

目次

コンファレンスプログラム	2
発表演題及び講演時間	3
シンポジウム講演要旨	11
一般講演要旨	40
ポスター発表講演要旨	50
人名索引	82
糸状菌分子生物学研究会会則	85
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿	86

第 5 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 17 年 11 月 7 日（月） - 9 日（水）

会場：東京大学弥生講堂

（東京都文京区弥生 1 - 1 - 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 7 日（月）

13:00-18:00 シンポジウム「タンパク質工場としての麹菌の高度利用」
18:00- 懇親会（農学部生協食堂）

11 月 8 日（火）

9:30～12:00 シンポジウム「糸状菌の有性生殖、無性生殖」
12:00～13:30 昼休み
13:30～15:30 ポスター発表（P-1～P-34）
15:30～17:15 一般講演（O-1～O-7）
17:15～17:25 総会

11 月 9 日（水）

10:30～12:00 一般講演（O-8～O-13）
12:00～13:30 昼休み
13:30～15:30 ポスター発表（P-35～P-64）
15:30～17:00 一般講演（O-14～O-19）
17:00～17:05 閉会の辞

発表演題および講演時間

シンポジウム 11月7日（月）13:00-18:00

「タンパク質工場としての麹菌の高度利用」

共催 生物系特定産業技術研究支援センター

- 13:00 「はじめに」 北本 勝ひこ（東大院・農生科・応生工）
- 13:05 **S-1**「麹菌発現用プラスミドの超迅速作成法とそれを用いたフグタンパク質の生産」
有岡 学（東大院・農生科・応生工）
- 13:25 **S-2**「麹菌によるヒトリゾチーム生産に及ぼすプロテアーゼ遺伝子破壊の効果」
丸山 潤一（東大院・農生科・応生工）
- 13:45 **S-3**「麹菌細胞壁のリモデリング：細胞内に生産させたタンパク質を培養上清へ回収するための戦略」
堀内 裕之（東大院・農生科・応生工）
- 14:05 **S-4**「麹菌の液体培養で固体培養と同様の遺伝子発現を実現するための戦略」
坂本 和俊（酒類総合研究所）
- 14:25 **S-5**「プロテオームから見た麹菌のタンパク質生産機構」
岩下 和裕・織田 健（酒類総合研究所）
- 14:45 （休憩）
- 14:55 **S-6**「コドン最適化による麹菌の異種タンパク質生産効率の向上」
五味 勝也（東北大院・農・生物産業創成科学）
- 15:15 **S-7**「*Aspergillus* 属糸状菌のタンパク質大量生産システム：高転写・高翻訳系の開発」
幸田 明生（大関・総研）
- 15:35 **S-8**「麹菌の多彩な物質生産のための新規宿主ベクター系の開発」
石田 博樹（月桂冠・総研）
- 15:55 **S-9**「**High level production of biopharmaceuticals in the fungus *Aspergillus oryzae***」
Hjort, C. (Fungal Gene Technology, Novozymes A/S, Denmark)
- 16:30 （休憩）
- 16:40 **S-10**「**Genomic analysis of protein secretion and associated stresses in *Aspergillus***」
Archer, D. B. (University of Nottingham, UK)
- 17:35 「パネル討論」 講演者全員
- 17:55 「終わりに」 秋田 修（酒類総合研究所）

シンポジウム 11月8日(火) 9:30~12:00

「糸状菌の有性生殖・無性生殖」

Sexual and asexual development in filamentous fungi

- 9:30 **S-11 「子囊菌および不完全子囊菌の交配と交配型遺伝子」**
有江 力、金子 功¹、金森正樹²、加藤ハナ³、井山真琴⁴、富樫加奈、寺岡 徹
(東京農工大学大学院・¹現 農業環境技術研究所・²現 サントリー先進技術応用研究所・³現 TIS・⁴現 JICA)
- 10:00 **S-12 Mating Type Genes-Mediated Sexual Reproduction in Filamentous Ascomycetes**
Sung-Hwan Yun (Soonchunhyang University, Korea)
- 10:30 **S-13 Sexual Development, Pheromon Receptor in *Aspergillus nidulans***
Kap-Hoon Han (PaiChai University, Korea)
- 11:00 **S-14 Mating Genes in *Aspergillus oryzae* Genome: Can It have a Sexual Life Cycle?**
Nanase Yamamoto¹, Praveen Rao Juvvadi¹, Jun-ichi Maruyama¹, David B Archer², Katsuhiko Kitamoto¹ (¹Department of Biotechnology, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-Ku, Tokyo 113-8657, Japan. ²School of Biology, University of Nottingham, University Park, Nottingham, NG7 2RD, UK.)
- 11:30 **S-15 「*Aspergillus nidulans* における三つの mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路」**
古川健太郎、阿部敬悦 (東北大院農・応生科)

一般講演 (O-1~O-7) 11月8日(火) 15:30~17:15

- 15:30 O-1 麹菌のフィルター培養条件下での発現解析
佐野元昭, 小林亜希子, 町田雅之*, 大箸信一 (金沢工大, *産総研)
- 15:45 O-2 テロメア付加ベクターによる麹菌形質転換と導入 DNA の解析
楠本憲二, 古川育代, 木村多江, 松下真由美, 鈴木聡, 柏木豊, (食総研)
- 16:00 O-3 糸状菌・酵母における RNA サイレncing 経路の進化的解析
中屋敷均, 角谷直樹, Nguyen Bao Quoc, 眞山滋志 (神戸大・農学部)
- 16:15 O-4 EGFP と AoVam3p の融合タンパク質を用いた液胞膜の可視化による麹菌
A. oryzae 液胞の形態解析
正路淳也, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- 16:30 O-5 麹菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシス経路の解析
樋口裕次郎, 中濱智之, 正路淳也, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- 16:45 O-6 麹菌(*Aspergillus oryzae*)の *impala* 様 DNA トランスポゾン *Aoimp1* の菌株間多様性と
転移活性
小笠原博信^{1, 2}, 小畑 浩³, 秦 洋二³, 高橋砂織², 五味勝也¹
(¹東北大院農・生物産業創成, ²秋田県総食研・生物機能, ³月桂冠・総研)
- 17:00 O-7 クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* における活性酸素種に対する耐性の **alternative oxidase** の寄与
服部貴澄, 木野邦器, 桐村光太郎 (早大・理工・応化)

一般講演 (O-8~O-13) 11月9日(水) 10:30~12:00

- 10:30 O-8 イネいもち病菌の APSES タンパク質 Mstu1 は付着器の成熟を制御する
西村麻里江, 林長生 (生物研)
- 10:45 O-9 *Cryphonectria parasitica* の GTP 結合タンパク質 $\beta\gamma$ -サブユニットとフォスフェーシオン
笠原 純 (宮城大・食産業・環境システム)
- 11:00 O-10 ベト病菌, *Phytophthora infestans*, における低温に応答した遺伝子発現制御機構
について
谷修治*, Howard S. Judelson
(Dept. of Plant Pathology, UC Riverside. *現所属: 阪府大院・生命環)
- 11:15 O-11 *Monascus purpureus* におけるカビ毒シトリニンの生産調節因子の機能解析
清水健雄¹, 木下浩¹, 永井史郎², 仁平卓也¹ (¹阪大・生物国際セ, ²ヤエガキ醸酵技研)
- 11:30 O-12 白色腐朽菌由来 P450/P450 レダクターゼ融合タンパク質 PcCYP17a の機能解析
志水元亨¹, 松崎芙美子¹, 廣末慎嗣², 有沢章², 恒川博², 割石博之¹
(¹九大院農, ²メルシャン)
- 11:45 O-13 白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の高窒素および低窒素条件下における細胞
外タンパク質の発現プロファイリング
寺本 寛, 志水元亨, 割石博之 (九大院・農)

一般講演 (O-14~O-19) 11月9日(水) 15:30~17:00

- 15:30 O-14 *Aspergillus oryzae* チロシナーゼのオリゴマー化と酸活性化機構
多田羅洋太, 難波 剛, 吉田 孝¹, 一島英治 (創価大院・生物工, ¹弘前大・農学生命)
- 15:45 O-15 糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるレスポンスレギュレーター解析
萩原大祐, 丸井淳一朗, 加藤雅士, 小林哲夫, 水野猛 (名大院・生命農学)
- 16:00 O-16 麹菌プロセッシングプロテアーゼ (KexB)の欠損が細胞壁構造に及ぼす影響
水谷治¹, 椎名松子², 佐野元昭³, 山形洋平², 渡邊剛志⁴, 阿部敬悦², 町田雅之⁵, 中島佑², 五味勝也¹
(¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大院農・応生化, ³金沢工大, ⁴新潟大・農, ⁵産総研)
- 16:15 O-17 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) の細胞内局在化部位、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)
- 16:30 O-18 Putative role of protein kinase C in the phosphorylation and multimerization of the Woronin body protein, AoHex1, in *Aspergillus oryzae*
Praveen Rao JUVVADI, Jun-ichi MARUYAMA and Katsuhiko KITAMOTO
(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)
- 16:45 O-19 麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジーの分化、発生への関与
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)

ポスター発表 11月8日 奇数番号 13:30-14:30 偶数番号 14:30-15:30

- P-1 ムギ類赤カビ病菌 *Fusarium graminearum* の発芽胞子におけるリン酸化タンパク質の解析
生駒卓也, 須賀晴久*, 鈴木徹*, H. C. Kistler. **, 百町満朗 (岐大・応生, *岐大・生命セ, **Univ. of Minnesota)
- P-2 チリ産トマト属野生種から分離した非病原性 *Fusarium oxysporum* の分子系統解析
岡部明子, 石川暢子*, 川部眞登**, 児玉基一郎***, 寺岡 徹, 有江 力 (東京農工大・*現食品分析センター・**ワシントン州大・***鳥取大)
- P-3 *Gibberella fujikuroi* 子嚢胞子における形質の分離と培養上清による子嚢殻形成誘導
富樫加奈, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大・農)
- P-4 パーティシリウム萎凋病菌 *Verticillium longisporum* のPCR検出と分子系統解析
斉藤秀成¹, 森沙織¹, 酒井宏², 漆原寿彦², 藤村真¹ (¹東洋大・生命, ²群馬農技セ・生産環境)
- P-5 ウリ類炭疽病菌の *ClacWH41* 遺伝子は宿主侵入に必須であり侵入器官の細胞壁合成に関与する
松井理恵・宮地俊彦・辻 元人・辻山 彰一・Richard O'Connell・白石友紀*・久保康之 (京府大院農・岡山大農*)
- P-6 GATEWAY システムを利用した糸状菌用遺伝子破壊ベクターの構築
阿部 歩, Evelyn B. Elegado, 曾根輝雄 (北大院農・応用菌学)
- P-7 イネいもち病菌の DNA 組換え修復遺伝子群の解析
Evelyn B. Elegado, 阿部 歩, Marites A. Sales, 岩崎阿寿美, 石井千津*, 曾根輝雄 (北大院農・応用菌学, *元埼大理・生体制御)

- P-8** イネいもち病菌の付着器形成に対するマクロライド系抗生物質の影響
武川 治, 鎌倉高志 (東理大理工)
- P-9** イネいもち病菌の葉鞘細胞内での感染動態と遺伝子発現
三田地貴史・齋藤憲一郎・金森正樹・有江力・寺岡徹 (農工大農)
- P-10** イネいもち病菌付着器形成関連遺伝子 *CBPI* 産物の局在性の検討
岡本俊輔, 齋藤憲一郎*, 有江 力*, 寺岡 徹*, 鎌倉高志 (東理大理工・*農工大農)
- P-11** イネいもち病菌のヒスチジンキナーゼ *Hik1* の情報伝達系の解析
森田真純^{1,2}, 本山高幸¹, 宇佐美論², 工藤俊章¹ (¹理研・中央研、²東洋大・工)
- P-12** イネいもち病菌の二成分情報伝達系の環境応答への関与の解析
向坂由貴, 本山高幸, 工藤俊章 (理研・中央研)
- P-13** *Neurospora crassa* の浸透圧 OS シグナル伝達経路の下流で制御される遺伝子の同定
野口莉枝子, 坂野真平, 市川亮太, 木村真¹, 山口勇², 藤村真 (東洋大・生命,¹理研,²東洋大・工)
- P-14** アカパンカビのヒスチジンキナーゼ-MAP キナーゼ経路と cAMP-PKA 経路のクロストーク
渡邊節子¹, 塩澤あずさ¹, 坂野真平¹, 木村真², 藤村真¹ (¹東洋大・生命, ²理研・中央研)
- P-15** *N.crassa* の複数のヒスチジンキナーゼが浸透圧応答に関与する
塩澤あずさ¹, 岡田晃佳¹, 落合則幸², 寺井明穂¹, 木村真², 藤村真¹ (¹東洋大・生命, ²理研・中央研)
- P-16** *Cryptococcus neoformans* のハイブリッド型 Histidine kinase をコードする遺伝子 *CnNik1* の機能解析
清水公德¹, 渡辺哲¹, 亀井克彦¹, Drivinya Antra¹, 吉見啓², 田中千尋², 川本進¹ (¹千葉大・真菌セ, ²京大院・農)
- P-17** *Aspergillus nidulans* ヒスチジンキナーゼ遺伝子 *nika*、*phkA*、*phkB* の機能解析
松林良博、山崎ゆかり、丸井淳一朗、加藤雅士、小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)
- P-18** 糸状菌の Hog1 型 MAPK の活性はグループⅢヒスチジンキナーゼによって制御される
吉見啓¹, 小島海平^{2,3}, 高野義孝², 田中千尋¹ (京大院農・¹地環科・²応生物, ³現・デューク大)
- P-19** アカパンカビのシグナル遺伝子 *ncSCD1*、*ncSCD2* の解析
川村真志, 一石昭彦 (東洋大・生命科学部)
- P-20** adenylyl cyclase 突然変異を抑圧する突然変異体
茂泉幸太¹, 河内征典¹, 工藤愛子², 村山肇子¹ 1) 関東学院大・工・物質生命科学科 2) 旭ガラス (株)
- P-21** 麹菌 *Aspergillus oryzae* は光に応答し分化を決定する
畠山理広, 中濱智之, 樋口裕次郎, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-22** THE *smtA* GENE ENCODING A SAM METHYL TRANSFERASE IS REQUIRED FOR NORMAL DEVELOPMENT OF *ASPERGILLUS NIDULANS*
Kap-Hoon Han¹, Hyo-Jung Kim, Jee Hyun Kim, and Dong-Min Han (Div. Biol. Sci. Wonkwang Univ. Iksan, 570-749, Korea, ¹Dept. Pharm. Engin. Woosuk Univ. Wanju, 565-701, Korea)
- P-23** *Aspergillus oryzae* における *steA* ホモログの機能解析
森田寛人, 竹内道雄 (東京農工大院・生物工学)

P-24 Sexuality and asexuality in *Aspergillus* species

Fabian A. Seymour¹, Mathieu Paoletti¹, Nanase Yamamoto², Praveen R. Juvvadi², Jun-ichi Maruyama², Katsuhiko Kitamoto², David B. Archer¹, Paul S. Dyer¹ (¹School of Biol., Univ. of Nottingham, UK, ²Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-25 黄麹菌生育菌体内プロテオームの解析

神太郎, グエン・コン・ハ, 竹内道雄 (東京農工大学・応用生物科学科)

P-26 糸状菌における APase 遺伝子の多様性

岡本綾子, 竹内道雄 (東京農工大学・農・応生科)

P-27 糸状菌 *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¹, 古川健太郎¹, 水谷治², 藤岡智則¹, 徳岡昌文², 五味勝也², 阿部敬悦¹ (東北大院農・¹応生科, ²生物産業創生)

P-28 糸状菌 *Aspergillus nidulans* における class III キチン分解酵素をコードする遺伝子の機能解析

山崎晴丈, 堀内裕之, 太田明徳 (東大院・農生科・応生工)

P-29 *Aspergillus tamarii* 由来の *niaD* 遺伝子の構造

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-30 Insights into RIP and DNA methylation in the *Aspergillus* section Flavi complex

Heather A. Lee, Maria Dolores Montiel and David B. Archer (Institute of Genetics, School of Biology, University of Nottingham, University Park, Nottingham, NG7 2RD)

P-31 麹菌の G タンパク質共役型 cAMP 受容体相同遺伝子

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-32 Dikaryon の分裂におけるクランプの意義

岡崎孝映, 丹羽修身 (かずさ DNA 研究所・染色体機能領域第一)

P-33 *smuH501*, a second mutation found in the original *uvsH77* mutant strain that involved in DNA replication checkpoint control in *Aspergillus nidulans*

Mee-Jeong Cha, Sun-Hee Noh, Nak-Jung Kwon, and Suhn-Kee Chae (Dept. Biochem. and Biomed RRC, Paichai Univ. Daejeon, 302-735 Korea)

P-34 蛍光タンパク標識を用いた *Aspergillus nidulans* タンパク質の細胞周期変動のライブイメージング: II 型 topoisomerase を中心に

¹紅 朋造, 川岸美佳, 菊池韶彦, ²Berl R. Oakley, ³堀尾哲也 (¹名古屋大院医系・分子標的, ²オハイオ州立大・分子遺伝, ³徳島大院・ヘルスバイオ)

ポスター発表 11月9日 奇数番号 13:30-14:30 偶数番号 14:30-15:30

P-35 シイタケ(*Lentinula edodes*)の β -1,3-グルカナーゼの解析

坂本裕一, 永井勝, 中出啓子, 佐藤利次 (岩手生工研)

P-36 シイタケの子実体形成過程において特異的に発現する遺伝子群の単離と解析

宮崎安将, 中村雅哉, 馬場崎勝彦 (森林総研)

- P-37** 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が有する P450 遺伝子の発現プロファイリング
 中村知恵¹、廣末慎嗣²、平塚宣博¹、山田修司³、親泊政二三³、有沢 章²、恒川 博²、割石博之¹
 (¹九大院農、²メルシャン生資研、³JST 割石プロジェクト)
- P-38** 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* におけるセルロース分解酵素遺伝子発現応答に関する研究
 鈴木一史、五十嵐圭日子、鮫島正浩 (東大院・農生科)
- P-39** 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来トレハロース加リン酸分解酵素の機能解析
 平石正男、五十嵐圭日子、鮫島正浩 (東大院・農生科)
- P-40** 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が生産する糖質加水分解酵素ファミリー74 キシログルカナナーゼの機能解析
 石田卓也¹、加治佐平¹、五十嵐圭日子¹、矢追克郎²、日吉あや子²、三石 安²、鮫島正浩¹ (¹東大院・農生科、²産総研)
- P-41** 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が生産する糖質加水分解酵素ファミリー1 に属する β -グルコシダーゼの機能解析
 塚田剛士¹、二十軒悠里¹、吉田誠²、伏信進矢¹、五十嵐圭日子¹、鮫島正浩¹ (¹東大院・農生科、²食総研)
- P-42** DNA の非特異的増幅を利用した木材腐朽菌の高感度検出
 和田朋子、加治佐平、五十嵐圭日子、鮫島正浩 (東大院・農生科)
- P-43** 麹菌における新規の糖鎖関連活性タンパクの探索
 玉野孝一、寺林靖宣、佐藤友紀、堀越江美*、砂川美佐緒、山根倫子、町田雅之 (産総研・生物機能、*日大・生産工学)
- P-44** *A. oryzae* における N-結合型糖鎖と相互作用するタンパク質のスクリーニング
 丸山潤一¹、松尾一郎²、伊藤幸成²、北本勝ひこ¹ (¹東大院農生科・応生工、²理研)
- P-45** 麹菌 *A. oryzae* における ER-Golgi 体間の輸送に関わる SNARE の局在解析
 田浦綾子、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-46** 麹菌 *A. oryzae* における post-Golgi 輸送に関わる SNARE の局在解析
 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-47** 麹菌 *A. oryzae* における接合フェロモン前駆体遺伝子 *AoppG* の機能解析
 山本七瀬、JUVVADI Praveen Rao、丸山潤一、北本勝ひこ (東大院農生科・応生工)
- P-48** プロテアーゼ遺伝子破壊による麹菌 *A. oryzae* を用いたヒトリゾチーム生産量の増加
 渡辺泰祐、金鋒杰、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-49** 麹菌 *A. oryzae* における 2つの分泌型ホスホリパーゼ A₂ の抗体を用いた局在解析と RT-PCR による発現解析
 中濱智之、北本勝ひこ、有岡 学 (東大院・農生科・応生工)
- P-50** 麹菌 *A. oryzae* を用いたトラフグ・パフレクチンの生産
 笹栗志保、馬橋由佳、丸山潤一、有岡学、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-51** 麹菌 *A. oryzae* における *Aovps24* (class E *vps*) 遺伝子の単離と解析
 辰巳晶紀、菊間隆志、有岡学、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-52** 麹菌 *A. oryzae* の III 型ポリケタイド合成酵素遺伝子の発現と機能解析
 勢ノ康代¹、藤井 勲²、Praveen Rao Juvvadi¹、海老塚豊²、北本勝ひこ¹ (¹東大院・農生科・応生工、²東大院・薬)

- P-53** *Penicillium luteo-aurantium* の新規ポリケタイド合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析
佐野裕基、石井絵美、藤井 勲、海老塚豊 (東大院・薬)
- P-54** 糸状菌芳香族ポリケタイド合成酵素のクライゼンサイクラーゼドメイン
宮崎 俊、藤井 勲、海老塚豊 (東大院・薬)
- P-55** 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-56** 糸状菌 *A. nidulans* アミラーゼ遺伝子群の発現プロファイリング
中村貴、牧田智裕、加藤雅士、小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)
- P-57** 麹菌キシラナーゼ・セルラーゼ誘導因子 AoXlnR の転写制御機構
野口祐司、田中寿基、加藤雅士、小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)
- P-58** 麹菌 CCAAT 結合因子優勢阻害型変異サブユニットの解析：制御される遺伝子群の網羅的解析への利用
杉山純也、高橋明珠、合田秀矢、小林哲夫、加藤雅士 (名大院・生命農・生物機構)
- P-59** 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の HSP30 遺伝子プロモーターの Deletion 解析
松下真由美、鈴木 聡、楠本憲一、柏木 豊 ((独) 食総研)
- P-60** 麹菌 *Aspergillus oryzae* の低温誘導プロモーターの単離
久田博元、堤浩子、秦洋二、安部康久 (月桂冠総研)
- P-61** 麹菌と酵母における遺伝子発現の比較解析
山根倫子、寺林靖宣、佐野元昭*、高瀬久美子、大箸信一*、町田雅之 (産総研・*金沢工大)
- P-62** Carbon and nitrogen repression of the expression of *citA* gene encoding citrate synthase in *Aspergillus nidulans*
Pil Jae Maeng* and Yeong Man Yu (Dept. of Microbiology, Chungnam National Univ., Daejeon 305-764, Korea)
- P-63** RNAi による麹菌(*Aspergillus oryzae*)遺伝子サイレンシング系の開発
山田 修、坂本和俊、秋田 修 (酒総研)
- P-64** クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* における緑色蛍光タンパク質をマーカーとして用いた alternative oxidase 遺伝子 (*aox1*) の発現解析
小河賢史、服部貴澄、木野邦器、桐村光太郎 (早大・理工・応化)

S-1

麹菌発現用プラスミドの超迅速作成法とそれを用いたフグタンパク質の生産

有岡 学 (東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻)

はじめに

ポストゲノム時代の到来に伴い、研究材料として使用する高品質なタンパク質、あるいは医薬用途などの付加価値の高い有用タンパク質を大量にそして迅速に生産する技術の進歩が強く望まれている。大量に、安価に、かつ短時間でタンパク質を生産するには微生物宿主が適しているが、中でも糸状菌は酵母などに比べてはるかに多量のタンパク質を細胞外に分泌する能力を持つことから、酵素剤などの生産に広く用いられてきた。特に麹菌 *Aspergillus oryzae* は我が国の伝統的な醸造製品である酒、味噌、醤油などといった様々な食品の製造に 1000 年以上にわたって利用されてきた経験から、人体にとって安全性の高い宿主として認められており、その高いタンパク質分泌生産能力を利用して食品・化成品・医薬品向けの酵素剤および代謝化合物が生産され国際的に広く流通している。

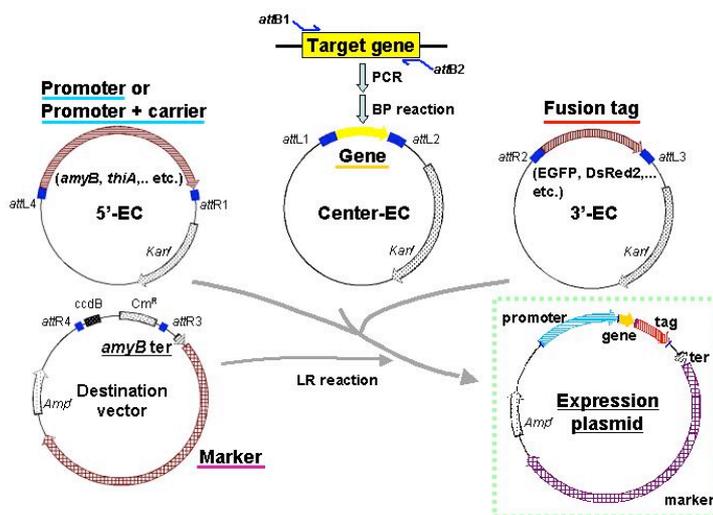
麹菌を用いて異種タンパク質、特に分泌タンパク質を生産する際には、一般に強力なプロモーターを用い、グルコアミラーゼなど高発現するキャリアタンパク質との融合タンパク質として発現させることが多い。また発現のボトルネックとなる様々な要因を排除するため、宿主に対してシャペロンの高発現やプロテアーゼ遺伝子の破壊などの改変を加えることも行われる。こうした操作を効率よく行うためには、それらに用いる多数のプラスミドを迅速に構築する必要があるが、制限酵素とライゲーション反応を用いる従来のプラスミド構築法では、特に多種類の発現プラスミド構築を並行して行う際にしばしば困難が伴う。

近年、遺伝子の迅速なクローニングを行うための技術として MultiSite Gateway テクノロジーが開発された。これはλファージの組換え反応を利用することにより、ライゲーション反応を行うことなく複数の DNA 断片を一つのベクターに組み込むことを可能にするシステムである。我々はこのシステムを用いて麹菌用の発現ベクターおよび宿主改変用の種々のプラスミドを極めて容易に作製することのできるベクター系の開発を行った。本発表でははじめにその概説を行い、続いてそれを利用した異種タンパク質の生産実験に関して紹介したい。

A. *oryzae* における新規発現ベクター系の構築とそれを利用したミトコンドリアの可視化

Multisite Gateway システムではそれぞれ 5'-、中央、および 3'-エントリークローン (EC) 上にクローニングされた 3 つの DNA 断片を定められた順序と方向性で 1 つのベクターに移すことができる。我々は 5'-EC としてプロモーターあるいはプロモーター+キャリアタンパク質遺伝子を有するプラスミド、また中央および 3'-EC として N-あるいは C-末端融合タグ遺伝子を有するプラスミドを用意した。具体的には、プロモーター用として 3 種 (*amyB*, *thiA* および *pgkA*)、プロモーター+キャリアタンパク質用として 2 種 (*amyB* および *glaA*) の配列を持つ 5'-EC を、また N-あるいは C-末端融合タグ用として EGFP、DsRed2、GST、HA-His₆ の各配列を持つ中央あるいは 3'-EC を合計約 10 種類構築した。これにより、これら EC と目的遺伝子を有する中央あるいは 3'-EC とを適当に組み合わせることで数十種類の発現プラスミドを簡便に得ることができるようになった。また、これらとは別に選択マーカーのみを持つ中央 EC も用意し、遺伝子破壊用プラスミドを容易に作製できるようにした。

構築した麹菌用ベクターシステムの有効性を確認するため、ミトコンドリア可視化用のプラスミドを作製した。5'-EC として *amyB* あるいは *thiA* プロモーター、中央 EC としてミトコンドリア局在化シグナルを含む麹菌 citrate synthase 相同配列の N 末端側部分、また 3'-EC として EGFP あるいは DsRed2 を選択した。得られた発現用プラスミドを麹菌に導入し、蛍光顕微鏡で観察したところ、ミトコンドリアと考えられる多数のチュ



Multisite Gateway を利用した麹菌発現用プラスミド作製システム

Center-および 3'-EC についてはこの逆の組み合わせのプラスミドも作製した

一ブ状構造が、発現を誘導する条件下でのみ認められた。これらはいずれも Mitotracker 陽性であったことから、新規システムが計画通り機能することが確認された。

新規システムを利用した魚類生理活性タンパク質の生産

続いて東京大学付属水産実験所との共同研究として、新規システムを用いてトラフグ由来のレクチンであるパフレクチン (FrPI) の生産実験を行った。5'-EC として *amyB* プロモーターおよびキャリアを、3'-EC として解析および精製に用いる HA-His₆ タグを選択し、FrPI は中央 EC として調製した。その際、*amyB* と FrPI との連結部には Kex2 様プロテアーゼによる認識配列を挿入した。得られたプラスミドで形質転換した麹菌の培養上清を抗 HA 抗体を用いて解析したところ、目的とする FrPI::HA-His₆ 融合タンパク質の予想分子量を持つバンド以外にも、キャリアタンパク質と連結したままの状態と考えられるバンドも認められた。そこで Kex2 認識配列の直後にグリシンを 3 残基導入したプラスミドを同様にして構築し、プロテアーゼによる切断効率が上昇するかどうかを検討した。その結果、高分子量のバンドが消失し、ほぼ完全に切断されたバンドのみが認められた。これを Ni²⁺カラムを用いて精製し、アミノ酸配列の解析を行った結果、FrPI の N 末端配列が検出され、目的とする融合タンパク質が分泌生産されたことが確認された。

精製した組換え FrPI を用いて血球凝集活性およびレクチン活性を調べたところ、両活性とも認められた。現在、さらに大量のサンプルの調製を試みている。

以上のように、本研究で構築されたシステムを用いることで麹菌用の発現ベクターを極めて容易に作製することができるようになった。実際、当研究室ではこれを用いて数多くのプラスミドが作製されており、研究の迅速化が成されている。本システムの活用は調製するプラスミドの種類が多ければ多いほど効果的であることから、今後予想される麹菌のセルフファクトリーとしての高度利用においても必須のツールになると考えている。

本研究は生研センター基礎研究推進事業「タンパク質工場としての糸状菌の高度利用に関する基盤的研究」の一環として行われた。

A novel vector system for rapid preparation of *Aspergillus oryzae* expression plasmids: its application for production of *Fugu* proteins

Manabu Arioka (Department of Biotechnology, The University of Tokyo)

S-2

麹菌によるヒトリゾチーム生産に及ぼすプロテアーゼ遺伝子破壊の効果

丸山潤一（東大院農生科・応生工）

麹菌 *A. oryzae* はタンパク質高分泌能を有し、また安全性が認められていることから、異種タンパク質生産の宿主として注目されている。これまでの *A. oryzae* を用いた生産の試みでは、強力な高発現プロモーターの開発、コドンの最適化などで成果が得られている。一方で、糸状菌由来のものとは比べて高等生物由来のタンパク質の生産量が低いにもかかわらず、その分解に関与すると考えられるプロテアーゼ遺伝子破壊の報告はほとんどない。演者らは、異種タンパク質のモデルとしてヒトリゾチームの生産を *A. oryzae* を用いて行い、5種のプロテアーゼ遺伝子の破壊による効果を検討した。

1、*A. oryzae* を用いたヒトリゾチームの生産¹⁾

ヒトリゾチームを発現するためのプラスミドは、MultiSite Gateway™ システムにより作製した。またキャリアーには、*A. oryzae* が最も大量に分泌するタンパク質である α -アミラーゼ (AmyB) を用いた。amyB プロモーターおよび ORF の下流にヒトリゾチーム遺伝子をタンデムに2コピー連結した融合遺伝子を作製し、それぞれの連結部位には Kex2 切断配列を挿入した (図1)。宿主には、我々のグループで育種した4重栄養要求性 NSAR1

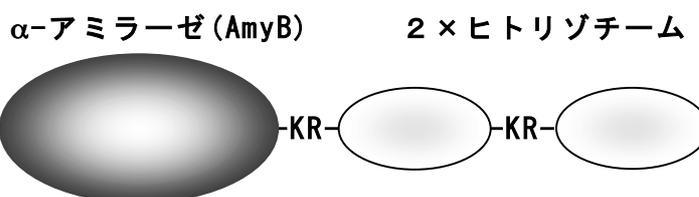


図1. ヒトリゾチーム生産のための融合タンパク質。各連結部分に挿入した配列(KR)はKex2様プロテアーゼにより切断されるので、遊離したヒトリゾチームが培地中に検出される。

株(*niaD⁻ sC⁻ ΔargB adeA*)^{2,3)}を使用した。この株を用いると、異種タンパク質を発現する以外に、*ptrA* マーカーも含めて最大4ステップの遺伝子操作が可能である。ヒトリゾチーム発現プラスミドを、*Aspergillus nidulans* sC マーカーにより NSAR1 株に形質転換した。取得した株の培養上清に対してウエスタン解析を行った結果、予想された分子量のヒトリゾチームが検出された。至適生産条件を検討した結果、5×DPY 液体培地(pH 8.0)で最大 15.6 mg/L の生産量が得られた。

2、5種のプロテアーゼ遺伝子破壊によるヒトリゾチーム生産の検討

次に、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遺伝子について、系統的に破壊株を作製した¹⁾。菌体外酸性プロテアーゼ (*pepA*)、菌体内酸性プロテアーゼ (*pepE*)、菌体外アルカリプロテアー

