

## 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	16
シンポジウム講演要旨	19
一般講演要旨	38
ポスター発表講演要旨	47
人名索引	97
糸状菌分子生物学研究会会則	101
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿	102

## 第7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19年11月15日(木)-16日(金)

会場：東京大学弥生講堂  
(東京都文京区弥生1-1-1)

主催：糸状菌分子生物学研究会

後援：糸状菌遺伝子研究会

11月15日(木)

- 10:00-11:40 シンポジウム1 (S-1-1~S-1-4)  
「糸状菌における隔壁と形態形成の分子メカニズム」
- 11:40-12:40 昼食
- 12:40-13:52 口頭発表 (O-1~O-6)
- 13:52-14:00 休憩
- 14:00-16:00 ポスター発表 (P-1~P-50)
- 16:00-16:45 特別講演① Dr. Nancy P. Keller  
(University of Wisconsin)
- 16:45-17:30 特別講演② Dr. Gregory Jedd  
(Temasek Life Sciences Laboratory)
- 17:30-17:45 総会
- 18:00- 懇親会

11月16日(金)

- 9:30-11:35 シンポジウム2 (S-2-1~S-2-5)  
「二次代謝研究の分子基盤」
- 11:35-12:30 昼食
- 12:30-13:30 口頭発表 (O-7~11)
- 13:30-15:30 ポスター発表 (P-51~P-99)
- 15:30-16:42 口頭発表 (O-12~17)
- 16:42-17:00 閉会の辞

## 発表演題および講演時間

### 特別講演 11月15日（木）16:00-17:30

16:00-16:45 特別講演①

**The LaeA complex regulates development, secondary metabolism and virulence in *Aspergillus* spp.**

Dr. Nancy P. Keller (Departments of Plant Pathology and Medical Microbiology and Immunology, University of Wisconsin)

16:45-17:30 特別講演②

**The Mechanism of Woronin body biogenesis.**

Dr. Gregory Jedd (Temasek Life Sciences Laboratory & Department of Biological Sciences, The National University of Singapore)

### シンポジウム1 11月15日（木）10:00-11:40

#### 「糸状菌における隔壁と形態形成の分子メカニズム」

- 10:00 S-1-1 「麹菌における隔壁孔を介した細胞間コミュニケーション」  
丸山潤一（東京大学大学院農学生命科学研究科）
- 10:25 S-1-2 「O-グリコシレーションによって制御される糸状菌の正常な形態形成」  
後藤正利（九州大学大学院農学研究院）
- 10:50 S-1-3 「*Aspergillus nidulans* の隔壁形成と形態形成における各種キチン合成酵素の機能」  
堀内裕之（東京大学大学院農学生命科学研究科）
- 11:15 S-1-4 「担子菌ウシグソヒトヨタケ子実体の柄伸長に関わる遺伝子 *eln1* と *eln6* のクローニング」  
村口 元<sup>1</sup>、鎌田 堯<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>秋田県立大学生物資源科学部、<sup>2</sup>岡山大学大学院自然科学研究科)

シンポジウム2 11月16日(金) 9:30-11:35

「二次代謝研究の分子基盤」

- 9:30 S-2-1 「麹菌が生産する有用な二次代謝産物について」  
堤 浩子 (月桂冠 総合研究所)
- 9:55 S-2-2 「トリコテセン系毒素の構造多様性を生み出すメカニズムの解明と  
生産制御にむけて」  
木村 真 (理化学研究所・中央研究所)
- 10:20 S-2-3 「発ガン・毒性物質アフラトキシンの生合成機構とその防御」  
矢部希見子<sup>1</sup>、中島廣光<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>農業・食品産業技術総合研究機構、<sup>2</sup>鳥取大農学部)
- 10:45 S-2-4 「糸状菌ポリケタイド生合成遺伝子の機能解析」  
藤井 勲 (岩手医科大学薬学部)
- 11:10 S-2-5 「ML-236B (compactin)生合成遺伝子群の解析と高生産株育種への  
応用」  
馬場悟史、阿部有生 (第一三共株式会社)

## 一般講演（口頭発表）（O-1～O-17）

### 11月15日（木）

- 12:40-12:52 O-1 担子菌シイタケの Myb 型転写因子 Le.CDC5 と相互作用する新規 DNA 結合性タンパク質 CIPB  
中沢威人, 金子真也, 宮崎安将<sup>1</sup>, 山崎丘<sup>2</sup>, 勝川志穂<sup>3</sup>, 宍戸和夫（東工大・生命理工 1 現・森林総研 2 現・JAXA 3 現・日本製紙）
- 12:52-13:04 O-2 担子菌シイタケの Myb 型転写因子 Le.CDC5 およびそのパートナー CIPB の標的遺伝子 *ctg1*  
中沢威人, 金子真也, 宮崎安将<sup>1</sup>, 城島透<sup>2</sup>, 山崎丘<sup>3</sup>, 勝川志穂<sup>4</sup>, 宍戸和夫（東工大・生命理工 1 現・森林総研 2 現・RITE 3 現・JAXA 4 現・日本製紙）
- 13:04-13:16 O-3 木材腐朽担子菌においてセルロース分解酵素系の違いを与える分子生物学的因子  
加治佐平, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩（東大院・農生科・生材料）
- 13:16-13:28 O-4 *Gibberella fujikuroi* のフェロモンレセプター遺伝子の単離と破壊株の作出  
關波直子・寺岡 徹・有江 力（東京農工大・院農生物制御）
- 13:28-13:40 O-5 イネいもち病菌の非相同末端再結合に関与する遺伝子 *Khm70, Khm80* の欠損変異株の解析  
曾根 輝雄<sup>1</sup>, 阿部 歩<sup>1</sup>, 芦澤武人<sup>2</sup>（<sup>1</sup>北大院農・応用菌学, <sup>2</sup>中央農研）
- 13:40-13:52 O-6 *Agrobacterium tumefaciens* による形質転換法を利用したアラキドン酸生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 株の脂肪酸組成改変  
安藤晃規, 角田洋輔, 櫻谷英治, 小川 順, 清水 昌（京大院農・応用生命）

### 11月16日（金）

- 12:30-12:42 O-7 抽出液面固定化システムを用いたカビによる抗カビ物質 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone (6PP) の高濃度生産  
小田 忍・一色邦夫（メルシャン・生物資源研）
- 12:42-12:54 O-8 網羅的菌代謝物の比較解析システム  
岡崎孝映<sup>1</sup>, 中島大輔<sup>1</sup>, 細内敦<sup>1</sup>, 櫻井望<sup>1</sup>, 飯島陽子<sup>1</sup>, 青木考<sup>1</sup>, 鈴木秀幸<sup>1</sup>, 中島琢自<sup>2</sup>, 小牧久幸<sup>2</sup>, 原山重明<sup>2</sup>, 柴田大輔<sup>1</sup>（<sup>1</sup>かずさ DNA 研究所, <sup>2</sup>NITE）
- 12:54-13:06 O-9 糸状菌 *Aspergillus nidulans* ヒスチジンキナーゼの機能解析  
金丸京子, 松井哲児, 鈴木麻子, 山崎ゆかり, 加藤雅士, 小林哲夫（名大・生命農）

