the relevance of these domains for the functioning of AoHex1, in vivo, are being conducted by expressing DsRed2-Aohex1, DsRed2-Aohex1-S151A (Ser-151 substituted with Ala) fusion constructs in the *A. oryzae hex1* disruptant strain.

O-9

麹菌 *A. oryzae* における小胞体の局在および動態解析

丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

[目的] 麹菌 *A. oryzae* はタンパク質を大量に分泌する能力を有していることから、有用タンパク質生産の宿主として用いられている。これまでに演者らは *A. oryzae* の分泌経路の動態を観察するために、EGFP を用いて分泌タンパク質、小胞体およびゴルジ体を可視化した^{1,2)}。小胞体の可視化では、小胞体のシャペロン BiP をコードする *bipA* 遺伝子に *egfp* 遺伝子を融合して発現した。蛍光顕微鏡観察の結果、網目状の蛍光がダイナミックに動いていることがわかった。今回は、小胞体の構造をより詳細に解析したので報告する。

[方法と結果] 共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて、BipA-EGFP 融合タンパク質発現株の菌糸を観察した。その結果、細胞辺縁部にはチューブ状またはドット状の構造が、細胞中心部にはこれらに加えて核膜と推定されるリング状の構造が観察され、これらの構造は互いに連絡していることが明らかになった。経時的に観察すると、いずれの構造もダイナミックに動いていた。この結果は、酵母や高等生物に見られる小胞体の動態と同様であった。BipA-EGFP 融合タンパク質の蛍光量は菌糸先端が最も強く、基部へ向かって減少していたことから、分泌極性との関連が示唆された。また、隔壁を境にして、一方のコンパートメントのみが強い蛍光を発する菌糸が多数観察され、隣接するコンパートメントが隔壁孔を通じて連絡しているものの、独立に機能していることが推測された。さらに、これらの隔壁に対して平行に局在する蛍光が観察されたが、この像を3次元構築したところ、隔壁孔を囲む像が得られた。

- 1) 丸山ら、2001 年度日本農芸化学会大会要旨集 p125
- 2) 菊池ら、2003 年度日本農芸化学会大会要旨集 p182

Microscopic analysis of endoplasmic reticulum in *Aspergillus oryzae*

Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

O-10

ヒラタケのスフィンゴミエリン特異的2成分サイトリシンの膜孔形成

富田敏夫¹, 野口桂代子², 三室仁美², 富田(菅原)典子¹, 橋本洋一²

(東北大院農・生物産業創成, 埼玉大理・分子生物)

幾つかの担子菌の子実体中には膜孔形成サイトリシンが存在し、そのサイトリシンと子実体形成の関連が示唆されている。膜孔形成サイトリシンは、タンパク質の膜組込み機構および膜孔(チャネル)超分子の分子構築を研究するために格好の材料でもある。我々はヒラタケ子実体から新規なスフィンゴミエリン特異的2成分性サイトリシン、Pleurotolysin(Ply)を精製し、その膜孔形成機構を解析した。Ply は PlyA(17kDa)および PlyB(59kDa)から成り、両成分は協調的に作用してヒト赤血球を崩壊した。Ply の溶血作用は赤血球膜のスフィンゴミエリン含量と密接に関連していた。リン脂質とコレステロールから調製した多重膜リポソームを使用して解析した結果から、PlyA がスフィンゴミエリン結合タンパク質であり、PlyA が結合したリポソームへ PlyB が結合するとリポソーム膜が透過性になり、内部蛍光マーカーが流失した。Ply 処理したヒト赤血球あるいはスフィンゴミエリン多重膜リポソームを SDS によって可溶化し、SDS-PAGE/Western blotting によって分析すると、PlyA と PlyB は約 700kDa の複合体を形成することが判明した。さらに、可溶化した膜をショ糖密度勾配遠心によって分画して電顕観察した結果、外径 15nm、内径 7nm のリング状複合体が観察された。以上の結果から、PlyA と PlyB はヒト赤血球膜およびスフィンゴミエリンリポソーム上においてリング状膜孔複合体を形成する事実が明らかになった。

参考文献: Tomita et al. J. Biol. Chem. 279, 26975-26982, 2004.

Pore formation by a novel s phingomyelin-specific two-component cytolysin from *Pleurotus ostreatus*

Toshio Tomita, Kayoko Noguchi, Hitomi Mimuro, Noriko Sugawara-Tomita, Yohichi Hashimoto

(Dpt. of Microbial Biotechnol. Graduate School of Agricultural Science, Tohoku Univ.)

O-11

シイタケ子実体における *Le.recQ* 遺伝子の局在性

勝川志穂, 宍戸和夫 (東工大・生命理工)

RecQ 型 DNA ヘリカーゼは大腸菌からヒトに至る様々な生物種より遺伝子が単離されており、主に DNA の複製や、修復における組換え関与すると考えられている。我々は担子菌シイタケ(*L. edodes*)より RecQ 型 DNA ヘリカーゼをコードする遺伝子をクローニングし、この遺伝子 (*Le.recQ* と命名) の発現産物の機能について検討するためにまず、*Saccharomyces cerevisiae* での相補実験を行った。その結果 *S. cerevisiae* の唯一の RecQ ヘリカーゼ遺伝子 *sgs1* の欠損を部分的に相補することが明らかになった。そこで今回は、*Le.recQ* のシイタケにおける機能の解明を目指し、シイタケ子実体における転写産物の局在性を調べることにした。成熟子実体を柄、傘、襞に分け、各々から調製した全 RNA 1 μ g を鋳型に *Le.recQ* 遺伝子の塩基配列を基に作成したプライマーを用いて RT-PCR を行ったところ、各部位由来の RNA より同程度量の cDNA が増幅した。しかしながらパラホルムアルデヒドで固定した子実体切片をグリーンピロニン染色し、全 RNA の分布を調べたところ、RNA は襞に非常に多く、傘の上部では少なく、顕著な偏りが観察された。襞組織は RNA 量が多いだけでなく、担子胞子形成の場であり、減数分裂に際して DNA 複製や組換えが活発に行われる。そこで襞組織に注目し、*in situ hybridization* 法を用いて、襞組織における *Le.recQ* 転写産物を直接的に検出を試みた。その結果、襞組織のなかで全 RNA の分布の偏り (子実層に特に多い) と、*Le.recQ* 転写産物の分布の偏りが必ずしも一致しないことが示唆された。現在、検出の条件等を吟味し、さらに解析を進めている。

Localization of the *recQ* transcript in the *Lentinula edodes* fruiting body.

Shiho Katsukawa, Kazuo Shishido (Dept. of Life sci., Tokyo inst. of Tech.)

O-12

シイタケ (*Lentinula edodes*) の *exo*-グルカナーゼ遺伝子 (*exg1, exg2*) の単離

坂本裕二, 入江俊一, 湊健一郎*, 川上佐知子*, 水野雅史*, 佐藤利次 (岩手生工研・* 神戸大農)

シイタケ (*Lentinula edodes*) から抽出精製されているレンチナンは、細胞壁の主要構成成分である β -1,3 グルカンであり、抗ガン剤として認可されて臨床で用いられている。レンチナンは、シイタケ保存過程で *exo*-グルカナーゼで分解されることが報告されている。そこで本研究では、シイタケから *exo*-グルカナーゼ遺伝子の単離を試みた。酵母類と糸状菌類で単離されている *exo*-グルカナーゼの保存配列をもとに縮重プライマーを作製し、*exg1* 及び *exg2* 遺伝子をそれぞれクローニングした。*exg1* は cDNA の長さが 1.2kb、ゲノム DNA の長さは 1.8kb でイントロンを 10 個含むことが明らかになった。また、推定アミノ酸配列は 420 アミノ酸で、分子量 46kDa、pI 値 4.41 と推定された。また、シイタケ *exg1* 遺伝子の推定アミノ酸配列は、*A. bisporus* の *exg1* と 67% の相同性を持ち、酵母類の *exo*-グルカナーゼで保存されている領域を持っていることが明らかになった。*exg2* の cDNA の長さは約 2.4kb、ゲノム DNA の長さは 3.9kb で、*Aspergillus* 属の *exo*-グルカナーゼと 40% 程度の相同性を示した。推定アミノ酸配列は 758 アミノ酸で、分子量 79kDa、pI 値 4.66 と推定された。また糖鎖認識部位と考えられている繰り返しモチーフが保存されていることが確認された。*exg1* 遺伝子は子実体でのみ発現し、*exg2* 遺伝子は菌糸体、子実体共に発現していた。収穫後の保存過程においては、*exg1* は発現が減少したが、*exg2* は発現が上昇した。このことから、*exg2* 遺伝子が保存過程でのレンチナン分解に関わる可能性が高いことが示唆された。

Isolation of *exo*-glucanase encoding genes (*exg1, exg2*) from *L.edodes*

Yuichi Sakamoto, Toshikazu Irie, Ken-chiro Minato*, Sachiko Kawakami*, Masashi Mizuno*, Toshitugu Sato

(Iwate Biotech. Res. Center, * Kobe Univ.)

O-13

***Polyporus brumalis* によるフタルートエステル類分解における初期脱エステル化後のリグニン分解酵素の役割**

Lee, Soo-Min, Kim, Myung-Kil, Lee, Sung-Suk, Choi, In-Gyu (KFRI, Seoul National Univ., Korea)

Currently, some of phthalate esters are known as endocrine disrupting chemicals, and it has been reported that these were degraded by some soil bacteria, and pathogenic fungi. White rot fungi have their unique extracellular enzyme system which can degrade lignocellulosic complex. *Polyporus brumalis* is one of white rot fungi, which can be resistant to high concentration of Di(ethylhexyl) phthalate (DEHP). DEHP was degraded up to 50% by *P. brumalis* within 12 day incubation. Among their degradation products, de-esterified or hydroxylated compounds were detected by GC/MS analysis, indicating that the esterase has played an important role in the initial step of phthalate esters degradation. After de-esterification, the involvement of ligninolytic enzymes, however, has not been yet fully understood. In order to confirm the degradation mechanism of phthalate esters, we have used 1,2-benzene dicarboxylic acid as model compound on *in vitro* and *in vivo* conditions. The model compound was also monitored by HPLC and GC/MS to trace the degradation mechanism by ligninolytic enzymes on *in vitro* condition. The enzyme induction effect on 1,2-benzene dicarboxylic acid degradation by *P. brumalis* was evaluated by SDS-PAGE. After purifying the enzyme, the external amino acid sequencing was performed to identify the induced enzyme.

Role of ligninolytic enzymes after initial de-esterification in the degradation of phthalates by *Polyporus brumalis*

Lee, Soo-Min, Kim, Myung-Kil, Lee, Sung-Suk, Choi, In-Gyu (KFRI, Seoul National Univ., Korea)

O-14

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が生産する多様な菌体外糖質関連酵素に対するポストゲノミックアプローチ

五十嵐 圭日子、吉田 誠、鮫島 正浩 (東大院・農生科)

木材腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* は、植物細胞壁を構成する多糖を分解する際に、多様な糖加水分解酵素 (GH) を菌体外に生産することが知られている。しかし、それらの多くに関して酵素学的キャラクターが為されておらず、遺伝子配列も決定されていない。一方、現在米国エネルギー省 (DoE) によって本菌のゲノム解析が進められており、その配列情報がインターネット上で公開されている。演者らは、本菌が持つ高い物質変換能力を *in vitro* で再現するために、本菌のゲノム情報を用いて主要な GH およびその他多糖の分解に関与する酵素の遺伝子およびタンパク質ライブラリーを構築することを目的としてきた。その結果、これまでに 10 の GH ファミリーに含まれる 19 種類の GH 遺伝子のクローニングに成功し、それらを含む 7 つの酵素に関して異種発現系による活性型タンパク質の高生産に成功した。さらに、セルロース・キシラン混合培養系や固体培養系における菌体外液のプロテオーム解析を行うとともに、単糖やオリゴ糖に対する各酵素遺伝子の発現応答を調べた。

Post-genomic approaches for various extracellular glycoside hydrolases from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*

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

O-15

糸状菌が行う異化的硫黄還元代謝

安部剛史、星野貴行、中村颯、高谷直樹（筑波大・応生化）

多くの細菌は酸素以外の無機化合物（硫酸や硝酸など）を最終電子受容体として利用する嫌気呼吸能をもつ。一方、通常真核生物は呼吸の最終電子受容体として分子状酸素のみを利用するが、近年、糸状菌が硝酸塩を利用した嫌気呼吸により生育することが明らかとなった。我々は最近、糸状菌 *Fusarium oxysporum* が培地に単体硫黄 (S^0) を添加することによって、 S^0 を硫化水素 (H_2S) に還元し、嫌氣的に生育することを示した。また、無細胞抽出液のミトコンドリア画分内に NADH 依存的に S^0 を H_2S に還元する sulfur reductase (SR) の活性が再構成でき、その活性は呼吸鎖電子伝達系の阻害剤に感受性であった。また、ミトコンドリア画分内に S^0 依存的な ATP 生成活性が見出され、脱共役剤の添加によって SR 活性とともにこの ATP 生成活性が阻害された。これらの結果から、SR 活性が呼吸鎖電子伝達系を介した ATP の生産に寄与（硫黄呼吸）すると考えられた。また、全遺伝子配列の明らかとなっている *Aspergillus nidulans* も同様に嫌氣的に H_2S を生成することが観察され、*F. oxysporum* と同様の異化的 S^0 還元が行われている可能性が考えられた。また、モリブドプテリン合成系遺伝子変異株 *cnxE16* は、 H_2S を生成しなかったことから、SR がモリブドプテリンを活性中心に持つことが推測された。

Dissimilatory sulfur reducing mechanism of fungi

Tsuyoshi Abe, Takayuki Hoshino, Akira Nakamura, Naoki Takaya

(Applied Biochemistry, Univ. of Tsukuba)

O-16

クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* 由来 alternative oxidase 遺伝子 (*aox1*) の転写解析

服部 貴澄、草井 啓、木野 邦器、桐村 光太郎 (早大・理工・応化)

【目的】クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* WU-2223L は、シアン感受性呼吸系としてのチトクロム鎖とは別に、シアン非感受性でサリチルヒドロキサム酸 (SHAM) 感受性の呼吸系を有する^{1,2)}。当該呼吸系を構成する酵素 alternative oxidase を SHAM の添加により阻害しながら培養すると、菌体量はほとんど変化せず、クエン酸生産量が著しく低下することを明らかにした²⁾。本研究では、当該酵素をコードする遺伝子 *aox1*¹⁾ を利用して、ノーザン解析により培養日数にともなう mRNA 転写量の変化および酵素活性の変化について検討した。

【方法と結果】*A. niger* WU-2223L 由来の *aox1* 遺伝子¹⁾ は染色体上に 1 コピーのみ存在し、その ORF は 1,158 bp から成り、50 bp 程度の intron により 3 つの exon に分断されていた。さらに、開始コドンの 145 bp 上流には TATA box が存在した。ノーザン解析により、クエン酸生産条件下における *aox1* の転写量を培養日数ごとに測定した。転写量は、菌体増殖期である培養 2 日目に最大値を示し、呼吸活性の変化に従いクエン酸蓄積期となる 4 日目には半減しその後はほぼ同レベルに維持された。また、duroquinol oxidase として測定した比活性の消長も同様の傾向を示した。

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

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

Transcriptional Analysis of the Alternative Oxidase Gene (*aox1*) in *Aspergillus niger*

Takasumi HATTORI, Kei KUSAI, Kuniki KINO, Kohtarō KIRIMURA

(Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Engineer., Waseda Univ.)

O-17

糸状菌転写活性化因子 AmyR の誘導的核局在化機構

牧田智裕, 加藤雅士, 小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)

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る。N 末に Zn(II)2Cys6 型の DNA 結合ドメイン (Zn)、その C 末側に酵母 Mal63p と相同性の高い MH1 から MH4 ドメインを順次有するという構造を持ち、アミラーゼの生理的誘導物質、イソマルトース依存的に核に局在化し転写誘導を引き起こす。核移行シグナル (NLSs) は Zn ドメインに存在し、AmyR の核局在化の制御には MH4 が関与する。また、MH2 は転写活性化に必須である。本報告では AmyR の誘導的核局在化における MH3 ならびに NLS の役割を検討した。

AmyR_{H476} は MH3 領域内に H476L の置換を持つ機能欠損変異体である。GFP::AmyR_{H476} を用いて局在性の解析を行ったところ、本変異体はイソマルトースに反応した核局在化を示さなかった。しかし、本変異体の MH4 を欠失すると構成的核局在化、構成的転写活性化を示したため、H476L 変異は核移行、DNA 結合、転写活性化いずれにも直接的には影響しないことが明らかとなった。従って、H476 はシグナル受容に関与するアミノ酸と考えられる。さらに、AmyR NLS の誘導的核局在化に果たす役割を明らかにするため、AmyR NLS に変異を持ち核移行できない AmyRpmw に SV40 NLS と GFP を融合したところ、融合タンパク質 NLS::GFP::AmyRpmw の核局在化はイソマルトース依存的となった。従って、AmyR NLS は核局在化を可能にするがその制御には関与しないと考えられる。一方、野性型の NLS::GFP::AmyR 並びに H476L の置換を持つ NLS::GFP::AmyR_{H476} は、構成的な核局在化を示したが、前者による転写活性化は誘導的であり、後者は転写活性化能を持たなかった。AmyR はイソマルトース存在下で、核局在化及び転写活性化を可能とする構造に変化すると考えられる。

Molecular mechanism underlying inducible nuclear localization of AmyR, a fungal transcriptional activator

Tomohiro Makita, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi

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

O-18

麹菌 *Aspergillus oryzae* nmtA 遺伝子の 5'-UTR 内イントロンに存在するリボスイッチ様配列による遺伝子発現抑制

清水広之, 窪寺隆文*, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成, *白鶴・研開)

【目的】我々は、麹菌の *thiA* 遺伝子の発現に 5'-UTR のイントロン内に存在するリボスイッチ様配列が重要な役割を果たしていることを明らかにし、真核生物で初めて転写因子の関与しない遺伝子発現制御機構の存在を示した¹⁾。今回は、*thiA* と同じようにチアミンによる発現抑制を受ける *nmtA* 遺伝子の 5'-UTR のイントロン内にも同様のリボスイッチ様配列が見出されたため、*nmtA* のチアミンによる転写抑制とリボスイッチ様配列との関連について検討した。

【方法及び結果】*nmtA* プロモーター領域 (PnmtA)、5'-UTR 及び GUS レポーター遺伝子の融合遺伝子について PnmtA の欠失変異解析を行った結果、PnmtA にはチアミンによる転写抑制に関与するシスエレメントが存在しないことを確認した。次に、*nmtA* のリボスイッチ様配列をチアミン抑制とは無関係の遺伝子プロモーターに連結して発現を調べたところ、チアミンによる転写抑制を受けたことから、*nmtA* においてもリボスイッチ様配列が発現制御に関与していることが明らかになった。

1) Kubodera et al, *FEBS Lett.*, 555, 516-520 (2003)

Thiamine-dependent gene repression regulated by the riboswitch-like domain in the 5'-UTR intron of the *Aspergillus oryzae* nmtA.

Hiroyuki Shimizu, Takafumi Kubodera*, Katsuya Gomi

(Grad. Sch. Agr. Sci., Tohoku Univ., *Research & Development Dept., Hakutsuru Sake Brewing CO., LTD.)

O-19

麹菌のアルコール代謝に関わる遺伝子の発現制御

八巻裕一, 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タンパク質生産の有望な宿主として期待されている。タンパク質生産には、高発現であることに加えて発現制御が可能なプロモーターの利用が有効であると考えられる。そこでEST解析ならびにトランスクリプトーム解析により、富栄養培地で非常に高発現するが、炭素源飢餓培養では極めて低い発現しか認められなかった麹菌のアルコール代謝系遺伝子の転写制御機構を調べると同時にコンディショナルなプロモーターとしての可能性を探る。

【方法および結果】 麹菌のゲノム解析により見出されたアルコール代謝系に関する遺伝子について、数種類の炭素源で生育させた後、ノーザン解析によりその発現を比較した。その結果、3種類のアルコール脱水素酵素遺伝子のうち、*A. nidulans* の *alcA* に相同性の高い *adhA* は、グルコース存在下で高い発現を示し、また非発酵性炭素源を用いた場合にもある程度の発現が認められ、*alcA* とは異なる発現プロファイルを示した。一方、2種類のピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子のうち、*pdhA* はグルコースを炭素源とした場合には強い発現が見られるが、酢酸ナトリウムを炭素源とした場合には発現が認められなかった。現在レポーター遺伝子として大腸菌 β - グルクロニターゼ(GUS)遺伝子を用いて *pdhA* のプロモーター解析を行っているところである。

Expression profiles of genes involved in alcohol metabolism in *Aspergillus oryzae*

Yuuichi Yamaki, Katuya Gomi

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

Poster Session

P-1

イネいもち病菌の感染過程で特異的に発現する遺伝子 *B19, B48, B59*

齋藤憲一郎, 石井ふみ, 金森正樹, 有江 力, 鎌倉高志*, 寺岡 徹 (農工大・農, *東京理科大・理工)

イネいもち病菌は付着器と呼ばれる特異的な器官を用いて植物体へ侵入する植物病原菌であり、ほぼ全ゲノム配列が決定されている。本菌の付着器形成、侵入および侵入菌糸成長を含む感染過程には、いくつかの細胞内情報伝達系と新規膜タンパク質等の関与が示唆されているが、その全容は明らかとなっていない。我々はこの時期に特異的に発現する遺伝子群を同定し、その全容を解析する目的で、付着器形成時に高発現している differential cDNA ライブラリーを既に構築し、その中から付着器形成誘導に関与する新規遺伝子 *CBPI* を単離している。今回、本ライブラリーから新たに発芽管で特異的な発現を示す *B48, B59* と、付着器形成条件時に発現する *B19* を選抜した。いずれの遺伝子も推定 ORF のコードするタンパク質はいもち病菌ゲノム解析による推定タンパク質とほぼ一致した。また各遺伝子の予想産物は複数の糸状菌推定タンパク質と相同性を示し、既知ドメイン様の配列を有していたが、全体的な相同性を示す既知タンパク質は見いだせなかった。これら新規遺伝子の機能を推察するため、それぞれの遺伝子破壊株作出を試みた。作出に成功した *B19, B48* 各遺伝子破壊株は、各種培地上での成長や分生胞子の形成頻度、分生胞子と付着器の形状等に異常を示さなかったが、付着器形成頻度およびイネへの侵入頻度と侵入菌糸進展度の低下を示した。

Novel genes *B19, B48* and *B59* specifically expressed during infection with rice blast fungus.

Ken-ichiro Saitoh, Fumi Ishii, Masaki Kanamori, Tsutomu Arie, Takashi Kamakura*, Tohru Teraoka

(Fac. of Agric., Tokyo Univ. of Agric. and Tech.,; *Fac. of Sci. and Tech., Tokyo Univ. of Sci.)

P-2

麹菌 *Aspergillus oryzae* の新規 endo- β -1,3-グルカナーゼの解析

砂川美佐緒, 佐野元昭, 高瀬久美子, 戸田智美, 新聞陽一, 町田雅之 (産総研)

【目的】糸状菌類などに含まれる β -1,3-グルカンは免疫賦活性作用をもつ抗腫瘍多糖として注目されている。しかし、ヒトにはこの β -1,3-グルカンを分解する酵素が存在しないことから消化吸収が悪く、その活性発現も低いと報告されていることから、それを効率的かつ人体に対して安全に低分子化することが必要であると考えられた。既に我々は、麹菌 *Aspergillus oryzae* から β -1,3-グルカン分解酵素である endo- β -1,3-グルカナーゼ遺伝子を取得しているが¹⁾、本研究ではこの endo- β -1,3-グルカナーゼについて詳細な解析をしたので報告する。

【方法及び結果】麹菌のゲノム解析により得られた配列情報に基づき、新規酵素 endo- β -1,3-グルカナーゼ遺伝子を単離し、その遺伝子をホモロジー検索したところ endo 型であることが推測された¹⁾。そこで本報告ではこの新規酵素を用いて、基質特異性およびラミナリンを基質として pH、温度について相対・残存活性を測定し、その特性を明らかにした。さらに、endo- β -1,3-グルカナーゼ活性を有する新規酵素を用いて、酵素反応により得られた分解産物を HPLC により検出した。その結果、PA 化ラミナリオリゴ糖を基質とした酵素分解様式により β -1,3-グルカナーゼは endo 型であることが証明された。

1) 佐野ら、生物工学会要旨、p.106 (2003).