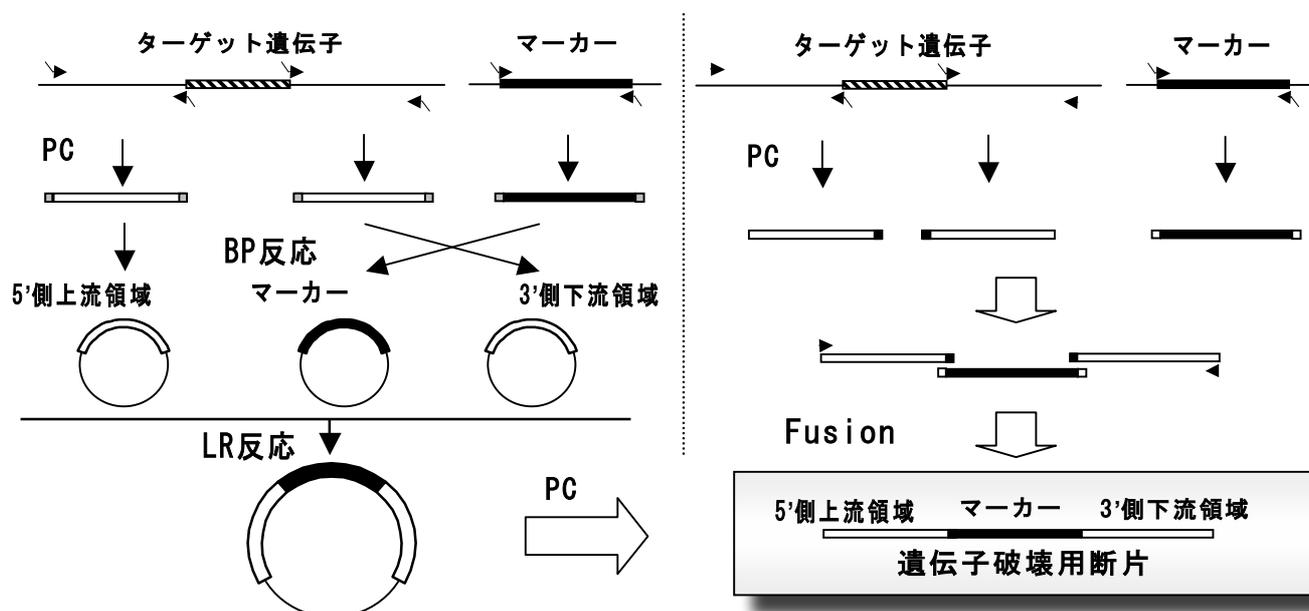


図2. MultiSite Gateway™システム (左) およびfusion PCR法 (右) による遺伝子破壊用断片の作製

ゼ (*alpA*))、トリペプチジルペプチダーゼ (*tppA*)、カルパイン様プロテアーゼ (*palB*) の5種の遺伝子を選び、MultiSite Gateway™ システムまたは fusion PCR 法を用いて破壊用 DNA 断片を作製した(図2)。これらの断片を *adeA* マーカーによってヒトリゾチーム生産株に形質転換し、目的の破壊株を取得した。各プロテアーゼ遺伝子破壊株のヒトリゾチーム生産性を5×DPY 液体培地(pH 8.0)において比較した。その結果、*tppA*、*palB*、*pepE*、*alpA*、*pepA* の順に遺伝子破壊の効果が認められ、なかでも *tppA* 遺伝子破壊株のヒトリゾチーム生産量は21.2 mg/Lに達した。

3) プロテアーゼ遺伝子2重破壊によるヒトリゾチーム生産量の増加

さらに、プロテアーゼ遺伝子を2重破壊することにより、ヒトリゾチーム生産量の増加を試みた⁴⁾。*palB* および *pepE* 各遺伝子破壊株に対して、*argB* を選択マーカーとして用い *tppA* 遺伝子を破壊した。これらの株を用いてヒトリゾチーム生産を行ったところ、*tppA*、*pepE* 遺伝子2重破壊株が最も高い生産量(25.4 mg/L)を示した。

これらの結果により、*A. oryzae* を用いたヒトリゾチーム生産において、プロテアーゼ遺伝子の2重破壊を行うことで約1.6倍の生産量増加に成功した(図3)。本研究は、*A. oryzae* において系統的なプロテアーゼ遺伝子破壊により高等生物由来タンパク質の生産量が上昇した初めての例である。また、異種タンパク質を発現、2重遺伝子破壊をしたうえで、それでもなお2ステップの遺伝子操作が可能である。さらに、小胞体シャペロンなど分泌関連遺伝子の操作をすることで、*A. oryzae* が有するタンパク質高生産能のポテンシャルが惜しみなく発揮されることが今後期待される。

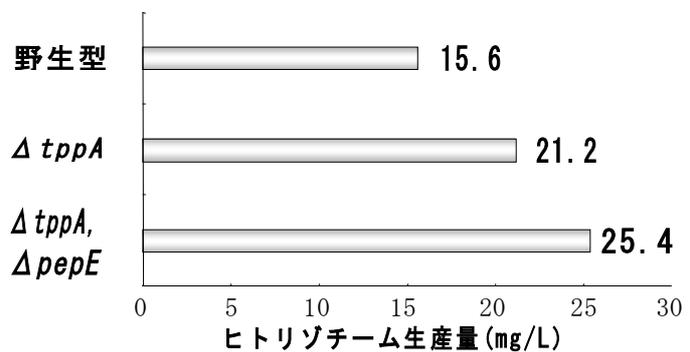


図3. プロテアーゼ遺伝子破壊による *A. oryzae* を用いたヒトリゾチーム生産量の増加

本研究は生研センター基礎研究推進事業「タンパク質工場としての糸状菌の高度利用に関する基盤的研究」の一環として行われた。

- 1) 金ら、第4回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集、p. 39
- 2) Jin *et al.*, FEMS Microbiol. Lett., 239, 79-85 (2004)
- 3) 北本ら、生物工学会誌、83, 277-279 (2005)
- 4) 金ら、日本農芸化学会 2005 年度大会要旨集、p. 240

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

Jun-ichi Maruyama

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

S-3

麹菌細胞壁のリモデリング：細胞内に生産させたタンパク質を培養上清へ回収するための戦略

堀内裕之（東京大学大学院農学生命科学研究科）

高等動植物から微生物までに及ぶ近年の急速なゲノムプロジェクトの進行は、人類の生活をより良くするための新たな可能性を示す一方で膨大な数の機能不明なタンパク質の存在を明らかにしてきた。そこでそれらタンパク質を調製しその機能を解析する手法を確立することは、ゲノムデータの高度利用において必要不可欠のことである。本研究はそのような状況の下で菌体内タンパク質の簡便な調製法として、糸状菌の細胞壁を人為的に改変することにより菌体内のタンパク質を培養上清へ漏出させ回収する手法の開発を目的としたものである。

麹菌 *Aspergillus oryzae* は古来より日本において清酒、醤油、味噌等の醸造、製造に利用されてきており、長い歳月にわたって人間の生活に密接にかかわってきたことからその安全性が認められており、その全ゲノム DNA 配列も決定されており、発現を制御可能な強力なプロモーター等も利用できることから、タンパク質生産の場としての利用に非常に適している。麹菌の細胞壁の主要構成成分は *N*-アセチルグルコサミンが β -1,4 結合でつながったポリマーであるキチンとグルコースが β -1,3 結合でつながった β -1,3-グルカンからなる。そこでこれらの分解酵素遺伝子の発現を人為的に制御することにより細胞質タンパク質の細胞外への漏出への効果を検討した。

麹菌キチナーゼ遺伝子の単離とその高発現

Aspergillus 属の糸状菌においてはすでに *Aspergillus nidulans*、*Aspergillus fumigatus* の全ゲノム配列が公開されているが、これらの配列情報から、*Aspergillus* 属糸状菌には十数種のキチナーゼ遺伝子が存在することが推定されており、*A. oryzae* にも同程度の数のキチナーゼ遺伝子の存在が推定された。そこでそれらの中から *A. oryzae* の細胞壁中のキチンを効率良く分解できるキチナーゼをコードする遺伝子を選択するため、我々の研究室において機能解析を行っている *A. nidulans* の 18 種のキチナーゼ遺伝子の中から、細胞壁キチンの分解に適したキチナーゼをコードすると考えられる *chiA*、*chiB* に着目した。*A. nidulans* において *chiB* の発現は培養後期に誘導され、その自己溶菌において重要な役割を果たすことが示されており(山崎ら、投稿準備中)、*chiA* は高発現させることによりある種の条件下で菌糸の溶菌に効果があることが示唆されていた。*chiA*、*chiB* の *A. oryzae* のオーソログ（ここでは *A. nidulans* の遺伝子との区別のために *AochiA*、*AochiB* と呼ぶ）に対し、*A. oryzae* のゲノム情報を利用してそれぞれ遺伝子を単離し、その発現について検討した。その結果、これら遺伝子の発現は、*A. nidulans* の *chiA*、*chiB* の発現様式とはパターンを異にしており、通常の培養では *A. oryzae* では *AochiA* の発現量が多く、*AochiB* の発現はほとんど見られなかった。*AochiA*、*AochiB* をそれぞれ *A. oryzae* の *amyB* プロモーターの下流につないだ形で *A. oryzae* の *thiA* locus に導入し、*amyB* プロモーターの高発現条件である培地の炭素源をマルトースにしたプレート上で培養した場合の影響について検討したが、これらの遺伝子を単独で高発現させただけでは菌糸の形態に変化は見られなかった。

グルカナナーゼ遺伝子の単離とその高発現の効果

次に β -1,3-グルカナナーゼ遺伝子を単離してその高発現の効果を検討した。*A. oryzae* のゲノム上にはキチナーゼの場合と同様 β -1,3-グルカナナーゼと相同性を有する遺伝子が多数存在することが推定されたため自己溶菌と比較的類似した環境であると考えられる炭素源を除いた状況での *A. oryzae* の EST 情報より 3 種のグルカナナーゼをコードする遺伝子を同定し、その全長を単離した。これらの遺伝子を *gluA*、*gluB*、*gluC* と命名し、それぞれ *amyB* プロモーター下、*sC* locus で高発現できる株を作製した。その結果、*gluA*、*gluB* を高発現できる株では培地の炭素源をマルトースにしたプレート上では、非常に低頻度ではあるが菌糸の溶菌が観察された。一方、*A. oryzae* の菌体に対し、外部から作用させることで細胞壁の溶解に効果があることが示唆されている *Bacillus circulans* の分泌性 β -1,3-グルカナナーゼをコードする *bglH* 遺伝子^{1,2)} についてもその成熟タンパ

ク質をコードする部分を *amyB* 遺伝子の分泌シグナルをコードする部分に in frame でつないだ *amyB-bglH* キメラ遺伝子を *amyB* プロモーター下で高発現できる株を作製したところ *amyB* プロモーターの発現を誘導できる条件下ではやはり非常に低頻度ではあるが菌糸の溶菌が観察された。

キチナーゼ遺伝子とグルカナーゼ遺伝子をともに高発現できる株の作製

キチナーゼ遺伝子、グルカナーゼ遺伝子、それぞれ単独では菌体の溶菌に対して効果が小さいことが明らかになったため、次にキチナーゼ遺伝子とグルカナーゼ遺伝子を同時に *amyB* プロモーター下で高発現できる株を2種のキチナーゼ遺伝子と4種のグルカナーゼ遺伝子の全ての組み合わせで作製した。その結果、*AochiB* と各種グルカナーゼ遺伝子を導入し高発現させた株では、グルカナーゼ遺伝子のみを高発現させた場合と比較して差が見られなかったのに対し、*AochiA* と *gluA*、*AochiA* と *gluB*、*AochiA* と *amyB-bglH* 遺伝子を同時に導入した株では、炭素源をマルトースとしたプレート上で頻繁に菌糸の溶菌が見られた。さらに *AochiA* と *gluB* を *amyB* プロモーターにつないだ株について、これら遺伝子の発現を抑える液体培養条件で2~3日間培養した後、発現を誘導する液体培養条件にシフトして経時的に菌体重量を測定したところ、*AochiA* と *gluB* の発現を誘導した株は同様の条件で培養した野生株に対して菌体重量が3-4割程度少ないことが明らかになった。さらにこれら培養菌体を顕微鏡で観察したところ、内容物が漏出したような菌糸が見られた。これらことから、*AochiA* と *gluB* の同時高発現によりプレート上でも、液体培養においても菌糸の溶菌が誘導できることが明らかになった。そこで現在、細胞質タンパク質の挙動について検討を行っている。

以上の結果から、ある種のキチナーゼとグルカナーゼを同時に高生産させることにより *A. oryzae* の菌糸を溶菌させることが可能であることが明らかになった。*Aspergillus* 属糸状菌の菌糸には隔壁が存在するが、隔壁の中央に穴があるため細胞質はつながっている。しかし菌糸細胞壁に何かの原因で損傷が生じ細胞質のタンパク質が細胞外へ漏出するような状況になった場合、Woronin body と呼ばれるオルガネラが隔壁の穴を塞ぐことにより、損傷の影響が隔壁を越えて広がらないようにしている。*A. oryzae* においては近年 Woronin body を構成するタンパク質をコードする遺伝子 *Aohex1* が単離されその機能解析が行われている³⁾。先に述べたキチナーゼ遺伝子、グルカナーゼ遺伝子を同時に高発現できる株において *Aohex1* を破壊すれば、細胞質のタンパク質等を細胞外へより効率的に漏出させることが期待できることから、今後は、最近開発された4種の栄養要求性を持つ *A. oryzae* の株⁴⁾を親株としてこれらを組み合わせた株を作製しその効果を検討してゆきたい。

本研究は生研センター基礎研究推進事業「タンパク質工場としての糸状菌の高度利用に関する基盤的研究」の一環として行われた。

1) Horikoshi, K. and Iida S. Nature 183: 186-187 (1959)

2) Yamamoto, M., Ezure, T., Watanabe, T., Tanaka, H. and Aono, R. FEBS Lett. **433**: 41-43 (1998)

3) Maruyama, J., Juvvadi, P. R., Ishi, K. and Kitamoto, K. Biochem. Biophys. Res. Commun. **331**: 1081-1088 (2005)

4) Jin, F. J., Maruyama, J., Juvvadi, P. R., Arioka, M. and Kitamoto, K. FEMS Microbiol. Lett. **239**: 79-85 (2004)

Strategy to promote the leakage of intracellular proteins into culture supernatants by altering the cell wall structure of *Aspergillus oryzae*

Hiroyuki Horiuchi (Department of Biotechnology, The University of Tokyo)

S-4

麴菌の液体培養で固体培養と同様の遺伝子発現を実現するための戦略

坂本和俊（酒類総合研究所）

麴菌 (*Aspergillus oryzae*) はその米麴などの固体培養における高いタンパク質生産・分泌能力から、醸造産業、酵素生産などの分野で古くから広く利用されている。この特徴は、麴菌が固体培養という環境に応答し、分泌に関与するタンパク質や酵素などの遺伝子発現を制御しているためと考えられるが、その分子生物学的背景は、いまだ詳細には解明されていない。

固体培養特異的な遺伝子発現制御は *glab* 遺伝子の研究に始まり、これまでに *melB*、*pepA*、AOS 遺伝子群など非常に多数の固体培養特異的な遺伝子が存在することが明らかとなってきた。このことから、麴菌の固体培養上での様々な形質は、固体培養特異的な遺伝子発現制御に依存していると予想される。逆に、固体培養での遺伝子発現を液体培養中で実現することができれば固体培養上での形質を液体培養でも再現させられることが期待される。

○固体培養後期の遺伝子発現を制御する転写制御因子 ATFB

固体培養において液体培養と同等の遺伝子発現を実現させるためには、固体培養を感知するレセプターから転写制御因子の間のシグナル伝達系を改変することで実現可能と考えられる。転写制御因子を改変することで遺伝子発現を直接的に変化させられる可能性が高いが、転写制御因子を単純に高発現しただけでは、それに制御される遺伝子が活性化することは少ないようである。ところが、分生子形成のマスターレギュレーターである *brlA* 遺伝子は高発現させるだけで下流遺伝子の転写が活性化し、分生子形成という複雑な発生過程を完了させることができる。この *brlA* の特徴として、転写制御因子の遺伝子自身が転写レベルで制御されていることが挙げられることから、我々は固体培養時に遺伝子発現が変動する転写制御因子を見つけ、これを高発現させることとした。まず麴菌 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、次にそれらの遺伝子発現パターンを調べた。その結果、固体培養条件で発現が変動する bZIP タイプ転写制御因子遺伝子を見だし、これを *atfB* と名付けて遺伝子高発現株を作成した。

マイクロアレイを利用してこの *atfB* 高発現株を解析した結果、固体培養特異的な発現を示すカタラーゼ遺伝子 *catA* を含む 30 遺伝子の発現を上昇させることに成功した。これら発現が上昇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た。つまり、これらは固体培養特異的な発現を示す遺伝子であり、我々はこの固体培養特異的な遺伝子発現を液体培養中で再現することに成功した。

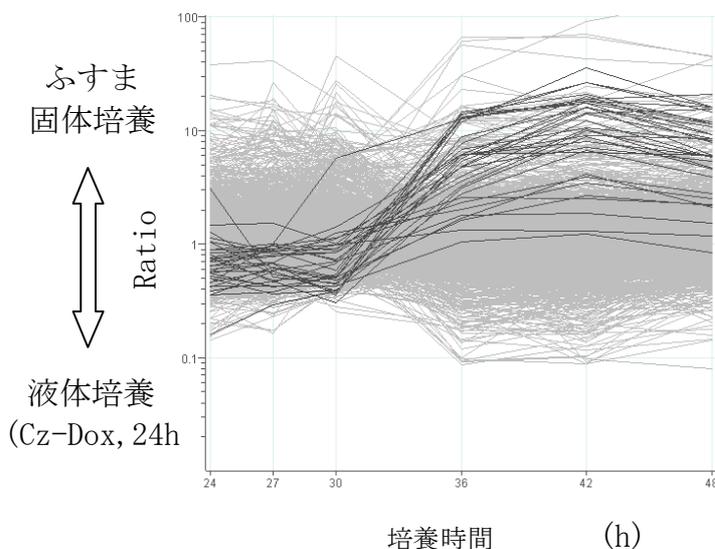


Fig1 ATFB に制御される遺伝子群のふすま固体培養中での発現パターン。ATFB は培養後期において同調して発現上昇する遺伝子群を制御している。

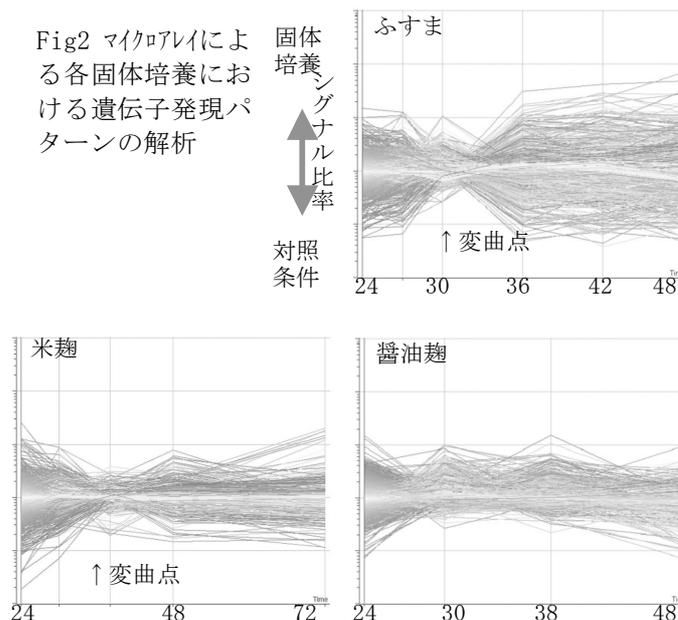
○マイクロアレイによる固体培養での遺伝子発現パターンの解析

米麴、醤油麴、ふすま培養は産業的に重要な固体培養の方法であることから、これらの培養過程における遺伝子発現の経時変化をマイクロアレイにて観察した。その結果、米麴及びふすま培養では、培養中期から後期への移行過程で遺伝子発現パターンの変曲点があり、麴菌細胞内でダイナミックな変化が起きていることが示唆された。ふすま培養においては、この変曲点が気中菌糸形成期に該当することから、この遺伝子発現の変動は気中菌糸から分生子形成という形態変化を表していると考えられる。

今回の我々の解析により、変曲点後の遺伝子発現の一部は *atfB* を高発現させることで液体培養において再現できることがわかった。他の発現パターンを示

す固体培養特異的遺伝子発現も、今後の解析により液体培養で再現することが可能となり、様々な固体培養特異的形質を液体培養で実現できるに違いない。

Fig2 マイクロアレイによる各固体培養における遺伝子発現パターンの解析



○謝辞

本研究は生研センター基礎研究推進事業「タンパク質工場としての糸状菌の高度利用に関する基盤的研究」の一環として行われた。

How to express the solid-state specific genes of *Aspergillus oryzae* in liquid culture

Kazutoshi Sakamoto

National Research Institute of Brewing

プロテオームから見た麹菌 (*Aspergillus oryzae*) のタンパク質生産機構

岩下和裕・織田 健 (独立行政法人 酒類総合研究所)

【はじめに】

麹菌は、清酒や焼酎、味噌や醤油など我が国の伝統的醸造産業において「麹」として使用される。麹菌の最大の特徴は、その驚異的なタンパク質生産性であり、多くのタンパク質は、特に「固体培養」いわゆる「麹造り」を行ったときに多量に生産される。

真核生物のタンパク質生産については、酵母やヒトの細胞を用いて、転写制御から mRNA のスプライシングと核外への輸送、リボソームでの翻訳制御や小胞体でのフォールディングと糖鎖修飾、小胞輸送の制御やソーティング、細胞外への分泌に至るまで、分子レベルで詳細に検討されている。麹菌でもほぼ同様のメカニズムによりタンパク質生産がコントロールされているものと考えられ、実際に多くの実験データがそれを強く示唆している。しかし、醸造産業上重要で最も重要な「固体培養」でのタンパク質生産機構については、十分に研究されているとは言いがたい。そこで、我々の研究グループでは、固体培養に着目し、麹菌酵素生産メカニズムの全体像を明らかにすることを目的に研究を行ってきた。

【麹菌生産タンパク質の Proteome 解析】

これまでの個々の酵素学的な研究から、固体培養では液体培養に比べ多種類の酵素の生産量が上昇する事が明らかとなってきている。しかし、固体培養と液体培養との酵素生産の差異について、鳥瞰的な立場からの研究はなく、総合的な議論をすることが難しかった。そこで、麹菌が生産する全タンパク質について、プロテオミクス的手法により解析を行い、全体像を把握した上で、個々の特徴あるタンパク質の生産メカニズムについて解析することとした。

図1 固体培養と液体培養でのタンパク質生産量の比較

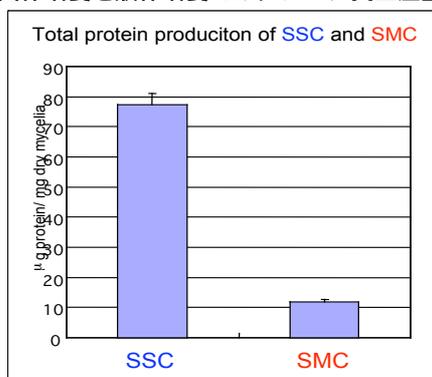
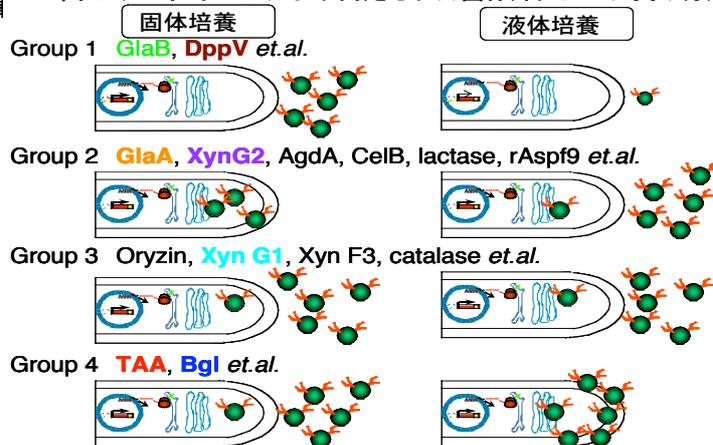


図2 プロテオームにより同定された菌体外タンパク質の分類

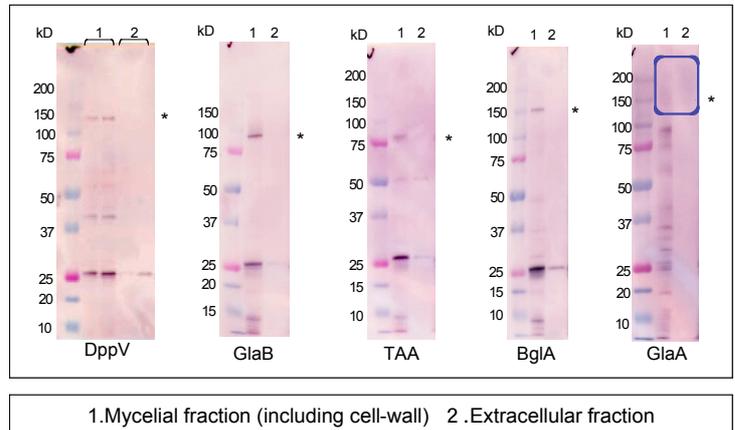


網羅的なプロテオーム解析の結果、液体培養に比較して、固体培養では麹菌の総タンパク質生産量は5倍以上に上昇し(図1)、生産されるタンパク質の種類も異なっていることが明らかとなった。また、生産されたタンパク質は、「固体培養でより多く生産されるもの」(グループ1: GlaB, DppV など)、「液体培養でより多く生産されるもの」(グループ2: GlaA, XynG2 など)、「両培養条件で生産されるもの」(グループ3: XylG1 など)、「固体培養では培地中に生産され、液体培養では細胞壁に多く局在するもの」(グループ4: Bgl1, TAA など)に分類された(図2)。各グループを代表するタンパク質(マーカータンパク質)の転写解析結果から、固体培養では転写制御に加え、転写後の制御も重要である事が示唆された。

【GFP 融合マーカートンパク質による動態解析】

各グループのマーカートンパク質の動態につて、さらに詳細な解析を進めるため、液体培養でも、固体培養と同様の高発現が可能な *amyB* プロモーターを使用して各種マーカートンパク質の動態について解析を行った。その結果、グループ1のタンパク質は、液体培養中で高発現させても、培地中に生産されず（培養40時間）、細胞フラクション（細胞壁を含む）に検出されるものが存在した（図3）。また、GlaB::EGFP や DppV::EGFP のように細胞内にパッチ状に局在するものや、Bgl1::EGFP や TAA::EGFP のように細胞壁及び液胞に局在するものなど、マーカートンパク質の違いにより局在パターンが異なっていた。このことから、転写後制御においてタンパク質生産の上でのボトルネックが複数存在することが示唆された。また、麹菌では、細胞壁がタンパク質生産の上で障壁になりうる事が示された。なお、液体培養で多く生産されるタンパク質については、細胞内の蛍光強度が大幅に減少したことから、細胞内に停留することなく菌体外に分泌されているものと思われた。

図2 液体培養でのマーカートンパク質の局在性解析



【まとめ】

これまでの解析の結果から、固体培養と液体培養では生産されるタンパク質の量及び種類が大きく異なることが明瞭に示された。また、固体培養でのタンパク質高生産には、転写制御だけでなく、転写後制御、翻訳後の制御が重要であることが明らかとなった。これに加え、真菌類で最大のオルガネラである細胞壁の通過が重要であることが示された。また、固体培養で特異的に転写制御されているタンパク質でも、液体培養で強制発現させた場合必ずしも分泌生産されなかった事から、固体培養では何らかの特異的なタンパク質生産機構があることが示唆された。

これまでのプロテオーム解析の結果から、固体培養では生産タンパク質として細胞内のタンパク質と思われるものが主要なスポットとして検出されるなど、液体培養でのタンパク質生産や、酵母等他の真菌類では報告されていない現象も見られている。我々は、これらの現象について、マイクロアレイ解析も含めた分子生物学的な解析により解明することを目的に、現在研究を進めている。また、得られた知見を基に、麹菌株あるいはタンパク質生産方法の改良を試みている。

*本研究は、生研センター基礎研究推進事業「タンパク質工場としての糸状菌の高度利用に関する基盤的研究」の一環として行われました。

The proteome analysis is the trigger to unveil the protein production mechanism of *Aspergillus oryzae*

Kazuhiro Iwashita, Ken Oda (National Research Institute of Brewing)

S-6

コドン最適化による麹菌の異種タンパク質生産効率の向上

五味勝也（東北大学大学院農学研究科）

麹菌をはじめとする *Aspergillus* 属カビは、古くから醸造産業や酵素剤生産に多用されており、高い安全性とタンパク質高分泌能を有する特徴が着目され、有用な異種タンパク質の分泌生産用の有望な宿主として期待されている。すでにアルカリ・リパーゼやキモシンなどの組換え体酵素が工業的に生産され、さらに多種類の異種タンパク質について生産性の向上が試みられている。これまでは、強力な発現用プロモーターを利用して多コピー導入することによって、目的の遺伝子の転写量を増強することで生産量を向上させようとする努力が中心であったが、転写以降の過程における転写産物の安定化や翻訳の効率化などについてはほとんど検討されてきていなかった。一方、一般的な組換えタンパク質発現系において、発現遺伝子の使用コドンを宿主のコドン使用頻度 (codon usage) に最適化することは翻訳過程を効率化し、生産量改善に有効であることが知られている。しかし、カビにおけるコドンの最適化効果に関する研究は少なく、特にタンパク質生産の宿主として利用されている *Aspergillus* 属においては、野生型遺伝子との発現量の比較などの詳細な解析を行った報告はない。そこで、演者らは *A. oryzae* を宿主とした異種タンパク質発現におけるコドン最適化の効果について調べるため、ダニアレルゲンタンパク質である Der f7 の麹菌による発現系をモデルとして発現ならびに分泌生産量を比較検討した。

コドン最適化遺伝子のデザインは、コドン使用頻度に関するデータベース (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) を参考にして行った。はじめに Der f7 自身のシグナル配列により直接分泌させるコンストラクトについて分泌量を比較検討した。1 コピーの遺伝子が同じ染色体部位に導入された株を 2 株ずつ選び、液体培地で培養後、培養上清を SDS-PAGE に供して、ウェスタン解析によって生産量を調べたところ、野生型コドンをもつ株(ND)ではまったくシグナルを検出できなかったのに対して、コドンを最適化した株(OD)では Der f7 に相当するバンドが明瞭に検出された。さらに、麹菌において効率的な分泌生産に効果があることが知られているグルコアミラーゼとの融合タンパク質として発現させるコンストラクトについても検討した結果、コドンを最適化した融合型の株(GKOD)において Der f7 に相当するバンドが非常に強く検出されたが、コドンを最適化していない株(GKND)では成熟型の Derf 7 の分泌量は少なかった。このときのウェスタン解析の結果から、Der f7 の分泌量はコドン最適化により約 2~5 倍改善されたことが分かった。このように、コドンの最適化は、Der f7 を直接発現させる場合だけでなく、融合タンパク質として発現させる場合にも、分泌量の改善に対して有意な効果を示すことが明らかとなった。

次にこれらの形質転換体について Der f7 mRNA 量の比較を行ったところ、コドン最適化により転写産物量が増加していることが分かった。コドンを最適化することで転写産物量に大きな差異が生じることは予想外であったが、コドン最適化が転写産物量の増加を引き起こすという例は他にも報告されており、コドンが翻訳の単位であるにもかかわらず、なぜ宿主への最適化が転写産物の増加を引き起こすかは不明である。そこで我々は直接発現型のコンストラクトを用いて、野生型と最適化型における、発現誘導時の Der f7 mRNA の蓄積速度を比較した。その結果、誘導初期から蓄積速度に差が生じており、mRNA の合成速度に差がある可能性が示唆された。一方、mRNA 分解には翻訳と共役した経路が存在することが知られており、特に終止コドンのない mRNA やナンセンス変異をもつ mRNA は、異常な mRNA として、翻訳と共役した経路の一つで分解されることが知られている。そこで、Der f7 に含まれるレアコドンによる翻訳効率の低下がこのような経路による mRNA の分解を引き起こしている可能性を検証するため、キャリアのグルコアミラーゼは翻訳されるが、Der f7 の翻訳が行われないように、野生型融合タンパク質の GKND の途中に終止コド

ンを導入したコンストラクト(GKND*)を作製し、Der f7 部分の翻訳がもたらす発現への影響を調べた。その結果、GKND 株と比較して GKND*株では Der f7 融合遺伝子の転写産物量の有意な増加が観察され、野生型 Der f7 の翻訳過程が転写産物量の低下に関与している可能性が示唆された。しかし、増加量はコドン最適化型の GKOD 株の Der f7 mRNA レベルの半分ほどであることから、コドン最適化による mRNA 量の増加は前述の転写速度に及ぼす影響なども含んだ複合的な効果の結果であると考えられた。

コドン最適化は麹菌の異種遺伝子発現系でも非常に有効であり、実際に生産量改善のための戦略の一つとして利用されつつある。しかし、コドンの最適化では遺伝子の全合成が必要なため、特に大きなタンパク質を生産させようとした場合の手間とコストを考えると、汎用性がある手法として利用しにくいことは否めない。理想的には遺伝子の全合成を介さない方法が望ましいが、コドン最適化効果の機構の解明を進めることにより、野生型コドンでも最適化コドンと同じ効率で異種タンパク質を発現できる宿主を造成するための手掛かりが得られるものと期待される。

S-7

Aspergillus 属糸状菌のタンパク質大量生産システム：高転写・高翻訳系の開発

幸田 明生（大関総研）

麹菌 (*Aspergillus* 属) は、わが国において千年を超える長い年月にわたって酒類や醸造食品の製造に使用されており、麹菌菌体とその生産物の安全性がきわめて高いこと、さらに菌体外に多量の酵素タンパク質を分泌生産する能力を有していることから、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。我々は、*Aspergillus* 属において目的のタンパク質を効率よく生産させるために発現ベクターの開発を行ってきた。本講演では、まず転写量を高めるためのシス・エレメント(Region III)を利用した高発現プロモーターの開発について、次に、遺伝子の発現を転写後レベルで高める試みとして、5'-非翻訳領域(5'UTR)の改変による高効率翻訳系の開発について紹介したい。

1. シス・エレメント Region III を利用した転写活性化

強力な転写活性を持つプロモーターを構築するにあたり、アミラーゼ系遺伝子の発現制御機構を解析する過程で発見した、シス・エレメント (Region III) を多重導入することによる転写活性化を試みた。

アミラーゼ系遺伝子の発現は、マルトース、デンプンなどによる誘導を正に制御する転写因子 AmyRp とコンセンサス配列(CGG-N8-CGG など)の結合、^{1,2)} 及び多くの真核微生物に存在する広域転写因子である HAP 複合体と CCAAT 配列の結合³⁾ により転写レベルで協調して活性化される。麹菌の α -グルコシダーゼ遺伝子のプロモーターには、この2つのシス・エレメントが Region III と呼ばれる領域に連続して存在する。そこで、麹菌(*A. oryzae*)宿主において様々なプロモーターに Region III の12回繰返し配列を導入したところ、*A. oryzae* 由来のグルコアミラーゼ遺伝子プロモーターで約4倍(P-glaA142)、*A. niger* 由来の No8 プロモーターで約6倍(P-No8142)のプロモーター活性の増加が観察された。⁴⁾ さらに最近、麹菌の解糖系遺伝子の中でも特に高発現しているエノラーゼ遺伝子プロモーターへの Region III 導入を試みたところ30倍以上のプロモーター活性(P-enoA142)の増加を示した。⁵⁾以上より、Region III の導入はプロモーターの転写活性化能を改良するための非常に効果的な手段であると考えられる。また、Region III の導入によるプロモーター活性の改良は、*A. niger* や *A. usamii* を宿主とした場合にも確認されており、*Aspergillus* 属宿主において広く機能することが予想される。

2. 5'UTR の改変による翻訳の効率化

さて、目的のタンパク質をより高いレベルで発現させるためには、上で述べた転写の活性化に加えて、転写後の過程におけるタンパク質発現の効率を改良することも重要と考えられる。そのような観点から、我々は次に、転写産物(mRNA)をより有効に利用するために翻訳の効率化を試みた。

真核生物における一般的な翻訳開始機構としては、リボソームによる mRNA 5'末端からのスキヤニングモデルが提唱されている。そこでは、mRNA 5'末端から開始コドンまでの5'UTR が重要な役割を担っており、その領域の構造や配列が翻訳効率に大きく影響すると考えられている。

一方、麹菌をはじめとするカビの翻訳機構についてはほとんど研究されておらず、5'UTR と翻訳効率との関係を定量的に解析した報告はなかった。そこで我々は、翻訳における5'UTR の影響を検討するために、同一プロモーターに異なる5'UTR を連結しレポーター遺伝子産物の活性により評価した⁶⁾。その結果、コントロールベクターと比較し4~8倍の活性増加が確認された。ノザン解析より mRNA 量は同等であることから、得られた酵素タンパクの活性上昇は翻訳レベルで生じていることが示唆された。また、最も高い翻訳効率を示した発現コンストラクトの多コピー導入株においては、蓄積したレポーター遺伝子産物 (GUS タンパク質) が菌体内全可溶性タンパク質の50%以上を占めるほどであった。これらの結果から、5'UTR の改変により翻訳(開始)効率を高めることが目的タンパク質を高生産させる上で非常に重要であることが確認された。

以上、転写・翻訳の両プロセスにおいて発現効率を高めるためのアプローチを紹介した。これらの技術を

利用して、これまでにさまざまな有用タンパク質の高生産が達成されている。しかしながら、目的とするタンパク質（遺伝子）によっては高発現化が難しいケースもあり、予想される要因もさまざまである。今後、それらの例を詳細に解析することにより、より汎用性の高い効率的な発現システムの構築が期待される。

参考文献

- 1) Petersen, K. L. *et al.*: *Mol. Gen. Genet.*, **262**, 668 (1999).
- 2) Gomi, K. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 816 (2000).
- 3) Kato, M.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 663 (2005).
- 4) 峰時俊貴: *化学と生物*, **38**, 831 (2000).
- 5) Tsuboi, H. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 206 (2005).
- 6) Koda, A. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 291 (2004).

