

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
特別講演要旨	12
シンポジウム講演要旨	15
一般講演要旨	27
ポスター発表講演要旨	36
人名索引	82
糸状菌分子生物学研究会会則	86
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿	87

第6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18年11月13日(月)-14日(火)

会場：大阪府立大学 Uホール白鷺
(大阪府堺市中区学園町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13日(月)

12:30-14:30 口頭発表(O-1~O-8)

14:30-14:45 休憩

14:45-16:15 ポスター発表(奇数番号)

16:15-17:00 特別講演①

Dr. B. Gillian Turgeon

(Department of Plant Pathology,
Cornell University)

17:00-17:45 特別講演②

Dr. James R. Kinghorn and Dr. Shiela Unkles

(School of Biology,
University of St. Andrews)

17:45-17:55 総会

18:00- 懇親会(学術交流会館)

11月14日(火)

9:30-12:00 シンポジウム

12:00-13:00 昼食

13:00-14:30 ポスター発表(偶数番号)

14:30-16:45 口頭発表(O-9~O-17)

16:45-16:55 閉会の辞

発表演題および講演時間

特別講演 11月13日(月) 16:15-17:45

16:15-17:00 特別講演①

**Secondary metabolites: fundamental and niche-specific roles
in fungal development and cell-cell interactions**

Dr. B. Gillian Turgeon (Department of Plant Pathology, Cornell University)

17:00-17:45 特別講演②

Fungal Nitrate and Nitrite Transporters: Insights into Structure and Function

Dr. James R. Kinghorn and Dr. Shiela Unkles
(School of Biology, University of St. Andrews)

シンポジウム 11月14日(火) 9:30-12:00

「バイオマスの有効利用に向けた糸状菌の役割」

- 9:30 「はじめに」 川口 剛司 (阪府大院・応生科)
- 9:40 S-1 「担子菌の生産するセルロース分解系酵素の多様性とその役割」
天野 良彦 (信州大・物質工学)
- 10:15 S-2 「選択的白色腐朽菌による木質バイオマスのエネルギー・化学資源化」
渡辺 隆司 (京大 生存圏研)
- 10:50 S-3 「バイオエタノール生産に利用される糸状菌由来酵素」
高木 忍 (ノボザイムズ ジャパン)
- 11:25 S-4 「高機能型セルラーゼ高生産 *Trichoderma reesei* 株の構築に向けて」
森川 康 (長岡技科大・生物系)

一般講演 (O-1~O-8) 11月13日(月) 12:30~14:30

- 12:30 O-1 いもち病菌における二つの Dicer 様蛋白質の機能分化
角谷直樹, 土佐幸雄, 眞山滋志, 中屋敷均 (神戸大・農学部)
- 12:45 O-2 ジャガイモ夏疫病菌 *Alternaria solani* 由来ポリケタイド合成酵素 PKSN の発現と機能解析
笠原堅¹, 及川英秋², 藤井勲¹, 海老塚豊¹ (¹東大院・薬, ²北大院・理)
- 13:00 O-3 麹菌 *A. oryzae* の異種タンパク質高生産変異株の取得
根本崇, 渡辺泰祐, 溝上豊, 丸山潤一, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- 13:15 O-4 イネいもち病菌の G タンパク質制御因子 RGS についての解析
友野理生, 南栄一, 西村麻里江 (生物研)
- 13:30 O-5 *Aspergillus nidulans* における His-Asp 情報伝達系タンパク質の網羅的解析
金丸京子, 松林良博, 東信宏, 鈴木麻子, 加藤雅士, 小林哲夫 (名大・生命農)
- 13:45 O-6 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の農薬応答における His-Asp リン酸リレー系の解析
萩原大祐¹, 松林良博¹, 金丸京子¹, 加藤雅士¹, 阿部敬悦², 小林哲夫¹, 水野猛¹
(¹名大院・生命農学, ²東北大院・農学)
- 14:00 O-7 *Aspergillus nidulans* HOG 経路特異的なレポーター遺伝子発現系の構築
古川健太郎, 古川貴子, 星由紀子, 佐藤奈津子, 吉見啓*, 藤岡智則, 水谷治, 阿部敬悦 (東北大院農・応生科, *東北大・未来研)
- 14:15 O-8 *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)

一般講演 (O-9~O-17) 11月14日(火) 14:30~16:45

- 14:30 O-9 *Aspergillus nidulans* の形質転換時に必要とされる分子および操作についての検討
桑野哲矢¹, 依田康孝², 伊藤靖夫^{2,3} (¹信大・理, ²信大院・工, ³信大・全学教育機構)
- 14:45 O-10 糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるキチナーゼ遺伝子群の発現解析
田中彩, 山崎晴丈, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)

- 15 : 00 **O-11** 褐色腐朽菌 *Coniophora puteana* による植物細胞壁由来多糖の分解メカニズム
加治佐平、五十嵐圭日子、鮫島正浩（東大院・農生科・生材料）
- 15 : 15 **O-12** *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* 由来の β -1,6-ガラクトナーゼの精製とクローニング
谷口雄哉、阪本龍司、川崎東彦（大阪府立大・生命環境）
- 15 : 30 **O-13** リボフラビン生産糸状菌 *Ashbya gossypii* の代謝解析
金政真¹、田島諭¹、朴龍洙^{1,2}（¹静岡大・農・応生化、²静岡大・創科技院・統合バイオ）
- 15 : 45 **O-14** 褐色腐朽菌オオウズラタケにおいてシュウ酸耐性に寄与するタンパク質の機能解析
渡邊知樹¹、土反伸和¹、梅澤俊明¹、矢崎一史¹、島田幹夫²、服部武文¹（¹京大・生存研、²福井工大・工）
- 16 : 00 **O-15** TPP 結合型リボスイッチの機能改変
山内隆寛^{1,2}、三好大輔²、窪寺隆文¹、伴光博¹、西村顕¹、杉本直己^{2,3}（¹白鶴酒造（株）・研究開発室、²甲南大・FIBER、³甲南大・理工）
- 16 : 15 **O-16** 麹菌 *Aspergillus oryzae* のチアミン高生産株の分子育種
徳井美里、窪寺隆文、五味勝也¹、山下伸雄、伴光博、西村顕（白鶴酒造研究開発、¹東北大院農・生物産業創成）
- 16 : 30 **O-17** 水分含量の異なる固体培養条件下における麹菌遺伝子発現の解析
小林亜紀子¹、佐野元昭¹、久田博元²、秦洋二²、大箸信一¹（¹金沢工業大・ゲノム研、²月桂冠・総研）

ポスター発表 奇数番号 : 11月13日 14:45-16:15
偶数番号 : 11月14日 13:00-14:30

- P-1** 酵母 Bni1 の相同タンパク質 AoBni1 を用いた麹菌 *A. oryzae* における Spitzenkörper の可視化
石川絵理、正路淳也、有岡学、北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）
- P-2** 蛍光タンパク標識による *Aspergillus nidulans* 先端成長機構の解析：微小管とアクチンの関係を中心に
¹堀尾哲也、²紅 朋浩、³Naimeh Taheri-Talesh、²菊池韶彦、³Berl R. Oakley（¹徳島大院・ヘルスバイオ、²名古屋大院医系・分子標的、³オハイオ州立大・分子遺伝）
- P-3** *A. oryzae* の Woronin body 形成に関与する *Aohex1* 遺伝子の破壊株における表現型解析
丸山潤一、北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）
- P-4** *A. oryzae* の Woronin body 形成に必要な *Aohex1* 遺伝子における選択的スプライシングの意義に関する解析
岩崎健太郎、内田博教、Praveen Rao Juvvadi、丸山潤一、北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）

- P-5** アカパンカビにおける蛍光タンパクで標識した *NC-RAS-2* 遺伝子の可視化
 茂泉幸太、村山肇子 (関東学院大院・工学研究科)
- P-6** *N*-結合型糖鎖ビーズを用いた *A. oryzae* 小胞体内レクチンの取得と局在解析
 渡邊泰祐¹、松尾一郎^{1,2}、丸山潤一³、北本勝ひこ³、伊藤幸成^{1,2} (理研¹、CREST²、東大院農生科・応生工³)
- P-7** 麹菌 *A. oryzae* における小胞体ストレスの可視化
 大野絢子、丸山潤一、有岡学、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-8** 麹菌 *Aspergillus oryzae* 菌糸基部におけるオルガネラ構成成分のオートファジーによる液胞への取込み
 正路淳也、菊間隆志、有岡学、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-9** 担子菌 *Coprinus cinereus* 由来オートファジー関連タンパク質 Atg8 ホモログの機能解析
 吉村昌徳、渡邊 彰、麻田恭彦 (香川大・農)
- P-10** 麹菌 *A. oryzae* におけるエンドソーム様構造体の解析
 樋口裕次郎、正路淳也、有岡 学、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-11** 麹菌 *A. oryzae* における AoVps24 の液胞形成に関する機能の解析
 辰巳晶紀、菊間隆志、正路淳也、有岡学、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-12** イネいもち病菌の付着器形成に対する各種抗生物質の影響
 長島由夏、武川治、斉藤彩華、鎌倉高志 (東理大理工)
- P-13** イネいもち病菌における機械刺激受容カルシウムイオンチャンネル *MIDI* ホモログの機能解析
 伊澤真澄、柏木知子、鎌倉高志 (東理大理工)
- P-14** イネ科植物いもち病菌(*Pyricularia spp.*)における非病原力遺伝子 *AVR-Pita* の座乗染色体変動機構
 中馬いづみ、磯部千尋、中屋敷均、眞山滋志、土佐幸雄 (神戸大・農)
- P-15** イネいもち病菌の非病原性遺伝子 *Avr-pia* のクローニング
 曾根輝雄¹、三木慎介¹、松井幸太郎¹、芦澤武人²、鬼頭英樹³、平八重一之¹、
 中島敏彦⁴、富田房男⁵
 (¹北大院農・応用菌学、²中央農研、³農業生物資源研、⁴東北農研、⁵放送大)
- P-16** Biotinylated NeoechinulinA 化学合成経路の改善と *Aspergillus* 属の NeoechinulinA 生合成遺伝子群の探索
 竹野正洋、大石麻由、堀内桃子、鎌倉高志 (東理大理工)
- P-17** *Aspergillus fumigatus* が生産するトリプロスタチン類の生合成遺伝子クラスター
 加藤直樹、高木海、浅見行弘、掛谷秀昭、長田裕之 (理研・中央研・抗生物質)
- P-18** 麹菌 *A. oryzae* の III 型ポリケタイド合成酵素遺伝子の機能解析
 勢 康代¹、藤井勲¹、Praveen Rao Juvvadi²、北本勝ひこ²、海老塚豊¹
 (¹東大院・薬、²東大院・農生科・応生工)
- P-19** 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-20** 麹菌 *A. oryzae* の繰返し型タイプ I ポリケタイド合成酵素遺伝子の発現と機能解析
 守屋智博¹、勢 康代¹、北本勝ひこ²、藤井勲¹、海老塚豊¹ (東大院・薬¹、
 東大院・農生科・応生工²)
- P-21** *Penicillium luteo-aurantium* のポリケタイド合成酵素遺伝子の機能解析
 佐野裕基、藤井勲、海老塚豊 (東大院・薬)
- P-22** 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-23** 酵母をホストとした *Aspergillus fumigatus* DHN-メラニン生合成系の再構成
南部夏希、藤井勲、海老塚豊 (東大院・薬)
- P-24** GFP 融合蛋白質を用いた麴菌のシデロフォア生産調節因子(SreAo)の局在解析
渡辺久敬、佐藤利次 (岩手生工研)
- P-25** 紅麴菌 (*Monascus pilosus*) による二次代謝産物の生産
三宅剛史¹、張明永^{1,2}、内富久美子³、河野勇人¹、野崎信行¹、産本弘之¹、稲垣賢二³
(¹岡山県工技セ、²JSPS、³岡山大院・生物機能化学)
- P-26** キャベツ萎黄病菌 Cong:1-1 とその病原性欠損株 Cong:1-2 におけるタンパク質発現パターンの解析
岡部明子、吉田隆延¹、有本裕²、堂前直²、森翔吾³、寺岡徹、有江力 (農工大、¹農環研、²理研、³農大)
- P-27** *Colletotrichum acutatum* のペノミル耐性遺伝子 *CaBEN1* は β -チューブリン遺伝子の転写に関わっている
中畝良二、中野正明 (農研機構 果樹研)
- P-28** リンゴ斑点落葉病菌の AM 毒素生合成遺伝子クラスターにコードされる Zn(II)2Cys6 タイプ転写制御因子の機能
播本佳明、児玉基一朗¹、山本幹博²、尾谷 浩¹、柘植尚志 (名大院生農・¹鳥取大農・²岡山大農)
- P-29** ナシ黒斑病菌の貫穿菌糸における活性酸素種(ROS)の機能解析
玄康洙、池田健一、中屋敷均、朴杓允 (神戸大・自然科学)
- P-30** *Fusarium oxysporum* の孢子形成関連転写因子 *Ren1* は亜硝酸還元酵素遺伝子を制御する
飯田祐一郎、小原敏明、柘植尚志 (名大院生農)
- P-31** *Fusarium oxysporum* のピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子の同定
本山愛、寺岡徹、有江力 (東京農工大・院農生物制御)
- P-32** 浸透圧により発現が変動する麴菌の遺伝子群とそのプロモーターの利用
織田健、¹坂本和俊、²有馬寿英、¹大北由佳、¹柿菌ダララット、¹山田 修、^{1,3}岩下和裕、⁴秋田修 (金沢工大ゲノム研、¹酒総研、²県立広島大、³広大先端研、⁴実践女子大)
- P-33** 麴菌 *Aspergillus oryzae* の bZIP 型転写制御因子遺伝子 *atfA* の解析
坂本和俊¹、山田修¹、大北由佳¹、岩下和裕¹、秋田修²、五味勝也³、三上重明¹ (¹酒総研、²実践女子大、³東北大院・農)
- P-34** アカパンカビの浸透圧ストレスで誘導されるグリセロール合成における glycerol dehydrogenase の役割
山下和宏¹、坂野真平²、塩澤あずさ¹、藤村真¹ (¹東洋大・生命、²東洋大・植機研セ)
- P-35** 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}、宇佐美論²、工藤俊章¹、本山高幸¹ (¹理研・中央研、²東洋大・工)
- P-36** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* における多様な酸化ストレス応答機構の解析
浅野祐広、萩原大祐、金丸京子、加藤雅士、小林哲夫、水野猛 (名大院・生命農学)
- P-37** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* における二成分性情報伝達系リン酸基伸介因子 *YpdA* の解析
佐藤奈津子、古川健太郎、阿部敬悦 (東北大院・農・応生科)
- P-38** *Aspergillus nidulans* レスポンスレギュレーター *SskA*、*SrrA* の時間的発現変動と農薬感受性との関連
松林良博、金丸京子、萩原大祐、丸井淳一郎、水野猛、加藤雅士、小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)

- P-39** *In vitro* リン酸リレー系を用いた *Aspergillus nidulans* His-Asp リン酸リレーネットワークの解析
東信宏、金丸京子、松鹿昭則、山篠貴史、水野猛、加藤雅士、小林哲夫 (名大院・生命農)
- P-40** *Aspergillus nidulans* Histidine Kinase の部位特異的発現
鈴木麻子、金丸京子、加藤雅士、小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)
- P-41** インゲン根腐病菌における MAPK 遺伝子破壊株の作出とその病原性
北嶋勇典、須賀晴久、百町満朗 (岐阜大院・農)
- P-42** *Neurospora crassa* の *grg-1* (glucose-repressible gene) は OS-2 MAP キナーゼにより発現調節を受ける
渡邊節子¹、坂野真平²、塩澤あずさ¹、落合則幸³、木村真³、藤村真¹
(¹東洋大・生命、²東洋大・植機研セ、³理研・中央研)
- P-43** *Neurospora crassa* の OS-2 MAP キナーゼの下流の転写調節因子の同定
塩澤あずさ¹、坂野真平²、山下和宏¹、渡邊節子¹、福森文康¹、藤村真¹
(¹東洋大・生命、²東洋大・植機研セ)
- P-44** The *nsdC* gene encoding a novel positive regulator of sexual development of *Aspergillus nidulans* is regulated by complicated transcriptional and post-transcriptional control.
Hye-Ryoun Kim and Dong-Min Han (Division of Life Science, Wonkwang University, Korea)
- P-45** Molecular analysis of the rapamycin-sensitive and cycloheximide-resistant *ActA1* gene in *Aspergillus nidulans*
Sun-Hee Noh and Suhn-Kee Chae (Dept. Biochemistry and Biomed RRC, Paichai Univ. Daejeon, 302-735 Korea)
- P-46** *N. crassa* におけるシグナル遺伝子 *ncSCD2*、*ncSHK1* の解析
川村真志、一石昭彦 (東洋大学・生命科学研究所)
- P-47** *Neurospora crassa* の NER 遺伝子 *mus-43*、*mus-44* の解析
佐藤正仁、一石昭彦 (東洋大・生命科学部)
- P-48** 麹菌の DNA ligase (*lig4*) 遺伝子破壊による高頻度相同組換え宿主の造成
水谷治¹、工藤洋平¹、松浦知己¹、井上弘一²、阿部敬悦³、五味勝也¹ (¹東北大院農・生物産業創成、²埼玉大理、³東北大院農・応生化)
- P-49** 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) における ORF 内への poly(A) 付加シグナル導入による異常 poly(A) 付加
田中瑞己¹、徳岡昌文^{1,2}、高木忍³、新谷尚弘¹、五味勝也¹ (¹東北大・農・生物産業創成科学、²野田産業科学研究所、³ノボザイムジャパン)
- P-50** 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の DNA トランスポゾン *Crawler* の転移活性と transposase 遺伝子の 3'-RACE 解析
小笠原博信¹、小畑浩²、秦洋二²、高橋砂織¹、五味勝也³
(¹秋田県総食研・酵素微生物、²月桂冠・総研、³東北大院農・生物産業創成)
- P-51** 栽培不良症状を示すエノキタケで検出された dsRNA ウイルス
横井寿郎、砂川政英、馬替由美 (森林総研)
- P-52** 奇形症状を示す菌床栽培シイタケで検出された 2 本鎖 RNA ウイルス
馬替由美、砂川政英、横井寿郎 (森林総研)
- P-53** 日本産、ベトナム産の亜種間接合体クロアワビタケ株における ITS 配列の奇妙な一致
Truong Binh-Nguyen^{1,2}、岡崎孝映³、Le Xuan-Tham⁴、鈴木彰¹ (¹千葉大・院自然科学、教育、²Tropical Biology Inst. Vietnam、³かずさ DNA 研、⁴Vietnam Atomic Energy Commission)
- P-54** *Agrobacterium* を用いた担子菌エノキタケの形質転換法の開発
岡本智充、山田雅人、稲富聡、岡崎光雄、下坂誠 (信州大・繊維・応生科、ホクトきのこ総合研究所)

- P-55** 高活性リグニン分解白色腐朽菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株の形質転換系構築
山岸賢治、木村俊之、老田茂（東北農研センター）、杉浦立樹、平井浩文（静岡大学農学部）
- P-56** アグロバクテリウムを用いた木材腐朽担子菌の形質転換
加治佐平、五十嵐圭日子、鮫島正浩（東大院・農生科）
- P-57** アグロバクテリウム法によるシイタケ (*Lentinula edodes*) 形質転換系の確立
宮本幸恵¹、平岡良輝¹、山岸大輔¹、時本景亮²、尾谷 浩¹、前川二太郎¹、児玉基一郎¹
(¹鳥取大・農、²菌茸研究所)
- P-58** *Aspergillus oryzae* 由来 *sC* マーカーを利用した *Aspergillus oryzae* の形質転換
西晶子、坊垣隆之、広常正人（大関・総研）
- P-59** *Aspergillus aculeatus* における *sC* 選択マーカーを用いた形質転換系の開発
足立浩美、谷修治、炭谷順一、川口剛司（阪府大院・生命環）、荒井基夫
（中部大・応生）、金政真（静岡大院・応生化）
- P-60** *Aspergillus aculeatus* における *trpC* 遺伝子を用いた形質転換系の開発
前田優介、金政真¹、谷修治、炭谷順一、荒井基夫²、川口剛司（阪府大院・応生科、
¹静岡大・応生化、²中部大・応生）
- P-61** *A. tamarii niaD* 遺伝子の発現解析
木村多江¹、楠本憲一¹、北本則行²、鈴木聡¹、柏木豊¹（¹農研機構・食総研、
²愛知産技研・食品工技）
- P-62** 麹菌 DNACHIP による麹菌 Genotyping の検討
小林靖典^{1,2}、坂本和俊²、山田修²、岩下和裕^{1,2}、下飯仁^{1,2}、三上重明²（¹広島大・先端研、²酒総研）
- P-63** 貧栄養条件下で発現する麹菌菌体内タンパク質の解析
北川治恵、佐野元昭、堂本光子、町田雅之¹、大箸信一（金沢工大・ゲノム研¹産総研）
- P-64** 米ヌカ培地で高発現する麹菌遺伝子群の解析
尾関健二、山中崇*、佐野元昭、築野卓夫*、大箸信一（金沢工大・ゲノム研、
*築野食品工業）
- P-65** 麹菌 DNACHIP の開発とゲノム解析、発現解析への利用
岩下和裕^{1,2}、坂本和俊²、山田修²、三上重明²（¹広島大・先端研、²酒総研）
- P-66** 麹菌 CCAAT-box 結合因子によって制御される遺伝子の網羅的解析
高橋明珠、杉山純也、合田秀矢、佐野元昭*、小林哲夫、加藤雅士（名大院生命農・
生物機構、*金沢工業大・ゲノム研）
- P-67** 黄麹菌生育菌体内プロテオームの解析
神太郎、竹内道雄（東京農工大院・農）
- P-68** 黄麹菌 *A. oryzae* における CPase 遺伝子の解析
俣野達彦、竹内道雄（東京農工大学・農・応生科）
- P-69** プロテアーゼ遺伝子二重破壊株を用いたセルロース糖化麹菌の分子育種
中井喬彦¹、有岡学¹、川口剛司²、荒井基夫³、北本勝ひこ¹（¹東大院・農生科・
応生工、²阪府大院・農生科、³中部大・応生）
- P-70** 乾燥土壌環境中における遺伝子組換え麹菌胞子の生存性の解析
楠本憲一¹、古川育代¹、北本則行²、鈴木聡¹、柏木豊¹（¹農研機構・食総研、²愛知産技研・食品工技）

- P-71 麹菌における簡便コロニーPCR法とその応用**
鈴木聡、竹谷博子、木村多江、松下真由美、多田功生、楠本憲一、柏木豊（食総研）
- P-72 *Fusarium oxysporum* 由来糖化アミノ酸オキシダーゼの金属イオンによる活性化**
藤原真紀¹、炭谷順一¹、古賀晋治²、芳陵一生²、高妻卓司²、今村茂行²、川口剛司¹、
荒井基夫³（¹大阪府大院・応生化、²旭化成ファーマ・診断薬研、³中部大・環境生物）
- P-73 *Rhizopus microsporus* の細胞内共生バクテリアの形質転換と異種タンパク質発現**
本山高幸¹、落合奈緒子¹、森田真純^{1,2}、宇佐美論²、工藤俊章¹（¹理研・中央研、
²東洋大・工）
- P-74 麹菌(*Aspergillus oryzae*)の固体培養初期に発現する遺伝子 *AOS13* の解析**
歌島悠^{1,2}、岩下和裕^{1,2}、坂本和俊²、赤尾健²、山田修²、秋田修³、下飯仁^{1,2}、
三上重明²（広大・先端研¹、酒総研²、実践女子大³）
- P-75 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の HSP30 遺伝子プロモーターを用いた液体培養における
酵素遺伝子の発現とタンパク質生産の検討**
松下真由美、鈴木聡、多田功生、石田博樹¹、楠本憲一、柏木豊（食総研、¹月桂冠総研）
- P-76 *A.oryzae* の MAL クラスター遺伝子はアミラーゼ系酵素遺伝子発現にも関与する**
長谷川祥子、五味勝也（東北大院農・生物産業創成）
- P-77 *Aspergillus nidulans* 硝酸還元酵素遺伝子の嫌気条件特異的な転写制御機構の解明**
梶尾俊介、藤井達也、高谷直樹（筑波大院・生命環境）
- P-78 *Trichoderma reesei* におけるキシラーゼ III 遺伝子の誘導発現機構の解析**
古川隆紀、小笠原渉、岡田宏文、森川康（長岡技科大・生物）
- P-79 *Trichoderma reesei* におけるセルラーゼ遺伝子の誘導機構の解析**
志田洋介、熊谷克幸、小笠原渉、岡田宏文、森川康（長岡技科大・生物）
- P-80 麹菌 *Aspergillus oryzae* による cellobiose phosphorylase の生産**
多田功生、鈴木聡、楠本憲一、天野良彦¹、佐々木堯、柏木豊（食総研、¹信州大院・工）
- P-81 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* のセルロース分解酵素遺伝子発現量にグルコース
濃度および培養時間が与える影響**
鈴木一史、五十嵐圭日子、鮫島正浩（東大院・農生科）
- P-82 Cluster analysis of microarray gene expression data during growth of *Aspergillus oryzae*
in cellulose substrate medium**
Avid SHIAU, Praveen Rao JUVVADI, Jun-ichi MARUYAMA, Manabu ARIOKA, Katsuhiko
KITAMOTO (Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)
- P-83 *Aspergillus oryzae* 転写因子 AoXlnR 支配下にある多糖分解酵素遺伝子群の同定**
野口祐司、佐野元昭¹、加藤雅士、小林哲夫（名大院生命農、¹金沢工大）
- P-84 *Trichoderma reesei* 由来セルラーゼの機能改良**
中澤光、岡田和士、落合伸廣、小野寺朋子、小笠原渉、岡田宏文、森川康
（長岡技科大・生物）
- P-85 *Aspergillus aculeatus* 由来 *aviIII* 遺伝子の *A.aculeatus* を宿主とした高発現**
板東夏海、金政真¹、谷修治、炭谷順一、荒井基夫²、川口剛司（阪府大院・応生
科、¹静岡大農・応生科、²中部大・応生）
- P-86 *Aspergillus aculeatus* 由来 β -キシロシダーゼ遺伝子の *A. oryzae* における発現**
小西 達也、田尾藍子、谷 修治、炭谷順一、荒井基夫¹、川口剛司（阪府大院・
応生科、¹中部大・応生）

- P-87** ヒゲカビキチンデアセチラーゼ遺伝子の工学的利用
米村晃子、村山肇子（関東学院大・工・物質生命科学）
- P-88** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* のミオシン様ドメインを持つキチン合成酵素
CsmA、CsmB のドメイン間の機能的差異の解析
對崎真楠、竹下典男、堀内裕之、太田明德（東大院・農生科・応生工）
- P-89** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* のクラス III キチン合成酵素（ChsB）の細胞内局在
部位の解析
福田一治¹、山下修一²、堀内裕之¹、太田明德¹（東大・農生科・¹応生工・²生環生）
- P-90** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* のキチナーゼ遺伝子 *chiH*、*chiR* の機能解析
山崎晴丈、田中彩、堀内裕之、太田明德（東大院・農生科・応生工）
- P-91** *Rhizopus oryzae* のキチン合成酵素遺伝子の発現解析
阿部歩、浅野行蔵、曾根輝雄（北大院農・応用菌学）

Special Lecture I

Secondary metabolites: fundamental and niche-specific roles in fungal development and cell-cell interactions

B. Gillian Turgeon and Shinichi Oide
Department of Plant Pathology
334 Plant Science Bldg.
Cornell University
Ithaca, NY, 14853

An exhaustive characterization of the set of non-ribosomal peptide synthetase (*NPS*) genes of the corn pathogen, *Cochliobolus heterostrophus*, and the small molecule peptides produced by the enzymes they encode, has been undertaken to ascertain what peptide secondary metabolite products are doing for the fungal cell. Non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) are multimodular enzymes that make small non-ribosomal peptides (NRPs) through a mechanism, independent of organelles best known for protein synthesis, the ribosomes. To date, the NRPS method of peptide biosynthesis has been described for filamentous ascomycete fungi (and to a limited extent, for basidiomycete fungi) and for bacteria, only. The diversity of possible NRP products is potentially limitless as NRPs can be composed of D- and L-amino acids, protein and non-protein amino acids, hydroxy acids, ornithine, β -amino acids, and other unusual constituents. Furthermore, NRPs can be linear, cyclic, or branched cyclic, and may be modified by glycosylation, N-methylation or acylation. In addition to structural diversity, NRPs have an astonishingly broad spectrum of biological activities, many of which have been useful in medicine, agriculture, industry, and biological research. However, despite the fact that activities of the peptide products with respect to interactions with other organisms are well-documented, and certainly remarkable, to suggest that this is their primary function is likely incorrect. For example, only one of the 12 *C. heterostrophus* *NPS* genes is required for virulence on the host, maize. In fact, the physiological significance of these small peptides to the producing fungi is largely unknown. We document that NRPS enzymes are purveyors of small molecules for both basal metabolism and for specialized environmental niches. Certain *NPS*s are required for sexual reproduction, asexual reproduction, virulence, as nutrient ‘gatherers’ (such as iron-gathering siderophores), for responses to oxidative, nitrosative, nutrient, pH stress etc, for growth, and for hydrophobicity. Our results indicate that 8 of the 12 *C. heterostrophus* *NPS* genes are not conserved, while four are conserved in other ascomycetes, and we have examined functional conservation of conserved genes in the wheat pathogen, *Fusarium graminearum*, and the *Arabidopsis* pathogen, *Alternaria brassicicola*. Comprehension of secondary metabolite function, from the perspective of the fungal cell itself, impacts our understanding of evolution of fungal pathogenicity mechanisms by addressing how pathogens become pathogens.

Special Lecture II

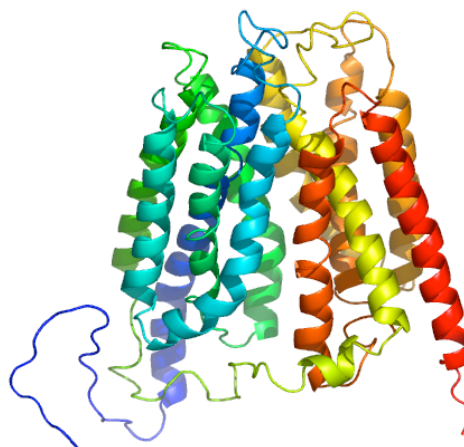
Fungal Nitrate and Nitrite Transporters: Insights into Structure and Function

Shiela E Unkles and James R Kinghorn,
University of St Andrews, United Kingdom

Nitrate is a major source of nitrogen for microbes and plants and it is a nutrient that most frequently limits their growth. In the natural environment, nitrate is the most ephemeral of inorganic nutrients, concentrations varying by as much as five orders of magnitude. Nitrate is readily leached from soils, contributing to eutrophication of natural water systems and simultaneously lowering nitrogen availability to land organisms. In addition, nitrate based fertilisers, widely used at around 10^{11} kg per annum to improve crop yield, have the inherent disadvantage of cost, globally costing roughly US\$50 billion. There are also health concerns as nitrogen oxides derived from nitrate may be generated in the human gut.

Nitrate is converted to nitrite by the enzyme nitrate reductase and then to ammonium by nitrite reductase activity. Ammonium is used for the production of organic nitrogen molecules including amino acids. Whilst there is considerable information regarding nitrate and nitrite reductases, there is significantly less on the transport of nitrate and nitrite into cells. This first step in the assimilation of nitrate to ammonium, involves the influx of nitrate into cells, an active process that may require up to 25 kJ mol^{-1} , depending upon external nitrate concentration. Two nitrate transporter proteins are present in *Aspergillus nidulans*, NrtA (formerly CrnA) and NrtB, and both are high-affinity systems. The *A. nidulans nrtA* gene was the first eukaryotic gene encoding high-affinity nitrate transporter to be isolated and has acted as a paradigm for such high-affinity systems, leading to the cloning and identity of orthologous genes from a number of species, including *A. oryzae* (which has a single nitrate transporter). A secondary structure model was proposed for the 57 kDa (507 amino acids) NrtA protein in which 12 hydrophobic transmembrane domains (Tm) in alpha-helical conformation, pass through the membrane connected by hydrophilic loops. The NrtA homologues belong to a distinct cluster (nitrate-nitrite porter family, TC 2.A.1.8) of the largest secondary transporter family known, the major facilitator superfamily (MFS: TC 2.A.1) that comprises a vast range of functionally diverse transporters, each containing motifs characteristic of the superfamily (Fig. 1, positions marked by MFS). Recently, the three dimensional structures of three bacterial MFS members have been determined, the oxalate (OxIT: TC 2.A.1.11.1), glycerol-3-phosphate (GlpT: TC 2.A.1.4.3) transporters and lactose permease (LacY: TC 2.A.1.5.1). Although the primary sequence similarity between these and NrtA is low, comparative modelling to these structures has allowed us to develop a three dimensional representation of NrtA (Fig. 1).

Fig. 1. Three dimensional representation of NrtA as viewed from the side within the plane of the membrane.



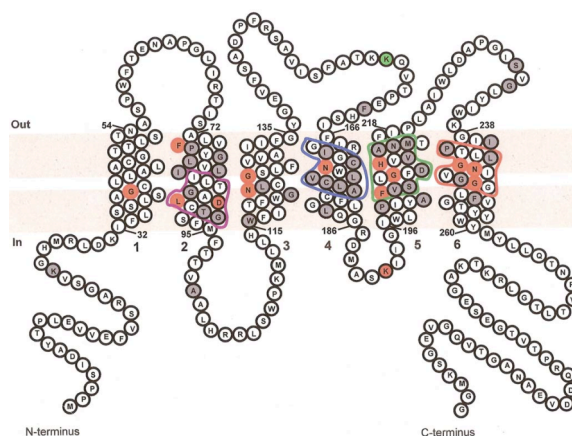
Several Tms of NrtA are predicted by helical wheel analysis to form amphipathic α -helices suggesting that the hydrophilic faces of such Tms could form the lining of an aqueous pore through which nitrate is channelled. Among the amino acids of these helices, are a number of residues that are highly conserved in all nitrate transporters, with at least 95% conservation in 52 proteins from archaeobacteria, eubacteria, fungi, algae and plants. Some of these amino acids are found within a motif present in all nitrate transporters,

F/Y/K-x3-I/L/Q/R/K-x-G/A-x-V/A/S/K-x-G/A/S/N-L/I/V/F/Q-x1,2-G-x-G-N/I/M-x-G-G/V/T/A which is not observed in any other classes of MFS proteins. This residue stretch has been referred to as the nitrate signature of which there are two copies within NrtA, located in Tm 5 and Tm 11. The first copy contains a highly conserved (48/52) polar asparagine residue, N168, while in the second motif, N459 is conserved in eukaryotes. Also prominent are two charged polar arginine residues, R87 and R368, which are completely conserved in both prokaryotes and eukaryotes, within helices Tm 2 and Tm 8, respectively. Towards gaining an understanding of the importance of residues and their role in the structure and function of this important anion transporter, we have altered these amino acids and characterised the resulting mutant strains using the short-lived tracer $^{13}\text{NO}_3^-$. Possible roles of such residues in the function of NrtA will be discussed as well as progress towards crystallographic structure determination.

The anion nitrite can also be used as a source of nitrogen by many bacteria, algae, fungi and plants. Certain nitrate uptake systems such as *A. nidulans* NrtA and NrtB have been shown to transport nitrite as well as nitrate. In addition, there are transporters that appear to transport nitrite, but not nitrate. These include *Escherichia coli* NirC, *Chlamydomonas reinhardtii* NaR1 and *A. nidulans* NitA (and *A. oryzae* NitA and NitB). Such proteins as belong to a family, quite separate from the MFS, namely the formate/nitrite transporter family (FNT: TC 2.A.44), and many are thought to transport nitrite and/or the structurally related formate. In contrast to the nitrate transporter group, members of the FNT family probably possess 6 Tms and are therefore much smaller (at the primary protein sequence level) than NNP proteins, the *A. nidulans* NitA protein possessing 310 residues. A secondary structure model of the *A. nidulans* 33.6 kDa NitA protein is given in Fig. 2. Multiple sequence alignments of 186 proteins have indicated several residues and motifs that are conserved within this family and therefore are likely to be involved in the function of these proteins. These are clear targets for analysis by mutagenesis followed by biochemical characterisation and this will be discussed. Unlike the MFS family, there are no crystal structures as yet for the FNT family and our progress towards this goal will be reported.

Fig. 2. Secondary structure model of NitA.