Analysis of endo- β -1,3-glucanase from *Aspergillus oryzae*

Misao Sunagawa, Motoaki Sano, Kumiko Takase, Tomomi Toda, Yoh-ichi Shimma, Masayuki Machida (AIST)

P-3

麹菌 hydrophobin の PBSA 分解における役割

高橋徹¹, 前田浩², 米田幸世¹, 大滝真作¹, 山形洋平^{1,3}, 阿部敬悦^{1,3}, 長谷川史彦³, 町田雅之⁴, 石岡領治⁵, 五味勝也^{3,6}, 中島佑^{1,3}

(東北大院農・応生科¹, 千葉県産技研², NICHe³, 産総研⁴, 昭和高分子⁵, 東北大院農・生物産業創成⁶)

(目的) Hydrophobin (RolA) は、麹菌が生分解性プラスチックの一つである PBSA を分解する時に大量に発現するタンパク質であり、この RolA を麹菌で高発現させることにより PBSA の分解効率が上昇することが分かっている。Hydrophobin は広く糸状菌に分布しており、疎水性が高く、菌糸や分生子の細胞壁に局在しており、糸状菌の動植物への初感染に重要なタンパク質であると考えられている。このことから、RolA 高発現麹菌による PBSA 分解促進作用は、麹菌の PBSA への吸着能が増大したからではないかと考えられた。しかし、この分解促進作用は精製した RolA においても見られ、RolA は In vitro でどのような機構により PBSA の分解を促進しているかを解析した。

(方法・結果) RolA を吸着させた PBSA film と吸着させていない PBSA film を分解酵素で処理した結果、RolA を吸着させた方に分解促進作用が認められた。さらに、RolA が吸着している film での分解酵素の存在量は RolA が吸着していない film に比べ多かったことから、吸着状態の RolA は分解酵素と相互作用をし、PBSA 表面に分解酵素を濃縮する結果、分解を促進するのではないかと考えられた。

The role of the *A.oryzae* RolA in PBSA degradation

Toru Takahashi¹, Hiroshi Maeda², Sachiyo Yoneda³, Shinsaku otaki¹, Youhei Yamagata¹, Keietsu Abe¹, Fumihiko Hasegawa³, Masayuki Machida⁴, Ryouji Isioka⁵, Katsuya Gomi⁶, Tasuku Nakajima¹.

(^{1,6}Tohoku Univ., Grad.Sch.Agri.Sci., ²CITRI, ³NICHE, ⁴AIST, ⁵Showa highpolymer)

P-4

麹菌が産生する新規疎水表面吸着タンパク質 HsbA の性質決定

大滝真作¹, 前田浩³, 高橋徹¹, 山形洋平^{1,4}, 阿部敬悦^{1,4}, 長谷川史彦⁴, 町田雅之⁵, 石岡領治⁶, 五味勝也^{2,4}, 中島佑^{1,4}

(¹東北大学院農・応生化, ²東北大学院農・生物産業創成, ³千葉県産技研, ⁴Niche, ⁵産総研, ⁶昭和高分子)

【目的】 麹菌は生分解性プラスチックである Polybutylene succinate-co-adipate (PBSA) を分解資化時に 14.5 kDa の Hydrophobic surface binding protein A (HsbA) を産生する。HsbA は機能未知の新規タンパク質であり、本研究は HsbA の性質を明らかにすることを目的としている。

【方法及び結果】 HsbA は溶液中で硫酸、NaCl、MgCl₂、CaCl₂ などの塩を添加した際に PBSA に吸着した。そして吸着した HsbA は塩濃度を下げても溶出せず、Tween 80、Triton-X-100 などの非イオン性界面活性剤を添加した場合に溶出した。このことより HsbA は疎水的相互作用によって疎水表面に対して吸着していることが明らかとなった。また、HsbA と PBSA 分解酵素である cutinase を混合した場合に PBSA 分解促進効果は見られなかったが、予め塩を用いて HsbA を PBSA に対して前吸着処理すると有為な分解促進効果がみられた。以上より HsbA は塩によって溶解状態から疎水表面結合状態へと変化し、疎水表面結合状態の HsbA は cutinase による PBSA 分解の促進効果があると考えられた。

Characterization of hydrophobic surface binding protein A (HsbA) produced by *Aspergillus oryzae*

Shinsaku Otaki¹, Hiroshi Maeda², Toru Takahashi¹, Youhei Yamagata^{1,3}, Keiestu Abe^{1,3}, Fumihiko Hasegawa³, Masayuki Machida⁴, Ryoji Ishioka⁵, Katsuya Gomi^{1,3}, Tasuku Nakajima^{1,3}

(¹Tohoku Univ., Grad. Sch. Agri. Sci., ²CITRI, ³Niche, ⁴AIST, ⁵Showa highpolymer)

P-5

麴菌のクチナーゼホモログ (CutB) の遺伝子構造と生分解性プラスチックの分解活性

伊藤竹久¹, 前田浩^{2,3}, 山形 洋平^{2,3}, 長谷川 史彦³, 阿部 敬悦^{2,3}, 中島 佑^{2,3}, 五味 勝也^{1,3} (¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大院農・応生科, ³東北大 NICHe)

【目的】我々はこれまでに生分解性プラスチックの一つである polybutylenesuccinate(PBS)を効率よく分解する酵素として麴菌のクチナーゼ (CutL1) を単離・精製し、その酵素学的諸性質を明らかにした。今回、さらに麴菌から CutL1 に相同性の高いホモログ遺伝子を単離したので、その構造および生分解性プラスチックの分解活性等について検討した。

【結果】単離した *cutL1* ホモログ遺伝子 (*cutB*) の塩基配列から、N 末側の約 200 アミノ酸は CutL1 と 80% の高い相同性を示したが、C 末端側にセリンが連続して存在する配列が付加されていることが推定された。*CutB* を高発現用プロモーターに連結して麴菌 *A.oryzae* NS4 株に導入したところ、形質転換株は親株に比べて PBS 単一 C 源培地での生育が旺盛で大きくクリアな消化円を形成した。液体培養上清の SDS-PAGE の結果、30kDa 付近にバンドが認められ、遺伝子から推定される分子量から考えて、セリンリッチな配列が付加された形で生産されていることが示唆された。さらに、高生産株から精製した CutB タンパク質の酵素学的諸性質を調べた結果についても報告する。

Gene structure and enzyme properties of a novel cutinase homolog (CutB) from *Aspergillus oryzae*.

Takehisa Ito, Hiroshi Maeda, Yohei Yamagata, Fumihiko Hasegawa, Keietsu Abe, Tasuku Nakajima, Katsuya Gomi (Div.Bioscil.Biotech.Future Bioind.,Grad.Sch.Agric.Sci,Tohoku Univ., Div.Life sci.,Grad.Sch.Agric.Sci,Tohoku Univ., NICHe,Tohoku Univ.)

P-6

麴菌オリゴアレイを用いた各種培養条件下での発現解析

佐野元昭、山根倫子*、大箸信一、町田雅之* (金沢工大、*産総研)

<目的> 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麴菌 *Aspergillus oryzae* が広く利用されている。近年、ゲノム解析がほぼ終了し¹⁾、麴菌の持つ遺伝子の全貌が明らかになってきた。そこで今回、ポストゲノム解析として麴菌のゲノム情報を利用した、DNA オリゴマイクロアレイを作製した。そのアレイを用いて、各種培養条件下での遺伝子の網羅的発現解析を行なったので報告する。

<方法および結果> 麴菌ゲノム解析により明らかとなった、麴菌 11000 遺伝子をスポットしたオリゴアレイを作製した。今回作製したオリゴアレイは、麴菌ゲノムのほぼ全ての遺伝子をカバーしている。各種培養条件下で麴菌を培養した後、RNA を抽出しアレイ用プローブを作製し、遺伝子の発現プロファイルの解析を行なった。

1) 町田ら：日本生物工学大会要旨 P13 (2002)

Gene expression analysis by oligo DNA microarray

Motoaki Sano, Noriko Yamane*, Shinichi Ohashi, Masayuki Machida* (KIST, *AIST)

P-7

トマト萎凋病菌の非病原性決定領域はキュウリモザイクウイルス (CMV) 外被タンパク質遺伝子と部分的に相同性を示す

中村亘宏, 岡部明子, 川部眞登*, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大農・*農環研)

トマト萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: FOL) レース 2 は, トマトの持つレース 1 抵抗性遺伝子 (*I*) による抵抗性を打破することでレース 1 から分化したと考えられる. FOL レース 1 NBRC 6531 ゲノムに REMI 法で pHYG-EGFP を挿入した形質転換体 (X-83) は, 本来レース 1 に抵抗性の品種 (*I*) に対して病原性を示した. つまり, レース 2 と同様な感染反応を示す病原性変異株 (X-83) が人為的にレース 1 から誘導された. これは, 遺伝子対遺伝子説 (Flor, 1957) に従うと, トマトの抵抗性遺伝子 *I* に対応する NBRC 6531 の持つ非病原性遺伝子 *AVRI* が X-83 で破壊されていることで説明できる. プラスミドレスキュー法で pHYG-EGFP 挿入部位周辺領域を解析した結果, NBRC 6531 ゲノムにはプラスミド挿入部位を挟み, キュウリモザイクウイルス (CMV) 外被タンパク質 RNA と高い相同性を示す配列 (265 bp, 47 bp) が inverted repeat で存在し, さらにこれらと隣接して, class II transposable element (TE) 等に特徴的な terminal inverted repeat (TIR) 様配列が存在することを見出した. *F. oxysporum* で既報の class II TE である *impala* との相同性は低かった. この領域はレース 1 菌株のみに存在していた. NBRC 6531 株で同領域を二回相同組換えで破壊したところ, レース 1 抵抗性品種に対する病原性が再現されたことから, この領域が FOL レース 1 の非病原性決定領域 (*AVRI*) であると判断された. 菌類のゲノムにおいて植物ウイルス RNA と相同性を持つゲノム領域は初の報告である. また, FOL のレース分化 (レース 1 → レース 2) を人為的に誘導した初の報告である.

A genomic region of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 determining avirulence has partial homology to cucumber mosaic virus (CMV) coat protein RNA

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

P-8

麹菌 *A. oryzae* を用いた魚類生理活性タンパク質の生産

馬橋由佳, 有岡学, 末武弘章*, 鈴木謙*, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工、*附属水産実験所)

麹菌 *A. 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、タンパク質生産の宿主として注目されている。我々は特定の発現ベクターに複数の遺伝子を一度にクローニング可能な MultiSite Gateway™ テクノロジーに注目し、麹菌において様々な用途に応じたタンパク質を発現するために有効な新規ベクターシステムを構築した¹⁾。本研究では、このシステムにさらに目的タンパク質を α -アミラーゼ (AmyB) あるいはグルコアミラーゼ (GlaA) との融合タンパク質として発現させるためのプラスミドを加え、これらを用いて麹菌における魚類生理活性タンパク質の生産を試みた。

トラフグ *Takifugu rubripes* のインターロイキン(IL)-8 の生産を行うため、IL-8 全長の C 末端に HA-His6 あるいは EGFP タグを連結したタンパク質を発現させるためのプラスミドを構築した。しかし麹菌の形質転換株において両者とも発現が確認されなかった。そこで Kex2 プロテアーゼ認識配列を介して AmyB あるいは GlaA と成熟型 IL-8 が連結され、さらに上記 C 末端タグが付加された融合タンパク質を発現させるためのプラスミドを 3 種類構築した。また、これと並行してトラフグ IL-6、pufflectin、インターフェロン γ についても AmyB、HA-His6 タグとの融合タンパク質生産用のプラスミドを作製した。各プラスミドを用いて麹菌を形質転換し、得られた形質転換株について Western 解析および顕微鏡観察を行って生産性を比較し、より多量、高純度なタンパク質の生産を目指した検討を行っている。

1)馬橋ら、日本農芸化学会 2004 年度大会要旨集 p.24

Production of physiologically active proteins of *Takifugu rubripes* in *Aspergillus oryzae*

Yuka Mabashi, Manabu Arioka, Hiroaki Suetake*, Yuzuru Suzuki*, Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnol. and *Dept. of Aquat. Biosci., Univ. of Tokyo)

P-9

黄麹菌分生子、発芽分生子のプロテオーム解析

ゲン・コン・ハ、竹内道雄（東京農工大学、農学部、応用生物化学）

（目的）黄麹菌の生活環境において発芽の制御メカニズムは不明である。本研究では麹菌分生子発芽分生子の菌体内タンパク質についてプロテオミックスの手法を用い、両者でのタンパク質濃度の違いを含めたその全体像を解析し、分生子発芽との関係を明らかにすることを目的とした。

（方法・結果）*A.oryzae* RIB40 の分生子、発芽分生子の菌体内タンパク質について二次元電気泳動を行った。分生子、発芽分生子の各スポット約 750 について、その濃度を Melanie 2.2 software 用いたデンストメトリーにより比較した。分生子、発芽分生子に存在するタンパク質約 300 個をペプチドマスフィンガー法で同定し、COG ファイルの分類に従って分類した。その結果、information storage and processing に属するタンパク質 30、cellular processing and signaling 65、metabolism 160、poorly characterized 45 を同定することができた。また、発芽分生子に特異的に存在しているか、または分生子より濃度が増加しているスポットでは metabolism 関連タンパク質のものが多く含まれていた。一方、分生子特異的または、発芽分生子より増加するタンパク質では defense mechanism に属するタンパク質が多い傾向が認められた。

Proteome analysis of conidia and germinated conidia from *A.oryzae*.

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

P-10

Rhizopus oryzae のキチン合成酵素遺伝子の解析

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

Rhizopus oryzae と *Amylomyces rouxii* は、全く同一の rDNA ITS 領域をもち、ゲノムレベルでも相同性が非常に高いが、別の属に分類されている（平成 15 年度カンファレンス）。両者の決定的な差異は *A. rouxii* が胞子のう胞子をほとんど形成せず、厚膜胞子を大量に形成するところにある。我々は両者の分子遺伝学的差異を明らかにするため、胞子のう胞子形成に関与する遺伝子の探索を進めている。*R. oligosporus* では、クラス IV に属するキチン合成酵素遺伝子が胞子形成に関与するとの報告がある。そこで、*R. oryzae* のキチン合成酵素遺伝子の解析を行った。

キチン合成酵素遺伝子の取得に関する種々の報告から、クラス I-III 及びクラス IV-V キチン合成酵素遺伝子の保存領域をそれぞれ特異的に増幅するプライマーを用いて *R. oryzae* CBS 112.07 からキチン合成酵素の取得を試みた。その結果、クラス I-III では 6 つのクラスターに分けられ、相同性解析を行った結果、そのすべてがクラス II に分類された。また、クラス IV-V では 3 つのクラスターに分けられ、クラス IV が 2 つ、クラス V が 1 つに分類された。サザンハイブリダイゼーションで解析した結果、それぞれ異なる分子量のバンドが確認され、*R. oryzae* ではクラス II, IV に複数のキチン合成酵素が存在することが示唆された。これらの遺伝子断片の発現解析を行った結果、胞子形成時に特異的に発現するクラス II 遺伝子 1 種、胞子形成時に発現が抑制されるクラス II 遺伝子 1 種があることがわかった。現在これらの全長の解析を行っている。

Molecular cloning of chitin synthase genes from *Rhizopus oryzae*

Ayumi Abe, *Yuji Oda, Teruo Sone, and Kozo Asano

(Grad. Sch. Agr., Hokkaido Univ., *Natl. Agr. Res. Center, Hokkaido)

P-11

誘導シグナルに応答した *Aspergillus nidulans* AmyR の構造変化

伊東達雄, 加藤雅士, 小林哲夫 (名大院・生命農学)

AmyR は *Aspergillus* 属アミラーゼ遺伝子群の転写活性化因子である。我々はこれまでに *A. nidulans* AmyR が発現誘導シグナルであるイソマルトースに反応して核局在化することを明らかにしてきた。本報告では、誘導の前後で AmyR がコンフォメーション変化を起こしている可能性を考え、イソマルトース誘導前後の *A. nidulans* 細胞抽出液を用いて *agdA* プロモーターへの結合活性をゲルシフトアッセイにより解析した。

非誘導時においては AmyR の DNA 結合能は弱く、また形成された DNA-AmyR 複合体の移動度は極めて小さかった。一方、イソマルトース誘導時には DNA 結合能が高く、非誘導時と異なり大きな移動度を持つ DNA-AmyR 複合体が形成された。非誘導、誘導条件下での DNA-AmyR 複合体の移動度の違いは、両者間で AmyR-タンパク質複合体の構成が異なることを示唆している。AmyR の細胞内局在部位が非誘導時に細胞質、誘導時に核であることを考慮すると、非誘導条件下では AmyR は高次タンパク質複合体として細胞質に存在し、イソマルトースシグナル受容時に複合体から解離して核移行するというモデルが考えられる。

Structural transition of *Aspergillus nidulans* AmyR in response to induction signal.

Tatsuo Ito, Masashi, Kato, Tetsuo Kobayashi

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

P-12

Aspergillus oryzae の細胞壁構造の改変による細胞質タンパク質生産系の構築

一宮維幸, 池田佳広, 北本勝ひこ, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)

Aspergillus oryzae は高いタンパク質生産能力を持つことから、様々な有用酵素生産に用いられている。*A. oryzae* は分泌タンパク質以外の種々の異種細胞内タンパク質の生産においても有効な宿主として利用できることが考えられる。本研究では、細胞質に存在するタンパク質を培地中に生産する菌株の作出を目的とした。糸状菌の菌糸は細胞壁によって覆われていることから、細胞壁強度を低下させることによって菌糸に部分的に溶菌を引き起こし、細胞質タンパク質を菌体外に漏出させることができると考えられた。多くの糸状菌ではグルカンおよびキチンが細胞壁の主要構成成分となっている。そこでまず *A. oryzae* のキチン分解酵素 *AochiA* または *AochiB* を *amyB* プロモーターの制御下で発現させることにより、キチン分解酵素を高発現させることのできる株を作製した。これらの菌株の表現型を解析した結果、これらのキチン分解酵素を高発現させるだけでは顕著な溶菌を誘導することはできないことが分かった。しかし *AochiA* の高発現は溶菌を促進する効果があることが示唆された。そこでこれらの株で *Bacillus circulans* のグルカン分解酵素 BglH を *amyB* プロモーター下で高発現させたが、その効果はみられなかった。現在 BglH の改変などを行っている。

Construction of cytoplasmic protein production system by altering cell wall structure in *Aspergillus oryzae*

Masayuki Ichinomiya, Yoshihiro Ikeda, Katsuhiko Kitamoto, Hiroyuki Horiuchi, and Akinori Ohta

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

P-13

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

一柳俊介、古川健太郎、水谷治、藤岡智則、徳岡昌文、五味勝也、阿部敬悦、中島佑 (東北大院農・応生科)

我々は、糸状菌生体内での分泌タンパク質のプロセッシング機構の解明を目指し、これまで麹菌 *Aspergillus oryzae* 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。*A. oryzae* *kexB* 破壊株は、cell integrity 経路 (PKC 経路) に異常をもたらし、野生株と比べて非常にコンパクトなコロニーしか形成しないが、高浸透圧条件下で培養すると表現型が復帰する。そこで、今回、高浸透圧ストレスによる *kexB* 破壊株の表現型復帰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* の *kexB* 破壊株を造成し解析を行った。この破壊株において *A. nidulans* *kexB* および *A. oryzae* *kexB* をそれぞれ発現させたところ、通常培地において表現型が共に同程度まで復帰したことから両者の KexB の機能そのものには差が無いことが考えられた。*A. oryzae* のグルコアミラーゼ GlaA のヒンジ領域に KexB の認識サイトである Lys-Arg を導入し、その先に異種タンパク質としてダニアレルゲン Derf7 を融合させた融合タンパク質は、*A. nidulans* 野生株の培養上清中には N 末端側触媒ドメインと C 末端側異種タンパク質が切断された状態で分泌されたが、切断能を欠いた *kexB* 破壊株ではそのままの形で分泌された。しかし、*kexB* 破壊株を高浸透圧条件下で培養するとプロセッシング能力の復帰が見られたことにより KexB 以外のプロセッシングプロテアーゼ遺伝子の存在が示唆された。また、プロセッシング機構には *A. nidulans* HOG 経路が関与している可能性があることから、現在、HOG 経路を活性化させるために酸化ストレスを与えた場合のプロセッシング能復帰の有無について、研究を進めているところである。

Characterization of the *Aspergillus nidulans* disruptant of *kexB* gene encoding a protein processing enzyme

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

P-14

Alternaria solani 還元型ポリケタイド合成酵素遺伝子の発現と機能解析

笠原堅¹、藤井勲¹、海老塚豊¹、及川英秋² (¹東大院薬、²北大院理)

カビ毒であるソラナピロン、アルタナル酸などの還元型ポリケタイドを生成することが知られているジャガイモ夏疫病菌 *Alternaria solani* より、ゲノム DNA を鋳型とし、既知還元型 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て PCR を行ない、これまでに還元型ポリケタイド合成酵素遺伝子 3 種、*pksN*、*pksF*、*pksK* を得た。いずれも、還元型 PKS に特徴的な、KR、ER、DH ドメインの存在が確認されたが、*pksN* においては、さらに MeT ドメインも存在し、*Aspergillus oryzae* での発現により、デカケタイド鎖にマルチメチル化を受けた alternapyrone を生成することを確認した。

今回、*pksF* を *A. oryzae* において発現させたところ、コントロールの形質転換体には見られない黄色色素が生産された。これを HPLC で分析した結果、400 nm 付近に特徴的な吸収を持つ 2 種のポリエン化合物の存在が認められ、AS405 及び AS423 と命名した。機器分析の結果、AS405 は $C_{23}H_{26}O_2$ の化合物であり、アセチル CoA をスターターとして、11 個のマロニル CoA が縮合したのち、アルドール環化、脱炭酸、脱水により生成するものと考えられた。一方、AS423 は $C_{22}H_{24}O_4$ の化合物であり、AS405 と同一の部分構造をもつことから AS405 と共通の生合成中間体を経て生成すると考えており、現在さらに構造解析を進めている。

Expression and Functional Analysis of *Alternaria solani* Reduced Type PKS Genes

Ken Kasahara¹, Isao Fujii¹, Yutaka Ebizuka¹, Hideaki Oikawa²

(¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Tokyo, ²Graduate School of Science, Hokkaido Univ.)

P-15

ウシグソヒトヨタケの青色光受容体をコードしている遺伝子 *dst1* : 遺伝子構造、発現、変異株の解析

寺島和寿, 幸克行, 秋山匡史, 村口元¹, 鎌田堯 (岡大・理,¹秋田県大・生物資源)

ウシグソヒトヨタケは明暗周期下で培養すると正常な子実体を形成する。しかし、連続暗黒下では子実体原基は形成されるが、その後、傘が未熟な状態で子実体原基の基部が徒長し、dark stipe と呼ばれる構造体を形成する。これまでに、明暗周期培養下でも dark stipe を形成する突然変異株を単離・分析し、光形態形成に関わる2つの遺伝子(*dst1*, *dst2*)を同定している。本研究では *dst1* を、変異を相補する DNA 断片としてクローニング・分析した。その結果、*dst1* は N 末端から順に LOV ドメイン(=PAS A ドメイン)、PAS B ドメイン、coiled coil 構造、転写活性化領域と思われる Q リッチ領域を持つタンパクをコードしていることが明らかになった。LOV ドメインは植物およびアカパンカビで青色光受容に関わるドメインとして知られており、Dst1 も青色光受容タンパクであることが強く示唆された。また、変異遺伝子 *dst1-1* は Q リッチ領域を欠失させるナンセンス変異を持つことが明らかになった。それゆえ、Dst1 の Q リッチ領域が、青色光による原基基部の徒長抑制に関して、重要な役割を果たしていることが示された。ノーザン解析の結果、*dst1* は栄養菌糸よりも、子実体原基、子実体、dark stipe で強く発現していることが明らかになった。現在、*dst1* の機能をさらに詳細に解析するために、遺伝子破壊を試みている。

The *dst1* gene encoding a blue light photoreceptor in *Coprinus cinereus*: gene structure, developmental regulation and analysis of a mutant.