High expression system for foreign proteins in *Aspergillus* species: Efficient transcription and translation

Akio Koda (General Research Laboratory, Ozeki Co., Ltd.)

麹菌の多彩な物質生産のための新規宿主ベクター系の開発

石田 博樹 (月桂冠 総研)

はじめに

麹菌(*Aspergillus oryzae*)は、清酒、醤油、味噌、味醂などのわが国の伝統的な醸造産業に使用されてきた。これらの醸造産業では、米・大豆・麦などの表面に麹菌を生育させる固体培養により、非常に大量のアミラーゼやプロテアーゼを分泌させ、発酵に必要な穀物の分解に利用してきた。また近年の殺菌技術の発展により、麹菌は液体培養でも大量の酵素を分泌することが解明され、産業上有用な酵素が麹菌の液体培養でも供給されている。このように、固体培養も液体培養も可能な麹菌は、その酵素生産量と分泌力から、微生物の中でも物質生産宿主として非常に有用であるばかりでなく、長年の食経験に裏づけされた安全性から、GRAS(Generally Recognized As Safe)にも認定されている。よって、麹菌の EST とゲノム配列から得られる有用酵素遺伝子を、麹菌を宿主として発現させることにより、安全なタンパク質を産業的に供給できる。そこで、麹菌の効率的な物質生産を可能とするために、固体培養と液体培養で発現する新規なプロモーター、及び新規な宿主ベクター系などの麹菌物質生産ツールを開発したことを報告する。

固体培養、液体培養で発現するプロモーター

麹菌は固体培養と液体培養が可能な微生物であり、麹菌で効率的な物質生産を行うためには、それぞれの培養条件で効率的に発現するプロモーターを取得するのが得策である。麹菌の固体培養と液体培養の両培養条件で発現するプロモーターとしては、既に *amyB*, *glaA* などのプロモーターが報告されている。しかし、我々は麹菌の固体培養と液体培養で発現するプロモーターとして、それぞれの培養特異的に発現する遺伝子のプロモーターを選択し、その物質生産性について評価した。

麹菌の固体培養で特異的に発現する遺伝子として、グルコアミラーゼ遺伝子 *glaB* をクローニングした。本プロモーターは、レポーターアッセイから固体培養で特異的に発現することが示された。また *glaB* プロモーターをさらに高発現するプロモーターへ改良するために、プロモーター解析から同定された固体培養での発現に不可欠な領域を、タンデムに 8 コピー挿入した改変プロモーターを構築した結果、改変後のプロモーター活性は固体培養で約 5 倍に上昇した。

麹菌の液体培養で特異的に発現する遺伝子のプロモーターを探索した。まず初めに清酒麹の褐変現象解析のため、麹菌の褐変性に関与する *melO* 遺伝子の発現条件を検討した結果、偶然にも液体培養特異的に発現する遺伝子であることが明らかとなり、そのプロモーターは液体培養での物質生産に利用できることが明らかとなった。また麹菌の EST データの発現頻度情報から液体培養で特異的に発現する遺伝子を抽出し、そのプロモーター解析を行った結果、液体培養で特異的に高発現する *sodM* プロモーターをクローニングすることに成功した。

麹菌の新規な宿主ベクター系の開発

麹菌の宿主ベクター系の中では、*niaD* が一般的に汎用されている。*niaD* は準優性マーカーとして利用可能であることから、例えば固体培養での遺伝子組み換え生産に適するような、孢子形成能が高い株についても宿主ベクターとして利用できる。しかし、選択マーカーが *niaD* の場合、宿主に導入される遺伝子のコピー数が一般に 1 コピーであり、物質生産に有利でない。そこで、孢子形成能が高い麹菌で新規な宿主ベクター系の構築を試みた。清酒麹菌 1013 株に紫外線照射し、ロイシン要求性を示す栄養要求性変異株を得た。当該変

異を相補する遺伝子を麹菌ゲノム DNA からショットガンクローニングした結果、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* であることが判明した。上記変異株に対して *leuA* を用いて形質転換した結果、1-3 コピーのプラスミドが導入されることを確認し、新規な麹菌宿主ベクター系の構築に成功した。

本宿主ベクター系を用いて、液体培養では *sodM* プロモーター、固体培養では *glaB* プロモーターを利用した物質生産について検討した。液体培養では培養 3 日間で最大 1500mg/L-broth のグルコアミラーゼの生産が確認され、固体培養では菌体内酵素であるレクチンが菌対外に分泌されることが示された。

よって、麹菌の液体培養と固体培養の双方で、麹菌の遺伝子組み換えによる物質生産を可能とするツール開発に成功した。

謝辞

本研究を行うにあたり、麹菌の宿主ベクター系の開発についてご指導いただきました、独立行政法人食品総合研究所応用微生物部糸状菌研究室 室長 柏木 豊博士に厚く御礼申し上げます。

Development of a novel host-vector system for protein overproduction in *Aspergillus oryzae*.

Hiroki Ishida

Research Institute, Gekkeikan Sake Co. Ltd.

High level production of biopharmaceuticals in the fungus *Aspergillus oryzae*.

Carsten M. Hjort, Fungal Gene Technology, Novozymes A/S

The *Aspergillus oryzae* expression system has been developed by Novozymes and used for recombinant protein production since 1988. Later on also *Aspergillus niger* and *Fusarium venenatum* expression systems have been developed.

The rationale for entering development of the *Aspergillus oryzae* expression system was that we needed an efficient expression system that could secrete large amounts of protein at a high product purity for production of industrial enzymes.

The choice of *Aspergillus oryzae* as the preferred expression system was made from several different criteria. First of all *Aspergillus oryzae* is a well characterized organism that has been used in the food and fermentation industry in Japan for several hundred years. This means that the products of the fungus have been recognized as “Generally Rearded As Safe” (GRAS). The system was also used by producers of industrial enzymes using submerged fermentation for production for decades as *Aspergillus oryzae* has been used for production of amylases and proteases since the dawn of modern enzyme manufacturing. Another important advantage of *Aspergillus oryzae* was that it could be genetically manipulated using methods based on the recombinant DNA technology present at the time the project was initiated. In the mid eighties it was not trivial to develop methods for transformation and genetic manipulation of a new microorganism. Finally there were no patents blocking the use of *Aspergillus oryzae* at the time.

The early recombinant strains were essentially wild type strains transformed with plasmids based on a promoter and a selection marker that was cloned directly from different *Aspergillus* strains. Several shortcomings of these strains were quickly realized and work to improve the system was undertaken.

The host strain produced a lot of unwanted proteins such as amylases, amyloglycosidases and proteases. Proteases are particularly troublesome as they can degrade the enzyme product during production or severely interfere with the stability of the final product. The production of these proteins could be abolished by either gene disruption of the corresponding specific gene or by manipulation of wide domain transcription factors. In *Aspergillus niger* extracellular expression of proteases can be abolished almost completely by deletion of one single transcription activator without any identified pleiotrophic effects.

In addition to unwanted proteins, the *Aspergillus* expression systems also produce a number of unwanted metabolites. These are both primary metabolites such as acids and secondary metabolite. The production of such metabolites can be abolished by either random mutation followed by screening for the desired mutants or by a rational metabolic engineering approach. *Aspergillus niger* produce substantial amounts of oxalic acid. This is a problem both because oxalic acid is toxic, oxalic acid precipitates with calcium which coarse recovery process problems and product quality problems and finally the formation of oxalic acid is simply a waste of carbohydrate fed to the fermentation. We have identified a gene responsible for the formation of oxalic acid and disrupted that gene in *Aspergillus niger*. Metabolic flux analysis of the resulting strain proves that the oxalic acid production has been abolished while the flux through the glycolysis and the TCA cycle remains almost unaltered.

In addition to improving the host strain, the expression vectors have also been improved. In particular the promoter has been the subject of optimization.

The promoter used in the first recombinant *Aspergillus oryzae* production strains was the TAKA promoter, the promoter driving the expression of the abundant TAKA amylase. We have characterized this promoter and found a specific transcription factor called *amyR* and binding sites

for that transcription factor in the TAKA promoter. The detailed understanding of the promoter has enabled us to design new synthetic promoters that are substantially improved compared to the wild type TAKA promoter.

The improvements of the *Aspergillus oryzae* expression system have resulted in a versatile, clean and high yielding expression system for enzyme production. With these improvements the system is suitable for other uses than just expression of enzymes, including production of biopharmaceuticals. So recently we have initiated a number of projects aiming at developing biopharmaceutical products using *Aspergillus oryzae* as expression host.

Expression of monoclonal antibodies in *Aspergillus* has been suggested by other groups. We have now developed a heterokaryon system for monoclonal antibody expression where the heavy chain and the light chain are transformed into two different parent cells and are co-expressed in the heterokaryon cell. A number of the challenges including yield improvement and post translational modifications of the monoclonal antibody, particularly the N linked glycosylation will be discussed. We have also used the *Aspergillus oryzae* system for expression of a number of antimicrobial peptides as well as other proteins of pharmaceutical interest.

The technical challenges will be discussed and the very significant regulatory challenges will be touched upon. Also the intellectual property landscape is very complex and will briefly be introduced.

Genomic analysis of protein secretion and associated stresses in *Aspergillus*

David B. Archer

School of Biology, University of Nottingham, University Park, Nottingham, NG7 2RD, UK

Email: david.archer@nottingham.ac.uk

This is an auspicious time for *Aspergillus* genomics. Manuscripts that describe the genome sequences and annotation for *A. nidulans* (Galagan *et al.*, 2005), *A. fumigatus* (Nierman *et al.*, 2005) and *A. oryzae* (Machida *et al.*, 2005) have been submitted for publication. The genome of *A. niger* has been sequenced (see Archer & Dyer, 2004) and that sequence (<http://www.dsm.com/dfs/innovation/genomics/>) is being annotated by the company that commissioned the sequencing, DSM, and an invited group of experts. The intention is that a description of the annotated sequence will be published in 2006. In addition, the genome of another strain of *A. niger* is being sequenced by the US Department of Energy (<http://www.microbialgenome.org/announcement/seq2005.shtml>) and the genome of *A. flavus* is also being sequenced and the annotated version will soon be accessible (<http://www.aspergillusflavus.org/Genomics.html>). A useful web-site with links to all the *Aspergillus* genome data is <http://www.aspergillus.man.ac.uk>. Other useful web-sites are referred to in Archer and Dyer (2004). Thus, we will have available to us the genome sequences of a sexual *Aspergillus* sp. that has served as a model for genetic studies, *A. nidulans*, a human pathogen, *A. fumigatus*, two commercially-important spp., *A. niger* and *A. oryzae*, and a close relative of *A. oryzae* that produces aflatoxin, *A. flavus*. These sequences will afford comparative genomic studies (Galagan *et al.*, 2005) and scientists will be able to apply genomic approaches in their studies of *Aspergillus* biology (Archer and Turner, 2005). Already, for example, it has been possible to show that *A. fumigatus* has the potential for sexuality even if it has not yet been demonstrated to occur (Paoletti *et al.*, 2005). Other asexual *Aspergillus* spp. may also have sexual potential and, if realised in practise, this would provide new opportunities for scientific exploration and enable the construction of new strains for exploitation.

The secretion of proteins is a core component of the lifestyles of *Aspergillus* spp and their capacity for efficient secretion has underpinned their commercial exploitation. The genome sequences will provide a resource for the discovery of new enzymes (Machida *et al.*, 2005) and might provide insight into the role of secreted enzymes in the pathogenicity of *A. fumigatus* (Robson *et al.*, 2005).

Genome analysis and the use of transcriptomic techniques is beginning to provide insight into the mechanisms of protein secretion and the cellular stress responses, including the unfolded protein response (UPR), that are induced when *Aspergillus* spp. are used as cell factories for high-level enzyme production (Sims *et al.*, 2005).

The presentation will focus on what has already been learnt from the *Aspergillus* genomes about the molecular basis of protein secretion and associated stresses. Repression under endoplasmic reticulum (ER) stress (RESS) (Pakula *et al.*, 2003; Al-Sheikh *et al.*, 2004) will be discussed in addition to the UPR, as will transcriptomic studies in *A. niger* using Affymetrix GeneChips (Guillemette *et al.*, in preparation). Stress is induced either by chemicals (e.g. DTT or tunicamycin) added exogenously to cell cultures or by the secreted production of heterologous proteins. But, not all heterologous proteins elicit stress to the same extent and it is not known why some proteins are secreted well whereas others are poorly-secreted and induce the UPR. ER stress is initiated due to poorly-folded proteins being detected in the lumen of the ER, indicating that the assisted folding (by chaperones and foldases) of heterologous proteins presents a difficulty to the cell. The secreted production of human lysozymes, which have well-defined folding characteristics (Dumoulin *et al.*, 2003; Kumita *et al.*, 2005) from fungi may provide insights into defining some predictive rules on the efficiency of protein folding in the ER and secretion, and this will be discussed.

Acknowledgements

I thank the Biotechnology and Biological Sciences Research Council and DSM for support.

References

- Al-Sheikh, H. M., Watson, A. J., Lacey, G. A., Punt, P., MacKenzie, D. A., Jeenes, D. J., Pakula, T., Penttilä, M., Alcocer, M. J. C. & Archer, D. B. (2004). Endoplasmic reticulum stress leads to the selective transcriptional down-regulation of the glucoamylase gene in *Aspergillus niger*. *Molecular Microbiology*, **53**, 1731-1742.
- Archer, D. B. & Dyer, P. S. (2004). From genomics to post-genomics in *Aspergillus niger*. *Current Opinion in Microbiology*, **7**, 499-504.
- Archer, D. B. & Turner, G. (2005). Genomics of protein secretion and hyphal growth in *Aspergillus*. In *The Mycota XIII, Fungal Genomics*, ed. A. J. Brown, Berlin: Springer-Verlag, in press.
- Dumoulin, M., Last, A.M., Desmyter, A., Decanniere, K., Canet, D., Larsson, G., Spencer, A., Archer, D.B., Muyltermans, S., Wyns, L., Redfield, C., Matagne, A., Robinson, C.V. & Dobson, C.M. (2003). A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme. *Nature*, **424**, 783-788.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C. *et al.* (2005). Sequencing and comparative analysis of *Aspergillus nidulans*. *Nature*, submitted.
- Kumita, J. R., Johnson, R. J. K., Alcocer, M. J., Dumoulin, M., Holmqvist, F., McCammon, M. G., Robinson, C. V., Archer, D. B., & Dobson, C. M. (2005). Expression and characterization of the amyloidogenic variants F57I and W64R of human lysozyme. *Journal of Biological Chemistry*, submitted.

- Machida, M., Asai, K., Sano, M., *et al.* (2005). Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, submitted.
- Nierman, W., Pain, A., Anderson, M.J., *et al.* (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, submitted.
- Pakula, T. M., Laxell, M., Huuskonen, A., Uusitalo, J., Saloheimo, M. & Penttilä, M. (2003). The effects of drugs inhibiting protein secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*: evidence for down-regulation of genes that encode secreted proteins in the stressed cells. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 45011-45020.
- Paoletti, M., Rydholm, C., Schweier, E. U., Anderson, M.J., Szakacs, G., Lutzoni, F., Debeaupuis, J.-P., Latgé, J.-P., Denning, D.W. & Dyer, P.S. (2005), Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Current Biology* **15**, 1242-1248.
- Robson, G. E., Huang, J., Wortman, J. & Archer, D. B. (2005). A preliminary analysis of the process of protein secretion, and the diversity of putative secreted hydrolases encoded in *Aspergillus fumigatus*: insights from the genome. *Medical Mycology Supplement* 1, **43**, S41-S47.
- Sims, A.H., Gent, M.E., Lanthaler, K., Dunn-Coleman, N.S., Oliver, S.G. & Robson, G.D. (2005). Transcriptome analysis of recombinant protein secretion by *Aspergillus nidulans* and the unfolded protein response *in vivo*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 2737-2747.

S-11

子囊菌および不完全子囊菌の交配と交配型遺伝子

有江 力・金子 功¹・金森正樹²・加藤ハナ³・井山真琴⁴・富樫加奈・寺岡 徹
東京農工大学大学院・¹現 農業環境技術研究所・²現 サントリー先進技術応用研究所・³現
TIS・⁴現 JICA

子囊菌門に属する種には基本的に2種類の交配型 (MAT1-1 あるいは MAT1-2 のいずれか) の菌株が存在し、異なる交配型菌株が交配することで有性生殖を行い、完全世代を形成する (self-incompatible = heterothallic)。各菌株の交配型は、ゲノム上の交配型遺伝子 (MAT1) 領域に存在する対立遺伝子群 (MAT1-1 遺伝子群あるいは MAT1-2 遺伝子群) のいずれを持つかによって決定される。

MAT1 領域の解析は、当初、*Neurospora crassa*、*Podospora anserina*、*Cochliobolus heterostropus* (トウモロコシごま葉枯病菌) 等で進められた。いずれの種においても MAT1 領域には、MAT1-1、MAT1-2 菌株間で塩基配列の相同性が認められない領域が、両交配型菌株で共通の領域に挟まれて存在することが報告された。この非相同領域をそれぞれ MAT1-1、MAT1-2 イディオモルフ (idiomorph) と呼ぶ。イディオモルフ上には、それぞれ、DNA 結合ドメイン (α -box および HMG-box) を持つ MAT1-1-1 および MAT1-2-1 遺伝子が存在する。それぞれの DNA 結合ドメインのアミノ酸配列は種を超えて保存性が高いのが特徴であり、これを利用して多種で MAT1 領域の解析が進んだ。遺伝子破壊実験等によって、MAT1-1-1 および MAT1-2-1 がコードするタンパク質が、菌株の交配型決定、交配開始の制御に関与することが示されている。*Co. heterostrophus* の MAT 領域にはこの1組の遺伝子のみが、*N. crassa* および *Po. anserina* では、MAT1-1 イディオモルフ上にさらに2つの遺伝子 MAT1-1-2、MAT1-1-3 が存在する。これらの遺伝子産物は稔性等、有性生殖に関与することが示唆されている。

その後、*Mycosphaerella graminicola*、*Didymella rabiei*、*Cryphonectria parasitica*、*Gibberella fujikuroi*、*Paecilomyces tenuipes*、*Pyrenopeziza brassicae* 等の self-incompatible 種、および *Co. homomorphus*、*G. zeae* 等の self-compatible (= homothallic) 種で MAT1 領域の構造が精査されている。詳しくは Debuchy & Turgeon 2005 を参照いただきたい。

子囊菌は多くの交配不全性 (asexual) の種を含む。完全世代形成が未報告かあるいは殆ど見られない、いわゆる不完全子囊菌類である。植物病原菌を含む *Fusarium oxysporum*、*Alternaria alternata*、*Biporalis sacchari* や麴菌 *Aspergillus oryzae* では完全世代が未報告である。当初、これらの種が交配不全である原因が MAT1 領域の欠損や不全、一方の交配型菌株の欠如にあるのではないかと想定されたが、その後 *F. oxysporum*、*A. alternata*、*B. sacchari* においても両交配型の菌株が存在することが DNA レベルで確認され、さらに、それらの MAT1 領域が近縁のヘテロタリック種と相同であるばかりか、座乗する MAT1-1-1 および MAT1-2-1 遺伝子が発現し、機能性をも保持していることが示された。このため、交配不全の原因は、交配遺伝子の下流で機能する、交配関連シグナル伝達系にあると想定されている。

イネの最重要病害であるいもち病の病原菌 *Magnaporthe grisea* (anamorph, *Pyricularia grisea*) は、本来ヘテロタリックな交配を行うはずであるが、中国雲南などで採集された一部の株を除き、通常、交配能を示さない。日本産いもち病菌同士のかげ合わせによる完全世代形成の報告はなく、通常、交配不全性であると理解されている。さて、いもち病菌国内分離株を供試し解析を行った結果、我々は、交配型 MAT1-1 および MAT1-2 の株が存在すること、改めて MAT1-1 菌株と MAT1-2 菌株をかけ合わせても完全世代を形成しないこと、日本産株の MAT1 領域の構造はヘテロタリックな雲南株とほぼ同様であること、MAT1 領域上の遺伝子 (MAT1-1-1、MAT1-1-2、MAT1-1-3 および MAT1-2-1、MAT1-2-2) は日本産

株でも発現していること、を明らかにした。構造解析の過程で見出した *MATI-1-3* および *MATI-2-1* は、*MATI-1* および *MATI-2* イディオモルフ上から共通配列にかけて存在する興味深い構造をとっていた。そのため、両遺伝子がコードする産物は、大部分のアミノ酸が共通で、N 末側の僅かなアミノ酸が異なることによって、交配型特異性を持つ。この産物の差が機能的にどのような意味を生じるのか、また、両遺伝子が生じた背景については未知である。さらに、*MATI-1-3* 遺伝子上流に CT 反復配列 (CT)_n が存在すること、この CT の反復数が菌株によって異なる（ヘテロタリック株で大きく、交配不全株で小さい）こと、CT 反復数の多い株で *MATI-1-3* の転写量が多い傾向にあることを見出した。

交配型遺伝子産物は、フェロモンやフェロモンレセプターなどの産生を制御し、レセプターが受容した「他交配型菌株の存在」という情報が三量体 G タンパク質、MAP キナーゼ経路あるいは cAMP 経路を介して核内に伝達され、菌糸融合、核融合、子実体形成などの交配挙動が起こることが想定されている。我々は、ヘテロタリック種である *Gibberella fujikuroi* (anamorph, *Fusarium sacchari*; サトウキビしょう頭腐敗病菌) において G タンパク質βサブユニットおよび MAP キナーゼ遺伝子の破壊株をそれぞれ作出し、どちらの破壊も菌糸成長には影響を及ぼさないこと、雌性不稔となること、病原性が低下することを見出した。今後はこれらを含む情報伝達系の解析を進め、ヘテロタリック種と交配不全種の比較を行うことで交配不全の原因を探りたいと考えている。

参考文献

Debuchy R and Turgeon B. G. (2005) Mating-type structure, evolution and function in Euscomycetes. The Mycota ed. by K. Esser; Vol I "Growth, Differentiation and Sexuality", 2nd edition ed. by U. Kes and R. Fischer., Springer-Verlag, Heidelberg, chapter 15, in press.

Sexual and asexual development in ascomycetes and mating type genes

Tsutomu Arie, Isao Kaneko¹, Masaki Kanamori², Hana Kato³, Makoto Iyama⁴, Kana Togashi and Tohru Teraoka

(Tokyo University of Agriculture and Technology, ¹National Institute for Agro-Environmental Sciences, ²SUNTORY, ³TIS, ⁴JICA)

MATING TYPE GENES-MEDIATED SEXUAL REPRODUCTION IN FILAMENTOUS ASCOMYCETES

Sung-Hwan Yun

Division of Life Sciences, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

Fungi capable of sexual reproduction use heterothallic (self-sterile) or homothallic (self-fertile) mating strategies. In most ascomycetes, a single mating type locus, *MAT*, with two alternate forms (*MAT1-1* and *MAT1-2*) called idiomorphs, controls mating ability. Structural analyses of *MAT* sequences from homothallic and heterothallic *Cochliobolus* and *Gibberella* species support the hypothesis that heterothallism is ancestral. In heterothallic species these alternate idiomorphs reside in different nuclei. In contrast, all of homothallic species examined carry both *MAT1-1* and *MAT1-2* in a single nucleus, usually closely linked. The mechanism of conversion from heterothallism to homothallism is a recombination event between islands of identity in otherwise dissimilar *MAT* sequences. Expression of a fused *MAT* gene from a homothallic *Cochliobolus* species confers self-fertility on a *MAT*-null strain of a heterothallic species, suggesting that *MAT* alone is sufficient to change reproductive life style. Conversely, I asked if a homothallic *Gibberella* species (*G. zeae*) could be made strictly heterothallic by manipulation of *MAT*. Targeted gene replacement was used to differentially delete *MAT1-1* or *MAT1-2* from a wild type haploid *MAT1-1;MAT1-2* strain, resulting in *MAT1-1;mat1-2*, and *mat1-1;MAT1-2* strains that were self-sterile, yet able to cross to wild type testers and more importantly, to each other. These results indicated that differential deletion of *MAT* idiomorphs eliminates selfing ability of *G. zeae*, but the ability to outcross is retained. They also indicated that both *MAT* idiomorphs are required for self fertility.

However, not much is known about the gene regulatory pathway, or genes under the control of mating-type proteins in filamentous ascomycetes. I have focused on the genes specifically controlled by the mating type (*MAT*) locus, a master regulator of this developmental process in *G. zeae*. To do identify them, I employed suppression subtractive hybridization between a *G. zeae* wild-type strain Z03643 and its isogenic self-sterile *mat1-2* strain T43ΔM2-2. Sequence analysis of 1,000 subtractive cDNA clones revealed 327 unigenes of expressed sequence tags. Both reverse northern and cDNA microarray analyses using these unigenes confirmed that 171 (52.3%) unigenes were significantly down-regulated in T43ΔM2-2, suggesting that the expression of these genes might be critical for sexual development in *G. zeae*. Among these, 98 could be either manually or automatically annotated based on known functions of their possible homologs. A high frequency of the genes similar to those involved in signal transduction pathway, transcriptional regulation, protein degradation, and cellular differentiation indicates that many regulatory functions are required during the entire mating processes. Northern blot analysis revealed that all of the genes examined were down-regulated by *MAT1-2*, but needed for different stages during sexual development: specific to perithecial formation, vegetative stage, or no stage specific.

PUTATIVE PHEROMONE RECEPTORS AND SIGNALING OF SEXUAL DEVELOPMENT IN *ASPERGILLUS NIDULANS*

Kap-Hoon Han

Dept. of Pharmaceutical Engineering, Woosuk University, Wanju, 565-701, Korea

A homothallic ascomycete, *Aspergillus nidulans*, which develops both sexual and asexual spores through complicated morphogenic processes, is a model fungus to study spore formation in molecular level. Many genes have been identified that are associated with asexual development and the regulatory network of these genes is well established. *A. nidulans* also produces sexual spores developed in closed fruiting bodies, called cleistothecia. Sexual development is greatly affected by carbon sources and environmental stresses as well as growth conditions. To understand genetic network and regulatory mechanism(s) of the cellular developmental fate decision in response to various environmental factors, several genes, including *nsdD* which encodes a GATA type transcription factor regarded as positive regulator of sexual development, have been identified by forward genetic screening using the development-specific characteristics in response to environmental stresses. In addition, two genes, *gprA* and *gprB*, that are predicted to encode putative G protein-coupled receptors (GPCRs) similar to fungal pheromone receptors, have been characterized to reveal whether the putative pheromone receptors affect fruiting body formation of this homothallic fungus. Deletion of *gprA* or *gprB* resulted in the production of a few small cleistothecia carrying a reduced number of ascospores, whereas $\Delta gprA;\Delta gprB$ eliminated cleistothecia formation in homothallic conditions. However, $\Delta gprA$ and/or $\Delta gprB$ did not affect vegetative growth, asexual sporulation, or even cleistothecia formation in outcross, indicating that GprA and GprB are specifically required for self-fertilization. Over-expression of *nsdD* resulted in the production of barren cleistothecia in the $\Delta gprA;\Delta gprB$ mutant, suggesting that NsdD can partially rescue the developmental defects caused by deletion of GPCRs and that GprA/B-mediated signaling may involved in activation of other genes required for maturation of cleistothecia.

MATING GENES IN THE *ASPERGILLUS ORYZAE* GENOME: CAN IT HAVE A SEXUAL LIFE CYCLE?

Nanase Yamamoto¹, Praveen Rao Juvvadi¹, Jun-ichi Maruyama¹, David B Archer², Katsuhiko Kitamoto¹

¹Department of Biotechnology, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-Ku, Tokyo 113-8657, Japan.

²School of Biology, University of Nottingham, University Park, Nottingham, NG7 2RD, UK

Sexual reproduction in general is regulated by mating-type genes, and filamentous fungi exhibit a diversity of mating-types. In particular, the *Aspergillus* species undergoing both asexual and sexual life cycles with homothallic or heterothallic patterns of breeding not only serve as tools for understanding the basis of sexuality, but also can be role models for the analysis on switching between asexual and sexual pathways. Critical analyses of the genomic information in the three species of Aspergilli (*Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus* and *A. oryzae*) is expected to provide new insights into the cause and consequence of sexuality in filamentous fungi. With the recent report on sexuality in *A. fumigatus*¹, a supposedly “asexual” species, our understanding on the asexual/sexual habits of filamentous fungi seems to require terser analyses to clearly define their sexual/asexual states. While in *A. nidulans*, a homothallic species, sexual state is well known and sex in *A. fumigatus* is beginning to be understood, not much is known on the closely related species, *A. oryzae*, which until now is considered to propagate “asexually”. In this report we provide genomic evidences towards understanding sexuality in *A. oryzae*. In addition to evidences on the existence of sexual pathway genes in *A. oryzae*, the expression analysis on the alpha-pheromone precursor and receptor genes will also be discussed.

Mating-type genes (*MAT*) are generally regarded as the primary regulators of sexual activity, and are present at a single locus with in the genome. In contrast to *A. nidulans*, which consists of both the *MAT-1* and *MAT-2* gene loci, a typical characteristic representing its homothallic nature, the genome sequencing of *A. oryzae* RIB40 strain revealed the existence of only the *MAT-1* gene encoding a protein with the alpha-box motif, prompting a consideration on its sexual identity. In addition to this, the presence of genes encoding the alpha-pheromone and its receptor (designated as *AoppgA* and *AogprA*, respectively), which constitute the basic factors indispensable for eliciting and sexual response, and also the genes encoding the proteases (*Kex1*, *Kex2* and *Ste13*) required for the processing of the alpha-factor strongly implicated the operation of a sexual pathway in this fungus. However, as yet we could not locate the gene encoding the a-factor, even though the a-receptor (*AogprB*) and many genes encoding the proteins (*Rce1*, *Ste24*, *Ram2*, *Ste14*, *Ste16*, and *Ste23*) responsible for the processing and modification of the a-factor could be identified in the *A. oryzae* genome. Moreover, the identification of several other genes directly/indirectly related to sexual response pathway, such as the velvet (*ve*) gene, known to induce sexual response in *A. nidulans*, the transcription factors *nsdD* and *pro1* required for sexual development and maturation respectively, and the general components of the MAP kinase pathway clearly indicated the inherent sexual potential of this filamentous fungus.