Conserved formate/nitrate motifs are outlined and conserved residues are shaded in red (>95%), green (charge conservation) or grey (>60%)



担子菌の生産するセルロース分解系酵素の多様性とその役割

信州大学工学部物質工学科

天野良彦、野崎功一、水野正浩、神田鷹久

1. はじめに

セルロースは生物圏において最も豊富に存在し、かつ再生可能なバイオマスである。これらは未利用であり、また十分な量が存在することから、食料やエネルギーそして環境問題を解決するための資源として期待されている。そこで、多くの研究者がセルロースのグルコースへの分解について研究してきている。なぜなら、グルコースは容易に多くの化成品に変換できるからである。しかしながら、バイオマスは直接燃焼する以外に、これらの目的には利用されていないのが現状である。これが利用されない理由のいくつかは、その変換にかかるコストや分解する酵素の触媒効率の低さにあると考えられる。研究者の夢は、短時間にこれらのバイオマスを分解できるスーパー酵素を作ることであろう。我々は酵素の効率を改善する手段として遺伝子工学やバイオインフォマティクスのような強力な技術を手に入れたが、バイオマス分解のためのスーパー酵素のイメージはまだ定かではない。むしろこれらの夢を追うよりも、地道ではあるがセルラーゼの構造と機能の関係や、相乗作用などの分解メカニズムに関して基礎的知見を得ることにより、前述の問題を根気よく解決していく必要がある。

2. 担子菌の生産する酵素の多様性

当研究室では、古くから担子菌の生産するセルロース分解系の酵素に関する研究を行ってきた。特にヒダナシタケ目のウスバタケ (*Irpex lacteus*) は、西澤先生（東京教育大学名誉教授）が昭和14年より研究を開始した菌であり、長年の歴史がある。この研究は、当時の中国での軍馬の飼料不足から、木質系飼料を開発できないかとの陸軍からの依頼によるものであったようだ（1）。本菌は、セルラーゼはもとより、その他の多糖類やタンパク質を分解する能力が高く、それらの酵素に関する精製やその性質に関する文献は数多く報告されている。最近では、遺伝子工学的手法が発達し、本菌の主成分である酵素群の遺伝子がクローニングされた。現在までに明らかになっているのは、GHファミリー5のエンドグルカナーゼ遺伝子1個、同6のセロビオヒドロラーゼ遺伝子1個、同7のセロビオヒドロラーゼ遺伝子3個、および酸化還元酵素であるセロビオース脱水素酵素1個である（2）。最近になって、担子菌 *Phanerochaete cryosporium* のゲノム情報が明らかとなり、担子菌も多くのセルラーゼ遺伝子を持つことが示唆された。おそらく、本菌も数多くのセルラーゼ遺伝子が存在すると考えられるが、菌体外に生産されるタンパク質のうちでは、上記のものの占める割合が圧倒的に高い。

3. セルラーゼ成分間の相乗作用

基質である天然のセルロースは種々の形態をもち、その多様性は結晶構造ばかりではなく、その分布においても認められる（3）。この基質構造の複雑さはセルラーゼの成分の多様性を生みだしているのかもしれない。多くの微生物が少なくとも2種以上の成分を生産しており、それらは相乗的にセルロース分解を触媒していることが報告されている（4）。また、それらの酵素は一次構造の比較およびその疎水性クラスター解析により12以上のグループに分類されている（5）。同じグルコシルヒドロラーゼ（GH）ファミリーに属するすべての成分は、グルコシド結合の加水分解に際して、同じ立体選択性を示すことが知られている。我々は、セルロース分解の相乗作用について、セルロース繊維の回転という観点から考察した。すなわち、最適な分解の時には、セルロース繊維の撚りが解れることから、繊維の末端がくるくると回転する現象を見出した。この現象について、上記の3つのファミリーに属する酵素の相乗作用を検討し、ファミリー7と5に属するエンドグルカナーゼとセロビオヒドロラーゼの相乗作用が強いことを報告している（6）。しかも、回転現象に

はその量比が重要であることが分かっている。

4. セルロース分解における他の酵素の関与

セルロース分解を行う典型的な生態系では、セルロースを分解する細菌や糸状菌が不溶性セルロースを細胞が利用できるグルコースやセロビオースのような可溶性の糖に変換するため、相乗的に働く酵素群を分泌している。セルロースを分解する微生物の中でも、白色腐朽菌や軟腐菌および少なくとも1種の褐色腐朽菌は、培地中に付随的にセロビオース脱水素酵素 (CDH) を生産する。CDHの生物学的な機能については未解明であるが、最近水酸化ラジカル生成系について支持する結果が報告されている。この生成ラジカルは、セルロース、ヘミセルロースおよびリグニンを修飾し分解することができるであろう。我々はCDHが *I. lacteus* の培養中にセルラーゼと共に分泌されることを確認しているので、 β -1,4-グルカナーゼを含めたセルロース分解酵素システムの相乗的な作用におけるCDHの生物学的な機能を研究すべきと考えた。我々の実験では、CDHと鉄イオンの還元システムで前処理したセルロースは、セルラーゼにとっては良い基質とならなかった。対照的に、CDHが共存する系では、セルロース分解酵素の能力は増大した。さらに、CDHと β -グルコシダーゼおよびセルラーゼを含むシステムでは、セルラーゼのみの場合より、異なる結晶構造をもつセルロースに対して、より効果的に分解することがわかった。現在、セルロース分解に果たすCDHの役割を確認するため、CDH還元システムを含むセルロース分解系で処理したセルロースの形態や物理化学的性質の変化について検討している。

5. セルロース酵素分解を助ける他の因子の解明の重要性

多くの研究者が、ドメインシャッフリングや部位特異的変換などにより、酵素の触媒活性を改良するために研究している。また、自然界から耐熱性のセルラーゼのような特異的な酵素を生産する微生物もスクリーニングされてきている。しかしながら、セルラーゼのみでの分解では、結晶性セルロースはあまりにも堅固な構造をしているので、前処理が必要であろう。一方、担子菌や高熱性細菌などの微生物の菌体そのものを用いた時には、セルロースは完全に可溶化できる。それらの細胞は、セルラーゼ以外に他の酵素や物質を生産し、これらがセルロース分解に関与しているかもしれない。最終的には、セルラーゼを含めた全体の酵素分解系としてセルロース分解を考察すべきと考える。

- (1) 西澤一俊: *Irpex lacteus* セルラーゼの初期酵素学的研究の歩み (その1)。 (2004) (株) 富士経済付属阿部研究所研究報告, 97, 1-14.
- (2) 天野良彦、神田鷹久: 白色腐朽菌 *Irpex lacteus* のバイオマス分解に関わる酵素系 (2004) *Cellulose communication*, 11(4), 175-180.
- (3) Hackney, J.M., Atalla, R.H., VanderHart, D.L. (1994) *Int. J. Biol. Macromol.* **16**, 215-218
- (4) Nisizawa, K., Tomita, Y., Kanda, T., Suzuki, H., Wakabayashi, K. (1972) in *Fermentation technology today*. Terui G, (ed), Society of Fermentation Technology, Osaka, pp. 719-725.
- (5) <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html>.
- (6) Amano, Y., Kanda, T. (2002) *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 14(75), 27-34.

Variations of cellulases and related enzymes from Basidiomycetes and their roles in cellulose degradation

Yoshihiko Amano, Kouichi Nozaki, Masahiro Mizuno, Takahisa Kanda

Department of Chemistry and Material Engineering Faculty of Engineering, Shinshu University

選択的白色腐朽菌による木質バイオマスのエネルギー・化学資源化

京都大学 生存圏研究所
渡辺 隆司、渡邊 崇人、本田 与一

1. はじめに

急激な人口増加と化石資源の消費に伴う CO₂ 濃度の増加を背景として、再生産可能な資源であるバイオマスから有用なエネルギー・化学原料を生産することが求められている。しかしながら、木材などのリグノセルロースの酵素糖化・発酵には、リグニンにより被覆された細胞壁多糖を露出させる前処理が必要であり、このプロセスが成分利用の大きな障害となっている。こうした点を背景として、我々は木材中のリグニンを高選択的に分解する選択的白色腐朽菌(リグニン分解性担子菌)の生物機能を利用した木質バイオマス変換法を開発するとともに、機能増強に向けた研究を行っている。ここでは、選択的白色腐朽菌の木質バイオマス変換への応用等について述べる。

2. 木質バイオマスの酵素糖化前処理

木材組織の中でセルロース、ヘミセルロースは、リグニンにより被覆されているため、これらの細胞壁多糖をセルラーゼ、ヘミセルラーゼで加水分解するためには、木材細胞壁の密なパッキングを破壊して細胞壁多糖を露出させる前処理が必要となる。蒸煮、水蒸気爆砕、アンモニア爆砕(AFEX)、CO₂爆砕、蒸煮、粉碎、ソルボリシス、オゾン酸化、酸処理、アルカリ処理、マイクロ波照射、電子線照射、 γ 線照射、木材腐朽菌処理、など様々な前処理法がこれまで検討されてきた。木材酵素糖化前処理法の中で、爆砕、蒸煮、マイクロ波照射、ソルボリシス等熱化学的手法の多くは、一般に広葉樹材に比較して針葉樹材に対する前処理効果が低い。針葉樹の中でも、我が国の人口林の約6割を占めるスギ材は特に前処理効果を得ることが難しい。例えば、マイクロ波水熱反応は、広葉樹ブナ材に対しては93%(多糖当たりの還元糖収率)という高い酵素糖化率を与えるが、針葉樹ヒノキに対しては61%、スギ材に対しては、最大でも36%の酵素糖化率しか与えない¹⁾。こうした問題を打開するため、針葉樹材の爆砕前処理では、硫酸やSO₂、有機酸、ルイス酸、アルカリ過酸化水素等を触媒として使用する方法が検討されてきた。しかしながら、有害な薬品を使用することは酵素糖化法のメリットを損なうことになる。また、熱化学的処理においては、糖骨格の熱分解が起こる温度と前処理効果が得られる温度域が近接しているため、前処理温度を下げて発酵阻害物質の生成を最小限に抑えることが望ましい。こうした点を背景として、白色腐朽菌によるリグニン分解反応をスギなどの木質バイオマスの酵素糖化前処理法として利用することが注目されている。ここでは、白色腐朽菌を用いたバイオマス糖化前処理法とその関連研究を紹介する。

3. リグノセルロースの酵素糖化・エタノール発酵のための白色腐朽菌前処理

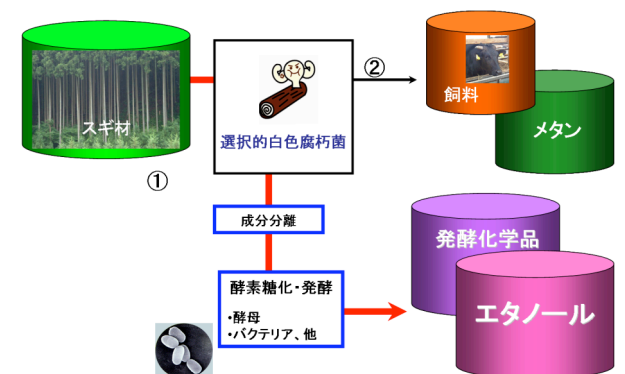


図1 選択的白色腐朽菌を用いたスギなどの木材の変換

リグニンを常温で分解する白色腐朽菌（リグニン分解性担子菌）による前処理は、処理時間が長いという欠点はあるものの、有害な薬品を使用しないこと、エネルギーインプットが小さいこと、菌株によっては針葉樹材に対しても高い効果を与えることから注目される。白色腐朽菌は、一般にリグニンとセルロースを同時に分解する。このような非選択的の白色腐朽菌による菌処理は、バイオマス変換の前処理としては利用価値が低い。これに対し、*Ceriporiopsis subvermisporea* 等の選択的の白色腐朽菌と呼ばれる菌は、セルロースの損傷を最小限に抑えつつ、リグニンを高選択的に分解する能力を有しており、菌処理を組み込んだパルプ化（バイオパルピング）に関連して、研究が進められてきた^{2,3)}。選択的の白色腐朽菌では、木材の細胞同士を接着している細胞間層のリグニンが腐朽初期から分解されるため、この菌で2-4週間処理した後に機械的なパルプ化を行うと重量減少をそれほど伴うことなく最大47%ものエネルギー削減効果が得られる。選択的の白色腐朽菌処理を、クラフト法やサルファイト法などケミカルパルプ化と組み合わせると、パルプ化に必要な薬品投入量を減少させることができる。

白色腐朽菌処理は、バイオパルピングの他、木材および非木材リグノセルロースの酵素糖化・発酵前処理に利用できる（図1）。筆者らは、*C. subvermisporea* などの選択的の白色腐朽菌による木材腐朽とソルボリシスを組み合わせた木材の糖化・エタノール発酵のための前処理法を検討している⁴⁻⁸⁾。白色腐朽菌でブナ材チップを2週間から8週間腐朽させ、腐朽材を180℃でエタノリシスし、得られた不溶性パルプ画分をセルラーゼと酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で併行複発酵した。使用した白色腐朽菌の中では、リグニンとセルロースを同時に分解する白色腐朽菌 *Coriolus versicolor* や *Pleurotus ostreatus* に比べて、リグニン分解の選択性が高い *C. subvermisporea* が高い発酵収率の増大効果を与えた。選択的の白色腐朽菌 *C. subvermisporea* で8週間処理したものは、菌未処理のものに比較し、1.6倍エタノール収率を増大させた⁴⁾。こうした菌処理効果は、針葉樹において顕著に現れる。針葉樹スギ材チップを200℃、1時間の条件でエタノリシス処理し、得られたチップをセルラーゼで酵素糖化すると、広葉樹ブナ材の場合とは対比的に、7%の酵素糖化率しか与えない。しかしながら、スギ材を *C. subvermisporea* であらかじめ8週間腐朽させた後にエタノリシス処理をすると、酵素糖化率は菌未処理の7倍以上に上昇した。選択的の白色腐朽菌処理を組み込むことにより、硫酸などの化学触媒を使用することなく針葉樹のエタノリシスバイオリファイナリーが可能となる。

国内で森林バイオマスを白色腐朽菌で処理するためには、国産の菌を利用することが望ましい。このため、スギ材の糖化前処理に効果のある白色腐朽菌を分離・選抜し、スギ材からのエタノール生産に関する研究を進めている⁹⁾。分離した新規株は、スギ材に対する重量減少率が *C. subvermisporea* より少ないにもかかわらず、エタノリシスや高沸点アルコールを用いるソルボリシスでは、*C. subvermisporea* を上回る前処理効果を示した。本菌は、マンガンペルオキシダーゼを生産し、木材中のリピッドを減少させる。現在、新規株とマイクロ波ソルボリシスを組み合わせた前処理法の開発

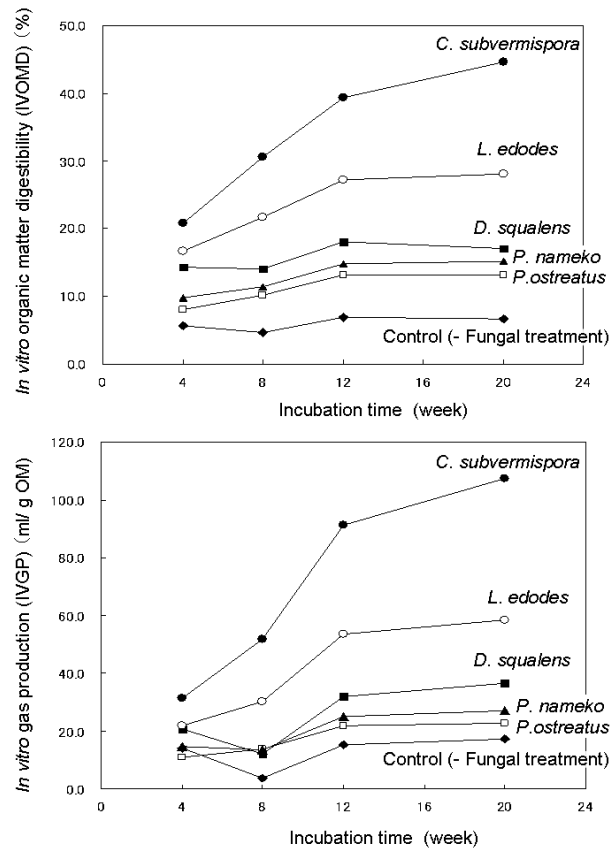


図2 白色腐朽菌処理スギチップのルーメン液による *in vitro* 有機物消化率 (IVOMD) とガス発生量 (IVGP)¹³⁾

研究を実施中である。マイクロ波照射装置は、2.45GHz と 5.8GHz の照射部を備え、3次元電磁界シミュレーションでキャビティを設計した装置を開発した。本装置は照射過程をコンピュータプログラムで制御する。

白色腐朽菌処理は、木材の他、非木材系リグノセルロースであるオイルパームの空果房(EFB)に対しても脱リグニンによる糖化・発酵促進効果を示す¹⁰⁾。白色腐朽菌処理は、バガスの糖化・発酵前処理にも効果を示す¹¹⁾。

木質バイオマスの微生物発酵においては、発酵阻害の低減も大きな課題である。発酵阻害物質の除去にはオーバーライミング、活性炭やイオン交換樹脂による吸着、減圧除去、酸化酵素による処理など様々な方法が知られている。*C. subvermispora* は木材にもともと含まれていた脂肪酸などの発酵阻害物質を分解除去する。また、白色腐朽菌処理は、菌処理と組み合わせる爆砕やソルボリシスなどの前処理の温度を下げることによって、前処理によって生成する発酵阻害物質の量を低減させる。発酵阻害の低減には、白色腐朽菌が生産するラッカーゼの利用も検討されている。42°Cで生育可能な耐熱性白色腐朽菌 *Trametes versicolor* RC3 株由来のラッカーゼは、発酵阻害の低減に高い効果を示す。ペントース発酵性酵母 *Pichia stipitis* によるブナ材エタノリシス可溶性画分のエタノール発酵において、RC3 由来のラッカーゼ処理は、エタノール収率を 15%から 78%へ向上させた。RC3 由来のラッカーゼの中の酸性アイソザイムについては、遺伝子クローニングとヒラタケ形質転換系を利用した異種発

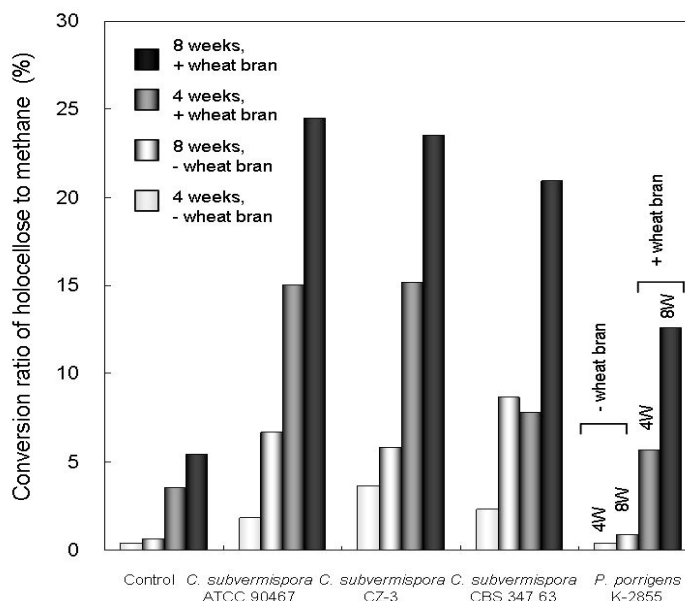


図3 白色腐朽菌処理スギチップのメタン発酵¹⁴⁾

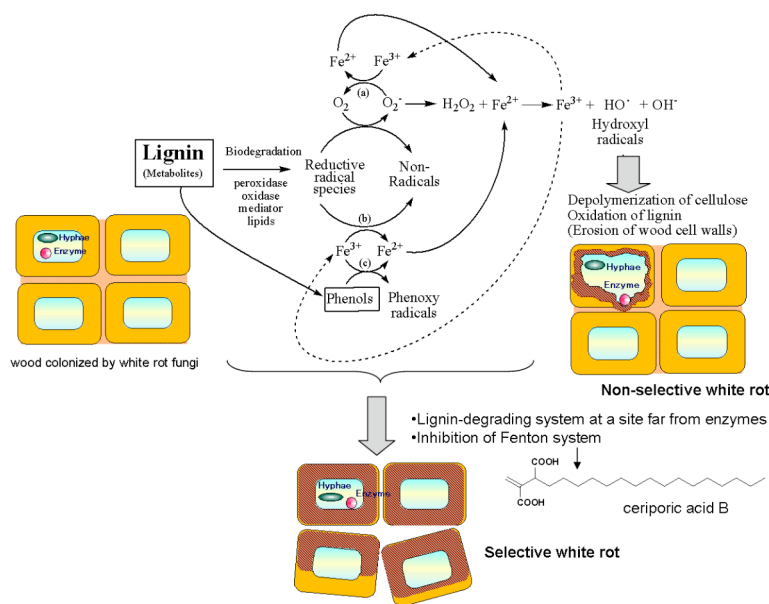


図4 選択的および非選択的的白色腐朽菌の木材腐朽様式^{7,8,19)}

酵素は分子量が大きいため、木材細胞壁内に侵入できない。非選択的的白色腐朽菌は、フェントン反応によりヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)を生成させて木材細胞壁を侵食し、大きく開いた孔に酵素が侵入してリグニンとセルロースを同時分解する。選択的的白色腐朽菌は、木材細胞壁に酵素や菌糸を進入させることなく、酵素から離れた場所のラジカル発生系でリグニンを高選択的に分解する。 Fe^{3+} の還元代謝物による制御が選択性を決める大きな鍵となる。

現に成功している¹²⁾。本ラッカーゼは、*T. versicolor* の LAC4 と 81%の相同性をもつ新規な酵素である。

5. 白色腐朽菌処理木材の家畜飼料化とメタン発酵前処理

選択的白色腐朽菌処理は、木材の家畜飼料化やメタン発酵前処理に高い効果を示す。これまで、木材を粗飼料化するために爆砕処理、粉碎処理が検討されてきたが、爆砕処理および粉碎処理木材の反芻家畜による消化率は低い。特に、爆砕では針葉樹材に対する処理効果が低く、また家畜の嗜好性を損なうアルデヒド類が生成する。そこで、針葉樹スギ材から栄養価の高い家畜粗飼料を生産するために白色腐朽菌処理スギ材の反芻家畜ルーメン液による消化性試験を行った。飼料化はリグニンによる細胞壁多糖の被覆を破壊して、反芻家畜がバイオマス中のセルロースやヘミセルロースを分解・利用しやすくする処理であり、糖化前処理とみなすこともできる。反芻家畜は4つの胃をもち、そのうちの第一胃（ルーメン）中には植物細胞壁多糖の分解力をもつ嫌気性微生物群が棲息する。飼料化の評価法の中で、反芻家畜の第一胃からルーメン液を体外に取り出し、それを用いて *in vitro* で有機物の可溶化率やガス発生量を測定する方法は、少量のサンプルで簡便に試験できることから、粗飼料の消化性評価法として広く利用されている。この方法では、可溶化した糖が栄養源として利用されるとは限らないため、有機物の可溶化率（あるいは不溶性残滓の残存率）と同時に、ガス発生量を測定することが望ましい。スギ材を、白色腐朽菌 *C. subvermispota*、シイタケ (*Lentinula edodes*)、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*)、ナメコ (*Pholiota nameko*) で菌処理し、腐朽材の反芻家畜ルーメン液による *in vitro* 消化性試験を行った¹³⁾。その結果、白色腐朽菌を接種していないスギ材の有機物消化率は、4.7-6.8%の間であったのに対し、*C. subvermispota* を培養したスギ材の消化率は、44.6%まで上昇した(図2)。これは、日本標準飼料成分表に記載されている蒸煮爆砕処理スギ材の TDN (消化できる栄養分総量) 11.0%の4倍に当たる。この実験結果は、スギ材が *C. subvermispota* 処理によって、ルーメン微生物の植物細胞壁分解酵素群の作用を受けやすい状態に変化したことを示しており、選択的白色腐朽菌処理をスギ材の様々な発酵生産に利用できることを示す。

実際、*C. subvermispota* によるスギ材処理は、下水汚泥を用いたスギ材のメタン発酵前処理にも効果を示した¹⁴⁾。小麦フスマを含むスギ材チップに *C. subvermispota* を植菌し、8週間培養すると、腐朽スギ材の多糖（ホロセルロース）あたり 35%、原料スギ材あたり 25%の転換効率でバイオガス（メタン濃度 55-60%）が生成した(図3)。腐朽処理においては、小麦フスマの添加が前処理効果を高めた。この腐朽効果と

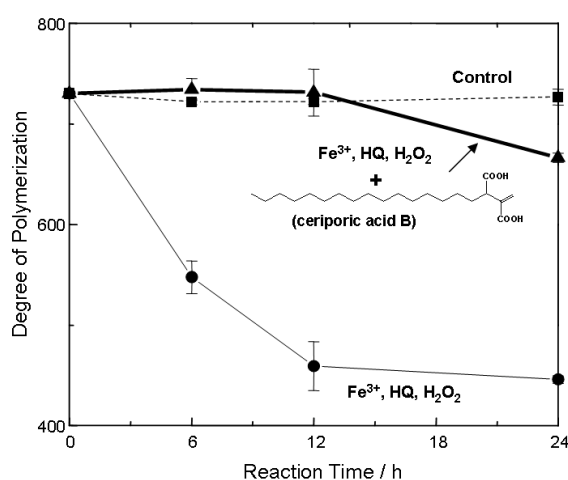


図5 選択的白色腐朽菌菌体外代謝物 ceriporic acid によるフェントン反応系におけるセルロース分解の抑制¹⁹⁾

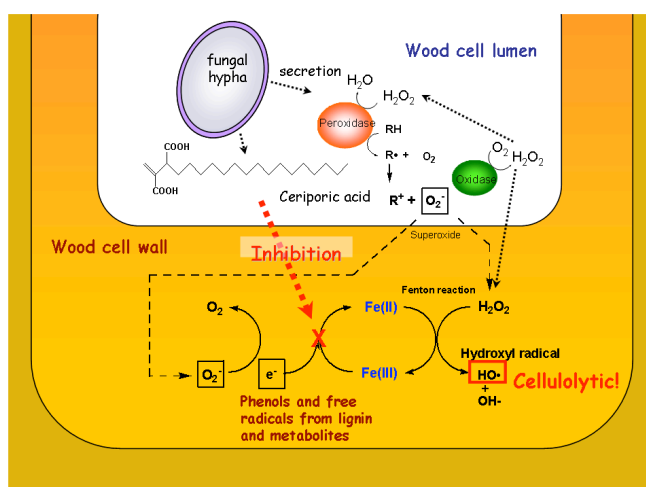


図6 選択的白色腐朽菌の菌体外代謝物 ceriporic acid によるセルロース分解の抑制機構²⁰⁾

β -O-4 アリルエーテル結合の切断率には相関が認められた。白色腐朽菌 *C. subvermispora* やシイタケは、バガスの飼料化にも効果を示す¹⁵⁾。

6. 選択的白色腐朽菌によるリグニン分解機構

白色腐朽菌は、菌体外にリグニンやセルロースの分解酵素を分泌する。ところが、これらの酵素の分子サイズは木材細胞壁に元々存在している細孔の直径より大きいために、分泌された菌体外酵素はそのままでは木材細胞壁中に進入できない。このため、多くの白色腐朽菌は、活性酸素であるヒドロキシルラジカル(OH)を遷移金属のレドックス反応を介して発生させることにより木材細胞壁中の多糖をぼろぼろにし、結果として開いた木材細胞壁の大きな孔に自分の出す菌体外酵素を進入させる(図4)。これに対し、*C. subvermispora* 等の選択的白色腐朽菌は、木材腐朽がかなり進行した段階になっても、自分の分泌した菌体外酵素を木材細胞壁内に進入させることなく、酵素から遠く離れた細胞間層や細胞壁深層のリグニンを低分子代謝物を利用して高選択的に分解する³⁾。即ち、選択的白色腐朽菌はリグニンのラジカル分解を止めることなく、酸素および鉄イオン存在下でOHの生成を抑制する機構をもつ。我々は、選択的白色腐朽菌の培養物から鉄のレドックス反応を抑制することによりOHの生成を阻止する新規代謝物を単離した(図5,6)¹⁵⁻¹⁸⁾。この物質は、鉄イオン、 H_2O_2 、ヒドロキノンなど Fe^{3+} 還元剤存在下において、フェントン反応によるOHの生成とセルロースの解重合を強力に抑制する¹⁹⁾。

選択的白色腐朽菌 *C. subvermispora* は、木材腐朽の初期に飽和および不飽和脂肪酸とマンガネールオキシダーゼ(MnP)を産生し²⁰⁾、MnPや拡散可能な Mn^{3+} 錯体を開始剤とする脂質過酸化によりアシラジカルをchain carryingラジカルとするラジカル連鎖反応を起こす^{21,22)}。MnPによる脂質過酸化は非フェノール性リグニンモデルを分解することから²³⁾、本菌のリグニン分解機構の一つとして注目されている。また、脂質過酸化中間体のモデルである有機ヒドロペルオキシドを金属錯体と反応させてカーボンセンターラジカルを生成させると、非フェノール性合成リグニンが低分子化するみでなく²⁴⁾、木材細胞壁および細胞間層中のリグニンが分解してパルプ化が起き、木材細胞が剥離する²⁵⁾。脂質過酸化などの選択的白色腐朽菌の機能解析と能力増強のため、*C. subvermispora* の不飽和脂肪酸生合成酵素である $\Delta 9$ -及び $\Delta 12$ デサチュラーゼの遺伝子クローニングと同菌の形質転換系の開発、リグニン分解に直接関与するラジカル種の反応解析を行っている。

7. おわりに

選択的白色腐朽菌 *C. subvermispora* は、ゲノムが未解読であり、形質転換系の構築が難しく、リグニン分解には酵素の直接反応ではなく、代謝物の反応が関与することから、その機能解析とリグニン分解能の増強は容易ではない。しかしながら、この菌は、リグニンを酵素から離れた場で高選択的に分解するユニークな菌体外のラジカル制御システムをもっており、また非選択的白色腐朽菌と異なり、木質バイオマス変換への幅広い応用展開が可能である。基礎・応用の両面から選択的白色腐朽菌に関する研究を着実に進めることが必要と思われる。

参考文献

- 1) 越島哲夫、真柄謙吾：木材研究・資料 **24**, 1-12 (1988).
- 2) Akhtar, M., Scott, G. M., Houtman, C. J. : *Abst. 8th Intern. Conf. on Biotechnol. In the Pulp and Paper Industry*, 39-41 (2001).
- 3) Messner, K., Srebotnik, E.: *FEMS Microbiol. Rev.* **13**, 351-364 (1994).
- 4) Ito, H., Wada, M., Honda, Y., Kuwahara, M., Watanabe, T.: *J. Biotechnol.*, **103**, 273-280 (2003).
- 5) 渡辺隆司：バイオマスハンドブック、オーム社, 176-183 (2002).
- 6) 渡辺隆司：ケミカルエンジニアリング, **48**, 30-35 (2003)
- 7) 渡辺隆司：エコバイオエネルギーの最前線 - ゼロエミッション型社会を目指して -、シーエムシー出版、東京、pp. 68-78 (2005).
- 8) 渡辺隆司：木質系有機資源の新展開、シーエムシー出版、東京、pp. 68-79 (2005).
- 9) 渡辺隆司：田邊俊朗、馬場保徳、矢野健太、渡邊崇人、本田与一、岡田俊樹、白井伸明：平成17年度日

本生物工学会講演要旨集、183 (2005).

- 10) Syafwina, Watanabe, T., Honda, Y., Kuwahara, M., Watanabe, T. : *Proc. The Fifth Intern. Wood Sci. Symp.*, 313-316 (2004).
- 11) Samsuri, M., Prasetya, B., Hermiati, E., Idiyanti, T., Okano, K., Syafwina, Honda, Y., Watanabe, T. : *Proc. The Fifth Intern. Wood Sci. Symp.*, 317-323 (2004).
- 12) 西圭介、中本光架、Khanongnuch, C.、渡邊崇人、本田与一、渡辺隆司 : 2006 年度農芸化学会大会講演要旨集、275 (2006).
- 13) Okano, K., Kitagawa, M., Sasaki, Y., Watanabe, T. : *Animal Feed Sci. and Technol.*, **120**, 235-243 (2005).
- 14) Amirta, R., Tanabe, T., Watanabe, T., Honda, Y., Kuwahara, M., Watanabe, T.: *J. Biotechnol.* **123**, 71-77 (2006).
- 15) Okano, K., Iida, Y., Samusuri, M., Prasetya, B., Usagawa, T., Watanabe, T.: *Animal Sci.J.*, **77**, 308-313 (2006).
- 16) Enoki, M., Honda, Y., Kuwahara, M., Watanabe, T.: *Chem. Phys. Lipid*, **120**, 9-20(2002).
- 17) Watanabe, T., Teranishi, H., Honda, Y., Kuwahara, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 918-923 (2002).
- 18) Amirta, R., Fujimori, K., Shirai, N., Honda, Y., Watanabe, T. : *Chem. Phys. Lipids*, **126**, 121-131 (2003).
- 19) Rahmawati, N., Ohashi, Y., Watanabe, T., Honda, Y., Watanabe, T.: *Biomacromolecules* **6**, 2851-2856 (2005).
- 20) Enoki, M., Watanabe, T., Nakagame, S., Koller, K., Messner, K., Honda, Y., Kuwahara, M.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **180**, 205-211 (1999).
- 21) Watanabe, T., Katayama, S., Enoki, M., Honda, Y., Kuwahara, M.: *Eur. J. Biochem.*, **267**, 4222-4231 (2000).
- 22) Watanabe, T., Shirai, N., Okada, H., Honda, Y., Kuwahara, M.: *Eur. J. Biochem.*, **268**, 6114-6122 (2001).
- 23) Jensen, K. A., Bao, J. R. W., Kawai, S., Srebotnik, E., Hammel, K. E.: *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3679-3686 (1996).
- 24) Watanabe, T., Koller, K., Messner, K. : *J. Biotechnol.*, **62**, 221-230 (1998).
- 25) Messner, K., Fackler, K., Lamaipis, P., Gindl, W., Srebotnik, E., Watanabe, T. : *ACS Symposium Series* **845**, 73-96 (2003)

Conversion of wood biomass into energy and chemical resources by selective white rot fungi

Takashi Watanabe, Takahito Watanabe, Yoichi Honda

Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University

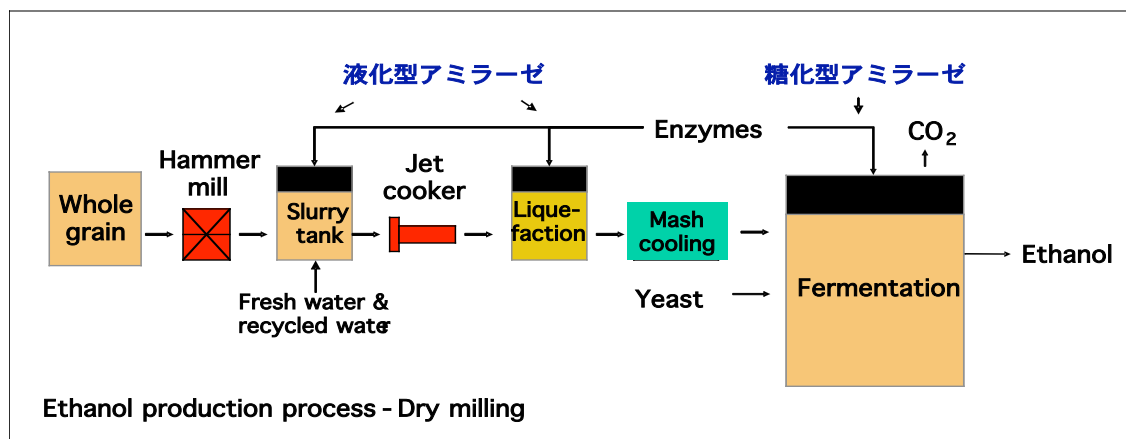
バイオエタノール生産に利用される糸状菌由来酵素
ノボザイムズ ジャパン株式会社 研究開発部 高木 忍

はじめに

世界的にみて、バイオマス燃料の利用は現在急速に拡大しつつあり、バイオエタノールやバイオジゼル生産量は年間約10～20%の伸びを示している。現在これらのバイオマス燃料は、食糧・飼料となる植物原料から生産されているが、将来は非食糧原料の利用が重要視されると考えられる。今回は、現在または将来のバイオエタノール生産に利用される糸状菌由来の酵素を紹介する。

1) 澱粉分解酵素

澱粉原料を蒸煮・糊化後アミラーゼにより糖化しブドウ糖・果糖等を製造するプロセスは、1970年代に確立し以来ほぼ変わることなく利用されている。現在米国では、このプロセスを応用して、とうもろこし原料よりバイオエタノールを生産している。