- 13:06-13:18 **O-10** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞壁構築シグナル伝達経路の解析  
藤岡智則<sup>1</sup>, 水谷治<sup>2</sup>, 古川健太郎<sup>2</sup>, 佐藤奈津子<sup>2</sup>, 吉見啓<sup>3</sup>, 山形洋平<sup>2</sup>, 中島佑<sup>2</sup>, 阿部敬悦<sup>2,3</sup> (<sup>1</sup>クミアイ化学・生科研, <sup>2</sup>東北大院・農, <sup>3</sup>東北大・未来研)
- 13:18-13:30 **O-11** *Aspergillus fumigatus* の産生するトリプロスタチン類の生合成遺伝子クラスターの同定  
加藤直樹, 鈴木宏和, 高木海, 高橋俊二, 長田裕之 (理研・中央研・抗生物質)
- 15:30-15:42 **O-12** *Aspergillus nidulans* の低酸素応答に関するプロテオーム解析  
志水元亨, 藤井達也, 梶尾俊介, 藤田健作, 北爪達也, 伊藤尚志, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)
- 15:42-15:54 **O-13** 米麴造りのポストゲノム解析  
岩下和裕<sup>1,2</sup>, 大北由佳<sup>1</sup>, 河野美乃里<sup>1</sup>, 西浦未華<sup>2</sup>, 富村健太<sup>1</sup>, 坂本和俊<sup>1</sup>, 山田修<sup>1</sup>, 三上重明(1酒総研・基盤, 2広島大院・先端・生命機能)
- 15:54-16:06 **O-14** 麴菌 *Aspergillus oryzae* の Non-Syntenic 領域の転写制御解析  
玉野孝一<sup>1</sup>, 佐野元昭<sup>2</sup>, 山根倫子<sup>1</sup>, 寺林靖宣<sup>1</sup>, 戸田智美<sup>1</sup>, 砂川美佐緒<sup>1</sup>, 小池英明<sup>1</sup>, 畑本修<sup>3</sup>, 海附玄龍<sup>3</sup>, 高橋理<sup>3</sup>, 小山泰二<sup>3</sup>, 旭井亮一<sup>4</sup>, 阿部敬悦<sup>5</sup>, 町田雅之<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>産総研・セルエンジニアリング, <sup>2</sup>金沢工業大・ゲノム研, <sup>3</sup>野田産研, <sup>4</sup>産総研・生命情報工学研究センター, <sup>5</sup>東北大院農・応生科)
- 16:06-16:18 **O-15** Woronin body 形成に関与する麴菌 *AoHex1* 遺伝子の選択的スプライシングの生理的意義  
岩崎健太郎<sup>1</sup>, 山下修一<sup>2</sup>, 丸山潤一<sup>1</sup>, 北本勝ひこ<sup>1</sup> (東大院・農生科・<sup>1</sup>応生工・<sup>2</sup>生環生)
- 16:18-16:30 **O-16** Localization and functional analyses of the AoSO protein in *Aspergillus oryzae*  
Cristopher Salazar ESCAÑO, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)
- 16:30-16:42 **O-17** 麴菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシスの生理学的機能解析  
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)

ポスター発表 P-1～P-50: 11月15日(木) 14:00-15:00(奇数番号)  
15:00-16:00(偶数番号)  
P-51～P-99: 11月16日(金) 13:30-14:30(奇数番号)  
14:30-15:30(偶数番号)

- P-1** リンゴ斑点落葉病菌の AM 毒素生合成遺伝子は複数コピー存在する.  
播本佳明<sup>1</sup>, 児玉基一朗<sup>2</sup>, 山本幹博<sup>3</sup>, 尾谷 浩<sup>2</sup>, 柘植尚志<sup>1</sup>(<sup>1</sup>名大院生農・<sup>2</sup>鳥取大農・<sup>3</sup>岡山大農)
- P-2** トマトアルターナリア茎枯病菌において宿主特異的 AAL 毒素生合成遺伝子 (ALT) クラスターが座乗する conditionally dispensable (CD)染色体  
赤木靖典, 赤松創, 尾谷浩, 柘植尚志<sup>1</sup>, 児玉基一朗 (鳥取大農, <sup>1</sup>名大院生農)
- P-3** *Fusarium oxysporum* におけるピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子の破壊  
本山 愛, 中原光一\*, 川端砂矢香\*, 金山典生\*, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大院農・\*サントリー)
- P-4** 交配不全性糸状菌 *Fusarium oxysporum* における交配型遺伝子領域 (MAT1) イディオモルフ入換え体の作出  
今井峻介・寺岡 徹・有江 力 (農工大院農・植物病理)
- P-5** *Fusarium oxysporum* の病原性遺伝子変異株の生物防除活性  
緒方 綾<sup>1</sup>, 飯田祐一郎<sup>1</sup>, 黒田克利<sup>2</sup>, 柘植尚志<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名大院生農, <sup>2</sup>三重県科学技術振興センター)
- P-6** アブラナ科野菜類炭疽病菌の効率的な遺伝子ターゲティング実験系の確立  
寺田 寛, 坪井基枝, 牛丸拓磨, 辻 元人, 久保康之 (京府大院・農)
- P-7** ウリ類炭疽病菌の分裂酵母 *teal* ホモログ変異株を利用した付着器形成に関与する Ca<sup>2+</sup>シグナル関連遺伝子の探索  
坂口 歩・辻 元人・久保康之 (京府大院農)
- P-8** ウリ類炭疽病菌の NADPHoxidase をコードする *ClaNOX1*, *ClaNOX2* 遺伝子の機能解析  
大澤貴紀, 辻 元人, 久保康之 (京府大院・農)
- P-9** *Mglg4* は *Magnaporthe grisea* の非相同末端結合修復に関与する  
鬼頭英樹, 藤川貴志, 西村麻里江 (生物研)
- P-10** イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* のキチン合成酵素の生長、分化、病原性における役割の解析  
本山高幸<sup>1</sup>, 落合奈緒子<sup>1</sup>, 工藤俊章<sup>2</sup> (<sup>1</sup>理研・中央研, <sup>2</sup>長崎大・水産)