Existence of mating-related genes raises a question whether they can function in *A. oryzae* where sexual cycle has not yet been found. We chose the pheromone precursor and receptor genes (*AoppgA*, *AogprA* and *AogprB*) among the other mating-related genes and examined their expression. RT-PCR analyses confirmed that all the three genes were expressed. Further analysis using various culture conditions revealed that the expression of *AoppgA* and *AogprA* genes was upregulated upon carbon source depletion whereas the expression of *AogprB* gene remained unaltered. This result suggested that recognition of alpha-pheromone by its receptor might play an important role during carbon source starvation condition. Hence we isolated and analyzed *AoppgA* and *AogprA* genes to reveal the function of alpha-factor in *A. oryzae*.

AoppgA gene was predicted to encode 103 amino acids with a putative secretory signal sequence and two repeats of the amino acid sequences (~10 aa). Each repeat is followed by *Kex2*-processing site (-Lys-Arg-) as in other fungal alpha-pheromones. In *S. cerevisiae* alpha-pheromone precursor is processed by the proteases such as *Kex2* in the Golgi and excreted out of the cells. For confirmation of processing and secretion of alpha-pheromone in *A. oryzae*, *AoPpgA*-EGFP fusion construct was expressed under the control of *amyB* promoter and its localization was examined by fluorescent microscopy. EGFP fluorescence was detected at the septa and in the vacuoles, which was also observed when a secretory protein was fused with EGFP and expressed. Supporting the microscopic analysis, Western blotting using GFP-antibody suggested the secretion of the processed forms of *AoPpgA* into the growth medium.

Alpha-pheromone receptor gene, *AogprA* is deduced to encode a protein belonging to seven-transmembrane-

spanning G protein-coupled receptor (GPCR) family. In *S. cerevisiae* alpha-pheromone receptor is sensitized by ligand binding and activates the downstream components of the heteromeric G protein and MAPK signaling cascade. For localization analysis, AoGprA was expressed as a fusion with EGFP. Upon fluorescence microscopic analysis EGFP-fluorescence was detected on the plasma membranes and in the vacuoles. This implied that AoGprA might be exposed on the cell surface and after pheromone binding may internalize into the vacuoles for degradation.

To further characterize the function of alpha-pheromone and its receptor, the disruption of the *AoppgA* and *AogprA* genes in *A. oryzae* NSR13 strain (*niaD*⁻, *sC*⁻, *adeA*⁻) was performed using the *adeA* marker. Phenotypic variations of these disruptants will be discussed.

1. Paoletti, M. et al., Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Biol.* 2005,15, 1242-8.

Aspergillus nidulans における三つの mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路

東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

古川健太郎、阿部敬悦

はじめに

MAPK は酵母から哺乳類に至る真核生物に普遍的に保存されたプロテインキナーゼである。MAPK 経路は、成長因子・サイトカイン・UV 照射・浸透圧ストレスなどの様々な外部刺激によって活性化され、転写制御因子が応答遺伝子群の発現調節をすることで適切な細胞応答を引き起こす。真核生物のモデル生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、HOG (High-osmolarity glycerol) 経路 (Hog1)・cell integrity 経路 (Mpk1)・mating 経路 (Fus3)・擬菌糸形成経路 (Kss1) などが知られている(1)。近年の EST 解析やゲノム解析により、糸状菌においてもようやく MAPK 経路の解析が進められるようになってきた。本講演では、アスペルギルス属カビのモデル生物である *A. nidulans* の MAPK 経路についてのこれまでの知見をレビューするとともに、酵母の MAPK 経路との類似点及び相違点について紹介したい。

酵母と糸状菌の MAPK 経路

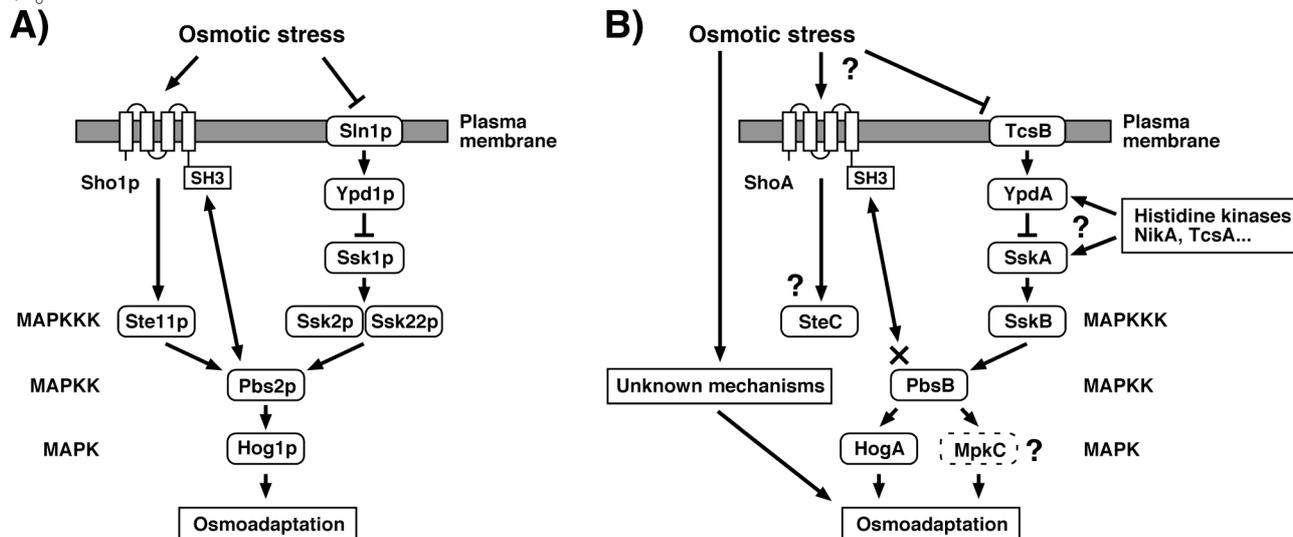
MAPK 経路は、上流のセンサー経路と下流の MAPK カスケードから成る。MAPK カスケードは、MAPK、MAPK をリン酸化して活性化する MAPKK、MAPKK をリン酸化して活性化する MAPKKK より構成されるキナーゼカスケードである。*A. nidulans* は四つの MAPK、HogA (Hog1 オルソログ)、MpkA (Mpk1 オルソログ)、MpkB (Fus3/Kss1 オルソログ)、MpkC (Hog1 オルソログ) を持ち、Hog1 オルソログが重複している点や Fus3/Kss1 タイプの MAPK が一つしか存在しない点で酵母と異なる。酵母は MAPKKK と MAPKK を四つずつ持つが、一つの経路で機能が重複していたり、Ste11 MAPKKK のように複数の経路に関与しているキナーゼも存在する。ところが、*A. nidulans* は MAPKKK と MAPKK を三つずつしか持たないため、MAPK カスケードは酵母よりも単純な構成をしていると予想される。*A. nidulans* の HOG 経路は以下で述べるが、cell integrity 経路と mating 経路については *in silico* 解析(2)や一部の遺伝子の解析が行われている。Cell integrity 経路の MpkA MAPK の欠損では極性成長が失われ、mating 経路の SteC MAPKKK は有性生殖に必須であることが報告されている(3, 4)。

A. nidulans HOG (AnHOG) 経路(5)

真核生物の浸透圧応答の研究は、遺伝学的解析の容易な出芽酵母において最も進展しており、HOG 経路のほぼ全容が解明されている (図 A)。HOG 経路は上流の二つの浸透圧センサー経路 (Sln1、Sho1) と下流の Hog1 MAPK カスケードから構成されている。Sln1 経路 (=二成分性情報伝達経路) は、ヒスチジンキナーゼ Sln1-リン酸基伸介因子 Ypd1-レスポンスレギュレーター Ssk1 が、His-Asp リン酸基リレーを形成しており、高浸透圧刺激で Ssk2/Ssk22 MAPKKKs 経由で下流経路を活性化する。また、Sho1 経路は、高浸透圧刺激で Pbs2 MAPKK が Sho1 の SH3 ドメインと結合し、その結果として Ste11 MAPKKK 経由で下流経路を活性化する。HOG 経路の遮断は高浸透圧感受性を引き起こし、逆に HOG 経路の恒常的な活性化は致死となる。

ゲノム解析により、*A. nidulans* は酵母 HOG 経路相同遺伝子を全て有することが明らかとなった (図 B)。二成分性情報伝達系因子である TcsB、YpdA、SskA は、それぞれ酵母の相同遺伝子の欠損を機能相補したことから、これらは *A. nidulans* 内において Sln1 経路と類似の機構で働いていることが示唆される。しかしながら、*SLN1* と異なり *tcsB* の欠損が表現型を示さなかったことから複数のヒスチジンキナーゼの関与が考えられる。一方、*sskA* や *hogA* 変異体だけでなく、Ssk2/Ssk22、Pbs2 のオルソログをコードする *sskB*、*pbsB* の変異体も高浸透圧条件で生育低下を示し、HogA MAPK のリン酸化も観察されなかった。このように、AnHOG 経路の活性化は二成分性情報伝達系依存的であり、MAPKK の活性化機構は、Sln1 と Sho1 の二つの経路から活性化される酵母のそれと異なることが明らかとなった。PbsB と Pbs2 のアミノ酸配列を比較したところ、Pbs2 に存在する Ssk2/Ssk22 結合ドメインや Sho1 結合ドメイン (=Pro-rich motif) は保存されていないように思われた。PbsB は、*pbs2Δ* の高浸透圧感受性を相補したが、PbsB が酵母内で Ssk2/Ssk22 と Sho1 のどちらから活性化されたのかという疑問が生じた。そこで、片方の経路が欠損した *pbs2Δ (sho1Δ pbs2Δ, ssk2Δ ssk22Δ pbs2Δ)* において *pbsB* を発現させたところ、*sho1Δ pbs2Δ* の方だけを機能相補した。これらの結果から、酵母内における PbsB の活性化は Ssk2/Ssk22 に依存しており、PbsB は Sho1 と結合できないことが示唆された。*A. nidulans* 内において、PbsB は典型的な Pro-rich motif を持たないため ShoA と結合できず、その結果として、HogA の活性化は SskA や SskB 依存的に起こると予想した。そこで、PbsB の N 末端領域に Pbs2 由来の Pro-rich motif (KPLPPLPV) を挿入した変異体 PbsB(Pro) を作製した。PbsB(Pro) は *ssk2Δ ssk22Δ pbs2Δ* の高浸透圧感受性を相補したことから、PbsB(Pro) と Sho1 の遺伝学的相互作用が示された。しかしながら、PbsB(Pro) を HogA を活性化することができない *ssk4Δ* において発現させたところ、

高浸透圧感受性の回復は見られず、HogA の活性化も観察されなかった。これらの結果から、PbsB が Pro-rich motif を持たないことに加えて、ShoA からの高浸透圧応答シグナルが PbsB に伝達できない何らかの欠損が存在するものと予想された。これらのことを前提に、AnHOG 経路と mating 経路の関係についても紹介したい。



参考文献

- 1) Hohmann S. (2002) *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300-372.
- 2) Muthuvijayan V. et al. (2004) *In Silico Biol* **4**: 605-631.
- 3) Bussink H.J. et al. (1999) *FEMS Microbiol Lett* **173**: 117-125.
- 4) Wei et al. (2003) *Mol Microbiol* **47**: 1577-1588.
- 5) Furukawa K. et al. (2005) *Mol Microbiol* **56**: 1246-1261.

Three mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways in *Aspergillus nidulans*.

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

O-1

麴菌のフィルター培養条件下での発現解析

佐野元昭, 小林亜希子、町田雅之*、大箸信一 (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。麴菌の培養は大きく分けて、フラスコなどに培養成分を入れて培養を行う液体培養と、米や麦などの固体上で培養を行う固体培養の2種類が存在する。醸造発酵産業で重要な酵素は、固体培養でしか生産されないものが多く固体培養での解析が非常に重要である。しかしながら、固体培養では培地と菌体を分離することが困難で、培養途中に培地条件を変化させることが難しい。そのため培地成分の変化による、遺伝子発現の解析が不可能であった。そこで今回、固体培養と同様な条件で培養ができ、培地成分が分離可能なフィルター培養法¹⁾で麴菌を生育させ、DNA オリゴマイクロアレイを用いて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> 今回の発現解析には、麴菌のゲノム解析で明らかになったほぼ全ての遺伝子に対応する、11000 の特異的プローブをスポットしたオリゴアレイを使用した²⁾。フィルター培養で麴菌を培養した後、RNA を抽出して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) H. ISHIDA *et al.* J. Ferment. Bioeng., 86: 301-307 (1998)
- 2) 佐野ら : 日本生物工学大会要旨、 P138 (2004)

Gene expression analysis under filter culture condition of *Aspergillus oryzae*

Motoaki Sano, Akiko Kobayashi, Masayuki Machida*, Shinichi Ohashi(KIST, *AIST)

O-2

テロメア付加ベクターによる麴菌形質転換と導入 DNA の解析

楠本憲一、古川育代、木村多江、松下真由美、鈴木聡、柏木豊、(食総研)

【目的】 演者らは麴菌 *Aspergillus oryzae* の染色体末端に位置するテロメアを分離し、その構造が 12bp (TTAGGGTCAACA) を単位とした繰り返し配列であることを解明した¹⁾。酵母等のテロメアは染色体の複製や安定化に関わることが知られるが、麴菌テロメアについてはその複製機構や染色体末端保持機構等の基礎的知見が解明されていない。そこで麴菌テロメアを付加したベクターを作成し、細胞導入後の特性を検討した。

【方法及び結果】 テロメア配列 (135bp) を 1 コピー、あるいは逆向きに 2 コピー有し、マーカー遺伝子 *ptrA* を連結したプラスミドベクターを作製した。ベクター上の *ptrA* は *MfeI* 認識配列を上流側に有し、下流にテロメア配列を連結するよう配置した。これらのベクターを用いて *A. oryzae* NFRI1599 株の形質転換を行った。得られた形質転換体のゲノム DNA を *MfeI* で消化し、サザン解析を行った結果、形質転換株に特有な *ptrA* シグナルが 2-6 本検出され、ベクターは多コピーで導入されていた。これらのシグナルは宿主及び形質転換株に共通なテロメアシグナル (10-12 本、菌株により異なる) の一部と移動度が一致した。形質転換株によっては、宿主株にない新たに生じた *ptrA* シグナルと、同様に新たに生じたテロメアシグナルの移動度が一致する株も見られた (検出範囲約 1 - 15kb)。以上の結果から、導入ベクターは複数のテロメアの近傍に組み込まれ、ベクター由来のテロメアが *ptrA* を連結したまま染色体末端として機能することが示唆された。

- 1) 楠本ら、日本農芸化学会 2003 年度大会講演要旨集 p29 (2003)

Transformation of *Aspergillus oryzae* with the telomere-attached vectors and characterization of the introduced DNA

Ken-Ichi Kusumoto, Ikuyo Furukawa, Tae Kimura, Mayumi Matsushita, Satoshi Suzuki, Yutaka Kashiwagi (Natl. Food Res. Inst.)

O-3

糸状菌・酵母における RNA サイレンシング経路の進化的解析

中屋敷均, 角谷直樹, Nguyen Bao Quoc, 眞山滋志 (神戸大・農学部)

RNA サイレンシングは dsRNA を介した転写後の遺伝子抑制機構であるが、この経路には RNaseIII 様ヌクレアーゼである Dicer、RNA 依存 RNA ポリメラーゼ(RdRP)、RNA induced silencing complex (RISC)の構成要素である Argonaute などの蛋白質が関与することが明らかとなっている。ゲノム配列情報が、公開されている 10 種の子のう菌、4 種の担子菌、1 種の接合菌におけるこれらの蛋白質配列を調査した所、3 種の子のう菌(*Candida albicans*, *C. lusitaniae*, *Saccharomyces cerevisiae*)、1 種の担子菌(*Ustilago maydis*)において、上記の RNA サイレンシング蛋白質のホモログのすべてあるいはそのほとんどが存在しておらず、RNA サイレンシング経路が失われていることが示唆された。一方、対照的に担子菌である *Coprinus cinereus* では、7 種の Argonaute、3 種の Dicer、8 種の RdRP パラログをゲノム内に保有しており、極めて複雑な RNA サイレンシング経路を保有していることが推定された。これらの結果は、糸状菌において RNA サイレンシング経路は、その菌の生態や形態分化の程度に応じて多様性に富んだ分化を遂げていることを示唆した。各菌における RNA サイレンシング蛋白質の分子系統解析を行った結果、興味深いことに一つの菌内のパラログ同士よりも、子のう菌・担子菌・接合菌におけるオーソログの方がより近縁である例が示された。この結果は、複数の RNA サイレンシング経路の起源が大変古く、主要な菌群の分化以前に存在していたことを示唆するものであった。

Ancient origin of RNA silencing pathways in fungi

Hitoshi Nakayashiki, Naoki Kadotani, Nguyen Bao Quoc, Shigeyuki Mayama

(Fac. of Agri., Kobe Univ.)

O-4

EGFP と AoVam3p の融合タンパク質を用いた液胞膜の可視化による麴菌 *A. oryzae* 液胞の形態解析

正路淳也, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】糸状菌において液胞は、チューブ状液胞の存在など出芽酵母では見られない特徴を備えている。我々はこれまで、麴菌 *A. oryzae* において EGFP と液胞膜上の t-SNARE として機能すると予想される AoVam3p の融合タンパク質(EGFP-AoVam3p)を用いることにより、液胞動態の解析を行ってきた¹⁾。今回我々は EGFP-AoVam3p を用いた液胞観察系をさらに発展させ、分生子発芽、気中菌糸、基底部の古い菌糸といった様々な発達段階の菌糸における液胞形態を観察した。

【結果】細胞染色との比較から、EGFP-AoVam3p は液胞に加え、出芽酵母の後期エンドソームに類似したコンパートメントにも局在することが分かった。また、分生子発芽時の液胞形態を観察したところ、分生子の膨潤に伴って液胞が大きく発達していくことが観察された。さらに培地と直接接していない気中菌糸においては、大きく発達した液胞は通常観察されず、かわってチューブ状液胞と小さな液胞によるネットワーク構造が観察された。また基底部の古い菌糸においてみられる発達した液胞では EGFP 蛍光が液胞内腔に観察されたことから、これらの菌糸においてはオートファジーによる細胞質成分の分解と、それに伴う液胞膜の取込みがおこっていると考えられる。以上の結果から、糸状菌の液胞は様々な発達段階において特異的な働きを担っている可能性が示唆された。

1)正路ら、第3回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集, p48

Detailed observations of vacuoles using a fusion protein of EGFP with AoVam3p in *A. oryzae*.

Jun-ya SHOJI, Manabu ARIOKA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotech., Univ. of Tokyo)

O-5

麹菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシス経路の解析

樋口裕次郎、中濱智之、正路淳也、有岡 学、北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）

【目的】 エンドサイトーシスの機構は、動物細胞および酵母において研究が進んでいるものの、糸状菌においてはエンドサイトーシス自体が存在するか否かでこれまで議論がなされてきた。最近 *A. nidulans* において、プリントランスポーターである UapC タンパク質が培地へのアンモニウム塩の添加によって細胞膜から液胞へと輸送されることが報告され、糸状菌においてもエンドサイトーシスの存在が強く示唆された。そこで本研究では糸状菌におけるエンドサイトーシス機構の解析を目的として *A. oryzae* における同経路の可視化を行った。

【方法と結果】 *A. oryzae* における *uapC* 相同遺伝子 *AouapC* をクローニングし、その産物の C 末端に EGFP を融合した AoUapC-EGFP を *A. oryzae* NS4 株において *amyB* promoter の制御下で発現させる株を作製した。共焦点レーザー顕微鏡観察により AoUapC-EGFP は細胞膜に局在しており、アンモニウム塩を含む培地にシフトすると、細胞膜の EGFP 蛍光が薄れていく様子が観察された。またこの取り込みが一般的なエンドサイトーシスの特徴を備えていることを ATP 合成阻害剤やアクチン脱重合剤等を用いて確認した。以上のことから AoUapC-EGFP がアンモニウム塩の存在下、細胞膜からエンドサイトーシスにより取り込まれることを示し、糸状菌におけるエンドサイトーシスの存在を初めて確認した。さらに、同経路観察の際に、液胞染色試薬である CMAC によって染色されない顆粒状のエンドソーム様構造体が見出された。微小管脱重合剤によりこれらの構造体の動きが停止したことから、エンドソーム様構造体は菌糸内を微小管に沿って移動していることがわかった。

Analysis of endocytic pathway in *Aspergillus oryzae*

Yujiro Higuchi, Tomoyuki Nakahama, Jun-ya Shoji, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto (Dept. of Biotech., Univ. of Tokyo)

O-6

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の *impala* 様 DNA トランスポゾン *Aoimp1* の菌株間多様性と転移活性

小笠原博信^{1, 2}, 小畑 浩³, 秦 洋二³, 高橋砂織², 五味勝也¹

(¹東北大院農・生物産業創成, ²秋田県総食研・生物機能, ³月桂冠・総研)

【目的】 実用麹菌 *Aspergillus oryzae* OSI1013 株から見出された新規トランスポゾン *Aoimp1* は、転移活性が高い *Fusarium* 属の *impala* (Tc1/mariner superfamily) と高い相同性を有し、麹菌における転移活性が期待された。そこで、トランスポゾンを用いた優良株の育種や遺伝子 Tagging 法の開発を目的として、菌株間におけるトランスポゼース (*aotA*) 配列の分布と構造を解析すると同時に転移活性についても検討した。

【方法と結果】 ITR 部分をプライマーに用いた PCR により、RIB40 株を含む *A. oryzae* や *A. sojae* 供試株の多くに広く分布が認められ、サザン解析によるコピー数の違いから麹菌供試株は 3 グループに分類された。*aotA* の塩基配列を決定したところ、OSI1013 等の多コピー株ではアミノ酸配列が一致しているのに対し、RIB209 株 (3 コピー) では 2 個のアミノ酸変異、RIB40 等の 1 コピー株では高頻度の RIP 様 (GC→AT) 変異が認められた。一方、OSI1013 株のノーザン解析において CuSO₄ 添加培養や高温培養時に *aotA* の転写量上昇が認められたので、同様条件下で培養した分生子からの Transposon-Trapping を行った。その結果、*niaD* のみならず *crnA* 遺伝子への挿入も認められ、*Aoimp1* はストレス条件下で転移活性を示すことが明らかとなった。

Distribution and transposition of *impala*-like DNA transposon *Aoimp1* in *Aspergillus oryzae*

Hironobu Ogasawara^{1,2}, Hiroshi Obata³, Yoji Hata³, Saori Takahashi², Katsuya Gomi¹

(¹Akita Res. Inst. Food and Brewing, Bioeng., ²Div. Biosci. Biotech. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ³Res.Inst.,Gekkeikan Sake Co.)

O-7

クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* における活性酸素種に対する耐性への alternative oxidase の寄与

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 *A. niger* WU-2223L は通常のシトクロム呼吸系の他にシアン非感受性呼吸系を有する。演者らは、当該呼吸系を構成する酵素 alternative oxidase をコードする遺伝子(*aox1*)を取得している¹⁾。本研究では、活性酸素種に対する耐性への alternative oxidase の寄与を明らかにすることを目的として、*aox1* 破壊株(DAOX-1)について活性酸素種を含む培地での生存率を調べた。さらに、DAOX-1 における catalase(CAT)活性と superoxide dismutase(SOD)活性を測定し、活性酸素種の除去に関与する酵素の生産に *aox1* 破壊の及ぼす影響について検討した。

【方法および結果】 *A. niger* WU-2223L 由来の *aox1* 破壊株(DAOX-1)は、相同組換えによって作成した。DAOX-1 では *aox1* の転写および alternative oxidase 活性が消失したことを確認した。DAOX-1 については、活性酸素種として 5 mM の過酸化水素を含む培地上での生存率が WU-2223L の生存率の約 20% となり、さらに *t*-butyl hydroperoxide を含む培地での生存率も低下したことから活性酸素種に対する耐性の低下が認められた。5 mM の過酸化水素を含む培地で 4 日間生育させた DAOX-1 では、WU-2223L と比較して CAT 比活性が約 1.2 倍、SOD 比活性が 10 倍以上に増大した。以上の結果は、*aox1* 破壊にともなう alternative oxidase 活性の消失が DAOX-1 の細胞内において活性酸素種を増大させ、SOD 活性が増大することを強く示唆した。

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

Contribution of Alternative Oxidase to Resistance to Reactive Oxygen Species in *Aspergillus niger* Producing Citric Acid

Takasumi Hattori, Kuniki Kino, Kohtaro Kirimura

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

O-8

イネいもち病菌の APSES タンパク質 Mstu1 は付着器の成熟を制御する

西村麻里江、林長生 (生物研)

糸状菌において、APSES 転写因子は菌の形態分化を制御する。イネいもち病菌の APSES 転写因子 Mstu1 の欠損株は、菌糸生長の遅延、孢子形成数の低下(野生型の約 10%)、交配時の雌性欠損、噴霧接種時の感染率の低下を示す。Mstu1 における付着器(感染特異的器官)形成を観察したところ、欠損株では初期の付着器形成(<8h)に遅延がみられたものの、16 時間後には野生型株と同程度の数の、形態的に正常な付着器を形成した。しかしながら、侵入菌糸の形成率は Mstu1 欠損株では野生型株の約 20% まで低下していた。また、付着器形成誘導 24 時間後の Mstu1 欠損株では発芽管の異常な分岐が観察された。いもち病菌では、孢子/分生子柄形成、付着器形成、侵入菌糸形成が cAMP シグナルの制御を受けていることが知られているが、Mstu1 欠損株のいずれの欠損形質についても cAMP 添加により著しい回復は見られなかった。Mstu1 欠損株孢子を無傷のイネへ噴霧接種した場合には病斑がほとんど見られないが、傷をつけたイネに接種した場合にはイネに侵入し病斑を形成した。いもち病菌は付着器内に高濃度に蓄積されたグリセロールにより形成された膨圧を利用してイネへ侵入するが、グリセロールは孢子内のグリコーゲンや脂質から生合成されと考えられている。付着器形成誘導 24 時間後において、孢子・付着器内グリコーゲンをヨードカリウム液、脂質をニールブルーで染色し観察したところ、野生型株と比べ、Mstu1 欠損株では孢子内グリコーゲン・脂質の付着器への移動率と分解率が著しく低下していた。これらの結果は、Mstu1 が付着器内の膨圧形成といった機能的成熟を制御していることを示唆する。いもち病菌の cAMP-dependent protein kinase A (PKA) catalytic subunit (Cpka) は Mstu1 と同様、孢子内のグリコーゲンや脂質の分解と付着器の成熟、イネへの付着器を介した侵入に関与する。Mstu1 に PKA リン酸化サイトがあることから、現在、Cpka による Mstu1 の制御について検討している。

An APSES protein Mstu1 regulates appressorium maturation in *Magnaporthe grisea*.

Marie Nsuhimura, Nagao Hayashi (NIAS)

O-9

Cryphonectria parasitica の GTP 結合タンパク質 $\beta\gamma$ -サブユニットとフォスデューシン

笠原 純 (宮城大・食産業・環境システム)

日本(または中国)から米国にもたらされたとされるクリ胴枯病菌 *Cryphonectria parasitica* は、米国アパラチア地方において極めて優勢であったクリ(American chestnut)をほぼ一掃するほどの被害をもたらした。ウイルスを用いた同菌のバイオコントロール技術開発の一環として、メリーランド大学の D. Nuss らは同菌よりウイルス感染の影響を受ける三量体 GTP 結合タンパク質の α -サブユニットを単離して解析を行い、病原性との関りを示した。その後演者らは β -サブユニットおよび γ -サブユニット遺伝子を単離し、各々の産物の性質を検討、また欠損変異体を得た。 β -サブユニット欠損株は特徴的な表現型を示し、PDA 培地上では非常に高い生育能を示したが、クリ幹上における病原性はほとんど失っていた。また同時期に取得した変異体の1つが β -サブユニット欠損変異体に酷似する表現型を示したので解析したところ、変異は β -サブユニットでも γ -サブユニットの遺伝子でもなく、 β -サブユニットに結合してその機能を負に調節するとされるフォスデューシン様タンパク質の遺伝子に生じていた。これら β -サブユニットおよびフォスデューシン様タンパク質について、 α -サブユニットとの相関を含め分子レベルで解析した。また動物細胞のフォスデューシンについて提唱されていた機能とは異なる新規の性質を見出した。また β -サブユニットおよびフォスデューシン遺伝子がゲノム上において隣接する座位に存在すること、*N. crassa* においても同様の構造をとることを見出した。このシンテニクな構造は他の酵母や他の糸状菌にも広く認められた。また γ -サブユニットについては、その構造を *N. crassa* 等と比較した。

G-protein $\beta\gamma$ -subunits and phosducin in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*

Shin Kasahara (Dept. of Environmental Sciences, Miyagi Univ.)

O-10

ベト病菌, *Phytophthora infestans*, における低温に応答した遺伝子発現制御機構について

谷修治*, Howard S. Judelson (Dept. of Plant Pathology, UC Riverside. *現所属: 阪府大院・生命環)

ジャガイモに感染してベト病を引き起こす *Phytophthora infestans* は、低温 (<14°C) では孢子から遊走子を放出し、暖かい温度 (>15°C) では孢子から直接菌糸を伸長する。*P. infestans* による植物への感染は、主に低温に誘導される孢子の分化が引き金となる。そこで、温度変化による孢子分化の分子メカニズムを解明することを目的として、我々は低温により発現が誘導される NIF (nuclear LIM-interacting interactor) 遺伝子の発現制御機構について解析した。GUS 遺伝子をレポーターに用いて、欠損・キメラ・改変プロモーターの機能を解析し、低温に応答した誘導発現には、転写開始点の上流 139-bp に位置する 7-nt 配列, GGACGAG, が必須であることを明らかにした。コールドボックスと名付けられたシスエレメントは、近縁種の *P. sojae* 由来の NIF 遺伝子プロモーター上にも見いだされた。コールドボックス特異的に結合する核タンパク質が EMSA 法により検出され、現在タンパク質の精製を試みている。更に、遊走子の放出とコールドボックスを介した NIF 遺伝子発現誘導は、膜の流動性を減少させる dimethyl sulfoxide により促進され、膜の流動性を増加させる benzyl alcohol により抑制された。以上の結果より、孢子は、細胞膜の流動性の減少により温度低下を感じ、それが遊走子の放出とコールドボックスを介した遺伝子発現を誘導すると推測される。

Activation of zoosporogenesis-specific genes in *Phytophthora infestans* involves a seven-nucleotide promoter motif and cold-induced membrane rigidity.

Shuji Tani* and Howard S. Judelson (Dept. of Plant Pathology, UC Riverside. *present address: Grad. Sch. of Life & Env. Science, Osaka Pref. Univ.)

O-11

Monascus purpureus におけるカビ毒シトリニンの生産調節因子の機能解析

清水健雄¹、木下浩¹、永井史郎²、仁平卓也¹ (¹ 阪大・生物国際セ、² ヤエガキ醗酵技研)

糸状菌 *Monascus purpureus* は紅麴カビと称され、古くから発酵食品および天然着色料として食品業界で利用されている赤色色素の生産に用いられてきた。近年、色素以外にも高脂血症治療薬と同様の生理活性を示すモノコリンや GABA を二次代謝により生産することが明らかとなり、健康食品への応用が期待されている。しかし、本菌は同時に人間にとって有害なカビ毒であるシトリニンも生産することから、更なる有効利用において、シトリニンの生合成機構の解明、制御が必須となっている。当研究室では、シトリニン主骨格を生合成する、ポリケタイド合成酵素をコードしている遺伝子 *pksCT* のクローニングに成功している。糸状菌では、二次代謝物質の生合成関連遺伝子群はクラスターを形成していることから、本菌においても *pksCT* 周辺にシトリニン生合成関連遺伝子群はクラスターを形成している可能性があると考えられた。周辺領域のシーケンズ解析の結果、*pksCT* の上流約 6 kb の位置に、DNA 結合能を有する 2Cys6 zinc finger motif を持つ regulator と相同性を示す ORF が見出された。この遺伝子について遺伝子破壊による機能解析を試みたところ、破壊株においてシトリニン生産が約 1/70 に減少したことから、この regulator はシトリニン生産の活性化に関与していると考えられた。本研究は、*M. purpureus* においても他の糸状菌と同様に 2Cys6 zinc finger motif を持つ regulator が存在し、二次代謝物質の生産が調節されている最初の報告例であり、この regulator の機能制御を通じてカビ毒であるシトリニンの生産量を減少させることができることが判明した。

Functional analysis of regulator involved in citrinin production in *Monascus purpureus*.

Takeo Shimizu^a, Hiroshi Kinoshita^a, Shiro Nagai^b, Takuya Nihira^a (^aICBiotech, Osaka Univ., ^bYaegaki Bio-industry, Inc)

O-12

白色腐朽菌由来 P450/P450 レダクターゼ融合タンパク質 PcCYP17a の機能解析

志水元亨¹、松崎芙美子¹、廣末慎嗣²、有沢章²、恒川博²、割石博之¹ (¹ 九大院農、² メルシャン)

白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* のゲノムプロジェクトが終了し、そのゲノム中には 154 の P450 遺伝子を有することが明らかとなった。さらに、P450 と P450 レダクターゼの融合タンパク質についても 7 種存在していた。これまで、融合タンパク質の機能については、*Fusarium oxysporum* 由来の P450foxy や、枯草菌の P450BM-3 について報告されており、飽和脂肪酸の水酸化 (ω -1- ω -3 位) を行うことが知られている。しかしながら、*P. chrysosporium* における機能については明らかとなっていない。そこで本研究では、*P. chrysosporium* 由来 P450/P450 レダクターゼ融合タンパク質である PcCYP17a の機能解析を行った。

大腸菌を宿主とした異種発現を行い、得られたリコンビナントタンパク質を用いて炭素鎖長 9 から 18 までの飽和脂肪酸を基質として反応を行った。その結果、炭素鎖長 9 から 15 までの飽和脂肪酸については ω -1- ω -6 位を水酸化したのに対し、炭素鎖長 16 から 18 までの飽和脂肪酸については ω -1- ω -4 位を水酸化した。また、炭素鎖長 9 から 18 までの飽和脂肪アルコールに対しても同様に水酸化した。さらに、ナフタレンやベンゾ(a)ピレンなど芳香族化合物についても水酸化した。このことから、PcCYP17a は、P450foxy や P450BM-3 と構造的に異なった基質認識部位を有していることが示唆された。現在、遺伝子の発現制御機構を含め、さらに詳細に解析を行っている。

Molecular Characterization of a Fused Protein of P450 and P450 Reductase PcCYP17a from the White-rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*

Motoyuki Shimizu¹, Fumiko Matsuzaki¹, Shinji Hirose², Akira Arisawa², Hiroshi Tsunekawa², Hiroyuki Wariishi¹ (¹ Faculty of Agriculture, Kyushu Univ., ² Bioresource Laboratories, Mercian Co.)