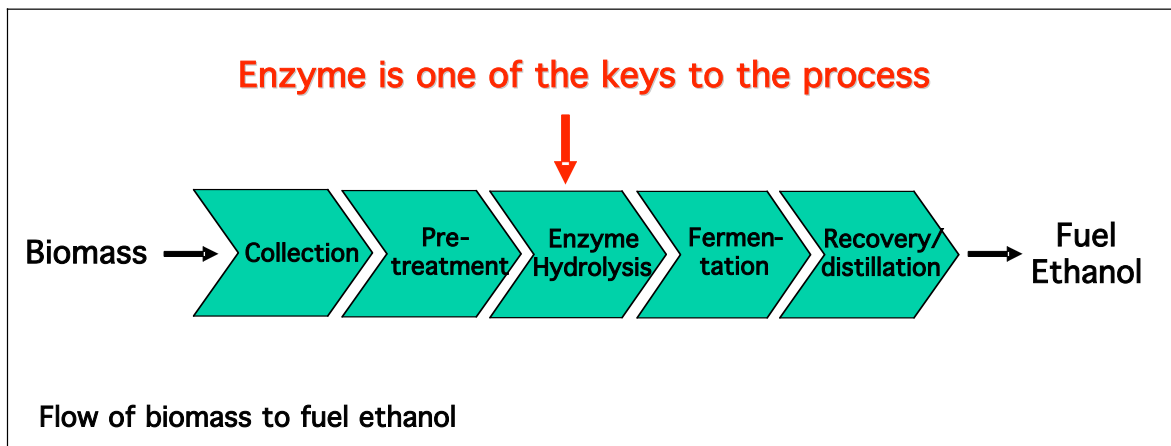


ここで利用される液化型アミラーゼや枝切り酵素は細菌由来であるが、糖化型アミラーゼ(グルコアミラーゼ)は *Aspergillus niger* や *Rhizopus* 属菌など糸状菌由来の酵素である。近年、無蒸煮澱粉よりエタノールを生産するプロセスが開発された。実用化に成功したのは米国のエタノールメーカーで、この実用化に寄与したのが弊社開発の改良型糸状菌由来アミラーゼである。これは、まず澱粉吸着ドメイン(Starch binding domain)を改良し、さらに触媒ドメインにも改良を加えて得た酵素である。この新規開発酵素により、プロセスに必要な酵素添加量を実用化レベルまで低減することに成功した。この新しいエタノール製造プロセスは主に米国内で拡大しつつある。

2) リグノセルロース分解酵素

現在米国で行われているとうもろこし原料からのエタノール生産は、飼料用原料の確保を考慮すると2012年には限界に達すると見られている。そのため米国政府は、未利用資源であるリグノセルロース系バイオマスを原料としたバイオエタノール生産を2013年までに実用化することを目指して、現在盛んに研究助成を行っている。産業用酵素メーカーとしての弊社米国支社は、エネルギー省DOEより研究委託助成を受け、リグノセルロース分解用の *Trichoderma reesei* 由来セルラーゼの改良を行った。使用した基質は、共同研究先である国立エネルギー再生研究所 NREL から供給された前処理済みのとうもろこし廃棄物(corn storver)である。4年間にわたる研究の成果として、当初の目標であったエタノール

製造にかかる酵素コストの 10 倍削減（10分の1にすること）を大きく上回り、NREL による前処理技術の改良と合わせて最終的に酵素にかかるコストを 30分の1に低減することに成功した。酵素側の改良点は、おもにセルラーゼに含まれる酵素成分の構成比の改良(β -グルコシダーゼの比率を向上)、他のバイオマス分解糸状菌より発見された分解活性向上因子、酵素製造プロセスの改良による製造コストの削減などによる。現在は、5年後の実用化を目指し、各国の共同研究先とともに実証試験を行っている。



Fungal enzymes used for Bio-ethanol production

Shinobu Takagi

Novozymes Japan Ltd. R&D

高機能型セルラーゼ高生産 *Trichoderma reesei* 株の構築に向けて

森川 康、岡田宏文、小笠原 渉（長岡技術科学大学生物系）

〔はじめに〕

セルロース系バイオマス（リグノセルロース）からの糖生産は、現在炭酸ガス増加抑制を目指した燃料エタノールなどのバイオマスエネルギーに焦点が当てられているが、石油枯渇を考慮した中長期的には、地球規模での食糧・食品や化学工業原料の生産に必要な技術として非常に重要となる（バイオリファイナリー）。セルロースの糖化は長い歴史のある成熟した酸糖化に代わって、今後は改良の余地が残っているセルラーゼによる酵素糖化の出番が期待されている。

セルロース系バイオマスはセルロースが結晶構造を取っていることに加えて、ヘミセルロースやリグニンが複雑に絡み合った構造を有しているため、セルラーゼによる酵素糖化では、前処理および大量のセルラーゼが必要という課題が工業化を阻んでいる。

Trichoderma reesei（これまで不完全菌に分類されていたが、有性世代 *Hypocrea jecorina* が見出された）は野生株の発見から60年の歴史があり、結晶セルロースを効率よく分解可能な大量のセルラーゼを分泌することから、セルロースの酵素糖化には欠かせない糸状菌である。*T. reesei* のセルラーゼに関して、個々のセルラーゼ成分の酵素化学的性質、構造機能相関、酵素およびその遺伝子の発現制御機構などに関して無数の報告がある。しかし、昨年ゲノム配列が公表されたことから、これからの研究の方向性や進行速度は新しい段階に入ったと考えられる。

筆者等の研究グループでは、*T. reesei* の生産する多数のセルラーゼ・キシラナーゼの性質やそれら遺伝子の異種宿主発現とタンパク質工学的改変を進める一方、セルラーゼ（およびキシラナーゼ）の誘導発現機構の解明に取り組んできた。ここでは、セルロース系バイオマスの酵素糖化の実現に向けた取り組みに絞って、これまでの結果と今後の計画を述べたい。

〔個々のセルラーゼ遺伝子の異種宿主発現と進化分子工学的改変〕

1) *T. reesei* は多数のセルラーゼを分泌するので、個々のセルラーゼの性質を解明するためには、セルラーゼを生産しない異種宿主（あるいは生産しない条件）で発現させる必要がある。表に示したように、これまでに *T. reesei* の生産する主要なセルラーゼ・キシラナーゼの異種宿主での発現を行い、組換え酵素の性質あるいはセルロース分解における協奏作用を検討してきた。最終的な目標はセルロース分解における主要セルラーゼ成分の最適比率を決定することである。

2) これらの遺伝子を用いてタンパク質工学的に改変を試み、若干の改良酵素を調製した。しかし、

この方法は構造機能相関等の研究には有効であるが、比活性の増強等に対する指針を得ることは困難であったため、現在は進化分子工学的改変を試みている。改変には多数の変異ライブラリーの構築が可能な大腸菌や酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) での発現が必要であるため、EG

Trichoderma reesei 由来セルラーゼ・キシラナーゼの異種宿主発現

GHF	<i>T. reesei</i>		<i>E. coli</i>		<i>Sch. pombe</i>		<i>P. pastoris</i>		<i>A. oryzae</i>	
	Mr (kDa)	Mr (kDa)	発現量 (μg/ml)	発現量 (μg/ml)	Mr (kDa)	発現量 (μg/ml)	Mr (kDa)	発現量 (μg/ml)	Mr (kDa)	発現量 (μg/ml)
Cellulohydrolase										
CBH I	7	68	—	—	—	—	—	—	75	460
CBH II	6	58	—	—	70,72	130	—	—	70-110	約100
Endoglucanase										
EG I	7	54	—	—	N.D.	15	—	—	58	1030
EG II	5	50	N.D.	trace	56	440	—	—	—	—
EG III	12	25	25	36*	29	330**	(56 440)***	—	—	—
EG IV	61	56	—	—	60	約100	—	—	—	—
EG V	45	36	—	—	N.D.	trace	—	—	50-55	N.D.
Xylanase										
XYN I	11	19	—	—	21	30	—	—	—	—
XYN II	11	21	21	約550*	21,28	170	—	—	—	—
XYN III	10	32	32	約50*	—	—	—	—	—	—

* Inclusion bodyとして発現 ** シグナルペプチドをKRCBIIIに変更 ***キメラEG III (CBD II-EG III) N.D.: not determined

I (*S. cerevisiae*)、EG II および EG III (大腸菌) に対して、エラーブローン PCR 法による改変を進めている。改変のモデルとして先行している EG III では、発現量増大、比活性向上および耐熱性向上などの興味深い変異体も取得している。

〔*T. reesei*の相同組換えを利用したセルラーゼ誘導制御機構の解明〕

もう一つの研究の中心はセルラーゼの誘導制御機構に関する研究である。*T. reesei*は、セルロースとその誘導体およびラクトースやソルボースの存在下で、セルラーゼを誘導する。この誘導機構の詳細はほとんど解明されておらず、ACE II が唯一の特異的な転写活性化因子として報告されているが、少なくとも7種のセルラーゼ遺伝子の転写に関して、①なぜ同時に誘導が開始されるのか、②なぜ転写量が大きく異なるのか、などの理由は全く不明である。

そこで、*gus*をレポーター遺伝子として、転写量の少ない(アクチンの発現量よりも多い)EG III、およびセルラーゼと同挙動をするキシラナーゼ III の両遺伝子の上流配列を欠失変異あるいは領域や点変異を行い、相同組換えによって解析している。現在誘導転写に重要な領域の特定や活性化因子 ACE II だけで説明不可能な現象を見出している。今後、これらの領域を含めて、目的のセルラーゼ比率に見合った発現量を達成させることを目標に検討していく予定である。

〔高機能性セルラーゼ高生産 *T. reesei* 株の構築に向けて〕

以上のセルロース分解における各セルラーゼ成分の最適比率の検討、各成分の改変、誘導調節機構の解明を組み合わせることによって、相同組換えによる高機能型セルラーゼ高生産変異株の構築が可能になると考えている。

従来、大量に発現している CBH I のプロモーターを利用した異種酵素タンパク質発現が試みられているが、いずれも CBH I ほどの大量発現に成功していない。上記の技術は異種酵素タンパク質の大量発現を行う際にも適用できるものと期待している。

また、*T. reesei*セルラーゼに関する研究およびセルラーゼ生産についてはほとんどが液体培養で行われてきた。これはセルロース系バイオマスからの糖生産を考えた場合は液体培養が必然であるためであろう。このような液体培養での成果に加えて、*Aspergillus* 属で明らかになりつつある固体培養と液体培養での発現調節機構の差異を *T. reesei* に適用させることによって、高機能型 *T. reesei* 変異株の構築を進めることが可能と考え、現在研究をスタートさせた。

Construction of highly functional cellulase-highly producing *Trichoderma reesei* mutants

Yasushi Morikawa

Dept. of BioEngineering, Nagaoka University of Technology

O-1

いもち病菌における二つの Dicer 様蛋白質の機能分化

角谷直樹, 土佐幸雄, 眞山滋志, 中屋敷均 (神戸大・農学部)

Dicer 蛋白質は、RNA サイレンシング(RNAi)経路の鍵酵素であり、長い二本鎖 RNA の前駆体を 20-30bp 程度の小さな RNA 分子に切断する触媒作用を持つ。イネ科植物いもち病菌ゲノムには、2 種の Dicer 様遺伝子、Mdl-1 および MDL-2 が認められるが、これらの破壊株(Knock-Out, KO)を作製した所、MDL-2 KO 株のみがヘアピン RNA により誘導される RNA サイレンシングに欠損があることが明らかになった。また、内在性のトランスポゾンに対する siRNA の蓄積も MDL-2 KO 株で消失しており、自然条件下では MDL-2 のみが RNA サイレンシング経路に関与することが示唆された。一方、菌糸での MDL-1 および MDL-2 の発現量を Real Time PCR で定量した所、MDL-2 mRNA は MDL-1 mRNA に比べて約 15 倍の発現量があることが明らかとなった。この転写量の差が Dicer 様蛋白質の機能分化に与える影響を調べるため、*Aspergillus nidulans* の *gpd* プロモーターを用いた強発現系を利用した。MDL-2 KO 株で、MDL-1 および MDL-2 mRNA を強発現させた所、同程度の発現量を示したが、MDL-2 強発現株では、野生株と同程度のサイレンシング効率を示し、MDL-1 強発現株では、低効率の RNA サイレンシング能を示した。これらのことは以下に示すいくつかの示唆を与える。1. 自然条件下では RNA サイレンシング経路で機能していない MDL-1 蛋白質も、RNA サイレンシング経路で機能し得る蛋白質である、2. MDL-1 と MDL-2 はすでに蛋白質レベルで分化しており、MDL-2 がより効率的に働く、3. 自然条件下での MDL-1 と MDL-2 の機能分化には転写コントロールが関与している。4. MDL-2 の発現量は、いもち病菌の RNA サイレンシング効率の制限要因ではない。

Two dicer-like proteins in *Magnaporthe oryzae*

Naoki Kadotani, Yukio Tosa, Shigeyuki Mayama, Hitoshi Nakayashiki

(Fac. of Agri., Kobe Univ.)

O-2

ジャガイモ夏疫病菌 *Alternaria solani* 由来ポリケタイド合成酵素 PKSN の発現と機能解析

笠原 堅¹、及川英秋²、藤井 勲¹、海老塚豊¹ (¹東大院・薬、²北大院・理)

【目的】ジャガイモ夏疫病菌 *Alternaria solani* のポリケタイド合成酵素 PKSN は、8 個の S-adenosyl methionine (SAM)由来の側メチル基を持つデカケタイド alternapyrone を生成する。¹⁾ これらの側メチル基は、PKSN 上のメチル基転移酵素 (MeT) ドメインの触媒反応により導入されると考えられるが、他の糸状菌ポリケタイド合成酵素の MeT ドメインと同様、その機能の詳細は不明である。そこで、今回 PKSN の酵母発現系を確立し、MeT ドメインの機能解析を試みたので報告する。

【実験と結果】MeT 活性に必須なアミノ酸残基の特定を目的として点変異導入実験を進めるにあたり、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主としたより効率的な発現系の構築を試みた。酵母用発現ベクター pYES-DEST52 に *pksN* cDNA を組み込み、*Bacillus subtilis* 由来ホスホパンテテイル化酵素遺伝子 *sfp* とともに、出芽酵母に導入した。培養・誘導条件を種々検討した結果、PKSN 形質転換酵母による alternapyrone の生産に成功した。これは、糸状菌還元型 PKS として酵母で機能発現した最初の例である。この PKSN 酵母発現系を用い、MeT ドメインへの変異導入実験を行った。その結果、PKSN の MeT ドメイン中、alternapyrone 生成に必須のアミノ酸残基を同定した。また、MeT 変異体による側メチル基を持たない alternapyrone 誘導体の生成は認められなかった。

1) I. Fujii et al., *Chem. Biol.*, 12, 1301-1309 (2005)

Expression and functional analysis of polyketide synthase PKSN from *Alternaria solani*

Ken Kasahara¹, Hideaki Oikawa², Isao Fujii¹, Yutaka Ebizuka¹

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

O-3

麹菌 *A. oryzae* の異種タンパク質高生産変異株の取得

根本崇, 渡辺泰祐, 溝上豊, 丸山潤一, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】優れたタンパク質分泌能を有する麹菌 *A. oryzae* は、異種タンパク質生産の宿主として期待されている。しかし、高等生物由来タンパク質の大部分は生産性が低いのも関わらず、*A. oryzae* においてこれらを高生産するための宿主を創製する試みはほとんど行われていない。これまでに我々は、菌体内酸性プロテアーゼ遺伝子(*pepE*)とトリペプチジルペプチダーゼ遺伝子(*tppA*)の2重破壊により、ヒトリゾチームの生産量が約 1.6 倍になることを報告している。本研究では、上記遺伝子の2重破壊株をもとにして、リゾチーム活性を指標に異種タンパク質高生産変異株の育種を行った。

【方法と結果】最初に、4重栄養要求性株を用いて *pepE*, *tppA* 2重破壊株(NS-tApE)を作製した。この株の仔ウシキモシン生産量をコントロール株と比較したところ、約 1.8 倍の増加が認められた。このことから、*pepE*, *tppA* 2重破壊が他の異種タンパク質にも有効であることが示された。さらに、NS-tApE 株にヒトリゾチーム発現プラスミドを *niaD* 遺伝子座に単コピーで導入し、この株の分生子に対して紫外線照射による変異処理を行った。変異処理後の分生子を *Micrococcus* 菌体入り寒天培地に塗布し、リゾチーム活性による溶菌のハローが大きくなった株をスクリーニングした。最も高い活性を示した株から発現プラスミドをキュアリングにより脱落させ、高生産変異株を7株取得した。その7株をAUT1~7株と名づけ、現在AUT1株にキモシン発現プラスミドを形質転換し、その生産量について検討している。

Breeding of the *A. oryzae* mutants for higher-level production of heterologous proteins

Takashi Nemoto, Taisuke Watanabe, Yutaka Mizogami, Jun-ichi Maruyama, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

O-4

イネいもち病菌の G タンパク質制御因子 RGS についての解析

友野理生, 南栄一, 西村麻里江 (生物研)

イネいもち病菌は、3量体 G タンパク質により外界の疎水性や植物成分などを認識し、感染器官である付着器を形成すると考えられている。3量体 G タンパク質 β サブユニット (Mgb1) の欠損株は付着器形成を行えず、植物細胞内への侵入、感染もできないことから、G タンパク質が感染に重要な働きを担っていることが明らかである。3量体 G タンパク質の制御因子として知られる RGS タンパク質は、 α サブユニットの不活性化を促進することで3量体 G タンパク質を負に制御することが分かっている。いもち病菌には RGS タンパク質と同源性のあるタンパク質をコードする遺伝子がゲノム中に4個存在し、そのうちの1つ *MRGS2* の転写量が G タンパク質 β サブユニットの欠損株において大きく減少していた。そこで *MRGS2* の欠損株 *mrgs2* を作製した。親和性のイネの葉鞘に孢子を接種して 24 時間後、野生株 Guy11 ではほとんどが一細胞へのみの侵入が見られたのに対し、*mrgs2* では多細胞への侵入が多く見られた。しかし、*mrgs2* の孢子を親和性のイネに噴霧接種したところ、抵抗性病斑が見られた。これらの結果より、Mrgs2 はいもち病菌の侵入菌糸の形成およびイネの抵抗性反応誘導に関わっていると考えられる。

Mrgs2, a regulator of G-protein signalling is involved in infectious hyphal development in *Magnaporthe grisea*.

Ayami Tomono, Eiichi Minami, Marie Nishimura (NIAS)

O-5

Aspergillus nidulans における His-Asp 情報伝達系タンパク質の網羅的解析

金丸京子, 松林良博, 東信宏, 鈴木麻子, 加藤雅士, 小林哲夫 (名大・生命農)

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因子として、hybrid 型 histidine kinase (HK) 15 種類、response regulator (RR) 4 種類、HK と RR 間のリン酸基転移中間因子として 1 種類の HPt が存在する。糸状菌ではこれらの因子が複雑なリン酸転移のネットワークを形成し、浸透圧や農薬、酸化ストレスなどの応答や無性生殖、有性生殖の制御に重要な役割を担うと考えられている。本研究は糸状菌情報伝達系タンパク質を分子生物学的手法により網羅的に解析することで、複雑な情報伝達ネットワークの全貌を明らかにすることを目的としている。まず、Real Time PCR により全因子の発現時期と量を同定し、さらに GFP との融合遺伝子を用いて発現部位を観察した。また、HK, HPt, RR のリン酸転移反応に重要なアミノ酸を置換した変異株の作製および機能変化の *in vivo* 観察と精製タンパク質を用いた *in vitro* リン酸転移実験を行った。これらの結果より *A. nidulans* における His-Asp リン酸リレーを介した情報伝達系の機能について考察する。

Comprehensive analysis of signal transduction factors for His-Asp phosphorelay in *Aspergillus nidulans*

Kyoko Kanamaru, Yoshihiro Matsubayashi, Nobuhiro Azuma, Asako Suzuki, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi
(Dept of Biological Mechanisms and Functions, Nagoya Univ.)

O-6

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の農薬応答における His-Asp リン酸リレー系の解析

萩原大祐¹、松林良博¹、金丸京子¹、加藤雅士¹、阿部敬悦²、小林哲夫¹、水野猛¹ (¹名大院・生命農学、²東北大院・農学)

His-Asp リン酸リレー系はバクテリアから高等植物にまで普遍的に存在する環境応答情報伝達機構である。糸状菌においてもいくつかの因子は報告されているが、その環境応答メカニズムの体系的な理解はまだ浅い。我々は *A. nidulans* のゲノム配列から、His-Asp リン酸リレー系の構成因子である Histidine kinase (HK)、HPt 因子、Response regulator (RR) をそれぞれ 15 種類、1 種類、4 種類同定し、これらの因子を網羅的に解析することで His-Asp リン酸リレー系の体系的な理解を目指している。これまでの解析で、Nik1-type の HK である NikA がジカルボキシイミド系およびフェニルピロール系の農薬応答に関与することを明らかにした。つまり、NikA 破壊株は農薬に対して耐性を示していた。この現象を His-Asp リン酸リレー系のシグナル伝達モデルをもとに考えると、下流因子である RR が農薬応答に関与することが予想される。そこで、これまでに取得した 4 種類の RR 破壊株および多重 RR 破壊株を用いて農薬感受性を解析したところ、SskA と SrrA の二重破壊株が農薬耐性を示すことがわかった。このことから農薬感受性には SskA 依存的経路と SrrA 依存的経路の両方が寄与していると考えられた。これまでに SskA は Hog1-type MAPK (HogA) カスケードを制御していることがわかっており、現在、農薬の添加による HogA MAPK の活性や、その下流制御因子の発現パターンなどを解析中である。これらの結果を踏まえて、糸状菌の農薬応答機構の全体像について考察してみる。

Analysis of the His-Asp phosphorelay signaling pathway in response to fungicide in *Aspergillus nidulans*

Daisuke Hagiwara, Yoshihiro Matsubayashi, Kyoko Kanamaru, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi, Takeshi Mizuno
(Grad. Sch. Bioagricultural Sci. Nagoya Univ.)

O-7

***Aspergillus nidulans* HOG 経路特異的なレポーター遺伝子発現系の構築**

古川健太郎、古川貴子、星由紀子、佐藤奈津子、吉見啓*、藤岡智則、水谷治、阿部敬悦
(東北大院農・応生科、*東北大・未来研)

我々はこれまでに *A. nidulans* の高浸透圧応答 HOG (high-osmolarity glycerol response) 経路 (AnHOG 経路) の全容解明のため、経路構成遺伝子の単離、酵母相同遺伝子との比較解析、遺伝子破壊株を用いた遺伝学的解析を行い、AnHOG 経路の遮断や恒常的活性化が菌体の生育に悪影響を及ぼすことを見出した。動植物感染糸状菌 (*A. fumigatus* や *Magnaporthe grisea* など) も相同経路を有することから、この経路の動態を研究するためのレポーターを開発することとした。*A. nidulans* 野生株及び、*AnhogA* 破壊株の浸透圧刺激時の遺伝子発現応答解析から、レポーター候補遺伝子を複数選択した。AnHOG 経路に支配されると予想される遺伝子のプロモーター領域をレポーター遺伝子に連結し、経路特異的なストレス刺激時にレポーターの活性が上昇することを指標とした。候補遺伝子のプロモーター領域を単離し、GUS 遺伝子に連結したものを *A. nidulans* に導入した。高浸透圧刺激や経路活性化剤処理によってレポーターの活性が上昇し、AnHOG 経路を遮断するような変異体を宿主にした場合には活性は全く上昇しなかった。以上の結果から、本レポーター発現系は AnHOG 経路の活性動態をモニターする系として MAP kinase HogA のリン酸化検出と並んで有効であることが確認された。

Construction of a reporter gene expression system for the *Aspergillus nidulans* HOG pathway

Kentaro Furukawa, Takako Furukawa, Yukiko Hoshi, Natsuko Sato, Akira Yoshimi*, Tomonori Fujioka, Osamu Mizutani and Keietsu Abe (Tohoku Univ., Grad. Sch. Agri. Sci., *Tohoku Univ., NICHe)

O-8

***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)

A. 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* が見い出された。そこで、*A. oryzae* における *steA* の機能を調べるため、*steA* 過剰発現株と破壊株を作製し、表現型を観察した。その結果、*steA* 過剰発現株は野生株に比べて菌糸の生育抑制と分生子形成の抑制が認められ、液体培養時の菌糸には、バルーン状に肥大した細胞が観察された。また、*steA* 過剰発現株は Yatalase 等の細胞壁溶解試薬に対する感受性が上昇していた。さらに、液体培養時における分泌タンパク質についてペプチドマスフィンガープリント法で解析したところ、 β -1,3-glucanase 等の細胞壁溶解酵素の分泌が上昇していた。このため、これらの細胞壁溶解酵素の影響で *steA* 過剰発現株の細胞壁に異常が引き起こされていると考えられた。酵母では β -1,3-glucanase がステージ特異的に細胞壁の合成に関与している。*A. oryzae* の *steA* は液体培養時に転写されていたことから、菌糸の伸長に伴う細胞壁の合成または再構築に関与していることが示唆された。一方、RT-PCR により *steA* が転写されていないことを確認した破壊株では、表現型、分泌タンパク質パターンに野生株との差異は認められなかった。

Function analysis of *steA* in *Aspergillus oryzae*

Hiroto Morita, Michio Takeuchi

(Dept. of Biochemistry and Biotechnology, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

O-9

Aspergillus nidulans の形質転換時に必要とされる分子および操作についての検討

桑野哲矢¹, 依田康孝², 伊藤靖夫^{2,3} (¹信大・理、²信大院・工、³信大・全学教育機構)

糸状菌のプロトプラストを用いた形質転換において、添加する DNA 分子が染色体に組み込まれるまでの過程は、(1)原形質膜の通過、(2)細胞質の通過、(3)核膜の通過、および(4)染色体への組込みの4段階に大別できる。本研究では、このうち、原形質膜の通過について検討した。材料として *Aspergillus nidulans* を用いた。pH と浸透圧を調整し、室温でプロトプラスト懸濁液を得た。ポリエチレングリコール(PEG)とカルシウムイオン(Ca²⁺)とともに DNA 分子を加えた段階での攪拌および希釈操作は、形質転換効率に影響しなかった。PEG はプロトプラストの融合を促進する。また、本菌の菌糸細胞は多核であり、融合後の細胞における核の再分配が問題とならない。そこで、融合と DNA 分子の取り込みについて検討したが、これらは関連しなかった。次に、DNA 分子とプロトプラストの相互作用に対する、PEG の役割について検討した。Ca²⁺を加えない場合、回収したプロトプラスト画分から、添加した DNA 分子は検出されなかった。PEG をポリエチレンジイミン(PEI)に代えた場合には検出されたことから、物理的な相互作用という点では、DNA 分子と原形質膜間の電気的斥力の中和効果の重要性が示唆された。さらに、Ca²⁺は、マグネシウム、ニッケルイオン等で代替可能であったことから、特異的なシグナル分子としてエンドサイトーシスの誘導等を介して DNA 分子の取り込みに関与している可能性は低いと考えられた。むしろ PEG および PEI の細胞毒性に対する保護効果の方が重要かも知れない。

Extracellular DNA uptake during genetic transformation of *Aspergillus nidulans*

Tetsuya Kuwano¹, Yasutaka Yoda², Yasuo Itoh^{2,3} (¹Fac. Science, ²Grad.Sch. Dev. Sci., ³Sch. Gen. Ed. / Shinshu Univ.)

O-10

糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるキチナーゼ遺伝子群の発現解析

田中彩, 山崎晴丈、堀内裕之、太田明德 (東大院・農生科・応生工)

糸状菌において、その細胞壁の主要構成成分であるキチンを分解する酵素キチナーゼは形態形成・維持に重要な役割を果たしていると考えられる。*A. nidulans* のゲノムには、糖質分解酵素分類ファミリー18に属するキチナーゼの活性中心と相同性のあるアミノ酸配列をコードする領域が18ヶ所存在することが明らかになっている。この18種のキチナーゼ遺伝子 (*chiA*~*R*) はそれらがコードするアミノ酸配列からさらに2つのクラスに分類され、*chiA*, *H*, *R* は class III、残りの15種は class V のキチナーゼをコードすると考えられる。今回、これらのキチナーゼ遺伝子についてリアルタイム RT-PCR 法を用いて発現解析を行った。その結果、*chiD* と *chiH* の転写産物は分生子形成誘導条件下でその量が急激に増加した。また、これら転写産物の量は分生子の発芽を誘導すると時間と共に低下した。これらのことから *chiD*, *H* は分生子形成に関わる機能を持つことが示唆された。一方、*chiA* の転写産物の量は分生子自体では少ないが発芽誘導条件にシフト後に急激な増加が見られた。このことから *chiA* の分生子の発芽における機能が示唆された。

Expression of chitinase genes in *Aspergillus nidulans*

Aya Tanaka, Harutake Yamazaki, Hiroyuki Horiuchi and Akinori Ohta

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

O-11

褐色腐朽菌 *Coniophora puteana* による植物細胞壁由来多糖の分解メカニズム

加治佐 平, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科・生材科)

木材腐朽菌は、一般的に腐朽後における材の色から白色腐朽菌と褐色腐朽菌に分類される。白色腐朽菌が植物細胞壁の主成分であるセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンを分解できるのに対して、褐色腐朽菌はヘミセルロースと非晶性セルロースを特異的に分解し、木材の強度を著しく低下させることが知られている。担子菌 *Coniophora puteana* (イドタケ) は、木造住宅を劣化させる褐色腐朽菌の一種であるが、一般的な褐色腐朽菌とは異なり、糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー7 に属するセロビオヒドロラーゼ (Cel7) を菌体外に生産することが報告されている。本酵素は、子囊菌や白色腐朽菌においては結晶性セルロースの分解において重要な役割を担っていることが知られているが、褐色腐朽菌における機能は不明である。そこで本研究では *C. puteana* が生産する Cel7 のキャラクタライズを行った。

セルロースを炭素源としたときに *C. puteana* が生産する2種類の Cel7 をカラムクロマトグラフィーによって精製し活性を測定したところ、両酵素とも結晶性セルロースを分解できなかった。また、両酵素をコードする cDNA をクローニングし、推定アミノ酸配列を他の糸状菌由来の Cel7 と比較したところ、*C. puteana* 由来の酵素には糖質結合モジュール (CBM) が存在しなかったことから、両酵素は CBM が欠如しているために結晶性セルロースを分解できないと考えられた。そこで他の植物細胞壁由来の多糖を基質として活性測定を行ったところ、どちらの酵素もグルコマンナンに対する活性が高かった。これまで GH ファミリー7 に属するグルコマンナーゼは報告例がないことから、本酵素は新規グルコマンナーゼであると考えられ、*C. puteana* による植物細胞壁由来多糖の分解を特徴づける酵素であると考えられた。

Degradation of plant cell wall polysaccharide by brown-rot fungus *Coniophora puteana*

Taira Kajisa, Kiyohiko Igarashi, and Masahiro Samejima (Dept. Biomat. Sci., Univ. Tokyo)

O-12

Fusarium oxysporum f. sp. *melonis* 由来の β -1,6-ガラクトナーゼの精製とクローニング

谷口雄哉, 阪本龍司, 川崎東彦 (大阪府立大・生命環境)

近年、II型アラビノガラクトタンはNK細胞活性化やコレステロール吸収阻害など種々の生理活性を持つことから、医薬品やサプリメントとしての利用が期待されている。しかし、II型アラビノガラクトタン分解酵素に関する研究は少なく、そのような酵素はII型アラビノガラクトタンの構造解析や生理活性発現にかかわる糖鎖構造の決定において強力な手段となる。そこで本研究では、カラムツ由来II型アラビノガラクトタン(LWAG)分解酵素生産菌のスクリーニングを行い、酵素の精製およびその遺伝子のクローニングを試みた。

土壌より単離したサンプルを対象に、その上澄を粗酵素液として用い LWAG からの分解産物を指標にスクリーニングを行った。分解産物の分析は、高性能陰イオン交換クロマトグラフィーにより行った。その結果、主要分解産物としてアラビノース、ガラクトースと多量のオリゴ糖を生成した *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis* 12S 株を目的の菌として選択した。

まず、未知オリゴ糖遊離酵素(FoGal1)の精製を行った。培養上澄をにより精製し、SDS-PAGEにて電気泳動的に均一な標品を得た。次に、本酵素の作用により LAG から遊離するオリゴ糖をゲルろ過を用いて精製し、構成糖分析、TOF-MS、H/C-NMRにより β -1,6-ガラクトピオースであると決定した。このことから FoGal1 は LWAG より特異的に側鎖を切り出すことができる酵素であることが明らかとなった。

次に、FoGal1 の N 末端アミノ酸配列情報から作製したプライマーを用いて、*fogall* 遺伝子の全長 cDNA を獲得した。獲得した *fogall* 遺伝子を大腸菌に形質転換し、組換え酵素を獲得した。

Purification and gene cloning of β -1,6-galactanase of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*

Yuya Taniguchi, Tatsuji Sakamoto, Haruhiko Kawasaki

(Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture Univ.)

O-13

リボフラビン生産糸状菌 *Ashbya gossypii* の代謝解析

金政 真¹, 田島 諭¹, 朴 龍洙^{1,2} (¹静岡大・農・応生化, ²静岡大・創科技院・統合バイオ)

A. gossypii は糖質だけでなく、植物油や油脂系廃棄物を資化してリボフラビン（ビタミン B₂）に変換できるため、油脂系廃棄物利用の観点から重要な菌であり、世界のリボフラビンの3割以上が本菌によって生産されている。これまでに、当研究室において変異処理によりリボフラビン高生産株を取得している。今回、変異株のリボフラビン合成酵素遺伝子の転写量を調べたところ、イソクエン酸リアーゼ遺伝子（*ICLI*）及びイソクエン酸脱水素酵素遺伝子（*ICDH1*）の転写量が増大していた。そこで、本菌において両遺伝子をそれぞれ破壊し、リボフラビン生産性に与える影響を調べた。カナマイシン耐性遺伝子をマーカーとし、両端に遺伝子置換のための相同配列を持つ遺伝子破壊用カセットを PCR にて構築し、細胞に導入した。目標領域での置換が確認できた株を遺伝子破壊株とした。両破壊株を菜種油を炭素源に培養して分析した結果、リボフラビン生産量は野生株と比して *ICDH1* 破壊株では 4.7%、*ICLI* 破壊株では 27.7% と顕著に低下した。このことから、両酵素はリボフラビン生合成において重要であることがわかった。

Functional analyses of metabolic enzymes for riboflavin synthesis in *Ashbya gossypii*

Shin Kanamasa¹, Satoshi Tajima¹, Enoch Y. Park^{1,2}

(¹Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ., ²Integ. Biosci., Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

O-14

褐色腐朽菌オオウズラタケにおいてシュウ酸耐性に寄与するタンパク質の機能解析

渡邊知樹¹, 土反伸和¹, 梅澤俊明¹, 矢崎一史¹, 島田幹夫², 服部武文¹ (¹京大・生存研, ²福井工大・工)

褐色腐朽菌が分泌するシュウ酸は、木質成分の加水分解を触媒する一方、銅を含む木材防腐剤を無毒化する。銅耐性菌オオウズラタケはシュウ酸発酵に依存して生育し、シュウ酸を培地中に大量に蓄積する。一般にシュウ酸は生物に毒性を示すため、本研究ではオオウズラタケのシュウ酸毒性回避機構を解明することを目的とした。得られる知見は、菌の一次炭素代謝機構の解明、新規木材防腐剤開発に資する。オオウズラタケ cDNA ライブラリーを用いた形質転換によりシュウ酸耐性を獲得した酵母から、これまで機能未知とされたチオレドキシシン様タンパク質 (TRP26) をコードする遺伝子のホモログ cDNA *FpTRP26* を得た。*FpTRP26* 形質転換酵母では、コントロールと比べ細胞内でのシュウ酸量が減少した。*FpTRP26* はオオウズラタケにおいても発現が認められ、本菌においてシュウ酸耐性に寄与すると示唆された。現在 *FpTRP26* の機能を解析中である。

The possible role of *FpTRP26* involved in oxalic acid resistance of brown-rot fungus *Fomitopsis palustris*

Tomoki Watanabe¹, Nobukazu Shitan¹, Toshiaki Umezawa¹, Kazufumi Yazaki¹, Mikio Shimada², and Takefumi Hattori¹ (¹RISH, Kyoto Univ.) (²Tech., Fukui Univ. of Technol.)