- P-11** *Aspergillus niger* の分生子を用いたシアン非感受性呼吸系酵素遺伝子(*aox1*)の視覚的な発現解析  
服部貴澄, 本田裕樹, 木野邦器, 桐村光太郎 (早大・理工・応化)
- P-12** クエン酸生産系状菌 *Aspergillus niger* における NADP<sup>+</sup>依存性 isocitrate dehydrogenase 遺伝子 (*icdA*)の高発現による代謝改変  
林理恵, 服部貴澄, 木野邦器, 桐村光太郎 (早大・理工・応化)
- P-13** 麹菌 *A. oryzae* における後期エンドソーム構造の同定  
正路淳也, 辰巳晶紀, 菊間隆志, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-14** 麹菌 *A. oryzae* における Rab family GTPase の網羅的解析  
平田恭子, 正路淳也, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-15** *A. oryzae* 小胞体の糖タンパク質品質管理機構に関連する遺伝子群の機能解析  
渡邊泰祐<sup>1,2</sup>, 松尾一郎<sup>1,2</sup>, 戸谷希一郎<sup>1,2</sup>, 丸山潤一<sup>3</sup>, 北本勝ひこ<sup>3</sup>, 伊藤幸成<sup>1,2</sup> (理研<sup>1</sup>, CREST<sup>2</sup>, 東大院農生科・応生工<sup>3</sup>)
- P-16** 麹菌 *A. oryzae* における分泌タンパク質 AmyB の動態解析  
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-17** 麹菌 *A. oryzae* におけるペルオキシソーム生合成因子 AoPex11 の機能解析  
Praveen Rao JUVVADI<sup>1</sup>, Cristopher Salazar ESCAÑO<sup>1</sup>, 金鋒傑<sup>2</sup>, 高橋理<sup>2</sup>, 小山泰二<sup>2</sup>, 丸山潤一<sup>1</sup>, 北本勝ひこ<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東大院・農生科・応生工、<sup>2</sup>野田産研)
- P-18** 麹菌 *A. oryzae* におけるキネシン様タンパク質 AoKin3 を用いたエンドソームの動態解析  
滝口鉄也, 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-19** 麹菌 *A. oryzae* におけるペルオキシソーム局在配列レセプターAoPex5,7 の機能解析  
田鍋康子, 岩崎健太郎,丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-20** 麹菌の産生する生分解性プラスチック分解促進蛋白質 RolA の疎水面への吸着部位の特定  
上原健二<sup>1</sup>, 高橋徹<sup>1</sup>, 前田浩<sup>2</sup>, 山形洋平<sup>2</sup>, 長谷川史彦<sup>1</sup>, 五味勝也<sup>1</sup>, 阿部敬悦<sup>1</sup>  
(東北大・未来研<sup>1</sup>, 東北大・農・応生科<sup>2</sup>)
- P-21** 麹菌の Ski 遺伝子群の探索と nonstop mRNA 分解への関与  
田中瑞己<sup>1</sup>, 徳岡昌文<sup>2</sup>, 五味勝也<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東北大院農・生物産業創成,<sup>2</sup>野田産研)
- P-22** *Aspergillus nidulans* における protein O-mannosyltransferase 遺伝子群の機能解析  
原田祐佳, 松本翔, 後藤正利 (九大院・生資環)
- P-23** 麹菌 *Aspergillus oryzae* の潜在的な  $\alpha$ -マンノシダーゼ活性について  
芳賀 楓<sup>1</sup>, 赤尾 健<sup>2</sup>, 山田 修<sup>2</sup>, 大町鉄雄<sup>1</sup>, 吉田 孝<sup>1</sup> (<sup>1</sup>弘前大・農学生命、<sup>2</sup>酒総研)



- P-24** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* のクラス III キチン合成酵素 ChsB の分生子形成、菌糸生長における役割  
山田和成<sup>1</sup>、福田一治<sup>1</sup>、山下修一<sup>2</sup>、堀内裕之<sup>1</sup>、太田明德<sup>1</sup> (東大院・農生科・<sup>1</sup>応生工・<sup>2</sup>生環生)
- P-25** *Rhizopus oryzae* のキチン合成酵素新規クラス VIII について  
阿部 歩、浅野行蔵、曾根輝雄 (北大院農・応用菌学)
- P-26** *Aspergillus nidulans* における *pkcA* 遺伝子の機能解析  
内田博教、一宮維幸、堀内裕之、太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- P-27** 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 のドメイン互換性の解析  
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-28** *Aspergillus nidulans* における cell wall integrity 経路の解析と MAP kinase 遺伝子 *mpkB* の機能解析  
吉見啓<sup>1</sup>、藤岡智則<sup>2,3</sup>、丸井焯一郎<sup>1</sup>、萩原大祐<sup>1</sup>、佐藤奈津子<sup>2</sup>、水谷治<sup>2,4</sup>、古川健太郎<sup>2,5</sup>、阿部敬悦<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>東北大・未来研、<sup>2</sup>東北大院農・応生科、<sup>3</sup>現・クミアイ化学工業(株)、<sup>4</sup>現・酒類研、<sup>5</sup>現・ヨーテボリ大)
- P-29** 糸状菌 *A. nidulans* の速い先端成長を支える分子機構の研究  
<sup>1</sup>堀尾哲也、<sup>2</sup>紅 朋浩、<sup>3</sup>Naimeh Taheri-Talesh、<sup>3</sup>Berl R. Oakley (<sup>1</sup>徳島大院・ヘルスバイオ、<sup>2</sup>名古屋大院医系・分子標的、<sup>3</sup>オハイオ州立大・分子遺伝)
- P-30** エノキタケがセルロース培養系において生産するグリコシダーゼに関する研究  
石黒真希、五十嵐圭日子、鮫島正浩 (東大・農生科)
- P-31** 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来 Cel6A の反応特性  
五十嵐圭日子、石田卓也、和田昌久、鮫島正浩 (東大院・農生科)
- P-32** シイタケの子実体形成に特異的な新規ファスシンクリン遺伝子 *Le.flp1*  
宮崎安将<sup>1</sup>、金子真也<sup>2</sup>、砂川政英<sup>1</sup>、山崎丘<sup>2,3</sup>、宍戸和夫<sup>2</sup>、中村雅哉<sup>1</sup>、馬場崎勝彦<sup>1</sup> (<sup>1</sup>森林総研、<sup>2</sup>東工大院生命、<sup>3</sup>現・JAXA)
- P-33** 担子菌 *Coprinus cinereus* 由来糖質加水分解酵素ファミリー 6 遺伝子の発現挙動  
吉田 誠、福田清春 (農工大・農)
- P-34** シイタケにおけるリグニン分解酵素の解析  
坂本裕一・中出啓子・佐藤利次 (岩手生工研)
- P-35** 竹バイオマス分解過程において担子菌が生産する菌体外タンパク質の解析  
堀 千明、五十嵐圭日子、鮫島正浩 (東大院・農生科)