O-13

白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の高窒素および低窒素条件下における細胞外タンパク質の発現プロファイリング

寺本 寛、志水元亨、割石博之 (九大院・農)

【目的】白色腐朽担子菌は地球上で最も難分解性の天然高分子であるリグニンを唯一単独で無機化可能な微生物である。白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* はリグニン分解酵素として、マンガンペルオキシダーゼ (MnP) およびリグニンペルオキシダーゼ (LiP) を分泌する。これら酵素の発現は窒素枯渇下において誘導されることが示されている。このことから、*P. chrysosporium* の窒素濃度に依存した細胞外タンパク質の発現制御機構に興味を持たれた。そこでまず、高窒素 (HN) および低窒素 (LN) 条件においてそれぞれ分泌される、*P. chrysosporium* 細胞外タンパク質の網羅的解析を開始した。

【方法および結果】HN および LN 条件下で調製した細胞外タンパク質を二次元電気泳動に供したところ、両条件で発現パターンが大きく異なった。MALDI-TOF-MS 解析で得たペプチドフィンガープリントを用いて、*P. chrysosporium in silico* protein database に対して MASCOT 検索することでタンパク質を同定した。LN 下では、MnP1 や細胞外過酸化水素供給系と考えられている glyoxal oxidase、aryl-alcohol oxidase 等が同定された。一方 HN 下においては、複数の糖質加水分解酵素、glutaminase、lipolytic enzyme、mannose 6-phosphatase、oxalate decarboxylase 等、LN 下では見られなかった酵素が同定された。

Proteomic analysis of extracellular proteins from *Phanerochaete chrysosporium* grown on media with high and low nitrogen concentrations

Hiroshi Teramoto, Motoyuki Shimizu, Hiroyuki Wariishi (Faculty of Agriculture, Kyushu Univ.)

O-14

Aspergillus oryzae チロシナーゼのオリゴマー化と酸活性化機構

多田羅洋太, 難波 剛, 吉田 孝¹, 一島英治 (創価大院・生物工, ¹弘前大・農学生命)

A. oryzae チロシナーゼは酸性条件で活性化するという特異的な性質を持つ。四次構造はホモ四量体で活性中心は 2 つの銅原子である。この複雑な構造を持つチロシナーゼの酸活性化機構を解明することを目的とする。不活性型のプロチロシナーゼ (pro-TY) は pH 3.0 において活性化された (acid-TY)。また 0.01% の SDS によりわずかに活性化された。ゲルろ過から pro-TY と acid-TY のネイティブ条件における分子質量はそれぞれ 290kDa と 165kDa であった。CD スペクトルの解析から、酸活性化により 2 次構造に変化は見られなかったが、3 次構造に大きな変化があった。トリプトファン蛍光とトリプトファンに結合する蛍光試薬 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS) により、酸活性化によりトリプトファン残基が露出していることが示唆された。これらの結果から pro-TY は pH 3.0 で四量体の分子が不可逆的に解離して二量体となり活性中心の銅原子が露出すると考えられる。還元状態におけるゲルろ過から、活性型二量体のサブユニット間の結合にジスルフィド結合が関与していることが示唆された。システイン残基を特異的に蛍光標識する ABD-F により、Cys108 が分子間のジスルフィド結合に関与することが示唆された。Cys82 は遊離システインであり、その他の 6 つのシステイン残基は分子内におけるジスルフィド結合に関与していると考えられる。C108A 変異酵素は 68kDa の単量体 (mono-C108A) と 380kDa の多量体 (oligo-C108A) の 2 通りの分子が生産された。このうち mono-C108A には活性がみられず、oligo-C108A は酸活性化を経て酵素活性をわずかに示した。*A. oryzae* チロシナーゼの活性にはオリゴマー化が必須であると考えられる。

Acid-activation and oligomerization of *Aspergillus oryzae* tyrosinase

Yota Tatara, Takeshi Namba, Takashi Yoshida¹ Eiji Ichishima

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

O-15

糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるレスポンスレギュレーターの解析

萩原大祐、丸井淳一朗、加藤雅士、小林哲夫、水野猛 (名大院・生命農学)

2成分制御系は細菌のみならず真核微生物においても普遍的な環境応答情報伝達機構である。モデル糸状菌 *A.nidulans* の2成分制御系を網羅的に解析することによって、糸状菌における普遍的な環境応答メカニズムを明らかにしたいと考えた。*A.nidulans* のゲノム配列を調べると、2成分制御系の構成因子であるヒスチジンキナーゼ (HK)、HPt 因子、レスポンスレギュレーター (RR) はそれぞれ15種類、1種類、4種類存在することがわかった。本研究では出力系であるレスポンスレギュレーターに焦点を絞り、各 RR の生理機能を明らかにするために4種類の RR 破壊株の作製を試みた。得られた破壊株はいずれも生育速度において野生株と大差はなかった。しかし SrrA 破壊株の形態は野生株と著しく異なり、分生子柄の形成に異常が見られ、無性孢子(conidia)の着生は著しく低下していた。さらに、有性生殖器官であるクライストセチアの形成も観察されなかった。また、SrrA は以前に我々が解析した分裂酵母の Prr1 のホモログであり、Prr1 と同様に酸化ストレス応答に関与していることが考えられた。予想通り、SrrA 破壊株は酸化ストレスに対して感受性を示し、抗酸化因子であるカタラーゼの発現にも関与していることから、酸化ストレス応答機構において重要な役割を果たしていることが明らかになった。これらのことから SrrA は糸状菌の環境応答において多面的なエフェクターであると考えられ、その生理機能について考察する。

Aspergillus nidulans response regulator SrrA involved in oxidative stress response.

Daisuke Hagiwara, Junichirou Marui, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi, Takeshi Mizuno

(Agriculture, Univ. of Nagoya)

O-16

麴菌プロセッシングプロテアーゼ (KexB)の欠損が細胞壁構造に及ぼす影響

水谷治¹, 椎名松子², 佐野元昭³, 山形洋平², 渡邊剛志⁴, 阿部敬悦², 町田雅之⁵, 中島佑², 五味勝也¹

(¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大院農・応生化, ³金沢工大, ⁴新潟大・農, ⁵産総研)

我々は、麴菌の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、その解析を行ってきた。その結果、*kexB* 破壊株は、プレート培養で顕著な形態形成異常を示し、その形態異常の原因の一つに細胞壁の統合性に関与する cell integrity シグナル伝達経路の構成的活性化が示唆された。そこで、この経路の活性化が *kexB* 破壊株の細胞壁にどのような影響を与えているかを明らかにする目的で、麴菌 *kexB* 破壊株細胞壁の詳細な化学構造解析を試みた。細胞壁構造解析を行うために、*kexB* 破壊株及び野生株の菌体を熱水抽出後、アルカリ抽出によりアルカリ可溶画分とアルカリ不溶画分とに分画した。その結果、*kexB* 破壊株の細胞壁は、アルカリに可溶性細胞壁画分が野生株と比較して非常に少ないことが明らかになった。現在、各画分に対する構成糖の定量及びキチナーゼ、 β -1,3-グルカナーゼ等の酵素処理を行い、得られた画分を解析し、多糖の分岐や結合様式にまで変化があるか検討中である。

Perturbation of cell wall caused by defect of the KexB in *Aspergillus oryzae*.

Osamu Mizutani¹, Matsuko Shiina¹, Motoaki Sano², Youhei Yamagata¹, Takeshi Watanabe³, Keietsu Abe¹, Masayuki

Machida⁴, Tasuku Nakajima¹, Katsuya Gomi¹

(¹Tohoku Univ., Grad. Sch. Agri. Sci., ²KIST, ³Niigata Univ., ⁴AIST)

O-17

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) の細胞内局在化部位、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)

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* には、N 末端側にミオシンと相同性を示すドメインを持つタイプのキチン合成酵素をコードする *csmA*、*csmB* の二種類の遺伝子が存在する。これまでの解析により、*csmA* 破壊株と *csmB* 破壊株の表現型の類似性が示され、*csmA* と *csmB* の二重破壊が合成致死となることが示されている¹⁾。また 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菌糸先端や隔壁形成部位に局在化し、細胞壁合成を行うことが示唆されている²⁾。本研究では、CsmB の細胞内での局在化部位を検討するため、*csmB* の ORF の C 末端側に 3 コピーの FLAG の tag がつながつた形のタンパク質 CsmB-FLAG を野生型 CsmB のかわりに発現できる株を作製した。間接蛍光抗体法により解析したところ、CsmB-FLAG が菌糸先端、隔壁形成部位のアクチン近傍に局在する様子が観察された。また、CsmB のミオシン様ドメインとアクチンフィラメントとの結合を *in vitro* において示した。さらに、CsmA と CsmB の局在化部位の比較や相互作用についても解析を行い、両者の機能的相関関係を検討した。

1) 竹下ら、第 4 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p. 7

2) Takeshita, N. *et al.* (2005) *Mol. Biol. Cell* **16**, 1961-1970

Functional relevance between two chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, in *Aspergillus nidulans*

Norio Takeshita, Hiroyuki Horiuchi, and Akinori Ohta

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

O-18

Putative role of protein kinase C in the phosphorylation and multimerization of the Woronin body protein, AoHex1, in *Aspergillus oryzae*

Praveen Rao JUVVADI, Jun-ichi MARUYAMA and Katsuhiko KITAMOTO

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

We previously characterized the *Aspergillus oryzae* *Aohex1* gene encoding the major protein of the Woronin body and demonstrated its plugging at the septal pore upon hypotonic shock by three-dimensional confocal microscopy¹⁾. However, the regulatory mechanisms involved in the formation of the Woronin body remain unclear. In this report we show the reduction in the dimeric and tetrameric forms of AoHex1 upon lambda-protein phosphatase treatment, which indicated that AoHex1 phosphorylation *in vivo* may facilitate its multimerization. Concomitant with the presence of a highly conserved predicted protein kinase C (PKC) phosphorylatable site (Ser151), the recombinant AoHex1 was phosphorylated in a PKC-dependent manner *in vitro*. Moreover, culturing *A. oryzae* in presence of chelerythrine, a potent PKC specific inhibitor, resulted in the reduction of the multimeric forms of AoHex1 implicating the relevance of PKC-dependent phosphorylation of AoHex1 for its multimerization. Supporting these data, mutation of Ser151 to Ala in AoHex1 caused reduced phosphorylation by PKC *in vitro*. While the Woronin bodies were visualized as dot-like structures by expressing the *dsred2-Aohex1*, expression of the mutagenised construct, *Aohex1^{mut}-S151A* as *dsred2* fusion showed perturbed localization to ring-like structures, which were also evident under chelerythrine treatment of the *dsred2-Aohex1* expressing strain.

1) Maruyama J. *et al.*, (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **33**, 1081-8.

O-19

麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジーの分化、発生への関与

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】ヒトや酵母をはじめとする真核生物は、栄養飢餓に応答して細胞質やオルガネラを液胞で分解し、再利用する細胞内分解機構が存在する。また近年、オートファジーが栄養飢餓時の生存戦略としてだけでなく、通常時の細胞内代謝回転、分化や発生、免疫機構、感染病原体からの防御、細胞死などにも関与することが報告されている。本研究では、*A. oryzae* をはじめとする糸状菌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、オートファジーにおいて重要な機能を果たす出芽酵母 *ATG8* ホモログ遺伝子 *Aoatg8* の破壊によるオートファジーの生理機能の解析を行った。

【方法及び結果】これまでに我々は、EGFP-AoAtg8 および DsRed2-AoAtg8 融合タンパク質の局在解析により *A. oryzae* におけるオートファジーの存在を示した¹⁾。今回、*Aoatg8* 破壊株を作成し、その表現型の解析を行った。*Aoatg8* 破壊株は気中菌糸および分生子の形成に欠損が見られた。また最小培地においてはわずかながら生育阻害が観察された。この破壊株の細胞質に DsRed2 を発現させ、栄養飢餓における液胞への取り込みを観察したところ、*Aoatg8* 破壊株では DsRed2 の取り込みが観察されなかった。これは *Aoatg8* 破壊株が実際にオートファジーを欠損していることを示しており、*Aoatg8* がオートファジーに必須であることが示唆された。また、チアミンプロモーター下で *AoAtg8* を *Aoatg8* 破壊株において発現させた相補株を観察した結果、チアミン濃度依存的に気中菌糸および分生子の形成が回復することが観察された。以上の結果より、*A. oryzae* においてオートファジーが分化や発生に関与することが示唆された。現在、この相補株から分生子を回収し、オートファジーが発芽に与える影響についても検討中である。

1) 菊間ら、第4回糸状菌分子生物コンファレンス要旨集 p.67

Evidences for autophagy during differentiation and development of *A. oryzae*

Takashi Kikuma, Mamoru Ohneda, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

P-1

ムギ類赤カビ病菌 *Fusarium graminearum* の発芽胞子におけるリン酸化タンパク質の解析

生駒卓也, 須賀晴久*, 鈴木徹*, H. C. Kistler. **, 百町満朗 (岐大・応生, *岐大・生命セ, **Univ. of Minnesota)

ムギ類赤かび病菌 *Fusarium graminearum* は穀物に病害とかび毒汚染を起こすことで大きな問題となっている糸状菌である。2003年、本菌はその重要性から植物病原糸状菌で2番目に36Mbpからなるゲノムの全塩基配列が決定され、約11,640個の遺伝子が見出された。演者らは感染初期に *F. graminearum* で機能している遺伝子を明らかにするため発芽分生胞子におけるプロテオーム解析を行った結果、タンパク質レベルで少なくとも188個の遺伝子発現を認めた(平成17年度 日本植物病理学会大会)。そこで本研究では翻訳後修飾の一種であるタンパク質のリン酸化について調べた。まず発芽分生胞子からタンパク質を抽出し、二次元ゲル電気泳動で分離した。次にチロシン、セリン、スレオニン残基に結合したリン酸基の検出が可能な試薬を用いてゲルを染色した。その結果、約410個のタンパク質スポット中、37個のスポットがリン酸化タンパク質として検出された。これまでに作成した2DE-reference map(個々のタンパク質スポットに遺伝情報が付加された二次元ゲル電気泳動像)に照合してそれらは他の植物病原性糸状菌で病原性に関係があるとされているCAP20、各種 dehydrogenase、woronin body protein precursor、elongation factor などを含むことが明らかとなった。

Phosphoprotein analysis of germed conidiospores of *Fusarium graminearum*

Takuya Ikoma, *Haruhisa Suga, *Toru Suzuki, **H. C. Kistler, Mituro Hyakumachi

(Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu Univ *LSRC, Gifu Univ. **Univ. of Minnesota)

P-2

チリ産トマト属野生種から分離した非病原性 *Fusarium oxysporum* の分子系統解析

岡部明子, 石川暢子*, 川部眞登**, 児玉基一郎***, 寺岡 徹, 有江 力 (東京農工大・*現食品分析センター・**ワシントン州大・***鳥取大)

トマト原産地近傍と推定されているチリ共和国北部地域から、2002年12月および2004年3月にトマト属野生種 (*Lycopersicon peruvianum*, *L. chilense*) および栽培種 (*L. esculentum*) を採集した。これら植物体の果実内部、果実外部、茎外部、茎内部、葉、根から計562株の糸状菌を分離し、同定を行ったところ、*Alternaria* 属菌、*Aspergillus* 属菌、*Cladosporium* 属菌、*Fusarium* 属菌、*Geotrichum* 属菌、*Mucor* 属菌、*Rhizopus* 属菌、*Papulaspora* 属菌、*Penicillium* 属菌、*Phoma* 属菌、*Trichoderma* 属菌、*Ulocladium* 属菌が見出された。*Fusarium* 属菌については種を同定し、*F. oxysporum* 39株のトマト萎凋病菌レース検定用トマト品種に対する病原性を調査したところ、いずれも病原性を示さず、非病原性であると考えられた。これらの菌株の rDNA IGS 領域の塩基配列を決定し、すでに登録済みの *F. oxysporum* 各分化型株の塩基配列情報(川部ら, 2005)と比較し、分子系統解析を行った。その結果、トマト属野生種および栽培種由来の *F. oxysporum* 菌株は概ね *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*FOL*) 株によって構成されるクラスターの近傍に位置し、他分化型菌株よりも *FOL* に近縁であることが示唆された。また2005年7月に、メキシコで、野生種から栽培種への移行期にあったと想定されているトマト (*L. esculentum* var. *cerasiforme*) を採集し、同様に *F. oxysporum* を分離し、現在これらの菌株についてもあわせて系統解析を行っている。

Genealogical analyses of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolated from Wild *Lycopersicon* spp. in Chile.

Akiko Okabe, *Nobuko Ishikawa, **Masato Kawabe, ***Motoichiro Kodama, Tohru Teraoka, Tsutomu Arie

(Tokyo Univ. of Agric. & Tech., *Japan Food Res. Lab., **Washington state Univ., ***Tottori Univ.)

P-3

***Gibberella fujikuroi* 子嚢胞子における形質の分離と培養上清による子嚢殻形成誘導**

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。*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て得られた形質転換体と野生株間とで交配して形成された子嚢胞子を単胞子分離後、3 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ところ、野生型 FGSC 7610 株を雄側、形質転換体 FGSC 7611 株を雌側として交配すると、ほぼ 1 : 1 に各形質が分離したが、形質転換体 FGSC 7610 株を雄側、野生型 FGSC 7611 株を雌側にすると、各形質が必ずしも理論通りに分離しなかった (2004 年度報告)。再度、その分離比を精査するとともに、背景となる交配挙動について考察した。また、通常の交配時に雄として用いる雄株胞子懸濁液に代えて、雄株の培養上清 (濾過培養液) を処理した場合にも子嚢殻形成が誘導された。さらに、本菌の近縁種である *Fusarium oxysporum* (不完全性) の胞子懸濁液を処理した場合にも、交配型の異なる菌株同士の組合せ間においてのみ子嚢殻形成が誘導された。

Segregation of phenotypes in ascospores of *Gibberella fujikuroi* and induction of barren perithecia formation by culture supernatant

Kana Togashi, Tohru Teraoka, Tsutomu Arie

(Tokyo Univ. of Agric. & Tech.)

P-4

バーティシリウム萎凋病菌 *Verticillium longisporum* の PCR 検出と分子系統解析

斎藤秀成¹, 森沙織¹, 酒井宏², 漆原寿彦², 藤村真¹ (¹東洋大・生命, ²群馬農技セ・生産環境)

土壌植物病原菌 *Verticillium* による作物被害は、主に *V. dahliae* と *V. albo-atrum* によるとされているが、群馬県の孀恋地区では、アブラナ科作物に強い病原性を示す *V. longisporum* が *V. dahliae* とともに問題となっている。同地区から分離した *V. longisporum* の CA9 株を用いて rDNA の配列を決定し、*V. dahliae* や *V. albo-atrum* と比較したところ、ITS 領域はむしろ *V. albo-atrum* と相同性が高いこと、18S 領域に 841bp の特異的な挿入配列をもつことが明らかになった。これらの情報をもとに *V. longisporum* を PCR 検出する 2 セットのプライマーを作成し、土壌中の CA9 型 *V. longisporum* を検出し、定量も可能なリアルタイム PCR 系を構築した。しかし、同地区から *V. longisporum* として分離した 8 株を PCR 診断したところ、約半数が *V. dahliae* と診断された。これらの Vd 型株の形態学的特徴 (胞子長径や菌核形状) および生化学的特徴 (ポリフェノールオキシダーゼ活性) は、いわゆる *V. dahliae* とは異なり *V. longisporum* のそれと一致した。CA9 型および Vd 型という 2 種類の菌株の遺伝的背景を比較するために、RAPD 法解析やミトコンドリア遺伝子の PCR-RFLP 法による解析を行なった。これらの結果から、Vd 型株は、CA9 型株と共通の多型を示す場合と *V. dahliae* と共通の多型を示す場合があることが判明した。これらのことから、孀恋地区の *V. longisporum* には、遺伝的な背景が異なると思われる 2 種類の株が存在し、Vd 型株は *V. longisporum* と *V. dahliae* と両方の遺伝的背景をもつ可能性が示唆された。

Molecular characterization of two types of *Verticillium longisporum* isolates from cabbage fields in Tsumagoi

Hidenari Saito¹, Saori Mori¹, Hiroshi Sakai², Toshihiko Urushibara², Makoto Fujimura¹ (¹Fac.of Life Sci., Toyo Univ.;

²Gunma Pref. Agri. Tech. Center)

P-5

ウリ類炭疽病菌の *ClaCWH41* 遺伝子は宿主侵入に必須であり侵入器官の細胞壁合成に関与する

松井理恵・宮地俊彦・辻 元人・辻山 彰一・Richard O'Connell・白石友紀*・久保康之 (京府大院農・岡山 大農*)

ウリ類炭疽病菌の付着器形態分化は宿主侵入に必須である。今回、REMI 法により作出した付着器形態形成変異株 P51 の破壊遺伝子の同定と性状解析を行なった。本変異株の変異領域の解析を行ったところ、出芽酵母において細胞壁合成に関与することが報告されている *CWH41* 遺伝子と高い相同性を示し、本遺伝子を *ClaCWH41* と命名した。次に AtMT 法を用いて *clacwh41* 破壊株を作出し、性状解析を行った。*clacwh41* 破壊株は弱病原性を示し、人工セルロース膜に対する物理的侵入能の低下を示した。スライドガラス上における付着器形態を観察したところ、野生株が球形の付着器を形成するのに対し、破壊株は異常な付着器を形成していた。電子顕微鏡を用いて発芽胞子及び菌糸を野生株と比較したところ、菌糸形態は野生株と同様であった。しかしながら、付着器形成時における破壊株の付着器及び発芽胞子は細胞壁が肥大していることが明らかとなった。以上の結果から、侵入器官の細胞壁合成の異常が、付着器の侵入機能の欠損に関連する可能性が考えられた。

The *ClaCWH41* Gene is Essential for Penetration of Host Tissue and Cell Wall Formation during Germling Development in *Colletotrichum lagenarium*.

Rie Matsui, Toshihiko Miyaji, Gento Tsuji, Shouichi Tsujiyama, Richard O'Connell, Tomonori Shiraishi and Yasuyuki Kubo (Univ. of Kyoto Pref, Univ. of Okayama.)

P-6

GATEWAY システムを利用した糸状菌用遺伝子破壊ベクターの構築

阿部 歩, Evelyn B. Elegado, 曾根輝雄 (北大院農・応用菌学)

【目的】近年、糸状菌のゲノム解析が進むにつれ、多くの Hypothetical Protein 遺伝子が同定されている。これらの機能を解析するには、遺伝子破壊実験が不可欠である。遺伝子破壊実験は、相同組換え系を利用して行われることが多いが、その破壊用 DNA の作成には、複数断片のクローニングや、fusion PCR を用いる方法、トランスポゾンタギングなどがある。今回我々は Inverse PCR を用い、さらに GATEWAY システムを利用することで簡便に破壊用 DNA を作成する系と、それに用いるベクターの構築を行った。

【方法と結果】Inverse PCR により、標的遺伝子の隣接 DNA を増幅し、マーカー遺伝子を持つベクターに連結後、Inverse PCR に使用した制限酵素で開環することで、破壊用 DNA が作成できる。このベクターは、制限酵素サイトを持たず、なおかつ簡便に Inverse PCR 断片が結合できることが望ましい。pGEM-Teasy プラスミドの MCS を脱落させ、そこに pCB1004 のハイグロマイシン耐性遺伝子を挿入し、さらに GATEWAY 用の *attR-Cm^R-ccdB-attR* 構造を連結することで、pDEST_R を作成した。このベクターには代表的な制限酵素のサイトがなく、GATEWAY により Inverse PCR 断片を効率よく挿入できる。モデルとして *Neurospora crassa* の *Frost* 遺伝子の破壊実験を行った。*Frost* 遺伝子の周辺 3.6kb の *XhoI* 断片を Inverse PCR で増幅し、pENTR-D-TOPO にクローニングし、pDEST_R に組換え、*XhoI* で消化した。これを用いて *N. crassa* 野生株を形質転換したところ、多くの *frost* 変異株様のコロニーが得られた。サザン解析により、遺伝子破壊が確認された。

Construction of GATEWAY-based gene disruption vectors for filamentous fungi

Ayumi Abe, Evelyn B. Elegado, Teruo Sone

(Lab. Appl. Microbiol., Grad. Sch. Agr., Hokkaido Univ.)

P-7

イネいもち病菌の DNA 組換え修復遺伝子群の解析

Evelyn B. Elegado, 阿部 歩, Marites A. Sales, 岩崎阿寿美, 石井千津*, 曾根輝雄 (北大院農・応用菌学,*元
埼大理・生体制御)

【目的】いもち病菌の病原性レース変異には、トランスポゾンの転移や大規模な染色体再編成等、DNA 鎖の組換えが関与していると考えられている。細胞内での DNA 組換えを担っているのは DNA 組換え修復遺伝子群であるが、いもち病菌におけるそれら遺伝子群の解析の報告はない。そこで我々はイネいもち病菌における DNA 組換え修復遺伝子群のクローニングを行い、DNA 組換えのいもち病菌レース変異における役割を明らかにすることを目的として解析を進めている。

【方法及び結果】組換え修復遺伝子群の中から、相同組換えに関わる遺伝子 *RAD52*, *RAD54*, 非相同末端結合 (NHEJ) に関わる遺伝子 *MRE11*, *Ku70*, *Ku80* のいもち病菌ホモログ, *Rhm52*, *Rhm54*, *Mhm11*, *Khm70*, *Khm80* を, Degenerate PCR 及びゲノムデータからの PCR により、日本産イネいもち病菌 Ina168 株より取得した。塩基配列解析の結果、これらのホモログは *N. crassa* のホモログと最も高い相同性を示した。*Rhm52* と *Rhm54* を *N. crassa mus-11*, *mus-25* 変異株に導入したところ、変異株の MMS(メチルメタンスルホン酸)感受性をそれぞれ相補し、機能する事が確認された。またノーザン解析の結果、*Rhm52*, *Rhm54* は MMS, UV の変異源に加え、熱ショック (42°C), Methyl Viologen でもその転写の上昇が確認され、宿主の抵抗性反応による発現の増大が起こる可能性を示している。現在、*Khm70*, *Khm80* の *N. crassa* 変異株の相補試験と、それぞれの遺伝子の pDEST を用いた破壊株の作成を行っている。

Analyses of recombination and repair genes in the rice blast fungus

Evelyn B. Elegado, Ayumi Abe, Marites A. Sales, Asumi Iwasaki, Chizu Ishii*, Teruo Sone
(Lab. Appl. Microbiol. Grad. Sch. Agr., Hokkaido Univ. *Saitama Univ.)

P-8

イネいもち病菌の付着器形成に対するマクロライド系抗生物質の影響

武川 治, 鎌倉高志 (東理大理工)

マクロライド系抗生物質は原核生物の 50S リボソームに結合し、ペプチド転移反応を阻害することによりタンパク質合成を阻害することで知られている。したがって、真核生物においてはミトコンドリアなど、原核生物型のリボソームを持つオルガネラに作用し、呼吸阻害等がおこることが予想される。しかしながら、モチリン様作用、IL-8 等のサイトカインの産生阻害作用、血管新生阻害作用など従来の抗菌作用では説明できない作用が報告されている。そこで、マクロライド系抗生物質がイネいもち病菌の付着器分化にも影響を与えないか検定を行い、呼吸を阻害せずに分化阻害活性を示す傾向が見られた。また、原核生物においてタンパク質合成阻害効果がある他の抗生物質についても同様の検定をおこなったところ、クロラムフェニコールでも付着器分化の阻害が観察された。

The effect of macrolide antibiotics on appressorial development of *Magnaporthe oryzae*.

Osamu Takakawa, Takashi Kamakura.
(Tokyo Univ. of Science)

P-9

イネいもち病菌の葉鞘細胞内での感染動態と遺伝子発現

三田地貴史・齋藤憲一郎・金森正樹・有江力・寺岡徹（農工大農）

イネいもち病菌の孢子発芽，付着器形成から宿主イネへの侵入に至る感染初期過程については多くの知見が得られているが，宿主侵入後の動態については未詳の部分が多い。EGFP 常発現株を用いてイネ葉鞘細胞への侵入，侵入菌糸の伸展，蔓延の挙動を共焦点顕微鏡下で観察したところ，興味深い挙動が観察された。侵入菌糸は隣接細胞への侵入時に細胞壁付近でいったん膨潤後，くびれ細まった後，細胞壁を貫入し，その部位では EGFP の蛍光が見られないか微弱であった。その後，侵入菌糸は先端が丸みを帯びた吸器様の球状構造をとった。経時的に観察すると，接種約 96 時間後までの挙動から侵入菌糸の伸展は二つの様式に大別できた。すなわち侵入開始直後から観察される伸展が遅く太い，分枝を数多くもつ菌糸と，96 時間後に見られたほとんど分枝を伴わず細く伸展が速い菌糸である。感染初期過程に関わる *FMI1(BI9)* 遺伝子¹⁾の ORF 上流約 2.1 kb の断片の下流に EGFP を連結し，その導入個体を葉鞘接種して観察したところ，接種 48 時間後の前者の侵入菌糸には蛍光が認められたものの，90 時間後の侵入菌糸では蛍光が消失していた。これらのことは本菌の侵入菌糸の動態がイネ組織内で変化し，それと符号して発現する遺伝子も切り替わることを示唆していた。

1) Saitoh *et al.* (2005) 23rd Fungal Genetics Conference program book p137

Dynamic behavior of rice blast fungus expressing EGFP in rice sheath cells and associated genes expression.

Takashi Mitachi, Ken-ichiro Saitoh, Masaki Kanamori, Tsutomu Arie and Tohru Teraoka.
(Tokyo Univ. Agric. & Tech.)

P-10

イネいもち病菌付着器形成関連遺伝子 *CBP1* 産物の局在性の検討

岡本俊輔，齋藤憲一郎*，有江 力*，寺岡 徹*，鎌倉高志（東理大理工・*農工大農）

イネいもち病菌の付着器形成誘導に関与する *CBP1* がコードするタンパク質は N 末端側に膜透過シグナル配列が存在することから，*CBP1* 遺伝子産物は細胞膜系又は細胞外へ移行すると予測される。また本タンパク質は C 末端側にセリンとスレオニンに富んだ配列も含んでおり，このような配列を持つタンパク質において GPI アンカー化によって細胞膜に定着しポリペプチド鎖を細胞壁内に展開して一部を細胞外へ露出する例が見いだされている。もし，*CBP1* 遺伝子産物が GPI アンカー化されているならば本タンパク質の局在性と作用部位を特定する上で強力な証拠となる。GPI アンカー化されたタンパク質は PI-PLC 処理によって脂肪酸鎖と遊離するため，*CBP1* の C 末端と GFP の融合タンパク質を構成的に発現する株を作出し，プロトプラスト化およびプロトプラストの PI-PLC 処理による蛍光変化を顕微鏡観察および撮影画像のデジタル解析を行なうことによってその局在と GPI アンカー化の有無を検討した。

The localization of CBP1 protein of *Magnaporthe grisea*.

Shunsuke Okamoto, Kenichiro Saitoh, Tsutomu Arie, Toru Teraoka, and Takashi Kamakura.
(Tokyo Univ. of Science, Tokyo Univ. of Agric. & Technol.)