O-15

TPP 結合型リボスイッチの機能改変

山内隆寛^{1,2}, 三好大輔², 窪寺隆文¹, 伴光博¹, 西村顕¹, 杉本直己^{2,3} (¹白鶴酒造(株)・研究開発室, ²甲南大・FIBER, ³甲南大・理工)

【目的】我々はこれまでに麹菌からチアミノピロリン酸(TPP)結合型リボスイッチを見出し、その機能を真核生物で初めて明らかにした。本リボスイッチは *A. oryzae thiA* の 5'非翻訳領域(5'UTR)に存在するイントロン上に在り、TPP と結合することでスプライシング様式を変化させる。これによりイントロンの一部が残存した未成熟 mRNA が転写され、制御下にある遺伝子の発現を抑制する。有用タンパク質の生産を目的とした場合は遺伝子発現を誘導するリボスイッチが好ましいが、真核生物ではまだ報告されていない。そこで TPP 結合型リボスイッチの周辺領域に変異を導入し、本来とは逆の制御様式に機能改変することを試みた。

【方法と結果】リボスイッチ周辺領域への変異導入による制御様式の変化を確認するため、*A. oryzae thiA* の 5'UTR 下流に GUS レポーター遺伝子を接続した発現カセットを作成した。宿主として *A. oryzae niaD300*、培地として CD 最少培地を用いた。まず発現カセットから TPP 存在下で残存するイントロン部分配列を削除することで発現特性が逆転し、培地にチアミンを 10 μ M 添加することで GUS 活性がチアミン非存在下の 1.5 倍に増加した。さらに上記変異遺伝子の 5'スプライシング部位と TPP 結合型リボスイッチ間の領域を 5 または 9 塩基削除した結果、チアミン存在下での活性がそれぞれ約 5、4 倍に増加した。以上により、チアミン添加により遺伝子発現を誘導するリボスイッチの開発に成功した。

Functional changes of TPP-dependent riboswitch

Takahiro Yamauchi^{1,2}, Daisuke Miyoshi², Takafumi Kubodera¹, Mitsuhiro Ban¹, Akira Nishimura¹, Naoki Sugimoto^{2,3} (¹Hakutsuru Sake Brewing Co. Ltd., ²FIBER, Konan Univ., ³Fac. Sci. Eng., Konan Univ.)

O-16

麹菌 *Aspergillus oryzae* のチアミン高生産株の分子育種

徳井美里・窪寺隆文・五味勝也¹・山下伸雄・伴光博・西村顕 (白鶴酒造研究開発、¹東北大院農・生物産業創成)

チアミン 2 リン酸(TPP)はエネルギー代謝における重要な補酵素であり、酵母を中心にその生合成経路および制御機構が遺伝子レベルでほぼ解明されている。一般的にチアミン合成に関与する遺伝子群は最終生産物である TPP によりフィードバック抑制を受けることが知られているが、その抑制解除によりチアミンの生産量が顕著に増大した報告例はない。我々は、これまでに麹菌 *A. oryzae* のチアミン高生産株取得を目指し、チアミンを構成するチアゾール環合成遺伝子 *thiA* の脱抑制株を取得したが、チアミンの生合成に顕著な増大は確認されなかった。

今回は *thiA* 以外で、チアミン生合成系におけるキーポイントと考えられる推定ピリミジン環合成酵素遺伝子 *nmtA* およびチアミン 2 リン酸化酵素遺伝子 *thiP* にも着目した。その結果、*thiA*、*nmtA* および *thiP* を同時に脱抑制化した時に TPP 生合成の顕著な増大が確認された。

Molecular breeding of the thiamin-high-producing strain from *Aspergillus oryzae*

Misato Tokui, Takafumi Kubodera, Katsuya Gomi¹, Nobuo Yamashita, Mitsuhiro Ban, Akira Nishimura (Hakutsuru Sake Brewing CO., LTD. ¹Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ.)

O-17

水分含量の異なる固体培養条件下における麹菌遺伝子発現の解析

小林 亜紀子¹、佐野 元昭¹、久田 博元²、秦 洋二²、大箸 信一¹ (¹金沢工業大・ゲノム研、²月桂冠・総研)

【目的】 麹菌 *Aspergillus oryzae* は、酒作りの際、米などの固体上で培養を行う固体培養の方法が採られている。その際、固体培地の含水率により生産される酵素群が変わることが経験的に知られているが、遺伝子レベルでの解析はなされていない。そこで、我々は水分が重要なファクターであると考え、水分含量の異なる固体培養条件における麹菌の遺伝子解析を行った。水分含量と遺伝子発現との関連性を示すことにより、高効率酵素生産培養条件の提示が期待される。

【方法および結果】 水分含量の異なるコムギフスマにおいて *A. oryzae* RIB40 株を 30°C48 時間培養した後、RNA を抽出しそれぞれの遺伝子の発現をリアルタイム PCR により解析した。また、麹菌のゲノム解析で明らかとなった 11,000 遺伝子をスポットした DNA オリゴマイクロアレイを用い、遺伝子の発現プロファイルの解析を行った。これにより、水分含量依存的に発現量が異なる遺伝子群を見出した。

Analysis of *Aspergillus oryzae* gene expression with different water content under solid-state culture condition

Akiko Kobayashi¹, Motoaki Sano¹, Hiromoto Hisada², Yoji Hata², Shinichi Ohashi¹

(¹KIT, ²Res. Inst., Gekkeikan Sake Co.)

P-1

酵母 Bni1 の相同タンパク質 AoBni1 を用いた麹菌 *A. oryzae* における Spitzenkörper の可視化

五川絵理, 正路淳也, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】 Spitzenkörper は、糸状菌の菌糸先端に存在する分泌小胞に富むオルガネラで、菌糸の伸長中心として働く。Spitzenkörper には、分泌小胞が蓄積されている他、エンドサイトーシス小胞も存在することから、細胞内の小胞輸送の全体像を理解するためにも重要なオルガネラである。最近酵母の formin タンパク質である Bni1 が Spitzenkörper の構成成分であることが明らかになった。本研究では *A. oryzae* における Bni1 相同タンパク質 AoBni1 に EGFP を融合させることにより、*A. oryzae* の Spitzenkörper の可視化と、その観察を行った。

【結果】 *A. oryzae* ゲノムデータベースから酵母 *BNI1* と相同性を示す遺伝子を見だし、*Aobni1* と名づけた。AoBni1 は *A. nidulans* の formin である SepA との相同性が高く、formin に特有のドメインである FH2 と FH3 を有していることがタンパク質モチーフ検索で明らかになった。また、FH1 ドメインの特徴であるプロリンに富んだ配列も有していた。次いで *Aobni1* を PCR によって単離し、*egfp* との融合遺伝子を発現する *A. oryzae* 形質転換体を取得した。この形質転換体の顕微鏡観察を行ったところ、菌糸の先端の Spitzenkörper 様構造に EGFP 蛍光が見られた。現在この Spitzenkörper 様構造の性質の解析を進めている。

Observation of Spitzenkörper using a fusion protein of EGFP with AoBni1 in *A. oryzae*.

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

P-2

蛍光タンパク標識による *Aspergillus nidulans* 先端成長機構の解析：微小管とアクチンの関係を中心に

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

真菌の先端成長は、菌糸先端に成長点が限定される特徴的な成長様式で、成長に関与する様々な分子群の局在化と協調の元に成り立っている。細胞骨格は、成長点の維持や伸長反応に必須の役割を果たしていると考えられている。我々は GFP 標識チューブリンを用いた解析により、*A. nidulans* の速い先端成長において、微小管が必須である事、成長端近傍の細胞質微小管が分裂期にも保持される事を明らかにした。アクチンはすべての細胞成長に必須である事が知られている。そこで GFP 標識アクチンを用いて微小管機能との関係を調べた。アクチンは、多数のパッチ状の集合体として成長端から数 μm 内側に集中して局在していた。アクチンの局在は微小管に依存しており、細胞成長はアクチンの局在に依存していた。成長の遅い出芽直後の菌糸内のアクチン局在は、速く成長する成熟した菌糸先端とそれとは異なっていた。*A. nidulans* では、菌糸の伸長とそれに伴う成長速度の増加に従って微小管とアクチンが協調して機能する機構が確立し、継続的で速い先端成長を可能にしていると考えられる。現在、アクチン結合タンパク質や SNARE の局在、および局在制御におけるキネシンの関与について検討中である。

Essential role of microtubule and actin in hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*: analysis with live cell imaging of proteins tagged with fluorescence proteins.

¹Tetsuya Horio, ²Tomohiro Akashi, ³Naimeh Taheri-Talesh, ²Akihiko Kikuchi, ³Berl R. Oakley (¹Health Bio., Tokushima Univ. Grad. Sch., ²Mol. Mycol. Med., Nagoya Univ. Grad. Sch., ³Mol. Genet., Ohio State Univ.)

P-3

***A. oryzae* の Woronin body 形成に關与する *Aohex1* 遺伝子の破壊株における表現型解析**

丸山潤一、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】Woronin body は子囊菌類と一部の不完全菌類糸状菌に存在するオルガネラであり、隔壁孔を塞いで溶菌の伝播を防ぐ働きを有する¹⁾。Woronin body の局在は隔壁近傍のほか、菌糸先端など別の菌糸部位にも観察され、隔壁孔を塞ぐ以外の機能をもつことが考えられるが、これらの機能についてはあまりわかっていない。我々はこれまでに Woronin body 形成に必要な *Aohex1* 遺伝子の ORF 全長を破壊した株を作製したが、通常の培養条件ではコントロール株と同様の生育を示した²⁾。本研究では、AoHex1 の新たな機能を明らかにするために *Aohex1* 遺伝子破壊株の様々な生育条件での表現型解析を行った。

【方法と結果】*Aohex1* 遺伝子破壊株を各種条件(高温、高浸透圧、栄養飢餓、各種薬剤添加など)で培養し、生育特性を詳細に調べた。薬剤添加条件で培養を行ったところ、 β -1,3-グルカン合成酵素阻害剤 Micafungin および β 結合型糖鎖結合性色素 Congo red の存在下で *Aohex1* 遺伝子破壊株の生育低下が観察された。これらは、AoHex1 が細胞壁のリモデリングに關与していることを示唆するものである。現在、*Aohex1* 遺伝子破壊株が Micafungin および Congo red に感受性を示す機構の解析を行っている。

1) Maruyama *et al.*, (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331, 1081-8.

2) 内田ら、日本農芸化学会 2006 年度大会要旨集、p. 98

Phenotypic analysis of the disruptant of the *Aohex1* gene required for Woronin body formation in *A. oryzae*

Juni-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto

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

P-4

***A. oryzae* の Woronin body 形成に必要な *Aohex1* 遺伝子における選択的スプライシングの意義に関する解析**

岩崎健太郎、内田博教、Praveen Rao Juvvadi、丸山潤一、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】Woronin body は、子囊菌類および類縁の不完全菌類糸状菌に存在するオルガネラであり、菌糸損傷時に溶菌の伝播を防ぐため隔壁孔を塞ぐ役割が知られている。*A. oryzae* の Woronin body 形成に必要な *Aohex1* 遺伝子の転写産物は選択的スプライシングを受け、スプライシングされる場合 AoHex1 タンパク質は 50 アミノ酸短くなる¹⁾。一方で、アカパンカビ *Neurospora crassa* では *hex1* 遺伝子の選択的スプライシングは見られず、*A. oryzae* と異なる理由は不明である。本研究では、*Aohex1* 遺伝子破壊株の相補能を指標として選択的スプライシングの意義を検討した。

【方法・結果】低浸透圧ショックにより先端細胞を溶菌すると、*Aohex1* 遺伝子破壊株では隣接する細胞に溶菌が伝播する¹⁾ので、この表現型を指標に相補解析を行った。*Aohex1* 遺伝子よりイントロンの部分を除いたスプライシング型を発現するプラスミド、及びスプライシング部位に変異を加え非スプライシング型のみを発現するプラスミドを、*Aohex1* 遺伝子破壊株に形質転換した。取得した株について、低浸透圧ショックにより溶菌の伝播を観察した。その結果、スプライシング型 AoHex1 発現株は溶菌の伝播を防いだことから、相補が確認された。一方で、非スプライシング型を発現した場合、相補は確認されなかった。このことから、*Aohex1* 遺伝子の転写産物がスプライシングされることによって、AoHex1 が隔壁孔を塞ぐ機能をもつことが示唆された。現在、スプライシング型と非スプライシング型の AoHex1 タンパク質の性質を解析する予定である。

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

Functional analysis of two forms of the Woronin body protein AoHex1 expressed by alternative splicing.

Kentaro Iwasaki, Hirotaka Uchida, Praveen Rao Juvvadi, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto

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

P-5

アカパンカビにおける蛍光タンパクで標識した *NC-RAS-2* 遺伝子の可視化

茂泉幸太, 村山肇子 (関東学院大院・工学研究科)

糸状菌の菌糸成長は先端のみで行われるが、先端における成長に必要な細胞壁の前駆体および細胞壁合成酵素、また菌体外に存在する栄養分を分解して利用するための分解酵素などは先端小胞 (apical vesicles) に包まれた形で菌糸の先端に運ばれ、そこで先端小胞の内容物が exocytosis により細胞膜外に分泌され、これらの分泌された前駆体や酵素を用いて細胞壁が合成され、また菌体外に分泌された分解酵素により菌体外に存在する高分子栄養分は分解され、小さな分子となって菌体内に吸収され利用されると考えられている。

糸状菌のモデル生物として研究に用いられているアカパンカビの形態的突然変異体 *smco7* は原ガン遺伝子の一つである *NC-RAS-2* の null mutant である。*smco7* は野生型と比較すると菌糸が細く、菌糸成長速度が著しく遅く、また細胞壁が薄く、菌体外分解酵素活性が低い。これらの結果は *NC-RAS-2* の介在する信号伝達系が先端小胞の運搬や先端小胞の exocytosis の調節に関与していることを示唆している。

そこで、本研究では *NC-RAS-2* 遺伝子にレポーターとして緑色蛍光タンパク質をコードする *GFP* 遺伝子を連結して融合遺伝子を作成し、その融合遺伝子を *NC-RAS-2* タンパク質が欠損している *smco7* に導入して融合タンパク質を合成させ、*smco7* 菌糸内での *NC-RAS-2* タンパク質の局在性及び発現時期などを可視化して解析し、先端小胞の運搬や先端小胞の exocytosis との関係に関する知見を得ようとするを目的として行われた。*smco7* 細胞内における融合遺伝子の発現の解析結果について報告し、先端小胞の運搬や先端小胞の exocytosis との関係について検討する。

Visualization of *NC-RAS-2* protein tagged with fluorescence protein in *Neurospora crassa*

Kouta Moizumi, Tadako Murayama (Grad.Sch. of Engineering., Kanto Gakuin Univ.)

P-6

N-結合型糖鎖ビーズを用いた *A. oryzae* 小胞体内レクチンの取得と局在解析

渡邊泰祐¹, 松尾一郎^{1,2}, 丸山潤一³, 北本勝ひこ³, 伊藤幸成^{1,2} (理研¹, CREST², 東大院農生科・応生工³)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* は優れたタンパク質分泌能を有しており、異種タンパク質を生産するホストとしての利用が期待されている。我々は *A. oryzae* におけるタンパク質生産能力を高めるために、*N*-結合型糖鎖を介したタンパク質品質管理機構に関する理解が必要不可欠であると考えている。昨年度、*N*-結合型糖鎖結合ビーズを用いた *A. oryzae* 膜画分の解析を行い、糖鎖認識タンパク質の取得に成功している¹⁾。本発表では Glc1Man9GlcNAc2 糖鎖結合ビーズに結合した糖鎖認識タンパク質の同定、各種糖鎖に対する結合特異性解析、および *A. oryzae* 細胞内における局在解析を行った結果を報告する。

【方法と結果】小胞体を含む膜画分は、*A. oryzae* 菌体を液体窒素にて破碎後、遠心分離法に供することにより調製した。得られた小胞体画分を用いて、Glc1Man9GlcNAc2 ビーズに結合するタンパク質を取得した。この糖鎖結合タンパク質は、麹菌ゲノムデータベースを利用した LC/MS/MS 解析より *A. oryzae* における calnexin (CNX) であると同定された。さらに、種々の糖鎖結合ビーズとの結合実験を行い、*A. oryzae* における CNX が Glc1Man9 糖鎖特異的に結合することを確認した。*A. oryzae* 細胞内における CNX の局在を調べるために CNX-EGFP 融合タンパク質を発現する形質転換株を作製し、可視化を試みた。EGFP 蛍光と細胞染色の観察より、CNX が小胞体に局在することが強く示唆された。現在、種々の小胞体型糖鎖ビーズを用いて、糖鎖認識タンパク質の解析を行っている。

1) 丸山ら、第5回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p. 71

Identification and localization of intracellular lectins using *N*-glycan-conjugated beads in *Aspergillus oryzae*

Taisuke Watanabe¹, Ichiro Matsuo^{1,2}, Jun-ichi Maruyama³, Katsuhiko Kitamoto³, Yukishige Ito^{1,2}

(RIKEN¹, CREST², Dept. of Biotech., Univ. of Tokyo³)

P-7

麹菌 *A. oryzae* における小胞体ストレスの可視化

大野 絢子, 丸山 潤一, 有岡 学, 北本 勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】細胞内で生産された分泌タンパク質は、まず小胞体で品質管理を受ける。このとき、フォールディングに失敗した変性タンパク質が小胞体内に蓄積し、小胞体機能に負担がかかることを「小胞体ストレス」と呼ぶ。小胞体ストレスに応答して、小胞体シャペロン遺伝子の発現誘導、タンパク質の翻訳抑制、変性タンパク質の分解・除去、アポトーシスなどが起こる。麹菌は高いタンパク質生産能力を持つが、動物や植物由来のタンパク質を生産させた場合には一般に生産量が高くない。この原因として小胞体ストレスによる分解が考えられている。そこで、小胞体ストレス応答経路の上流に位置する遺伝子である酵母 *HAC1* ホモログ *AohacA* を用いて、小胞体ストレスを可視化する系の構築を試みた。

【方法及び結果】*A. niger* の知見から、*AohacA* は 20 bp のイントロンを持ち、小胞体ストレスに応答してこのイントロンがスプライシングされることで翻訳の際にフレームシフトが起き、活性型の *AohacA* が翻訳されると考えられた。そこで、*AohacA* の C 末端の転写活性化ドメインを削除した遺伝子 *AohacAΔC* に *egfp* 遺伝子を融合させた *AohacAΔC-egfp* 遺伝子を *A. oryzae* に導入した。得られた株に小胞体ストレス誘導剤であるジチオスレイトール(DTT)を添加したところ、DTT に応答して細胞内に EGFP 蛍光が観察された。また、RT-PCR により *AohacA* の 20 bp イントロンのスプライシングが増加していることが確認された。現在、この株に異種タンパク質発現プラスミドを導入し、異種タンパク質生産条件下での小胞体ストレス応答を蛍光顕微鏡により観察している。

Visualization of ER stress in *Aspergillus oryzae*

Ayako Ohno, Jun-ichi Maruyama, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto

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

P-8

麹菌 *Aspergillus oryzae* 菌糸基部におけるオルガネラ構成成分のオートファジーによる液胞への取込み

正路 淳也, 菊間 隆志, 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、菌糸の部位に応じた多様な形態を示す。これまで我々は麹菌 *A. oryzae* の液胞形態の解析から、菌糸基底部において液胞が細胞の大半を占めるほどに発達していること、さらに液胞膜が液胞内腔へ取り込まれた痕跡があることを見いだしている¹⁾。この結果から、菌糸基底部においては細胞質およびオルガネラ成分の包括的な分解が起こっている可能性があると考え、オルガネラの動態を観察することによって検証を行った。

【結果】各オルガネラの観察のため、当研究室で作成された、ヒストン H2B、ペルオキシソーム局在シグナル、またはクエン酸合成酵素にそれぞれ EGFP を付加した融合タンパク質を発現する株を使用した。これらの株を 24 時間培養後観察したところ、既に報告されているようにそれぞれ核、ペルオキシソーム、ミトコンドリアに蛍光が観察された。これに対し 48 時間培養後の菌糸体では全ての株において、液胞の発達した基底部の菌糸で一部の EGFP 蛍光が液胞内腔にも観察された。一方でオートファジーに必須な *Aoatg8* を欠損した株において各融合タンパク質を発現させ観察したところ、全ての株において 60 時間以上培養を行っても EGFP 蛍光はほとんど液胞内腔に観察されなかった。以上の結果から、基底部の菌糸においてはオートファジーにより、核やペルオキシソーム、ミトコンドリアといったオルガネラの構成成分が液胞へと取り込まれ、分解されていることが示唆された。

1) 正路ら、第五回糸状菌分子生物学コンファレンス講演要旨集、p41

Autophagic uptake of organelle components by vacuoles in mature hyphae of *A. oryzae*.

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

P-9

担子菌 *Coprinus cinereus* 由来オートファジー関連タンパク質 Atg8 ホモログの機能解析

吉村昌徳, 渡邊 彰, 麻田恭彦 (香川大・農)

オートファジーとは、真核細胞におけるタンパク質分解機構の一つであり、非特異的に細胞内に存在するオルガネラやタンパク質を分解する系である。近年、各種生物におけるオートファジー関連遺伝子の破壊株等の解析から、オートファジーが細胞分化過程においても重要な役割を持つことが示唆されてきている。本研究では、担子菌 *Coprinus cinereus* におけるオートファジーについて明らかとするため、まず、同機構のマーカーと考えられている Atg8 ホモログの機能解析を行ったのでここに報告する。

C. cinereus のゲノム解読情報に基づき PCR 法および RACE 法を用いて *C. cinereus* より Atg8(CcAtg8)ホモログ cDNA を取得した。解析の結果、同 cDNA は 126 アミノ酸残基をコードしていることが明らかとなった。

Saccharomyces cerevisiae において Atg8 の欠損株は、胞子形成能を欠失しているばかりでなく、オートファジー誘導条件において観察される Atg8 の液胞への局在も行われなくなる。そこで、得られた CcAtg8 ホモログ cDNA を *S. cerevisiae* ATG8 欠損株に導入し、その相補性について検討した。その結果、CcAtg8 ホモログ cDNA を導入した株では、野生株と同様の胞子形成能を回復することが確認され、また緑色蛍光タンパク質をマーカーとした局在解析では、CcAtg8 ホモログが液胞に局在することが確認された。

以上の結果は、*C. cinereus* より取得した CcAtg8 ホモログ cDNA が、*S. cerevisiae* 内においてオートファジー関連遺伝子として機能していることを示唆するものである。

Functional analysis of Atg8 homolog from *Coprinus cinereus*.

Masanori Yoshimura, Akira Watanabe, Yasuhiko Asada

(Dept. of Agriculture, Univ. of Kagawa)

P-10

麹菌 *A. oryzae* におけるエンドソーム様構造体の解析

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

【目的】糸状菌においてエンドサイトーシスはまだその存在が明らかになった段階であり、その詳細な機構はほとんどわかっていない。我々はこれまでに細胞膜タンパク質と EGFP との融合タンパク質である AoUapC-EGFP を用いて糸状菌におけるエンドサイトーシスの存在を初めて示すとともに、エンドサイトーシス誘導時に多く観察されるエンドソーム様構造体を見出している¹⁾²⁾。またエンドソーム様構造体は微小管依存的に細胞内を菌糸の軸に沿った動きをしていることを示した。そこで今回はエンドソーム様構造体に関するより詳細な解析を行った。

【方法と結果】エンドサイトーシスの誘導後にアクチン脱重合剤を作用させると菌糸内にエンドソーム様構造体は観察されなくなった。このことからアクチンはエンドソーム様構造体の液胞への動態に影響していないことが示唆された。さらに、エンドソーム様構造体のモータータンパク質との関わりを調べるためにダイニン重鎖及びダイナクチン複合体の欠損株を用いて観察したところ、ほとんどのエンドソーム様構造体は菌糸に沿った運動を停止した。このことからダイニンモータータンパク質はエンドソーム様構造体の動態に一部関与していることが示唆された。現在エンドサイトーシスの条件欠損株を作製し、それを用いてエンドソーム様構造体に関して更なる解析を行っている。

- 1) 樋口ら、第5回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p.42
- 2) Higuchi Y. et al. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 784-791.

Analysis of the endosomal-like structures in *Aspergillus oryzae*

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

P-11

麹菌 *A. oryzae* における AoVps24 の液胞形成に関する機能の解析

辰巳晶紀, 菊間隆志, 正路淳也, 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* において液胞酵素カルボキシペプチダーゼ 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。我々はこれまでにエンドソームを介した液胞へのタンパク質輸送に関わる VPS24 の *A. oryzae* におけるホモログ *Aovps24* を単離し、EGFP 融合タンパク質発現株を取得した。また同遺伝子破壊株では著しい生育阻害や菌糸の形態異常、分生子形成機能の欠損が観察された¹⁾。本研究ではこれらの株を用いて *A. oryzae* における液胞機能及び液胞形成の解析を行った。

<方法及び結果>*Aovps24* 破壊株に CPY-EGFP 及び EGFP-AoVam3 をそれぞれ発現させ、液胞及び液胞膜の観察を行った。破壊株において液胞は未発達であり、通常の丸い大きな液胞は観察されなかった。*S. cerevisiae* の *vps24* 変異株では液胞の異常は観察されず、著しい生育阻害や形態異常は見られないことから、*Aovps24* 破壊株の表現型は液胞形成の欠損によるものが示唆された。したがって糸状菌である *A. oryzae* においては液胞機能が菌糸の形態形成や分化にも関与すると考えられる。また EGFP-AoVps24 を用いて AoVps24 の液胞発達条件下での挙動の観察を行った。その結果、EGFP-AoVps24 で可視化される液胞近傍の後期エンドソーム様構造体が N 源枯渇条件下において凝集する様子が観察された。この凝集して見られる構造体は FM4-64 により染色されることから、後期エンドソーム様構造体が凝集したものであると考えられ、現在この構造体の詳細を解析中である。

1) Tatsumi *et al.*, (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347, 970-978

Functional analysis of AoVps24 for vacuolar formation in *A. oryzae*

Akinori Tatsumi, Takashi Kikuma, Jun-ya Shoji, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

P-12

イネいもち病菌の付着器形成に対する各種抗生物質の影響

長島由夏, 武川治, 斉藤彩華, 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に対してタンパク合成阻害活性をもつ。真核生物に対しても高濃度でミトコンドリアなどの原核生物型リボソームを持つオルガネラに作用し呼吸阻害等が起こる。しかし近年 14 員環マクロライドが真核生物に対して従来の作用機作では説明できない作用を示すことが報告されている。イネいもち病菌でも呼吸阻害を示さない濃度で付着器形成阻害が観察された。同様の付着器形成阻害はクロラムフェニコールで検定を行った場合にも観察され、他にも付着器分化に対し同様の影響を与える抗生物質があるのではないかと考えられる。そこで、タンパク質合成阻害効果のある抗生物質に限らず様々な抗生物質を用いてイネいもち病菌の付着器分化に対する影響を検定したところ、真核細胞のタンパク質合成を阻害する glutarimide 系抗生物質 9-Me streptimidone、ヌクレオチド生合成系阻害剤 Hadacidin 等で分生子の発芽が可能な濃度において付着器分化阻害が観察された。

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

Yuka Nagashima, Osamu Takekawa, Ayaka Saitoh, Takashi Kamakura.

(Tokyo Univ. of Science)

P-13

イネいもち病菌における機械刺激受容カルシウムイオンチャネル *MIDI* ホモログの機能解析

伊澤真澄, 柏木知子, 鎌倉高志 (東理大理工)

カルシウムは糸状菌の先端成長においてその濃度勾配が用いられるだけでなく、二次メッセンジャーとして様々なシグナル伝達に関わっていると考えられている。イネいもち病菌の付着器分化においてもカルシウムシグナルが重要な役割を果たしていると考えられている。*MIDI* は *S.cerevisiae* で発見された機械刺激受容型カルシウムイオンチャネルであるが、この遺伝子は糸状菌において広く保存されていた。日本産イネいもち病菌 P2 株をもちいて *MIDI* ホモログ遺伝子の発現解析を RT-PCR により行ったところ、栄養成長時及び付着器形成条件下の両条件下で発現が見られた。また、ゲノムデータより予想される *MIDI* ホモログ遺伝子の ORF を相同的 2 回組換えにより破壊したところ、破壊株の生育速度・付着器形成能に野生株との有意な差は見られなかった。現在、周囲のカルシウム環境やストレスに対する応答について詳細な検討を行っている。

Functional analyses of mechanosensitive ion channel *MIDI* homolog in *Magnaporthe oryzae*.

Masumi Izawa, Tomoko Kashiwagi, Takashi Kamakura

(Tokyo Univ. of Science)

P-14

イネ科植物いもち病菌 (*Pyricularia* spp.) における非病原力遺伝子 *AVR-Pita* の座乗染色体変動機構

中馬いづみ, 磯部千尋, 中屋敷均, 眞山滋志, 土佐幸雄 (神戸大・農)

いもち病菌における寄生性分化機構をゲノム構造から解明することを目的に、複数種の *Pyricularia* 属菌集団の比較核型解析を行った。その結果、本菌集団には、染色体構造の多様化とともに非病原力遺伝子座を変動・分散させる機構が存在することが示唆された。このうち、すでにクローニングされている非病原力遺伝子のひとつ *AVR-Pita* の座乗染色体と周辺構造を詳細に検討した。本遺伝子の座乗染色体ならびに染色体上の座乗位置は、常染色体あるいは過剰染色体、テロメア近傍あるいは非テロメア領域というように様々で、本遺伝子が寄生性分化の過程でゲノム上をダイナミックに変動・分散したことが判明した。この機構を解明するため、本遺伝子周辺領域をクローニングし、構造を比較したところ、本遺伝子上流および下流に様々な組み合わせでレトロトランスポソンの断片等が存在した。このことから、周辺に存在する転移因子が異所的組み換えの媒体になり、本遺伝子を移動させたと考えられた。特にイネ菌群では、菌群内でも座乗染色体の変動・分散が激しく起こっており、周辺に集積した転移因子配列が他の菌群と比べてより多様であった。このような周辺構造の多様化が異所的組み換えの機会を増大させ、コピー数や座乗染色体のより激しい変動性をイネ菌に付与したと思われた。

Dynamics of an avirulence gene locus, *AVR-Pita*, in *Pyricularia* spp.

Izumi Chuma, Chihiro Isobe, Hiotschi Nakayashiki, Shigeyuki Mayama, Yukio Tosa

(Fac. of Agriculture, Kobe Univ.)

P-15

イネいもち病菌の非病原性遺伝子 *Avr-pia* のクローニング

曾根輝雄¹, 三木慎介¹, 松井幸太郎¹, 芦澤武人², 鬼頭英樹³, 平八重一之¹, 中島敏彦⁴, 富田房男⁵
(¹北大院農・応用菌学, ²中央農研, ³農業生物資源研, ⁴東北農研, ⁵放送大)

我々は、イネいもち病菌の宿主特異性相互作用の解析と、宿主特異性変異の機構を解析するため、イネ品種愛知旭のもつ真性抵抗性遺伝子 *Pi-a* に対する非病原性遺伝子である *Avr-Pia* のクローニングを試みている。現在までにイネいもち病菌 Ina168 株コスミドゲノムライブラリーから *Avr-Pia* 領域を含む約 40kb のインサートを含むコスミドクローンを得ている。そこで、インサート約 40kb の配列からトランスポゾン等の既知の反復配列を除く部分を PCR 法によって I-VI の 6 つの断片に分け、別々にクローニングした。これらクローンを愛知旭に対して病原性をもつ (*avr-Pia*) 変異株 Ina168m95-1 に形質転換し、これらの形質転換体を愛知旭に接種した。その結果、断片 V を形質転換したものだけが、愛知旭に対して非病原性を示した。また、同様に愛知旭に病原性の圃場分離株 Ina86-137 株に断片 V を形質転換したところ、愛知旭への病原性を失った。断片 V の領域を増幅するプライマーを用いて圃場分離株のゲノム DNA の PCR 反応を行ったところ、愛知旭に非病原性の菌株のみから同断片の増幅が見られた。以上より、断片 V に *Avr-Pia* を含むことが示唆された。断片 V は全長 3,531bp で、内在する最も長い 255bp の ORF に細菌由来 cytochrome 様タンパク質への弱い相同性がみられた。

Molecular cloning of *Avr-Pia*, the avirulence gene in *Magnaporthe oryzae* toward the rice blast resistance gene *Pi-a*.

Teruo Sone¹, Shinsuke Miki¹, Kotaro Matsui¹, Taketo Ashizawa², Hideki Kito³, Kazuyuki Hirayae², Toshihiko Nakajima⁴, and Fusao Tomita⁵. (¹Hokkaido Univ., ²NARC, ³NIAS, ⁴NARCT, ⁵Univ. of Air)

P-16

Biotinylated Neoechinulin A 化学合成経路の改善と *Aspergillus* 属の Neoechinulin A 生合成遺伝子群の探索

竹野正洋, 大石麻由, 堀内桃子, 鎌倉高志 (東理大理工)

Neoechinulin A は 1) 抗酸化作用、2) 細胞の NADH-デヒドロゲナーゼ活性の上昇作用、及び 3) 細胞の Caspase-3 の活性抑制作用、の少なくとも 3 つの機能を有しており、SIN-1 (3-(4-morpholinyl)sydnimine hydrochlorid) により誘導される神経細胞死に対して、高い抑制作用を示す。Neoechinulin A は一酸化窒素やスーパーオキシドといった生理活性物質には影響を与えずに抗酸化作用を示す化合物であり、生体内への影響を考えた場合非常に有用である。Neoechinulin A は、特に分化 PC12 細胞及び初代培養神経細胞において細胞死を抑制したことから、神経細胞に対して特異的に作用する可能性が高いと考えられる。

これら興味深い活性を持っている Neoechinulin A だが、生合成に関する遺伝子は未だ単離・解析されていない。よって我々は Neoechinulin A の生合成に関する遺伝子の単離と解析を目指した。Neoechinulin A 生合成経路に必要な酵素は最終産物である Neoechinulin A に親和性があると予測されるので、T7 フェージディスプレイ法によって合成経路に関わる遺伝子の単離と解析を試みた。また、T7 フェージディスプレイ法を行う際に必要であった Neoechinulin A のビオチン化誘導体の化学合成を行い、既知の合成方法の改善を試みた。

Improvement of chemical synthesis of biotinylated Neoechinulin A and search for *Aspergillus* spp. genes involved in the neoechinulin A biosynthetic pathway.

Masahiro Takeno, Mayu Oishi, Momoko horiuchi, and Takashi Kamakura.
(Tokyo Univ.of Science)

P-17

Aspergillus fumigatus が生産するトリプロスタチン類の生合成遺伝子クラスター

加藤直樹, 高木海, 浅見行弘, 掛谷秀昭, 長田裕之 (理研・中央研・抗生物質)

Aspergillus fumigatus BM939 株が生産するトリプロスタチン類は細胞周期を制御する生物活性を有するジケトピペラジン化合物である。微小管が分子標的であり、その重合を阻害することにより細胞周期を分裂期に停止させる。様々な類縁体の中には微小管重合に対して促進活性を示すものもあり、トリプロスタチンのファーマコアは抗腫瘍剤のリード化合物として有望である。

トリプロスタチン類の推定生合成経路を基に、トリプトファンとプロリンの縮合反応を担う非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS) に加え、プレニル基転移酵素 (DMATS、ジメチルアリールトリプトファン合成酵素)、P450 酸化酵素、メチル基転移酵素の関与を予想した。*A. fumigatus* ゲノム中に見出される 6 種類の dimodular NRPS のうち、生合成への関与が予想された酵素遺伝子すべてが近傍に存在するのは 1 種類だけであった。最近、Maiya らは本 NRPS 遺伝子を *A. nidulans* において過剰発現させることにより、トリプロスタチン類生合成の初段階である brevianamide F (cyclo-L-Trp-L-Pro) の生合成に関与していることを報告している (Maiya *et al.*, *ChemBioChem* 2006, 7, 1062-1069)。しかしながら、ゲノム解読株 (Af293) ではトリプロスタチン類が検出されておらず、ノックアウトによる生合成遺伝子群の機能同定には至っていない。現在、トリプロスタチン類生産株を対象に候補 NRPS、DMATS 遺伝子のノックアウト株を作製中である。また、ゲノム解読株とトリプロスタチン生産株のトリプロスタチン類の生産能の差異の原因を明らかにするため、生産株からの生合成遺伝子クラスターのクローン化とゲノム配列の比較を行っている。

Studies on tryprostatin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus fumigatus* BM939.