- P-36** 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来ピラノース酸化酵素のクローニングと大腸菌による生産  
 福田 明, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)
- P-37** バイオエタノール固体発酵に供する麹菌固体培養でのバイオマス分解酵素の大量生産  
 坂東弘樹, 久田博元, 石田博樹, 秦洋二 (月桂冠・総研)
- P-38** バイオマスのグルコース変換を目指した麹菌液体培養でのセルロース分解酵素の大量生産  
 久田博元<sup>1</sup>, 長谷山陽平<sup>1</sup>, 石田博樹<sup>1</sup>, 秦洋二<sup>1</sup>, 近藤昭彦<sup>2</sup> (<sup>1</sup>月桂冠・総研, <sup>2</sup>神戸大工・応化)
- P-39** *Trichoderma reesei* の転写活性化因子 Xyr1 の機能解析  
 北上巨樹, Taki Koffi Alphonse, 古川隆紀, 志田洋介, 小笠原 渉, 岡田宏文, 森川 康 (長岡技科大・生物)
- P-40** *Trichoderma reesei* 由来 Xylanase regulator 1 (Xyr1) の結合配列の解析  
 古川隆紀<sup>1</sup>, 志田洋介<sup>1</sup>, 小笠原 渉<sup>1</sup>, 岡田宏文<sup>1</sup>, 加藤雅士<sup>2</sup>, 小林哲夫<sup>2</sup>, 森川 康<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>長岡技科大・生物, <sup>2</sup>名大院・生命農)
- P-41** *Trichoderma reesei* の固体培養条件下での糖質加水分解酵素遺伝子の発現解析  
 齋藤勇司, 関口裕久, 小笠原 渉, 岡田宏文, 森川 康 (長岡技科大・生物)
- P-42** セルラーゼ高生産麹菌を用いた結晶性セルロースの分解  
 中井喬彦<sup>1</sup>, 有岡学<sup>1</sup>, 川口剛司<sup>2</sup>, 荒井基夫<sup>3</sup>, 北本勝ひこ<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>阪府大院・生環科, <sup>3</sup>中部大・応生)
- P-43** *Trichoderma reesei* 由来 3 種エンドグルカナーゼの酵素学的性質  
 中澤 光, 岡田和士, 小林遼太, 小野寺朋子, 窪田哲也, 小笠原 渉, 岡田宏文, 森川 康  
 (長岡技科大・生物系)
- P-44** *Aspergillus oryzae* における AoXlnR 類似転写因子の機能同定  
 金田貴詳, 海附玄龍\*, 野口祐二, 金丸京子, 加藤雅士, 小山泰二\*, 小林哲夫  
 (名大院生命農・生物機構, \*野田産研)
- P-45** *Aspergillus japonicus* が産生する細胞外  $\beta$ -キシロシダーゼをコードする遺伝子の構造解析  
 吉原浩司<sup>1</sup>, 脇山元気<sup>1</sup>, 林 幸男<sup>1</sup>, 太田一良<sup>2</sup> (<sup>1</sup>宮崎大・工・物質環境, <sup>2</sup>宮崎大・農・応生科)
- P-46** *Aspergillus japonicus* には 2 種類の糖質加水分解酵素ファミリー11 キシラナーゼ遺伝子が存在する  
 脇山元気<sup>1</sup>, 吉原浩司<sup>1</sup>, 林 幸男<sup>1</sup>, 太田一良<sup>2</sup> (<sup>1</sup>宮崎大・工・物質環境, <sup>2</sup>宮崎大・農・応生科)

- P-47** 糸状菌を用いたヤマイモ由来キチナーゼ E の発現  
太田康司, 西北広信, 池 正和, 小笠原 渉, 岡田宏文, 森川 康 (長岡技科大・生物)
- P-48** 麹菌ポストゲノム解析を支援する *Aspergillus nidulans* 発現用プラスミドの構築  
石田博樹<sup>1</sup>、 秦洋二<sup>1</sup>、 楠本憲一<sup>2</sup>、 山形洋平<sup>3</sup>、 小出芳直<sup>4</sup>、 竹内道雄<sup>5</sup> (<sup>1</sup>月桂冠・総研、<sup>2</sup>食総研、<sup>3</sup>東北大院農・応生科、<sup>4</sup>天野エンザイム・研究部、<sup>5</sup>東京農工大院・応生科)
- P-49** *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, 金政真<sup>1</sup>, 荒井基夫<sup>1</sup>, 川口剛司 (阪府大院・生命・応生科,<sup>1</sup>中部大・応生)
- P-50** *Aspergillus aculeatus ku80* 遺伝子破壊による高頻度相同組換え宿主の開発  
辻篤史, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院生命・応生科)
- P-51** *Aspergillus aculeatus* における *pyrG*, *sC*, *niaD* 三重欠損株の作出  
國武絵美, 足立浩美, 谷修治, 炭谷順一, 荒井基夫<sup>1</sup>, 川口剛司 (阪府大院生命・応生科,<sup>1</sup>中部大応生・環境生化)
- P-52** 麹菌(*Aspergillus oryzae*)NS4 株における *niaD* 及び *sC* 遺伝子変異部位の同定  
山田 修, 林 梨咲, 池田涼子, 坂本和俊, 岩下和裕, 三上重明 (酒総研)
- P-53** 麹菌のプロリルアミノペプチダーゼ様遺伝子産物の組換え麹菌による生産と蛋白質の性質  
松下真由美<sup>1</sup>、楠本憲一<sup>1</sup>、古川育代<sup>1</sup>、鈴木 聡<sup>1</sup>、小出芳直<sup>2</sup>、石田博樹<sup>3</sup>、山形洋平<sup>4</sup>、竹内道雄<sup>5</sup>、柏木豊<sup>1</sup> (<sup>1</sup>食総研、<sup>2</sup>天野エンザイム、<sup>3</sup>月桂冠、<sup>4</sup>東北大・院・応生科、<sup>5</sup>東京農工大・院・応生科)
- P-54** 麹菌 *A. oryzae* による異種タンパク質生産に及ぼす  $\alpha$ -amylase 発現抑制の効果  
根本崇, 丸山潤一, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-55** 麹菌 *Aspergillus oryzae* による cellobiose phosphorylase の分泌生産の検討  
多田功生, 熊谷明夫<sup>1</sup>, 鈴木 聡, 楠本憲一, 天野良彦<sup>1</sup>, 佐々木 堯, 柏木豊 (食総研,<sup>1</sup>信州大院・工)
- P-56** アラキドン酸生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 における新規選択薬剤の探索及びマーカー遺伝子の評価  
安藤晃規, 櫻谷英治, 小川 順, 清水 昌 (京大院農・応用生命)
- P-57** DNA リガーゼ遺伝子破壊による *Cryptococcus neoformans* 相同組換え効率への影響  
清水公德, 李皓曼, 渡辺哲, 亀井克彦, 山口正視, 川本進 (千葉大・真菌センター)
- P-58** Production of *Aspergillus fumigatus* swollenin in *A. oryzae*  
Xinai CHEN, Jun-ichi MARUYAMA, Manabu ARIOKA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