P-11

イネいもち病菌のヒスチジンキナーゼ Hik1 の情報伝達系の解析

森田真純^{1,2}, 本山高幸¹, 宇佐美論², 工藤俊章¹ (¹理研・中央研、²東洋大・工)

【目的】イネの最重要病原菌であるイネいもち病菌のハイブリッド型ヒスチジンキナーゼ Hik1 の null 変異体 ($\Delta hik1$) は高濃度の糖に対する高浸透圧感受性を示し、病原性は野生株と変わらない。一方、一部の点変異体 (*hik1*-M16 型変異体) は高浸透圧超感受性及び病原性の低下を示す。このような形質を示す原因を明らかにするとともに、Hik1 の情報伝達系を明らかにすることを目的として解析した。

【方法・結果】酵母からヒトまで高浸透圧等のストレス応答には p38 MAP キナーゼが関与する。イネいもち病菌においては Osm1 がこれに相当する。Hik1 からの情報がこの MAPK 経路を活性化するかどうかをみるために、 $\Delta hik1$ 株及び *hik1*-M16 株を高浸透圧処理した場合の Osm1 の活性化を解析した。*hik1*-M16 株では、高浸透圧処理した場合の Osm1 の活性化レベルは野生株や $\Delta hik1$ 株と比較して低下しており、Hik1 は Osm1 の活性化に何らかの関与をしていることが示唆された。また、*hik1*-M16 株での Osm1 の活性化レベルの低下は高浸透圧超感受性の一つの原因であることが示唆された。

Analysis of the signal transduction pathway of a histidine kinase Hik1 of the rice blast fungus

Masumi Morita^{1,2}, Takayuki Motoyama¹, Ron Usami², Toshiaki Kudo¹

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

P-12

イネいもち病菌の二成分情報伝達系の環境応答への関与の解析

向坂由貴, 本山高幸, 工藤俊章 (理研・中央研)

【目的】二成分情報伝達系はバクテリアから菌類や植物などにおいて環境応答などに関与する。イネの最重要病原菌であるイネいもち病菌のゲノム中には二成分情報伝達系因子として、10 種の (推定) ハイブリッド型ヒスチジンキナーゼ、1 種の推定含ヒスチジンリン酸転移タンパク質、3 種の推定レスポンスレギュレーターが存在する。二成分情報伝達系因子に注目し、イネいもち病菌の二成分情報伝達系の環境応答や病原性への関与を明らかにすることを目的とする。

【方法・結果】イネいもち病菌の二成分情報伝達系の機能を解析するため、3 つの推定レスポンスレギュレーター遺伝子 (*MgSSK1*、*MgSKN7*、*MgRIM15*) の遺伝子破壊体を作成した。3 種の遺伝子破壊体とも通常の培地での生育速度は野生株と同様だった。*MgSSK1* 遺伝子破壊株では顕著な高浸透圧感受性を示した。一方、酸化ストレス感受性はどの遺伝子破壊体でも野生株と同程度だった。

Functional analysis of the two-component signal transduction system of the rice blast fungus in response to environmental signals

Yuki Mukouzaka, Takayuki Motoyama, Toshiaki Kudo

(Discovery Res. Institute, RIKEN)

P-13

Neurospora crassa の浸透圧 OS シグナル伝達経路の下流で制御される遺伝子の同定

野口莉枝子, 坂野真平, 市川亮太, 木村真¹, 山口勇², 藤村真 (東洋大・生命,¹理研,²東洋大・工)

アカパンカビの浸透圧 OS シグナル伝達経路と酵母の浸透圧シグナル伝達 HOG 経路はヒスチジンキナーゼと MAP キナーゼカスケードから構成されており、os-2 MAP キナーゼは HOG1 を機能的に相補することが報告されている。HOG 経路の下流では、*CTT1* (Catalase) や *GPD1*, *GPPI* (glycerol 合成酵素), *HSP12* (heat shock protein), *FBP1* (糖新生関連酵素) などの遺伝子が制御されていることが報告されている。しかし、OS 経路の下流で制御されている遺伝子についてはほとんど報告がない。そこで、HOG 経路の下流で制御されている遺伝子のオルソログをアカパンカビのゲノム情報より検索し、遺伝子の発現変動をリアルタイム PCR 法により解析した。なお、OS 経路の下流で制御される遺伝子の特定は、1) 浸透圧処理および OS 経路に作用する殺菌剤 Fludioxonil 処理の両方により発現が変動する。2) *os-2* 変異株ではストレス処理による発現変動が消失することを指標とした。その結果、*NcCTT1* 及び *NcFBP1* は 1) 2) ともに見られ、酵母と同様に OS 経路の下流で制御されていることが明らかになった。しかし、*NcGPD1*, *NcGPP* や *HSP* の浸透圧、殺菌剤処理による誘導は認められなかった。このことより、HOG 経路と OS 経路の下流で制御されている遺伝子群には違いがあることが明らかとなった。HOG 経路と同様に、OS 経路の活性化は細胞内グリセロール量を増加させるが、アカパンカビではグリセロール合成酵素として、*NcGPD1*, *NcGPP* ではなく、*NcGLD* が *os-2* 依存的に発現制御されていることが明らかとなった。さらに、OS 経路の下流で制御されているこれらの遺伝子の発現について、酸化的ストレスやヒートショックなどの各種ストレス応答についても解析したので報告する。

Neurospora genes induced by osmotic stress and fludioxonil under control of the os-2 MAP kinase.

Rieko Noguchi, Shinpei Banno, Ryouta Ichikawa, Makoto Kimura¹, Isamu Yamaguchi², Makoto Fujimura

(Toyo Univ. Grad. Life Sciences, ¹RIKEN. Dis. Res. Inst, ²Toyo Univ. Fac. Engineering)

P-14

アカパンカビのヒスチジンキナーゼ-MAP キナーゼ経路と cAMP-PKA 経路のクロストーク

渡邊節子¹, 塩澤あずさ¹, 坂野真平¹, 木村真², 藤村真¹ (¹東洋大・生命, ²理研・中央研)

アカパンカビの cAMP-PKA 経路は分生子形成・気中菌糸形成の制御に関与している。恒常的活性化変異と推定される調節サブユニット *hah* 株は気中菌糸の亢進と分生子形成の欠失が認められ、同経路の遮断変異と推定される触媒ユニット *pkac-1* 株は分生子形成が強く亢進され colonial な生育をする。一方、*Ustilago maydis* では cAMP-PKA 経路の変異株のなかに、浸透圧感受性と iprodione 耐性を示す例が報告されており、アカパンカビの *os-1* ヒスチジンキナーゼ-MAP キナーゼ(OS)経路の変異株の形質と酷似している。そこで、アカパンカビの cAMP-PKA 経路と浸透圧応答との関連を調べた。*hah* および *pkac-1* 株の浸透圧や iprodione に対する感受性は、野生株と顕著な差は認められなかった。また、二重変異株 *os-1/pkac-1* と *os-1/hah* の形態は、基本的には *os-1* 変異による影響を受けずそれぞれ *pkac-1* と *hah* の形態を示した。しかし、*pkac-1/os-1* 株では *os-1* 株のもつ浸透圧感受性がほぼ完全に抑制され、むしろ 2% の NaCl 存在下で生育が促進されることが判明した。逆に、*hah/os-1* 株では、*os-1* 株よりさらに高い浸透圧感受性を示した。これらのことから、浸透圧応答に対して、cAMP-PKA 経路と OS 経路間にはクロストークがある可能性が示唆された。

Cross talk between histidine kinase-MAP kinase pathway and cAMP-PKA pathway in *Neurospora crassa*

Setsuko Watanabe¹, Azusa Shiozawa¹, Shinpei Banno¹, Makoto Kimura², and Makoto Fujimura¹

(¹Fac.of Life Sci.,Toyo Univ.,²Env.Mol.Biol.,RIKEN,)

P-15

N. crassa の複数のヒスチジキナーゼが浸透圧応答に関与する

塩澤あずさ¹, 岡田晃佳¹, 落合則幸², 寺井明穂¹, 木村真², 藤村真¹ (¹東洋大・生命, ²理研・中央研)

ヒスチジキナーゼ(HK)は、出芽酵母では1種類(Sln1)のみであるが、糸状菌には多数の遺伝子が存在する。しかし、これらの機能については *os-1* 様遺伝子が浸透圧応答と殺菌剤 fludioxonil 耐性に関与していること以外、ほとんど明らかになっていない。そこで、糸状菌の HK の機能を解明するために、アカパンカビのゲノムに存在する 11 種類の HK 遺伝子の各破壊株の作成をおこなっている。現在までに、*NcFOS1* を除く 10 種類の HK 遺伝子破壊株の単離に成功した。しかし、得られた各破壊株(*os-1* 変異株を除く)は、浸透圧感受性、殺菌剤感受性および形態形成などに関して、野生株と顕著な形質の差は認められず、各 HK の機能を特定するに至らなかった。そこで、HK 遺伝子間の機能重複の可能性を検証するため、多重破壊株を作成しその形質を調べた。出芽酵母では *SLN1* (浸透圧センサー) の破壊株は lethal であることが知られているが、アカパンカビの *NcSLN* 破壊株は、*Aspergillus* の場合と同様に顕著な形質を示さなかった。しかし、*ncsln/os-1* 二重変異株は、*os-1* 単独株よりも高い浸透圧感受性を示した。逆に、Ser/Thr キナーゼドメインをもつ *NcHK3.79* 破壊株は、*os-1* 株の浸透圧感受性を抑制した。なお、*ncsln/os-1* 二重変異株は *os-1* 株と同様に薬剤高度耐性であったが、*nchk3.79/os-1* 二重変異株は *os-1* 株よりも薬剤感受性を示した。これらのことから、複数の HK が浸透圧応答に関与しており、*NcSlnp* と *Os1p* の間には正の相互作用が、逆に *NcHK3.79p* と *Os1p* の間には負の相互作用があると考えられた。

Three histidine kinases involved in osmoregulation in *Neurospora crassa*

Azusa Shiozawa¹, Akiyoshi Okada¹, Noriyuki Ochiai², Akiho Terai¹, Makoto Kimura², and Makoto Fujimura¹

(¹Fac.of Life Sci., Toyo Univ., ²Env.Mol.Biol., RIKEN,)

P-16

Cryptococcus neoformans のハイブリッド型 Histidine kinase をコードする遺伝子 *CnNik1* の機能解析

清水公徳¹, 渡辺哲¹, 亀井克彦¹, Drivinya Antra¹, 吉見啓², 田中千尋², 川本進¹

(¹千葉大・真菌セ, ²京大院・農)

Histidine kinase (HK) は多くの真菌でフェニルピロール系抗真菌剤に対する感受性や浸透圧調節に関わる MAPK シグナル伝達経路を制御することが知られているタンパク質リン酸化酵素である。今回、ヒト病原真菌 *Cryptococcus neoformans* の HK をコードすると推定される遺伝子 *CnNIK1* をクローニングし、構造解析を行った。塩基配列、アミノ酸配列を用いた相同検索の結果、アカパンカビ、イネいもち病菌をはじめとする真菌類の HK 遺伝子の活性部位を中心に高く保存されていた。B4500 由来の栄養要求性菌株 TAD1 を用いて、栄養要求性マーカー遺伝子と *CnNIK1* 遺伝子との置換による遺伝子破壊を行い、形質転換株 TAD12 を取得した。フェニルピロール系抗真菌剤フルジオキシニルに対する感受性について比較したところ、YPD 液体培地を用いた場合の野生型株に対する MIC は $3 \mu\text{g/ml}$ であったのに対して、TAD12 では MIC 値が $48 \mu\text{g/ml}$ よりも大きく、本菌の *CnNIK1* 遺伝子は他の真菌類と同様にフェニルピロール系抗真菌剤に対する感受性に関与していた。一方、高浸透圧条件下での生育は野生型株と差異が見られなかった。浸透圧調節を制御する MAPK である *Hog1* のリン酸化状態を比較したところ、野生型株より低レベルなリン酸化が確認された。現在、動物モデルを用いた感染実験を行い、本遺伝子の病原性への関与を検証中である。

Functional analysis of *Cryptococcus neoformans* histidine kinase gene *CnNIK1*.

Kiminori Shimizu¹, Akira Watanabe¹, Katsuhiko Kamei¹, Antra Drivinya¹, Akira Yoshimi², Chihiro Tanaka², Susumu Kawamoto¹ (¹RC-PFMT, Chiba Univ., ²Grad. Sch. Agr., Kyoto Univ.)

P-17

Aspergillus nidulans ヒスチジンキナーゼ遺伝子 *nikA*、*phkA*、*phkB* の機能解析

松林良博、山崎ゆかり、丸井淳一朗、加藤雅士、小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)

[目的] 糸状菌 *Aspergillus nidulans* には、His-Asp リン酸リレー型情報伝達機構に関与する hybrid 型 histidine kinase (HK) をコードする遺伝子が 15 種存在する。我々はこれら HK 遺伝子の機能解明を目的として、網羅的な破壊株の作製を行っている。今回は、*Neurospora crassa nik-1/os-1* のオルソログである *nikA*、並びに *Shizosaccharomyces pombe phk1/mak2, phk2/mak3* のオルソログ *phkA*、*phk3/mak1* のオルソログ *phkB*、それぞれについて遺伝子破壊の影響を解析した。

[結果] 1. *nikA* 破壊株 *N. crassa* の知見から、*A. nidulans nikA* 破壊株は高浸透圧感受性になると予想された。しかし、*nikA* 破壊株は高浸透圧感受性を示さず、むしろ低浸透圧条件下において生育と無性孢子形成が著しく遅延した。また、*N. crassa nik-1* 破壊株は、糸状菌特異的な農薬、イプロジオン、フルジオキソニルに対して耐性を示すが、*nikA* 破壊株はこれら薬剤存在下で、非存在下より良好な生育を示した。グリセロール代謝関連遺伝子の発現に与える *nikA* 破壊の影響については現在解析している。

2. *phkA*、*phkB* 破壊株 *S. pombe* において、HK 遺伝子は酸化ストレス応答や有性生殖に関与しているが、各 HK 遺伝子の単独破壊ではこれらの表現型に対する顕著な影響は見られない。同様に、*A. nidulans phkA*、*phkB* 破壊株も形態上顕著な表現型を示さなかった。

Physiological roles of histidine kinase genes, *nikA*, *phkA* and *phkB*, in *Aspergillus nidulans*.

Yoshihiro Matsubayashi, Yukari Yamazaki, Jyunichiro Marui, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi

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

P-18

糸状菌の Hog1 型 MAPK の活性はグループ III ヒスチジンキナーゼによって制御される

吉見啓¹、小島海平^{2,3}、高野義孝²、田中千尋¹ (京大院農・¹地環科・²応生物、³現・デューク大)

トウモロコシごま葉枯病菌のグループ III ヒスチジンキナーゼ (HK III) 遺伝子 *Dic1* 欠損株は、ジカルボキシイミド剤ならびにフェニルピロール剤高度耐性を示し、浸透圧感受性を併せ持つ。また、数種の糸状菌において、これらの殺菌剤が Hog1 型 MAPK を異常活性化させることが明らかになっている。我々は、HK III と HOG 経路との関係を明らかにするため、トウモロコシごま葉枯病菌の野生型株ならびに *Dic1* 欠損株を試して、本菌の Hog1 型 MAPK (BmHOG1) のリン酸化様式を解析した。まず、比較的低い浸透圧ストレスあるいは低濃度薬剤処理では、野生型株と比較して *Dic1* 欠損株における BmHOG1 のリン酸化は顕著に低下した。このことから、DIC1 は BmHOG1 の活性をポジティブに制御していることが明らかになった。一方、高浸透圧条件ならびに高濃度の薬剤処理では、*Dic1* 欠損株においても明確な BmHOG1 のリン酸化が認められた。したがって、本菌には DIC1 以外にも BmHOG1 の活性化を制御する因子が存在することが示唆された。さらに、アカパンカビの HK III である NIK1 (OS-1) と Hog1 型 MAPK である OS-2 の間にも類似した関係が認められたことから、一般に糸状菌の Hog1 型 MAPK の活性は、HK III によって制御されると考えられた。

Hog1-type MAPK activation is regulated by group III histidine kinase in filamentous fungi.

Akira Yoshimi¹, Kaihei Kojima^{2,3}, Yoshitaka Takano², Chihiro Tanaka¹

(^{1,2}Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., ³Present address: Duke Univ.)

P-19

アカパンカビのシグナル遺伝子 *ncSCD1*、*ncSCD2* の解析

川村真志, 一石昭彦 (東洋大・生命科学部)

S.pombe における Cdc42 依存的シグナル伝達経路は細胞の極性成長やアクチン構造形成など、細胞の形態形成を維持しており、GDP/GTP 交換因子である Scd1 と、Cdc42 結合蛋白質である Scd2 が Cdc42 タンパク質の調節に関与していることが知られている。

アカパンカビにおいても Scd1、Scd2 アミノ酸配列と相同性を示す遺伝子がゲノムデータベース上に存在し、それぞれを *ncSCD1*、*ncSCD2* とした。そしてそれら遺伝子がアカパンカビでどのような機能をしているのかを調べるために *ncSCD1*、*ncSCD2* 遺伝子を破壊してその表現型を調べた。

作成した遺伝子破壊株は菌糸の形状に異常を示し、また分生子を形成しないこと、雌性不稔などの表現型を示した。また、*ncSCD1*、*ncSCD2* 両遺伝子破壊株間の表現型は非常に良く似た特徴を示した。これらのことより、*ncSCD1*、*ncSCD2* はアカパンカビにおいても形態形成の調節に関与しており、さらに *ncSCD1*、*ncSCD2* は同一経路上で機能することが予想される。

Characterization of signaling gene *ncSCD1*, *ncSCD2* of *Neurospora crassa*

Masashi Kawamura, Akihiko Ichiishi

(Toyo Univ, Fac. Life Sciences)

P-20

adenylyl cyclase 突然変異を抑圧する突然変異体

茂泉幸太¹⁾, 河内征典¹⁾, 工藤愛子²⁾, 村山肇子¹⁾ 1) 関東学院大・工・物質生命科学科 2) 旭ガラス (株)

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* の形態異常の原因が adenylyl cyclase 遺伝子の突然変異によるものであることが報告されたが、*cr-1* の成長と形態異常を回復させる抑圧突然変異が高頻度で起こった。そのうちの 1 株 *hah* は protein kinaseA の regulatory subunit をコードする遺伝子 (*MCB*) の catalytic subunit との結合部位に起こった突然変異体であることが本研究室の工藤倫子、神崎誠一によって第 3 回コンファレンスで報告されたが今回は *hah* とは別の抑圧突然変異遺伝子 *wh* 及び *ah* について形態、連鎖群、温度感受性を調べたのでこれらについて報告する。さらに *ah* については原因遺伝子が *MCB* であり、*hah* とは異なる cAMP の結合部位に突然変異を持つことが分かったが、*wh* 突然変異体については原因遺伝子を探索中である。

Suppressor mutants which suppress adenylyl cyclase mutation

Kouta Moizumi¹⁾, Masanori Kawauchi¹⁾, Aiko Kudo²⁾, Tadaki Murayama¹⁾

1) Univ. of Kanto Gakuin

2) Asahi Glass co LTD

P-21

麹菌 *Aspergillus oryzae* は光に応答し分化を決定する

島山理広, 中濱智之, 樋口裕次郎, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】麹菌 *A. oryzae* は発酵産業上最も有用な微生物の一つであり、その酵素生産・分泌能の高さから異種タンパク質生産の分野においても重要な位置を占めている。さらに分子生物学的手法を用いた *A. oryzae* の遺伝子機能の解析などが広く行われている。しかしこれまで *A. oryzae* において、環境因子の一つである光照射の有無が生育や形態分化などに及ぼす影響に関する知見はほとんどない。そこで我々は野生株 RIB40 を用いて光照射の影響を調べた。

【方法と結果】Potato Dextrose プレート培養にて白色光照射の影響を生育や分生子形成について調べたところ、麹菌において初めて光照射下では無性世代の胞子である分生子がほとんど形成されないことが見出された。同じ糸状菌である *A. nidulans* においては光照射下では無性世代、非照射下では有性世代が誘導されることが分かっている。そこで *A. oryzae* と *A. nidulans* を比較したところ上述の記述を裏づけ、二つの糸状菌で逆の現象が起こることが示された。また、照射する光の波長による影響を調べるため、赤色光と青色光における表現型を調べた。その結果、赤色光においては、白色光とほぼ同一程度の表現型を示したのに対して、青色光照射においては極度の発芽阻害、生育阻害が確認された。これらの結果より、光の持つ様々な波長による異なったシグナルが麹菌の細胞内に伝わっていることが示唆された。

Light decides the differentiation in *Aspergillus oryzae*.

Rikou Hatakeyama, Tomoyuki Nakahama, Yujiro Higuchi, Manabu Arioka, and Katsuhiko Kitamoto (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-22

THE *smtA* GENE ENCODING A SAM METHYL TRANSFERASE IS REQUIRED FOR NORMAL DEVELOPMENT OF *ASPERGILLUS NIDULANS*

Kap-Hoon Han¹, Hyo-Jung Kim, Jee Hyun Kim, and Dong-Min Han (Div. Biol. Sci. Wonkwang Univ. Iksan, 570-749, Korea, ¹Dept. Pharm. Engin. Woosuk Univ. Wanju, 565-701, Korea)

The *smtA* (SAM Methyl Transferase) gene encodes a methyl transferase carrying an S-adenosylmethionin binding domain. The gene has 9 introns within an ORF consisted of 353 amino acids. The *smtA* gene in multi-copy can suppress various mutations such as *sndE80*, *silC188*, *silD6*, *silE181* and *silF174*, which are responsible for preferred sexual development even in the conditions favored for asexual development. Both sexual and asexual sporulations were reduced and delayed by *smtA* deletion mutation, even under the conditions where either of those developments was promoted. The mutant phenotypes suggest that the *smtA* gene is not essential for initiation of both sporulations. However, it is necessary for development in normal rate. The *smtA* gene was expressed in high level during vegetative growth and maintained upto the late stages of asexual and sexual development. The level of *smtA* mRNA was reduced in *veA* or *fluG* deletion mutant. The *veA* and the *fluG* deletion mutations were epistatic to *smtA* deletion mutation. These results suggest that *smtA* acts downstream of *veA* or *fluG* which is known as a positive regulator of sexual or asexual development, respectively. And also they support the suggestion that SmtA functions in both sexual and asexual development.

P-23

Aspergillus oryzae における *steA* ホモログの機能解析

森田寛人, 竹内道雄 (東京農工大院・生物学)

Aspergillus nidulans の *steA* 破壊株では有性胞子の形成が抑制されることから、*steA* は有性胞子の形成を制御する転写調節因子をコードする遺伝子として報告されている。 *A. oryzae* のゲノム解析の結果、有性世代を持たない *A. oryzae* から *steA* ホモログが見い出された。そこで、*A. oryzae* における *steA* ホモログの機能を調べるため、*steA* ホモログ過剰発現株と antisense mRNA 発現株を作製し、寒天平板培地、液体培地、小麦ふすま培地での表現型を観察した。その結果、どの培地においても *steA* ホモログ過剰発現株は WT に比べて菌糸の生育が遅いことが明らかになった。また、寒天平板培地においては分生子の形成も抑制されていた。この結果は、*A. nidulans* での報告と一致しており、有性世代のない *A. oryzae* でも同様の結果となることが明らかになった。さらに、液体、小麦ふすま培養時における分泌タンパク質の SDS-PAGE パターンを調べたところ、どの培地でも過剰発現株には特異的なバンドが確認できた。現在これらのバンドについて、ペプチドマスフingerprint法で解析中である。以上の結果から、*A. oryzae* の *steA* ホモログは菌糸の生育に関与し、さらに菌体外タンパク質の発現にも関与していることが示唆された。

Functional analysis of *steA* homolog in *Aspergillus oryzae*

Hiroto Morita, Michio Takeuchi

(Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

P-24

Sexuality and asexuality in *Aspergillus* species

Fabian A. Seymour¹, Mathieu Paoletti¹, Nanase Yamamoto², Praveen R. Juvvadi², Jun-ichi Maruyama², Katsuhiko Kitamoto², David B. Archer¹, Paul S. Dyer¹ (¹School of Biol., Univ. of Nottingham, UK, ²Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

The genus *Aspergillus* comprises species that reproduce by asexual and/or sexual means, and includes species with both homothallic (sexually self fertile) and heterothallic (obligate outbreeding) breeding systems. Thus they provide good model systems to study the evolution of sexual breeding systems and the molecular genetic basis of asexuality. In addition, the aspergilli include species of importance in the biotechnology, food production and medical sectors. Thus there are possible applied benefits to understanding the nature of reproduction in these species. We are investigating reproduction in the supposed 'asexual' species *A. fumigatus* (an opportunistic pathogen) and *A. oryzae* (used in the Asian food and biotechnology industries). A series of complementary genomic and experimental approaches have been used to investigate possible reasons for asexuality in these species. Genome analysis of both *A. fumigatus* and *A. oryzae* revealed the presence of a set of genes known to be involved with sexual reproduction in heterothallic filamentous ascomycetes. Isolates used in the genome sequence projects contained either a *MAT-2* high-mobility group gene or a *MAT-1* alpha-domain gene in *A. fumigatus* and *A. oryzae* respectively. Further experimental work identified the presence of sexually compatible *MAT-1* and *MAT-2* isolates of *A. fumigatus* and *A. oryzae* in a screen of laboratory isolates. Evidence for recombination was also gained in population genetic studies of *A. fumigatus*. Finally, expression of certain key genes involved with sexual reproduction (mating-type, pheromone precursor and pheromone receptor genes) was demonstrated for both species. Taken as a whole, these data suggest that both *A. fumigatus* and *A. oryzae* have a recent evolutionary history of sexuality, and might retain the capacity to undergo sexual reproduction.

P-25

黄麹菌生育菌体内プロテオームの解析

神太郎, グエン・コン・ハ, 竹内道雄 (東京農工大学・応用生物科学科)

前回、黄麹菌 *A.oryzae* RIB40 の分生子及び発芽分生子菌体内のプロテオームについて解析し、約300個のスポットを同定し、分生子では defense mechanism に属するタンパク質が増加または特異的に存在しており、発芽分生子では分生子に比べ metabolism 関連タンパク質が増加していることを報告した(平成16年コンファレンス)。黄麹菌は産業上重要な微生物であり、通常生育後期の菌体が麹として利用されている。そこで、今回、培養開始1,2,3日目の生育後期の菌体を用い、菌体内プロテオームについて解析を行った。培養には SP 液体培地を用いた。培養後回収した菌体を液体窒素存在下で破碎し、得られたタンパク質について二次元電気泳動を行った。その結果、生育後期では、分生子・発芽分生子の二次元電気泳動パターンとは明らかに異なっていた。明らかに生育後期で増加するスポット13個、減少または消滅するスポット13個について、麹菌データベースと MALDI-TOF-MASS を用いたペプチドマスフィンガープリント法により同定した。その結果、減少または消滅するスポットとして Heat shock protein、機能未知タンパクなどが認められた。一方、培養開始3日目の生育後期の菌体では代謝関連のタンパク質が増加し、同一のタンパク質が複数のスポットとして検出されることから修飾を受けていることが示唆された。生育菌体で増加した菌体内タンパク質は、塩切り麹の酵素として重要な役割を果たしているものと考えられた。

Proteome analysis of intracellular proteins from *A.oryzae* RIB40.

Taro Ko, Nguyen Cong Ha, Michio Takeuchi

(Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

P-26

糸状菌における APase 遺伝子の多様性

岡本綾子, 竹内道雄 (東京農工大学・農・応生科)

麹菌 (*Aspergillus oryzae* RIB40) のゲノム解析によって、ゲノム内には塩基配列から推定されるアミノ酸配列よりアスパルテックプロテアーゼ (APase) と考えられる遺伝子が多数存在することが明らかになった。これらの遺伝子が *A. oryzae* RIB40 株以外の *A. oryzae* 株に存在するのかを調べるため、*A. oryzae* RIB40 の APase 遺伝子全長をプローブとして *A. oryzae* 株4種類と *A. sojae* についてサザン解析を行った。その結果、他の *A. oryzae* 株や *A. sojae* にも *A. oryzae* RIB40 の持つ APase 遺伝子は存在していた。*A. oryzae* 株の APase 遺伝子は *A. oryzae* RIB40 の APase 遺伝子と同じ位置にバンドが出現した。しかし、*A. sojae* に存在する APase 遺伝子のうち7種類は *A. oryzae* RIB40 の APase 遺伝子とは異なる位置にバンドが出現した。さらに、*A. oryzae* RIB40 の APase 遺伝子のうち1種類は *A. sojae* でバンドが出現しなかった。また、配列がすでに報告されている *A. nidulans* についても同様にサザン解析を行った。その結果、*A. oryzae* には存在するが、*A. nidulans* には存在しない APase 遺伝子の存在が明らかになった。さらに、ゲノム配列が明らかになった糸状菌の APase 遺伝子についても *A. oryzae* における APase 遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列情報をもとに解析を行い APase の系統樹を作成した。その結果、糸状菌の APase は大きく4つのグループに分類できることが示唆された。

Diversity of APase genes from Filamentous fungi.

Ayako okamoto, Michio Takeuchi(Tokyo Univ.of Agriculture and Technology)

P-27

糸状菌 *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¹, 古川健太郎¹, 水谷治², 藤岡智則¹, 徳岡昌文², 五味勝也², 阿部敬悦¹ (東北大院農・¹応生科,²生物産業創生)

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、これまでに糸状菌 *Aspergillus nidulans* のスブチリシン様プロセッシング酵素遺伝子 *kexB* 破壊株 ($\Delta kexB$ 株) を用いたトランスクリプトーム解析を行ってきた。*A. nidulans* $\Delta kexB$ 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した。また、*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 Lys-Arg を導入し、異種タンパク質としてダニアレルゲン *Derf7* を連結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、 $\Delta kexB$ 株ではそのままの形で分泌された。興味深いことに、 $\Delta kexB$ 株を高浸透圧条件下で培養するとプロセッシング能力が復帰した。Lys-Arg を Ala-Ala に置換したところ、通常培地では、野生株・ $\Delta kexB$ 株共にプロセッシングを全く受けなかった。高浸透圧培地では僅かにプロセッシングが見られたが、Lys-Arg 体よりも少なかった。これらのことは、高浸透圧条件下でのみ働く *KexB* 様の基質特異性を持つプロセッシング酵素が存在することを示唆している。現在、我々は種々の方法を用い、このプロセッシング酵素の同定を試みているところである。

Characterization of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans kexB* disruptant.

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

P-28

糸状菌 *Aspergillus nidulans* における class III キチン分解酵素をコードする遺伝子の機能解析

山崎晴丈, 堀内裕之, 太田明德 (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り、その合成・分解は、*A. nidulans* の形態形成において厳密に制御されていると考えられている。*A. nidulans* のゲノムには、糖質分解酵素分類ファミリー18に属するキチン分解酵素をコードすると考えられる配列が18個存在し、そのうち3個が class III、15個が class V に属するキチン分解酵素遺伝子をコードしていると推定される。今回、class III キチン分解酵素をコードすると考えられる遺伝子 *chiA*、*chiH*、*chiR* について解析を行った。*chiA*、*chiH*、*chiR* の各単独破壊株、さらに *chiA*、*chiH* または *chiA*、*chiR* の二重破壊株では、野生型株と同様の生育を示した。しかし *chiH*、*chiR* の二重破壊株は取得できず、これら両遺伝子の欠失は致死である可能性が考えられた。そこで *chiR* の破壊株において、*chiH* の発現を *A. nidulans* において培地の炭素源により発現の制御可能な *alcA* プロモーターの支配下で抑制したところ、野生型株に比べ菌糸の生育に遅れが見られた。この株においてさらに *chiA* を破壊しても影響はなかった。これらのことから *chiH* と *chiR* は、*chiA* とは独立した互いに重複した機能を有しており、生育に重要な役割を果たしていることが示唆された。

Functional analysis of class III chitinase genes in *Aspergillus nidulans*

Harutake Yamazaki, Hiroyuki Horiuchi and Akinori Ohta

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

P-29

Aspergillus tamarii 由来の *niaD* 遺伝子の構造

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)

【目的】醤油粕は全国で年間約 10 万トンが醤油製造の副産物として排出されている。しかし、醤油粕は塩分を多量に含むため、その有効な処理方法が確立されていない。そこで、高分子多糖類分解酵素を生産する糸状菌を用いて、醤油粕を分解処理する事を考えた。最初に数株の麹菌より醤油粕上で生育できる *A. tamarii* ST-2 株を選抜した。次に形質転換によって多糖類分解酵素遺伝子を導入するために、本株の *niaD* 株を誘導した。得られた *A. tamarii* ST-2 *niaD* 株に *A. oryzae* の *niaD* 遺伝子を連結したプラスミドを導入したが、形質転換体を得ることは出来なかった。

そのため、本研究では形質転換マーカとして *A. tamarii* ST-2 株由来の *niaD* 遺伝子を分離し、その構造の解明を行った。

【方法及び結果】*A. oryzae* 及び近縁種の *niaD* 遺伝子の塩基配列に基づいて設計した PCR プライマーを用いて、*A. tamarii* ST-2 ゲノム DNA を鋳型にして degenerated PCR を行った。*niaD* ORF の N 末端及び、C 末端領域に相当するそれぞれ約 250bp の DNA 断片を取得した。これらの塩基配列は *A. oryzae* の *niaD* 遺伝子と 90% 以上の高い相同性を示した。そこで、これらの *A. tamarii* 由来の DNA フラグメントと *A. oryzae* *niaD* 遺伝子の塩基配列を基にプライマーを設計し、PCR によって増幅したところ、*A. tamarii* *niaD* の翻訳領域の全領域約 3kb、上流域約 0.4kb 及び、下流域約 0.9kb に相当する領域を取得できた。

A. tamarii と *A. oryzae* の翻訳領域の相同性は、塩基配列で約 91%、アミノ酸配列で約 98%であった。*A. tamarii* *niaD* の 3'非翻訳領域に典型的なポリ A 付加配列(AATAAA)は認められなかったが、類似した配列(AATATA,AATACA)が 2 カ所認められた。いくつかの酵母やカビでターミネーションシグナルとして報告されている配列(TACATTA, CATGTCTT)は 1 カ所(CATGTCTT のみ)認められた。

Structural analysis of *niaD* from *Aspergillus tamarii*

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

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

P-30

Insights into RIP and DNA methylation in the *Aspergillus* section *Flavi* complex Heather A.

Lee, Maria Dolores Montiel and David B. Archer (Institute of Genetics, School of Biology, University of Nottingham, University Park, Nottingham, NG7 2RD)

DNA methylation of cytosine is an epigenetic mechanism found in many eukaryotic genomes, with the dual roles of gene regulation and protection of the genome. Control and function of DNA methylation are still largely unknown in fungi and, apart from detailed work in *Ascobolus immersus* and *Neurospora crassa*, few studies have been conducted in other species. In *N. crassa* DNA methylation is involved in a process called Repeat-Induced Point Mutation (RIP), which acts at a precise stage in the sexual cycle, detecting sequence duplications and introducing C:G and T:A transitions leading to dense cytosine methylation. Recently RIP-like transitions have been reported in transposons in *Aspergillus nidulans* and *A. fumigatus*, but *Aspergillus* species were thought to be devoid of DNA methylation, although this has now been contradicted in work detecting methylation by HPLC for *A. flavus*. We isolated a transposase sequence from *A. parasiticus* using a DNA methyl-binding column. The sequence has 67% identity with *Tan 1* from *A. niger* and is present in at least 20 copies in the *A. oryzae* genome sequence database. Comparison of these copies indicates the presence of RIP-like transitions. The pattern was similar to RIP changes in *N. crassa* but was less dense. Although the original sequence was isolated from a methyl-binding column, no evidence of methylation was found by Southern Blotting. The preference for CpA to TpA changes could increase the introduction of termination codons (TAA and TAG) leading to gene inactivation by mutation alone. It is also possible that this light form of RIP is a source of genetic diversity.