Naoki Kato, Hiroshi Takagi, Yukihiko Asami, Hideaki Kakeya, Hiroyuki Osada

(Antibiotics Lab., Discovery Res. Institute, RIKEN)

P-18

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

勢ノ康代¹, 藤井 勲¹, Praveen Rao Juvvadi², 北本勝ひこ², 海老塚豊¹

(¹東大院・薬,²東大院・農生科・応生工)

【目的】これまでに糸状菌の III 型ポリケタイド合成酵素 (PKS) 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 *A. oryzae* のゲノム中に見出し、*csyA*, *B*, *D* の 3 遺伝子が *A. oryzae* で発現していることを確認した。III 型 PKS 遺伝子は、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が、*csy* 遺伝子を含む糸状菌 III 型 PKS 遺伝子は、系統樹解析により植物やバクテリアの III 型 PKS 遺伝子とは異なるグループを作ることから、その機能に興味を持たれている。本研究では、*A. oryzae* の *csy* 各遺伝子の機能を解明するため、遺伝子破壊株の作製、および、誘導発現による PKS 産物の同定を試みた。

【方法および結果】*A. oryzae* RIB40 由来の NSR13 株を宿主とし、マーカー遺伝子 *adeA* との相同組換えにより、*csyA* 遺伝子の破壊株を取得した。本破壊株は、生育や菌糸・分生子色素などの表現型に違いは認められなかった。次に、*csyA* 遺伝子を *amyB* プロモーター下に組み込んだ発現プラスミドを構築し、*A. oryzae* M-2-3 株に形質転換・導入した。マルトース存在下に *csyA* 遺伝子を誘導発現させ、*csyA* 特異的な化合物の検出を試みた。誘導培地上清と菌体、それぞれを酢酸エチルで抽出し、TLC、HPLC により分析した。その結果、培地、菌体ともにコントロールの形質転換体には見られない複数の化合物が認められた。そこで、大量培養した誘導培地上清より主生成物と考えられる化合物を抽出し、これをカラムクロマトにより単離、精製した。現在、NMR などによりその構造解析を進めている。

Functional analysis of type III polyketide synthase genes from *Aspergillus oryzae*

Yasuyo Seshime¹, Isao Fujii¹, Praveen Rao Juvvadi², Katsuhiko Kitamoto², Yutaka Ebizuka¹

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

P-19

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）

6-メチルサリチル酸合成酵素（MSAS）は、糸状菌のタイプ I 繰返し型ポリケタイド合成酵素（PKS）として最小であり、その構造と反応機構の解明のよいターゲットであると考えられる。我々は、*Aspergillus terreus* 由来の MSAS である ATX について、酵母発現系を用いて単独では不活性な N 末欠失体と C 末欠失体を共発現させることにより、ATX の反応中心は少なくとも 2 つのポリペプチド鎖の相互作用により構成されていることを示してきた。

今回、欠失領域をより長くした変異体の共発現により、反応中心の再構成に最小限必要な領域を明らかにした。MSAS は縮合酵素 KS、アシル基転移酵素 AT、脱水酵素 DH、ケト還元酵素 KR、アシルキャリアープロテイン ACP からなるポリペプチド鎖が互いに head-to-tail 構造をとって活性中心を構成し、機能していると考えられていたことから、ATX の各触媒ドメイン活性中心変異体を用いた検討も行った。各変異体を発現させると、KR 変異体がトリケタイド中間体の環化体である triacetic acid lactone（TAL）を合成したにも関わらず、DH-KR 共変異体が TAL を合成しなかったことから、DH は中間体の脱水反応以外の反応も触媒する可能性が示唆された。異種変異体の共発現においては、異なるポリペプチド上の KS と AT、KS と DH、AT と DH、KR と ACP が反応中心の構成に関わることが明らかになり、これまで提唱されていた単純な head-to-tail モデルでは説明できないドメイン間相互作用の存在が見出された。ATX は 4 量体で機能することから、2 つのポリペプチド鎖が head-to-head で近接し、これがさらに 4 量体を形成する新たなモデルを提案した。

Expression and functional analysis of iterative type I polyketide synthase

Tomomi Moriguchi, Isao Fujii, Yutaka Ebizuka

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

P-20

麹菌 *A. oryzae* の繰返し型タイプ I ポリケタイド合成酵素遺伝子の発現と機能解析

守屋智博¹、勢ヶ康代¹、北本勝ひこ²、藤井勲¹、海老塚豊¹（東大院・薬¹、東大院・農生科・応生工²）

麹菌 *A. oryzae* RIB40 のゲノム解析により本菌には多数のポリケタイド合成酵素（PKS）遺伝子が存在することが明らかになった。完全長の繰返し型タイプ I PKS 遺伝子は 28 個存在し、そのドメイン構成から、芳香族化合物を生成すると考えられる芳香族型 PKS をコードする遺伝子は 13 個（*Ao1-1~13*）、脂肪族化合物を生成する還元型 PKS の遺伝子は 12 個（*Ao2-1~12*）、また、非リボソームペプチド合成酵素とのハイブリッド型 PKS の遺伝子は 3 個（*Ao3-1~3*）であった。しかし、これまでに *A. oryzae* よりこれら PKS の産物と考えられる化合物の単離は報告されておらず、その機能を明らかにすることを目的として、これら PKS を順次誘導発現させ、その生成産物を同定することとした。

まず、芳香族型 PKS 遺伝子 *Ao1-1* を糸状菌用発現ベクター pTAex3R に Gateway 法により導入し、発現プラスミドを構築、*A. oryzae* M-2-3 株に形質転換・導入した。得られた形質転換体を誘導培養し、生産化合物を HPLC で分析したところ、培養液・菌体抽出液ともにコントロールの形質転換体には存在しない特異的な 2 つの化合物が検出され、現在、その単離、同定について検討中である。また、他の PKS 遺伝子についても同様に発現系の構築と解析を進めている。

Expression and functional analysis of type I polyketide synthase genes from *A. oryzae*

Tomohiro Moriya¹, Yasuyo Seshime¹, Katsuhiko Kitamoto², Isao Fujii¹, Yutaka Ebizuka¹

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

P-21

Penicillium luteo-aurantium のポリケタイド合成酵素遺伝子の機能解析

佐野 裕基, 藤井 勲, 海老塚 豊 (東大院・薬)

細胞周期の停止など様々な活性をもつラディシコールは、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、その生合成遺伝子は未だ同定されていない。そこで、ラディシコール生産菌である *Penicillium luteo-aurantium* より新規 PKS 遺伝子のクローニングを試み、これまでに還元型 PKS をコードする *pkHS1*、PKS/NRPS のハイブリッド遺伝子である *pkHS5*、芳香族型 PKS をコードする *pkHS12* の全長配列を決定した。*pkHS1* に関しては、Gateway cloning 法を用いて糸状菌発現用ベクター pTAex3R に導入したプラスミド pTA-PkHS1 で *Aspergillus oryzae* を形質転換し、生産物の分析を行った。その結果、培養液の HPLC 分析で、コントロールには見られない特異的なピークを検出した。標品との比較から、これをオルセリン酸であると同定した。PkHS1 はケト還元酵素 KR ドメイン、脱水酵素 DH ドメインを有することから還元型 PKS と考えられたが、そのドメイン配置は 6-メチルサリチル酸合成酵素の C 末にアシル基転移酵素 AT ドメインを付加したものであり、アセチル基をスターターとしてオルセリン酸合成酵素様に閉環し、オルセリン酸を生成したものと考えられる。ラディシコールはオルセリン酸の部分構造をもつことから、別の PKS/FAS が生成したアシル鎖をスターターとして PkHS1 の AT が受け取り、3 分子の酢酸単位の縮合、閉環反応により、ラディシコールの炭素骨格を生成する可能性が考えられる。PkHS5 についても、Gateway cloning 法を用いて作製したプラスミド pTA-PkHS5 を *A. oryzae* に導入し、得られた形質転換体の生産物について分析を進めている。

Functional analysis of polyketides synthase genes from *Penicillium luteo-aurantium*

Hiroki Sano, Isao Fujii, Yutaka Ebizuka

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

P-22

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)

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。その C 末領域は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クライゼンサイクラーゼドメイン CYC である。Alb1p の CYC 欠失体である Cd-3 を発現させるとイソクマリン型のヘプタケタイド化合物である DHCI が生産されるが、Cd-3 と共に CYC ドメインを独立のタンパクとして発現させると YWA1 が生産されることから、CYC ドメインが独立の酵素タンパクとして 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できることを報告した。

そこで、今回、CYC ドメインの機能をさらに解析するため、CYC タンパクの大腸菌での発現と精製を試みた。Alb1p の CYC ドメイン遺伝子を実験用ベクター pET21a に導入し、発現プラスミド pET21a-alb1p-CYC を構築した。これを大腸菌 BL21 Codon plus に導入し発現を試みたところ、25°C、18 hr 誘導培養で最もよく可溶性画分に発現することが確認された。His tag を付加した CYC タンパクは、Ni affinity column でほぼ単一のタンパクとして精製され、enterokinase 処理により His tag を除去した。現在、この CYC タンパクと Cd-3 による YWA1 の in vitro 合成系の再構築を検討中である。

Studies on the Claisen cyclase domains of fungal aromatic polyketide synthases

Shun Miyazaki, Isao Fujii, Yutaka Ebizuka

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

P-23

酵母を宿主とした *Aspergillus fumigatus* DHN-メラニン生合成系の再構成

南部 夏希, 藤井 勲, 海老塚 豊 (東大院・薬)

ヒトアスペルギルス症の主たる病因菌である *Aspergillus fumigatus* の胞子色素生合成遺伝子クラスターには、芳香族繰返し型タイプ I ポリケタイド合成酵素 (PKS) をコードする *alb1* を含む 6 つの遺伝子が存在する。ヘプタケタイド合成酵素である Alb1p によりナフトピロン YWA1 が生成し、これがクラスターを構成する側鎖切断酵素、還元酵素、脱水酵素などにより、順次、1,8-dihydroxynaphthalene (DHN) へと変換され、最後に DHN がフェノール酸化酵素により重合して DHN-メラニンが生成すると考えられている。しかし、クラスター内にコードされる 2 つの酸化酵素 *Abr1p*、*Abr2p* のどちらが DHN の重合を触媒するかなど不明な点も多い。本研究においては、*A. fumigatus* の DHN-メラニン生合成に関わる各酵素の機能を同定するとともに、酵母を宿主とした糸状菌二次代謝生合成系の再構成モデルとして DHN-メラニン生合成系の構築を目的とした。

まず、酵母内で発現した PKS を活性型とするため、*Aspergillus nidulans* のホスホパンテテイン転移酵素遺伝子 *npgA* を染色体に組み込んだ酵母を作製した。これに *alb1* の発現プラスミド pYES-*alb1* を導入し、この形質転換酵母が YWA1 を生産することを確認した。次に、YWA1 の側鎖切断酵素遺伝子 *ayg1* を共発現させ、1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (T4HN) の生産を確認した。続いて、T4HN 還元酵素をコードすると予想された *arp2* 遺伝子を共発現させることにより *sycitalone* が生成することを確認した。現在、残りの 3 つの遺伝子 *arp1*、*abr1*、*abr2* についても各発現プラスミドを構築、順次、酵母に導入し、解析を進めている。

Reconstitution of DHN-melanin biosynthetic pathway of *Aspergillus fumigatus* in yeast

Natsuki Nambu, Isao Fujii, Yutaka Ebizuka

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

P-24

GFP 融合蛋白質を用いた麴菌のシデロフォア生産調節因子(SreAo)の局在解析

渡辺久敬, 佐藤利次 (岩手生工研)

麴菌(*A. oryzae*)は清酒の潜在的な着色原因となっているフェリクリシンを分泌する。フェリクリシンはシデロフォアの一つであり鉄欠乏時に誘導的に分泌生産される。SreAo はフェリクリシン生産制御因子遺伝子であり、鉄余剰環境下でフェリクリシン合成の第一段階であるオルニチン-*N*⁵-オキシゲナーゼ遺伝子 (*dffA*) を転写レベルで抑制するが、SreAo による *dffA* 転写の ON/OFF の制御機構は十分には明らかでない。

今回我々は、SreAo と GFP との融合蛋白質を麴菌で発現をさせ、その細胞内での局在性を調べた。高発現プロモータである *amyB* プロモータを用いて GFP 融合蛋白質を発現させたところ、GFP 蛍光の細胞核への局在が観察された。また、GFP 融合蛋白質は *sreAo* 欠損株の表現型を野性型に復帰させたことから、SreAo が核タンパク質として機能していることが確認された。また現在、培地中の鉄の存在の有無によって GFP 融合蛋白質の局在性が変化するかどうかを検討しており、その結果も併せて発表する予定である。

Analysis of localization of SreAo, a siderophore biosynthesis regulator of *Aspergillus oryzae*, as GFP fusion protein

Hisayuki Watanabe, Toshitsugu Sato (IBRC)

P-25

紅麴菌 (*Monascus pilosus*) による二次代謝産物の生産

三宅剛史¹, 張明永^{1,2}, 内富久美子³, 河野勇人¹, 野崎信行¹, 産本弘之¹, 稲垣賢二³

(¹岡山県工技セ, ²JSPS, ³岡山大院・生物機能化学)

紅麴菌 (*Monascus pilosus*) はロバスタチン (コレステロール低下作用) や赤色色素 (天然色素) などの有用な二次代謝産物を生産するがその調節についてはほとんど明らかにされていない。紅麴菌による二次代謝産物の高生産を目的に炭素源や窒素源などの影響を調べ、紅麴菌による二次代謝産物の生産が cAMP 経路を経る強いグルコース抑制を受けることを明らかにした。そして適切な培養基質の調製によりバイオマス形成を維持しながらグルコース抑制を回避することで二次代謝産物の高生産を実現できることを示した。同時にグルコース抑制が解除された変異株を分離取得しこれまでにない高生産を達成した。また糸状菌の二次代謝を制御する因子 *LaeA* の紅麴菌ホモログ *MpLaeA* を同定取得しその制御機構と二次代謝への寄与を調べた。その結果、*MpLaeA* の mRNA は 5'末端非翻訳領域で選択的スプライシングを受け長鎖型と短鎖型となることが明らかになった。この選択的スプライシングは培養基質などによる制御を受け、短鎖型へは構成的にスプライシングされていたのに対し、長鎖型へのスプライシングはペプトンなどの有機窒素源の存在により抑制された。そして興味深いことに長鎖型へのスプライシングが抑えられる条件下でロバスタチンが生産されていることを見いだした。長鎖型のもつ長い 5'非翻訳領域に非翻訳的な効果も示唆されることから、長鎖型への抑制が短鎖型による翻訳を促進させ、その結果ロバスタチンが生産されたと考えている。さらにアンチセンス鎖導入による *MpLaeA* の転写抑制によってロバスタチンの生産が抑えられたことから、紅麴菌においても本遺伝子が二次代謝の制御に寄与していることが示唆された。

Production of secondary metabolites by *Monascus pilosus*

Tsuyoshi Miyake¹, Ming-Yong Zhang^{1,2}, Kumiko Uchitomi³, Isato Kono¹, Nobuyuki Nozaki¹, Hiroyuki Sammoto¹, Kenji Inagaki³ (¹Ind Tech Ctr, Okayama Pref, ²JSPS, ³Dept Biofunct Chem, Grad Sch, Okayama Univ)

P-26

キャベツ萎黄病菌 Cong:1-1 とその病原性欠損株 Cong:1-2 におけるタンパク質発現パターンの解析

岡部明子, 吉田隆延*・有本 裕**・堂前 直**・森 翔吾***・寺岡 徹・有江 力 (農工大・*農環研・**理研・***農大)

土壌病原性子のう菌であるキャベツ萎黄病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* Cong:1-1 の継代培養中に病原性を欠損した株 Cong:1-2 が出現した。Cong:1-2 をあらかじめキャベツに処理すると、Cong:1-1 による病害が抑制されることから、Cong:1-2 はキャベツ萎黄病に対する生物防除活性を持つ。Cong:1-1 と Cong:1-2 間での発現タンパク質の差異を調査することで病原性関連因子、生物防除活性関連因子の探索を試みている。10日間振とう培養した菌体からタンパク質を抽出し、二次元電気泳動法によって分離展開し、タンパク質スポットの差異を調査した。その結果、約 300 のスポットをそれぞれ検出し、差のあるタンパク質を複数見出した。このうち、Cong:1-2 で圧倒的に多く発現している推定オキシドリダクターゼタンパク質 (ODX1) に注目し、解析を行ったが、病原性には関与していなかった。

Comparison of protein expression patterns between cabbage yellows fungus Cong:1-1 and its virulence-loss-mutant Cong:1-2.

Akiko Okabe, Takanobu Yoshida, Naoshi Domae, Shougo Mori, Thoru Teraoka, Tutomu Arie (Tokyo Univ. of Agric. & Tech., Natn. Inst. for Agro-Env. Sci., RIKEN, Tokyo Univ. of Agric.)

P-27

***Colletotrichum acutatum* のベノミル耐性遺伝子 *CaBEN1* は β -チューブリン遺伝子の転写に関わっている**

中畝良二・中野正明 (農研機構 果樹研)

果樹をはじめ農作物の炭疽病を引き起こす *Colletotrichum acutatum* は、ベノミル等のベンズイミダゾール系殺菌剤に低感受性を示すことが知られている。一般的に、菌類のベノミル耐性は、薬剤の標的である β -チューブリンのアミノ酸置換に起因するが、*C. acutatum* では別の機構の関与が示唆されており、その詳細は不明である。我々は、ハイグロマイシン耐性遺伝子で形質転換した約 3,600 株の中からベノミル感受性変異株 CAT7-150 を選抜し、ベノミル耐性関連遺伝子 *CaBEN1* を単離している。*CaBEN1* は、*Gibberella zeae* や *Neurospora crassa* の leucin zipper motif を有する機能未知タンパク質と高い相同性を示す 818 アミノ酸をコードすると推定された。一方、CAT7-150 と野生株 CAB03 から 2 種の β -チューブリン遺伝子 (*CaTUB1* および *CaTUB2*) をそれぞれ単離・解析したが、両株の間に配列の違いは認められなかった。CAB03 および *CaBEN1* 遺伝子破壊株における *CaTUB1* および *CaTUB2* の発現特性をノーザン解析したところ、CAB03 ではベノミル処理によって *CaTUB1* の転写が顕著に活性化されるのに対し、*CaBEN1* 遺伝子破壊株では転写の活性化は全く見られなかった。これらの結果から、*C. acutatum* のベノミル耐性に関する *CaBEN1* は *CaTUB1* の転写因子である可能性が示唆された。

CaBEN1 required for benomyl resistance regulates the transcription of beta-tubulin gene in *Colletotrichum acutatum*

Ryoji Nakaune, Masaaki Nakano
(NIFTS, NARO)

P-28

リンゴ斑点落葉病菌の AM 毒素生合成遺伝子クラスターにコードされる Zn(II)2Cys6 タイプ転写制御因子の機能

播本佳明, 児玉基一朗¹, 山本幹博², 尾谷 浩¹, 柘植尚志 (名大院生農・¹鳥取大農・²岡山大農)

リンゴ斑点落葉病菌は、宿主特異的毒素 (AM 毒素) を生産し、毒素感受性のリンゴ品種にのみ斑点性病害を引き起こす。先に、本菌から 2 個の AM 毒素生合成遺伝子 (*AMT* および *AMT2*) を同定した。さらに、IFO8984 株の *AMT* 遺伝子を含む BAC クローンを選抜し、その塩基配列(118 kb)を決定したところ、*AMT*、*AMT2* に加え 22 個の推定読み枠 (ORF) が見出された。毒素生産時と非生産時におけるこれら ORF の発現レベルを比較したところ、*AMT*、*AMT2* および 10 個の ORF が毒素生産時に高発現することが明らかとなり、*AMT* 遺伝子とこれら ORF を含む約 62 kb の領域が毒素生合成遺伝子クラスターであることが示唆された。このクラスターには、2 次代謝関連酵素と相同な ORF に加え、Zn(II)2Cys6 タイプの転写制御因子をコードする ORF13 が存在する。そこで、ORF13 の遺伝子破壊株を作出し、その毒素生合成における機能を解析した。野生株と破壊株の毒素生産量を比較したところ、破壊株ではその生産量が著しく増加することが明らかとなった。さらに、毒素生合成遺伝子クラスターの ORF の発現レベルが野生株に比べ破壊株で上昇することを見出した。また、ORF13 高発現株を作出したところ、高発現株では遺伝子クラスターの ORF の発現レベルが低下し、毒素生産量が減少することを確認した。以上の結果は、ORF13 (*AMTR1* と命名) が AM 毒素生合成遺伝子群の負の転写制御因子をコードすることを示した。

Function of a Zn(II)2Cys6-type transcription regulator embedded in the AM-toxin biosynthesis gene cluster of the apple pathotype of *Alternaria alternata*

Yoshiaki Harimoto, Motoichiro Kodama¹, Mikihiro Yamamoto², Hiroshi Otani¹, Takashi Tsuge
(Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., ¹Fac. Agric., Tottori Univ., ²Fac. Agric., Okayama Univ.)

P-29

ナシ黒斑病菌の貫穿菌糸における活性酸素種(ROS)の機能解析

玄康洙、池田健一、中屋敷均、朴杓允 (神戸大・自然科学)

宿主侵入時に生成するナシ黒斑病菌の ROS の役割を明らかとするために、細胞学・分子生物学的手法を用いて解析した。病原菌の孢子懸濁液をナシ葉に接種すると、ナシ葉上で孢子発芽した後、発芽管先端が膨らみ付着器を形成する。その付着器から貫穿菌糸が生じナシ葉のクチクラに侵入する時、感受性ナシ葉の貫穿菌糸に大規模な H₂O₂ 生成が認められ、それに伴って菌は高頻度に宿主へ侵入した。抵抗性ナシ葉の貫穿菌糸では小規模な H₂O₂ 生成が認められ、宿主への菌の侵入率は低かった。しかし、H₂O₂ の消去剤としてアスコルビン酸を添加した孢子懸濁液を接種すると、両品種葉における貫穿菌糸で H₂O₂ 生成量が減少し、それに相関して感受性ナシ葉で宿主への侵入率が低下した。以上の結果は、本菌の貫穿菌糸における H₂O₂ の生成は侵略力に関わる事を示唆する。次に、病原性への関与を証明するために ROS 生成に関わる NADPH oxidase (NOX) の単離を試みた。これまでに菌類で報告されている NOX 遺伝子を比較し、縮合プライマーを設計後、本菌のゲノム DNA を鋳型にして PCR を行った。その結果、既報の NOXA 遺伝子と高い相同性を示す PCR 断片が得られ、それをプローブとして用い本菌ゲノムのコスミドライブラリーから陽性クローンを選抜し、完全長遺伝子を単離した。

Role of reactive oxygen species (ROS) on penetration peg of *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype

Gang-Su HYON, Kenichi Ikeda, Hitoshi Nakayashiki, Yukio Tosa, Pyoyun Park

(Grad.Sch.of Science and Technology,Kobe Univ.)

P-30

Fusarium oxysporum の孢子形成関連転写因子 Ren1 は亜硝酸還元酵素遺伝子を制御する

飯田祐一郎、小原敏明、柘植尚志 (名大院生農)

F. oxysporum は、小型孢子、大型孢子および厚膜孢子の3種類の無性孢子を形成する。本菌は、栄養豊富な完全培地では孢子を形成しないが、カルボキシメチルセルロースを主な炭素源とする CMC 培地ではほとんど菌糸成育せず、小型孢子と大型孢子を大量に形成する。先に、EST (Expressed Sequence Tag) 解析によって両培地における発現遺伝子群を比較解析した。完全培地培養時と CMC 培地培養時の cDNA ライブラリーを作製し、それぞれ約 1,300 クローンの部分塩基配列を決定した。決定配列の比較によって、両ライブラリーからそれぞれ約 640 個の異なる遺伝子由来の独立クローンを同定した。また、本菌の孢子形成に不可欠な転写制御因子をコードする *REN1* 遺伝子を同定した。そこで、孢子形成時の発現遺伝子について、野生株と Δ *REN1* 変異株における発現レベルをリアルタイム PCR 法によって比較し、Ren1 によって正に制御される 23 個の候補遺伝子を選抜した。今回、これら遺伝子のうち硝酸塩利用性に関与する亜硝酸還元酵素遺伝子 (*FoNIIA* と命名) について、その孢子形成における機能を解析した。 Δ *REN1* 変異株における *FoNIIA* の発現レベルは野生株の 1/100 程度であり、亜硝酸培地での Δ *REN1* 変異株の成育は野生株に比べ有意に低下した。一方、硝酸還元酵素遺伝子の発現レベルは両菌株で同様であった。 Δ *FoNIIA* 変異株を作出し、その小型孢子、大型孢子および厚膜孢子の形成能を検定したところ、大型孢子の形成数が有意に減少することが明らかとなった。以上の結果は、Ren1 によって制御される亜硝酸還元酵素が大型孢子形成数に関与することを示した。

Conidiation-Related Transcription Factor Ren1 Regulates the Nitrite Reductase Gene in *Fusarium oxysporum*

Yuichiro Iida, Toshiaki Ohara, Takashi Tsuge

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

P-31

Fusarium oxysporum のピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子の同定

本山 愛, 寺岡 徹, 有江 力 (東京農工大・院農生物制御)

交配不全性子の菌 *Fusarium oxysporum* は、土壌伝染性の植物病原菌で、植物根部から侵入し、導管内を蔓延し、全身を萎凋・枯死させる。本菌は、酸素分圧が低いと想定される植物の導管内で生育することから、導管内では嫌気呼吸を行うことが推察される。また、本菌は嫌気呼吸の1つであるアルコール発酵能を持つことも知られている。そこで、本研究ではアルコール発酵と病原性との関連性について調査するため、好気呼吸とアルコール発酵の分岐点付近で機能するピルビン酸デカルボキシラーゼ (PDC) に着目した。*F. oxysporum* では PDC 遺伝子は未同定であったため、近縁種である *F. graminearum* のデータベース上の、他菌ピルビン酸デカルボキシラーゼと相同性の高い機能未知タンパク質 (#XM_390010.1) をコードする遺伝子情報を基に、縮重 PCR、TAIL-PCR によって、*F. oxysporum* から 3554bp の断片をクローニングした。この DNA 断片中には、3つのエクソンからなる推定 ORF (1710 bp) が存在し、PDC と想定される 570 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていると考えられた。この遺伝子を *pdcl* とした。PDC1 は、アミノ酸配列で *F. graminearum* の推定タンパク質と 96.1%、*Aspergillus fumigatus* の PDC (#XM_74419.1) と 63.5%、*A. oryzae* の PDC (#AF098293.1) と 62%、*Saccharomyces cerevisiae* の PDC1 (#NC_001144.4) と 47%の相同性を示した。また、PDC に高く保存されるアミノ酸モチーフ (-GDG-から-NN-) が存在した (aa. 448-476)。ゲノミックサザン解析の結果、*pdcl* は *F. oxysporum* ゲノム上に 1 コピー存在した。

A putative pyruvate decarboxylase gene in *Fusarium oxysporum*

Ai Motoyama, Tohru Teraka, Tsutomu Arie

(Tokyo Univ. of Agric. & Tech.)

P-32

浸透圧により発現が変動する麹菌の遺伝子群とそのプロモーターの利用

織田 健、¹坂本和俊、²有馬寿英、¹大北由佳、¹柿菌ダララット、¹山田 修、^{1,3}岩下和裕、⁴秋田 修
(金沢工大ゲノム研、¹酒総研、²県立広島大、³広大先端研、⁴実践女子大)

浸透圧に対する応答は、酵母から哺乳類に至る真核生物において普遍的に存在し、詳細な研究がなされている。特に麹菌 *Aspergillus oryzae* では、麹造り(固体培養)の工程において環境認識の重要な因子と考えられ、実際に AtfB や HogA など浸透圧制御系が重要であることが示されている。そこで、浸透圧の変化に応じて発現が誘導される遺伝子群を解析し、そのプロモーターを利用した発現ベクターの開発を行った。

A. oryzae RIB40 株を DP 培地にて 24 時間前培養した後、0.8M NaCl および 1.2M Sorbitol を添加した培地に移し、経時的なマイクロアレイ解析を行ない発現が変動する遺伝子の探索を行なった。その結果、5 倍以上発現が上昇する遺伝子群として 19 種類の遺伝子を見出した。うち 5 つは浸透圧に鋭敏に、大きく応答したことから、GUS レポーター解析を行なった。結果、等張条件で誘導可能で、かつ厳密な制御が可能な 2 つのプロモーターを取得した。また、本プロモーターを利用し、浸透圧で誘導される発現系を構築した。

Isolation of Isoosmotic Up-regulated Gene (IUG) promoters in *A. oryzae*

Ken Oda, ¹Kazutoshi Sakamoto, ²Toshihide Arima, ¹Yuka Okita, ¹Dararat Kakizono, ¹Osamu Yamada, ^{1,3}Kazuhiro Iwashita, ⁴Osamu Akita

(KIT, ¹NRIB, ²Prefect. Univ. of Hiroshima, ³Hiroshima Univ., ⁴Jissen Women's Univ.)

P-33

麴菌 *Aspergillus oryzae* の bZIP 型転写制御因子遺伝子 *atfA* の解析

坂本和俊¹, 山田修¹, 大北由佳¹, 岩下和裕¹, 秋田修², 五味勝也³, 三上重明¹ (¹酒総研, ²実践女子大, ³東北大院・農)

米麴、ふすま麴などの固体培養では、液体培養や寒天培地よりも水分活性が低く、これが麴菌の固体培養における特徴的な遺伝子発現を生み出していると考えられている。これまで我々は固体培養時の特徴的な遺伝子発現を制御する転写制御因子の特定を試み、ATF/CREB ファミリーに属する *atfB* 遺伝子が固体培養後期の遺伝子発現を制御することを明らかにしてきた。麴菌には AtfB タンパク質の推定 DNA 結合ドメインとほぼ同一のアミノ酸配列をコードする遺伝子 *atfA* が存在していることが明らかとなっている。

今回我々は *atfA* 遺伝子の機能を解析することを目的として *atfA* 破壊株を作成し解析したところ、分生子の発芽率が大きく低下していた。液体培養中での菌体量の推移を観察した結果 *atfA* 破壊株の菌体量は野生株より低く推移したが、この菌体量の低下は発芽率に依存しており、液体培養中での菌糸成長は野生株と同等であることが確認された。また *atfA* 破壊株はふすま固体培養 (湿度 25%) において生育が極端に遅れ、培養環境中の湿度を 95% に高めることにより生育が回復するという現象が見られた。さらに浸透圧を高めた寒天培地上での生育の遅れも観察されたことから *atfA* は低水分活性 (高浸透圧) 環境への応答にも重要であることが明らかとなった。

Analysis of *atfA*, a transcription-factor gene of *Aspergillus oryzae*

Kazutoshi Sakamoto¹, Osamu Yamada¹, Yuka Okita¹, Kazuhiro Iwashita¹, Osamu Akita¹, Katsuya Gomi², Shigeaki Mikami¹ (¹National Research Institute of Brewing, ²Jissen Women's Univ., ³Tohoku Univ., Grad. Sch. Agri. Sci.)

P-34

アカパンカビの浸透圧ストレスで誘導されるグリセロール合成における glycerol dehydrogenase の役割

山下和宏¹, 坂野真平², 塩澤あずさ¹, 藤村真¹ (¹東洋大・生命, ²東洋大・植機研セ)

生物は浸透圧ストレスに応答して細胞内にグリセロールを蓄積するが、グリセロール合成酵素として出芽酵母は Gpd1(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)を、糸状菌は glycerol dehydrogenase (GLD) を使用していると報告されている。アカパンカビには、GLD 活性をもつと推定される遺伝子が数種存在するが、そのうち *gcy-1* と *gcy-3* 遺伝子の発現が浸透圧処理により OS-2 MAP キナーゼ依存的に誘導される。そこで、*gcy-1* 破壊株を作成し、浸透圧感受性および GLD 酵素活性を調べた。その結果、*gcy-1* 破壊株は、浸透圧感受性を示すと同時に、GLD 活性が消失しており、フルジオキソニルや浸透圧処理した場合にも酵素活性は検出されなかった。しかし、浸透圧処理により蓄積するグリセロールは、野生株よりは低いものの、*gcy-1* 破壊株および *os-2* 変異株で顕著に認められた。一方、浸透圧感受性 *cut* 変異株は、GLD 酵素活性は野生株同様に浸透圧処理で誘導されたが、グリセロールの蓄積は全くおこらなかった。これらの遺伝子間の二重変異株を作成し浸透圧感受性を比較した。その結果、浸透圧感受性は(*cut os-2*)>(*os-2*, *gcy-1 os-2*)>(*cut*, *gcy-1*, *cut gcy-1*)>(野生株)であった。*gcy-1* 変異は、*os-2* および *cut* 変異株の浸透圧感受性にほとんど影響を与えないことから、*gcy-1* が OS-2 により調節されている主要な GLD 遺伝子であると考えられた。一方、*cut os-2* 株はそれぞれの単独株よりも高い浸透圧感受性を示したことから、浸透圧応答によるグリセロール合成には OS-2 MAP キナーゼおよび GLD に依存しない合成経路があると考えられた。

Role of glycerol dehydrogenase on glycerol synthesis in response to osmotic stress in *Neurospora crassa*

Kazuhiro Yamashita¹, Shinpei Banno², Azusa Shiozawa¹, and Makoto Fujimura¹ (¹Life Sci., Toyo Univ., ²PRPC., Toyo Univ.)

P-35

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

【目的】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 ($\Delta hik1$ 株) は高濃度の糖に対する高浸透圧感受性を示すのに対し、点変異体 ($hik1$ -M16 型変異株) は高浸透圧超感受性及び病原性の低下を示す。高浸透圧ストレス応答に関与する MAP キナーゼ Osm1 の活性化レベルの解析から、 $hik1$ -M16 株では野生株や $\Delta hik1$ 株と比較して Osm1 の活性化能が低下していることを明らかにしている。今回、より詳細な解析を行った。

【方法・結果】 $hik1$ -M16 型変異体の高浸透圧超感受性の原因を調べるため、Osm1 以外の MAP キナーゼで病原性に必須の Mps1 と Pmk1 の活性化を活性型 p44/42 MAP キナーゼ抗体を用いて解析した。その結果、野生株では未処理と高浸透圧処理において Mps1 の活性化はほとんど見られなかった。一方、 $hik1$ -M16 株では高浸透圧処理では、野生株と同様に活性化はほとんど認められなかったが、未処理においては Mps1 が活性化された。このことから、 $hik1$ -M16 株では Mps1 の情報伝達系が攪乱されてい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}, Ron Usami², Toshiaki Kudo¹, Takayuki Motoyama¹

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

P-36

糸状菌 *Aspergillus nidulans* における多様な酸化ストレス応答機構の解析

浅野祐広、萩原大祐、金丸京子、加藤雅士、小林哲夫、水野猛 (名大院・生命農学)

His-Asp リン酸リレー系はバクテリアから高等植物にまで普遍的に存在する環境応答情報伝達機構である。我々は糸状菌の普遍的な環境応答メカニズムの解明を目指し、*A. nidulans* における His-Asp リン酸リレー系の体系的な機能解析を行っている。これまでに His-Asp リン酸リレー系の構成因子である Histidine kinase (HK)、HPt 因子、Response regulator (RR) をそれぞれ 15 種類、1 種類、4 種類同定し、このうちの 2 つの RR (SskA、SrrA) が酸化ストレス応答に関与していることを明らかにした。また、酵母においては AP-1 type 転写因子も主要な酸化ストレス応答因子であることから、*A. nidulans* の相同因子も併せて機能解析を試みた。AP-1 type 転写因子に特徴的な N 末端の bZIP ドメイン、C 末端の CRD モチーフをともに有する因子は、*A. nidulans* のゲノム中に一つ推定された。その因子を NapA (*A. nidulans* AP-1) として破壊株を作製し、酸化ストレス応答の解析を行ったところ、NapA 破壊株は SskA や SrrA の破壊株と同様に H₂O₂、t-BOOH に感受性を示し、さらには Menadione に対しても感受性を示すことが明らかになった。その一方で NapA の破壊は、SskA や SrrA の破壊とは異なり、分生子形成能や形態には全く影響を及ぼさなかった。さらに、酵母において AP-1 type 転写因子や RR (SskA、SrrA の相同因子) は、重金属や Methylglyoxal (MG) のストレス応答にも関与していることが知られており、*A. nidulans* におけるこれらのストレス応答機構についても解析したいと考えている。このように、酵母と糸状菌の間で保存されているストレス応答因子に焦点を当てた解析から、糸状菌の環境応答機構の全体像の理解を目指している。

Analysis of the components involved in oxidative stress responses in *Aspergillus nidulans*

Yoshihiro Asano, Daisuke Hagiwara, Kyoko Kanamaru, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi, Takeshi Mizuno

(Grad. Sch. Bioagricultural Sci. Nagoya Univ.)