- P-59** FTA 簡易ゲノム抽出法を用いた PCR-TTGE による味噌中の真菌叢の解析  
鈴木 聡, 福岡真里, 竹谷博子, 松下真由美, 多田功生, 楠本憲一, 柏木豊 (食総研)
- P-60** 液面固定化 (LSI) システムによる麹菌酵素の生産性について  
高木義弘, 小田 忍\*, 尾関健二, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研, \*メルシャン・生資研)
- P-61** 麹菌 *A. oryzae* のプロテアーゼ遺伝子発現解析と *nptB* 破壊株によるヒトリゾチーム生産  
木村信弥<sup>1</sup>, 丸山潤一<sup>1</sup>, 竹内道雄<sup>2</sup>, 北本勝ひこ<sup>1</sup> (東大院・農生科・応生工<sup>1</sup>, 東農工大・農・応生科<sup>2</sup>)
- P-62** 麹菌 *A. oryzae* における異種タンパク質生産時のマイクロアレイ解析  
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-63** 麹菌菌体内タンパク質解析条件の再検討  
北川治恵, 佐野元昭, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)
- P-64** 米ヌカ培地で高発現する  $\beta$ -グルコシダーゼの生産条件の比較  
尾関健二, 中川浩志, 近藤花菜, 加治木佑紀子, 篠島里江, 佐野元昭, 小田 忍\*, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研 \*メルシャン・生資研)
- P-65** 麹菌 *A. oryzae* の細胞質型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の性質と機能  
高谷康平, 北本勝ひこ, 有岡学 (東大院・農生科・応生工)
- P-66** ゲノム情報に基づく麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来プロテアーゼ群の発現  
片瀬 徹<sup>1</sup>, 星由紀子<sup>1</sup>, 結城健介<sup>1</sup>, 小出芳直<sup>1</sup>, 竹内道雄<sup>2</sup>, 山形洋平<sup>3</sup>, 楠本憲一<sup>4</sup>, 石田博樹<sup>5</sup>  
(<sup>1</sup>天野エンザイム,<sup>2</sup>東京農工大院・応生科,<sup>3</sup>東北大学・院・応生科,<sup>4</sup>食総研,<sup>5</sup>月桂冠・総研)
- P-67** 液体培養とフィルター培養における麹菌 *Aspergillus oryzae* の熱応答比較解析  
寺林靖宣<sup>1</sup>, 山根倫子<sup>1</sup>, 佐野元昭<sup>2</sup>, 小池英明<sup>1</sup>, 大箸信一<sup>2</sup>, 町田雅之<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>産総研,<sup>2</sup>金沢工大)
- P-68** 黄麹菌菌蓋のプロテオーム解析  
神太郎, 竹内道雄 (農工大院・応生化)
- P-69** 麹菌 *Aspergillus oryzae* の胞子形成制御系の解析  
小川真弘, 徳岡昌文, 金鋒杰, 松島健一朗, 高橋理, 町田雅之<sup>a</sup>, 小山泰二 (野田産研, <sup>a</sup>産総研)
- P-70** 麹菌の培養条件に応答したアミノ酸代謝制御の解析  
小池英明<sup>1</sup>, 寺林靖宣<sup>1</sup>, 山根倫子<sup>1</sup>, 佐野元昭<sup>2</sup>, 大箸信一<sup>2</sup>, 町田雅之<sup>1,2</sup> (1産総研セルエンジニア、2金沢工大)
- P-71** 麹菌の薬剤に対する転写応答解析と創薬標的遺伝子機能解析システムの構築  
丸井淳一郎<sup>1</sup>, 吉見 啓<sup>1</sup>, 玉野孝一<sup>2</sup>, 小池英明<sup>2</sup>, 織田 健<sup>3</sup>, 佐野元昭<sup>3</sup>, 町田雅之<sup>2</sup>, 阿部敬悦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東北大・未来研,<sup>2</sup>産総研,<sup>3</sup>金沢工大・ゲノム研)

- P-72** 麴菌の酸化ストレス条件下における遺伝子発現と転写制御因子 *kapA* についての解析  
 小竹学<sup>1,2</sup>, 坂本和俊<sup>2</sup>, 岩下和裕<sup>1,2</sup>, 山田 修<sup>2</sup>, 下飯仁<sup>1,2</sup>, 三上重明<sup>2</sup> (<sup>1</sup>広島大・先端研, <sup>2</sup>酒  
 総研)
- P-73** *Neurospora crassa* の OS-2 MAP キナーゼは体内時計により制御される遺伝子の調節に関与す  
 る  
 渡邊節子、高橋正和、山下和宏、坂野真平、福森文康、藤村真 (東洋大・生命)
- P-74** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の His-Asp リン酸リレー系における農薬応答機構の解析  
 萩原大祐<sup>1</sup>、水野猛<sup>2</sup>、阿部敬悦<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東北大・未来研、<sup>2</sup>名大院・生命農学)
- P-75** *Aspergillus nidulans* ヒスチジンキナーゼ *NikA* の機能解析  
 鈴木麻子, 金丸京子, 松林良博, 高見絵里香, 萩原大祐, 水野猛, 加藤雅士, 小林哲夫 (名大院生  
 命農・生物機構)
- P-76** 浸透圧アダプテーションにおける麴菌の遺伝子発現解析  
 西浦未華<sup>1,2</sup>、坂本和俊<sup>2</sup>、山田 修<sup>2</sup>、岩下和裕<sup>1,2</sup>、三上重明<sup>2</sup>(<sup>1</sup>広島大、<sup>2</sup>酒総研)
- P-77** アカパンカビの転写調節因子 ATF-1 は CRE 配列を認識してカタラーゼ *cat-1* を制御する  
 山下和宏、渡邊節子、塩澤あずさ、福森文康、藤村真 (東洋大・生命)
- P-78** 麴菌 *A. oryzae* における *Aof1bA* 遺伝子破壊株の表現型解析  
 山口悠, 丸山潤一、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-79** NsdD type GATA factor in *Aspergillus fumigatus*  
 Yoon-Hee Cheon, <sup>1</sup>Hye-Ryun Kim, Jong Hwa Kim, <sup>1</sup>Dong-Min Han and Kap-Hoon Han (Dept of Pharm.  
 Engineering, Woosuk Univ.)
- P-80** 糸状菌 CCAAT-box 結合因子によるリボソームタンパク質遺伝子の発現抑制機構  
 高橋明珠, 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-81** 糸状菌 CCAAT 結合因子サブユニットの発現・局在性プロファイル  
 伊奈慎太郎, 小林哲夫, 加藤雅士 (名大院・生命農)
- P-82** 麴菌 *A. oryzae* の *MAL* クラスターの初期アミラーゼ系酵素生産への関与  
 長谷川祥子, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-83** 麴菌(*Aspergillus oryzae*)DNA トランスポゾン *Crawler* の転移活性と mRNA 分子種変動に及ぼ  
 すストレス処理の影響  
 小笠原博信<sup>1</sup>、小畑 浩<sup>2</sup>、秦洋二<sup>2</sup>、高橋砂織<sup>1</sup>、五味勝也<sup>3</sup>  
 (<sup>1</sup>秋田県農技セ・総食研、<sup>2</sup>月桂冠・総研、<sup>3</sup>東北大院農・生物産業創成)