P-31

麹菌の G タンパク質共役型 cAMP 受容体相同遺伝子

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)

細胞は様々な細胞外からの信号を受容し細胞内への信号伝達を行ない環境への適応を図っている。麹菌近縁種では、*Aspergillus nidulans* の研究により G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor: GPCR) の存在が明らかになったが、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、麹菌ゲノム中に 6 種の GPCR 様配列を見出し、そのうち cAMP 受容体相同配列が発現している事を確認した。また、*A. oryzae* RIB40 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR により本遺伝子を含む DNA 断片を取得した (2005 年度農芸化学会大会)。今回は、本遺伝子の 5' および 3' 末端配列を確認し、非翻訳領域配列も含めた全長 cDNA の取得とその全塩基配列を決定したので報告する。

G protein-coupled cAMP receptor homologue of *Aspergillus oryzae*

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

(Natl. Food Res. Inst.)

P-32

Dikaryon の分裂におけるクランプの意義

岡崎孝映, 丹羽修身 (かずさ DNA 研究所・染色体機能領域第一)

キノコは分裂ごとに dikaryon の 2 つの核をそれぞれ分配させるためにクランプと呼ばれる核が通るバイパスを形成する。我々は分裂酵母を用いて dikaryon の分裂機構を解析しているが、勿論クランプはない。クランプのないキノコもあり、その核分裂の様式は分裂酵母のとよく似ていた。分裂酵母 dikaryon の分裂では、最初 A,A,B,B と並んだ娘核が A,B,A,B の順に入れ替わるのを anaphase B 中程まで阻むものがある。それが互いの核そのものだとすると、分裂酵母はどうやってクランプも使わずに娘核同士が互いの障壁となるのを回避するのか。そう考えて解析してきたが、意外にも娘核の入れ替わりを阻むものは、実は細胞質分裂アクトミオシン収縮環の成熟チェック機能であった。現時点では、核どうしの物理的障壁を避ける機構がないとは言えないが、物理的障壁になっているという証拠もなくなった。クランプの役割は互いの核が物理的障壁となるのを回避することだという見方がされてきたが、本当にそうなのか。クランプが子囊菌類の crozier 構造に類似していることは以前から指摘されてきた。この構造は dikaryon が核融合する直前に 1 つの dikaryon と 2 つの monokaryon を生ずるものであるが、娘核どうしの物理的障壁を回避する意味があるとは思えない。2 つの monokaryon は再び接合して dikaryon となり、次の crozier を形成する。つまり crozier は接合によって 2 つの核の接合型がヘテロであることを確認する機能を果たしていると考えられる。クランプも同様に、分裂のたびに接合によって核がヘテロであることを確認するため (実際クランプ形成は接合型遺伝子がヘテロであることに依存している) の装置ではなかろうか。

Role of clamp connection for conjugate division of dikaryon

Koei Okazaki, Osami Niwa

(Kazusa DNA Research Institute)

P-33

smuH501*, a second mutation found in the original *uvsH77* mutant strain that involved in DNA replication checkpoint control in *Aspergillus nidulans

Mee-Jeong Cha, Sun-Hee Noh, Nak-Jung Kwon, and Suhn-Kee Chae (Dept. Biochem. and Biomed RRC, Paichai Univ. Daejeon, 302-735 Korea)

smuH (suppressor of mutagen-sensitivity of *uvsH77*) was originally isolated as a DNA fragment complementing partially the MMS-sensitivity of *uvsH77* mutant during the course of the *uvsH* gene (a yeast *RAD18* homolog) cloning in *A. nidulans*. $\Delta smuH$ as well as the original *uvsH77* mutant strain exhibited high sensitivities to camptothecin (CPT), a topoisomerase I inhibitor. However, during the analysis of meiotic progenies in *uvsH77* heterozygotic crosses, a second mutation causing high CPT-sensitivity was identified. The second mutation, called *smuH501* was shown to be a mutant allele of *smuH*. The mutation site was also identified in *smuH501*, changing the 56th lysine residue to a stop codon. Therefore, *smuH* was redefined as "Second Mutation in *uvsH77*". *smuH501* alone showed high CPT- but very slight MMS-sensitivities, while *uvsH77* without *smuH501* exhibited no CPT- and much reduced MMS-sensitivities than the original *uvsH77* mutant. Null mutants of *uvsH77* showed MMS-sensitivity similar to those shown in *uvsH77* (without *smuH501*), *uvsH304*, and *uvsH311* mutants. Synergistic interaction between *smuH* and *uvsH* was evident. In addition, *smuH501* showed synergistic interaction with *uvsF201* encoding replication factor C. SmuHp exhibited the amino acid sequence similarity to Tof1 of *S. cerevisiae* and Swi1 of *S. pombe*, which are involve in DNA replication checkpoint control.

P-34

蛍光タンパク標識を用いた *Aspergillus nidulans* タンパク質の細胞周期変動のライブイメージング：II型 topoisomerase を中心に

¹紅 朋浩, 川岸美佳, 菊池韶彦, ²Berl R. Oakley, ³堀尾哲也 (¹名古屋大院医系・分子標的, ²オハイオ州立大・分子遺伝, ³徳島大院・ヘルスバイオ)

II型 topoisomerase (topoII) はDNAの高次構造を調節・制御する酵素である。この酵素活性を阻害する薬剤は抗がん剤などに利用されているが、実際に細胞に対してどう作用しているかは不明な点が多い。また動物細胞では topoII が様々な局在変化を示すが、その理由もわかっていない。私達はこのタンパク質の機能を調べるのに *Aspergillus nidulans* が有効なのではないかと考え、まずその細胞内での挙動を知るため、蛍光タンパク標識を利用したライブイメージングにより、topoII とその他のタンパク質の局在を比較した。

A. nidulans FGSC4 株を用い、ゲノム上の topoII 遺伝子の C 末に GFP を組み込んだ株を作成した。多くの細胞が静止期の核と思われる GFP 蛍光を示す一方、分裂期と思われる細胞では、よりコンパクトに集積した様々な像が見られた。CFP 標識 histone H2A の共発現により、それらが核領域の局在であることが確認された。分裂期の挙動を連続観察したところ、分裂前には核全体に一樣に分布していた topoII-GFP が分裂期になると集合し始め、複数の小さな明るい蛍光が核内に見られるようになった。後期以降は集中していた蛍光が核領域全体へと急速に拡散した。以上から topoII は分裂期に著しい局在変化を示すことがわかった。

Cellular behavior of type II topoisomerase in *Aspergillus nidulans*: analysis with live cell imaging of proteins tagged with fluorescence proteins.

¹Tomohiro Akashi, ¹Mika Kawagishi, ¹Akihiko Kikuchi, ²Berl R. Oakley, ³Tetsuya Horio (¹Mol. Mycol. Med., Nagoya Univ. Grad. Sch.; ²Mol. Genet., Ohio St. Univ.; ³Health Bio., Tokushima Univ. Grad. Sch.)

P-35

シイタケ(*Lentinula edodes*)の β -1,3-グルカナーゼの解析

坂本裕一, 永井勝, 中出啓子, 佐藤利次 (岩手生工研)

シイタケ(*Lentinula edodes*)から抽出精製されているレンチナンは、シイタケの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 β -グルカナーゼにより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 β -グルカナーゼ遺伝子を単離し、コードされている酵素の精製を行った。*exg1* 遺伝子は、GHF5 に属する β -グルカナーゼであり、生長過程の柄に強い発現が認められた。しかし保存過程で発現が減少し、またレンチナン分解活性を持っていなかった。*exg2* 遺伝子は糸状菌類に特有の β -グルカナーゼとアミノ酸レベルで40%程度の相同性を示した。*exg2* 遺伝子は生長過程の柄で強い発現を示した。*exg1*, *exg2* 遺伝子ともに、柄の伸長に関わる可能性が示唆された。*exg2* 遺伝子は保存過程で発現が上昇し、ウェスタン解析においてもタンパク質レベルでの発現の上昇が確認された。また、精製した EXG2 はレンチナン分解活性を持っていた。*tlg1* 遺伝子は、PR5 ファミリーに分類される β -グルカナーゼ活性を持つ植物の抗菌タンパク質と、アミノ酸レベルで40%程度の相同性を示した。*tlg1* 遺伝子は新鮮な子実体では全く発現が認められず、保存過程の子実体で強い発現が認められた。また、ウェスタン解析においてもタンパク質レベルでの発現の上昇が確認された。精製した TLG1 は、レンチナン分解活性を持っており、EXG2 とともに保存過程でのレンチナン分解に関わるということが明らかになった。

Characterization of β -1,3-glucanases from *Lentinula edodes*

Yuichi Sakamoto, Masaru Nagai, Keiko, Nakade, Toshitsugu Sato

(Iwate Biotech. Res. Center)

P-36

シイタケの子実体形成過程において特異的に発現する遺伝子群の単離と解析

宮崎安将, 中村雅哉, 馬場崎勝彦 (森林総研)

最もポピュラーなきのこの一つシイタケ(*Lentinula edodes*)において、cDNA-RDA(cDNA-Representational Difference Analysis)法を改変した遺伝子サブトラクションを試みた結果、子実体形成過程において特異的に発現する105クローン(子実体原基51クローン、成熟子実体54クローン)の遺伝子cDNA断片の単離に成功した。これらのクローンの塩基配列を解析し予想されるアミノ酸配列についてデータベースを検索した結果、コードされる産物は一般的代謝、細胞構造、シグナル伝達、ストレス応答などに関わるタンパク質と高い相同性を示すことが明らかとなり、様々な代謝経路やシグナル伝達経路が子実体形成時に働くものと考えられた。一方、約半数のクローンはデータベース上の遺伝子及びタンパク質と全く相同性が見いだせなかったため、シイタケに特有な新規遺伝子であると考えられた。

これらクローンのうち、20個の遺伝子クローンについて子実体形成過程における転写発現パターンをRT-PCRにより調べた結果、子実体形成過程を通じて構成的に発現しているもの、胞子形成を行う成熟子実体中のみ発現しているもの及び子実体発生の初期段階である子実体原基のみ発現しているもの、の大きく分けて3パターンに分類することが出来た。これら遺伝子及びその産物タンパク質はシイタケの子実体形成過程において重要な役割を担っていると考えられた。これら遺伝子及び産物の機能を調べることにより、シイタケのみならずきのこ類全般の子実体形成のメカニズムの解明が期待される。

Molecular cloning of developmentally specific genes by representational difference analysis during the fruiting body formation in the basidiomycete *Lentinula edodes*

Yasumasa Miyazaki, Masaya Nakamura, Katsuhiko Babasaki

(Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI))

P-37

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が有する P450 遺伝子の発現プロファイリング

中村知恵¹、廣末慎嗣²、平塚宣博¹、山田修司³、親泊政二三³、有沢 章²、恒川 博²、割石博之¹

(¹九大院農、²メルシャン生資研、³JST 割石プロジェクト)

【緒言】近年、白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の全塩基配列が公開され、アノテーションの結果から 154 の P450 が存在することが示された。これまでに既知の P450 の他に、担子菌に独特な芳香族化合物分解に関与する P450 の存在が期待されている。さらに、水酸化反応などを触媒する P450 は、産業界でも好適な触媒ツールとなると考えられている。しかし、*P. chrysosporium* P450 の機能はほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、マイクロアレイ法を用い、標的化合物ごとに誘導的に発現する P450 の探索を試みた。

【手法および結果】*P. chrysosporium* 由来の完全長 cDNA 132 種をプローブとして用いた。HCLN 条件下で 3 日間培養後、種々の化合物を添加し、培養を継続した。所定時間後、得られた菌体から mRNA を抽出し、逆転写反応を行った。コントロール、化合物添加下より得られた cDNA をそれぞれ Cy3, Cy5 で蛍光ラベルしてマイクロアレイ解析を行った。その結果、ドデカノール添加・バニリン添加・安息香酸添加によりコントロールと比べて 2 倍以上の発現を示した P450 が数種見いだされた。現在、さらに詳細に解析を行っている。

Microarray profiling of cytochrome P450 gene expression in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*

Chie Nakamura¹, Shinji Hirose², Nobuhiro Hiratsuka¹, Shuji Yamada³, Masafumi Oyadomari³, Akira Arisawa²,

Hiroshi Tsunekawa², Hiroyuki Wariishi¹ (¹Faculty of Agriculture, Kyushu Univ., ²Bioresource Laboratories, Mercian Co. ³JST)

P-38

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* におけるセルロース分解酵素遺伝子発現応答に関する研究

鈴木一史、五十嵐圭日子、鮫島正浩（東大院・農生科）

木材腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* のセルロース分解における基質の認識機構は未だ不明な点が多い。これを明らかにするため、培地成分としての炭素源の種類や濃度、あるいは窒素濃度がセルロース分解に関連する酵素遺伝子の発現応答にどのように影響するかについて解析を行った。

P. chrysosporium を窒素濃度および炭素源の種類、濃度の異なる培地を用いて 3 日間培養し、菌体から mRNA を抽出し、RT-PCR により既知のセルロース分解関連酵素遺伝子の発現応答解析を行った。炭素源にはセルロース、グルコース、セロビオースをそれぞれ用いた。その結果、各遺伝子発現量の窒素濃度による差はほとんど見られなかった。一方、炭素源の種類および濃度の影響については、3 日間の培養では 0.02% のセロビオースにおいてほとんどの遺伝子発現が増加した。グルコースを炭素源として用いた培養系においても、低濃度のときに発現レベルが増加する遺伝子が多かった。次にグルコースを用いて 3 日間前培養した菌体を炭素源を含まない培地で 6 時間培養した。その後各糖を添加してさらに 6 時間培養し同様に発現応答を解析した。その結果、セロビオース濃度が高いときに発現量が増加する遺伝子が多く、またグルコース濃度が低いときにはグルコースによる発現抑制はみられずに発現量が増加し、濃度が高くなるにつれ発現量が減少する傾向がみられた。添加した糖が低濃度の場合ではセロビオースよりもグルコースを用いた場合に発現量の増加が著しかったことから、糖濃度が低いときにはグルコースがセルロース分解の引き金となる可能性が示唆された。

Analysis of gene expression involved in cellulose degradation by basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*

Hitoshi Suzuki, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima (Univ. of Tokyo)

P-39

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来トレハロース加リン酸分解酵素の機能解析

平石正男、五十嵐圭日子、鮫島正浩（東大院・農生科）

セルロースは地球上で最も豊富に存在するバイオマスであることから、付加価値の高い有用糖質への変換技術の開発が望まれている。本研究では、酵素を用いたセルロースのトレハロースへの変換を目指して、担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来トレハロース加リン酸分解酵素(TP)の機能を明らかにすることを目的とした。

P. chrysosporium のゲノムデータベースを利用して TP 様遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した。この遺伝子を用いて大腸菌を形質転換し、組換えタンパク質の生産および精製を行った。精製した組換えタンパク質をグルコースおよびグルコース 1-リン酸とインキュベートし、反応生成物を薄層クロマトグラフィー (TLC) によって解析した。

本実験でクローニングされた TP 様遺伝子は、グリコシルトランスフェラーゼグループ1のモチーフを持つ、糖転移酵素ファミリー4 に属するタンパク質をコードしていることが明らかになった。精製した組換えタンパク質を SDS-PAGE に供したところ、分子量 80kDa 付近に単一のバンドが確認された。また、TLC 分析の結果、トレハロース標品と同じ R_f 値を与えるスポットが確認できたことから、本遺伝子が *P. chrysosporium* 由来 TP をコードするものであることが明らかとなった。現在、組み換え TP の機能解析を行っている。

Characterization of a trehalose phosphorylase from the basidiomycete

Phanerochaete chrysosporium

Masao Hiraishi, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima (Univ. Tokyo)

P-40

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が生産する糖質加水分解酵素ファミリー74キシログルカナーゼの機能解析

石田卓也¹、加治佐平¹、五十嵐圭日子¹、矢追克郎²、日吉あや子²、三石 安²、鮫島正浩¹

(¹東大院・農生科、²産総研)

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* は、植物細胞壁を構成する多糖を分解する過程で様々な糖質加水分解酵素 (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、それらのうち酵素学的なキャラクタライズが行われたものはわずかであり、多くの菌体外 GH の機能が未知のままである。そこで我々は、ゲノム情報を利用して、細胞壁多糖分解過程で生産される菌体外タンパク質のプロテオーム解析を行い、その過程で本菌がセルロース培養系において GH ファミリー74 に属する未知タンパク質を生産していることを明らかにしてきた。そこで本研究では、GH ファミリー74 に属する酵素をコードする cDNA の塩基配列を決定するとともに、メタノール資化性酵母を用いて組換え酵素を生産し、本菌由来の GH ファミリー74 に属する酵素のキャラクタライズを行った。発現させた組換え酵素をタマリンド由来のキシログルカンに作用させたところ、キシログルカンオリゴ糖を生成物として与えたことから、本菌由来の GH ファミリー74 に属する酵素がキシログルカナーゼであることが明らかとなった。現在、様々な基質を用いて本酵素の反応性を調べている。

Characterization of the glycoside hydrolase family 74 xyloglucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*

Takuya Ishida¹, Taira Kajisa¹, Kiyohiko Igarashi¹, Katsuro Yaoi², Ayako Hiyoshi², Yasushi Mitsui², Masahiro Samejima¹ (¹Univ. of Tokyo, ²AIST)

P-41

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が生産する

糖質加水分解酵素ファミリー1に属する β -グルコシダーゼの機能解析

塚田剛士¹、二十軒悠里¹、吉田誠²、伏信進矢¹、五十嵐圭日子¹、鮫島正浩¹ (¹東大院・農生科、²食総研)

セルロースの酵素糖化は、セルラーゼによって切り出されてきたセロビオースやセロオリゴ糖を、 β -グルコシダーゼ (BGL) がグルコースへと変換することで行われる。これまでセルラーゼについては多くの研究が為されているのに対し、 β -グルコシダーゼ (BGL) については研究例が少なく、効率的な BGL は得られていない。本研究では、担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が生産する糖質加水分解酵素ファミリー (GHF) 3 に分類される BGL (BGL3) を調べてきたが、この BGL はセロビオースに対する反応性が乏しいことが明らかとなっている。*P. chrysosporium* ゲノム情報によると、GHF1 に属する BGL 様遺伝子が2つ存在することが明らかとなっているため、本研究ではそれらの遺伝子がコードする cDNA をクローニングし、異種発現系により組換え体として生産し機能解析を行った。

本研究でクローニングされた2つの cDNA がコードしているタンパク質 (BGL1A、BGL1B) の推定アミノ酸配列を解析した結果、両者は65%の相同性を示したことから互いに類似した構造を有する可能性が示唆された。両 BGL の pH 依存性を測定したところ、どちらも pH6.5 で最大活性を示したが、興味深いことに、BGL1B は酸性側でほとんど活性を示さなかったのに対して、BGL1A は pH4.0 においても最大活性の50%以上の活性を保持することが明らかとなった。さらに、セロビオースに対する反応速度パラメータを算出したところ、BGL1B は BGL1A や BGL3 と比較してセロビオースに対する親和性が高く、最も高い触媒効率を示したことから、BGL1B がセルロースの糖化に適した酵素であることが示唆された。

Characterization of glycoside hydrolase family 1 β -glucosidases from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*

Takeshi Tsukada¹, Yuri Nijikken¹, Makoto Yoshida^{1,2}, Shinya Fushinobu¹, Kiyohiko Igarashi¹, Masahiro Samejima¹

(¹Univ. of Tokyo, ²Natl. Food Res. Inst)

P-42

DNA の非特異的増幅を利用した木材腐朽菌の高感度検出

和田朋子, 加治佐平, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)

木材腐朽菌は木質構造物の強度劣化を引き起こし、地震による木質住宅の破損や倒壊の大きな原因のひとつとされていることから、住環境における木材腐朽菌の動態をモニタリングしていくことは、木質住宅の維持管理のために重要な課題と言える。木材腐朽菌の多くは担子菌に分類されるが、これまでは、腐朽材から採取した菌を培養し、その形態を観察することで菌の同定を行ってきた。しかしながら、この手法は未知の有害菌を培養してしまう危険性や操作の煩雑さが指摘されている。そこで最近になって、担子菌の検出と同定を目的として、rDNA の ITS 領域を PCR によって増幅する手法が開発されたが、木材に含まれる成分が PCR を阻害したり、鋳型 DNA を得るために多量のサンプルを必要とするため、現実的なモニタリング法としては問題がある。そこで本研究では、Phi29 DNA ポリメラーゼとランダムヘキサマーを用いた DNA 増幅法を既存の方法に組み合わせることで、微量サンプルからの菌株同定と比較定量を可能とする手法の開発を試みた。

各種糸状菌の菌糸をバッファー中で破碎した後、サンプル中の全ての DNA を上記の方法により増幅した。次に、得られた DNA を鋳型として、rDNA の ITS 領域を増幅するための糸状菌に特異的なプライマー、および担子菌に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、子囊菌と担子菌が分離できることを確認した。さらに、複数種の菌を様々な比率に混合したサンプルを用いて同様の手順で PCR を行ったところ、それぞれの菌由来の ITS 領域がサンプル中の菌の混合比を反映しながら増幅した。以上の結果から、微量の腐朽木材試験体を実験に供した場合でも、腐朽菌の存在確認およびその同定、さらに比較定量できることが明らかとなった。

Sensitive detection of wood-rotting fungi using non-specific amplification of DNA

Tomoko Wada, Taira Kajisa, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima (Univ. of Tokyo)

P-43

麹菌における新規の糖鎖関連活性タンパクの探索

玉野孝一, 寺林靖宣, 佐藤友紀, 堀越江美*, 砂川美佐緒, 山根倫子, 町田雅之 (産総研・生物機能, *日大・生産工学)

麹菌が生産するタンパクの中で糖鎖に対して分解あるいは結合の活性を有する新規の産業上有用なタンパクの探索を行っている。新規タンパクの探索は製品評価技術基盤機構(NITE)との共同研究で産学官連携のコンソーシアムにおいて行われた麹菌のゲノム解析の結果に対するホモロジー解析により行った。その結果、二種類の新規のグルカナーゼ候補遺伝子と四種類の新規のレクチン候補遺伝子とを見つけ出した。これらの遺伝子の cDNA を麹菌より作製した cDNA ライブラリーより PCR にて増幅を行った。その結果、これらの遺伝子はゲノム解析で予測されたものとほぼ同じ大きさで増幅された。増幅された遺伝子の制限酵素処理後の生成 DNA 断片のアガロースゲル電気泳動でのバンドパターンの解析により、各遺伝子のスプライシング部位もゲノム解析で予測されたものとほぼ同じであることが示唆された。

次に、これらの増幅した各 cDNA を大腸菌大量発現ベクターである pET21b に 6×His タグが付加された融合タンパクとして発現されるようにクローニングして、大腸菌において大量発現を試みた。その結果、一種類のグルカナーゼ候補と一種類のレクチン候補の発現が確認された。今後、発現の認められたタンパクに関してニッケルカラムにて精製後、活性測定、基質特異性・耐熱性などの機能解析および諸性質の検討を行う予定である。

Expression and characterization of novel proteins of *Aspergillus oryzae* that have activities for degradation of or binding to carbohydrate chains

Koichi Tamano, Yasunobu Terabayashi, Yuki Satou, Emi Horikoshi*, Misao Sunagawa, Noriko Yamane, Masayuki Machida (AIST, *Nihon Univ.)

P-44

A. oryzae における N-結合型糖鎖と相互作用するタンパク質のスクリーニング

丸山潤一¹, 松尾一郎², 伊藤幸成², 北本勝ひこ¹ (¹東大院農生科・応生工, ²理研)

麹菌 *A. oryzae* は大量のタンパク質を培地中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。しかし、*A. oryzae* を始めとした糸状菌では分泌経路でタンパク質が受ける品質管理および選別機構についての研究は限られている。一般に、小胞体ではフォールディング不全のタンパク質が品質管理機構により分解されるが、最近この過程での N-結合型糖鎖の役割が酵母や動物で明らかになりつつある。本研究では糸状菌における N-結合型糖鎖の機能解明を目的として、この糖鎖と相互作用するタンパク質のスクリーニングを行った。

A. oryzae の菌体抽出物から遠心分離により、小胞体シャペロン BipA を指標に小胞体を含む膜画分を調製した。N-結合型糖鎖のひとつ $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ を固定化したビーズとインキュベートした結果、溶出画分に約 70 kDa のタンパク質が特異的に検出された。これをトリプシンにより消化し、生じたペプチド断片を LC/MS/MS により解析した。得られたペプチドの分子量および内部アミノ酸配列をもとに、*A. oryzae* ゲノムデータベースを検索したところ、小胞体シャペロンであるカルネキシンのデータと有意に一致した。カルネキシンが $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ と結合することはこれまでに報告されていることから、本研究の実験系が有効であることが確認された。現在、N-結合型糖鎖と相互作用する他のタンパク質のスクリーニングを行っている。

Screening for proteins that associate with N-glycan from *A. oryzae*

Jun-ichi Maruyama¹, Ichiro Matsuo², Yukishige Ito², Katsuhiko Kitamoto¹

(¹Dept of Biotechnology, Univ of Tokyo, ²RIKEN)

P-45

麹菌 *A. oryzae* における ER-Golgi 体間の輸送に関わる SNARE の局在解析

田浦綾子, 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】 *A. oryzae* はアミラーゼ、プロテアーゼなどのタンパク質を大量に分泌する能力を持つが、細胞内小胞輸送に関する分子レベルでの知見は少ない。優れた分泌能力を有する *A. oryzae* において分泌経路の研究は応用面でも重要であり、これを理解するためにはその最初のステップの小胞輸送に関する知見の蓄積が役立つと考えた。そこで、小胞輸送を仲介する SNARE のうち、特に ER-Golgi 体間で働くものに注目した。

【方法及び結果】 *S. cerevisiae* において ER-Golgi 体間で働くと考えられる SNARE の、*A. oryzae* におけるホモログをコードする遺伝子 7 個 (*Aobet1*, *Aobos1*, *Aosec22*, *Aoufe1*, *Aosec20*, *Aouse1*, *Aogos1*) を単離した。各遺伝子について、MultiSite Gateway™ Cloning System を用いて *amyB* プロモーター下で *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) を構築し、これらを用いて形質転換を行った。取得した株の顕微鏡観察を行い、これらの SNARE の局在部位をオルガネラ染色試薬との共染色によって同定したところ、*A. oryzae* においても *S. cerevisiae* と同様の局在を示すことが示唆された。以上の結果により、今後これらの SNARE を各オルガネラのマーカーとして使用するなど、*A. oryzae* における ER-Golgi 体間の輸送解析に適用することができると考えられる。

Localization analysis of SNARE proteins that function between ER and Golgi compartments in *A. oryzae*

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

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

P-46

麹菌 *A. oryzae* における post-Golgi 輸送に関わる SNARE の局在解析

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】我々はこれまで *A. oryzae* において ER、Golgi 体、液胞に局在するタンパク質と EGFP との融合タンパク質を発現させることにより、それらのオルガネラの可視化を行ってきた。しかし、Golgi 体以降のオルガネラの空間的分布に関する細胞生理学的な知見は多くない。そこで、各オルガネラに局在し、輸送小胞と標的オルガネラ膜の結合及び融合の特異性を担う SNARE タンパク質に注目した。本研究では、*S. cerevisiae* の SNARE タンパク質の配列を基に *A. oryzae* のゲノム情報から 21 個の SNARE を推定し、その中から post-Golgi の輸送に関わると予想されるものについて局在解析を行った。

【方法及び結果】推定 SNARE タンパク質をコードする遺伝子 12 個 (*Aosft1*, *Aoykt6*, *Aovt1*, *Aotlg1*, *Aotlg2*, *Aosyn8*, *Aonyv1*, *Aovam7*, *Aosso1*, *Aosso2*, *Aosec9*, *Aosnc1*) について、*egfp* との融合遺伝子を発現するベクターを田浦らと同様の方法で構築した。これらを用いて形質転換を行い、各 SNARE タンパク質の可視化を行った。EGFP 蛍光の観察と細胞染色の結果から、12 個の推定 SNARE タンパク質は *S. cerevisiae* とほぼ同様のオルガネラに局在することが示唆された。また各オルガネラについて、Golgi 体は菌糸先端に多く存在し、late endosome/PVC は液胞に近接して存在する、それぞれ点状の構造体として細胞内に分布することが示唆された。

Localization analysis of SNARE proteins that function in post-Golgi transport in *A. oryzae*

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

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

P-47

麴菌 *A. oryzae* における接合フェロモン前駆体遺伝子 *AoppG* の機能解析

山本七瀬、JUVVADI Praveen Rao、丸山潤一、北本勝ひこ（東大院農生科・応生工）

【目的】麴菌 *A. oryzae* はこれまでに有性世代が確認されていないものの、ゲノム中には多くの接合関連遺伝子の相同遺伝子が存在する。その一つである α -フェロモン前駆体遺伝子 *AoppG* は、有性世代の確認されている糸状菌において、接合相手の認識や受精後の核融合において重要な働きをしていると考えられている。しかし、有性世代の知られていない糸状菌における機能は未知である。そのため不完全菌類と考えられている麴菌において、接合フェロモンの新たな機能の解明を目指して解析を行った。

【方法及び結果】 α -フェロモンの機能を探索するため、 α -フェロモン受容体の相同遺伝子 *AogprA* を単離した。*AoGprA* は 369 アミノ酸よりなり、7 回膜貫通領域をもつ三量体 G タンパク質共役型受容体である。他の *Aspergillus* 属の α -フェロモン受容体遺伝子と比較するとタンパク質レベルで約 50% の相同性を示した。RT-PCR 解析により、*AoppG*、*AogprA* 遺伝子はともに発現していること、また炭素源枯渇およびアルカリ条件下で発現の上昇することが認められた。*AoppG*、*AogprA* 遺伝子高発現株、および破壊株を作製し、生育速度、分生子数、形態における表現型の解析を行っている。

Functional analysis of alpha-pheromone precursor *AoppG* in *Aspergillus oryzae*

Nanase Yamamoto, JUVVADI Praveen Rao, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto

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

P-48

プロテアーゼ遺伝子破壊による麴菌 *A. oryzae* を用いたヒトリゾチーム生産量の増加

渡辺泰祐、金鋒杰、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】タンパク質高分泌能を有する麴菌 *A. oryzae* は、異種タンパク質生産の宿主として注目されている。しかしこれまでに、*A. oryzae* においてプロテアーゼ遺伝子破壊により異種タンパク質の生産量が増加したという報告はない。演者らは、ヒトリゾチーム生産を α -アミラーゼ (*AmyB*) をキャリアーとして行い、5×DPY 液体培地 (pH 8.0) において最大 15.6 mg/L の生産量を得ている¹⁾。今回は、5 種のプロテアーゼ遺伝子 (*pepA*, *pepE*, *alpA*, *tppA*, *palB*) の一重および二重の破壊株について、ヒトリゾチーム生産への効果を検討した。

【方法と結果】5 種類のプロテアーゼ遺伝子破壊株のヒトリゾチーム生産性を 5×DPY 液体培地 (pH 8.0) において比較した。その結果、 $\Delta tppA$, $\Delta palB$, $\Delta pepE$, $\Delta alpA$, $\Delta pepA$ の順に遺伝子破壊の効果が認められ、なかでも $\Delta tppA$ 株の生産量は 21.2 mg/L を示した。さらに、 $\Delta palB$ 株および $\Delta pepE$ 株に対して *argB* を選択マーカーとして *tppA* 遺伝子を破壊することにより、プロテアーゼ遺伝子二重破壊株を作製した。これらの株を用いてヒトリゾチーム生産を行ったところ、 $\Delta tppA \Delta pepE$ 二重破壊株において最も高い生産量 (25.4 mg/L) が得られた。以上の結果から、*A. oryzae* を用いたヒトリゾチーム生産において、プロテアーゼ遺伝子の二重破壊を行うことにより約 1.6 倍の生産量の増加に成功した。

1) 金ら、第 4 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p. 39

Higher-level production of human lysozyme by protease gene disruption in *A. oryzae*

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

P-49

麹菌 *A. oryzae* における 2 つの分泌型ホスホリパーゼ A₂ の抗体を用いた局在解析と RT-PCR による発現解析

中濱智之, 北本勝ひこ, 有岡 学 (東大院・農生科・応生工)

【目的】分泌型ホスホリパーゼ A₂ (sPLA₂) はグリセロリン脂質の 2 位のエステル結合を加水分解し、脂肪酸とリソ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】これまでに高発現株における PLA₂ 活性の分布を調べた結果から、SpaA が主に培地中に分泌されるのに対し、SpaB は予想シグナル配列を持つにも関わらず分泌されず菌体画分に局在することが示唆されている。今回、組換え SpaA および SpaB タンパク質を抗原として各々のタンパク質に特異的なポリクローナル抗体を作製し、より詳細な検討を行った。ウエスタンブロットにより高発現株の培養上清画分と菌体画分を解析したところ、上述の結果と一致して SpaA が培養上清に、SpaB が菌体画分に存在することがわかった。このことから両タンパク質が異なる局在を示すことが証明された。現在、間接蛍光抗体法による観察を行ない、両タンパク質、特に SpaB の細胞内における局在をさらに調べている。また、麹菌を様々な条件で培養し、各遺伝子の発現を RT-PCR 法によって検出した。その結果、*spaA* はノザン解析によってすでに明らかにされていた炭素源枯渇条件における発現に加えて、窒素源の枯渇とアルカリ条件によって、また *spaB* は 4℃ という低温条件において発現することが分かった。これらの情報を元にこれまでに取得している *spaA*、*spaB* 単独、および *spaA/spaB* 二重破壊株の表現型を探索することで、それぞれの酵素の生理的な機能を同定できると期待している。

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

Tomoyuki Nakahama, katsuhiko Kitamoto, and Manabu Arioka (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-50

麹菌 *A. oryzae* を用いたトラフグ・パフレクチンの生産

笹栗志保, 馬橋由佳, 丸山潤一, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

演者らは、トラフグ由来のレクチンであるパフレクチンを、N 末にキャリアーとして α -アミラーゼ (AmyB)、C 末に検出および精製のタグとして HA-His₆ と融合して生産を行った。またこの際に、Kex2 様プロテアーゼ認識配列を AmyB との連結部位に導入した。このようにして取得したパフレクチン生産株の培地上清について HA 抗体を用いウエスタン解析を行ったところ、目的の約 16 kDa の生産物が確認されたが、AmyB との融合タンパク質も検出された。そこで、今回は、パフレクチンと Kex2 様プロテアーゼ認識配列の間に、グリシンを 3 残基挿入したコンストラクトを作成し、麹菌に導入した。得られた株の培地上清には、融合タンパク質は見られず、パフレクチンのみが確認された。さらに、ニッケルカラムを用い His₆ タグを有するタンパク質を精製したところ、精製画分には目的のサイズのものの他に HA 抗体では認識されないやや小さめの生産物も検出された。N 末シークエンスの結果、両タンパク質ともパフレクチンの上流に挿入した 3 つのグリシンから始まるアミノ酸配列をもっていたことから、小さなタンパク質はタグを含む C 末端が欠失したものと考えられた。これらの結果は、HA-His₆ タグ配列を認識するペプチダーゼの存在が予想されたので、C 末端の分解を防ぐためにタグの配列を改変したコンストラクトを作成し、パフレクチンの生産を試みている。

Production of *Takifugu rubripes* puflectin by *A. oryzae*.