Kazuhisa Terashima, Katsuyuki Yuki, Masashi Akiyama, ¹Hajime Muraguchi, Takashi Kamada (Fac. of Sci., Okayama Univ.; ¹ Fac. of Biores., Akita Pref. Univ.)

P-16

ウシグソヒトヨタケの青色光受容体 Dst1 と相互作用するタンパク質の two-hybrid 法による検索

嘉屋重雅幸, 寺島和寿, 宮本奈緒, ¹村口 元, 鎌田 堯 (岡山大・理, 秋田県大・生物資源)

担子菌ウシグソヒトヨタケは、子実体形成過程において顕著な光形態形成を示す。12 時間毎の明暗周期下で培養すると、約 10 日で子実体原基が完成し、翌日には正常な子実体が形成される。しかし、恒暗下で培養すると、将来傘になる部分が十分に発達せず、原基下部が徒長した、いわゆる“dark stipe”が形成される。これまでに、我々は、12 時間毎の明暗周期下で培養したにもかかわらず“dark stipe”を形成する突然変異株を取得し、それらの遺伝子分析により2つの原因遺伝子 *dst1*, *dst2* を同定している。最近、*dst1* のクローニングに成功し、この遺伝子が、LOV ドメインをもつ青色光受容体 Dst1 をコードしていることを明らかにした。Dst1 タンパク質は、アカパンカビの青色光受容体 WC-1 と高い相同性を持ち、タンパク質間の相互作用にかかわる PAS ドメイン及びコイルドコイル構造を持ち、また転写活性化 (AD) ドメインと考えられる Q リッチ領域をもつ。しかし、WC-1 と異なり、zinc-finger DNA 結合ドメインをもたない。これらのことは、Dst1 が他のタンパク質と相互作用して働いていることを示唆している。そこで本研究では、BD Matchmaker Two-Hybrid System 3 (Clontech)を用い、Dst1 と相互作用するタンパク質をコードするクローンを検索した。cDNA ライブラリーから約 8 万個のクローンを検索し、22 種類のクローンを同定した。それらのなかには、転写調節にかかわることが知られている Enolase や減数分裂にかかわる Mnd1 のホモログなどが含まれていた。現在、これら2つの遺伝子について、RNAi による遺伝子サイレンシングを試みている。

Screening of proteins interacting with Dst1, a blue-light photoreceptor of *Coprinus cinereus*, by yeast two-hybrid assay

Masayuki Kayashige, Kazuhisa Terashima, Nao Miyamoto, ¹Hajime Muraguchi, Takashi Kamada (Fac. of Sci., Okayama Univ.; ¹Fac. of Biores., Akita Pref. Univ.)

P-17

Amylomyces rouxii のシュクロース分解酵素について

鬼頭英樹, 齊藤勝一, 小田有二 (農研機構・北海道農研)

乳酸を生成する糸状菌 *Amylomyces rouxii* および *Rhizopus oryzae* は分類学的に近縁であるが、糖資化性、胞子形成能、形態において差異が認められる。本研究では、両菌株のシュクロースの資化性に注目し、詳細な解析を行った。

A. rouxii CBS438.76 および *R. oryzae* NRRL395 をそれぞれグルコースもしくはシュクロースを炭素源とした培地に接種して振盪培養した。両菌株の経時変化を調べたところ、グルコースを糖源とすると両菌株とも乳酸を生成したが、シュクロースを糖源とすると *A. rouxii* CBS438.76 だけが乳酸を生成した。シュクロース分解酵素活性はグルコース、シュクロースどちらの場合とも *A. rouxii* CBS438.76 でのみ認められた。このことより、シュクロース分解酵素がシュクロースからの乳酸発酵に必要であることが示された。次に、シュクロース分解酵素を精製するため、シュクロースを炭素源とする無機塩培地で 5 日間培養し、培養上清を粗酵素液とした。粗酵素液を 50mM ホウ酸バッファーで透析し、DEAE トヨパールに吸着後、0.5-0.15M の NaCl で溶出した。溶出液に 20% 硫酸アンモニウムを溶解し、フェニルトヨパールに吸着した。18% 硫酸アンモニウムで溶出したとき、SDS-PAGE でほぼシングルバンドが見られた。現在、得られた酵素の緒性質の検討を行っている。今後は、シュクロース分解酵素の一次構造の決定とクローニングを行う予定である。

Studies on a sucrose-hydrolyzing enzyme from the fungus *Amylomyces rouxii*.

Hideki Kito, Katsuichi Saito, Yuji Oda

(Nat. Agric. Res. Cent. Hokkaido Region)

P-18

プロモーターのデリーション解析とゲルシフト解析を用いた迅速なシスエレメントの同定方法の開発

久田博元¹, 佐野元昭², 石田博樹¹, 秦 洋二¹, 町田雅之², 川戸章嗣¹, 安部康久¹ (¹月桂冠総研, ²産総研)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は酵素分泌力が高く、異種タンパク質生産の宿主菌として大きく期待されている。蛋白質を高生産させるには高い発現能を有するプロモーターが必要で、我々も *sodM* プロモーターなどを単離し、その発現特性について報告している。さらにこれらのプロモーターの発現能を強化するには、転写制御因子が結合する領域(シスエレメント)を同定し、改変することが重要である。しかしプロモーター領域を順次欠失させていくデリーション解析を麹菌で行うことは、膨大な時間が要する。またタンパク質と DNA 配列の結合能を直接検出するゲルシフト解析は、転写活性に及ぼす影響を検証することができない。そこで我々は両解析方法を組み合わせて、短時間でシスエレメントを同定する方法を開発することを目的とした。モデルケースとして *sodM* プロモーターを上流から 200bp ごとにデリーション解析を行ったところ、発現に必要な領域は開始コドンの上流 200bp が必須であることが判った。次に TATA-box 上流をゲルシフトにより解析したところ、-209 から -179bp の領域がタンパク質結合領域であることが判明した。同定した領域を検証するためにデリーションしたところ、約 2 万 U/mg あった GUS 活性が 100 分の 1 に減少した。逆にタンデムでこの領域を *sodM* プロモーターに結合させたところ 2.5 倍に活性が上昇し、本領域に転写活性を正方向に制御するシスエレメントが含まれていることを明らかにした。このように、最初のデリーション解析にて転写制御領域を 200bp 程度の範囲に限定し、その領域に対して網羅的なゲルシフト解析を行うことにより、短期間にシスエレメントの配列を決定できると考えられる。また、他のプロモーターへの応用例も報告する。

The development of a novel method for identification of cis-elements in promoter region of *A. oryzae*.

Hiramoto Hisada¹, Motoaki Sano², Hiroki Ishida¹, Yoji Hata¹, Masayuki Machida², Akitsugu Kawato¹, Yasuhisa Abe¹

(¹Gekkeikan Sake Co. Ltd., ²AIST)

P-19

アフラトキシン生産阻害物質の研究

近藤彦彦, 多田倫子, 坂神洋次 (名大院・生命農学)

アフラトキシンは *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* などが生産する二次代謝産物であり、天然有機化合物中で最も強い発ガン性を有している。熱帯・亜熱帯地域における農作物のアフラトキシン汚染は、多大な経済的および人的被害をもたらしており、アフラトキシン汚染防除法の開発は危急を要する課題である。また、糸状菌の二次代謝産物の生産調節機構に関してはまだ不明の点が数多くあり、糸状菌を用いた有用物質生産という観点からも、アフラトキシン生産阻害物質を用いたアフラトキシン生産調節機構の解析は重要であると考えられる。

我々は、免疫抑制剤として利用されているマクロライド系化合物ラパマイシンが、*A. parasiticus* のアフラトキシン生産を非常に低濃度 ($IC_{50} = 0.5 \text{ ng/ml}$) で特異的に阻害するという現象を見出した。ラパマイシンは細胞内で FKBP (FK506 binding protein) と結合し、TOR (target of rapamycin) キナーゼを阻害することが知られているが、同じく FKBP に結合することが知られている他の化合物 (FK506, FK520, cyclosporin A) には、このような活性は見られなかった。また、ラパマイシンは富栄養培地上で *A. parasiticus* の分生子形成を阻害し fluffy な表現型を誘導した。さらに、RT-PCR 法による解析の結果、ラパマイシン添加時にはアフラトキシン生合成遺伝子の転写が抑制されていることが明らかになった。これらの結果は、ラパマイシンによって阻害される TOR キナーゼ情報伝達系が *A. parasiticus* のアフラトキシン生産と分生子形成の調節において重要な役割を担っていることを示唆している。

Studies on an inhibitor of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*

Tatsuhiko Kondo, Tomoko Tada, Youji Sakagami

(Dept. of Appl. Mol. Biosci., Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

P-20

Neurospora crassa の *het-c* vegetative incompatibility における 温度感受性変異体 *vib-2* の解析

金子 功*, Qijun Xiang, N. Louise Glass (U.C. Berkeley・Dept. Plant and Microbial Biology、*現・農環研)

菌糸融合によって形成されたヘテロカリオンの安定性や生育力は、*het* 遺伝子座により決定され、不親和な *het* 遺伝子を持つ個体間で形成されたヘテロカリオンは細胞死を起こす。この糸状菌に広く見られる現象を vegetative incompatibility (VI) と呼ぶ。本研究では、Panama 型の *het-c* 遺伝子 (*het-c^{PA}*) を持つ *N. crassa* から、*het-c* VI のサブレッサー変異体 *vib-2* を得、その解析を行った。*vib-2* は、Oak Ridge 型 *het-c* 遺伝子 (*het-c^{OR}*) を持つ株に対し、室温では不親和性、34°C 下では親和性と温度依存性の表現型を示す。この形質は、*het-c^{PA}* を持つ菌株によってのみ相補された。*het-c^{PA}* 株から Inverse-PCR により得られた *vib-2^{PA}* は、ゲノムデータベース上の Oak Ridge 型 *vib-2* 遺伝子 *vib-2^{OR}* に対し、DNA 配列間で 69.3%、アミノ酸配列間で 59.2% と極めて低い相同性を示した。VIB-2 には、*N. crassa* の HET-6、TOL、*Podospora anserina* の HET-E、HET-D などの VI 関連遺伝子産物に見られる HET ドメインが見いだされた。次に、*vib-2* および *het-c* の RIP 変異体を用い、*vib-2* の *het-c* VI における機能を調査した。その結果、本遺伝子が、*het-c* との非対立遺伝子間相互作用によって VI を起こすこと、*het-c* の対立遺伝子間相互作用よりむしろ、この非対立遺伝子間相互作用が *het-c* VI において主要な役割を担っていることが明らかになった。

Characterization of temperature-sensitive mutant *vib-2* in *het-c* vegetative incompatibility in *Neurospora crassa*

Isao Kaneko, Qijun Xiang, N. Louise Glass (U.C. Berkeley・Dept. Plant and Microbial Biology)

P-21

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の class V キチン分解酵素 ChiB の酵素学的性質の解析

金子純一、山崎晴丈、福田良一、堀内裕之、太田明徳 (東大院・農生科・応生工)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞壁の主要構成成分の一つはキチンである。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。我々のグループでは、*A. nidulans* のゲノム上に存在すると考えられる 15 個の class V キチナーゼ遺伝子 (*chiB*~*chiF*, *chiH*, *chiJ*~*chiR*) と 3 個の class III キチナーゼ遺伝子(*chiA*, *chiH*, *chiR*)を単離し、その機能解析を行っている。そのうち class V キチナーゼの一つである ChiB は、培養後期に誘導されること、*chiB* の破壊株は野生型株に比べ溶菌に遅れを生じることから、自己溶菌に関わっていることが示唆されている¹⁾。今回、ChiB の酵素学的性質を特定し、更なる知見を得ることを目的として ChiB の精製、活性測定を行った。ChiB の N 末端に 6xHis タグを挿入した His-ChiB をコードするキメラ遺伝子を大腸菌 BL21 株において発現させた。細胞抽出液、培養上清に対しクマシー染色、ウェスタン解析を行った結果、予想される位置に His-ChiB のバンドが検出された。次いで培養上清の His-ChiB を Ni ビーズにより回収し、イミダゾールにより溶出させることにより、クマシー染色でシングルバンドになる程度に精製した。(GlcNAc)₂-MU、(GlcNAc)₃-MU を用いてキチナーゼ活性を測定したところ、ChiB は中性付近の pH においてはエキソ型キチナーゼ、エンド型キチナーゼの両方の活性を持つことが示唆された。現在、ChiB の種々の酵素学的性質について検討中である。

1) 山崎大輔ら、日本農芸化学会大会講演要旨集 vol. 72, p. 135

Characterization of a class V chitinase (ChiB) in *Aspergillus nidulans*

Junichi Kaneko, Harutake Yamazaki, Ryouichi Fukuda, Hiroyuki Horiuchi and Akinori Ohta

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

P-22

Aspergillus aculeatus におけるセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の発現調節機構

金政真¹、川口剛司²、荒井基夫³、梶原将¹ (¹東工大・院生命理工, ²阪府大院・農生科, ³中部大・応生)

【目的】 *A. aculeatus* No.F-50 株は高い(ヘミ)セルラーゼ分泌生産能を有する。これまでに塩基配列が決定されている数種類の糖質分解酵素遺伝子のプロモータ領域において、*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* のキシラナーゼ遺伝子転写誘導因子 XlnR の結合配列と類似の配列が見つかった。そこで本菌株においても XlnR ホモログ(AaXlnR)が存在し、(ヘミ)セルラーゼ遺伝子の発現に関与していることが推測された。今回、*AaxlnR* 遺伝子破壊株を作製し、各酵素の生産性に与える影響を調べたので報告する。

【方法と結果】 *A. niger xlnR* 遺伝子の配列をもとに *AaxlnR* 遺伝子の染色体及び cDNA クローンを取得し、塩基配列を決定した。この DNA 断片に *A. oryzae* 由来ピリチアミン耐性遺伝子を挿入した *AaxlnR* 遺伝子破壊用カセットを構築し、これを用いて置換法により *AaxlnR* 遺伝子破壊株を得た。破壊株はキシランを炭素源とした培地では極めて生育が遅く、またフスマ培養においてセルラーゼおよびヘミセルラーゼの分泌生産性は顕著に低下していたことから、AaXlnR はこれら酵素遺伝子の発現に関与していることが示唆された。現在、AaXlnR により転写調節される酵素遺伝子群を特定するためにノーザンブロット解析を行っている。

Regulation of the cellulolytic and hemicellulolytic genes of *Aspergillus aculeatus*

Shin Kanamasa¹, Takashi Kawaguchi², Motoo Arai³, Susumu Kajiwara¹

(¹Dept. Life Sci., Tokyo Inst. Technol., ²Dept. Appl. Biol. Chem., Osaka Pref. Univ., ³Dept. Env. Biol., Chubu Univ.)

P-23

麹菌 *A. oryzae* によるヒトリゾチームの高生産

金鋒杰, 渡辺泰祐, 丸山潤一, Praveen Rao Juvvadi, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】麹菌 *A. oryzae* はタンパク質の分泌能が極めて高く、異種タンパク質生産の宿主として利用されている。しかしながら、高等生物由来のタンパク質では一般にその生産量は多くない。これまで、グルコアミラーゼ (GlaA) をキャリアーとして融合させる事により、異種タンパク質生産量が上昇することが報告されているが、他の *A. oryzae* 分泌タンパク質に関してキャリアーとしての検討は行われていない。そこで、キャリアータンパク質として α -アミラーゼ (AmyB) を用い、ヒトリゾチーム生産株を取得し、各種培養条件における生産量を検討した。【方法と結果】Gateway システム¹⁾により、AmyB の C 末端にリゾチームを 1 コピー及びタンデムに 2 コピー連結した融合タンパク質を発現するプラスミド (それぞれ pALS, pA2LS) を構築した。切断サイトとして、連結部分に Kex2 サイトを付加した。*A. oryzae* 4 重栄養要求性株 NSAR1²⁾ (*niaD*, *sC*, Δ *argB*, *adeA*) に *A. nidulans* *sC* をマーカーとして形質転換を行い、リゾチーム生産株 (pALS を導入した NAR-L 株 15 株、pA2LS を導入した NAR-2L 株 15 株) を取得した。Western 解析により、全ての株でリゾチームが AmyB から切り離されて培地中に分泌されていることを確認した。さらに、*Micrococcus luteus* 菌体入り寒天培地におけるハロー形成の検討などの結果、リゾチーム生産量は NAR-L 株よりも NAR-2L 株で多い傾向を示した。培養に用いた DPY 培地の濃度を通常の 5 倍、pH をアルカリ性 (8.0) にするとリゾチーム生産量が上昇し、なかでも NAR-2L-7 株は最大約 10 mg/L の生産量を示した。

1) 馬橋ら：2004 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 24, 2) Jin, F. J. *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, (in press)

High level production of human lysozyme by *Aspergillus oryzae*

Feng Jie Jin, Taisuke Watanabe, Jun-ichi Maruyama, Praveen Rao Juvvadi, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto (Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

P-24

麹菌 *A. oryzae* によるヒトリゾチーム生産におけるプロテアーゼ遺伝子破壊の効果

金鋒杰, 渡辺泰祐, 丸山潤一, Praveen Rao Juvvadi, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】麹菌 *A. oryzae* による異種タンパク質の生産能を向上させるためには、その分解に関与すると考えられる様々なプロテアーゼ遺伝子の破壊が有効な手段であると考えられる。しかしながら、これまで *A. oryzae* のプロテアーゼ遺伝子破壊に関する報告はない。我々は *A. oryzae* において、キャリアータンパク質として α -アミラーゼを用いることにより、ヒトリゾチーム高生産株 NAR-2L-7 株 (*niaD*, *sC*::pA2LS, Δ *argB*, *adeA*) を取得した。本研究では NAR-2L-7 株を親株として、異種タンパク質の分解に関与する可能性のあるプロテアーゼ (菌体外酸性プロテアーゼ (*pepA*)、液胞内酸性プロテアーゼ (*pepE*)、トリペプチジルペプチダーゼ (*tppA*) 及び、菌体外アルカリプロテアーゼ (*alpA*)) の遺伝子破壊株を系統的に作製し、これらの遺伝子破壊がリゾチーム生産量に与える効果について検討を行った。

【方法と結果】fusion-PCR 法を用いる事により、*pepA*, *tppA* 及び、*alpA* に *adeA* マーカーを挿入した破壊用 DNA 断片を作製した。また、*pepE* 破壊用 DNA 断片は、Gateway システムを用いて同様に作製した。これらを NAR-2L-7 株に導入することにより遺伝子破壊株を取得した。各プロテアーゼ遺伝子の破壊は、PCR 及びサザン解析により確認した。現在、各種培養条件 (DPY 濃度、pH、界面活性剤添加等) におけるプロテアーゼ遺伝子破壊株のリゾチーム生産量について検討を行っている。また、カルパイン様プロテアーゼ (*palB*) 破壊株の作製及び、*argB* マーカーを用いたプロテアーゼ遺伝子二重破壊株の作製を検討している。

Effect of protease gene disruption on human lysozyme production by *Aspergillus oryzae*

Feng Jie Jin, Taisuke Watanabe, Jun-ichi Maruyama, Praveen Rao Juvvadi, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto (Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

P-25

Trichoderma reesei PC-3-7 株由来キシラナーゼⅢ遺伝子の誘導発現機構の解析

古川 隆紀、島田 龍一、中川 志穂、小笠原 渉、岡田 宏文、森川 康 (長岡技大・工・生物)

【目的】セルラーゼ高生産変異株である *T. reesei* PC-3-7 株が生産するキシラナーゼⅢ(XYNⅢ)は α -sophorose などのセルロース系の物質ならびに L-sorbose を炭素源としたときのみ誘導される。そのため、*xyn3* の発現はセルラーゼ遺伝子に類似した誘導発現機構により調節されていると考えられる。そこで我々は *xyn3* 上流領域 (約 1 kb) の解析を進めてきた。現在までに β -グルクロニダーゼ遺伝子(*gus*)をレポーターとした *xyn3* 上流配列の削除実験により、*xyn3* の誘導発現には少なくとも三つの領域が関与していることが明らかとなっている。今回は、最も活性が低下した領域(-739~-507)と既知の転写活性化因子の結合配列を含む領域(-331~-222)についてさらなる解析を進めた。

【方法と結果】 -739~-507 領域を段階的に削除した上流配列の制御下に *gus* を挿入し、相同組み換えを用いて *T. reesei* PC-3-7 株に導入した。GUS 活性を指標としてこの領域の機能を評価した結果、-722~-672 領域の削除に伴い大幅な活性の減少がみられた。この領域中には既知の転写活性化因子の結合配列が存在しなかったため、新規の転写活性化因子による誘導発現機構が示唆された。-331~-222 領域には *T. reesei* のセルラーゼ遺伝子の転写活性化因子である ACE II の結合配列が存在していたため、この配列を特異的に破壊した。その結果、GUS 活性は約半分に減少し、*xyn3* の誘導発現に ACE II が少なくとも一部は関与していることが明らかとなった。以上のことより *xyn3* の誘導発現は既知の転写活性化因子とともに新規の転写活性化因子によって調節されていると推察された。

Characterization of the *xyn3* expression mechanism from *Trichoderma reesei* PC-3-7

Takanori Furukawa, Ryuich Shimada, Shiho Nakagawa, Wataru Ogasawara, Hirofumi Okada, Yasushi Morikawa__

(Dept. of BioEng., Nagaoka Univ. of Tech.)

P-26

複数の触媒ドメインを持つ高機能キメラセルラーゼの作成

戸田 弘¹、権沢幸絵¹、天野良彦²、神田鷹久²、岡崎光雄¹、下坂 誠¹

(¹信州大・繊維・応生科、²信州大・工・物質工)

白色腐朽担子菌 *Irpex lacteus* MC-2 株は強力なセルラーゼ生産菌として知られており、セルラーゼ酵素製剤の生産菌として工業的に利用されてきた菌株である。我々は、これまでに本菌のセルロース分解酵素系の詳しい解明を目的として、*I. lacteus* MC-2 より数種のセルラーゼ成分の精製と解析を行い、またそれらをコードする遺伝子の単離と異種宿主による発現を試みてきた。これまでに糖質加水分解酵素ファミリー5 に属するエンドグルカナーゼ (En-1) とファミリー7 および 6 に属する2種のセロビオハイドrolラーゼ (Ex-1, Ex-3) 遺伝子を単離しその構造を解析してきた。これらの酵素は、それぞれ触媒ドメイン、セルロース結合ドメイン、およびそれらを結ぶリンカー領域から構成されるドメイン構造を有していた。これらの遺伝子を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* または麹菌 *Aspergillus oryzae* を宿主に用いて発現させ、単一成分からなる組換え酵素を用いて性質の調査を行った。その結果、エンド型およびエキソ型の酵素を共存させることにより、不溶性基質分解に対する顕著な相乗効果が観察された。さらにセルラーゼの分解能力の強化を目的として、一分子内に2つの異なる触媒ドメインを持つキメラセルラーゼの構築を試みた。Ex-1 および En-1 の各ドメインをPCRで個々に増幅し、任意の配列で再び連結させた。このキメラ遺伝子を宿主 *A. oryzae* において発現させて得られたキメラセルラーゼの性質評価を行った。

Construction of chimeric cellulase having different types of catalytic domains

Hiroshi Toda¹, Yukie Kabasawa¹, Yoshihiko Amano², Takahisa Kanda², Mitsuo Okazaki¹, and Makoto Shimosaka¹

(¹Dept, Appl. Biol., Shinshu Univ., ²Dept. Chem. Mat. Engn., Shinshu Univ.)