P-37

糸状菌 *Aspergillus nidulans* における二成分性情報伝達系リン酸基伸介因子 YpdA の解析

佐藤奈津子, 古川健太郎, 阿部敬悦 (東北大院・農・応生科)

真核生物の浸透圧応答研究は出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)において最も進展しており、高浸透圧応答 HOG (High-Osmolarity Glycerol response) 経路のほぼ全容が明らかにされている。Sln1p-Ypd1p-Ssk1p は、His-Asp リン酸基リレーを形成する浸透圧センサー二成分性情報伝達系であり、下流の Hog1p MAPK (mitogen-activated protein kinase) cascade を負に制御している。糸状菌のモデル生物である *Aspergillus nidulans* は、酵母 HOG 経路構成遺伝子のオルソログをすべて有することが明らかとなっている。酵母のリン酸基伸介因子 Ypd1p の欠損は Hog1pMAPK を構成的に活性化するために致死を示すことが報告されているが、我々は以前、*A. nidulans* の Ypd1p オルソログである YpdA がこの致死性を抑制できることを明らかにした。また、酵母では Ypd1p と相互作用する histidine kinase を Sln1p しか持たないが、*A. nidulans* は YpdA が複数の histidine kinase からリン酸基転移を受ける可能性があり、二成分性情報伝達系が複雑化している可能性が示唆される。

我々は *alcA* プロモーターを用いたコンディショナル *ypdA* 遺伝子発現抑制株 (*ypdAA*) を作成した。この株は *ypdA* 発現を抑制した場合にのみ顕著な生育阻害を示したことから、*A. nidulans* も出芽酵母と同様に *ypdA* 遺伝子を欠損すると致死を示す可能性が示唆された。さらに、*A. nidulans* HogA MAPK (酵母 Hog1pMAPK ホモログ) が *ypdAA* 株では、浸透圧刺激の有無に関わらず常に活性化状態にある事が観察された。また、*ypdAA* 株において HogA の上流因子である PbsB MAPKK (酵母 Pbs2pMAPKK ホモログ) を破壊したところ致死性の回避が見られた。以上のことから、YpdA は *Aspergillus nidulans* HOG 経路 (AnHOG 経路) の構成因子であり、YpdA 欠損による生育阻害の原因の一つとして AnHOG 経路の攪乱が起こっている事が考えられた。

Analysis of *ypdA* gene encoding a two-component histidine-containing phosphotransfer YpdA in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*

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

P-38

Aspergillus nidulans レスポンスレギュレーター SskA, SrrA の時間的発現変動と農薬感受性との関連

松林良博, 金丸京子, 萩原大祐, 丸井淳一郎, 水野猛, 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* は、他の多くの糸状菌同様、フルジオキソニル、イプロジオン等の農薬に対して、Nik-1 型 histidine kinase (nikA) 依存的な感受性を示す。*A. nidulans* には、His-Asp リン酸リレー型情報伝達系における下流因子である Response Regulator (RR) が 3 種 (SskA, SrrA, SrrC) 存在し、SskA, SrrA 類似遺伝子は糸状菌、酵母に高度に保存されている。我々は、SskA, SrrA と農薬感受性との関連を明らかにすることを目的として、NikA, SskA, SrrA 遺伝子の時間的発現変動と各遺伝子破壊株の分生子発芽時における農薬の影響を解析した。

[結果] フルジオキソニル、イプロジオン存在下では、*A. nidulans* の生育は阻害される。SskA, SrrA 単独破壊株の生育も上記農薬に対して、感受性を示すが、二重破壊株は NikA 破壊株と同等の耐性となる(萩原ら、本コンファレンス口頭発表)。リアルタイム PCR による経時的な発現プロファイル解析の結果、NikA mRNA は常に高レベル存在し、分生子形成期にはさらに発現レベルが上昇した。また、SskA はほぼ構成的に発現しているのに対し、SrrA は分生子形成後期に高発現していた。これは、SskA と SrrA の機能する時期が異なることを示しており、従って、SskA, SrrA 破壊の影響が培養時期により異なる可能性が考えられた。そこで、本報告では分生子からの発芽とその後の菌糸成長に与える SskA, SrrA 破壊の影響を顕微鏡下で観察した。SskA, SrrA いずれの破壊株においても、上記農薬による発芽阻害は見られなかったが、SskA 破壊株では数時間で菌糸成長が停止し、菌糸が膨潤して数珠状となった。SrrA 破壊株では生育速度が著しく低下し、高度にブランピングした塊が形成された。

Differential roles of response regulators, SskA and SrrA, in fungicide sensitivity in *Aspergillus nidulans*

Yoshihiro Matsubayashi, Kyoko Kanamaru, Daisuke Hagiwara, Junichiro Marui, Takeshi Mizuno, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi (Grad. Sch. of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.)

P-39

***In vitro* リン酸リレー系を用いた *Aspergillus nidulans* His-Asp リン酸リレーネットワークの解析**

東信宏、金丸京子、松鹿昭則、山篠貴史、水野猛、加藤雅士、小林哲夫 (名大院・生命農)

His-Asp リン酸リレー情報伝達系は生物における環境感知・細胞内情報伝達機構であり、原核生物だけでなく、酵母や高等植物においてもその存在が明らかとなっている。モデル糸状菌である *A. nidulans* には Histidine Kinase (HK) 15 種類、HPt 1 種類、Response Regulator (RR) 4 種類の存在がゲノム情報より推定されている。本研究ではこれらすべての因子の cDNA を取得し、リコンビナントタンパク質を精製することにより、リン酸リレーネットワークを戦略的に *in vitro* 解析することを目的とした。今回我々は HPt より下流のシグナル伝達経路に焦点を絞り、*in vitro* リン酸基転移実験を行った。大腸菌の代表的な HK である ArcB を過剰発現した細胞質膜をリン酸基のドナーとし糸状菌 HPt および RR へのリン酸基転移を解析したところ、HPt(YpdA)へのリン酸基転移と、さらに YpdA から RR (SrrA) へのリン酸基転移を確認した。さらに、推定リン酸化箇所を置換した変異タンパク質 (YpdA^{H85Q}、SrrA^{D385E}) を調製し *in vitro* 解析することにより、実際にこれらのアミノ酸残基がリン酸基転移に関与することを証明した。

In vitro* analysis of His-Asp phosphorelay in *Aspergillus nidulans

Nobuhiro Azuma, Kyouko Kanamaru, Akinori Matushika, Takashi Yamashino, Takeshi Mizuno, Masashi Kato, Tetuo Kobayashi

(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.)

P-40

***Aspergillus nidulans* Histidine Kinase の部位特異的発現**

鈴木麻子、金丸京子、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* の His-Asp リン酸リレー系構成因子としてヒスチジンキナーゼ (HK) 15 種、レスポンスレギュレーター (RR) 4 種、HPt 因子 1 種の存在が推定されているが、これらの因子が感知する環境シグナルの種類やその応答機構の大部分はいまだ解明されていない。また、15 種類の HK から伝達されると考えられる複数のシグナルを、いかにしてたった 1 種類の HPt を介してその下流の RR へと伝達するのか、その詳細についても明らかにされていない。そのメカニズムの一つとして、それぞれの HK が菌体内の異なる場所、異なる時期に発現することで、それぞれ異なるシグナルを下流へと伝達している可能性を考え、各 HK の発現部位や発現条件の解析を行うことにした。

【方法と結果】PCR で増幅した 15 種類の各 HK のプロモーター領域の下流にレポーター遺伝子として GFP 遺伝子を連結し、*A. nidulans* に導入した。得られた株を様々な培養条件で培養し、蛍光顕微鏡観察を行うことで、それぞれの HK の発現部位の解析を行った。その結果、(1) 菌糸および頂囊から胞子にかけての菌体全体で蛍光がみられたもの、(2) 頂囊から胞子にかけての部分に強い蛍光が観察されたもの、(3) 今回の観察条件では発現が見られなかったものの 3 種類に大別された。HK の部位特異的発現と機能分担の関係について考察する。

Site-specific expression of the Histidine kinases in *Aspergillus nidulans*.

Asako Suzuki, Kyoko Kanamaru, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi

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

P-41

インゲン根腐病菌における MAPK 遺伝子破壊株の作出とその病原性

北嶋勇典, 須賀晴久, 百町満朗 (岐阜大院・農)

細胞は多様な環境シグナルを受けて生理状態を変化させることが知られている。細胞内のシグナル伝達系には mitogen-activated protein kinase (MAPK) や cAMP-dependent protein kinase などがあり、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) などの植物病原性糸状菌においてはシグナル伝達系の病原性への関与が認められている。

本研究ではインゲン根腐病菌 *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* における MAPK の病原性への関与を調べた。まず近縁菌であるエンドウ根腐病菌 *F. solani* f. sp. *pisi* で明らかにされている *FUS3/KSS1* タイプの MAPK 遺伝子の塩基配列をもとに PCR 用プライマーを設計し、*F. solani* f. sp. *phaseoli* から MAPK ホモログ (*FspMAPK1*) をクローニングした。*FspMAPK1* がコードするアミノ酸配列には推定リン酸化部位である TEY 配列が存在した。クローニングした *FspMAPK1* にハイグロマイシン耐性遺伝子を挿入して遺伝子破壊用プラスミドベクターを構築し、ポリエチレングリコール法により *F. solani* f. sp. *phaseoli* を形質転換した。得られた形質転換体の中から、PCR 及び *FspMAPK1* をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより *FspMAPK1* 破壊株を選抜した。インゲンのもやし下胚軸を利用する方法で *FspMAPK1* 破壊株の病原性を調べた結果、*FspMAPK1* 破壊株の病原性は大きく低下していた。従って、他の植物病原性糸状菌と同様 *F. solani* f. sp. *phaseoli* においても MAPK が病原性に関与していることが示された。

MAPK gene desruption and it's affection of pathogenicity of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*

Yusuke Kitajima, Haruhisa Suga, Mituro Hyakumachi (Gifu Univ.)

P-42

Neurospora crassa の *grg-1* (glucose-repressible gene) は OS-2 MAP キナーゼにより発現調節を受ける

渡邊節子¹, 坂野真平², 塩澤あずさ¹, 落合則幸³, 木村真³, 藤村真¹

(¹東洋大・生命, ²東洋大・植機研セ, ³理研・中央研)

アカパンカビの OS-2 (MAP キナーゼ) は、浸透圧センサー (ヒスチジンキナーゼ) からのシグナルを受け浸透圧応答に重要な役割を担っている。一方、PKAC-1 (A キナーゼ) は、グルコースセンサー (G タンパク受容体?) の下流で孢子形成と菌糸形成のスイッチングに関与している。*os-2;pkac-1* 二重変異株などの浸透圧感受性解析から両経路のクロストークが示唆されているが、詳細は不明である。今回、*grg-1* (glucose-repressible gene) 遺伝子の発現が、OS-2 を活性化する fludioxonil および浸透圧処理で顕著に誘導されることが、リアルタイム RT-PCR 解析から明らかになった。*grg-1* のプロモーター領域のエレメント配列を検索したところ、CRE (cAMP-Responsive Element) や STRE (Stress Responsive Element) が存在した。*grg-1* 遺伝子の発現様式を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析するために、*grg-1* のプロモーターに EGFP 遺伝子を連結したプラスミド (pGRGFP) を作成した。pGRGFP 導入株は、fludioxonil や浸透圧処理により強い蛍光を示すことが確認された。現在、pGRGFP を利用して、発現調節とエレメントとの関連について解析を行っている。*grg-1* は糸状菌に特有の遺伝子でありその機能は不明であるが、OS 経路の下流で糖新生 Key 酵素の遺伝子 (*fbp-1* や *pck-1*) や孢子特異的カタラーゼ *cat-1* が調節されていることと合わせると、OS 経路が糖源の影響を受けている可能性が示唆される。

Expression of glucose-repressible gene, *grg-1*, is regulated by OS-2 MAP kinase

Setsuko Watanabe¹, Shinpei Banno², Azusa Shiozawa¹, Noriyuki Ochiai³, Makoto Kimura³, Makoto Fujimura¹ (¹Life Sci., Toyo Univ., ²PRRC., Toyo Univ., ³Env.Mol.Biol., RIKEN.)

P-43

***Neurospora crassa* の OS-2 MAP キナーゼの下流の転写調節因子の同定**

塩澤あずさ¹, 坂野真平², 山下和宏¹, 渡邊節子¹, 福森文康¹, 藤村真¹

(¹東洋大・生命,²東洋大・植機研セ)

N. crassa の OS-2 MAP キナーゼは浸透圧ストレスなどにより活性化され、グリセロール合成酵素(*gcy-1*, *gcy-3*, *dak-1*)、カタラーゼ(*ctt-1*, *cat-1*)や糖新生 key 酵素(*fbp-1*, *pck-1*)の遺伝子発現を誘導する。しかし、これらの OS-2 依存性遺伝子の転写調節遺伝子は特定されていない。そこで、酵母の Hog1 MAP キナーゼ下流の転写調節遺伝子 *sko1*, *msn2/4* および *yap1* のホモログである *atf-1* (CREB-type), *msn-1* (STRE-type), *nap-1* (AP-1-type)の破壊株を相同組み換え法により単離し、その解析を行った。*os-2* 変異株はフルジオキソニルに耐性および浸透圧に感受性を示すが、いずれの破壊株も野生株と同様の感受性を示した。しかし、*nap-1* 破壊株は出芽酵母の *yap1* 変異株同様にメナジオンなどの酸化的ストレスに感受性を示し、*msn-1* 破壊株は強いメナジオン耐性を示した。リアルタイム PCR を用いて各破壊株の OS-2 依存性の遺伝子群の発現誘導を調べたところ、*msn-1* および *nap-1* 破壊株では野生株と顕著な差が認められなかったが、*atf-1* 破壊株では *gcy-1* をはじめ 7 種類の OS-2 依存性遺伝子の発現誘導が顕著に低下していることが判明した。このことから、ATF-1 が OS-2 MAP キナーゼの下流の転写調節因子であると推定された。しかし、*atf-1* 破壊株を野生株や *os-2* 変異株と交配したところ、子嚢胞子は正常に形成されるものの、その発芽率は 50%程度であり、*atf-1* 破壊をもつ子孫が全く得られないことが明らかになった。現在、この原因を調査するとともに、プロモーター解析を行っている。

Identification of transcriptional factor regulated by OS-2 MAP kinase in *Neurospora crassa*

Azusa Shiozawa¹, Shinpei Banno², Kazuhiro Yamashita¹, Setsuko Watanabe¹, Fumiyasu Fukumori¹, and Makoto Fujimura¹ (¹Life Sci., Toyo Univ., ²PRRC., Toyo Univ.)

P-44

The *nsdC* gene encoding a novel positive regulator of sexual development of *Aspergillus nidulans* is regulated by complicated transcriptional and post-transcriptional control.

Hye-Ryoun Kim and Dong-Min Han (Division of Life Science, Wonkwang University, Korea)

The *nsdC* gene which is predicted to encode a putative transcription factor carrying a novel type of zinc finger DNA binding domain consisting of two C₂H₂ and a C₂HC motifs acts as a positive regulator of sexual development in *A. nidulans*. Two distinct transcripts, 3.2 and 2.8 kb, are synthesized and the smaller one differentially accumulates in various stages of growth and development as well as under the varying nutritional conditions. 5' RACE and Northern blot analysis revealed that there were at least two alternative transcription initiation sites which might be responsible for two kinds of transcript in different size. Two alternative transcription termination sites were also found through 3' RACE and Northern blot analysis of *nsdC* deletion mutant. The gene carries two relatively long introns in its 5'UTR, one of which is spliced alternatively. The results suggest that the expression of *nsdC* is controlled by complicated transcriptional and post transcriptional regulations.

P-45

Molecular analysis of the rapamycin-sensitive and cycloheximide-resistant *ActA1* gene in *Aspergillus nidulans*

Sun-Hee Noh and Suhn-Kee Chae (Dept. Biochemistry and Biomed RRC, Paichai Univ. Daejeon, 302-735 Korea)

The TOR (Target Of Rapamycin) pathway has been implicated in regulation of cellular responses to nutrients. During the course of screening of rapamycin-sensitive and -resistant mutants in *A. nidulans*, we observed that rapamycin sensitivities of FGSC stock strains were correlated to the presence of the *ActA1* mutation in the strains. In order to isolate the cognate gene responsible to rapamycin-sensitivity, we took an approach of complementation of an *ActA1* mutant with a genomic DNA library. Transformant was selected based on their wild-type sensitivity to rapamycin. The yeast *GCN20*-like gene was identified from the complementing region in the transformant. Sequencing analysis of its gDNA and cDNA predicted that the 2,596 bp-long ORF encoded a putative ATP-binding cassette protein and was interrupted by 8 introns. This *ActA1* complementing DNA region was mapped to chromosome III near *ActA* indicating that the complementing clone was not a suppressor of *ActA1*. The *ActA1* mutant allele was amplified and sequenced. The mutant allele *ActA1* contained point mutations at 393rd and 394th amino acid residues. $\Delta ActA$ displayed resistance to cycloheximide, but failed to show rapamycin sensitivity. Although $\Delta GCN20$ of *S. cerevisiae* is sensitive to 5'-MT, over-expression of *ActA* did not complement its 5'-MT sensitivity. [Supported by KRF]

P-46

N.crassa におけるシグナル遺伝子 *ncSCD2*, *ncSHK1* の解析

川村真志, 一石昭彦 (東洋大学・生命科学研究科)

S.pombe では、RAS1 による制御を受ける SCD1 シグナル伝達経路が存在し、細胞の形態形成や雌雄間の交配に関する調節していることが知られている。この SCD1 経路では、scaffolding タンパク質である SCD2、small-GTPase である CDC42、その GDP/GTP 交換因子である SCD1、そして kinase 活性を持つ SHK1 が複合体を形成し、下流へのリン酸化シグナルの伝達を行なっている。同じシグナル伝達経路上で、SCD2 と SHK1 は協調して働いている。

N.crassa のゲノムデータベース上においても、これら *S.pombe* の SCD2 と SHK1 に高い相同性を持つ領域が存在し、それぞれ *ncSCD2*, *ncSHK1* とした。そして *N.crassa* におけるそれらの機能を調べるため、*ncSCD2*、*ncSHK1* 遺伝子を破壊してその機能の解析を行なった。

両遺伝子破壊株は菌糸の伸長成長が遅く、菌糸先端での異常な分岐や非常に狭い隔壁間隔の形成といった形態異常、交配能の欠如といった共通の表現型を示した。しかし両遺伝子破壊株間の形質にはいくつかの違いが見られ、特に *ncSHK1* 遺伝子破壊株に関しては浸透圧耐性を示すといった形質を示した。両遺伝子破壊株には多少の形質の違いはあるが、やはり *N.crassa* においても SCD1 経路が細胞の形態形成や交配を制御し、その経路上で *ncSCD2*、*ncSHK1* は機能していると考えられる。また *ncSHK1* 遺伝子破壊株が浸透圧耐性を示したことから、*N.crassa* では SCD1 経路が浸透圧調節を担うシグナル伝達経路とクロストークしている可能性があると考えられる。

Characterization of signaling gene *ncSCD2*, *ncSHK1* of *N.crassa*

Masashi Kawamura, Akihiko Ichiishi

(Grad. Sch. of Life Sciences, Toyo Univ)

P-47

***Neurospora crassa* の NER 遺伝子 *mus-43*, *mus-44* の解析**

佐藤 正仁, 一石 昭彦 (東洋大・生命科学部)

紫外線がもたらす DNA 損傷は主に TC(6-4)光産物 ((6-4)PP) とシクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD) に代表され、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair : NER) はこれらの DNA 損傷を認識し修復を行う。

アカパンカビの NER に関与する *mus-43* と *mus-44* 変異株は、紫外線、4NQO の変異原に対して感受性を示したことから、修復系に関与していることを確認した。

これらの変異株とアカパンカビでこれまでに単離されている他の修復系変異株と二重変異株を作製し、エピスタシス解析を行った結果、両変異株の紫外線に対する生存率が NER 変異株である *mus-38* 変異株と非常に似た結果を示したことから NER 系に関与していることを確認した。また、*mus-38* 変異株で以前に報告されている光回復能の欠損が *mus-44* 変異株でも同様にみられ、*mus-43* 変異株においての光回復率は野生株よりは低いものの、*mus-38, mus-44* 変異株よりは高いことを確認した。

パントテン酸要求性株を用いて、両変異株の復帰突然変異率を調べた結果、両変異株ともに野生株よりも高い復帰率を示した。

紫外線により誘起される(6-4)PP、CPD の二つの DNA 損傷に対する除去能について、(6-4)PP および CPD に対する抗体を用いて測定を行った。CPD の損傷は *mus-43, mus-44* 両変異株とも野生株と同程度の除去能を有した。それらの結果も合わせて報告する。

Functional analyses of the NER gene, *mus-43* and *mus-44* from *Neurospora crassa*

Masahito Sato, Akihiko Ichiishi

(Toyo, Univ. Fac. of Life Sciences)

P-48

麴菌の DNA ligase (*lig4*) 遺伝子破壊による高頻度相同組換え宿主の造成

水谷治¹, 工藤洋平¹, 松浦知己¹, 井上弘一², 阿部敬悦³, 五味勝也¹ (¹東北大院農・生物産業創成、²埼玉大理、³東北大院農・応生化)

近年、アカパンカビなどにおいて非相同末端結合反応に関与する遺伝子である *ku70, ku80* のホモログ遺伝子を破壊することで相同組換え効率が劇的に上昇するという結果が報告された。これらの結果から非相同末端結合を抑制することで相同組換え頻度が上昇することが示された。麴菌においても *ku70, ku80* ホモログ遺伝子破壊株が得られているが、アカパンカビなどに比べその相同組換え頻度は低いことが報告されている。そこで本研究では、麴菌の更なる迅速な遺伝子破壊株造成システムの確立を目的とし、非相同末端結合反応において DNA の結合反応に関与している *lig4* ホモログ (*ligD*) の遺伝子破壊株の造成と相同組換え効率の検定を行った。プロテアーゼの発現に関与する転写因子である *prtR* 遺伝子を用いて相同組換え効率を検定したところ、報告されている麴菌 *ku70, ku80* 遺伝子破壊株よりも相同組換え効率が上昇していた。現在、*prtR* 遺伝子以外の遺伝子を用いて相同組換え効率を検討中である。

Highly efficient gene targeting of DNA ligase IV gene disruption in *Aspergillus oryzae*.

Osamu Mizutani¹, Youhei Kudou¹, Tomomi Matsuura¹, Hirokazu Inoue², Keietsu Abe¹, Katsuya Gomi¹ (¹Tohoku Univ., Grad. Sch. Agri. Sci., ²Saitama Univ.)

P-49

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) における ORF 内への poly(A)付加シグナル導入による異常 poly(A)付加

田中瑞己¹, 徳岡昌文^{1,2}, 高木忍³, 新谷尚弘¹, 五味勝也¹ (¹東北大・農・生物産業創成科学,²野田産業科学研究所,³ノボザイムジャパン)

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) を宿主とした異種タンパク質の生産量は自己のタンパク質と比較すると著しく少なく、生産量の改善が期待されている。これまでに我々は、ダニ由来タンパク質 Der f 7 のコドンをもとに麹菌に最適化することにより、mRNA 量の増加による Der f 7 生産量の改善に成功している。ネイティブな Der f 7 (Der ntv) の mRNA 量が減少する原因として、Der ntv の ORF 内において poly(A)が付加していたことから、異常 poly(A)付加による nonstop mRNA 分解経路による分解を受けている可能性が考えられた。しかし、真核生物で poly(A)付加シグナルとして機能する AAUAAA 配列が Der ntv ORF 内には認められなかった。そこで、麹菌において poly(A)付加シグナルとして機能する配列を明らかにするため、麹菌 EST クローン 3'側シーケンスを行った結果、AAUAAA 配列が存在するクローンはほとんど存在せず、AUUUU、AUUUA、UAAAU、AAUAAU 等の配列を持つクローンが多数存在した。Der ntv や別の異種遺伝子における ORF 内の異常 poly(A)付加部位の上流にもこれらの配列が存在しており、また、麹菌自身の遺伝子の ORF 内にこれらの配列を導入することにより発現量が低下したことから、麹菌においてはこれらの配列が poly(A)付加シグナルとして機能している可能性が示唆された。

Premature polyadenylation by inserting putative polyadenylation signal sequences within ORF in *Aspergillus oryzae*

Mizuki Tanaka¹, Masafumi Tokuoka^{1,2}, Shinobu Takagi³, Takahiro Shintani¹, Katsuya Gomi¹

(¹Div. Biosci. Biotech. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²Noda Institute for Scientific Research, ³Novozymes Japan Ltd.)

P-50

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の DNA トランスポゾン *Crawler* の転移活性と transposase 遺伝子の 3'-RACE 解析

小笠原 博信¹、小畑 浩²、秦 洋二²、高橋 砂織¹、五味 勝也³

(¹秋田県総食研・酵素微生物、²月桂冠・総研、³東北大院農・生物産業創成)

【目的】 実用麹菌 *Aspergillus oryzae* OSII013 株から見出されたトランスポゾン *Crawler* は *Tc1/mariner* superfamily に属する活性型の DNA トランスポゾンである。分生子の Cu 処理や高温処理などのストレス条件下における *niaD* や *crnA* 遺伝子への転移挿入および転移脱離活性が麹菌で初めて示された¹⁾。一方、ノーザン解析では転移活性が認められるか否かにかかわらず、スメアな 2 本のシグナルが認められたことから、OSII013 株では transposase 遺伝子から 2 種以上の mRNA が生成されていることが推定された。そこで、麹菌におけるトランスポゾン転移活性に対する制御機構の解析とその利用を目的に、*Crawler* の転写様式について検討を行った。

【方法と結果】 長さの異なる *Crawler* 転写産物を解析するため、CuSO₄ 添加培養区の total RNA を用いた 3'-RACE を行った。3'-RACE 産物の PCR の結果、ノーザン・プロットと同様のスメアな 2 本のバンドが得られ、塩基配列決定により transposase ORF 内部でも poly(A)付加が起きていることが明らかとなった。さらに、その上流域では 118bp のスプライシングも認められ、様々な長さの RACE クローンも多く得られている。一方、インタクトな全長 RACE クローンは少なかった。以上のことから、転移活性を示すトランスポゾン *Crawler* では、ORF 内での poly(A)付加やスプライシングにより不完全な mRNA が生成され、non-stop mRNA decay 経路などによる分解やプロセッシングによって *Crawler* の転移活性が制御されている可能性が示唆された。

1)小笠原ら、日本農芸化学会 2006 年度大会要旨、p 92

Transposition and expression of DNA transposon *Crawler* in *Aspergillus oryzae*

Hironobu Ogasawara¹, Hiroshi Obata², Yoji Hata², Saori Takahashi¹, Katsuya Gomi³

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

P-51

栽培不良症状を示すエノキタケで検出された dsRNA ウイルス

横井寿郎、砂川政英、馬替由美 (森林総研)

菌糸が不均一な生育を示すようになったエノキタケの栽培菌株(C株)について、病原因子の探索を行ったところ、分子量約 15kb の dsRNA ウイルスに感染していることが明らかになった。本ウイルスは、C株の育成に使用された親菌株では検出されなかったことから、栽培過程で感染したものと推定される。本ウイルスは PEG と NaCl 存在下で沈殿するが、電子顕微鏡観察によって粒子が確認できなかったことから、外皮タンパク質による粒子構造を持たない種類のウイルスであると推定される。また、菌糸を破碎する際にクロロフォルムを添加した時や、ウイルス画分をメンブランで濾過すると dsRNA が検出されなくなることから、膜成分と関与している可能性も示唆されている。抽出された本 dsRNA からランダムプライマーを用いた RT-PCR によって cDNA クローンを作製し、塩基配列の決定を行った。

dsRNA virus found in a degenerate strain of the cultivated *Flammulina velutipes*.

Toshiro Yokoi, Masahide Sunagawa, Yumi Magae

(Forestry & Forest Products Res.Inst.)

P-52

奇形症状を示す菌床栽培シイタケで検出された 2 本鎖 RNA ウイルス

馬替由美、砂川政英、横井寿郎 (森林総研)

菌床シイタケ(*Lentinula edodes*)で、子実体が奇形になる被害が各地で生じている。その病状は、茎の著しい徒長、傘の小型化、茎、傘の表面のささくれ、などである。その原因と考えられるウイルスが検出された。子実体組織をリン酸バッファー中で破碎した後、0.5M NaCl+ 0.7% PEG 6000 によって沈殿してくる画分を電子顕微鏡で観察した結果、奇形子実体組織中にヒモ状粒子が検出された。本ウイルスは、奇形子実体を生じた培地から同時に発生している正常子実体の組織中にも存在していた。しかし、種菌ならびに培地の中心部から分離した菌糸中には認められなかったことから、栽培過程で新たに感染したものと推定される。ウイルスの核酸を抽出したところ、4 本の dsRNA が検出された。そのうち最も大きな分子量 5.7Kb の dsRNA は正常、奇形のどちらの子実体にも共通に存在していたが、他の dsRNA の電気泳動パターンには正常と奇形子実体の間に違いが見られた。特に、正常子実体は約 500bp の大きさの特徴的な dsRNA を多コピー保持していた。この dsRNA の全長の配列をクローニング、シークエンスして解析を行った。本遺伝子は、ウイルス感染後の子実体の奇形化を抑制する satellite RNA の可能性もあると推定される。

dsRNA virus particles found in the cultivated *Lentinula edodes* that produces abnormal fruit bodies.

Yumi Magae, Masahide Sunagawa, Toshiro Yokoi

(Forestry & Forest Products Res. Inst.)

P-53

日本産、ベトナム産の亜種間接合体クロアワビタケ株における ITS 配列の奇妙な一致

Truong Binh-Nguyen^{1,2}, 岡崎孝映³, Le Xuan-Tham⁴, 鈴木彰¹ (¹千葉大・院自然科学, 教育, ²Tropical Biology Inst. Vietnam, ³かずさ DNA 研, ⁴Vietnam Atomic Energy Commission)

食用キノコであるクロアワビタケ *Pleurotus cystidiosus* subsp. *abalonus* は、dikaryon の無性胞子を作る。我々は rRNA 遺伝子の ITS 配列が、ベトナム産と日本産のクロアワビタケ株で奇妙に一致しているものを見つけた。いずれの株も ITS 配列が 2 つの核で大きく異なっており、亜種間接合体と考えられるが、その ITS 配列の組み合わせがベトナム産と日本産でほぼ一致している。世界中のクロアワビタケの仲間の ITS 配列はすでに多く報告されているが、このような雑種系統は知られていない。両株から分離した monokaryon は成育や形態が異常であり、いずれの dikaryon 株も多くの劣勢変異を蓄積しているようにみえる。したがって両キノコ株は共通の dikaryon を祖先として非常に長い世代を無性生殖によって経てきた可能性が示唆される。そのようなキノコが日本とベトナムに生息していた事実を、長江文明を築いた古代人が漢民族の侵入からベトナムや日本に逃れたという考古学的知見と結びつけることは可能だろうか。

Conservation of a combination of two ITS alleles in Japanese and Vietnamese *Coremiopleurotus*

Binh-Nguyen Truong^{1,2}, Koei Okazaki³, Xuan-Tham Le⁴, Akira Suzuki¹ (¹Grad. Sci. Tech., Facul. of Edu., Chiba Univ., ²Trop. Biol. Inst. Vietnam, ³Kazusa DNA Res. Inst., ⁴Vietnam Atomic Energy Comm.)

P-54

Agrobacterium を用いた担子菌エノキタケの形質転換法の開発

岡本智充, 山田雅人, 稲富 聡, 岡崎光雄, 下坂 誠 (信州大・繊維・応生科, ホクトきのこ総合研究所)

エノキタケ *Flammulina velutipes* の子実体形成機構を解明するため、子実体形成時に特異的に発現する遺伝子群を differential display 法により単離した。¹⁾ これら遺伝子の機能解析のためには、簡便で効率的な形質転換法が必要である。そこで、*Agrobacterium* を用いた *F. velutipes* に対する形質転換法を検討した。*F. velutipes* 由来の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 遺伝子 (*gpd*) プロモーター制御下に hygromycin B 耐性遺伝子 (*hph*) を配置したバイナリーベクターを構築し、*A. tumefaciens* LBA4404 株に導入した。本ベクター保持株細胞と *F. velutipes* 複核菌糸片をアセトシリゴン存在下で共培養したところ、選択培地上に hygromycin B 耐性の *F. velutipes* コロニーが再現性よく出現した。このとき、耐性コロニーの出現にはアセトシリゴンの添加が必須であった。さらに共培養条件を検討し、より多くの耐性コロニーを得ることができる最適条件を確立した。出現した *F. velutipes* コロニーは hygromycin B 耐性の形質を安定に保持した。独立に得られた耐性株菌糸からゲノム DNA を調製し、*hph* 遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼーション解析を行った。その結果、すべての株において *hph* 遺伝子のシグナルが検出され、1 コピーの T-DNA がゲノム上のランダムな位置に挿入されていることがわかった。今後、この形質転換法を用いて RNAi 法を用いた遺伝子発現抑制系を構築し、子実体特異的に発現する未知遺伝子の機能を解析する予定である。

¹⁾ M. Yamada, S. Sakuraba, K. Shibata, G. Taguchi, S. Inatomi, M. Okazaki, and M. Shimosaka, FEMS Microbiol.Lett.**254**,165-172 (2006).

Agrobacterium-mediated transformation of the basidiomycete *Flammulina velutipes*

Tomomitsu Okamoto, Masato Yamada, Satoshi Inatomi, Mitsuo Okazaki, and Makoto Shimosaka (Dept. Appl. Biol., Fac. Tex. Sci. Tech., Shinshu Univ., Mushroom Lab. Hokuto Co.)

P-55

高活性リグニン分解白色腐朽菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株の形質転換系構築

山岸賢治, 木村俊之、老田茂 (東北農研センター)、杉浦立樹、平井浩文 (静岡大学農学部)

自然界より選抜された高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* (和名; ウスキイロカワタケ) YK-624 株は、選択的リグニン分解能 (セルロース分解力に対するリグニンの相対的な分解力) が非常に高い白色腐朽菌である。本研究においては、*P. sordida* YK-624 株が持つ選択的リグニン分解能力の分子機構を解明し、また産業的に利用可能な程度までリグニン分解力を更に向上させることを目標としている。そのためには遺伝子導入系の活用が欠かせないが、現在のところ *P. sordida* の形質転換系は報告されていないため、*P. sordida* YK-624 株の形質転換系構築に着手した。

P. sordida YK-624 株は、形質転換系が既に確立している白色腐朽菌 *P. chrysosporium* と異なり分生子を形成せず、また子実体を形成させて胞子を回収する条件も見出されていない。そこで本研究では、栄養菌糸から作成したプロトプラストに紫外線を照射して変異導入を行い、5-FOA 存在下でプロトプラスト再生を行わせた結果、多数のウラシル要求性クローンを得た。各クローンのウラシル合成遺伝子 *URA3*、*URA5* を調べた結果、両遺伝子上に変異を持つ多くのクローンを同定したが、そのうち *URA5* のコード領域中に 43b.p. の欠失を持つクローン UV2-#64 菌株を用いて形質転換実験を行った。形質転換マーカー遺伝子として *URA5* 全長 5kb.p. を持つプラスミドを用い、UV2-#64 菌株より作成したプロトプラストを PEG 法によって形質転換した結果、多数のウラシル非要求性クローンを得た。形質転換効率は 1 clone/10⁵~10⁶ プロトプラスト程度であった。

Transformation by complementation of a uracil auxotroph of the hyper lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete sordida* YK-624.

Kenji Yamagishi, Toshiyuki Kimura, Sigeru Oita (National Agricultural Research Center for Tohoku Region), Tatsuki Sugiura, Hirofumi Hirai (Faculty of Agriculture, Shizuoka University)

P-56

アグロバクテリウムを用いた木材腐朽担子菌の形質転換

加治佐 平, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)

木材腐朽担子菌は、菌体外に酵素を分泌することで木材を分解することが知られている。その木材分解能力の高さから、これまでに木材分解酵素に対して酵素学的、分子生物学的な研究が詳細に行われてきている。その結果、酵素の木材分解における生理的な機能解析、または酵素の大量生産などの点において、木材腐朽担子菌の形質転換法の確立が望まれている。そこで、本研究において、アグロバクテリウムを用いた木材腐朽担子菌への形質転換法を確立することを目的とした。

木材腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* のゲノム情報を利用して、グリセルアルデヒド-3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GPD) 遺伝子、そしてアクチン遺伝子のプロモーターとターミネーターをクローニングした。それらのフラグメントと、ハイグロマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子を Double-Joint PCR 法¹⁾によりハイグロマイシン耐性遺伝子フラグメントを作製した。それぞれのフラグメントをバイナリーベクター pCAMBIA0380 に導入することで担子菌組み換えベクターを構築した。担子菌組み換えベクターを導入した *Agrobacterium tumefaciens* と、*P. chrysosporium* の菌糸を共培養することで担子菌の形質転換を行った。形質転換後、ハイグロマイシンを含む培地において生長し、経代した菌糸より抽出したゲノムを鋳型に、ハイグロマイシン遺伝子のプライマーを用いて PCR を行った結果、GPD 遺伝子、アクチン遺伝子プロモーター、そして CaMV35S プロモーターを使用したベクターにおいて形質転換体が得られたことが明らかとなった。

1): Yu, JH. *et al.* Fungal Genet. Biol. (2004)

Transformation of wood-rot basidiomycetes mediated *Agrobacterium tumefaciens*

Taira Kajisa, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima

(Univ. of Tokyo)

P-57

アグロバクテリウム法によるシイタケ (*Lentinula edodes*) 形質転換系の確立

宮本幸恵*, 平岡良輝*, 山岸大輔*, 時本景亮**, 尾谷 浩*, 前川二太郎*, 児玉基一郎*

(*鳥取大・農, **菌茸研究所)

アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) を利用した AtMT (*A. tumefaciens*-mediated transformation) 法による糸状菌の形質転換は、プロトプラスト調製が不要など多くの利点を有している。本研究では、AtMT 法によるシイタケ (*L. edodes*) 形質転換系の確立を目指した。*Agaricus* 由来 GPD 遺伝子プロモーター制御下のハイグロマイシン B (HygB) 抵抗性遺伝子 (*hph*) を選択マーカーとするバイナリーベクターを導入したアグロバクテリウム数系統と、シイタケの単核および二核菌糸体株数系統の組み合わせを用いた。シイタケ培養菌糸体ブロックとアグロバクテリウム懸濁液を混合し、減圧浸透処理した後、選択培地で選抜した。その結果、HygB 含有培地上で生育する多数のコロニーを得た。形質転換効率は、使用したアグロバクテリウム系統とシイタケ系統の組み合わせにより大きく異なった。見かけ上の形質転換効率 (HygB 耐性コロニー数/菌糸体ブロック数) は、最大 13%であった。PCR 法により、形質転換株においては継代後も *hph* が安定して保持されていることが示された。また、形質転換株より子実体を誘導し、導入 *hph* の発現を RT-PCR により確認したところ、子実体の傘および柄部分においても発現が認められた。以上の結果、AtMT 法を利用することにより、シイタケにおいて簡便かつ高効率で形質転換体を作成することが可能となった。

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of shiitake, *Lentinula edodes*

Yukie Miyamoto*, Yoshiki Hiraoka*, Daisuke Yamagishi*, Keisuke Tokimoto**, Hiroshi Otani*, Nitaro Maekawa* and Motoichiro Kodama* (*Fac. Agric, Tottori Univ., **Tottori Mycol. Inst.)