Shiho Sasaguri, Yuka Mabashi, Jun-ichi Maruyama, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto (Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

P-51

麹菌 *A. oryzae* における *Aovps24* (class E *vps*) 遺伝子の単離と解析

辰巳晶紀, 菊間隆志, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

<目的>*VPS* (vacuolar protein sorting) 遺伝子は出芽酵母 *S. cerevisiae* において液胞酵素 carboxypeptidase Y (CPY) を細胞外に分泌する変異に関する遺伝子であり、タンパク質輸送機構や液胞機能などに関与することが知られている。また近年、後期エンドソームから液胞への輸送を司る multivesicular body (MVB) の形成に関わるタンパク質が、アルカリ pH 応答を制御する Rim101 経路にも関与することが報告されている。我が国で日本酒や味噌の醸造に用いられている麹菌において、タンパク質の輸送経路や液胞機能、pH 応答の解明は重要であると考えられる。そこで、MVB 形成に関わる class E *vps* 遺伝子の中の 1 つである *Aovps24* 遺伝子の機能解析を行った。

<方法及び結果>*A. oryzae* のゲノムデータベースを基に *VPS24* と相同性の高い遺伝子 (*Aovps24*) を単離した。*Aovps24* は 1 つのイントロンを含み、228 個のアミノ酸からなるタンパク質をコードすると推定された。*AoVps24* は *S. cerevisiae*, *S. pombe* の *Vps24* とそれぞれ 34.1%、30.7% のアミノ酸相同性を示した。*AoVps24* の機能を調べるため、同遺伝子の破壊株を作成した。得られた破壊株は著しい生育阻害を示し、菌糸先端の多分岐や膨潤といった形態異常も見られた。また分生子形成も見られなかった。これらのことから、*AoVps24* が多面的な機能を持ち、糸状菌における液胞輸送タンパク質が形態形成や分化にも関与することが示唆された。現在 *A. oryzae* における MVB に関わるタンパク質についてのさらなる知見を求め、*Aovps2*、*Aovps4* の破壊株を作成中である。さらに *AoVps24* と EGFP の融合タンパク質の発現により相補実験及び細胞内局在解析を行っている。また pH 応答に関しての *AoVps24* の機能を解析中である。

Cloning and functional analysis of *Aovps24* (class E *vps*) gene from *A. oryzae*

Akinori Tatsumi, Takashi Kikuma, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

P-52

麹菌 *A. oryzae* の III 型ポリケタイド合成酵素遺伝子の発現と機能解析

勢ヶ康代¹, 藤井 勲², Praveen Rao Juvvadi¹, 海老塚豊², 北本勝ひこ¹

(¹東大院・農生科・応生工, ²東大院・薬)

【目的】III 型ポリケタイド合成酵素 (PKS) としては、植物のカルコン合成酵素やスチルベン合成酵素が知られていたが、近年、バクテリアからも芳香族合成酵素が見出され、その触媒する反応の多様性から、現在、非常に注目されている。我々はこれまでに、麹菌 *A. oryzae* のゲノム中に糸状菌の III 型 PKS 遺伝子として初めての例となる 4 つの遺伝子 (*csyA*, *csyB*, *csyC* および *csyD*) を見出し、*csyA*, *B*, *D* の 3 遺伝子が *A. oryzae* で発現していることを確認している。本研究では、これら遺伝子の機能を解明するため、麹菌 *A. oryzae* を宿主とした各遺伝子高発現株および破壊株の作製を行い、生産化合物の解析、ならびに大腸菌による組換えタンパクの発現と機能解析を試みた。

【方法および結果】*csyA*, *csyB*, *csyC* および *csyD* 遺伝子について、麹菌 *A. oryzae* を宿主とした高発現株および破壊株の作製を行った。*csyA* 遺伝子高発現株において、コントロールの形質転換体には見られない色素の生産が認められた。培養上清を LC/MS で分析した結果、培養日数によって異なる極性・推定分子量の化合物のピークが認められることから、*CsyA* の生合成化合物は誘導体化されているものと予想された。また、RACE 法および遺伝子強制発現株を用いて cDNA を取得し、大腸菌を宿主として *CsyA*, *CsyB* および *CsyC* 各組換えタンパクを調製した。現在、組換えタンパクを用いて *in vitro* での活性確認を進めている。

Expression and functional analysis of type III polyketide synthase genes from *Aspergillus oryzae*

Yasuyo Seshime¹, Isao Fujii², Praveen Rao Juvvadi¹, Yutaka Ebizuka², Katsuhiko Kitamoto¹

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

P-53

Penicillium luteo-aurantium の新規ポリケタイド合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析

佐野裕基、石井絵美、藤井 勲、海老塚豊 (東大院・薬)

細胞周期の停止作用など様々な生物活性を示すラディシコールは、そのマクロラクトン構造からポリケタイドと考えられるが、未だ生合成遺伝子は同定されていない。そこで、ラディシコール生産菌である *Penicillium luteo-aurantium* より新規ポリケタイド合成酵素 (PKS) 遺伝子のクローニングを試みた。まず、既知の糸状菌 PKS 遺伝子の縮合酵素 KS ドメインとアシル基転移酵素 AT ドメイン間でよく保存されているアミノ酸配列をもとに PCR プライマーをデザインし、PKS 断片の増幅を行った。T-ベクターにサブクローニング後、配列決定したところ、3種の異なる PKS 断片が確認された。そこで、各 PKS 断片からゲノムウォーキングし、全長塩基配列を決定した。*pla-1* のコードする PKS は全長 2332 aa で、ケト還元酵素 KR ドメインをもつことから、還元型 PKS と考えられた。*pla-5* は還元型 PKS の C 末に更に非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS) が繋がった PKS/NRPS ハイブリッド酵素 (全長 5270 aa) をコードする遺伝子と考えられた。また、*pla-12* は全長 2049 aa の芳香族型 PKS をコードするものと考えられた。*pla-1* について、その機能を確認するため、全長遺伝子を Gateway 法を用いて糸状菌用発現ベクター pTAex3R に導入した。構築した発現プラスミド pHS001 で *Aspergillus oryzae* を形質転換し、誘導培養後、生産化合物の HPLC 分析を行った。その結果、培養液中に、コントロールの形質転換体には見られない特異的なピークが検出され、現在、この化合物の単離条件について検討中である。また、他の PKS 遺伝子についても、発現プラスミドの構築を進めている。

Cloning and functional analysis of novel PKS genes from *Penicillium luteo-aurantium*

Hiroki Sano, Emi Ishii, Isao Fujii, Yutaka Ebizuka

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

P-54

糸状菌芳香族ポリケタイド合成酵素のクライゼンサイクラーゼドメイン

宮崎 俊、藤井 勲、海老塚 豊 (東大院・薬)

糸状菌 *Aspergillus fumigatus* のメラニン生合成に関わるポリケタイド合成酵素 (PKS) である Alb1p はヘプタケタイドであるナフトピロン化合物 YWA1 を生成する。同じく YWA1 の合成酵素である *Aspergillus nidulans* の WA において、その C 末領域がクライゼン型の反応により YWA1 の 2 環目の閉環を触媒するドメインであることを先に報告したが、今回、Alb1p の酵母発現系を構築し、これを用いてクライゼンサイクラーゼ (CYC) ドメインの機能解析を試みたので報告する。まず、*alb1* cDNA を酵母発現ベクター pYES-DEST52 に導入し、発現プラスミド pYES-albY を構築した。これをホスホパンテテイン転移酵素 NPGA とともに酵母で共発現させることにより、YWA1 が生産されることを確認した。一方、Alb1p から CYC ドメインを欠失させた変異体 Cd-3 では、ヘプタケタイド中間体の 2 環目のクライゼン環化反応が進行せず、イソクマリン体 DHCI が生産された。そこで、CYC ドメイン遺伝子と Cd-3 遺伝子をそれぞれ異なるベクターに導入し、二種の発現プラスミドを構築し、共に同一の酵母で共発現させたところ、全長 Alb1p と同様に、YWA1 が生成する事を確認した。この結果は、CYC ドメインが独立した酵素として Cd-3 上のヘプタケタイド中間体に働き、クライゼン環化反応を触媒したことを示している。現在、他の糸状菌芳香族 PKS の CYC ドメインが同様に機能するかどうかを確認するため、*Phoma* BAUA2861 株のノナケタイド PKS である PNK2、及び、*Colletotrichum lagenarium* のペンタケタイド PKS である PKS1 について、それぞれ CYC ドメインの発現プラスミドを構築し、Cd-3 と共発現させる事により、ヘプタケタイド中間体のクライゼン環化酵素として機能して YWA1 が生産されるかどうかを検討している。また、Alb1p の CYC ドメインの大腸菌での発現、精製についても検討中である。

Studies on the Claisen cyclase domains of fungal aromatic polyketide synthases

Shun Miyazaki, Isao Fujii, Yutaka Ebizuka

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

P-55

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* 型である。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、そ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 よりクローニングした MSAS 遺伝子 *atX* (*Mol. Gen. Genet.* **253** 1-10(1996)) を *Bacillus subtilis* のホスホパンテテイン転移酵素 Sfp とともに酵母を宿主として発現させ、6MSA の生産により ATX が酵母において機能することを確認した。一方、全長 ATX の N 末側縮合酵素ドメインの一部まで、また C 末側の 9 アミノ酸をそれぞれ人為的に欠失させた ATX 変異体は完全に機能を失い、6MSA の生産はみられなかった。ところが、単独では不活性な N 末欠失体と C 末欠失体を酵母において共発現させたところ、形質転換体は 6MSA を生産し、その 6MSA 生産性は全長形質転換体の約 1/20 であった。この結果は、N 末の欠失により不活性となった縮合酵素ドメインをもつサブユニット、および、C 末端の欠失により不活性となったアシルキャリアープロテインをもつサブユニットが相互作用することにより、ATX の 6MSA 合成触媒機能が再構成されたものと考えられ、ATX の活性中心が少なくとも 2 つのサブユニットの機能ドメインにより構成されていることを示している。現在、より詳細なサブユニット-ドメイン間の相互作用について検討中である。

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-56

糸状菌 *A. nidulans* アミラーゼ遺伝子群の発現プロファイリング

中村貴, 牧田智裕, 加藤雅士, 小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)

Aspergillus 属におけるアミラーゼ遺伝子群の発現は、基質であるデンプンやその分解産物マルトースなどにより誘導される。これまでに、*A. nidulans* において *agdA*、*agdB* や *amyB* などのアミラーゼ遺伝子群の生理学的誘導物質は、イソマルトースであり、この誘導シグナルが転写活性化因子 AmyR に伝達され、転写が活性化されることが明らかとなっている。しかし、すべてのアミラーゼ遺伝子が同様の機構で転写活性化されるかについては、未だ明らかになっていない。本研究では、*A. nidulans* ゲノム上に存在するすべてのアミラーゼ遺伝子を同定し、その発現プロファイルを網羅的に解析した。

A. nidulans genome database から、family13、15、31 に属する glycosyl hydrolase を抽出し、さらに manual annotation によりアミラーゼ遺伝子を同定した。その結果、 α -アミラーゼ 7 種類、 α -グルコシダーゼ 7 種類、グルコアミラーゼ 2 種類の存在が明らかとなった。半定量的 RT-PCR を行い、これらアミラーゼ遺伝子群の発現パターンを網羅的に解析した結果、イソマルトースに応答して発現が誘導される遺伝子群が存在するが、マルトースにより誘導される遺伝子は存在しなかった。また、炭素源飢餓条件下において、アミラーゼ遺伝子群は AmyR 非依存的な発現誘導を示した。炭素源飢餓条件下における発現誘導は、カーボンカタボライトリプレッションからの脱抑制である可能性があるため、現在、転写抑制因子 CreA の変異株を用いた解析を行っている。

Expression profiling of amylase genes in *Aspergillus nidulans*

Takashi Nakamura, Tomohiro Makita, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi

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

P-57

麴菌キシラナーゼ・セルラーゼ誘導因子 AoXlnR の転写制御機構

野口祐司, 田中寿基, 加藤雅士, 小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)

〔目的〕 AoXlnR は *Aspergillus oryzae* のキシラナーゼ・セルラーゼ遺伝子群の発現を制御する転写因子である。本因子はキシランやキシロースに応答して、支配下遺伝子群の転写を活性化する。しかし、AoXlnR の誘導シグナル認識機構、転写制御機構は明らかとなっていない。今回、AoXlnR による転写制御機構の解明を目的とし、非誘導条件、誘導条件下で AoXlnR の解析を行ったので報告する。

〔方法・結果〕 GFP-AoXlnR 融合遺伝子を *A. oryzae* AoXlnR 破壊株に導入した。破壊株におけるキシラナーゼ誘導能の欠失は GFP-AoXlnR 遺伝子の導入により回復したため、GFP-AoXlnR と野生型 AoXlnR は同等の機能を持つと考えられる。GFP-AoXlnR の細胞内局在性をキシロース添加、非添加条件下で観察した結果、GFP-AoXlnR は常に核に局在していた。従って、AoXlnR は核内で誘導シグナルを受容して活性化すると考えられる。

また、myc-AoXlnR 融合遺伝子を *A. oryzae* に導入、キシロース添加、非添加条件の菌体より細胞抽出液を調製し、抗 myc 抗体を用いてウエスタンブロッティング解析を行った。その結果、myc-AoXlnR の SDS-PAGE 上の移動度がキシロース添加条件下で低下することが明らかとなった。この移動度の低下はキシロース特異的に引き起こされ、また、キシロースの除去により回復した。以上の結果は、キシロースに応答して、AoXlnR に何らかの可逆的修飾または構造変化が起こることを意味している。

Regulatory mechanism of AoXlnR, a transcriptional activator of xylanase and cellulose genes in *Aspergillus oryzae*.

Yuji Noguchi, Hisaki Tanaka, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi

(Dept. of Biological Mechanisms and Functions, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

P-58

麴菌 CCAAT 結合因子優勢阻害型変異サブユニットの解析：制御される遺伝子群の網羅的解析への利用

杉山純也、高橋明珠、合田秀矢、小林哲夫、加藤雅士 (名大院・生命農・生物機構)

糸状菌 CCAAT 結合因子は Hap 複合体とも呼ばれ、HapB/C/E の3つのサブユニットからなり、多くの産業上重要な酵素遺伝子の転写を促進している。これまでに Hap 複合体の性質は詳細に解析されてきているが、どのような遺伝子群が制御されているのかという全体像は依然として明らかではない。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の解析から Hap サブユニットの遺伝子欠失株は生育が遅く胞子の着生が悪くなることが明らかになっており、麴菌においての欠失株の取得も容易ではないと考えられる。多核である麴菌では欠失株の分離はさらに難しく、現在までのところ成功していない。今回、マイクロアレイによる網羅的解析に必要なサブユニット遺伝子欠失株に替わる優勢阻害型（ドミナントネガティブ）変異株の取得を試みた。Hap サブユニットは種間で高度に配列が保存された領域を有している。保存領域内の推定 DNA 結合ドメインを変異させた HapB (HapB-1M) 遺伝子を野性型 *A. nidulans* に導入したところ、Hap 複合体依存であることが既に明らかになっているアミラーゼやエンド-β-グルカナーゼ A 活性の低下が明らかとなった。これらの現象は、変異 HapB が正常な HapB から他のサブユニット HapC/E を奪うことにより起こる優勢阻害効果に起因していることが示唆された。麴菌に HapB-1M 遺伝子を導入した株でも同様の優性阻害効果が認められた。現在、この株を用いてマイクロアレイ解析に向けた条件検討を進めている。

Analysis on a dominant-negative mutant subunit of the *Aspergillus oryzae* CCAAT-box binding factor: applications for the comprehensive analysis of genes controlled by the factor.

Junya Sugiyama, Akemi Takahashi, Hideya Goda, Tetsuya Kobayashi, Masashi Kato

(Dept. of biological mechanisms and functions, Grad. Sch. of Nagoya Univ.)

P-59

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の HSP30 遺伝子プロモーターの Deletion 解析

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のひとつである HSP30 遺伝子 (1) に着目し、そのプロモーター解析を行った。

[方法と結果] HSP30 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解った。次に、予測翻訳開始点より上流約 2 kb のプロモーター領域を約 500 又は 100bp の間隔で逐次 Deletion し、プロモーターアッセイ用ベクター pNAGM(pNAGT4 (大関(株)より恵与)より改変)に組み込み 13 種類の形質転換株を作成した。そして GUS 活性に対する時間と温度変化の影響を検討した。各 Deletion 株を YPD 液体培地で 30℃ 一晚培養後、GUS 活性を測定したところ、-2045~-476 領域を削除した時と比べて、-388 まで削ると大きく低下した。ノーザン解析の結果でも、30℃ 培養時の転写活性が下がっていた。この -476~-388 には、CCAAT 配列が存在していた。-2045~-388 まで削除した各株は、40℃ 2 時間の高温誘導処理による GUS 活性の増加が見られたが、-285 まで削除すると、30℃ 培養時だけでなく、高温誘導でも GUS 活性が著しく低下した。-388~-285 領域には、HSE とストレス応答配列に類似の配列が存在し、これが高温誘導に関わっていると考えられる。

(1) 松下ら、日本農芸化学会 2005 年度大会講演要旨集、p 232

Analysis of a promoter region of HSP30 gene from *Aspergillus oryzae* and expression of GUS gene

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

(Natl. Food Res. Inst.)

P-60

麹菌 *Aspergillus oryzae* の低温誘導プロモーターの単離

久田博元、堤浩子、秦洋二、安部康久 (月桂冠総研)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は伝統的な醸造産業である清酒、醤油、味噌に使用されている重要な微生物である。また麹菌は様々な酵素を多量に分泌することが知られ、遺伝子工学手法を用いて有用タンパク質生産が行われている。タンパク質の生産において重要となるのは、1.プロモーター選択、2.培養条件のコントロールである。我々はこれまでに、液体培養で高発現する *sodM*、*melO* と *catB* プロモーター、固体培養で高発現する *glaB* プロモーターを取得した。しかしこれらの高発現プロモーターを利用しても、全ての目的タンパク質が大量生産できるわけではない。翻訳後のタンパク質のフォールディングやプロテアーゼ分解などが、その原因として挙げられている。一方大腸菌によるタンパク質生産においては、低温で培養することにより成熟タンパクの収量が向上することが報告されている。そこで本研究では、麹菌の低温でのタンパク質生産システムを検討するため、低温で強力に発現誘導するプロモーターの取得を試みた。

まず、麹菌 OSII1013 株を低温と通常の温度でフスマ培養を行い、2 日間培養後に各菌体から mRNA を精製し、定法に従い DNA マイクロアレイ解析を行った。DNA マイクロアレイ解析の結果から、低温で発現量が多い遺伝子群を抽出した。抽出した遺伝子群の中から、低温で特異的に発現誘導される 3 種類の遺伝子を選択した。各遺伝子のプロモーター領域をサブクローニングし、GUS レポーター解析を行った。発現プロファイルを検討した結果、そのうちの 2 種類のプロモーターは低温フスマ培養で特異的に発現することが判明した。

Isolation and analysis of promoter regions required for low temperature induction in

Aspergillus oryzae

Hiramoto Hisada, Hiroko Tsutsumi, Yoji Hata, Yasuhisa Abe (Gekkeikan Sake Co. Ltd.)

P-61

麹菌と酵母における遺伝子発現の比較解析

山根倫子, 寺林靖宣, 佐野元昭*, 高瀬久美子, 大箸信一*, 町田雅之 (産総研・*金沢工大)

<目的> 麹菌 *Aspergillus oryzae* は、酒・味噌・醤油などの伝統的産業を初めとして、近年での遺伝子工学技術を用いる酵素生産など、日本のバイオテクノロジー産業に広く用いられている。近年、麹菌のゲノム解析がほぼ完了し、麹菌の持つ遺伝子の全貌が明らかになった。そこで我々は、麹菌のゲノム塩基配列から予測された遺伝子のほぼ全てを搭載するオリゴDNA マイクロアレイを作成した。既に、このマイクロアレイを用いて、様々な培養条件や形質転換体を用いた解析を開始しており、麹菌の全遺伝子の発現情報に関する大規模なデータベースを構築しつつある。この情報基盤は、麹菌の転写制御ネットワークを解くために重要な鍵になると考えられる¹⁾。今回、我々は、上記の麹菌 DNA マイクロアレイを用いて、モデル生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* との遺伝子発現プロファイルの比較を試みた。

<方法・結果> あらかじめ培養した麹菌菌体に Heat shock 処理を行い、RNA を抽出してマイクロアレイ用蛍光標識 mRNA を作製した。この試料を麹菌の 11,000 遺伝子のプローブをスポットしたオリゴアレイを用いて遺伝子の発現解析を行った。また、遺伝子発現データベース上にある、酵母の同様の培養条件下での解析結果との比較を行った。麹菌が有する代謝パスウェイを含めて、Heat shock に対する出芽酵母との反応の相違について解析を進めている。

1) 町田ら：日本農芸化学会要旨 P518(2005)

Comparative analysis of gene expression at heat shock between *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*

Noriko Yamane, Yasunobu Terabayashi, Motoaki Sano*, Kumiko Takase, Shinichi Ohashi*, Masayuki Machida(AIST,

*KIST)

P-62

Carbon and nitrogen repression of the expression of *citA* gene encoding citrate synthase in *Aspergillus nidulans*

Pil Jae Maeng* and Yeong Man Yu (Dept. of Microbiology, Chungnam National Univ., Daejeon 305-764, Korea)

The *citA* gene of *Aspergillus nidulans* encodes a citrate synthase which catalyzes the condensation reaction between acetyl-CoA and oxaloacetate yielding citrate, the first step of the TCA cycle. As an extension of the previous studies on the citrate synthase of *Aspergillus nidulans* and the *citA* gene, we studied the regulation of *citA* expression especially by carbon and nitrogen sources in the present research. According to the results obtained by real-time RT-PCR analysis, the expression of *citA* was strongly induced by acetate. However, the level of *citA* transcript was decreased by approx. 80%, when either 1% of glucose or sucrose was added to the inducing medium together with 50 mM acetate. This result suggests that the induction of *citA* expression by acetate was significantly repressed by either glucose or sucrose. The extent of the carbon catabolite repression was decreased by about 40% in *creA^{d30}* mutant when compared with that of wild-type strain, indicating that the repression is at least partially CreA-dependent. In addition, the level of *citA* transcript was decreased by approx. 40% in the presence of 5 mM ammonia when compared with that in the presence of 5 mM urea. This result suggests that the expression of *citA* gene is also subject to repression by ammonia.

P-63

RNAiによる麴菌(*Aspergillus oryzae*)遺伝子サイレンシング系の開発

山田 修, 坂本和俊, 秋田 修 (酒総研)

麴菌(*Aspergillus oryzae*)は、清酒をはじめとした醸造産業に広く利用されている有用糸状菌＝「国菌」である。近年、当研究所も参画した EST およびゲノム解析が終了し、麴菌もポストゲノム研究の時代を迎えた。麴菌の有用形質を分子レベルで理解・応用するためには、遺伝子破壊による機能解析が必須であるが、破壊用カセット構築の煩雑さや相同組換え効率の低さ等が研究のボトルネックとなっている。一方、動物・植物細胞などでは、RNAi 現象を利用した標的遺伝子に対する二本鎖 RNA の細胞内導入・発現による転写後遺伝子サイレンシング系が個別遺伝子機能解析の効率的な手法として注目され、活用されている。また、糸状菌 *Neurospora crassa*, *Magnaporthe oryzae*, *Aspergillus nidulans* 及び *A. fumigatus* においても RNAi による遺伝子サイレンシングが最近報告された。この RNAi による遺伝子サイレンシング系は、有力なポストゲノム研究ツールと期待されることから、麴菌における有効性について検討することとした。

麴菌ゲノム DB を検索したところ、*N. crassa* において RNAi に必須とされる *QDE2* (argonaute family protein) 及び *DCL-2*(Dicer)ホモログの存在が確認され、RNAi が麴菌でも機能する可能性が示唆された。そこで、コンパチブルな制限酵素サイトを持ち、さらに Gateway システムにより麴菌発現ベクターへ導入可能なプラスミド pGFPi 及び pMtlI を作成し、その有効性について検討した。麴菌の分生子形成を制御する転写因子 *brlA* 遺伝子 EST クローンを利用し RNAi によるサイレンシングを試みたところ、 α -amylase 遺伝子プロモータ制御下において RNAi コンストラクトを発現させた場合に分生子形成の遅れが観察された。また、ノーザン解析より、*brlA* 遺伝子 mRNA レベルの減少及び分解産物に由来すると考えられるシグナルが検出された。また、麴菌 RIB40 ゲノム中に 3 コピー存在する α -amylase 遺伝子に対する RNAi についても検討している。

Gene silencing with RNAi in *Aspergillus oryzae*

Osamu Yamada, Kazutoshi Sakamoto, and Osamu Akita (NRIB)

P-64

クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* における緑色蛍光タンパク質をマーカーとして用いた alternative oxidase 遺伝子 (*aox1*) の発現解析

小河賢史, 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 *A. niger* WU-2223L は通常のシトクロム呼吸系の他にシアン非感受性呼吸系を有する。当該呼吸系を構成する酵素 alternative oxidase (AOX) をサリチルヒドロキسام酸により阻害しながら培養すると、クエン酸生産量が著しく低下することを当研究室では明らかにしている¹⁾。本研究では、AOX 遺伝子 (*aox1*) と緑色蛍光タンパク質 EGFP 遺伝子 (*egfp*) の融合遺伝子を導入した *A. niger* 株を作製し、種々の培養条件下における *aox1* の発現を EGFP をマーカーとして解析した。

【方法および結果】*Aox1* の下流に *egfp* を連結した融合遺伝子 *aox1-egfp* を作製した。これを *A. niger* WU-2223L 由来の *aox1* 破壊株 (DAOX-1) に導入し、*aox1-egfp* を 1 コピー保持する株 (AOXEGFP-1) を作製した。AOXEGFP-1 の蛍光顕微鏡観察により EGFP の緑色蛍光と MitoTracker® Red CMXRos によるミトコンドリアの赤色蛍光の位置が同一であることから、AOX のミトコンドリア局在性を確認した。さらに、グルコース濃度を 10 g/l から 120 g/l まで段階的に変化させて培養を行った場合、常に EGFP の蛍光が確認されたことから、*aox1* はグルコース濃度に依存せずに発現することが示唆された。

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

Expression Analysis of the Alternative Oxidase Gene (*aox1*) with an Enhanced Green Fluorescent Protein as a Marker in *Aspergillus niger* Producing Citric Acid

Satoshi Ogawa, Takasumi Hattori, Kuniki Kino, Kohtaro Kirimura
(Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ.)

人名索引

- Drivinya Antra 57
 David B. Archer 29, 36, 61, 64
 Mee-Jeong Cha 66
 Suh-Keek Chae 66
 Paul S. Dye 61
 Evelyn B. Elegado 52, 53
 Dong-Min Han 60
 Kap-Hoon Han 35, 60
 Howard S. Judelson 44
 Praveen R. Juvvadi 36, 48, 61, 73, 75
 Hyo-Jung Kim 60
 Jee Hyun Kim 60
 H. C. Kistler 50
 Nak-Jung Kwon 66
 Heather A. Lee 64
 Pil Jae Maeng 80
 Maria Dolores Montiel 64
 Sun-Hee Noh 66
 Berl R. Oakley 66
 Richard O'Connell 52
 Mathieu Paoletti 61
 Nguyen Bao Quoc 41
 Fabian A. Seymour 61
 Marites A. Sales 53
 Sung-Hwan Yun 34
 Yeong Man Yu 80
 合田秀矢 78
 秋田 修 81
 阿部 歩 52, 53
 阿部敬悦 38, 47, 63
 安部康久 79
 有江 力 32, 50, 51, 54
 有岡 学 11, 41, 42, 49,
 60, 74, 72, 73, 74, 75
 有沢 章 45, 68
 五十嵐圭日子 68, 69, 70
 生駒卓也 50
 石井絵美 76
 石井千津 53
 石川暢子 50
 石田 博樹 25
 石田卓也 69
 市川亮太 56
 一島 英治 46
 一柳俊介 63
 一石昭彦 59
 伊藤幸成 71
 井山真琴 32
 岩崎阿寿美 53
 岩下和裕 19
 宇佐美論 55
 漆原寿彦 51
 海老塚豊 75, 76, 77
 太田明德 48, 63
 大根田守 49
 大箸信一 40, 80
 岡崎孝映 65
 小笠原 博信 42
 岡田晃佳 57
 岡部明子 50
 岡本綾子 62
 岡本俊輔 54
 小河賢史 81
 織田 健 19
 落合則幸 57
 小畑 浩 42
 親泊政二三 68
 角谷直樹 41
 笠原 紳 44
 加治佐平 69, 70
 柏木 豊 40, 64, 65, 79
 加藤ハナ 32
 加藤雅士 47, 58, 77, 78
 金森正樹 32, 54
 金子 功 32
 鎌倉高志 53, 54
 神太郎 62
 亀井克彦 57
 河内征典 59
 川岸美佳 66
 川部眞登 50
 川村真志 59
 川本進 57
 菊池韶彦 66
 菊間隆志 49, 75
 北本則行 64
 北本勝ひこ 36, 41, 42, 48, 49,
 60, 61, 71, 72, 73, 74, 75
 木野邦器 43, 81
 木下浩 45
 木村多江 40, 64, 65

木村真	56, 57	高野義孝	58
桐村光太郎	43, 81	高橋 砂織	42
金鋒杰	73	高橋明珠	78
グエン・コン・ハ	62	竹内道雄	61, 62
楠本憲一	40, 64, 65, 79	竹下典男	48
工藤愛子	59	竹谷博子	65
工藤俊章	55	多田羅 洋太	46
久保康之	52	辰巳晶紀	75
倉都将宏	72	田中千尋	57, 58
幸田 明生	23	田中寿基	78
小島海平	58	谷修治	44
児玉基一郎	50	玉野孝一	71
小林亜希子	40	塚田剛士	70
小林哲夫	47, 58, 77, 78	辻 元人	52
五味勝也	21, 42, 47, 63	辻山 彰一	52
齋藤憲一郎	54	堤浩子	79
斉藤秀成	51	恒川 博	45, 68
酒井宏	51	寺井明穂	57
坂野真平	56	寺岡 徹	32, 50, 51, 54
坂本和俊	17, 81	寺林靖宣	71, 80
坂本裕一	67	寺本 寛	46
砂川美佐緒	71	富樫加奈	32, 51
向坂由貴	55	徳岡昌文	63
笹栗志保	74	永井史郎	45
佐藤利次	67	中出啓子	67
佐藤友紀	71	永井勝	67
佐野元昭	40, 47, 80	中島佑	47
佐野裕基	76	中濱智之	42, 60, 74
鮫島正浩	68, 69, 70	中村貴	77
椎名松子	47	中村知恵	68
塩澤あずさ	56, 57	中村雅哉	67
清水公德	57	中屋敷均	41
清水健雄	45	難波 剛	46
志水元亨	45, 46	西村麻里江	43
正路淳也	41, 42, 72	二十軒悠里	70
白石友紀	52	仁平卓也	45
杉山純也	78	丹羽修身	65
鈴木徹	50	野口祐司	78
鈴木 聡	65, 79	野口莉枝子	56
鈴木一史	68	萩原大祐	47
鈴木聡	40, 64	畠山理広	60
須賀晴久	50	秦洋二	42, 79
勢ノ康代	75	服部貴澄	43, 81
曾根輝雄	52, 53	馬場崎勝彦	67
田浦綾子	72	林長生	43
高瀬久美子	80	樋口裕次郎	42, 60

久田博元	79	三石 安	69
百町満朗	50	宮崎安将	67
日吉あや子	69	宮地俊彦	52
平石正男	69	武川 治	53
平塚宣博	68	村山肇子	59
廣末慎嗣	45, 68	茂泉幸太	59
藤井 勲	75, 76, 77	本山高幸	55
藤岡智則	63	森口 智美	77
藤村真	51, 56, 57	森沙織	51
伏信進矢	70	森田寛人	61
古川育代	40	森田真純	55
古川健太郎	38, 63	矢追克郎	69
紅 朋浩	66	山形洋平	47
堀内裕之	15, 48, 63	山口勇	56
堀尾哲也	66	山崎晴丈	63
堀越江美	71	山崎ゆかり	58
牧田智裕	77	山田 修	81
町田雅之	40, 47, 71, 80	山田修司	68
松井理恵	52	山根倫子	71, 80
松尾一郎	71	山本 七瀬	73
松崎芙美子	45	吉田 孝	46
松下真由美	40, 65, 79	吉田誠	70
松林良博	58	吉見啓	57, 58
馬橋由佳	74	和田朋子	70
眞山滋志	41	渡邊節子	56
丸井淳一郎	47, 58	渡邊剛志	47
丸山潤一	13, 36, 48, 61, 71, 73, 74	渡辺哲	57
水谷治	47, 63	渡辺泰祐	73
水野猛	47	割石博之	45, 46, 68
三田地貴史	54		

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）