P-27

植物根圏糸状菌 *Trichoderma harzianum* の MAP キナーゼ ThPmk1 の機能解析

向坂由貴¹, 小野大輔^{1,2}, 本山高幸¹, 河合良夫², 工藤俊章¹ (¹理研・中央研、²東洋大・生命科学)

【目的】*Trichoderma harzianum* は糸状菌による植物病害の生物防除に用いられる糸状菌であり、植物根圏環境への高い適応能を示す。このような高い適応能のメカニズムを明らかにすることを目的としている。今回は *T. harzianum* の持つ3つの MAP キナーゼ (ThMps1、ThPmk1、ThOsm1) の1つ ThPmk1 に特に注目して研究を行った。

【方法・結果】*T. harzianum* から MAP キナーゼ遺伝子 *ThPMK1* を取得した。*ThPMK1* は357 アミノ酸、41.3 kDa の推定アミノ酸をコードし、イネいもち病菌の Pmk1 と96.3%の相同性を示した。次に、*ThPMK1* の遺伝子破壊体を作成したが、通常の培地での生育速度や浸透圧感受性に関して大きな変化は認められなかった。一方、別の MAP キナーゼ遺伝子 *ThOSM1* の破壊株は通常の培地での生育速度に大きな変化は認められなかったが、高浸透圧感受性を示した。

Functional analysis of a MAP kinase ThPmk1 of a plant rhizosphere filamentous fungus

Trichoderma harzianum

Yuki Mukouzaka¹, Daisuke Ono^{1,2}, Takayuki Motoyama¹, Yoshio Kawai², Toshiaki Kudo¹

(¹Discovery Res. Institute, RIKEN, ²Fac. Life Sci., Univ. Toyo)

P-28

優性阻害変異 HapB サブユニットを用いた Hap 複合体依存遺伝子の発現抑制

合田秀矢, 杉山純也, 小林哲夫, 加藤雅士 (名大院・生命農)

【目的】糸状菌 *Aspergillus* 属 CCAAT 結合因子は Hap 複合体と呼ばれ、3つのサブユニット HapB/C/E から形成されている。我々はこれまでに Hap 複合体の核内移行に関する解析を行い、核内移行メカニズムの詳細を明らかにした。解析の過程で得られた変異株 HapB1M はそれ自身機能を有さない Dominant negative (優性阻害型) 形質を示すことが予想された。今回はこの変異株の解析と Hap 複合体に依存した遺伝子群の人為的抑制への応用について検討した。【方法と結果】HapB1M は推定 DNA 結合ドメインに変異を導入した変異株であり、DNA 結合能の消失が予想された。EMSA 解析の結果、予想通り DNA 結合能が消失していることが確認された。構成的高発現プロモーターの下流に本変異遺伝子を挿入し、野生株 (*hapB⁺ pyrG*) に導入した。取得された形質転換株を γ -アミノ酪酸 (GABA) を単一 C 源および N 源とするプレート上で生育を調べると、生育速度が著しく低下した株が存在していた。GABA 資化に必要な GABA transaminase 遺伝子 (*gatA*) の発現は Hap 依存性であることから、HapB1M の導入により正常な Hap 複合体の機能が阻害され、*gatA* の遺伝子発現が抑制されていることが示唆された。Hap 複合体はアミノ酸配列が種を超えて高度に保存されていることから、今回のような解析方法は遺伝子破壊株の取得が難しい糸状菌においても、遺伝子発現の Hap 依存性を調べるのに有効な解析ツールであると考えられる。

Repression of the Hap-dependent genes by a negative dominant *hapB* mutant

Hideya Goda, Junya Sugiyama, Tetsuo Kobayashi, Masashi Kato

(Grand. Sch. of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.)

P-29

Neurospora crassa の NER 遺伝子 *mus-43* の解析

佐藤 正仁, 一石 昭彦 (東洋大・生命科学部)

紫外線が DNA に与える損傷は TC(6-4)光産物 (6-4PP) とシクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD) に代表され、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair : NER) がこれらの損傷により生じる DNA 鎖の歪みを認識し DNA 修復を開始する。我々はアカパンカビを用いてこの NER に関与する遺伝子を単離し、NER 修復機構について研究を進めている。

現在までにヒト XPA、出芽酵母 *RAD14* に相同な *mus-43* 遺伝子を RIP 法により破壊し、*mus-43* 遺伝子変異株を作製した。*mus-43* 変異株は紫外線、4NQO の変異原から生じる DNA 損傷に感受性を示したことから、修復系に関与していることを確認した。また、この変異株とこれまでにアカパンカビで単離・同定されている NER 遺伝子変異株 (*mus-38*)、複製後修復系に関与する変異株 (*uvs-2*)、組換え修復系の変異株 (*mei-3*)、そして第二除去修復に関与する変異株 (*mus-18*) との二重変異株を作製した。紫外線に対する生存率を調べた結果、この *mus-43* 変異株の生存率は *mus-38* 変異株と非常によく似た結果を示したことから、*mus-43* 遺伝子は NER 系に関与していることが確認できた。

さらに、紫外線により誘起される 6-4PP、CPD の二つの DNA 損傷に対する *mus-43* 変異株の除去能について、6-4PP および TD(Thymine dimer)に対する抗体を用いた ELISA 法により現在測定しているところであり、これについても報告する予定である。

Functional analyses of the NER gene, *mus-43* from *Neurospora crassa*

Masahito Sato, Akihiko Ichiishi

(Toyo Univ., Fac. Life Sciences)

P-30

乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子による *Rhizopus oryzae* 菌株の系統解析

斎藤勝一, 小田有二 (農研機構・北海道農研)

【目的】糸状菌 *Rhizopus oryzae* は、発酵産物として主に乳酸を蓄積する乳酸蓄積型菌株とフマル酸、リンゴ酸を蓄積するフマル酸蓄積型菌株の 2 種類の表現型グループに分けられる。また乳酸生成に関与する遺伝子として、*R. oryzae* NRRL395 では *ldh A* と *ldh B* の 2 種類の乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の存在が明らかとなっている。本研究ではこれらグループ間の表現型の相違について 2 種類の乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子に着目し、乳酸蓄積型菌株 27 株、フマル酸蓄積型菌株 21 株を用いた DNA レベルで多様性解析を行い、*R. oryzae* 菌株間の系統発生についての知見を得ることを目的に研究を行った。

【方法及び結果】*R. oryzae* NRRL395 の *ldh A*、*ldh B* の遺伝子配列を基にプライマーを作成し PCR 解析を行った結果、乳酸蓄積型菌株すべてに *ldh A*、*ldh B* が共に完全長で存在することを見出した。これら *ldh A*、*ldh B* をクローニングし塩基配列の決定を行ったところ各菌株間の塩基配列には多様性が見られた。アミノ酸配列に基づく *Ldh A*、*Ldh B* の各系統樹は互いに類似しており、各菌株の *ldh A*、*ldh B* が同調し多様性を生じたと考えられた。一方、フマル酸を蓄積する 21 株の解析では *ldh A* が存在せず *ldh B* のみが存在することが明らかになった。また、乳酸蓄積型菌株の *ldh B* とは相同性が低く、フマル酸蓄積型菌株内の多様性も乏しかった。以上のことから *R. oryzae* の乳酸蓄積型、フマル酸蓄積型の 2 グループは、ゲノム上の乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の存否に起因し、またそれらは互いに独立した別系統の菌株群であることが示唆された。

Genetic diversity in *Rhizopus oryzae* strains as revealed by the sequence of lactate dehydrogenase genes

Katsuichi Saito, Yuji Oda

(Nat. Agr. Res. Cent. for Hokkaido Region (NARCH))

P-31

***Aspergillus nidulans* AmyR のシグナル応答領域に関する解析**

坂口 孝, 牧田智裕, 加藤雅士, 小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)

(目的) AmyR は *Aspergillus* 属の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る。 *A. nidulans* AmyR は Zn(II)₂ Cys₆ 型の DNA 結合モチーフを有し、この領域に加えて *S. cerevisiae* と相同な領域 4 箇所(MH1 ~MH4)を持つ。これまでの解析より MH4 から C 末端側には、誘導物質からのシグナルに応答して核局在化を制御する領域が存在することが示唆されている。本研究では、この領域内のより詳細な機能解析を行った。

(方法及び結果) C 末側から MH4 までの領域(522~588aa)を順次欠失させた改変 AmyR 遺伝子を構築し、AmyR 変異体の転写活性化能と細胞内局在性を解析した。570aa までの欠失変異体は野生型と同様な性質を示したが、560aa まで欠失するとアミラーゼ遺伝子の転写活性化能を失い、核局在化を示さなかった。さらに 522aa まで欠失すると構成的転写活性化能を示し、かつ、構成的に核局在化していた。従って 560~569aa はシグナル受容に 522~559aa が核局在化の抑制に必要であると考えられる。

Mutational analysis of the signal response domain of AmyR, a transcriptional activator in *Aspergillus nidulans*

Takashi Sakaguti, Tomohiro Makita, Masashi Kato, Tetuo Kobayashi

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

P-32

麴菌 (*A.oryzae*) の転写制御因子 ATFB は固体培養後期の遺伝子発現を制御する

坂本和俊, 有馬寿英, 山田修, 秋田修 (酒総研)

麴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、赤尾らにより固体培養特異的遺伝子が数多く単離されている¹⁾。我々は、この遺伝子発現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、麴菌 EST データベースにおいて固体培養条件で出現頻度の高い転写制御因子遺伝子をリストアップし、その中から bZIP タイプ転写制御因子遺伝子を *atfB* と名付けて解析している。これまでに cDNA マイクロアレイである麴菌 NRIB3000 チップを利用して解析した結果、*atfB* 高発現株において、カタラーゼ遺伝子 *catA* を含む数十の遺伝子発現が増加することを報告した²⁾。また、これら発現が増加した遺伝子群のふすま固体培養中での発現パターンを調べた結果、培養後期においてこれら遺伝子の発現が同調して高くなっていった。

そこで今回 *atfB* の遺伝子破壊株を作成し、固体培養後期における遺伝子発現を NRIB3000 cDNA チップにて解析した結果、遺伝子破壊株で発現が低い遺伝子群は、*atfB* 高発現株にて発現が増加した上記遺伝子群の多くと一致していた。またこれらの遺伝子プロモーターには他生物種 ATF/CREB タンパク質の結合配列及びそれに類似した配列が多く見られたことから、この配列を通じて ATFB が転写制御を行っている可能性が強く示唆された。

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

2) 2004 年度農芸化学会 大会講演要旨集 p.165

ATFB controls the gene expressions at the late phase in the solid-state culture

Kazutoshi Sakamoto, Toshi-hide Arima, Osamu Yamada, Osamu Akita (NRIB)

P-33

スエヒロタケ cAMP-dependent protein kinase A 遺伝子のクローニング

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)

cAMP は真核生物における重要な情報伝達物質であり、酵母、カビにおいても細胞周期調節、胞子形成、菌糸伸長、病原性発現などに深く関与することが知られている。真性担子菌であるキノコにおいても、子実体形成時にアデニル酸シクラーゼ活性が大きく変動することなどが明らかとされており、子実体形成に深く関与すると考えられている。

本研究においては、キノコにおける cAMP の機能を更に詳しく調べるため、cAMP 情報伝達系に直接関与すると予想される cAMP-dependent protein kinase A(PKA)に着目した。キノコ類においては PKA が未同定であったため、酵母、クロボキン等の遺伝子配列を基に縮合 PCR を行い、PKA の触媒サブユニット(PKA(C))、及び調節サブユニット (PKA(R))と相同性のある遺伝子のクローニングを行った。その結果、他生物触媒サブユニットと相同性の高い遺伝子が二種類 (PKA(C)-1,2)、調節サブユニットと相同性の高い遺伝子が一種類 (PKA(R))、スエヒロタケ cDNA より見いだされた。次に、スエヒロタケにおける PKA の機能を解析するため、PKA(R)の cAMP-binding domain 中に dominant negative 変異を導入し、スエヒロタケへの遺伝子導入、強制発現を行った。現在、変異遺伝子発現株の形質変化を解析中である。

Isolation of cAMP-dependent protein kinase A in homobasidiomycete, *Schizophyllum commune*.

(Kenji Yamagishi, Toshiyuki Kimura, Masahiro Suzuki and Ko-ji Yamaki)

(National Agricultural Research Center for the Tohoku Region)

P-34

ランダムプラスミド導入による麴菌(*Aspergillus oryzae*)遺伝子破壊株の作成

山田 修, 池田涼子, 林 梨咲, 坂本和俊, 秋田 修 (酒総研)

麴菌(*Aspergillus oryzae*)は、醸造産業において広く利用されている有用糸状菌「国菌」である。また、優れたタンパク質生産能力を持つことから、有用タンパク質生産のためのホストとしても注目を集めている。近年、麴菌においても EST 解析やゲノム解析により膨大な塩基配列情報が蓄積され、これらの情報を利用した麴菌研究が大きく進む基盤が整ってきた。今後は、14,000 とも予想される麴菌遺伝子の強制発現や遺伝子破壊などの手法による網羅的解析により、麴菌有用形質の分子レベルにおける理解がさらに進展するものと期待されている。しかし、麴菌における遺伝子破壊は、その効率の低さがボトルネックとなる可能性が考えられる。そこで、プラスミドのランダム導入による麴菌遺伝子破壊株ライブラリ作成の可能性について検討することとした。

麴菌 NS4 株にプラスミド pUsC を形質転換し、300 株の形質転換体を得た。サザン解析により 1 コピー染色体挿入株 250 株を選択しゲノム抽出後、ST-PCR 法 1)によるプラスミド挿入周辺配列を増幅、シーケンス解析した。得られたシーケンスにより麴菌ゲノムデータベースを BLASTN 検索することで、染色体への挿入位置を確認した。現在のところ、50 株より塩基配列情報を取得しており、されに解析を続けている。

1) Rapid Amplification of Uncharacterized Transposon-tagged DNA sequences from Genomic DNA, Chun *et al.*, YEAST, 13, 233-240 (1997)

Gene disruption of *Aspergillus oryzae* by random plasmid transformation

Osamu Yamada, Ryouko Ikeda, Risa Hayashi, Kazutoshi Sakamoto, and Osamu Akita (NRIB)

P-35

糸状菌 *Trichoderma reesei* における *egl3* の誘導発現機構の解析

志田洋介、小笠原渉、岡田宏文、森川康 (長岡技科大・生物)

[目的]セルラーゼ高生産菌として研究されている糸状菌 *Trichoderma reesei* は、唯一の炭素源としてセルロースおよびその誘導体、単糖である L-sorbose を用いて培養したときに種々のセルラーゼを誘導生産する。これらセルラーゼ遺伝子の転写量は遺伝子によって大きく異なるが、その量比は用いた誘導物質に関わらずほとんど一定である。そのためセルラーゼ遺伝子に共通の誘導発現機構が存在すると考えられる。セロビオハイドロラーゼ遺伝子(*cbh1*, *cbh2*)に関して数種の転写調節因子が報告されているが、その他の遺伝子に関する詳細な報告はない。本研究はセルラーゼ遺伝子の中でも転写量の少ないエンドグルカナーゼIII遺伝子 (*egl3*) を研究対象として、セルラーゼの誘導発現機構と転写量に影響をおよぼす要因について新たな知見を得ることを目的としている。

[方法と結果] *egl3* の上流領域を種々の長さに削除し、その下流にレポーター遺伝子として *E. coli* 由来の β -グルクロニダーゼ遺伝子(*gus*)を挿入した GUS 発現カセットを構築した。プロトプラスト-PEG 法にて *T. reesei* の *egl3* 配座に GUS 発現カセットを導入し、形質転換体の GUS 活性を測定した。その結果、上流 1085 bp から 750 bp の間に誘導発現に重要な領域が存在することが明らかとなった。この領域内には *cbh1* の誘導発現に関与すると考えられている転写活性化因子 ACE II の推定結合コンセンサスサイトが存在した。このサイトを部位特異的変異導入によって破壊したところ、形質転換体の GUS 活性が大幅に減少した。しかし未だ誘導性を有していることから、他の調節因子の存在も示唆された。また、上流重要領域をさらに段階的に削除して、誘導発現に必要な領域を詳細に検討している。

Analysis of the *egl3* Induction Mechanism in Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*

Yosuke Shida, Wataru Ogasawara, Hirofumi Okada, Yasushi Morikawa

(Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.)

P-36

Aspergillus awamori 由来フェルロイルエステラーゼの基質認識に関わるアミノ酸残基の解析

高橋健二¹, 伏信進矢², 橋爪克己³, 小関卓也^{1,3} (¹広島大院・生物圏,²東大院農生科・応生工,³酒総研)

【目的】最近、*Aspergillus niger* フェルロイルエステラーゼ (以下 AnFAEA) の結晶構造が明らかとなり、ホモロジーモデリングにより *Aspergillus awamori* の本酵素 (以下 AwFAEA) は同じ構造を有することが分かった。また、両者は *Rhizomucor miehei* リパーゼ (以下 RmLIP) の構造とも類似しており、触媒部位である catalytic triad も同じ部位に見出されたが、リパーゼのような長鎖脂肪酸エステルに対する分解活性は見られなかった。そこで AwFAEA の活性中心近傍に位置するアミノ酸の部位特異的変異により、基質認識に関わるアミノ酸を同定し、AwFAEA の基質認識機構を明らかにする事とした。

【方法及び結果】 AnFAEA には flap 領域と呼ばれるリパーゼの Lid 領域に相当する領域が存在し、RmLIP と AwFAEA のアライメントから疎水性アミノ酸に着目し、部位特異的変異により D71I、T72R、D77I、D77N、Y80F を作成した。*Pichia pastoris* で発現させた野生型及び変異型酵素は全て活性を有する形で発現し、D71I、Y80F においては野生型にはない C16 の長鎖脂肪酸エステルに対する活性が見出された。また、D77N、D77I、Y80F はフェルラ酸メチルに対する活性が消失あるいは低下し、flap 領域が脂肪酸エステルやフェルラ酸エステルの認識に関わることが明らかとなった。さらに、D77N、D77I、Y80F は至適 pH がアルカリ側にシフトし、至適 pH の変化はズブチリンで見られるように疎水性残基への置換による表面電荷の変化が関与すると考えられた。

Functional analysis of amino acids involved in the substrate discrimination of feruloyl esterase from *Aspergillus awamori*

Kenji Takahashi¹, Shinya Fushinobu², Katsumi Hashizume³, Takuya Koseki^{1,3} (¹Hiroshima Univ., ²The Univ. Tokyo, ³Natl. Res. Inst. Brewing)

P-37

Aspergillus kawachii 由来 α -L-アラビノフラノシダーゼ B の Asn 結合糖鎖が酵素活性及び安定性に及ぼす影響

三輪陽三¹, 宮永顕正², 伏信進矢², 橋爪克己³, 小関卓也^{1,3} (¹広島大院・生物圏,²東大院農生科・応生工,³酒総研)

【目的】*Aspergillus kawachii* 由来 α -L-アラビノフラノシダーゼ B はキシラン分解を補助する酵素で、糖質分解酵素ファミリー54 に属している。我々は X 線結晶構造解析から本酵素は触媒ドメインと新規なアラビノース結合ドメインからなることを見出した¹⁾。この2つのドメイン間には Asn202 に結合している糖鎖が見出され、また、大腸菌で発現させた酵素の比活性は *Pichia pastoris* での発現酵素に比べて減少することから、Asn 結合糖鎖の酵素特性に及ぼす影響を検討した。

【方法】本酵素には Asn83(NTT)及び Asn202(NST)の Asn 結合糖鎖可能部位が存在しており、糖鎖結合モチーフのうち Thr85 及び Thr204 を部位特異的変異によって Ala に置換し、*P. pastoris* で発現させた酵素を用いて解析した。

【結果】T85A については *P. pastoris* での発現が確認されず、野生型酵素と T204A について調べた。SDS-PAGE から T204A の移動度は野生型酵素と比べて大きく、Asn202 に糖鎖が付加されていないことが示唆された。T204A は野生型に比べて速度パラメーターの k_{cat} が小さくなり、比活性が減少し、また、熱安定性も低下した。このことから Asn202 結合糖鎖は酵素活性や熱安定性に関与することが明らかとなった。

1) Miyanaga *et al.* *J. Biol. Chem.* in press

Effect of Asn-linked oligosaccharides in *Aspergillus kawachii* α -L-arabinofuranosidase B on the activity and the stability

Yozo Miwa¹, Akimasa Miyanaga², Shinya Fushinobu², Katsumi Hashizume³, Takuya Koseki^{1,3} (¹Hiroshima Univ., ²The Univ. Tokyo, ³Natl. Res. Inst. Brewing)

P-38

Pichia pastoris で発現させた *Aspergillus kawachii* 由来エンドグルカナーゼ(AkCel61)の酵素化学的性質

米原由希¹, 橋爪克己², 伊藤清^{2,3}, 小関卓也^{1,2} (¹広島大院・生物圏,²酒総研,³広島大院・先端研)

【目的】エンドグルカナーゼの中で糖質加水分解酵素(GH)ファミリー61 に分類される Cel61 は酵素特性をはじめ、触媒機構、立体構造が未知である。我々は既に *A. kawachii* から数種類のエンドグルカナーゼ遺伝子をクローニングしているが、そのうち *eglB* 遺伝子産物は Cel61 に属することが分かった¹⁾。本酵素の触媒機構等を明らかにすることの一環で、*P. pastoris* で発現させたりコンビナント酵素の性質を調べた。

【方法及び結果】*A. kawachii* *Akcel61* 遺伝子は *Pichia pastoris* によって発現し、自身のシグナル配列によりリコンビナント酵素が培地中に分泌された。培養上清から硫酸塩析と陰イオン交換カラムを用いて酵素を精製し、その酵素化学的性質を調べたところ、最適 pH 及び温度はそれぞれ pH 7.0 及び 40°C で、40°C までは安定であった。基質特異性はカルボキシメチルセルロース及び Yeast β -グルカンに対して活性を示し、また、合成基質の PNP- β -D-グルコピラノシド及び僅かながら PNP- β -D-セロピオシドに対する活性も示した。しかしながら、結晶セルロース、キシログルカン、アラビノキシランに対する活性は無かった。

1) Hara *et al.* *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 2010-2013 (2003)

Enzymatic properties of recombinant endoglucanase (AkCel61) from *Aspergillus kawachii* expressed in *Pichia pastoris*

Yuki Yonehara¹, Katsumi Hashizume², Kiyoshi Ito^{2,3}, Takuya Koseki^{1,2} (¹Bioshere Sci. Hiroshima Univ., ²Natl. Res. Inst. Brewing, ³Adv. Sci. Matter. Hiroshima Univ.)