- P-84** 麹菌 *Aspergillus oryzae* の転写制御関連遺伝子の破壊と機能解析  
 戸田智美<sup>1</sup>, 砂川美佐緒<sup>1</sup>, 大澤靖子<sup>1</sup>, 小川真弘<sup>2</sup>, 徳岡昌文<sup>2</sup>, 高橋 理<sup>2</sup>, 小山泰二<sup>2</sup>, 町田雅之<sup>1</sup> (<sup>1</sup>産総研,<sup>2</sup>野田産研)
- P-85** 麹菌の低分子金属プロテアーゼ群の解析  
 山形洋平<sup>1</sup>, 前田浩<sup>1</sup>, 阿部敬悦<sup>1</sup>, 内田隆史<sup>1</sup>, 竹内道雄<sup>2</sup>, 楠本憲一<sup>3</sup>, 小出芳直<sup>4</sup>, 片瀬徹<sup>1,4</sup>, 石田博樹<sup>5</sup> (<sup>1</sup>東北大学・院・応生科, <sup>2</sup>農工大・院・生物工学, <sup>3</sup>食総研, <sup>4</sup>天野エンザイム, <sup>5</sup>月桂冠)
- P-86** 麹菌機能未知 APase の解析  
 岡本綾子<sup>1</sup>, 森田寛人<sup>1</sup>, 山形洋平<sup>2</sup>, 楠本憲一<sup>3</sup>, 小出芳直<sup>4</sup>, 石田博樹<sup>5</sup>, 竹内道雄<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京農工大学院・応生科, <sup>2</sup>東北大院農・応生科, <sup>3</sup>食総研, <sup>4</sup>天野エンザイム・研究部, <sup>5</sup>月桂冠・総研)
- P-87** 麹菌の新規アミノペプチダーゼ様遺伝子がコードする蛋白質の精製と性質  
 楠本憲一<sup>1</sup>, 松下真由美<sup>1</sup>, 古川育代<sup>1</sup>, 鈴木 聡<sup>1</sup>, 小出芳直<sup>2</sup>, 石田博樹<sup>3</sup>, 山形洋平<sup>4</sup>, 竹内道雄<sup>5</sup>, 柏木豊<sup>1</sup> (<sup>1</sup>食総研, <sup>2</sup>天野エンザイム, <sup>3</sup>月桂冠, <sup>4</sup>東北大・院・応生科, <sup>5</sup>東京農工大・院・応生科)
- P-88** 麹菌セリントタイプカルボキシペプチダーゼの解析  
 森田寛人<sup>1</sup>, 岡本綾子<sup>1</sup>, 山形洋平<sup>2</sup>, 楠本憲一<sup>3</sup>, 小出芳直<sup>4</sup>, 石田博樹<sup>5</sup>, 竹内道雄<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京農工大院・応生科, <sup>2</sup>東北大院農・応生科, <sup>3</sup>食総研, <sup>4</sup>天野エンザイム・研究部, <sup>5</sup>月桂冠・総研)
- P-89** シクロピアゾン酸生合成に関わる PKS/NRPS ハイブリッド型酵素の機能解析  
 勢ヶ康代<sup>1</sup>, 北本勝ひこ<sup>2</sup>, 海老塚豊<sup>3</sup>, 藤井勲<sup>1</sup> (<sup>1</sup>岩手医大・薬, <sup>2</sup>東大院・農生科・応生工, <sup>3</sup>東大院・薬)
- P-90** 糸状菌由来メロテルペノイド化合物生合成に関与するポリケタイド合成酵素及びプレニル基転移酵素の機能解析  
 伊藤崇敬<sup>1</sup>, 勢ヶ康代<sup>2</sup>, 藤井勲<sup>2</sup>, 久城哲夫<sup>1</sup>, 海老塚豊<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東大院・薬, <sup>2</sup>岩手医大・薬)
- P-91** 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, 海老塚 豊 (東大院・薬), 藤井 勲 (岩手医大・薬)
- P-92** 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<sup>1</sup>, 勢ヶ康代<sup>2</sup>, 北本勝ひこ<sup>3</sup>, 藤井勲<sup>2</sup>, 海老塚豊<sup>1</sup>  
 (東大院・薬<sup>1</sup>, 岩手医大・薬<sup>2</sup>, 東大院・農生科・応生工<sup>3</sup>)
- P-93** 麹菌のシクロピアゾン酸生産性に関する研究  
 徳岡昌文<sup>1</sup>, 高橋理<sup>1</sup>, 勢ヶ康代<sup>2</sup>, 藤井勲<sup>2</sup>, 北本勝ひこ<sup>3</sup>, 小山泰二<sup>1</sup> (<sup>1</sup>野田産研, <sup>2</sup>岩手医大・薬, <sup>3</sup>東大院・農生科)

- P-94** タイ王国薬用植物からの生理活性物質生産糸状菌のスクリーニング  
木下浩<sup>1</sup>, Kanoktip Pansukusan<sup>1</sup>, 木谷茂<sup>1</sup>, 五十嵐康弘<sup>2</sup>, 仁平卓也<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>阪大・生物工学国際交流セ, <sup>2</sup>富山県大・工・生工)
- P-95** 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<sup>1</sup>, 藤井 勲<sup>2</sup>, 海老塚 豊<sup>1</sup> (東大院・薬<sup>1</sup>, 岩手医大・薬<sup>2</sup>)
- P-96** ヘルボール酸生合成に関与する糸状菌由来オキシドスクアレン閉環酵素の機能解析  
三ツ口尚志<sup>1</sup>, 勢ノ康代<sup>2</sup>, 藤井勲<sup>2</sup>, 渋谷雅明<sup>1</sup>, 久城哲夫<sup>1</sup>, 海老塚豊<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東大院・薬、<sup>2</sup>岩手医大・薬)
- P-97** 麹菌 *LaeA* は、コウジ酸生産に影響を及ぼす  
織田 健、佐野元昭、小林亜紀子、\*久田博元、\*石田博樹、\*秦洋二、大箸信一  
(金沢工大・ゲノム研、\*月桂冠・総研)
- P-98** *Aspergillus nidulans* の亜硝酸耐性に関わる遺伝子の単離と解析  
鳴神寿昭, 行木弥鈴, 榎尾俊介, 星野貴行, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)
- P-99** *Fusarium oxysporum* の硫黄還元機構  
佐藤育男, 安部剛史, 星野貴行, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

## Special Lecture I

### **The LaeA complex regulates development, secondary metabolism and virulence in *Aspergillus* spp.**

Nancy Keller, Departments of Plant Pathology and Medical Microbiology and Immunology, University of Wisconsin, Madison, USA

Abstract.