P-58

Aspergillus oryzae 由来 *sC* マーカーを利用した *Aspergillus oryzae* の形質転換

西 晶子, 坊垣隆之, 広常正人 (大関・総研)

【目的】*sC* (ATP sulfurylase) は *Aspergillus oryzae* の形質転換によく利用されるマーカーの一つであるが、*Aspergillus nidulans* 由来の *sC* 遺伝子が広く使われており、この場合 *A. oryzae* では染色体上にランダムな組換えが起こることが知られている。ランダムな組換えは時に好ましくない結果をもたらす場合もある。また *A. oryzae* 由来の *sC* 遺伝子を *A. oryzae* の相同的組換えに利用した報告は見当たらない。そこで本研究では *A. oryzae* RIB40 由来の *sC* 遺伝子をマーカーとするプラスミドを構築し、*A. oryzae* RIB40 由来の *sC* 株である NS4 株の形質転換を試みた。【方法及び結果】レポーター遺伝子である *uidA* の発現プラスミドを構築し、環状のまま、あるいは *sC* マーカー内で 1 箇所切断し直鎖状にして NS4 株を形質転換したところ、直鎖状にしたプラスミドを用いた場合に環状のまま用いた場合の 10 倍以上の効率で形質転換体を取得した。またサザン解析の結果、大半で染色体上の *sC* 遺伝子座への相同的な組換えが起こっていることを確認し、挿入されたプラスミドのコピー数は 1-8 程度と様々であった。次に *A. oryzae* の主要な分泌酵素であるタカアミラーゼの発現プラスミドを構築し、NS4 株を形質転換した。取得した候補 48 株のうち SDS-PAGE によって最も高い生産性を確認した株は、サザン解析の結果、相同的に 8-10 コピーが挿入されていることを確認した。本菌株のジャー培養を試みたところ、培地中に約 10g/l のタカアミラーゼを分泌した。

Transformation of *Aspergillus oryzae* by the homologous *sC* gene.

Akiko Nishi, Takayuki Bogaki, Masato Hirotsune

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

P-59

Aspergillus aculeatus における *sC* 選択マーカーを用いた形質転換系の開発

足立 浩美, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司 (阪府大院・生命環), 荒井 基夫 (中部大・応生), 金政 真 (静岡大院・応生化)

【目的】*Aspergillus aculeatus* が生産する多種類のセルラーゼはセルロースの糖化力に優れ、各種セルラーゼ遺伝子の発現調節機構を分子レベルで明らかにすることは極めて興味深い。これには *A. aculeatus* 自身を宿主とした形質転換系を開発することが必須である。そこで、硫酸代謝に関わる ATP スルフリラーゼ遺伝子 (*sC*) を選択マーカーとした *A. aculeatus* の形質転換系を確立することを目的とした。

【方法及び結果】まず、*sC* 欠損変異株 (*sC*) の取得を試みた。硫酸のアナログであるセレン酸含有培地で生育したセレン酸耐性株のうち、硫酸塩を単一硫黄源として同化出来ず、且つクロム酸感受性を示した6株を *sC* 候補株として単離した。候補株のサザンブロット分析により、*sC* 座位での大規模な欠損が起こっていないことが明らかとなり、相同組換えの宿主として利用可能であることがわかった。次に、既知の *Aspergillus* 属 *sC* の保存領域を基に作製したプライマーを用いた PCR により、*A. aculeatus sC* の部分 DNA 断片を取得した。得られた DNA 断片をプローブとしてサザンブロット分析を行い、約 7 kb の *Pst* I 消化断片が *A. aculeatus sC* 全長を含む事を見だし、スクリーニングにより *sC* 全長を取得した。クローン化した *sC* を用いて *sC* 候補株を形質転換し、硫酸塩を単一硫黄源として生育できる形質転換体が得られたため、*sC* 選択マーカーによる形質転換系が確立できた。今後はこの系を用い、相同組換えを試み、組換え効率・コピー数などについて検討していく。

Development of a transformation system for *Aspergillus aculeatus* using the *sC* gene as selectable marker

Hiroimi Adachi, Shuji Tani, Junichi Sumitani, Takashi Kawaguchi (Life & Env. Science, Osaka Pref. Univ.), Motoo Arai (Biochem., Chubu Univ.), Shin Kanamasa (Biochem., Shizuoka Univ.)

P-60

Aspergillus aculeatus における *trpC* 遺伝子を用いた形質転換系の開発

前田優介, 金政真¹, 谷修治, 炭谷順一, 荒井基夫², 川口剛司 (阪府大院・応生科,¹静岡大・応生化,²中部大・応生)

【目的】*trpC* 遺伝子は、コリスミ酸からトリプトファン合成に至る反応の内、三箇所を触媒する多機能タンパク質をコードしている。この遺伝子欠損変異株は、中間代謝産物の類似体であるフルオロアンスラニル酸 (5-FAA) に耐性になる事、また *trpC* の導入によりトリプトファン要求性が相補される事から、*trpC* をマーカーとした形質転換系は、ポジティブセレクションにより効率よく構築できる特長を有している。そこで、本研究では、*A. aculeatus* の高タンパク質分泌能、糖化力に優れたセルラーゼ剤の有効利用を最終目標として、まず本菌の *trpC* を選択マーカーとした形質転換系を構築することを目的とした。

【方法・結果】他の *Aspergillus trpC* 遺伝子の保存領域を基に設計したプライマーを用いて PCR を行い、約 700bp の部分 *trpC* 断片を取得した。この配列をもとに作成した DNA プローブを用いた、サザンブロット分析や、ショットガンクローニングにより、*trpC* 全長を含む約 9 kb の断片を取得した。現在、フレームシフト変異を導入した *trpC* 改良遺伝子を用いて野生株を形質転換し、5-FAA 耐性の表現型を指標にして、*trpC* 遺伝子変異株の単離を目指している。

Development of a transformation system for *Aspergillus aculeatus* using the *trpC* gene as a selectable marker

Yusuke Maeda, Shuji Tani, Junichi Sumitani, Takashi Kawaguchi (Life & Env. Science Osaka Pref. Univ.), Motoo Arai (Biochem., Chubu Univ.), Shin Kanamasa (Biochem., Shizuoka Univ.)

P-61

A. *tamarii* *niaD* 遺伝子の発現解析

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

【目的】塩分含有量が高い醤油粕上で生育する麹菌として、*Aspergillus tamarii* ST-2 を選抜した。本株が醤油粕上で生育できる理由を分子生物学的手法により解明するため、形質転換マーカーとして硝酸還元酵素遺伝子 *niaD* を PCR により分離し、その構造を解明した (平成 17 年度本大会要旨集 p64)。*A. oryzae niaD* との塩基配列比較の結果、ORF 領域及び 3'側非翻訳領域では相同性が高く 95%であったが、プロモーター領域と想定される配列を含む 5'側非翻訳領域では約 81%であった。この分離した配列をプローブに、*A. tamarii* ST-2 株のゲノムを鋳型にサザンブロット解析を行ったところ、予想される大きさのバンド以外にマイナーバンドが 1 本確認された。そこで、分離した配列が *A. tamarii* の *niaD* 遺伝子であることの確認の一つとして、ノザンブロット解析による発現確認を行った。

【方法・結果】硝酸塩、亜硝酸塩、グルタミン、グルタミン酸塩を唯一の窒素源としたツァベックドックス液体培地を作製し、*A. tamarii* ST-2 を接種して 2 日間 30°C で振盪培養を行った。培養菌体より全 RNA を抽出し、*A. tamarii niaD* の一部をプローブとして、ノザンブロット解析を行った。その結果、窒素源を硝酸塩あるいは亜硝酸塩とした際は *niaD* の発現が検出された。一方、窒素源をグルタミンあるいはグルタミン酸塩とした際は *niaD* の発現は検出されなかった。この結果は、Johnstone ら (*Gene* 90 (1990) 181-192) の報告による、*Aspergillus nidulans niaD* の発現制御に関する知見と矛盾しなかった。このことから、*A. tamarii* の *niaD* 遺伝子も他の *Aspergillus* 属のものと同様の発現制御を受けると考えられる。

Expression analysis of *niaD* gene isolated from *A. tamarii*

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

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

P-62

麹菌 DNACHIP による麹菌 Genotyping の検討

小林靖典^{1,2}、坂本和俊²、山田修²、岩下和裕^{1,2}、下飯仁^{1,2}、三上重明² (¹広島大・先端研、²酒総研)

麹菌は、清酒や醤油、味噌などの醸造に使用され、日本の食文化と深く関わっており国菌と称される微生物で、2005 年には酒総研所蔵の麹菌 RIB40 株の全ゲノムシーケンスが解読された。本菌株は、野生に近い菌株と言われている。一方、実際の醸造現場では、清酒や醤油などの用途、あるいは製品の品質化につながるような多様な麹菌が単離、育種され利用されて来ている。しかし、これまで遺伝学的な取扱が難しいなどの理由でこれらの菌株の特徴については、十分に生化学的・分子生物学的な研究がなされておらず、菌株の育種選抜は、官能評価や経験に多く依存している。酒総研では、麹菌 RIB40 株のゲノム情報に基づき麹菌 DNACHIP (アフィメトリクス社製) を作成した。麹菌 DNACHIP は、全遺伝子 (12,074 遺伝子) の発現解析だけでなく、原理上シーケンスの差を検証することが可能で、菌株間のゲノムレベルの違いを解析することが可能である。そこで各種麹菌の Genotyping が可能かどうかを検討するために、酒総研所蔵の RIB40、RIB128 株など数種の株について麹菌 DNACHIP 解析を行った。まず、RIB40 株では高いシグナル値及び再現性を示しゲノムアレイとして使用出来ることが明らかとなった。つづいて、RIB128 株について解析したところ、RIB40 株と異なり、177 遺伝子についてシグナルが見られず、欠損していることが示唆された。その他の菌株においても同様にゲノムレベルでの明確な違いが見られた。また既に明らかになっているアフラトキシン合成遺伝子についても解析を行った結果、これまでの PCR による分類と同じ結果を得ることができた。さらに個々の遺伝子について同じ AFL グループに分類されていても、AFL 合成遺伝子の一部の配列が変化している可能性があった。このように麹菌 DNACHIP を用いて、麹菌の Genotyping が可能であることが示唆された。

Application of *Aspergillus oryzae* DNA chip for rapid genotyping of *A. oryzae* species.

Yasunori Kobayashi^{1,2}, K. Sakamoto², O. Yamada², K. Iwashita^{1,2}, H. Shimoi^{1,2}, S. Mikami²

(¹Hiroshima Univ., ²NRIB)

P-63

貧栄養条件下で発現する麹菌菌体内タンパク質の解析

北川治恵, 佐野元昭, 堂本光子, 町田雅之*, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研 *産総研)

<目的> 麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本の伝統的醸造や酵素剤の工業生産での利用など産業的に非常に重要な微生物であり、近年では遺伝子レベルでの研究も精力的に進められている。昨年発表された麹菌全ゲノム解読の完了を受け、ポストゲノム研究の一端として、本研究所ではタンパク質の発現を網羅的に解析するため有効な手段である二次元電気泳動法を用いた麹菌のプロテオーム解析を行っている。

麹菌は固体培養や液体培養などその培養条件により発現するタンパク質群が大きく変化するため、様々な培養条件下での解析が必要とされる。今回富栄養液体培地と貧栄養液体培地で各々培養した麹菌を用いて解析を行い、比較検証したので報告する。

<方法> 富栄養液体培地として YPD 液体培地、貧栄養液体培地として Czapek-dox 液体培地を用いて *A.oryzae* RIB40 株を培養し、それぞれの菌体よりタンパク質を抽出・精製し、二次元電気泳動を行った。検出されたスポットを切り出し、質量分析器によるタンパク質の同定を行った。

Proteome analysis of intracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under the poor nutrient culture conditions.

Harue Kitagawa, Motoaki Sano, Mitsuko Dohmoto, Masayuki Machida*, Shinichi Ohashi
(KIST, *AIST)

P-64

米ヌカ培地で高発現する麹菌遺伝子群の解析

尾関健二, 山中崇*, 佐野元昭, 築野卓夫*, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研 *築野食品工業)

<目的> 米ヌカは豊富な栄養や機能性成分を含んでいるが、米油、飼料、機能性成分の抽出、土壌改良剤などとしての利用に限られている。米ヌカの各種有用成分を可溶化できる食品用酵素剤の種類が少なく、バイオコンバージョン素材としての更なる有効活用が望まれている。麹菌は酵素の宝庫であり、12,000 遺伝子のうち機能未知遺伝子が 8,000 遺伝子程度存在し、米ヌカの有用成分を可溶化できる麹菌の遺伝子群の組合せの開発、新規加水分解酵素遺伝子の取得、機能性バイオコンバージョン素材開発への展開を目指している。

<方法および結果> 日本酒醸造時に排出する赤ヌカ(飯米の米ヌカ)と中ヌカ(内側の米ヌカ)を麹菌の液体培養時の炭素源、窒素源として添加し、培養菌体より RNA 抽出、DNA マイクロアレイ用プローブの調製、遺伝子の発現プロファイルを解析した。解析には 11,000DNA マイクロアレイを使用した。さらに発現量が多い遺伝子については、リアルタイム PCR 法での発現量も検討した。解析したデータより、信頼できるデータを得るために、発現変動の差が 2 倍以上の遺伝子をピックアップした結果、赤ヌカでは 64 個の遺伝子が特異的に高発現し、そのうち機能既知の酵素遺伝子が 34 個、機能未知のタンパク質遺伝子が 13 個あった。これに対して中ヌカでは、70 個の遺伝子が高発現し、そのうち機能既知の酵素遺伝子が 29 個、機能未知のタンパク質遺伝子が 16 個あった。両米ヌカの高濃度の寒天培地での発現比較についても報告する。

Analysis of the specific gene cluster under a rice bran cultivation in *Aspergillus oryzae*

Kenji Ozeki, Takashi Yamanaka*, Motoaki Sano, Takuo Tsuno*, Shinichi Ohashi
(K.I.T., *Tsuno Food Industrial Co.)

P-65

麴菌 DNACHIP の開発とゲノム解析、発現解析への利用

岩下和裕^{1, 2}, 坂本和俊², 山田修², 三上重明² (¹広島大・先端研, ²酒総研)

黄麴菌 (*Aspergillus oryzae*) は、清酒や醤油、味噌など我が国の伝統的発酵産業に不可欠であるだけでなく、各種タンパク質の供給源、あるいは多種多様なタンパク質生産のためのホストとして広く利用されている重要な微生物である。昨年、酒総研所蔵の麴菌 RIB40 株の全ゲノムシーケンスが公開され、ゲノム情報を利用した研究の発展が期待されている。これまでに、当研究所ではポストゲノム研究の基本的インフラとなる cDNA マイクロアレイ (NRIB3000 アレイ) を開発した。しかし、NRIB3000 アレイでは全ての遺伝子を網羅していなかったことから、麴菌の全遺伝子の発現を高精度に再現性良く解析すること、さらには、Chip on Chip などゲノム配列に依存した解析等を行うことを目的に、麴菌 DNACHIP (Affymetrix 社製) を開発した。

本麴菌 DNACHIP は、1 遺伝子あたり 11 組のパーフェクトマッチ、ミスマッチプローブセットを有し、かつ、ほとんど操作が自動化されているため、実験者の技量によらず高精度かつ再現性良く発現解析を行うことが可能である。我々は、黄麴菌 RIB40 株のゲノム配列をベースに全遺伝子 (13,000 遺伝子) のプローブセットのデザインを行ない、麴菌 DNACHIP を作成した。つづいて、*Aspergillus oryzae* RIB40 株を用い、最少培地により独立に調製した試料について再現性を確認したところ、高い精度と再現性を確認することが出来た。本麴菌 DNACHIP は、原理的にはゲノムシーケンス等の差異や欠損、重複等を検出することも可能であることから、麴菌 DNACHIP のデザインに使用した RIB40 株の全ゲノム DNA を調製し、染色体 DNA の検出を行ったところ、全遺伝子について再現性の良好なシグナルが検出された。現在、本麴菌 DNACHIP を利用して、様々な環境因子に対する遺伝子発現の応答について検討を行っている。

Development of *Aspergillus oryzae* DNACHIP and its application.

Kazuhiro Iwashita^{1, 2}, K. Sakamoto², O. Yamada², H. Shimoi^{1, 2}, S. Mikami²

(¹Hiroshima Univ., ²NRIB)

P-66

麴菌 CCAAT-box 結合因子によって制御される遺伝子の網羅的解析

高橋明珠, 杉山純也, 合田秀矢, 佐野元昭*, 小林哲夫, 加藤雅士 (名大院生命農・生物機構, *金沢工業大・ゲノム研)

糸状菌 CCAAT 結合因子である Hap 複合体は HapB/C/E の 3 つのサブユニットから構成されており、多くの産業上重要な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たが、制御される遺伝子群は依然として明らかではない。このため、麴菌優性阻害型 (ドミナントネガティブ) 変異株を用いて DNA マイクロアレイ解析を試みた。

我々はすでに優性阻害型変異遺伝子の獲得に成功しており、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* においてその有効性を確認している。この遺伝子を麴菌に導入し、麴菌 DNA マイクロアレイ解析を行った。解析の結果、Hap 複合体によって 2 倍以上促進される遺伝子が 50 個見い出された。Hap 複合体が多くの遺伝子の転写促進として働いているというこれまでの知見を考え合わせると、Hap 複合体はハウスキーピング遺伝子のような構成的に発現している遺伝子群ではなく、何らかの誘導を受けて発現する遺伝子群を制御しているためであると考えられた。一方、2 倍以上抑制される遺伝子を見てみると、リボソーマルタンパク質遺伝子などの翻訳に関係する遺伝子群が抑制されていた。Hap 複合体と翻訳との関係について考察する。

Comprehensive analysis of genes regulated by *Aspergillus oryzae* CCAAT-box binding factor.

Akemi Takahashi, Junya Sugiyama, Hideya Gouda, Motoaki Sano*, Tetuo Kobayashi, Masashi Kato

(Grad. Sch. of Bioagricultural Sci., Nagoya Univ., *KIT)

P-67

黄麹菌生育菌体内プロテオームの解析

神太郎, 竹内道雄 (東京農工大院・農)

A.oryzae RIB40 の菌体内タンパク質について、二次元電気泳動、MALDI-TOF-MS を用い、研究を行ってきた。前回のコンファレンスでは、SP 液体培地で 1~3 日間生育させた菌体の二次元電気泳動パターンから、生育時間に従い発現量の変化するタンパク質の同定を行った。今回、麹菌が液体培養と固体培養では、発現するタンパク質の種類、量が異なることから、小麦ふすま培地で培養した菌体についての解析を行った。菌体を回収する際、固体培養では菌体と培地の分離が困難なため、培養物を培地ごと液体窒素で破碎し、タンパク質を抽出し、サンプルとした。そのサンプルを二次元電気泳動で展開したところ、ふすま培地のみを泳動したときに現れたスポットがなくなっていたため、培地のタンパク質は分解作用を受けたものと考えられた。SP 培地で 3 日間培養した菌体の泳動パターンと、3 日間ふすま培養した菌体のパターンは明らかに異なっていた。ふすま培養後抽出したタンパク質を泳動したゲルで、確認できた 200 弱のスポットについて同定作業を進めた。その結果、機能未知のタンパク質の発現が確認されるなど、液体培養時のタンパク質の発現とは異なった傾向が見られた。液体培養時に、培養時間が長くなることで代謝関連のタンパク質の増加が見られたが、固体培養 3 日目の場合もやはり代謝関連のタンパク質が多く発現していた。

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

Taro Ko, Michio Takeuchi

(Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

P-68

黄麹菌 *A. oryzae* における CPase 遺伝子の解析

俣野達彦, 竹内道雄 (東京農工大学・農・応生科)

麹菌 (*Aspergillus oryzae* RIB40) のゲノム解析から活性中心、モチーフなどによる検索を行なったところ、12 のカルボキシペプチダーゼ (CPase) の特徴を持つ遺伝子が見出された。ゲノム情報が明らかになった糸状菌の CPase 遺伝子について、*A. oryzae* における CPase 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 CPase の系統樹を作成した。その結果、糸状菌の CPase は大きく 4 つのグループに分けられることが示唆された。4 つのグループは、CPase の局在性を反映していることが示唆された。4 つのグループからそれぞれ一つの CPase 遺伝子を取り上げ、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 の各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なった。その結果、他の *A. oryzae* 株や *A. sojae* にも *A. oryzae* RIB40 の持つ CPase 遺伝子は存在していた。*A. oryzae* 株の CPase 遺伝子は *A. oryzae* RIB40 の CPase 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 CPase 遺伝子の中には、*A. oryzae* RIB40 の CPase 遺伝子とは異なる位置にバンドが出現したものも存在した。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なった。

Analysis of CPase genes from Filamentous fungi.

Tatsuhiko Matano, Michio Takeuchi

(Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

P-69

プロテアーゼ遺伝子二重破壊株を用いたセルロース糖化麹菌の分子育種

中井 喬彦¹, 有岡 学¹, 川口剛司², 荒井基夫³, 北本勝ひこ¹ (¹東大院・農生科・応生工, ²阪府大院・農生科, ³中部大・応生)

【目的】近年、化石燃料である石油に替わる資源として植物バイオマスの利用が注目を集めている。その主要成分である結晶性セルロースは難分解性のために利用が進んでいない。この結晶性セルロースを分解する酵素を生産する微生物として *Trichoderma reesei* や *Aspergillus aculeatus* などが知られている。本研究は *A.aculeatus* が生産する主要なセルラーゼである F I -CMCase、Cellobiohydrolase I、Beta-glucosidase I をコードする 3 遺伝子(*cmc1,cbh I,bglI*)を *A.oryzae* プロテアーゼ遺伝子二重破壊株 NS-tApE 株(*niaD,sC,Δ pepE,Δ tppA*)へ導入し、セルロース糖化麹菌を育種することを目的としている。

【方法及び結果】*A.aculeatus* 由来のセルラーゼをコードする 3 遺伝子(*cmc1,bglI,cbh I*)について *niaD* を選択マーカーとして用い、*tefl* プロモーター下で発現するプラスミドを構築した。これらを単独に NS-tApE 株に導入し、各々の酵素活性を調べた。*cmc1* 発現株では培養上清において最大で約 120 unit/ml の endo-glucanase 活性を示し、*bglI* 発現株では培養上清及び細胞壁に beta-blucosidase 活性が認められた。また、*cbh I* 発現株は取得中である。さらに、これら 3 つのセルラーゼ遺伝子を同時に NS-tApE 株に導入した株の育種を計画している。

Molecular breeding of cellulose hydrolysing koji-mold using double protease gene disruptant.

Takahiko Nakai¹, Manabu Arioka¹, Takashi Kawaguchi², Motoo Arai³, Katsuhiko Kitamoto¹

(¹Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, ²Dept. Appl. Life Sci., Osaka Pref. Univ., ³Dept. Env. Biol., Chubu Univ.)

P-70

乾燥土壌環境中における遺伝子組換え麹菌胞子の生存性の解析

楠本憲一¹, 古川育代¹, 北本則行², 鈴木聡¹, 柏木豊¹ (¹農研機構・食総研, ²愛知産技研・食品工技)

【目的】麹菌の実用菌株に対する遺伝子組換え技術が進展するに伴い、環境中における組換え菌株の生存性の解明が求められている。演者らはすでに実用麹菌由来株とセルラーゼ高発現性遺伝子組換え株を用いて、園芸用土壌中における生存性を比較検討した(平成 16 年度本大会要旨集 p70)。その結果、組換え株の川砂での生存率は冬季に低い傾向にあった。組換え株の生存率の季節変動が土壌中の水分含量に影響されるのではないかと考え、強制乾燥した土壌における両株の生存性について検討を行った。

【方法及び結果】醤油用麹菌由来の *Aspergillus oryzae* KBN616-39 及び、本株にセルラーゼ遺伝子 *celB* を導入したセルラーゼ高生産株 *A. oryzae* TB-1 を使用した。園芸用土壌(川砂) 90℃で一晩乾燥させた後、その 2g をフタ付きポリエチレン容器に入れ、KBN616-39 または TB-1 の胞子約 10⁶、0.01ml を接種し、25℃で恒温静置培養を行った。経時的に土壌抽出液を調製し、希釈平板法により生菌数を算出した。その結果、接種後 7 日目において、KBN616-39 の生存率が 12-24% (2 反復) であったのに対して、TB-1 では 1.0-2.0% (2 反復) であった。このことから、TB-1 の生存率は供試土壌の極度な低水分条件で KBN616-39 よりも 10 分の 1 以下に低下することがわかった。今後 TB-1 株の低水分下での生存率低下要因が解明されると、野外環境中で死滅速度の速い遺伝子組換え麹菌の育成につながると考えられる。

Analysis of the spore survivability of the recombinant koji mold in the dried soil environment

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

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

P-71

麹菌における簡便コロニーPCR法とその応用

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

麹菌ゲノム情報が公開され、新規遺伝子機能解析のための遺伝子破壊実験が広く行われるようになった。それに伴い、破壊株スクリーニングのための膨大な数の形質転換株のジェノタイプングが必要となる。これまで、PCR テンプレートとなるゲノム DNA の調製は、糸状菌の強固な細胞壁のため時間と労力が必要であった。そこで、我々は簡便な前処理で、寒天プレート上の麹菌コロニー菌体を直接 PCR テンプレートとすることが可能な手法を開発した。

本手法は、FTA カード (Whatman) を用いて麹菌ゲノムを固定化、安定化させるものであり、有機溶媒やカオトロピック塩などの有害物質、細胞破碎機等の特別な機械を必要とせず、数 mm³ 程度の菌体から PCR テンプレートに十分量の DNA を抽出することができる。また、本手法では、半年間 4°C にて保存されたスラント培養菌株からの PCR、あるいは味噌、日本酒からの PCR による糸状菌の検出にも応用することができる。

我々は、本手法を用いて、グルタミナーゼ相同遺伝子、GPCR 相同遺伝子の破壊株スクリーニングを行った。また、リボゾーム DNA の ITS 領域を増幅するプライマーセットを用いて、味噌からの糸状菌 DNA の検出、酵母 DNA の検出、及び菌株同定を行ったので報告する。

Application of colony direct polymerase chain reaction of *Aspergillus oryzae*

Satoshi Suzuki, Hiroko Taketani, Tae Kimura, Mayumi Matsushita, Sawaki Tada, Ken-Ichi Kusumoto, Yutaka Kashiwagi
(NFRI)

P-72

Fusarium oxysporum 由来糖化アミノ酸オキシダーゼの金属イオンによる活性化

藤原真紀¹, 炭谷順一¹, 古賀晋治², 芳陵一生², 高妻卓司², 今村茂行², 川口剛司¹, 荒井基夫³ (¹大阪府大院・応生化, ²旭化成ファーマ・診断薬研, ³中部大・環境生物)

【目的】糖化アミノ酸オキシダーゼ (FOD) は糖尿病における血糖コントロールマーカーである糖化タンパクを測定する診断薬として有用な酵素である。血中の主な糖化タンパクに糖化アルブミンと糖化ヘモグロビンが挙げられるが、前者は糖化リジン (FK)、後者は糖化バリン (FV) を含んでいる。*Fusarium oxysporum* 由来 FOD は、FK、FV の両方に作用するが、ランダム変異を導入することで、FV にほとんど作用しない変異酵素 (K373 置換体) を取得しており、今回は WT と変異酵素に対する金属イオンの影響について報告する。

【方法及び結果】WT と 5 種類の K373 置換体について、様々な金属イオンの存在下 (20 mM) でその活性を測定したところ、Ca²⁺、Mn²⁺、Mg²⁺ の存在下で、酵素活性の大きな上昇が見られた。活性の上昇率は酵素の種類、基質によって大きく異なった。Mg²⁺ の場合、非存在下と比較して WT で FK 活性が 113%、FV 活性が 148% であったが、K373W 置換体では FK 活性が 236%、FV 活性は 1410% まで上昇した。Mg²⁺ 濃度の変化に対する kinetic パラメータの変化を求めたところ、WT の FK に対する活性は Mg²⁺ 濃度の影響を殆ど受けなかったが、それ以外の酵素-基質の組み合わせでは Mg²⁺ 濃度が高くなるほど K_m は低下し、k_{cat} は増加することで活性化されることがわかった。

Activation of fructosyl amino acid oxidase from *Fusarium oxysporum* by metal ions.

Maki Fujiwara¹, Jun-ichi Sumitani¹, Shinji Koga², Issei Yoshioka², Takuji Kouzuma², Shigeyuki Imamura², Takashi Kawaguchi¹, Motoo Arai³

(¹Grad. Sch. of Life & Env. Science, Osaka Pref. Univ. ²Diagnostics R&D Dept., Asahi Kasei Pharma Co. ³Dept. of Env. Biol., Chubu Univ.)

P-73

***Rhizopus microsporus* の細胞内共生バクテリアの形質転換と異種タンパク質発現**

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

【目的】*Rhizopus* は接合菌類（下等菌類）に属する糸状菌であり、発酵食品生産等に利用されてきた。また一部は植物や動物の病原菌としても知られている。最近、*Rhizopus microsporus* の一部が細胞内共生バクテリアを保持することが報告された。我々は、*R. microsporus* と細胞内共生バクテリアとの共生系が、ダイオキシン類などのバイオレメディエーション等へ応用できないかと考え、共生メカニズムの解析を含めた研究を進めている。

【方法・結果】細胞内共生バクテリアを保持する *R. microsporus* 株の菌糸を破碎した後、段階希釈してプレートの培養することにより細胞内共生バクテリアのコロニーを得た。形質転換用プラスミドとしてグラム陰性菌の広宿主域ベクター pMFY42 を用いてエレクトロポレーションによる形質転換に成功した。次に、GFP とペンタクロロフェノール分解系酵素を同時に発現させるための人工オペロンを pMFY42 にクローニングし、バクテリアに導入した。形質転換体の GFP 蛍光を確認した後、抗生物質によりバクテリアを除菌した *R. microsporus* に感染させたところ、菌類細胞内で GFP 蛍光を発するバクテリアを確認することができた。

Transformation of *Rhizopus microsporus*-endosymbiotic bacteria and expression of heterologous proteins in transformants

Takayuki Motoyama¹, Naoko Ochiai¹, Masumi Morita^{1,2}, Ron Usami², Toshiaki Kudo¹

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

P-74

麴菌 (*Aspergillus oryzae*) の固体培養初期に発現する遺伝子 *AOS13* の解析

歌島悠^{1,2}, 岩下和裕^{1,2}, 坂本和俊², 赤尾健², 山田修², 秋田修³, 下飯仁^{1,2}, 三上重明² (広大・先端研¹, 酒総研², 実践女子大³)

麴菌は分生子形成などの分化を生じることや、固体培養条件下で多種多量の酵素を生産することが知られている。本研究では、麴菌の固体培養初期に発現する遺伝子 *AOS13* について、発現制御機構を解明することを目的とした。

AOS13 は固体培養と液体培養のサブトラクション法で同定された遺伝子であり、5'-RACE, 3'-RACE により ORF を決定し、構造解析を行ったところ、N-acetyltransferase の motif が見出されている。*AOS13* はふすまでの固体培養(20 時間、27 時間)で高発現することがノーザン解析によって明らかにされていることから、固体培養での *AOS13* の発現制御機構について解明するためにプロモーター領域の deletion 解析を行ったところ、翻訳開始点から上流-242bp~-484bp までの領域に固体培養における誘導、液体培養における抑制に参与する cis-element が存在することが示唆された。また、*AOS13* はプレート培養でも発現しており、麴菌の分化などに関連する遺伝子であると考えられるため、*AOS13* の GFP 融合株を作成し、その局在性等の解明についても研究を進めている。

Analysis of *AOS13* expressed in initial solid-culture in *Aspergillus oryzae* .

Y.Utashima^{1,2}, K.Iwashita^{1,2}, K.Sakamoto², T.Akao², O.Yamada², O.Akita³, J.Shimoi^{1,2}, S.Mikami²

(Hiroshima Univ.¹, NRIB², Jissen Women's Univ.³)

P-75

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の HSP30 遺伝子プロモーターを用いた液体培養における酵素遺伝子の発現とタンパク質生産の検討

松下真由美、鈴木聡、多田功生、石田博樹*、楠本憲一、柏木豊（食総研、*月桂冠総研）

「目的」麹菌 *Aspergillus oryzae* はわが国の伝統発酵食品であるみそ、醤油、清酒などの製造に不可欠であるとともに酵素生産にも用いられ、産業上重要な糸状菌である。我々は、麹菌の *hsp30* プロモーターを用いて、固体培養特異的に発現する麹菌グルコアミラーゼ遺伝子 *glaB* 遺伝子をモデルとして、液体培養にて、高温誘導発現させる酵素生産を行ってきた (1)。本研究では *hsp30* プロモーターを用いた酵素生産についてさらに、詳細な解析を試みた。

「方法と結果」*hsp30* プロモーターの下流に *glaB* 遺伝子の ORF を連結した融合遺伝子を、*niaD* をマーカーとして 1 コピー導入した形質転換株を得た。*hsp30* promoter の -388~-1 領域のみ用いると、30°C において転写は抑制され、高温誘導により転写活性が上昇した。得られた形質転換株を PYD 液体培地で 30°C 一晚培養後、40°C 2 時間の高温誘導を行って、培養上清に生産されるグルコアミラーゼ活性を測定した。その結果、固体培養特異的に生産される *GlaB* を、高温誘導後の培養上清中に生産させることができた。しかし、GUS 遺伝子を用いた Deletion 解析の結果 (2) から予測していたよりも、高温誘導による酵素活性の上昇が見られなかった。そこで、現在、発現量や培養条件の検討など解析を行っている。(1) 松下ら、日本農芸化学会 2006 年度大会講演要旨集、p 116 (2) 松下ら、第五回糸状菌コンファレンス 要旨集、p 79

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

Mayumi Matsushita, Satoshi Suzuki, Sawaki Tada, Hiroki Ishida*, Ken-Ichi Kusumoto, Yutaka Kashiwagi

(Natl. Food Res. Inst., * Research Institute, Gekkeikan Sake Co. Ltd)

P-76

A.oryzae の MAL クラスター遺伝子はアミラーゼ系酵素遺伝子発現にも関与する

長谷川祥子、五味勝也（東北大院農・生物産業創成）

[目的]産業的に重要な麹菌のアミラーゼ系酵素の生産は、培地中のデンプンやマルトースなどのマルトオリゴ糖の存在により転写因子 AmyR を介して正の制御を受けている。一方、麹菌におけるマルトース資化は MAL クラスターが中心的な機能を果たしており、この MAL クラスター遺伝子のうち、マルトースパーミアゼ遺伝子 *malP*、菌体内マルターゼ遺伝子 *malT* はマルトースにより発現が誘導され、その発現はアミラーゼ系酵素遺伝子の転写因子 AmyR ではなく、MAL クラスター内に存在し構成的に発現している *malR* の誘導下にあることが示唆されている。本研究では、デンプンやマルトースなどのマルトオリゴ糖の分解資化に関わる遺伝子の総合的な発現制御機構を明らかにすることを目的として、転写因子 MalR をはじめとする MAL クラスター遺伝子の機能解析を行ったところ、MAL クラスター遺伝子がアミラーゼ系酵素遺伝子発現に寄与していることを認めたので報告する。

[結果]*malP* 破壊株や *malR* 破壊株を作製した結果、 α -アミラーゼ活性が減少したことから、これらの遺伝子がアミラーゼ系酵素生産に何らかの機能を果たしていることが示唆された。また、 α -アミラーゼ遺伝子 *amyB* 発現にも影響が見られたことから、MalR により誘導される MalP のマルトース菌体内取り込み機能を通して AmyR が活性型となり、活性型 AmyR がアミラーゼ系酵素遺伝子発現を誘導するものと思われる。さらに、構成的に発現して転写因子として機能している MalR や AmyR の活性化を引き起こす誘導因子を明らかにするため、 α -グルコシダーゼ活性阻害剤を用いてマルトースとイソマルトース存在下での α -アミラーゼ活性、*amyB*、*glaA* の発現を調べたところ、モデルカビである *A.nidulans* では AmyR はイソマルトースにより活性化されるのに対し、*A.oryzae* ではマルトースでも活性化されることが明らかとなった。さらに、*A.nidulans* では *A.oryzae* の MAL クラスター遺伝子のオーソログは AmyR により制御されていると報告されていることから、以上の結果はデンプンの分解資化については *A.oryzae* 独自の機構が存在することを示唆するものである。

The MAL cluster in *Aspergillus oryzae* is involved in production of amylolytic enzymes.