P-39

植物根圏糸状菌 *Trichoderma harzianum* の植物根圏環境への適応における MAP キナーゼ ThMps1 の機能解析

小野大輔^{1,2}, 向坂由貴¹, 本山高幸¹, 河合良夫², 工藤俊章¹ (¹理研・中央研、²東洋大・生命科学)

【目的】*Trichoderma harzianum* は糸状菌による植物病害の生物防除に用いられる糸状菌であり、植物根圏環境への高い適応能と一部の環境汚染物質の分解能を示す。このような高い適応能のメカニズムを明らかにすることを目的として研究している。今回は糸状菌において主要な情報伝達因子である MAP キナーゼの一つ ThMps1 に注目して研究を行った。

【方法・結果】*T. harzianum* から MAP キナーゼ遺伝子 *ThMPS1* を取得した。*ThMPS1* は 413 アミノ酸、47.0 kDa の推定アミノ酸をコードし、イネいもち病菌の Mps1 と 91.3% の相同性を示した。次に、機能解析のために、*ThMPS1* の遺伝子破壊体とプロモーターを構成的で強力なものに置換した株を作成した。両方とも生育速度の低下が認められたが、セルラーゼ活性の低下は認められなかった。発表では、*ThMPS1* の植物根圏環境適応への関与について考察する。

Functional analysis of a MAP kinase ThMps1 of a plant rhizosphere filamentous fungus

Trichoderma harzianum in adaptation to the plant rhizosphere environment

Daisuke Ono^{1,2}, Yuki Mukouzaka¹, Takayuki Motoyama¹, Yoshio Kawai², Toshiaki Kudo¹

(¹Discovery Res. Institute, RIKEN, ²Fac. Life Sci., Univ. Toyo)

P-40

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の AoHSP30 遺伝子プロモーターの解析と外来遺伝子の発現制御

松下 真由美、鈴木 聡、楠本 憲一、柏木 豊 ((独)食総研)

【目的】麹菌における物質生産において強力かつ有用な遺伝子発現プロモーターの開発が望まれている。本研究では、その一環として、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の高温誘導性遺伝子を、サブトラクション法、EST 解析ならびに、ノーザン解析を用いて取得した (1)。高温誘導性遺伝子のひとつである AoHSP30 遺伝子を対象とし、そのプロモーター領域の解析を行うことを目的とした。

【方法と結果】高温誘導性遺伝子 AoHSP30 遺伝子の発現量に対する温度と時間の影響を調べるため、*A. oryzae* NFRI1599 株を 30°C で一晚培養後、30°C ~ 60°C 間の温度にて 60 分間の高温処理を行い発現量をノーザンブロットにて測定した。その結果 40°C において最大の転写が観察された。次に、AoHSP30 遺伝子の完全長 cDNA 及び、本遺伝子の 5' 上流域約 4kb を取得し、この領域の配列を解析したところ、5' 上流域にはストレス応答配列に類似の塩基配列が複数存在することがわかった。さらに、物質生産に対する温度の影響を解析するため、本遺伝子の予測翻訳開始点の 5' 上流約 2 kb のプロモーター領域を用いた GUS アッセイを行い、時間と温度変化による酵素活性の応答を測定した。形質転換株を 30°C で一晚培養後、40°C、4 時間の高温誘導により酵素活性は上昇するが、その後、30°C、2 時間の低温処理によって、酵素活性は低下した。温度により外来遺伝子産物の生産量の上昇、下降が観察された。

(1) 松下ら、日本農芸化学会 2004 年度大会講演要旨集、p 155

Analysis of a promoter region of *Aohsp30* gene from *Aspergillus oryzae* and expression of GUS gene

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

(Natl. Food Res. Inst.)

P-41

Aspergillus oryzae 分泌タンパク質の培養環境による分泌変動解析

織田 健、柿菌グララット、有馬寿英、坂本和俊、山田 修、秋田 修、岩下和裕（酒総研）

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、高いタンパク質生産能と安全性からタンパク質生産の宿主として利用されている。特に、麹菌のタンパク質高生産能は固体培養を行ったときに発揮される。また、キモシンのような異種タンパク質の場合においても同様で、固体培養での生産量は、液体培養に比較して約 500 倍も上昇する。我々は、これまでに麹菌のタンパク質分泌の全体像を明らかにするために、固体培養および液体培養条件下での分泌タンパク質と、液体培養条件下での細胞壁タンパク質のディファレンシャルディスプレイを行い、分泌タンパク質の発現プロファイルを明らかとした。そのうち、挙動に特徴のある 7 種類のタンパク質に着目し、ノーザン解析により経時的に両培養条件での遺伝子発現を確認したところ、 β -glucosidase、 α -amylase のように液体培養条件では遺伝子の発現が確認されているにも関わらず、培養液中にそれぞれのタンパク質がほとんど観察されないものが存在した。現在、これらのタンパク質生産において、分泌経路のどの段階がボトルネックであるかを明らかにするために、EGFP 等のタグで標識した 7 種類の融合タンパク質を *amyB* promoter の制御下で発現させ、融合タンパク質の局在について解析を行っている。

Analysis of secreted protein localization of *A. oryzae* in different culture conditions.

Ken Oda, Dararat Kakizono, Toshi-hide Arima, Kazutoshi Sakamoto, Osamu Yamada, Osamu Akita, Kazuhiro Iwashita (NRIB)

P-42

麹菌 *A. oryzae* の新規ポリケタイド合成酵素遺伝子 *csyA* の機能解析

勢 康代¹、藤井 勲²、Praveen Rao Juvvadi¹、北本勝ひこ¹（¹東大院・農生科・応生工、²東大院・薬）

【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群であり、医薬品資源として重要な地位を占めている。我々はこれまでに、*A. oryzae* のポリケタイド生産能を検討することを目的とし、ゲノムデータベースを利用して網羅的な検索を行い、典型的なドメイン構造をもつ 30 種のタイプ I ポリケタイド合成酵素 (PKS) 遺伝子を見出した。また、植物に普遍的に存在する Chalcone synthase superfamily 型のタイプ III PKS 遺伝子を 4 つ見出し、*csyA*、*csyB*、*csyC* および *csyD* と命名した。これまで糸状菌においてタイプ III PKS 遺伝子の機能解析の報告がないことから各遺伝子の発現条件の確認を行い、機能の解析を試みた。

【方法および結果】DPY 液体培地で 1-7 日間培養した *A. oryzae*RIB40 株から調製した RNA に対して、*csyA*、*csyB*、*csyC* および *csyD* 遺伝子の推定アミノ酸配列をもとに設計したプライマーを用い RT-PCR を行った。今回検討した培養条件では *csyC* 以外の 3 遺伝子の発現が認められ、各遺伝子の発現様式は異なっていた。また、*csyA* 遺伝子に関して 5'RACE、3'RACE を行い、全長 cDNA を取得して配列を決定したところ、2 つのイントロンを含み、402 アミノ酸からなる分子量 43.5 kDa のタンパク質をコードしていた。得られた *csyA* の cDNA を用い、大腸菌による組換え CsyA タンパク質を生産する系を構築した。現在、CsyA タンパク質の基質と生成物の探索を行っている。

Characterization of a novel polyketide synthase gene, *csyA*, from *Aspergillus oryzae*.

Yasuyo Seshime¹, Isao Fujii², Praveen Rao Juvvadi¹, Katsuhiko Kitamoto¹

(¹Dept. of Biotechnology., Univ. of Tokyo, ² Grad School of Pharm. Sciences, Univ. of Tokyo)

P-43

アカパンカビ DNA 修復遺伝子 *ncRAD4* 破壊株の作製と解析

星野正幸, 都甲 建, 一石昭彦 (東洋大・生命科学部)

出芽酵母 *S.cerevisiae* *RAD4* 遺伝子は、ヌクレオチド除去修復機構において、損傷塩基の認識に関与していることが知られている。出芽酵母の *RAD4* 遺伝子に相同な遺伝子をアカパンカビゲノムから探し出すため、アカパンカビゲノムプロジェクトデータベースを元に検索した。その結果、出芽酵母 Rad4 タンパク質の N 末端部分と相同性を示すタンパク質をコードしている遺伝子を見つけ、この遺伝子を *ncRAD4* と名付けた。

DNA 修復における *ncRAD4* 遺伝子の機能を調べるため、*ncRAD4* 遺伝子の両末端約 1.5kb の DNA フラグメントの間に選択マーカーとしてハイグロマイシン B 耐性遺伝子を挿入した DNA 断片を Fusion-PCR により作製し、この DNA 断片を相同組換えによって *ncRAD4* 遺伝子と置き換え、*ncRAD4* 遺伝子破壊株を作製した。

この変異株の紫外線に対する生存曲線を調べた結果、*ncRAD4* 遺伝子破壊株は野生株と同程度の感受性しか示さなかった。その理由として、アカパンカビには紫外線損傷に対する修復機構として、NER の他に第二除去修復機構が関わっていることが明らかになっており、この修復機構により *ncRAD4* 破壊株では UV に対しての感受性がないと推測した。そこで、第二除去修復機構 UVDR に欠損をもつ *mus-18* 変異株との二重変異株を作製し、同様の方法で紫外線に対する感受性を調べた結果、*mus-18* 変異株に比べて、二重変異株ではさらに高い感受性を示した。この結果から、*ncRAD4* 遺伝子が DNA 修復機構に関与していることが示唆された。現在、この *ncRAD4* 遺伝子がヌクレオチド除去修復機構で機能しているかを調べるため、他の DNA 修復に関与する遺伝子変異株との多重変異株を作製中である。

Characterization of DNA repair gene *ncRAD4* mutant of *Neurospora crassa*

Masayuki Hoshino, Takeru Tokoh, Akihiko Ichiishi

(Toyo Univ., Fac. Life Sciences)

P-44

ロイシン要求性を利用した麹菌の新規な宿主ベクター系の開発

石田 博樹、小島 泰弘、秦 洋二、川戸 章嗣、安部 康久、柏木 豊¹ (月桂冠総研・¹食総研)

麹菌 *Aspergillus oryzae* の物質生産では、発現プラスミドの染色体上への導入位置と導入コピー数とその生産性に大きく影響し、さらに染色体上への導入位置と導入コピー数は、形質転換に用いる選択マーカー遺伝子に依存すると考えられている。すなわち新規な選択マーカー遺伝子を利用した宿主ベクター系を構築することで、従来とは異なる物質生産特性を示す宿主ベクター系の開発が可能であると考えられる。そこで、本研究では麹菌 *A. oryzae* O-1013 由来の栄養要求性変異株の取得と当該相補遺伝子のクローニングを試みた。

麹菌 *A. oryzae* O-1013 の分生子に対して紫外線照射による突然変異を導入した。生存率 1% の紫外線照射によりロイシン要求性変異株 *A. oryzae leu-5* を取得した。当該変異を相補する遺伝子のショットガンクローニングのため、大腸菌プラスミドによる麹菌ゲノムライブラリーを *A. oryzae leu-5* 株へ形質転換した。得られた形質転換体のゲノム DNA から回収した遺伝子の解析から、相補遺伝子は β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼをコードする *leuA* であった。*leuA* は、386 アミノ酸残基をコードしており、4 つのイントロンを有していることが明らかとなった。また *leuA* を有するプラスミドを *A. oryzae leu-5* 株と *A. oryzae leu-5N* 株 (*leuA*-, *niaD*-)へ形質転換した結果、その形質転換体のサザン解析により 1 から 4 コピーの遺伝子導入が確認された。よって、*leuA* はロイシン要求性変異を相補でき、従来とは異なる座位への遺伝子導入を可能とすることが示された。得られた *leuA* を選択マーカーとして、*sodM*¹ プロモーターによるタンパク質生産についても検討する。

¹特開 2001 - 224381

Construction of a novel host-vector system with leucine auxotrophy in *Aspergillus oryzae*.

Hiroki Ishida, Yasuhiro Kojima, Yoji Hata, Akitsugu Kawato, Yasuhisa Abe, Yutaka Kashiwagi¹ (Gekkeikan

sake.co.ltd., ¹National Food Research Institute)

P-45

いもち病菌ミニクロモソーム由来の3種の新規レトロトランスポゾン

曾根輝雄, *小口晃央, *菊池 久, **妹尾彰宏, **中川 智, 富田房男 (北大院農・*NITE・**ザナジェン)

イネいもち病菌の多くの菌株には2Mb以下の大きさのミニクロモソームが存在することが知られている。現在公開されている本菌のゲノム配列の解析に用いられている、稔性の高いイネ病原菌にはこのミニクロモソームは存在しない。日本産イネいもち病菌圃場分離株 9439009 (レース 001) より、パルスフィールドゲル電気泳動法により1.6Mbのミニクロモソームを分離・回収し、pCR-TOPOベクターを用いてショットガンライブラリーを作成した。このうち28800クローン両端の塩基配列を決定し、アッセンブルを行ったが、少数のコンティグへの収束がみられなかった。その原因の1つは、多量の反復配列の存在であると示唆されたため、71種の反復配列をConsedからマニュアルで抽出した。これらの配列の中には3種の新規レトロトランスポゾンが含まれていた。

この3種のレトロトランスポゾンのうち、2種は*pol* 遺伝子産物のアミノ酸配列レベルで58.8%の高い相同性を示し、*inago 1* と *inago 2* と命名された。これらは構造的に *Gypsy/Ty3* ファミリーに属する。興味深いことに、これらの因子のLTRはそれぞれいもち病菌ゲノム中に単独に存在する反復配列である MGR608, REP1 であった。残り1種は *pol* 遺伝子の構造から *Copia/Ty1* ファミリーに属するものと考えられ、*swarm* と命名された。いもち病菌からの *Copia/Ty1* 様因子の報告は、これが最初である。現在、これらの因子のコピー数、発現解析等を行っている。

Three novel retrotransposons from *Magnaporthe grisea* mini-chromosome

Teruo Sone, *Akio Oguchi, *Hisashi Kikuchi, **Akihiro Senoh, **Satoshi Nakagawa and Fusao Tomita

(Grad. Sch. Agr., Hokkaido Univ., * NITE, **XANAGEN)

P-46

糸状菌 *Aspergillus nidulans* における形態形成に関与する新規転写制御因子

倉持太一, 藤岡智則, 山形洋平, 阿部敬悦, 中島佑 (東北大院・農・応生科)

真菌のストレス応答機構の解明は出芽酵母において最も研究が進んでいる。その中で重要な役割を担っているものの一つに転写制御因子 Msn2p がある。Msn2p は様々なストレス応答に応答する zinc finger 型の転写制御因子である。糸状菌は単細胞の酵母と異なる多細胞生物であるため、ストレスに対する応答が異なることが予想される。そこで、本研究では糸状菌独自のストレス応答機構を解明するため、糸状菌のモデル生物である *A. nidulans* における Msn2p ホモログの機能解析を目的とした。*A. nidulans* のゲノムデータベースより zinc finger domain を有し、Msn2p と最も高い相同性を示す配列を *A. nidulans* の cDNA ライブラリーよりクローニングした。Msn2p の認識配列 (STRE 配列) と *lacZ* が結合しているレポーター遺伝子を組み込んだ出芽酵母に、この推定 Msn2p ホモログを導入し、レポーターアッセイを行った。しかしながら β -galactosidase 活性は確認されなかった。このことより、本遺伝子は Msn2p のホモログではなく *A. nidulans* において特有の機能を持っている遺伝子であることが示唆された。そこで、*A. nidulans* において本遺伝子の破壊株を造成した。破壊株は菌糸成長が無いという野性株と大きく異なる表現型を示した。また、破壊株では単位面積あたりの分生子数が野性株と比較し5倍多く、また、本遺伝子を高発現した株では約半分に減少していることが明らかになった。さらに、破壊株は液体培養においても分生子形成が確認された。以上より、本遺伝子は分生子形成に関与する新規の転写制御因子であることが示唆された。

A novel transcriptional regulatory factor involved in morphogenesis in *A. nidulans*

Taichi Kuramochi, Tomonori Fujioka, Youhei Yamagata, Keietsu Abe, Tasuku Nakajima

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

P-47

麹菌 *A.oryzae* における SNARE タンパク質の網羅的解析

倉都将宏, 正路淳也, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】 真核生物の細胞内において小胞輸送に関わる SNARE タンパク質は、輸送小胞とターゲットオルガネラ膜の結合及び融合の特異性を担う。近年、出芽酵母と糸状菌の間で細胞内分子機構の差異が次第に見出されつつあり、SNARE タンパク質に関しても糸状菌において出芽酵母とは異なる細胞内局在を有している可能性が示唆されている。現在、*A.oryzae* の SNARE について出芽酵母のホモログとして 21 個のタンパク質が予想されており、この内 Sed5p、Pep12p/Vam3p のホモログに関しては、既にその局在を明らかにしてきた。本研究においては、糸状菌細胞を小胞輸送という側面から細胞生理学的に理解し細胞内構造の全体像を捉えるために、*A.oryzae* において予想されている SNARE タンパク質残り 19 個の局在を、EGFP を用い網羅的に解析することを目的とする。

【方法及び結果】 *A.oryzae* において SNARE タンパク質をコードすると予想される遺伝子に対し、MultiSite Gateway™ Cloning System を用いることにより *egfp* との融合遺伝子を発現するベクター(各遺伝子の 5'末端側に *egfp* を融合)を順次構築し、*A.oryzae* NS4 株へ形質転換を行っている。さらに、蛍光顕微鏡を用いて各形質転換株の EGFP 蛍光を確認し、その局在を細胞染色等の結果と比較することにより各 SNARE タンパク質の細胞内局在部位を観察する予定である。これまでに *TLG2*、*UFE1* のホモログ(*Aotlg2*、*Aoufe1*)について形質転換株を取得したが、本来の promoter 下において融合遺伝子を発現させた形質転換株では EGFP 蛍光を確認することができなかった。このため *amyB* 及び *thiA* promoter 下において融合遺伝子を発現する高発現用ベクターを用いて形質転換を行った結果、得られた形質転換株について EGFP 蛍光が観察された。出芽酵母において *Tlg2p* は late Golgi、*Ufe1p* は ER に局在するため、EGFP-Ao*Tlg2p* を発現する株に対しては FM4-64、EGFP-Ao*Ufe1p* を発現する株に対しては ER-Tracker を用いた細胞染色によって局在部位の同定を行っている。今後、その他の SNARE タンパク質について解析を進めていく予定である。

Comprehensive analysis of SNARE proteins in *Aspergillus oryzae*.

Masahiro KURATSU, Jun-ya SHOJI, Manabu ARIOKA, Katsuhiko KITAMOTO

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

P-48

糸状菌 *Aspergillus niger* におけるシアン非感受性呼吸系酵素遺伝子(*aox1*)の破壊によるクエン酸生産性の激減

草井 啓, 服部 貴澄, 木野 邦器, 桐村 光太郎 (早大・理工・応化)

【目的】 クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* WU-2223L は、シアン感受性呼吸系としてのチトクロム鎖とは別に、シアン非感受性でサリチルヒドロキسام酸 (SHAM) 感受性の呼吸系を有する^{1,2)}。当該呼吸系を阻害して培養すると、クエン酸生産が著しく減少することを明らかにしている²⁾。本研究では、当該呼吸系を構成する酵素 alternative oxidase をコードする遺伝子 *aox1* の破壊により、供試菌におけるクエン酸生産が著しく低下することを明らかにした。

【方法と結果】 *A. niger* の *aox1* 遺伝子は既にクローニングしており¹⁾、この一部を欠損させた遺伝子破壊用プラスミドを用いて、プロトプラスト-PEG 法により *aox1* 遺伝子破壊株を取得した。遺伝子破壊はサザン解析とノーザン解析により確認した。alternative oxidase 活性およびシアン非感受性の呼吸活性の測定により、遺伝子破壊株において予想通り alternative oxidase の消失を確認した。遺伝子破壊株のクエン酸生産量は原株の *A. niger* WU-2223L と比較して著しく低下し、alternative oxidase のクエン酸生産への寄与を明らかにした。

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

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

Drastic Decrease of Citric Acid Production by Disruption of the Gene (*aox1*) Encoding a Cyanide-Insensitive Alternative Oxidase in *Aspergillus niger*

Kei KUSAI, Takasumi HATTORI, Kuniki KINO, Kohtarō KIRIMURA

(Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Engineer., Waseda Univ.)

P-49

ウシグソヒトヨタケにおけるゲノム情報を利用した BAC contigs の作成

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の Okayama-7 株を用いたゲノムプロジェクトがアメリカ MIT において昨年 (2003.6) にほぼ完了し、ドラフトシーケンスが利用可能になっている。このゲノム情報を利用して、これまでに構築してきた BAC ライブラリー中のクローンを公開されているゲノムシーケンス上に位置付けたので、その現状について報告する。当研究室では、KF3#2 株と #326 株を両親とした F1 子孫をマッピング集団として連鎖地図を作成し、そのマッピング集団中の 1 株、MP#2 株のゲノム DNA を用いて BAC ライブラリーを構築してきた (昨年度報告)。その後 BAC クローンの Fingerprint contig (FPC) 解析を行い、約 29 Mbp を FPC でカバーするに至った。FPC 解析の過程で作られるインサートの HindIII 断片長ファイル (*.size) をフリーソフト BACFinder を使って処理し、ヒトヨタケゲノム情報より得られる HindIII 断片長パターンと比較することで、BAC クローンの約 15% を公開されているヒトヨタケゲノム情報中に位置付けることができた。BACFinder でヒットしたクローンの多くは、第 I, II, IV, V, VI, VIII, XII の各染色体に位置付けられた。MP#2 株のこれら染色体は、連鎖地図作成過程のマーカー分離状況から判断すると、#326 由来の染色体部分を多く持っている。#326 株はゲノムプロジェクトに供された Okayama-7 株と共通の祖先を持っており、この事実とマーカーの分離状況および BACFinder によるヒット結果とは、互いによく一致している。また、BACFinder によって BAC クローンを位置付けることのできない第 III, VII, IX, X, XI, XIII 染色体は KF3#2 株由来であり、KF3#2 株と Okayama-7 株のこれらの相同染色体は Fingerprint に関して大きく異なっていると推察された。

Construction of BAC contigs using the draft assembly of *Coprinus cinereus*

Hajime Muraguchi, Sonoe O. Yanagi

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

P-50

Aspergillus saitoi 1,2- α -mannosidase のシステイン残基の熱安定性への寄与

多田羅洋太, 吉田孝¹, 一島英治 (創価大院・工, ¹弘前大・農学生命)

A. saitoi 1,2- α -mannosidase⁽¹⁾ は 3 つのシステイン残基を持つ。このうち Cys334 と Cys363 はジスルフィド結合を形成し、Cys443 は遊離のチオール基を含んでいた。これらのシステイン残基の役割を探索するために部位特異的変異を行い、*A. oryzae* を宿主として変異遺伝子の発現を行った。C334A, C363A, C443A の変異酵素のカイネティックパラメーターは野生型酵素とほぼ同じ値を示した。このことから、本酵素のシステイン残基は活性に影響をあたえないことが明らかとなった。円二色性 (CD) による熱変性温度 (T_m) の測定を行った。野生型酵素と C334A, C363A の T_m はそれぞれ 55.8, 49.6, 49.6 °C となった。この結果から、Cys334 と Cys363 はジスルフィド結合を形成して、酵素の熱安定性に寄与していることが示された。Cys443 については A, D, F, I, N, L, S, T, V, Y への 11 種類の変異を行った。このうち C443F, C443I, C443N, C443Y は変異酵素が分泌されなかった。これらの変異酵素はミスフォールディングをおこし、宿主の品質管理システムにより除去されたと考えられる。C443D, C443L, C443V は酵素活性がわずかに見られたが、CD スペクトルから、変性したタンパク質の立体構造をとっていることが考えられた。C443A, C443S, C443T の δT_m は野生型酵素と比較してそれぞれ、-3.9, -5.8, -3.0 °C となった。これらの結果から、Cys443 はジスルフィド結合を形成しないにもかかわらず、分子構造ならびに熱安定性に寄与していることが明らかとなった。

参考文献⁽¹⁾Tatara, Y. *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 25289-94

Cysteine residues of *Aspergillus saitoi* 1,2- α -mannosidase contribute to thermostability

Yota Tatara, Takashi Yoshida¹, Eiji Ichishima

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

P-51

不完全菌 *Aureobasidium pullulans* における GH ファミリー10 キシラナーゼ遺伝子の発現量は培養の pH に依存する

田中秀典, 長澤真由子, 六車三治男, 太田一良 (宮崎大・農・応生科)

【目的】 *A. pullulans* var. *melanigenum* ATCC 20524 株は既報の Glycosyl Hydrolase(GH)ファミリー11 に属する好酸性キシラナーゼ (至適 pH 2.0, 分子量 24 kDa) とともに GH ファミリー10 に属し, 至適 pH 6.0 のキシラナーゼ (分子量 39 kDa) を菌体外に生産する。本報では, この GH ファミリー10 キシラナーゼをコードする遺伝子 *xynII* の構造を明かにし, 培養 pH による *xynII* 遺伝子の発現調節を解析した。

【方法・結果】 キシランを炭素源とし, 0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.0)を含む液体培地にて本菌株を 30°C で 3 日間振とう培養した。その培養ろ液から精製した GH ファミリー10 キシラナーゼの N 末端と内部アミノ酸配列をもとにプライマーを作成し, 染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。その増幅断片(650 bp)をプローブとして染色体 DNA から 9.0 kbp の *EcoRI* 断片をクローニングした。さらにサブクローニングした 3.8 kbp の *XbaI-KpnI* 断片の塩基配列を決定した。3.8 kbp 断片中のキシラナーゼ遺伝子 *xynII* には 2 ヶ所のイントロンが存在し, その ORF は 26 アミノ酸残基の分泌シグナルを含む 361 残基からなるタンパク質をコードした。成熟タンパク質の推定分子量は 37,344 Da, 等電点は 8.4 であった。上述の緩衝液を含む液体培地で培養した菌体から cDNA を合成し, pH 6.0 における *xynII* 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で定量した結果, 緩衝液を用いない酸性の培養条件下に比べて 10 倍以上高かった。また, 本遺伝子の上流領域には *Aspergillus nidulans* に見出され, pH に応答する転写活性化因子 PacC のモチーフ 5'-GCCARG が存在した。

Expression levels of GH family 10 xylanase gene in *Aureobasidium pullulans* depend on ambient pH

Hidenori Tanaka, Mayuko Nagasawa, Michio Muguruma, Kazuyoshi Ohta

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

P-52

糸状菌 *Trichoderma reesei* PC-3-7 由来 *exo-β-D-glucosaminidase* 遺伝子の cDNA の Cloning および Northern 分析

池 正和, 勇 光治, 小笠原 渉, 岡田 宏文, 森川 康 (長岡技大・生物)

<目的>我々はこれまでに、糸状菌 *Trichoderma reesei* PC-3-7 株由来 *exo-β-D-glucosaminidase* の精製を行い、その性質を明らかにしてきた。また、本酵素の染色体 DNA 遺伝子 (*gls93*) を単離し、塩基配列の決定を行った。その結果、本酵素は、相同性は低いものの糖質加水分解酵素 family 2 に属すると推測している。しかし、本菌における *gls93* の発現解析、cDNA の cloning および異種宿主での発現などはまだなされていない。そこでまず、本酵素の cDNA の cloning および発現状況の解析を行った。

<方法および結果> *T. reesei* PC-3-7 株を様々な炭素源で培養した菌糸より RNA を抽出し、*gls93* 染色体 DNA 部分断片を probe として Northern hybridization を行った。その結果、*N*-acetylglucosamine (GlcNAc) を炭素源としたとき、*gls93* には 2 段階の転写時期があることが判明した。このことから、*gls93* の発現には複数の調節因子が関与していると考えられる。また、*gls93* の 2 つの転写時期は、本菌由来 46 kDa chitinase 遺伝子とほぼ同様であった。

また、*gls93* の転写量が多い条件で培養した菌糸から抽出した RNA を用いて cDNA library を構築し、*gls93* cDNA を cloning した。現在塩基配列の決定を行っている。

cDNA Cloning and Northern Analysis of Exo-β-D-Glucosaminidase Gene from

Filamentous Fungus *Trichoderma reesei* PC-3-7

Masakazu Ike, Koji Isami, Wataru Ogasawara, Hirofumi Okada, Yasushi Morikawa

(Dept. of BioEng., Nagaoka Univ. of Tech.)