LaeA is a nuclear methyltransferase that transcriptionally regulates secondary metabolite gene clusters in the filamentous fungal genus *Aspergillus*. Deletion of this gene reduces virulence in both the human pathogen *A. fumigatus* and the plant pathogen *A. flavus*. Loss of virulence is attributed in part by diminishment of toxin production in  $\Delta laeA$  mutants. A whole genome comparison of the transcriptional profile of wild-type and *laeA* mutants (both  $\Delta laeA$  and overexpression *laeA*) of three different *Aspergillus* spp. indicates a global role of LaeA in activating secondary metabolite gene clusters. LaeA also is involved in the production of overwintering tissues including cleistothecial production in *A. nidulans* and sclerotial production in *A. flavus*. Detailed studies of LaeA in the genetic model *A. nidulans* indicates a novel mode of gene regulation by LaeA through chromatin remodeling where loss of *laeA* results in increased heterochromatin formation and toxin gene cluster silencing. LaeA function requires formation of a nuclear complex with VeA-like proteins. A model of LaeA involvement in epigenetic regulation of secondary metabolite gene clusters will be presented.



## Special Lecture II

### The Mechanism of Woronin body biogenesis

Gregory Jedd, Temasek Life Sciences Laboratory & Department of Biological Sciences, 1 Research Link, The National University of Singapore, Singapore 117604

Hyphae are the predominant mode of cellular organization in the fungi and in most species these filamentous cells are compartmentalized by perforate septa, which allow intercellular cooperation and communication. Woronin bodies are peroxisome-related organelles unique to Euscomycetous filamentous fungi, where they function to seal the septal pore in response to cellular wounding [1, 2]. This organelle is centered on a Euscomycete-specific protein, HEX, which utilizes a peroxisome targeting signal-1 (PTS1) for localization to the peroxisome matrix [3] where it self-assembles to produce a solid micrometer-scale protein assembly [3, 4]. In *hex* deletion mutants [3, 5-7] or *hex* mutants that disrupt self-assembly [4], hyphae bleed protoplasm following cellular wounding and display a variety of secondary defects including impaired invasive growth of the plant pathogen *Magnaporthe grisea* [6]. Thus, Woronin bodies provide an important adaptive function that supports the unique cellular architecture of Euscomycetes.

Woronin body biogenesis is believed to involve a multi-step process where HEX assemblies bud from the peroxisome matrix in apical compartments and subsequently associate with the cell cortex in a manner that roughly coincides with septation [8, 9]. Cortical association retains Woronin bodies in sub-apical compartments, and this process constitutes a form of organelle inheritance, which ensures that all hyphal compartments contain a complement of Woronin bodies. Structures where Woronin body cores appear to be budding from the peroxisome matrix have also been observed by thin-section electron microscopy [10], suggesting that protein sorting underlies the biogenesis of these organelles.

We employed a forward genetic screen to isolate mutants defective in Woronin body formation and function. This screen identified a large number of *Neurospora* peroxins. In addition, we identified *wsc* (Woronin sorting complex), a membrane protein specifically associated with Woronin body biogenesis. In *wsc* mutant hyphae, HEX assemblies accumulate to high levels in the apical compartment and fail to segregate into sub-apical compartments. Video microscopy further shows that these assemblies fail to bud from the peroxisome and instead move randomly in the peroxisomal matrix. *wsc* was identified by positional cloning and encodes a novel membrane protein. WSC is localized to the membrane of unusually large peroxisomes where it forms detergent-resistant oligomers that envelop HEX assemblies to produce asymmetric nascent Woronin bodies. These structures are delivered to the cell cortex in a reaction that also requires WSC and this permits partitioning and inheritance of the newly formed Woronin body organelle. Together, our findings suggest that WSC and HEX collaborate and control distinct aspects of Woronin body biogenesis; cortical association depends critically on the assembly of WSC, which in turn depends on HEX. This dependency helps order events across the organellar membrane and permits the peroxisome to produce a second organelle with a distinct composition and intracellular distribution.

1. Trinci, A.P.J. and A.J. Collinge, *Occlusion of Septal Pores of Damaged Hyphae of Neurospora crassa by Hexagonal Crystals*. Protoplasma, 1973. **80**(1-3): p. 57-67.
2. Markham, P. and A.J. Collinge, *Woronin Bodies of Filamentous Fungi*. Fems Microbiology Reviews, 1987. **46**(1): p. 1-11.
3. Jedd, G. and N.H. Chua, *A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(4): p. 226-231.
4. Yuan, P., et al., *A HEX-1 crystal lattice required for Woronin body function in Neurospora crassa*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(4): p. 264-270.
5. Tenney, K., et al., *hex-1, a gene unique to filamentous fungi, encodes the major protein of the Woronin body and*

- functions as a plug for septal pores.* Fungal Genet & Biol, 2000. **31**(3): p. 205-217.
6. Soundararajan, S., et al., *Woronin Body Function in Magnaporthe grisea Is Essential for Efficient Pathogenesis and for Survival during Nitrogen Starvation Stress.* Plant Cell, 2004. **16**(6): p. 1564-74.
  7. Maruyama, J., et al., *Three-dimensional image analysis of plugging at the septal pore by Woronin body during hypotonic shock inducing hyphal tip bursting in the filamentous fungus Aspergillus oryzae.* Biochem Biophys Res Commun., 2005. **331**(4): p. 1081-8.
  8. Momany, M., et al., *Mapping Woronin body position in Aspergillus nidulans.* Mycologia, 2002. **94**(2): p. 260-266.
  9. Tey, W.K., et al., *Polarized gene expression determines Woronin body formation at the leading edge of the fungal colony.* Mol. Biol. Cell, 2005. **16**: p. 2651-2659.
  10. Wergin, W.P., *Development of Woronin bodies from microbodies in Fusarium oxysporum f.sp lycopersici.* Protoplasma, 1973. **76**: p. 249-260.