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

P-77

Aspergillus nidulans 硝酸還元酵素遺伝子の嫌気条件特異的な転写制御機構の解明

梶尾俊介, 藤井達也, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* は、エタノールの酸化に伴って硝酸をアンモニアへと還元し、嫌氣的に ATP を生成する(アンモニア発酵)。この際、硝酸は硝酸還元酵素(Nar)および亜硝酸還元酵素(Nir)によりアンモニアへと還元される。好気条件下では、Nar 遺伝子(*niaD*)の発現は、硝酸によって誘導され、アンモニアなどの利用しやすい窒素源によって抑制されることが知られている(アンモニア抑制)。一方、我々は、嫌氣的なアンモニア発酵条件下ではその抑制が起こらないことを示してきた。そこで、本研究では、*niaD* のプロモーター領域と大腸菌の β -ガラクトシダーゼ遺伝子の融合遺伝子を作製・利用することによって、*niaD* の窒素源および通気条件による転写制御機構の解明を試みた。その結果、嫌気条件下では *niaD* の発現は、窒素源による正・負の制御を受けないこと、脱誘導・脱抑制条件では好気条件下よりも強いことが示された。さらに、プロモーター領域に 10 箇所存在する転写制御因子 AreAp の認識配列のうち、好気条件下での転写に最も重要とされている配列が、嫌気条件下の転写量の増加にとっても重要であることが明らかとなった。また、AreAp 遺伝子破壊株では、嫌気条件下での転写量の増加が見られなくなった。アンモニア抑制は AreAp の働きが阻害されることにより起こることが知られているが、嫌気条件下では AreAp の働きが阻害されないために、アンモニア抑制をうけない可能性が考えられる。

Gene expression of nitrate reductase under anaerobic conditions in *Aspergillus nidulans*

Shunsuke Masuo, Tatsuya Fjii, Naoki Takaya

(Graduate School of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba)

P-78

Trichoderma reesei におけるキシラナーゼ III 遺伝子の誘導発現機構の解析

古川 隆紀, 小笠原 渉, 岡田 宏文, 森川 康 (長岡技科大・生物)

【目的】*Trichoderma reesei* PC-3-7 においてキシラナーゼ III 遺伝子(*xyn3*) の発現はキシラン系の誘導物質によって誘導されず、セルロースとその誘導体および単糖である L-sorbose によってのみ誘導される。このため *xyn3* の発現はセルラーゼ遺伝子群と同様の誘導発現機構によって制御されていると推定される。我々は *T. reesei* におけるセルラーゼの誘導生産に関する新たな知見を得ることを目的として *xyn3* 上流領域(約 1.1 kb)の解析を進めてきた。これまでの研究により、*xyn3* の誘導発現には既知の転写活性化配列を含まない-686~-673 領域が最も重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。本研究ではこの領域を詳細に解析し、転写活性化配列の同定を試みた。

【方法と結果】開始コドンの上流-686~-673 領域内を連続的に変異させた変異型の上流領域を作製し、レポーター解析によりそれぞれの誘導性を評価した。その結果、-684~-673 領域内の変異に伴い誘導性の低下が観察された。特に-681 AATTTTGCC-673 領域の変異が著しい低下を引き起こしたことから、この配列が重要な転写活性化配列であると推察された。*T. reesei* のセルラーゼ遺伝子群の上流領域には 5'-GGCAA-3' 配列が複数存在していることから、この配列が *xyn3* 以外の遺伝子においても転写活性化配列として機能している可能性が示唆された。一方、-684 AATTTTGCC -673 配列はその上流に存在する-701 GGCTATATA -692 配列と逆向き反復配列様の構造をとっており、その配列および位置関係が *T. reesei* の XlnR ホモログである Xyr1 の結合配列(5'-GGCTAAN₁₀TTAGCC-3')とよく類似していた。このため、二つの GGC-AT rich モチーフが一つの転写活性化配列として機能している可能性も考えられた。現在、-701~-692 配列の機能について解析を進めている。

Transcriptional regulation of *xyn3* in *Trichoderma reesei* PC-3-7

Takanori Furukawa, Wataru Ogasawara, Hirofumi Okada, Yasushi Morikawa

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

P-79

***Trichoderma reesei* におけるセルラーゼ遺伝子の誘導機構の解析**

志田洋介, 熊谷克幸, 小笠原渉, 岡田宏文, 森川康 (長岡技科大・生物)

[目的] *Trichoderma reesei* において種々のセルラーゼ遺伝子は誘導条件下で同調して発現する。それぞれの転写量は大きく異なるがその量比は用いた誘導物質にかかわらずほとんど一定である。そのため共通の誘導発現機構が存在すると考えられている。セロビオハイドロラーゼ遺伝子 (*cbh1, cbh2*) に関して数種の転写調節因子が報告されているが、すべてのセルラーゼ遺伝子を含む誘導機構の全容解明には至っていない。本研究はセルラーゼ遺伝子群の中でも転写量の少ないエンドグルカナーゼ遺伝子 III(*egl3*)を研究対象として、セルラーゼ遺伝子の誘導発現機構と転写量に影響を与える因子について新たな知見を得ることを目的としている。

[方法と結果] *cbh1, 2, egl1*~5 の上流領域を比較解析したところ、*T. reesei* のセルラーゼ遺伝子の転写活性化因子である ACEII の結合配列は転写量の多い *cbh1, 2* の上流配列に多く存在していた。しかし *egl* の中で転写量の多い *egl1* の上流領域にはその相関関係が見られず、ACEII だけでは転写量の比を説明することができないため他の因子の存在が考えられた。*egl3* の上流領域の削除解析および変異解析では、ACEII 結合配列 (GGCTAA) に加えて類似した配列 (GGCTAT) が *egl3* の誘導発現に関与していることが明らかとなった。この ACEII 様配列は各セルラーゼ遺伝子の上流領域にも存在していたことから、*egl3* 以外でも機能している可能性が考えられた。どのような因子がこの ACEII 様配列に結合するのかは現在解析中である。また、*egl3* と他の遺伝子のいくつかの ACEII 結合配列にはその上流数塩基にわたって共通性が見いだされた。今後この共通配列を解析していく必要がある。

Analysis of induction mechanism of *Trichoderma reesei* cellulase genes

Yosuke Shida, Katsuyuki Kumagai, Wataru Ogasawara, Hirofumi Okada, Yasushi Morikawa

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

P-80

麹菌 *Aspergillus oryzae* による cellobiose phosphorylase の生産

多田 功生, 鈴木 聡, 楠本 憲一, 天野 良彦¹, 佐々木 堯, 柏木 豊 (食総研,¹信州大院・工)

(目的) 細菌 *Cellvibrio gilvus* 由来の cellobiose phosphorylase (CBPase) はセロビオースを過リン酸分解し、glucose-1-phosphate と glucose を生成する反応を触媒する。同時に逆反応も触媒するので、ヘテロオリゴ糖を生成することが可能であり、有用な酵素である。しかし、*C. gilvus* 培養では生産性が低いため、麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いた CBPase 生産系を構築し、酵素生産性及びその性質について検討した。

(方法と結果) *C. gilvus* の CBPase は、約 90kDa の分子量をもつ非常に大きな酵素であり、また細胞内において二量体あるいは四量体で存在することが報告されている。そこで、*amyB* プロモーター下流に CBPase 遺伝子を連結、*A. oryzae* に導入し、細胞内生産型の形質転換株を取得した。形質転換株の細胞抽出液には *C. gilvus* のそれと比較して単位蛋白質あたり約 10 倍の CBPase 活性が存在し、細胞内における CBPase の生産が確認された。至適生産条件については、現在検討中である。同時に、分泌生産の可能性についても探っている。

Production of cellobiose phosphorylase in *Aspergillus oryzae*

Sawaki Tada, Satoshi Suzuki, Ken-Ichi Kusumoto, Yoshihiko Amano¹, Takashi Sasaki, Yutaka Kashiwagi (NFRI,

¹Grad.Sch.Engineering, Shinshu Univ.)

P-81

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* のセルロース分解酵素遺伝子発現量にグルコース濃度および培養時間が与える影響

鈴木一史, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* によるセルロース分解機構においては、セロビオヒドロラーゼ、セロビオース脱水素酵素、 β -グルコシダーゼといった菌体外酵素の関与が示されている。これらの酵素の遺伝子発現パターンは菌の培養に用いる炭素源によって異なることが知られており、炭素源の種類が与える影響に関しては様々な研究が行われている。特にグルコースの存在によってこれらの遺伝子発現のリプレッションが生じることがよく知られている。しかし、グルコースの濃度がリプレッションに与える影響や、グルコースを炭素源とした場合の培養時間による発現量の差に関する検討はこれまで十分になされていない。そこで本研究では、*P. chrysosporium* に異なる濃度のグルコースを与えた場合の、セルロース分解酵素遺伝子の発現量の経時変化をリアルタイム定量 PCR によって解析した。また *P. chrysosporium* のゲノム情報を利用し、遺伝子発現調節機構についての知見を得るため各遺伝子のプロモーター上における転写調節因子結合部位の解析を行った。その結果、 $5000 \mu\text{M}$ あるいは $500 \mu\text{M}$ 相当のグルコースを添加した場合には、添加後 6 時間までに遺伝子発現が抑制されるが、 $50 \mu\text{M}$ 相当のグルコースを添加した場合には、添加後 6 時間までは発現量が対数的に増加することが示された。また各遺伝子のプロモーター上に子嚢菌のグルコースリプレッサー結合部位と相同な領域を見出した。

Glucose concentration and cultivation time affected gene expression of cellulolytic enzymes in the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*

Hitoshi Suzuki, Kiyohiko Igarashi, and Masahiro Samejima

(Univ. of Tokyo)

P-82

Cluster analysis of microarray gene expression data during growth of *Aspergillus oryzae* in cellulose substrate medium

Avid SHIAU, Praveen Rao JUVVADI, Jun-ichi MARUYAMA, Manabu ARIOKA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

The filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*, has been widely recognized as a safe organism and its importance for the food industry, such as for the production of useful enzymes has been well established. The recent release of its complete genome sequence has attracted fungal biologists and prompts investigations into its potential to be utilized for wider biotechnological applications. We have designed custom array (Affymetrix Inc.) consisting of 12,050 genes from *A. oryzae*. To understand the cellular machinery of biomass degradative processes/potential in *A. oryzae*, we studied the genome wide expression data during its growth on cellulose as a substrate. A 24 h pre-grown culture of *A. oryzae* RIB40 strain in Czapek's Dox (CD) medium was shifted to CD medium supplemented with 2% Avicel and cultured for a further period of 8 h. The labeled cRNA prepared from the total RNA was hybridized onto the *A. oryzae* microarray. The genome wide expression data obtained was processed and compared to similar data originating from RIB40 grown on CD-Glucose medium. Of the 12,050 genes examined, a positive expression profile consisting of 3,454 upregulated genes was produced. At the same time, data was retrieved using the comprehensive glucoside hydrolase database at CAZY and 52 predicted cellulolytic genes (cellobiohydrolases, endoglucanases and beta-glucosidases) were identified in *A. oryzae*. Fifteen of these hydrolases were found to be at least 2x upregulated in the positive expression profile. Within this subset, the promoter of each gene will be analyzed for the *cis*-element binding sequences that are commonly found in promoter regions of fungal hydrolytic enzymes.

P-83

***Aspergillus oryzae* 転写因子 AoXlnR 支配下にある多糖分解酵素遺伝子群の同定**

野口祐司, 佐野元昭*, 加藤雅士, 小林哲夫 (名大院生命農・生物機構, *金沢工大)

【目的】 麹菌 *Aspergillus oryzae* は植物性多糖分解能に優れ, 強力なキシラナーゼ, セルラーゼ遺伝子群を有している. 当研究室では, *A. oryzae* が有するこれら遺伝子群の工業的利用を目的として AoXlnR を単離した. これまでに AoXlnR は, キシランやキシロースに由来するシグナルに応答してキシラナーゼ, セルラーゼ遺伝子群の転写を活性化することが明らかとなっている. 今回, DNA マイクロアレイ解析によって, AoXlnR が転写制御している遺伝子群の完全同定を試みた.

【方法】 DNA マイクロアレイ解析に供する菌株には, 構成的高生産プロモーターである *TEF1* プロモーターを用いた AoXlnR 高生産株と AoXlnR 破壊株を選択した. 各菌株を培養し, 菌体を回収・洗浄後, 0.1%濃度キシロースを含む誘導条件下の液体培地で更に 30 分間培養した. 得られた菌体から mRNA を抽出し, 誘導条件下での遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレイにより解析した. DNA マイクロアレイ解析の結果から, AoXlnR 高生産株で発現量が多い酵素遺伝子群を抽出した. その結果, 既に AoXlnR 支配下であることが示されている 4 個のキシラナーゼ, 4 個のセルラーゼ遺伝子に加え, 新たに, 6 個のキシラナーゼ遺伝子, 9 個のセルラーゼ遺伝子が同定された. さらに, 11 個のキシラン側鎖分解酵素遺伝子, 3 個のキシロース代謝系酵素遺伝子の発現量も増大していた. 以上から, キシラン・セルロース分解に必要な全ての酵素遺伝子が AoXlnR の制御下にあることが確認された.

Identification of xylanolytic and cellulolytic enzyme genes under control of AoXlnR.

Yuji Noguchi, Motoaki Sano, *Masashi Kato, and Tetsuo Kobayashi

(Grad. Sch. of Bioagricultural Sci., Nagoya Univ., and *Kanazawa Inst. Tech.)

P-84

***Trichoderma reesei* 由来セルラーゼの機能改良**

中澤 光, 岡田 和士, 落合 伸廣, 小野寺 朋子, 小笠原 渉, 岡田 宏文, 森川 康

(長岡技科大・生物)

我々は、セルラーゼ高生産菌 *Trichoderma reesei* のセルロース分解能力をさらに高めるために、*T.reesei* により生産される個々のセルラーゼ (Cellobiohydrolase (CBH) I,II,および Endoglucanase(EG) I,II,III) について触媒能力および安定性を向上させることを目的として進化分子工学的に改変している。この改変手法ではランダム変異遺伝子ライブラリーで宿主を形質転換し、得られた多数の変異株から改良酵素発現株を選抜することが必須となる。そのため高い形質転換効率を有する *Escherichia coli* および *Saccharomyces cerevisiae* を宿主に用いてまずは発現の可否を確認した。このうち *E.coli* での発現に成功した EG II および EG III について改変を行ったところ、EG III において培養液当たりの活性値で約 2-5 倍の向上が見られた。*S.cerevisiae* で発現する EG I については約 2 倍の活性向上が見られた。現在活性が上昇した改良酵素について比活性、安定性および形質転換体の発現量の詳細な解析を行っている。

Directed evolution of cellulases from *Trichoderma reesei*

Hikaru Nakazawa, Katsunori Okada, Nobuhiro Ochiai, Tomoko Onodera, Wataru Ogasawara, Hirofumi Okada,

Yasushi Morikawa. (Bioeng., Nagaoka Univ.Tech.)

P-85

Aspergillus aculeatus 由来 *aviIII* 遺伝子の *A. aculeatus* を宿主とした高発現

板東夏海, 金政真*, 谷修治, 炭谷順一, 荒井基夫**, 川口剛司 (阪府大院・応生科, *静岡大農・応生科, **中部大・応生)

近年、エネルギー危機に伴いバイオマス利用が注目されている。本研究室で単離された *A. aculeatus* は強いセルラーゼ活性を持ち、バイオマス有効利用に大きく貢献するものと思われる。バイオマス利用には主成分であるセルロースの含まれる、強固に水素結合した結晶性セルロースの分解が問題となっている。そこで以前、結晶性セルロース分解に有用なエキソグルカナーゼ遺伝子 (*aviIII*) を同属の *A. oryzae*、酵母で高発現する事を試みたが有意の結果を示さなかったため、今回、当研究室で開発した元菌株である *A. aculeatus* の宿主ベクター系を用いて高発現を行い、性質決定を行った。

炭素源に影響されず構成的な発現を可能にする、プロモーターP-No8142 の下流に *aviIII* 遺伝子を連結し *A. aculeatus* へ導入した結果、*aviIII* 高発現株を取得することに成功した。また、得られた形質転換体の培養条件を検討し、Octyl-Sepharose を用いた疎水クロマトグラフィーに供し、さらに、SP-TOYOPEARL 650M を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーに供す事で精製を行った。得られた精製サンプルを用いて、至適温度、温度安定性、至適 pH、pH 安定性、また、基質特異性についても調べた。現在、TLC や HPLC により反応産物を解析し、この酵素の詳しい性質を調べている。

Overexpression of *aviIII* gene from *Aspergillus aculeatus* in *A. aculeatus*

Natsumi Bando, Shin Kanamasa*, Syuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Motoo Arai**, Takashi Kawaguchi

(Graduate School of Life & Environmental Sciences, Osaka Prefecture Univ., *Faculty of Agriculture, Univ. of Shizuoka, and **Dept. of Biological Chemistry, Univ. of Chubu)

P-86

Aspergillus aculeatus 由来 β -キシロシダーゼ遺伝子の *A. oryzae* における発現

小西 達也, 田尾藍子, 谷 修治, 炭谷 順一, 荒井 基夫1, 川口 剛司 (阪府大院・応生科, 1:中部大・応生)

<目的>当研究室で単離された *A. aculeatus* はヘミセルロースを効率よく分解する。本菌培養上清中からキシラン分解酵素として3種のキシラナーゼ、及び1種のキシロシダーゼが精製されている。このうち、キシロシダーゼについては、保存領域から設計したプライマーを用いたPCRから、2種の異なった配列を持つDNA断片が得られ、2種のキシロシダーゼ遺伝子がクローニングされている。本研究では2種の遺伝子が機能的なキシロシダーゼをコードしているのかどうかを明らかにすると共に、精製済みの酵素がどちらの遺伝子にコードされているかを同定することを目的とした。<方法・結果>2種のキシロシダーゼ遺伝子 (*xyl1*, *xyl2*) をそれぞれ糸状菌用高発現ベクター pNAN8142 に挿入し *niaD* を選択マーカーとして *A. aculeatus* に導入した。得られた形質転換株について、4MU-xyl を用いたプレートアッセイや、培養上清中のキシロシダーゼ活性を pNP-xyl を用いて測定することにより両遺伝子ともに機能的なキシロシダーゼをコードしていることを明らかにした。また、SDS-PAGE によって発現産物の検出を行ったところ、XYL1 および XYL2 両者とも明確な発現産物のバンドが検出されたが、付加する糖鎖の違いからか、その分子量は元菌株から精製されている β -キシロシダーゼの分子量と一致しなかった。そこで、両発現産物を精製し、個々の性質を決めて比較することにした。至適温度、至適 pH、熱安定性、pH 安定性、比活性について調べたところ、XYL2 の方が元菌株で精製されている酵素と近い値を示した。よって、4つの性質と比活性から XYL2 が元菌株で精製された β -キシロシダーゼである可能性が強く示唆された。

Expression of the β -Xylosidase Gene from *Aspergillus aculeatus* in *A. oryzae*

Tatsuya Konishi, Aiko Tao, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Motoo Arai, Takashi Kawaguchi

(Dept. of Applied Biological Chemistry, Univ. of Osaka Prefecture, and Dept. of Biological Chemistry, Univ. of chubu)

P-87

ヒゲカビキチンデアセチラーゼ遺伝子の工学的利用

米村晃子, 村山肇子 (関東学院大・工・物質生命科学)

動物性食物繊維のひとつであるキチンは地球最後のバイオマスと言われ、バイオポリマーとしてはセルロースについて多いことが知られているが、キチンを脱アセチル化して得られるキトサンは、キチンよりも汎用性が高く、医療材料や機能性食品、化粧品、土壌改良剤として用いられ、年々その需要が高まっている。

キトサンは生物資源由来の原料より生産されるため、無害で安全性が高く、資源枯渇の可能性が低く、生物分解性であるという特徴がある。現在キトサンの工業的生産には、キチンを高濃度のアルカリ処理によって脱アセチルする方法が用いられているが、そのときに生じる高濃度アルカリ廃液は環境破壊の原因となっている。そのため、高濃度アルカリ処理法に代わる方法が環境を配慮する上で重要であるが、当研究室ではキチンを脱アセチル化してキトサンを生成する酵素、キチンデアセチラーゼに着目している。

接合菌類の一種であるヒゲカビは細胞壁の主要成分としてキチンとキトサンを含み、キチンから脱アセチル化を行う酵素、キチンデアセチラーゼを持つ菌類の一つである。しかしヒゲカビを大量に培養しても得られる酵素はわずかであるため、ヒゲカビのキチンデアセチラーゼ遺伝子をクローニングして、このクローンをコウジカビに導入し、コウジカビにキチンデアセチラーゼを大量に発現させることを目的として研究している。

Industrial application of chitin deacetylase gene from *Phycomyces blakesleeanus*

Akiko Yonemura, Tadako Murayama

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

P-88

糸状菌 *Aspergillus nidulans* のミオシン様ドメインを持つキチン合成酵素 CsmA、CsmB のドメイン間の機能的差異の解析

對崎真植、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持つことが示されている。A. *nidulans* には、N 末端側にミオシンと相同性を示すドメイン (MMD)、C 末端側にキチン合成酵素ドメイン (CSD) を持つキチン合成酵素をコードする遺伝子が *csmA*、*csmB* の二種存在する。これまでに、それぞれの単独破壊株の表現型の類似性、二重破壊の合成致死性が示されている。一方、*csmB* 破壊株において *csmA* を高発現させても、*csmB* の破壊による異常が回復しないことから、両者の機能的差異も示唆されている。また CsmA、CsmB はともに菌糸先端や隔壁形成部位に局在化しており、それぞれの MMD とアクチン細胞骨格との相互作用が示唆されている^{1,2)}。今回、両者の機能的差異に関わるドメインを検討するため、*csmB* 破壊株において、CsmA の MMD と CsmB の CSD の融合タンパク質 MACB、あるいは CsmB の MMD と CsmA の CSD の融合タンパク質 MBCA を野生型 CsmB の代わりに発現させたところ、前者では *csmB* の破壊による生育の遅延や形態異常が回復し、後者では回復しなかった。このことから、CsmA の MMD は CsmB の MMD の機能を代替できるが、CsmA の CSD は CsmB の CSD の機能を代替できないことが示唆された。現在、MACB、MBCA が *csmA* の破壊による異常を相補するか等について検討中である。

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

2) Takeshita, N. *et al* (2006) Mol. Microbiol. **59**:1380-1394

Functional difference between the domains of two chitin synthases, CsmA and CsmB, in *Aspergillus nidulans*

Makusu Tsuizaki, Norio Takeshita, Hiroyuki Horiuchi, and Akinori Ohta

(Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

P-89

糸状菌 *Aspergillus nidulans* のクラス III キチン合成酵素 (ChsB) の細胞内局在部位の解析

福田一治¹、山下修一²、堀内裕之¹、太田明德¹ (東大・農生科・¹応生工・²生環生)

キチンは糸状菌の細胞壁の主要構成成分の1つであり、その生合成は形態の形成、維持に関わると考えられる。*A. nidulans* のキチン合成酵素のひとつである ChsB は 916 アミノ酸からなり、クラス III に属している。クラス III のキチン合成酵素は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* や *Shizosaccharomyces pombe* などには存在せず、菌糸状の形態で生育可能な菌からしか単離されていない。*chsB* の遺伝子破壊株では菌糸生長が大きく阻害され、その菌糸は分岐が多く、非常に小さなコロニーを形成する。本研究では ChsB の細胞内での存在状態や局在部位を解析するため、ゲノム上の *chsB* の発現が制御可能で、さらに ChsB の N 末端に 6xFLAG または EGFP を連結した FLAG-ChsB または EGFP-ChsB を *argB* 部位で発現できる FB-3 株、EB-5 株をそれぞれ作製した。FLAG-ChsB、EGFP-ChsB がそれぞれ正常に機能することを確認した。EB-5 株で EGFP-ChsB の菌糸内での局在部位を検討したところ、常に菌糸の先端部分に蛍光が見られた。また、形成時の隔壁でも蛍光が観察され、菌糸の外壁から中心部へ収縮する挙動を示した。FB-3 株を用い、免疫電顕による FLAG-ChsB の細胞内局在観察を行ったところ、FLAG-ChsB が隔壁の中心部や小胞に存在している様子が確認された。これらの結果から、ChsB が菌糸の先端生長や隔壁形成に重要な役割を果たすことが示唆された。

Localization of ClassIII Chitin Synthase (ChsB) in *Aspergillus nidulans*

Kazuharu Fukuda¹, Shuichi Yamashita², Hiroyuki Horiuchi¹, and Akinori Ohta¹ (¹Dept. Biotechnol., Univ. of Tokyo, ¹Dept. Agric. and Envir. Biol., Univ. of Tokyo)

P-90

糸状菌 *Aspergillus nidulans* のキチナーゼ遺伝子 *chiH*、*chiR* の機能解析

山崎晴丈、田中彩、堀内裕之、太田明德 (東大院・農生科・応生工)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の形態形成には、細胞壁の主要構成成分の一つであるキチンを加水分解する酵素であるキチナーゼの機能が不可欠であると考えられている。*A. nidulans* に存在すると推定される 18 個のキチナーゼ遺伝子中、*chiH* の遺伝子産物は、RACE 解析により、558 アミノ酸からなる蛋白質であり、N 末端に分泌シグナル、活性中心を含む領域、それに続く約 180 アミノ酸の Gln に富む領域からなると推定された。また同様に *chiR* の遺伝子産物は 305 アミノ酸からなる蛋白質であると推定され、活性中心を含む領域以外に特徴的な配列は見出されなかった。*chiH* 欠失株は野生型株と同様の生育をしたが、*chiR* 欠失株は分生子形成に異常が見られた。また *chiH* は転写レベルで分生子形成期に発現が誘導されており、さらに ChiH と EGFP との融合蛋白質はフィアライドとコニディアの間にリング状に局在することが分かった。以上のことから *chiH*、*chiR* は分生子形成期に機能している可能性が考えられた。さらに、*chiH* と *chiR* の二重欠失株は、特定の条件下で野生型株やそれぞれの単独欠失株に比べ著しく生育が遅れ、異常な形態を示した。このことから、*chiH*、*chiR* は菌糸生長期において協調的に機能している可能性が考えられた。

Functional analysis of chitinase genes, *chiH* and *chiR* in *Aspergillus nidulans*

Harutake Yamazaki, Aya Tanaka, Hiroyuki Horiuchi and Akinori Ohta
(Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-91

***Rhizopus oryzae* のキチン合成酵素遺伝子の発現解析**

阿部 歩, 浅野 行蔵, 曾根 輝雄 (北大院農・応用菌学)

糸状菌の中でも接合菌類の細胞壁はキチンに富んでおり, 細胞を形作る上でキチン合成酵素は重要な役割を果たしていると考えられるが, 子の菌類や担子菌類に比べるとその知見は少ない. 我々は, *Rhizopus oryzae* におけるキチン合成酵素の役割を明らかにするため, *R. oryzae* CBS 112.07 株から degenerate primer を使用して, キチン合成酵素の相同性配列の増幅を行い, いくつかの配列の異なるキチン合成酵素(CHS)遺伝子があることを以前報告した. 今回は, これらの遺伝子について, 公開されている *R. oryzae* のゲノム配列と比較して, 遺伝子全長を取得し, その発現を RT-PCR を用いて確認するとともにイントロンの決定を行った.

degenerate PCR とゲノム情報によって class II CHS 遺伝子が 6 種, class IV CHS 遺伝子が 2 種, class V CHS 遺伝子が 1 種得られた. 液体培養および平板培養菌体より RNA を抽出し, RT-PCR を行ったところ, class II 及び class V CHS 遺伝子は液体培養及び平板培養で発現が確認されたが, class IV CHS は 2 種とも発現を確認できなかった.

Class I 及び III CHS 遺伝子が得られなかったことから, キチン合成酵素の保存配列を用いて, *R. oryzae* ゲノム配列で Blast 検索を行った結果, *R. oryzae* には class I 及び III CHS は存在しないと考えられた. また, class IV 及び V については, 今回取得した遺伝子の他にも相同性を示したものが数多く存在したことから, 現在これらの遺伝子の発現解析を行っている.

Expression analysis of chitin synthase genes in *Rhizopus oryzae*

Ayumi Abe, Kozo Asano, and Teruo Sone

(Lab. of Appl. Microbiol, Research Faculty of Agr. Hokkaido Univ.)

人名索引 (訂正版)

Truong Binh-Nguyen	62	井上弘一	59
Suhn-Kee Chae	58	今村茂行	71
Dong-Min Han	57	岩崎健太郎	37
Praveen Rao Juvvadi	37, 44, 76	岩下和裕	51, 52, 66, 68, 72
Hye-Ryoun Kim	57	宇佐美論	53, 72
James R Kinghorn	13	歌島悠	72
Sun-Hee Noh	58	内田博教	37
Berl R. Oakley	36	内富久美子	48
Shinichi Oide	12	梅澤俊明	33
Avid SHIAU	79	海老塚豊	27, 44, 45, 46, 47
Naimeh Taheri-Talesh	36	及川英秋	27
B. Gillian Turgeon	12	老田茂	63
Shiela E Unkles	13	大石麻由	43
Le Xuan-Tham	62	大北由佳	51, 52
赤尾健	72	太田明德	31, 79, 80
紅朋浩	36	大野絢子	39
秋田修	51, 52, 72	大箸信一	35, 67
麻田恭彦	40	岡崎孝映	62
浅野行蔵	81	岡崎光雄	62
浅野祐広	53	小笠原博信	60
浅見行弘	44	小笠原涉	25, 74, 75, 77
芦澤武人	43	岡田和士	77
東信宏	29, 55	岡田宏文	25, 74, 75, 77
足立浩美	65	岡部明子	48
阿部歩	81	岡本智充	62
阿部敬悦	29, 30, 54, 59	長田裕之	44
天野良彦	15, 75	尾関健二	67
荒井基夫	65, 70, 71, 78	織田健	51
有江力	48, 51	尾谷浩	49, 64
有岡学	28, 36, 39, 40, 41, 70, 76	落合奈緒子	72
有馬寿英	51	落合伸廣	77
有本裕	48	落合則幸	56
飯田祐一郎	50	小野寺朋子	77
五十嵐圭日子	32, 63, 76	小畑浩	60
池田健一	50	小原敏明	50
伊澤真澄	42	柿菌ダララット	51
石川絵理	36	角谷直樹	27
石田博樹	73	掛谷秀昭	44
磯部千尋	42	加治佐平	32, 63
一石昭彦	58, 59	柏木知子	42
伊藤靖夫	31	柏木豊	66, 70, 71, 73, 75
伊藤幸成	38	加藤直樹	44
稲垣賢二	48	加藤雅士	29, 53, 54, 55, 68, 77
稲富聡	62	金政真	33, 65, 78

金丸京子	29, 53, 54, 55	塩澤あずさ	52, 56, 57
鎌倉高志	41, 42, 43	志田洋介	75
川口剛司	65, 70, 71, 78	島田幹夫	33
川崎東彦	32	下飯仁	66, 72
川村真志	58	下坂誠	62
神田鷹久	15	正路淳也	36, 39, 40, 41
菊池韶彦	36	新谷尚弘	60
菊間隆志	39, 41	須賀晴久	56
北川治恵	67	杉浦立樹	63
北嶋勇典	56	杉本直己	34
北本勝ひこ	28, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 44, 45, 70, 76	杉山純也	68
北本則行	66, 70	鈴木彰	62
鬼頭英樹	43	鈴木麻子	29, 55
木村多江	66, 71	鈴木一史	76
木村俊之	63	鈴木聡	66, 70, 71, 73, 75
木村真	56	炭谷順一	65, 71, 78
楠本憲一	66, 70, 71, 73, 75	勢ノ康代	44, 45
工藤俊章	53, 72	曾根輝雄	43, 81
工藤洋平	59	對崎真楠	79
窪寺隆文	34	田尾藍子	78
熊谷克幸	75	高木忍	23, 60
桑野哲矢	31	高木海	44
合田秀矢	68	高谷直樹	74
神太郎	69	高妻卓司	71
河野勇人	48	高橋明珠	68
古賀晋治	71	高橋砂織	60
児玉基一朗	49, 64	竹内道雄	30, 69
小西達也	78	武川治	41
小林亜紀子	35	竹下典男	79
小林哲夫	29, 53, 54, 55, 68, 77	竹谷博子	71
小林靖典	66	竹野正洋	43
五味勝也	34, 52, 59, 60, 73	田島諭	33
斉藤彩華	41	多田功生	71, 73, 75
坂野真平	52, 56, 57	辰巳晶紀	41
坂本和俊	51, 52, 66, 68, 72	田中彩	31, 80
阪本龍司	32	田中瑞己	60
砂川政英	61	谷口雄哉	32
佐々木堯	75	谷修治	65, 78
佐藤利次	47	築野卓夫	67
佐藤奈津子	30, 54	張明永	48
佐藤正仁	59	柘植尚志	49, 50
佐野元昭	35, 67, 68, 77	寺岡徹	48, 51
佐野裕基	46	堂前直	48
鮫島正浩	32, 63, 76	堂本光子	67
産本弘之	48	時本景亮	64
		徳井美里	34

徳岡昌文	60	古川隆紀	74
土佐幸雄	27, 42	坊垣隆之	64
富田房男	43	朴龍洙	33
友野理生	28	星由紀子	30
中井喬彦	70	堀内裕之	31, 79, 80
中畝良二	49	堀内桃子	43
中馬いづみ	42	堀尾哲也	36
中澤光	77	本山愛	51
中島敏彦	43	本田与一	17
長島由夏	41	前川二太郎	64
中野正明	49	前田優介	65
中屋敷均	27, 42, 50	馬替由美	61
南部夏希	47	榊尾俊介	74
西晶子	64	俣野達彦	69
西村顕	34	町田雅之	67
西村麻里江	28	松井幸太郎	43
根本崇	28	松浦知己	59
野口祐司	77	松尾一郎	38
野崎功一	15	松鹿昭則	55
野崎信行	48	松下真由美	71, 73
萩原大祐	29, 53, 54	松林良博	29, 54
朴杓允	50	眞山滋志	27, 42
長谷川祥子	73	丸井淳一郎	54
秦洋二	35, 60	丸山潤一	28, 37, 38, 39, 76
服部武文	33	三上重明	52, 66, 68, 72
播本佳明	49	三木慎介	43
板東夏海	78	水谷治	30, 59
伴光博	34	水野猛	29, 53, 54, 55
樋口裕次郎	40	水野正浩	15
久田博元	35	溝上豊	28
百町満朗	56	南栄一	28
玄康洙	50	三宅剛史	48
平井浩文	63	宮崎俊	46
平岡良輝	64	宮本幸恵	64
平八重一之	43	三好大輔	34
広常正人	64	村山肇子	38, 79
福田一治	80	茂泉幸太	38
福森文康	57	本山高幸	53, 72
藤井勲	27, 44, 45, 46, 47	森川康	25, 74, 75, 77
藤井達也	74	森口智美	45
藤岡智則	30	森翔吾	48
藤村真	52, 56, 57	森田寛人	30
藤原真紀	71	森田真純	53, 72
古川育代	70	守屋智博	45
古川健太郎	30, 54	矢崎一史	33
古川貴子	30	山内隆寛	34

山岸賢治	63	吉見啓	30
山岸大輔	64	芳陵一生	71
山崎晴丈	31, 80	吉村昌徳	40
山下和宏	52, 57	依田康孝	31
山下修一	80	米村晃子	79
山下伸雄	34	渡邊彰	40
山篠貴史	55	渡邊節子	56, 57
山田修	51, 52, 66, 68, 72	渡辺隆司	17
山田雅人	63	渡邊知樹	33
山中崇	67	渡辺久敬	47
山本幹博	49	渡邊崇人	17
横井寿郎	61	渡辺泰祐	28, 38
吉田隆延	48		

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

実践女子大学生活科学部（〒191-8510 東京都日野市大坂上 4-1-1）

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）

秦 洋二

月桂冠株式会社総合研究所（〒612-8385 京都市伏見区下鳥羽小柳町101番地）

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、加藤 雅士

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）