P-53

Aspergillus oryzae のグルカナーゼ遺伝子の機能解析

池田佳広, 一宮維幸, 北本勝ひこ, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は栄養飢餓の環境下で自己溶菌することが知られている。自己溶菌時には細胞壁構造が崩壊する事から、その主要構成多糖であるキチン及びグルカンを分解する酵素であるキチナーゼ及びグルカナーゼの発現量が増加していると考えられる。自己溶菌時には栄養条件の枯渇が予想される事から、貧栄養条件下で生産されているキチナーゼ及びグルカナーゼは自己溶菌に関与している可能性が高い。本研究では、貧栄養条件下で発現しているグルカナーゼ遺伝子の機能の解析を目的とした。

麹菌の EST 情報を利用し貧栄養条件下で発現している 3 種類のグルカナーゼ遺伝子を見出した。これらについてゲノム情報をもとにプライマーを作製し、PCR により遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物をそれぞれ *amyB* プロモーター下に挿入し、*A. oryzae* 中で高発現させるためのプラスミドを作製した。これらプラスミドを用いて *A. oryzae* の形質転換を行ない、多数の形質転換体を得た。また既に作製していた *A. oryzae* のキチナーゼ遺伝子 *AochiA* または *AochiB* を高発現する株¹⁾ に対しても形質転換を行ない、多数の形質転換体を得た。現在、これらの株についてその表現型の解析を行なっている。

1) 一宮ら、第 4 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 (2004)

Functional analysis of genes encoding glucanases of *Aspergillus oryzae*.

Yoshihiro Ikeda, Masayuki Ichinomiya, Katsuhiko Kitamoto, Hiroyuki Horiuchi, and Akinori Ohta

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

P-54

Aspergillus 属 Hap 複合体アセンブリ機構の *in vitro* 解析

中村麻里子, 合田秀矢, 伊東達雄, 小林哲夫, 加藤雅士 (名大院・生命農)

[目的] CCAAT-box 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である。*Aspergillus* 属 Hap 複合体は CCAAT-box に結合し転写を促進する。この複合体には少なくとも HapB, HapC, HapE の 3 種類のサブユニットが存在し、これらが三量体を形成して CCAAT-box に結合する。以前の研究から *hapC* 欠失株中では HapE タンパク質が安定に存在し得ないことが示されている。本研究では HapC による HapE の安定化の機構および Hap 複合体のアセンブリ様式を *in vitro* で解析した。

[方法と結果] ウサギ網状赤血球翻訳系により ³⁵S 標識 HapB, HapC, HapE サブユニットの *in vitro* 合成を行い解析に用いた。その結果、HapB および HapC は可溶性画分に安定に存在するのに対し、HapE は *in vitro* 合成後すぐに不溶性の沈澱物を形成してしまうことが明らかとなった。この HapE の不溶性沈澱物の形成は HapC の添加により顕著に抑制された。また、pull down assay による解析から、まず HapC と HapE がヘテロ二量体を形成し、これに第 3 のサブユニットである HapB がアセンブリして三量体を形成することを示す結果を得た。以上の結果とこれまでに明らかにされた知見を総合すると、HapE は単独では安定なコンフォメーションをとれないが、HapC とヘテロダイマーを形成することにより HapE の疎水性部分がマスクされることで不溶化が防がれ安定化される。その後、この HapC/HapE 二量体に HapB がアセンブリして三量体が形成され初めて DNA に結合できる形となり、これと同時に核への移行が起こるという機構が示唆された。

In vitro analysis on the assembly mechanisms of the *Aspergillus* Hap complex.

Mariko Nakamura, Hideya Goda, Tatsuo Ito, Tetsuo Kobayashi, Masashi Kato

(Grand. Sch. of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.)

P-55

麹菌 *A. oryzae* における 2つの分泌型ホスホリパーゼ A₂ の生理機能の解析

中濱智之, Angelo Bolchi*, Simone Ottonello*, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工, *Dept. of Biochem. Mol., Univ. of Parma, Italy)

【目的】分泌型ホスホリパーゼ A₂(sPLA₂)はグリセリン脂質の2位のエステル結合を加水分解し、脂肪酸とリゾリン脂質を遊離する酵素である。哺乳類においては約10個のsPLA₂遺伝子が見出され機能解析が行われているが、微生物由来のsPLA₂の生理的な役割は殆ど明らかにされていない。本研究では麹菌の持つ2つのsPLA₂ (SpaA, SpaB)の解析を行った。

【方法】これまでに組換え SpaA タンパク質の至適 pH は酸性側であることが分かっていたが、今回作製した組換え SpaB タンパク質は至適 pH を中性からアルカリ性に持つことが明らかとなった。また、高発現株を用いた解析から、SpaA は主に培地中に分泌され、SpaB は分泌されず菌体内に局在することが確認されている。SpaA、SpaB タンパク質の細胞内における局在をさらに詳細に調べるために、両タンパク質の全長、または予想 C 末端に GFP を連結した融合タンパク質を *amyB* プロモーターの制御下で発現する株を作製した。それらの株の細胞内蛍光を観察したところ、SpaA と SpaB は異なった局在を示した。これらの結果より、SpaA、SpaB の持つ生理的作用の違いが強く示唆された。現在、様々なオルガネラ染色試薬との共染色によって局在部位の同定を行っている。さらに、両遺伝子の単独破壊株と二重破壊株を作製し、それらの株を用いて様々な培地において生育比較を行った。しかし現在のところ野生株との目立った生育の違いは観察されていない。両遺伝子の発現する培養条件を明らかにするため、予想プロモーター領域 1.5 kb を GFP に連結したレポーターアッセイの系を確立し検討を行っている。

Molecular characterization of two secretory phospholipases A₂ in *Aspergillus oryzae*.

Tomoyuki Nakahama, Angelo Bolchi*, Simone Ottonello*, Manabu Arioka, and Katsuhiko Kitamoto (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, *Dept. of Biochem. Mol., Univ. of Parma, Italy)

P-56

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, 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、構成遺伝子の発現および機能解析を目的とした。

【結果】 酵母 MAL6 クラスターのマルトースパーミアーゼ 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結果、グルコースに対しマルトースを炭素源とする培地条件で malP、malT の発現が高く、マルトースによる発現誘導が行われているものと考えられた。malR はどの培地でも同様に発現が見られ、構成的に発現しているものと思われた。また、酵母マルトースパーミアーゼ欠損株に malP を相補したところ、マルトースを炭素源とする培地で生育がみられ、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。しかし、転写因子欠損酵母に malR を導入しても相補しなかった。一方、麹菌の malR 破壊株では、malP、malT のマルトース誘導性発現が失われたことから、これらの遺伝子の発現に転写因子 MalRp が関与していることが分かった。さらに、麹菌の malP 破壊株、malR 破壊株に GUS 遺伝子を導入し、菌体内 GUS 活性を測定したところ、いずれの培地でも野生株よりも活性が低かった。これは α -アミラーゼ活性についても同様であった。一方、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の高い配列群についてはマルトース誘導性の発現は見られず、マルトースの取り込みならびに資化には MAL クラスターが中心となって機能しているものと思われた。

Expression and functional analyses of gene clusters involved in maltose utilization in *Aspergillus oryzae*

Sachiko Hasegawa, Katsuya Gomi (Div. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Univ. of Tohoku)

P-57

プロセッシングプロテアーゼ (KexB) の欠損が麹菌細胞壁合成に及ぼす影響

椎名松子, 水谷治, 山形洋平, 阿部敬悦, 中島佑 (東北大・応生科)

【目的】我々は、麹菌のプロセッシング酵素をコードする *kexB* 遺伝子の破壊について報告してきた。¹*kexB* 遺伝子破壊株は、プレート培養で分生子形成能が著しく低下し、多分岐で密な菌糸を形成した。これらの表現型の変化は、高浸透圧条件下で野生株と同等にまで復帰した。さらに *kexB* 遺伝子破壊株のトランスクリプトーム解析から、*chsB*、*chsC*、*gelB* などの細胞壁合成関連酵素遺伝子群の転写レベルの上昇が明らかになった。これらのことから *kexB* 遺伝子破壊は、細胞壁合成に何らかの影響を与えていることが示唆された。そこで、本研究では麹菌 KexB の欠損が細胞壁組成及びその合成遺伝子群にどのような変化を及ぼしているかを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】*kexB* 破壊株と野生株のプレート培養における細胞壁組成を調べた。その結果、*kexB* 破壊株では野生株と比較して細胞壁のグルカン含量が約半分に減少し、逆にキチン含量は約 1.5 倍に増加していた。一方、高浸透圧下ではその組成は野生株と同等であった。さらに細胞壁の化学構造についてグルカンを中心として解析を行っている。また、各細胞壁合成関連酵素の活性についても測定している。 1) 水谷ら農芸化学会 2002 年度大会講演要旨集 p.204

The defect of *kexB* gene alters the cell wall synthesis in *A. oryzae*

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

P-58

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* の菌体内 β -グルコシダーゼの機能解析

塚田剛土, 吉田 誠, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)

糸状菌のセルロース分解は一般に、セルラーゼによって切り出されたセロビオースを菌体外 β -グルコシダーゼ(BGL)がグルコースに分解し、菌体内に取り込まれるという経路で理解されてきた。しかし、担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* においては、セルロース培養系で菌体外に生産される唯一の BGL が、セロビオースではなく β -1,3-グルカンを基質とすることが明らかとなり、この酵素をセロビオース代謝に位置づけることが難しくなっている。そこで本研究では、多くの糸状菌でその存在が知られている菌体内の BGL に注目し、この酵素の機能解析を行うことで、セロビオース代謝への関与を明らかにすることを目的として研究を行った。

データベース上に公開されている糸状菌の菌体内 BGL のアミノ酸配列情報をもとに、*P.chrysosporium* ゲノムデータベースに対して BLAST 検索を行ったところ、高い相同性を示す領域が 2カ所見いだされたことから、本研究ではこれらの遺伝子のクローニングを行った。その結果、これらの遺伝子はどちらも糖質加水分解酵素(GH)ファミリー1に属する菌体内 BGL とのみ高い相同性を示した。現在、大腸菌を宿主として組換え BGL を生産し、その機能解析を行っている。

Characterization of intracellular β -glucosidases from the basidiomycete

Phanerochaete chrysosporium

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

P-59

アカパンカビにおける DNA 修復遺伝子 *mus-44* の機能解析

都甲 建, 仁木孝治, 一石昭彦 (東洋大・生命科学)

アカパンカビ *mus-44* 遺伝子は、出芽酵母 (*S.cerevisiae*) *RAD10* 遺伝子の相同遺伝子である。出芽酵母の *RAD10* 遺伝子はヌクレオチド除去修復に関与し、損傷DNAの5'側を切断するエンドヌクレアーゼである。アカパンカビゲノムプロジェクトデータベースで検索した結果、*mus-44* は第VI連鎖群の左腕に位置することがわかった。*mus-44* は DNA 結合に重要な helix-hairpin-helix モチーフを持ち、他の生物の相同遺伝子との間に高い相同性を示す。これは修復遺伝子が、その機能の特性上、種を越えて高度に保存されていることを示唆していると考えられる。

RIP 法を用いて *mus-44* 遺伝子に変異を導入し、*mus-44* 変異株を作製した。この *mus-44* 変異株の変異原に対する感受性をスポットテストにより調べたところ、紫外線、4NQO に対して感受性を示し、MMS に対する感受性は示さなかった。さらに紫外線照射に対する生存曲線を調べた結果、すでにヌクレオチド除去修復に関与している *mus-38* 変異株と同じ曲線を描いた。*mus-38* 遺伝子は出芽酵母 *RAD1* の相同遺伝子であり、*RAD10* との間で複合体を形成することが知られている。また、他の修復経路の変異株である *mei-3* (組換え修復)、*uvs-2* (複製後修復)、*mus-18* (UVDR) 変異株との二重変異体を作製し、同様の方法で感受性を調べたところ、それぞれ単一の変異株よりも二重変異体の方が高い感受性を示した。以上のことから *mus-44* がヌクレオチド除去修復に関与していることが確認された。

Characterization of *Neurospora crassa mus-44* mutant.

Takeru Tokoh, Takaharu Niki, Akihiko Ichiishi

(Toyo Univ. Fac. Life Sciences)

P-60

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞壁構築シグナル伝達に関与する転写制御因子遺伝子 *rlmA* の機能解析

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曝される、または細胞壁に損傷を受けると、cell wall integrity pathway と呼ばれる MAP キナーゼシグナル伝達経路がその刺激を核に伝え、細胞壁合成関連遺伝子の発現を制御し細胞壁の再構築を行う。本研究では糸状菌の複雑な細胞壁生合成機構の解明に向け、これまでに *S. cerevisiae* のこの経路における最も主要な転写制御因子遺伝子 *RLM1* のホモログを糸状菌のモデル生物 *Aspergillus nidulans* の cDNA ライブラリーからクローニングし、*rlmA* と名付けた。*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。これより *rlmA* の細胞壁合成への関与が示唆された。また、*rlmA* Δ において数種の細胞壁合成関連遺伝子のノーザン解析を行ったところ、野生株とほとんど差のない発現様式を示し、*S. cerevisiae rlm1* Δ での結果と大きく異なっていた。以上の結果から、*A. nidulans* の cell wall integrity pathway によるストレスシグナル伝達における RlmA への依存度は非常に小さいと考えられ、*S. cerevisiae* と異なる制御機構の存在が示唆された。

Functional analysis of *Aspergillus nidulans rlmA* gene encoding a transcription factor involved in cell wall integrity signaling.

Tomonori Fujioka, Kentaro Furukawa, Osamu Mizutani, Keietsu Abe, Youhei Yamagata, Tasuku Nakajima

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

P-61

担子菌シイタケから単離した分裂酵母 *cdc5*⁺相同遺伝子とその発現産物の解析

宮崎 安将 (森林総研), 城島 透 (理研), 小野 剛, 山崎 丘, 宍戸 和夫 (東工大院)

担子菌シイタケから出芽酵母 *Schizosaccharomyces pombe cdc5*⁺の相同遺伝子を単離し、*Le.cdc5* と命名した。発現産物 *Le.CDC5* の推定アミノ酸配列 (842 残基) は N 末端において出芽酵母 *cdc5*⁺発現産物(*Sp.cdc5p*) 及び *Sp.cdc5p* に関連する遺伝子産物(SPCDC5RPs)に高い相同性を有していた。大腸菌内で発現させた *Le.CDC5* の N 末 185 アミノ酸(*Le.CDC5(1-185)*)を用いて random binding-site selection analysis を行った結果、*Le.CDC5(1-185)*はコンセンサス配列が 5'GCAATGT3'(相補鎖 5'ACATTGC3')の 7bp の配列に結合することが明らかとなった。*Le.CDC5(1-185)*を用いて genomic binding-site cloning を行ったところ、7bp コンセンサス様配列と TATA ボックスのセットを 3 つ含む染色体 DNA 断片 (3.7kbp) が得られた。一方、*Le.CDC5* は C 末端に A キナーゼによってリン酸化されると考えられる 2 つのリン酸化部位を有しており、これらの部位が実際に A キナーゼによってリン酸化されることが明らかとなった。また、それらに挟まれる形でロイシンジッパーをとりうると考えられる配列が存在しており yeast two hybrid analysis を行った結果、この領域を通して *Le.CDC5* がホモダイマーをとりうることが示唆された。ノーザンブロット解析の結果、*Le.cdc5* は子実体原基及び未成熟子実体初期に発現しており、*Le.cdc5* はシイタケ子実体形成の初期過程において機能すると考えられた。

A cDNA homologue of *Schizosaccharomyces pombe cdc5*⁺ from the mushroom *Lentinula edodes*: characterization of the cDNA and its expressed product

Yasumasa Miyazaki(FFPRI), Toru Jojima(RIKEN), Takeshi Ono, Takashi Yamazaki, Kazuo Shishido(Tokyo Tech.)

P-62

芳香族繰返し型タイプ I ポリケタイド合成酵素の発現と機能解析

森口 智美, 藤井 勲, 海老塚 豊 (東大院薬)

糸状菌のポリケタイド合成酵素(PKS)は、そのほとんどがタイプ I に分類されるが、バクテリアに見られるモジュラー型ではなく、各活性中心が繰返して反応に関与する iterative 繰返し型であり、なかでも 6-メチルサリチル酸(6MSA)合成酵素(MSAS)は、糸状菌のタイプ I PKS として最小であるため、繰返し型タイプ I PKS の構造と反応機構を解明するためのよいターゲットであると考えられる。

Aspergillus terreus からクローニングされ、MSAS をコードしていることが異種糸状菌での発現により確認されている *atX* 遺伝子(*Mol. Gen. Genet.* **253** 1-10 (1996))を用いて、酵母を宿主とした発現系を構築した。まず、RT-PCR により N 末側に存在するイントロンを確認した後、全長 cDNA を酵母発現用ベクター pESC-URA に導入し、発現プラスミド pESC-*atX* を構築した。また、イントロンより上流部を欠失させた遺伝子(*atX-N1*)や、さらに N 末領域を欠失させた遺伝子(*atX-S1*)の発現プラスミドも構築した。これらを PKS の acyl carrier protein の Ser 残基のホスホパンテテイル化酵素 Sfp とともに酵母で発現させたところ、全長 ATX、N1 体において 6MSA 合成活性が確認されたが、S1 体では 6MSA の合成は見られなかった。多環性芳香族化合物を合成する糸状菌 PKS では、N 末側を 5 アミノ酸程度欠失させるだけで、機能を失うことが知られており、単環性 PKS と多環性 PKS の N 末領域の機能的差異は非常に興味深い。

また、放線菌由来のオルセリン酸合成酵素 *AviM* は、MSAS からケト還元ドメインを除いたアーキテクチャーを持つ最小の繰返し型タイプ I PKS であり、その発現や機能解析についても併せて報告する。

Expression and Functional Analysis of Aromatic Iterative Type I Polyketide Synthases

Tomomi Moriguchi, Isao Fujii, Yutaka Ebizuka

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

P-63

イネいもち病菌における Stua ホモログ (MstuA) 欠損株の形質

深田純司, 林長生, 西村麻里江 (生物研)

APSES タンパク群は, basic Helix-Loop-Helix (bHLH) 構造をもつ転写因子であり、真核微生物では *A. nidulans* の Stua, *Candida albicans* の Efg1, *Neurospora crassa* の Asm-1 等が知られている。これらの転写因子はいずれも形態形成に関与しており、例えば、Stua は *A. nidulans* においてメトレとフィアライドの形成、Efg1 は *C. albicans* において cAMP-dependent protein kinase (Tpk2) の制御下で偽菌糸形成に関与している。*M. oryzae* において、cAMP-dependent protein kinase (CpkA) は付着器形成や植物細胞内での生長には関与しないものの、付着器内のグリセロールの蓄積および付着器からの侵入に関与している。これらのことから、*M. oryzae* の形態形成や付着器の機能の成熟における MstuA の機能を解析することを目的として、相同組み換えによりゲノム中に 1 コピーある *MSTUA* が欠損した株を 2 株作出した。野生株と比べて *mstuA* では分生子の形態や発芽率に差違は見られなかったが、付着器形成の遅延、胞子形成数と菌糸伸長率の減少、イネへの感染率の低下、交配時の雌性の欠損が見られた。

Knockout mutants of a putative *Magnaporthe oryzae* transcriptional factor, a homolog of Stua in *Aspergillus nidulans*.

Junji Fukada, Nagao Hayashi, Marie Nishimura (NIAS)

P-64

Aspergillus oryzae チロシナーゼのオリゴマー化とシステイン残基の関与

難波剛、多田羅洋太、一島英治 (創大院・工)

多くの生物種に広く存在しているチロシナーゼは活性中心に銅を持つ金属タンパクで、酸素添加ならびに酸化反応を触媒する酵素としてメラニンの生合成に関与している。チロシナーゼは生物種間で 1 次配列のホモロジーが低く、*Spyny lobster* などの甲殻類では 6 量体、*Aspergillus* や *Neurospora* などの糸状菌では 4 量体、*Streptomyces* に属する放線菌では単量体と 4 次構造や活性化も生物種によって大きく異なっている。本研究では大腸菌に発現させた *A. oryzae* チロシナーゼを用い、4 次構造形成様式の解析と多量体形成に関与しているアミノ酸残基の決定を目的とした。SDS-PAGE 上で単一のバンドとして確認できる精製チロシナーゼを倍率 2.8、3 倍、収率 1.09% で精製した。精製酵素についてゲルろ過による分子量測定を行ったところ、Native では 290K、Reduced では 68K であることがわかった。これは 4 量体と単量体の関係であると考えられ、サブユニット間の結合にジスルフィド結合の関与が示唆された。*A. oryzae* チロシナーゼはサブユニットあたり 8 つのシステイン残基を有しており、まず Free で存在しているアミノ酸残基の決定を行った。プロテアーゼで断片化したペプチドのチオール基を ABD-F により特異的に蛍光修飾し、HPLC で分離、シークエンスすると Cys82 を含むペプチドであることがわかった。このことより Cys82 のみ Free で存在しており、のこる 7 つのシステイン残基はサブユニット間、サブユニット内で S-S 結合を形成していることがわかった。

Roles of cystein residues of *Aspergillus oryzae* tyrosinase for oligomerization.

Takeshi Namba, Yota Tatara, Eiji Ichishima

(Graduate School of Bioeng., Soka Univ.)

P-65

リンゴ斑点落葉病菌の AM 毒素合成遺伝子クラスターの同定

播本佳明, 八田理恵子, 児玉基一朗¹, 山本幹博², 尾谷 浩¹, 柘植尚志

(名大院生農・¹鳥取大農・²岡山大農)

リンゴ斑点落葉病菌 (apple pathotype of *Alternaria alternata*) は宿主特異的毒素 (AM 毒素) を生産し, 毒素感受性のリンゴ品種にのみ斑点性病害を引き起こす. 先に, 本菌から 2 つの AM 毒素合成遺伝子 (*AMT* および *AMT2*) が単離され, それらが生育には必要でない余分な染色体 [conditionally dispensable (CD) 染色体] にコードされていることが見いだされた. 本研究では, EST (expressed sequence tag) 解析によってこの染色体にコードされる遺伝子群を探索した. 供試菌株 IFO08984 株では, *AMT* 遺伝子群が 1.4 Mb の小型染色体にコードされている. 糸状菌の遺伝子数は 10,000 個前後, 本菌のゲノムサイズは約 30 Mb であり, 1.4 Mb 染色体には約 400 個の遺伝子が存在すると推定される. 本菌の cDNA ライブラリー (41,000 クローン) から 1.4 Mb 染色体プローブを用いて 270 クローンを選抜し, 148 個の異なる遺伝子由来の独立クローンを同定した. さらに, これらのうち *AMT* 遺伝子と密に連鎖して存在するクローンを同定した. 本菌の BAC ライブラリーから 1.4 Mb 染色体 DNA を含む 78 個の BAC クローンを選抜し, それらにおける EST クローンの分布を PCR 法によって調査した. その結果, 2 次代謝に関与すると推定された 17 クローンが *AMT* および *AMT2* を含む約 150 kb の領域に連鎖して存在することが明らかとなった. この領域を含む BAC クローン (118 kb) の塩基配列を決定したところ, *AMT* および *AMT2* に加え 36 個の推定読み枠が見いだされた. 毒素生産時と非生産時におけるこれら読み枠の発現レベルを比較解析し, 毒素合成に関与する遺伝子を推定した.

Identification of AM-toxin biosynthesis gene cluster in the apple pathotype of *Alternaria alternata*

Yoshiaki Harimoto, Rieko Hatta, Motoichiro Kodama¹, Mikihiro Yamamoto², Hiroshi Otani¹, Takashi Tsuge

(Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., ¹Fac. Agric., Tottori Univ., ²Fac. Agric., Okayama Univ.)

P-66

イチゴ黒斑病菌の conditionally dispensable 染色体にコードされる遺伝子群の同定

八田理恵子, 播本佳明, 山本幹博¹, 秋光和也², 柘植尚志 (名大院生農・¹岡山大農・²香川大農)

イチゴ黒斑病菌 (strawberry pathotype of *Alternaria alternata*) は, 病原性決定因子として宿主特異的毒素 (AF 毒素) を生産する. 先に, イチゴ黒斑病菌 NAF8 株から AF 毒素合成遺伝子 (*AFT* 遺伝子) クラスターを単離し, このクラスターが生育には必要でない 1.05 Mb の余分な染色体 [conditionally dispensable (CD) 染色体] にコードされていることを見いだした. 本研究では, EST (expressed sequence tag) 解析によって CD 染色体にコードされる遺伝子群を探索した. 糸状菌の遺伝子数は 10,000 個前後, 本菌のゲノムサイズは約 30 Mb であり, 1.05 Mb 染色体には約 350 個の遺伝子が存在すると推定される. NAF8 株の cDNA ライブラリー (約 20,400 クローン) から 1.05 Mb 染色体プローブを用いて 352 クローンを選抜し, 100 個の異なる遺伝子由来の独立クローンを同定した. 独立クローンのデータベース相同性検索を行ったところ, 51 クローンは既知配列と有意な相同性が認められ, それらのうち 11 個は先に同定した *AFT* 遺伝子群の cDNA であった. 一方, 残りの 49 クローンは既知配列と相同性が認められず, CD 染色体には機能未知の遺伝子が多数コードされていることが明らかとなった. また, 選抜した 352 クローンのうち 161 個 (46%) が, コムギふ枯病菌 (*Phaeosphaeria nodorum*) の Tc1-mariner タイプトランスポゼースと有意な相同性が認められ, 本配列が高発現していることが示唆された. 本トランスポゾン様配列の染色体分布を調査したところ, 1.05 Mb 染色体にのみ分布する, CD 染色体特異的な配列であることが明らかとなった.

Identification of the genes encoded by a conditionally dispensable chromosome of the strawberry pathotype of *Alternaria alternata*

Rieko Hatta, Yoshiaki Harimoto, Mikihiro Yamamoto¹, Kazuya Akimitsu², Takashi Tsuge

(Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., ¹Fac. Agric., Okayama Univ., ²Fac. Agric., Kagawa Univ.)

P-67

Fusarium oxysporum の分生孢子形成時における発現遺伝子群の同定

飯田祐一郎, 小原敏明, 栢植尚志 (名大院生農)

F. oxysporum は、小型孢子、大型孢子および厚膜孢子の3種類の無性孢子を形成する。本菌は、栄養豊富な完全培地では孢子を形成しないが、カルボキシメチルセルロースを主な炭素源とする CMC 培地ではほとんど菌糸生育せず、小型孢子と大型孢子を大量に形成する。本研究では、EST (Expressed Sequence Tag) 解析によって両培地における発現遺伝子群を比較解析した。完全培地培養時と CMC 培地培養時の cDNA ライブラリーを作製し、それぞれ約 1,300 クローンの部分塩基配列を決定した。決定配列の比較によって、両ライブラリーからそれぞれ約 540 個の異なる遺伝子由来の独立クローンを同定した。両ライブラリーの独立クローンのうち共通なクローンは約 20% であり、栄養成長時と孢子形成時の発現遺伝子群が顕著に異なることが示唆された。CMC 培地ライブラリーからのみ検出された 430 クローンについて、完全培地培養時と CMC 培地培養時の mRNA をプローブとして cDNA ドットブロット解析を行い、孢子形成時に特異的に高発現する 173 クローンを選抜した。さらに、これらクローンについて、リアルタイム PCR 法によって発現レベルを定量解析し、孢子形成時に特に高発現する 39 クローンを同定した。先に、本菌の孢子形成に不可欠な *REN1* 遺伝子を単離し、*REN1* が転写制御因子をコードすることを見出した。そこで、孢子形成時に高発現する遺伝子について、*ren1* 変異株における発現レベルをリアルタイム PCR 法によって定量解析した。その結果、野生株に比べ *ren1* 変異株で発現量が顕著に低下している 16 クローンを見出し、これら遺伝子が *REN1* によって制御される孢子形成関連遺伝子であることを示唆した。

Identification of genes expressed during conidiation of *Fusarium oxysporum*

Yuichiro Iida, Ohara Toshiaki, Tsuge Takashi

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

P-68

Gibberella fujikuroi 子嚢孢子における形質の分離

富樫加奈, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大・農)

サトウキビしょう頭腐敗病菌 *Gibberella fujikuroi* mating population B (anamorph: *Fusarium sacchari*) は交配型 (mating type) の異なる (MAT1-1, MAT1-2) 菌株間で交配を行い、完全世代を形成する heterothallic な子嚢菌である。子嚢菌類では栄養体の核相が単相であることが多く、多様性維持のための遺伝子交換は主に、有性生殖に伴う異なる株同志の細胞質融合、核融合、減数分裂の過程で行われる。本研究では *G. fujikuroi* FGSC 7610 株 (MAT1-2, 雌性不稔) および FGSC 7611 株 (MAT1-1, 両性稔性) に EGFP 発現カセットとハイグロマイシン B 耐性カセットを同時に導入し、得られた形質転換体を交配して形成される子嚢孢子的形質 (GFP/ハイグロマイシン耐性/交配型) について遺伝的解析を行った。FGSC 7610 株が雌性不稔であるので、交配には常に FGSC 7610 株を雄株、FGSC 7611 株を雌株として用い、野生型の株と形質転換株を組合せて交配させ、次世代である子嚢孢子子を単孢子分離し、3 形質の分離比を調査した。野生型 FGSC 7610 株を雄側・形質転換体 FGSC 7611 株を雌側として用いた組み合わせにおいては形質がほぼ 1:1 に分離したが、形質転換体 FGSC 7610 株を雄側・野生型 FGSC 7611 株を雌側に用いた組み合わせにおいては 1:1 に分離する場合と雄側の形質が次世代に理論通りに分離しない場合があった。

Segregation of phenotypes in ascospores of *Gibberella fujikuroi*

Kana Togashi, Tohru Teraoka, Tsutomu Arie

(Tokyo Univ. of Agric. & Tech.)

P-69

Aspergillus oryzae の安全性に関する研究

-*A. oryzae* Group 2 株のアフラトキシン生合成遺伝子ホモログクラスタの解析-

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, 味噌などの伝統的醸造産業に使用されている有用糸状菌であり, *A. flavus* と近縁であるにもかかわらず, アフラトキシン(AF)を全く生産しないことが証明されている. この AF 非生産性を分子レベルで明らかにするため, 酒総研保有麹菌 210 株について解析した結果, 122 株(58%)は, AF 生合成遺伝子ホモログクラスタを保有する Group 1 株であったが, 75 株(36%)はそのクラスタに欠失が認められる Group 2 株であった. そこで, Group 2 株についてその遺伝子構造をより詳細に解析するとともに, Group 2 株の簡便な同定方法について検討した.

PCR による解析の結果, Group 2 株は AF 生合成遺伝子ホモログクラスタのうち, *avnA*, *verB*, *vbs* 遺伝子の増幅は認められたが, *aflT*, *nor-1*, *aflR*, *norA* 遺伝子は増幅しなかった. AF 生合成系の転写制御因子である *aflR* をプローブとしてサザン解析を行ったところ, 全ての Group 2 株からはシグナルが得られず, クラスタに欠失があることが確認された. Group 2 株のうち種麹由来の RIB62 株について, 塩基配列解析によりその構造を決定したところ, *ver-1* 遺伝子より *aflR* 遺伝子方向に断絶が認められ, そこから他生物と全く同性的の見られないユニーク配列 8-kb が続き, その先に麹菌テロメア配列が検出された. このユニーク配列をプローブとしてサザン解析を行ったところ, 全ての Group 2 株より同じ大きさのシグナルが検出され, Group 2 株は全て RIB62 株と同じ染色体構造を持ち, クラスタの半分以上が欠落しているものと考えられた. クラスタの分断ポイントをはさむようなプライマーを設計し, 上記 210 株について PCR を行ったところ, 全 Group 2 株にのみ予想通りのフラグメントの増幅が認められ, Group 2 株のみを容易に同定できることが示された.

A study on the safety of *Aspergillus oryzae*

- Analysis of aflatoxin biosynthetic homologue gene cluster in *A. oryzae* strains of Group 2 -

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

P-70

糸状菌 *Aspergillus nidulans* のクラス III キチン合成酵素 ChsB の菌糸内局在化部位の解析

福田一治, 出岡顕, 竹下典男, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)

キチンは糸状菌の細胞壁の主要構成成分の 1 つであり, その生合成は形態の形成, 維持に関わると考えられる. *Aspergillus nidulans* のキチン合成酵素のひとつである ChsB は 916 アミノ酸からなり, クラス III に属している. クラス III のキチン合成酵素は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* や *Shizosaccharomyces pombe* などには存在せず, 菌糸状の形態で生育可能な菌からしか単離されていない. *chsB* の遺伝子破壊株では菌糸生長が大きく阻害され, その菌糸は分岐が多く, 非常に小さなコロニーを形成するだけで生育を停止する. 本研究では ChsB の細胞内での存在状態, 局在化部位を解析するため, ゲノム上の *chsB* の発現が制御可能で, さらに ChsB の N 末端に 6 xFLAG または EGFP を連結した FLAG-ChsB または EGFP-ChsB を *argB* 部位で発現できる FB-3 株, EB-5 株をそれぞれ作製した. FLAG-ChsB, EGFP-ChsB はそれぞれ正常に機能することを確認した. FB-3 株の細胞抽出液を用い FLAG に対する抗体で western 解析をおこなったところ, 予想される約 110 kDa の位置の他に約 120 kDa の位置にもバンドが見られたことから, ChsB が何らかの翻訳後修飾を受けていることが示唆された. EB-5 株において EGFP-ChsB の菌糸内での局在化部位を検討したところ, 菌糸の先端部分, 隔壁形成部位, 液胞で蛍光が観察された.

Localization of Class III Chitin synthase (ChsB) in *Aspergillus nidulans*

Kazuharu Fukuda, Ken Deoka, Norio Takeshita, Hiroyuki Horiuchi, and Akinori Ohta

(Dept. Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-71

醤油麹菌新規セルラーゼ遺伝子 (*celE*) のクローニングと高発現

安田 (吉野) 庄子、北本則行 (愛知産技研・食工技セ)

【目的】我々は醤油粕低減化を目的として、醤油麹菌 *Aspergillus oryzae* KBN616 株からこれまでに 4 種類のセルラーゼ遺伝子をクローニングし、それらを高発現する形質転換株の取得を行った。ふすま麹抽出液に分子量約 35kDa のセルラーゼ (CelE と命名) を新たに見出した。そこで、今回は CelE をコードする遺伝子のクローニング及び高発現化を試みた。

【方法及び結果】CelE の N 末端アミノ酸配列とファミリー 5 エンドグルカナーゼの保存領域のアミノ酸配列に基づきオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、*A. oryzae* 染色体 DNA を鋳型として PCR を行った結果、717bp の DNA 断片を取得した。これを基に *celE* 遺伝子を含む *SalI* 3.9kbp 断片を取得し全塩基配列を決定した。また、ふすま培養した *A. oryzae* 菌体から mRNA を調製し、RT-PCR によって cDNA を取得し塩基配列を決定した。*celE* 遺伝子はイントロン 5 個を含む 1362bp から成る遺伝子で、決定した N 末端アミノ酸配列を含む 333 アミノ酸のタンパク質をコードしており、推定分子量は 34kDa であった。次に *celE* 遺伝子高発現ベクターを構築し、形質転換により CelE 高生産麹菌 *A. oryzae* E-1 株を取得した。E-1 株は液体培養時、親株に比べ約 15 倍の CMCase 活性を示した。この培養液から 2 回の陰イオンカラムクロマトグラフィーにより CelE を精製し、その諸性質について検討した。

Cloning and overexpression of a novel cellulase gene, *celE*, from *Aspergillus oryzae*

Shoko Yoshino-Yasuda, Noriyuki Kitamoto

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

P-72

イネいもち病菌由来ヒスチジンキナーゼの発現による、糸状菌特異的農薬感受性の出芽酵母の作成

本山高幸¹, 藤村真², 工藤俊章¹ (¹理研・中央研、²東洋大・生命科学)

【目的】フルジオキシニルをはじめとする多くの糸状菌特異的農薬のターゲットが糸状菌特異的ヒスチジンキナーゼ (Os-1 ファミリー) を介した情報伝達系であることが明らかになりつつある。Os-1 ファミリーの情報伝達系の下流因子は出芽酵母でも多くが共通している。そこで、糸状菌のヒスチジンキナーゼを酵母で発現させることにより、糸状菌特異的農薬への感受性が付与できるかどうかを解析した。

【方法・結果】イネいもち病菌由来の Os-1 ファミリーのヒスチジンキナーゼ Hik1 を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で発現させたところ、本来感受性を示さない糸状菌特異的農薬 (フルジオキシニル、イプロジオン、PCNB 等) に感受性を示すようになった。*hog1* 変異株でこの感受性がなくなること、Hik1 と Ypd1 の間で相互作用が認められることなどから、Hik1 は酵母のヒスチジンキナーゼ Sln1 から Ypd1-Ssk1-Ssk2/Ssk22-Pbs2-Hog1 へと続く情報伝達系を攪乱して糸状菌特異的農薬への感受性を付与していることが示唆された。

Construction of a budding yeast strain sensitive to filamentous fungi-specific pesticides by expression of a histidine kinase from the rice blast fungus

Takayuki Motoyama¹, Makoto Fujimura², Toshiaki Kudo¹

P-73

Aspergillus tamarii の R E M I 法による形質転換

木村多江¹, 楠本憲一¹, 北本則行², 鈴木聡¹, 柏木豊¹ (¹独法・食総研, ²愛知産技研・食品工技)

Aspergillus tamarii は *A. oryzae* の近縁な糸状菌である。我々は *A. tamarii* NFRI 1618 株より醤油粕上で生育可能な株 *A. tamarii* ST-2 株を得た。この *A. tamarii* ST-2 株に種々の分解酵素を生産させ、食品廃棄物である醤油粕の低減化に資することを想定した。

A. tamarii に醤油粕を分解させる機能を付与する手段として、*niaD* マーカーを用いた本菌のプロトプラスト-PEG 法による形質転換系の作製を行った。しかしながら、*niaD* を有するプラスミドを用いた *A. tamarii* ST-2*niaD* 株の形質転換では、形質転換効率および、プロトプラスト再生率共に *A. oryzae* の 5 分の 1~20 分の 1 と非常に低かった。そこで、形質転換効率を上げ、多くの形質転換体を分離するため、プロトプラスト調製条件を検討すると共に、Yaver ら (2000) の方法を用いて REMI (restriction enzyme-mediated integration) 法による *A. tamarii* ST-2 *niaD* 株の形質転換を行った。REMI 法を用いることにより、*A. tamarii* ST-2 *niaD* 株の形質転換効率は、REMI 法を用いない時に比べ、2~5 倍上昇した。

Transformation system for *Aspergillus tamarii* by restriction enzyme-mediated integration (REMI)

Tae Kimura¹, Ken-Ichi Kusumoto¹, Noriyuki Kitamoto², Satoshi Suzuki¹, Yutaka Kashiwagi¹

(¹Natl.Food.Res.Inst, ²Food Res. Center, Aichi Ind. Technol. Inst.)

P-74

Aspergillus oryzae 由来タカアミラーゼ及びグルコアミラーゼにおける *Bacillus* sp.no.195 株由来デンプン結合領域の付加効果

柳谷真理, 炭谷順一, 荒井基夫, 川口剛司 (阪府大院・農生科)

本研究室で単離された *Bacillus* sp.no.195 株が生産する α -アミラーゼ (BAA) は C 末端側に carbohydrate-binding module family 25 (CBM25) に分類されるデンプン結合領域 (SBD) を持つ。本 SBD は生デンプン分解能を殆ど示さない BAA 活性ドメインに対して強力な生デンプン分解能を付与する。そこで、本 SBD を用いた高効率生デンプン分解アミラーゼの創製を目的として、生デンプン分解能が低いと言われているタカアミラーゼ A (TAA) 及び、CBM20 に分類される SBD を持ち生デンプン分解能を有するグルコアミラーゼ A (GlaA) に本 SBD をそれぞれ付加することを試みた。

SBD を TAA, GlaA の C 末端に結合させるように遺伝子を設計し、糸状菌用高発現ベクター pNAN8142 に挿入して *niaD* 部位で相同組換えさせることで *Aspergillus oryzae* に導入した。培養上清を各種クロマトグラフィーに供することで精製し、諸性質について検討したところ、SBD を付加した TAA は野生型 TAA と比較して有意な生デンプン結合能と分解活性を示すことがわかった。また、SBD を付加した GlaA においても野生型に比べ生デンプン分解能と分解活性が上昇していた。以上のことから、本 SBD はキメラ酵素中でも生デンプン結合能を発揮し、分解能を付与することがわかった。しかし、これらの結果は予想された値より低いものであった。この原因として、原核生物由来の本 SBD を真核生物で発現させたために、本来ないはずの糖鎖が付加され、本 SBD 本来のパフォーマンスが発揮できていないことが示唆された。

Addition of a novel starch-binding domain of *Bacillus* sp. no. 195 α -amylase to *Aspergillus oryzae* Taka amylase A and Glucoamylase A.

Mari Yanagiya, Jun-ichi Sumitani, Motoo Arai, Takashi Kawaguchi (Grad. Sch. Agric. Biol. Sci., Osaka Pref. Univ.)

P-75

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¹, 赤尾 健¹, 山田 修¹, 岩下和裕¹, 坂本和俊¹, 阿部敬悦², 五味勝也², 秋田 修¹ (¹酒総研,²東北大院農)

現在、高等菌類のモデルとして広く認められている生物は、*Neurospora crassa* と *Aspergillus nidulans* であると考えられる。これらの微生物は、遺伝学、細胞生物学、分子生物学などの様々な手法を用いて学術的・基礎的研究に大きく貢献し、その確固たる基盤を構築するに至った。これらの基盤が研究の礎となり、新たな研究が進展しつつある。麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は醤油、味噌、清酒等の醗酵食品の生産に用いられており、産業上重要な微生物の一つであると考えられる。麹菌を様々な穀類上で生育させる固体培養においては、高いタンパク質生産・分泌能力から、醸造・醗酵産業、酵素生産などの工業的分野で古くから利用されている。しかしながら、その基盤は *N. crassa* や *A. nidulans* のそれらと比較すると脆弱であり、まだ途半ば、という感は否めないと思われる。さらには、固体培養におけるその詳細な解析は非常に困難ではあったが、近年、その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、麹菌の研究基盤を構築する一環として麹菌がどの様にして固体培養という環境に応答しているのか、を解明するための手法として、一昨年山田らによって発表された麹菌 cDNA microarray NRIB3000 (第2 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報告する。さらに、第1世代麹菌 DNA microarray (第3 回糸状菌分子生物学コンファレンス 16 S-1)を用いた固体培養時における発現プロファイリングについても併せて報告する。

Transcriptional responses of *Aspergillus oryzae* to solid-state fermentations

Toshi-Hide Arima¹, Takeshi Akao¹, Osamu Yamada¹, Kazuhiro Iwashita¹, Kazutoshi Sakamoto¹, Keietsu Abe², Katsuya Gomi², Osamu Akita¹ (¹NRIB, ²Grad. Sch. Agric. Sci., Univ. of Tohoku)

P-76

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来糖加水分解酵素ファミリー74 遺伝子のクローニング

李 載源、加治佐 平、吉田 誠、五十嵐圭日子、鮫島正浩 (東大院・農生科)

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* は、セルロース分解過程において様々な糖加水分解酵素 (GH) を菌体外に生産することが知られている。しかしながら、それらの中で機能解析が行われたものはわずかであり、ほとんどの菌体外 GH の機能が未知のままである。そこで我々は、本菌によるセルロース分解機構を解明するために、*P. chrysosporium* のゲノム情報を利用して、網羅的な GH のクローニングおよび異種発現系によるタンパク質の大量生産に挑んでいる。本菌がセルロース培養系において生産する菌体外酵素のプロテオーム解析を行ったところ、100kDa 程度の未知タンパク質がセルロース分解時に生産されていることがわかった。そこで等電点と分子量および MALDI-TOF/MS パターンから本タンパク質の同定を試みたところ、糖加水分解酵素ファミリー (GHF) 74 に属する酵素であることが推測された。さらに、全ゲノム配列データに対して検索を行ったところ、二カ所において GHF74 をコードすると考えられる部分が存在し、ファミリー1 に属する糖結合モジュール (CBM) を持つもの (GHF74A) と持たないもの (GHF74B) が存在することが明らかになった。さらに、セルロース培養系より抽出、合成した cDNA を鋳型に PCR を行い、GHF74 に属する二つの遺伝子のクローニングを行った。セルロース培養系において *P. chrysosporium* 由来の2つの GHF74 の機能を明らかにするため、現在酵母菌による酵素の大量発現を行っている。

Molecular cloning of Glycosyl hydrolase family 74 genes from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*

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

P-77

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* IAM2640 株 カルボキシペプチダーゼ遺伝子の解析

龍宏一, 竹内道雄 (東農工大・農・応生科)

黄麹菌は高分子型カルボキシペプチダーゼ(CPase)と低分子型 CPase を生産することが知られている。以前、高分子型 CPaseO 遺伝子のクローン化については既に報告した。今回は活性中心付近のアミノ酸配列をもとにしたプライマーを用いて、低分子型 CPase 遺伝子のクローン化、塩基配列の決定を試みた。PCR によって得られた 1779bp の断片をプローブとしてクローン化し、3432bp の配列を決定した。この遺伝子には 2245bp の ORF が存在していた。この ORF は既に報告されている *A.oryzae* TK3 株の CPase と非常に高い相同性を示したが、13bp の違いが認められた。塩基配列から推定されるアミノ酸配列は 556 アミノ酸残基で、そのうち 2 アミノ酸残基の配列が異なっていた。また同定した遺伝子は転写開始点の上流 868bp を含んでおりこの領域にはいくつかのモチーフが見られ、転写活性化に関与するプロモーター領域を含んでいると考えられた。しかし *A.oryzae* の EST の中には相同配列が認められなかった。また今回同定した遺伝子の推定アミノ酸配列には、以前本研究室において単離された低分子型 CPaseO-1 の N 末端配列は存在しなかった。以上の結果から *A.oryzae* IAM2640 株には少なくとも 3 種以上の配列の異なる CPase が存在し、異なる条件で発現していることが示唆された。

Cloning and characterization of the genes encoding Carboxypeptidases from *Aspergillus oryzae* IAM2640

Kouichi Ryuu, Michio Takeuchi (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

P-78

糸状菌ハイブリッド型 histidine kinase の機能解析

鈴木沙也香、丸井淳一郎、松林良博、東信宏、古川健太郎¹、萩原大祐、阿部敬悦¹、水野猛、加藤雅士、小林哲夫 (名大院生命農・生物機構、¹東北大院農・応生科)

His-Asp リン酸リレー情報伝達系は、環境シグナル応答や細胞内情報伝達系の制御において中心的な役割を果たしている。糸状菌における His-Asp リン酸リレー情報伝達機構の網羅的解明を目指し、*Aspergillus nidulans* ゲノム上の histidine kinase 遺伝子を同定した。*A. nidulans* には 15 種の histidine kinase (HK) が存在し、アミノ酸配列の相同性から HK1-HK9 の 9 つの family に分類された。HK1、HK3 はすでに報告された *tcsA*、*tcsB* である。また HK6 は *Neurospora crassa nic-1/los-1* と高い相同性を持ち、遺伝子破壊株は *N. crassa* の知見より高浸透圧感受性となることが考えられた。HK7 はバクテリアフィトクロム型の HK であり、光に応答して有性/無性生殖を制御する *A. nidulans veA* ヘシグナルを伝達すると推定された。各遺伝子破壊株の作製と表現型の観察を行った結果、得られた HK6 遺伝子破壊株では生育速度と胞子形成能が著しく低下し、菌糸の成長や分化に関与していることが示唆された。HK7 遺伝子破壊株については現在解析中である。

Analysis of hybrid-type histidine kinases in filamentous fungi.

Sayaka Suzuki, Junichiro Marui, Yoshihiro Matsubayashi, Nobuhiro Azuma, Kentaro Furukawa¹, Daisuke Hagiwara, Keietu Abe¹, Takeshi Mizuno, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi

(Dept. of Biological Mechanisms and Functions, Grad. Sch. of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ., ¹Dept. of Molecular and Cell Biology, Grad. Sch. of Agricultural Science, Tohoku University)

P-79

麹菌の受容体様タンパク質コード遺伝子の解析

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

多細胞生物がその生活環を全うする間に、細胞は外界の様々な環境条件、あるいは他個体及び自己の細胞からの信号を受容し、細胞内に伝達し、遺伝子発現を制御している。麹菌近縁種 *A. nidulans* の研究により増殖と生殖の切り換えには三量体 G タンパク質が重要な役割を果たしていることが解ってきた。三量体 G タンパク質は G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor: GPCR) を介して細胞外の信号を受容していると考えられるが、糸状菌における GPCR 及びそのリガンドに関する知見は少ない。我々は、公開の GPCR データベース (<http://www.gpcr.org/7tm/>) から取得した GPCR アミノ酸配列約 9500 種をクエリー配列として麹菌ゲノム情報を元にした推定アミノ酸配列データベース及び EST 配列の翻訳データベースに対する BLAST 検索を行い、麹菌推定アミノ酸配列中に 8 種類の GPCR 様配列を見出した。これら 8 種類の配列は公開のデータベースに対する BLAST 検索から、プロテインフォスファターゼ、バクテリオロドプシン、cAMP レセプター、逆転写酵素、cAMP 合成酵素、及び STE2、STE3、に相同性のあるものと、未知のロイシンリッチリピートタンパク質と予想されるものであった。これらのうち、GPCR である可能性の低い 5 種を除いた 3 種 (ロドプシン、cAMP 受容体、未知タンパク質) について、*A. oryzae* RIB40 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR を行い DNA 断片を取得した。これらの GPCR 様配列は、*A. nidulans* において今年報告された 9 種の GPCR 様配列と共通のものもあり、また関連が不明のものもある。現在、残り 5 種の配列についても解析を続けるとともに既取得 3 種について発現解析の検討を行っている。

Isolation of genome fragments coding G protein-coupled receptors from *Aspergillus oryzae*

Satoshi Suzuki, Hiroko Taketani, Tae Kimura, Mayumi Matsushita, Ken-Ichi Kusumoto and Yutaka Kashiwagi

(Natl. Food Res. Inst)

P-80

麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連遺伝子 *Aoatg8* の機能解析

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、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やオルガネラを分解し再利用する細胞内分解機構である。ATG8 は *S. cerevisiae* のオートファジー関連遺伝子であり、preautophagosome 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、*A. 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、ATG8 ホモログ遺伝子 *Aoatg8* を *A. oryzae* より単離し、機能解析を行った。

【方法及び結果】*A. oryzae* RIB40 株より *Aoatg8* 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、AoAtg8 と赤色蛍光タンパク質 DsRed2 との融合タンパク質 DsRed2-AoAtg8 を発現するプラスミドを構築し、niaD300 株に形質転換した。得られた形質転換株においてオートファジーを誘導したところ DsRed2-AoAtg8 の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 AoAtg8 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。また、CPY-EGFP と DsRed2-AoAtg8 を共発現させ、液胞内酵素の挙動と AoAtg8 の細胞内局在の関連を検討したところ、CPY-EGFP は液胞に観察されたが、DsRed2-AoAtg8 が PAS と思われる点状の構造体に局在しているものも観察された。さらに、発芽や分生子形成時にオートファジーが誘導されると示唆される結果が得られた。現在、*Aoatg8* 破壊株を作成中であり、その表現型の解析を予定している。

Functional analysis of *Aoatg8*, a gene involved in autophagy, from *Aspergillus oryzae*.

Takashi Kikuma, Mamoru Ohneda, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

P-81

adenylyl cyclase 突然変異を抑圧する突然変異体

工藤愛子, 村山肇子 (関東学院大・工・物質生命科)

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* 株は培養を続けるとその成長を回復させる抑圧突然変異が高頻度で起こる。その抑圧突然変異体の中の1株 *hah* は protein kinaseA の regulatory subunit をコードする遺伝子の突然変異体であることを昨年の本コンファレンスにおいて工藤倫子、神崎誠一らが報告したが、今回は *hah* と共に同じく *cr-1* の抑圧突然変異体 *wh* についても合わせて検討した。

wh は氣中菌糸を高く形成し、分生子を形成しないという形態異常を持つ。これは *hah* の形態異常と似ている。*hah* は regulatory subunit と catalytic subunit との結合部位のアミノ酸が変異しており、このことから regulatory subunit の cAMP ドメインに cAMP の結合の有無にかかわらず catalytic subunit が遊離し活性となり、基質タンパク質をリン酸化し、細胞外からの刺激に対する生理応答が発現されてしまう。よって、*hah* の形態異常には protein kinaseA の活性調節が関係していると推察された。遺伝解析を行なったところ、*hah* が第5染色体に存在する遺伝子の突然変異体であるのに対し、*wh* 遺伝子は少なくとも第5染色体には存在していないということが示された。すなわち *wh* は regulatory subunit をコードする遺伝子の突然変異体ではないことが分かった。しかし、*wh* の形態は *hah* と似ているので protein kinaseA 活性調節に関連した遺伝子の突然変異である可能性が高いので、catalytic subunit をコードする遺伝子の突然変異体ではないかと考え、解析を行っている。これらの解析結果からアカパンカビにおける cAMP の関与するシグナル伝達系の役割について考察する。

Suppressor mutants which suppress adenylyl cyclase mutation

Aiko kudo, Tadako murayama

(Dept. Mater. Life Sci., Kanto Gakuin Univ.)

P-82

担子菌エノキタケの子実体形成期に発現する遺伝子群に関する研究

山田雅人¹、柴田 航¹、櫻庭 壮¹、稲富 聡²、岡崎光雄¹、下坂 誠¹

(¹信州大・織・応生科、²ホクトきのこ総研)

担子菌の子実体形成過程を分子レベルで解明することを目的として、子実体形成誘導処理により同調的に子実体を形成するエノキタケ商業生産株を用い fluorescence differential display 法により、子実体原基形成時に特異的に発現する遺伝子群を単離した。得られた 610 個の cDNA 断片のうち 75 断片についてシーケンスを行った。相同性解析の結果、既知タンパク質のアミノ酸配列と相同性が高いものが 28 断片、新規の配列と考えられる遺伝子が 28 断片あった。これら既知のアミノ酸配列と相同性が高い断片の中には、担子菌類で子実体形成への関与が報告されている hydrophobin、細胞内メディエーターとして働く EF-hand protein や GTP binding protein、子実体柄の伸長への関与が報告されている cytochrome P450 が含まれていた。これら 56 断片についてノーザン解析を行い、その内 21 断片で子実体原基特異的なシグナルを確認した。また、hydrophobin 遺伝子 (*fv-hyd1*) について詳細な解析をおこなった。*fv-hyd1* ORF は 121 アミノ酸からなり、hydrophobin に特徴的な 8 つの保存されたシステイン残基を含んでいた。*fv-hyd1* は栄養菌糸体では発現せず、子実体原基ステージにおいて著しく発現量が増加し、成熟子実体のステージにおいても高発現していた。これらの結果から hydrophobin をコードする *fv-hyd1* は子実体形成に密接に関与している事が示唆された。

Study of genes specifically expressed during fruiting body development in the basidiomycete *Flammulina velutipes*

Masato Yamada¹, Sou Sakuraba¹, Satoshi Inatomi², Mitsuo Okazaki¹, Makoto Shimosaka¹

(¹Dept. Appl. Biol., Shinshu Univ., ²Mushroom Lab., Hokuto Co.)

P-83

麹菌 *Aspergillus oryzae* の GPI アンカー型アスパラギン酸プロテアーゼ (oryzapsin) の機能解析

松田吉彦, 水谷治, 山形洋平, 阿部敬悦, 中島佑 (東北大院・農・応生科)

【目的】 国広らにより麹菌 *A. oryzae* ゲノムから、2つの新規アスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子が見出されている¹⁾。これらの酵素は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において kexin 欠損を相補する yapsin と相同性が高いものとして報告されている。しかし、その酵素学的性質や生理的意義は未知である。本研究では、これらの酵素 (oryzapsins) の機能解析を目的としている。

【方法と結果】 *A. oryzae* 中の 2 種の oryzapsin 遺伝子 (*opsA*, *opsB*) の高発現株を作製した。それぞれの高発現株を細胞壁、細胞膜、細胞質の 3 つの画分に分画し、免疫ブロット解析により局在性を検討した。その結果、いずれの高発現株においても、細胞膜画分にのみ顕著なシグナルが認められた。このことから、2 つの oryzapsin は、その推定アミノ酸配列から予想されたように GPI アンカーによって細胞膜に結合していると考えられた。そこで、推定 C 末端 GPI シグナル配列を欠損させた変異体をそれぞれ作製し、その高発現株を同様の方法で分画し、免疫ブロット解析を行ったところ、目的酵素は液体培養上清中に分泌された。この変異株の培養上清から目的酵素の精製を行った。OpsB は、塩基性アミノ酸を数多く含むようなタンパク質を特異的に認識・切断することが明らかとなった。しかし、*S. cerevisiae* の yapsin とは異なり、*A. oryzae* の kexin (KexB) 欠損を相補することはできなかった。さらに詳細な酵素化学的性質、および破壊株の造成・解析について報告する。

1) Kunihiro, S., *et al*, Gene 289, 177-184 (2002)

Functional analysis of GPI-anchored aspartyl protease (oryzapsin) of *Aspergillus oryzae*.

Yoshihiko Matsuda, Osamu Mizutani, Youhei Yamagata, Keietsu Abe, Tasuku Nakajima

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

P-84

Analysis of the tip cell specific expression of genes in the *Aspergillus oryzae* mycelium

Kumiko Masai¹, Jun-ichi Maruyama¹, Harushi Nakajima¹, Kazutoshi Sakamoto², Osamu Akita²,

Katsuhiko Kitamoto¹ (¹ Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, ² NRIB)

The most relevant characteristic of filamentous fungi is the extension of the tip cell, and the growth of the mycelium depends on the cellular activities of these cells. To analyze the uniqueness of the tip region, we compared the differences in the genes expressed in the various regions of the mycelium of the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*.

Upon macroscopic observation of the mycelium of a wild type strain of *A. oryzae*, three distinct regions were detected: 1) the tip, 2) the white, and 3) the basal region. The tip is the region at the growing edge of the mycelium. In the white region, aerial hyphae are observed, some which have initiated conidiophore formation, and the basal region consists of developed conidiophores. Assuming that the differences in the genes or the quantity of the genes expressed in the regions reflect the characteristics observed in each region, RT-PCR was performed to determine the differential expression, if any, of the genes in the fungal mycelium. Genes encoding secreted proteins (α -amylase), cytoskeleton (α -tubulin), and enzymes involved in metabolism (cytochrome c) were highly expressed in the tip region. Following the initial analysis by RT-PCR, differential expression was further analyzed by microarray using the *A. oryzae* cDNA chip. The analysis revealed that the regions indeed have genes that were expressed at different levels and also uncovered functionally unknown and possibly filamentous fungi-specific genes that were expressed to a higher degree in the tip region. It is hopeful that the study of these unknown genes provides further understanding of the molecular properties of tip growth, especially that of its initiation, in industrially important filamentous fungi.

P-85

Aspergillus niger を用いた植物起源遺伝子発現における DNA 全合成の効果

幸田明生, 坪井宏和, 坊垣隆之, 峰時俊貴, 尾関健二, 広常正人 (大関総研)

【目的】*Aspergillus* 属糸状菌は外来遺伝子発現系として注目されているが、植物起源遺伝子の発現についてはあまり検討されておらず、報告例は限られている。本研究では、グルコース-1-リン酸または α -グルカンを合成するために有用な馬鈴薯由来 α -グルカンホスホリラーゼ (GP) について *Aspergillus niger* を宿主として効率的生産することを試みた。

【方法と結果】Native な GPcDNA を高発現ベクター (pNAN8142) に挿入し、*A. niger* を形質転換した。得られた形質転換体に GP 酵素活性は認められず、ノザン解析より目的の mRNA が検出されなかったことから、転写段階あるいは mRNA の安定性に障害があると考えられた。Native GPcDNA は AT 含量が高く、また codon usage も *A. niger* と大きく異なるため障害の原因となっていることが予想された。そこで AT 含量、codon usage を考慮し DNA 配列を設計、Assembly PCR により遺伝子全長を合成した。合成 GP 遺伝子を導入した形質転換体は顕著な GP 酵素活性を示し、菌体抽出液の SDS-PAGE において主バンドとして確認される程のレベルであった。また、対応する mRNA が検出できたことから、DNA 配列の改変が mRNA 量の増加に有効であったことが確認された。以上より、糸状菌宿主において DNA 配列の再設計が植物など異種起源遺伝子の発現に極めて有効であることが示された。

Expression of potato alpha-glucan phosphorylase gene in *Aspergillus niger*- effect of codon optimization of the gene-

Akio Koda, Hirokazu Tsuboi, Takayuki Bogaki, Toshitaka Minetoki, Kenji Ozeki, Masato Hirotsune

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

P-86

遺伝子組換え麹菌のモデル土壤環境における生存性

楠本憲一¹、古川育代¹、北本則行²、鈴木聡¹、柏木豊¹ (¹食総研、²愛知産技研・食工技セ)

【目的】麹菌等の実用菌株に対する遺伝子組換え技術の進展に伴い、実用菌株の環境中における生存性の解明が求められている。演者らは麹菌 *Aspergillus oryzae* PTR-1 が土壤または水道水を用いたモデル環境中で2ヶ月以上生存することを報告した¹⁾。これに続いて、実用麹菌由来株及び、セルラーゼ高発現性遺伝子組換え株を用いて、モデル土壤中における生存性を比較検討した。

【方法及び結果】醤油用麹菌由来の *A. oryzae* KBN616-39 と、本株にエンド-ベータ-1,4-グルカナーゼ遺伝子 *celB* を導入したセルラーゼ高発現株 *A. oryzae* TB-1 を用いた。園芸用川砂あるいは黒土(水分含量各5%、44%)をフタ付き容器に入れ、KBN616-39 または TB-1 の胞子を接種し、25°Cで静置培養を行った。経時的に土壤をサンプリングし、その抽出液を用いて、希釈平板法により生菌数を算出した。各試験区において2回ずつ試験した結果、KBN616-39 は黒土中で40日後において初発菌数の約60及び80%、川砂中で約35及び80%残存していた。また、TB-1 の生存率は黒土中で40日後において約50及び80%であったが、川砂中で約1及び30%に低下していた。TB-1 は遺伝子組換え操作により川砂中での生存率が低下するような何らかの変異が生じたことが考えられた。本研究の一部は農林水産省委託研究「遺伝子組換え体の産業利用における安全性確保総合研究」により行なわれた。

¹⁾楠本ら、第55回日本生物工学会大会講演要旨集、p.188 (2003)

Survivability of the recombinant koji molds in the model soil

Ken-Ichi Kusumoto¹, Ikuyo Furukawa¹, Noriyuki Kitamoto², Satoshi Suzuki¹, Yutaka Kashiwagi¹

(¹Natl.Food.Res.Inst, ²Food Res. Center, Aichi Ind. Technol. Inst.)

鎌倉高志.....	28	櫻庭 壯.....	68
鎌田 堯.....	35	幸 克行.....	35
嘉屋重雅幸.....	35	佐藤利次.....	23
河合良夫.....	41, 47	佐藤正仁.....	42
川上佐知子.....	23	佐野元昭.....	28, 30, 36
川口剛司.....	38, 64	鮫島正浩.....	24, 56, 65
川戸章嗣.....	36, 49	椎名松子.....	56
川部眞登.....	31	宍戸和夫.....	23, 58
神田鷹久.....	40	志田洋介.....	45
菊池 久.....	50	柴田 航.....	68
菊間隆志.....	67	島田龍一.....	40
北本勝ひこ.....	21, 22, 31, 33, 39, 48	清水公德.....	14
.....	51, 54, 55, 67, 69	清水広之.....	26
北本則行.....	63, 64, 70	下坂 誠.....	40, 68
鬼頭英樹.....	36	正路淳也.....	51
木野邦器.....	25, 51	城島 透.....	58
木村多江.....	64, 67	新聞陽一.....	28
木村俊之.....	44	末武弘章.....	31
桐村光太郎.....	25, 51	杉山純也.....	41
金 鋒杰.....	39	鈴木 聡.....	47, 64, 67, 70
ゲン・コン・ハ.....	32	鈴木沙也香.....	66
草井 啓.....	25, 51	鈴木雅博.....	44
楠本憲一.....	47, 64, 67, 70	鈴木 讓.....	31
工藤愛子.....	68	砂川美佐緒.....	28
工藤俊章.....	41, 47, 63	炭谷順一.....	64
窪寺隆文.....	12, 26	勢ノ康代.....	48
倉都将宏.....	51	妹尾彰宏.....	50
倉持太一.....	50	曾根輝雄.....	32, 50
幸田明生.....	70	高木 忍.....	19
合田秀矢.....	41, 54	高瀬久美子.....	28
小島泰弘.....	49	高橋健二.....	45
小関卓也.....	45, 46	高橋 徹.....	29
児玉基一朗.....	18, 60	高谷直樹.....	10, 25
小林哲夫.....	26, 33, 41, 43, 54, 66	竹内道雄.....	32, 66
五味勝也.....	19, 26, 27, 29, 30, 34	竹下典男.....	21, 62
.....	55, 65	竹谷博子.....	67
近藤竜彦.....	37	多田倫子.....	37
斉藤勝一.....	36, 42	多田羅洋太.....	52, 59
齋藤憲一郎.....	28	田中秀典.....	53
坂神洋次.....	37	塚田剛士.....	56
坂口 孝.....	43	柘植尚志.....	60, 61
坂本和俊.....	43, 44, 48, 62, 65, 69	坪井宏和.....	70
坂本裕一.....	23	出岡 顕.....	62

寺岡 徹.....	28, 31, 61	福田良一.....	38
寺島和寿.....	35	藤井 勲.....	34, 48, 58
富樫加奈.....	61	藤岡智則.....	20, 34, 50, 57
徳岡昌文.....	19, 34	藤村 真.....	63
都甲 建.....	49, 57	伏信進矢.....	45, 46
土佐幸雄.....	18	古川育代.....	70
戸田智美.....	28	古川健太郎.....	20, 34, 57, 66
戸田 弘.....	40	古川隆紀.....	40
富田敏夫.....	22	坊垣隆之.....	70
富田(菅原)典子.....	22	星由紀子.....	20
富田房男.....	50	星野貴行.....	25
富永美穂子.....	62	星野正幸.....	49
中川志穂.....	40	堀内裕之.....	21, 33, 38, 54, 62
中川 智.....	50	前田達哉.....	20
長澤真由子.....	53	前田 浩.....	29, 30
中島 佑.....	20, 29, 30, 34, 50, 56	牧田智裕.....	26, 43
.....	57, 69	町田雅之.....	28, 29, 30, 36
中濱智之.....	55	松下真由美.....	47
中村 顕.....	25	松下真由美.....	67
中村亘宏.....	31	松田吉彦.....	69
中村麻里子.....	54	松林良博.....	66
中屋敷均.....	18	馬橋由佳.....	31
難波 剛.....	59	眞山滋志.....	18
仁木孝治.....	57	丸井淳一朗.....	66
西村麻里江.....	59	丸山潤一.....	21, 22, 39, 69
丹羽修身.....	19	水谷 治.....	20, 34, 56, 57, 69
野口桂代子.....	22	水野 猛.....	66
萩原大祐.....	66	水野雅史.....	23
橋爪克己.....	45, 46	峰時俊貴.....	70
橋本洋一.....	22	三室仁美.....	22
長谷川祥子.....	55	宮崎安将.....	58
長谷川史彦.....	29, 30	宮永顕正.....	46
湊健一郎.....	23	宮本奈緒.....	35
秦 洋二.....	36, 49	三輪陽三.....	46
八田理恵子.....	60	六車三治男.....	53
服部貴澄.....	25, 51	向坂由貴.....	41, 47
林 長生.....	59	村口 元.....	35, 52
林 梨咲.....	44, 62	村山肇子.....	68
播本佳明.....	60	本山高幸.....	41, 47, 63
久田博元.....	36	森川 康.....	40, 45, 53
広常正人.....	70	森口智美.....	58
深田純司.....	59	安田(吉野)庄子.....	63
福田一治.....	62	柳 園江.....	52

柳谷真理.....	64	山根倫子.....	30
山形洋平.....	20, 29, 30, 50, 56, 57	山本幹博.....	60
.....	69	吉田 孝.....	52
八卷幸二.....	44	吉田 誠.....	24, 56, 65
八卷裕一.....	27	米田幸世.....	29
山岸賢治.....	44	米原由希.....	46
山岸大輔.....	18	李 允惠.....	62
山崎 丘.....	58	李 載源.....	65
山崎晴丈.....	38	龍 宏一.....	66
山田 修.....	43, 44, 48, 62, 65	渡辺泰祐.....	39
山田雅人.....	68		

糸状菌分子生物学研究会 会則

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

以上

補則

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

糸状菌分子生物学研究会運営委員会名簿

会 長

北本 勝ひこ

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

運営委員

秋田 修

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

五味 勝也

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

鮫島 正浩

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

会計担当

有江 力

東京農工大学農学部（〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8）

竹内 道雄

東京農工大学農学部（〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8）

編集担当

小林 哲夫

名古屋大学大学院生命農学研究科（〒464-8601 名古屋市千種区不老町）

広報担当

川口 剛司

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

庶務担当

堀内 裕之

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