## 麹菌における隔壁孔を介した細胞間コミュニケーション

丸山潤一（東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻）

### 【はじめに】

麹菌 *Aspergillus oryzae* は古くから日本酒、醤油、味噌の醸造に用いられ、その歴史は約千年にわたる。現在では、アミラーゼなどの酵素生産や異種タンパク質生産の宿主としても用いられている。

*A. oryzae* の菌糸では多数の細長い細胞が連なっており、隣接する細胞は隔壁で仕切られる。隔壁の中心には隔壁孔と呼ばれる小さな穴が空いている。演者らは以前、*A. oryzae* を寒天培地に生育させ、コロニーに水をかけて低浸透圧ショックを与えると、菌糸先端から細胞内容物が噴き出して溶菌する現象を見出した<sup>1)</sup>。溶菌した先端細胞に隣接する細胞を観察すると、溶菌が伝播しておらず、細胞内容物が維持されていた。さらに培養を続けると、この細胞から溶菌した先端細胞内に菌糸内菌糸が形成された<sup>2)</sup>。以上のことから、通常の生育時は隣接する細胞どうしが隔壁孔を通じて連絡しあい、溶菌時にはなんらかの細胞内構造が隔壁孔をふさいで生存を維持するシステムが存在することが推測された。

日本酒醸造の麹造りでは固体培養で麹菌を生育させるが、もろみを仕込む際に麹菌は水の中に投入される。このことは、低浸透圧ショックによる溶菌が、醸造の現場でも起きることを意味している。本講演では、*A. oryzae* の隔壁孔を介した細胞間コミュニケーションに関する、我々のこれまでの知見を紹介する。

### 【Woronin body の可視化】

Woronin body は子囊菌類糸状菌および類縁の不完全菌類糸状菌に特異的に存在するオルガネラである。このオルガネラは隔壁近傍に観察され、菌糸損傷時には隔壁孔をふさぐことで溶菌の伝播を防ぐ役割をもつ。ロシアの生物学者 Woronin による発見(1864年)から140年あまり経過しているが、その分子レベルでの解析は最近までまったく進んでいなかった。2000年に Jedd 博士により、アカパンカビ *Neurospora crassa* から Woronin body を構成するタンパク質 Hex1 が初めて同定された<sup>3)</sup>。*A. oryzae* のゲノム配列にも *hex1* 相同遺伝子(*Aohex1*)が存在したことから、これをクローニングして Woronin body の動態の可視化を試みた<sup>1)</sup>。Woronin body は赤色蛍光タンパク質 DsRed2 を AoHex1 に融合することで、また隔壁は分泌酵素 RNase T1 に緑色蛍光タンパク質 EGFP を融合したタンパク質を発現させることで可視化した。寒天培地上に生育させたコロニーに低浸透圧ショックを与え、溶菌した細胞に隣接する隔壁を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、Woronin body が隔壁孔をふさぐ様子を、生きている細胞で可視化することに成功した。したがって、低浸透圧ショックによる溶菌において Woronin body が溶菌の伝播を防ぐ機能を有していることが示唆された。

### 【AoHex1 タンパク質の機能解析】

透過型電子顕微鏡観察下では、*N. crassa* の Woronin body は六角形をしているが、*A. oryzae* は球状の形態として観察される。*Aohex1* 遺伝子の破壊株を取得し、透過型電子顕微鏡で観察すると、Woronin body が消失した<sup>1,4)</sup>。低浸透圧ショックによって先端細胞の溶菌を誘導した結果、*Aohex1* 遺伝子破壊株では隣接する細胞にも溶菌の伝播が認められた。以上の結果より、AoHex1 タンパク質が Woronin body の形成および機能に必要であることを明らかにした。また、*Aohex1* 遺伝子破壊株は細胞壁に作用する薬剤 Congo red および micafungin に対して感受性を示した<sup>5)</sup>。

*Aohex1* 遺伝子は、選択的スプライシングにより2つの異なる遺伝子産物を発現する<sup>1)</sup>。一方で、*N. crassa hex1* 遺伝子において選択的スプライシングは起こらない。非スプライシング型 AoHex1 タンパク質は、スプライシング型 AoHex1 に50アミノ酸が挿入されたかたちで発現する。選択的スプライシングの意義を調べるため、スプライシング型または非スプライシング型 AoHex1 を

*Aohex1* 遺伝子破壊株で発現する株を作製した。そして、低浸透圧ショックで隣接する細胞に溶菌が伝播するかどうかを指標に相補解析を行った。この結果、スプライシング型発現株では破壊株の表現型が相補されたが、非スプライシング型発現株では相補が認められなかった<sup>6)</sup>。

Hex1 タンパク質はペルオキシソーム局在配列 PTS1 (Peroxisome Targeting Signal 1)を有することから、これまでに Woronin body 形成へのペルオキシソームの関与が指摘されている。現在、ペルオキシソームの形成に関与する *Aopex* 遺伝子の破壊をすることで、Woronin body の形成過程への影響を調べている<sup>7,8)</sup>。また演者らは、*in vitro* で AoHex1 が protein kinase C (PKC)によりリン酸化されること、PKC 阻害剤存在下では AoHex1 の局在が異常になることを明らかにした<sup>9)</sup>。

#### 【AoSO タンパク質の局在解析】

最近、海外の2つのグループが隔壁孔に局在するタンパク質を報告している。*N. crassa* SO は菌糸融合に必要なタンパク質であり、細胞質に局在し、溶菌時に隔壁孔に蓄積する<sup>10)</sup>。*Sordaria macrospora* の有性生殖に関与する Pro40 は SO に相同なタンパク質であるが、Woronin body と共局在し、溶菌時に隔壁孔に観察される<sup>11)</sup>。我々は、*A. oryzae* のゲノム配列より SO/Pro40 をコードする遺伝子と相同性を示す遺伝子を見出し、*Aoso* と命名した。EGFP との融合によって局在解析を行った結果、AoSO は細胞質に観察されたが、様々なストレス条件（高温、低温、高 pH、低 pH、炭素源枯渇、窒素源枯渇）で隔壁孔に局在することがわかった<sup>12)</sup>。このことから、生育環境によって AoSO が細胞間連絡を制御している可能性が示唆された。現在、*Aoso* 遺伝子の破壊株を取得して表現型を解析している。

#### 【おわりに】

これまでに演者らは、多細胞真核生物としての麹菌の姿に焦点を当てて研究を行ってきた。麹菌の隔壁を介した細胞間連絡は、動物のギャップ結合や植物の原形質連絡のような、多細胞生物の恒常性を維持するための共通の機構と考えられる。今後、細胞間連絡に関するさらなる解析により、醸造や酵素生産における麹菌の生育特性の理解が深まることを期待したい。

- 1) J. Maruyama *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 1081-1088 (2005)
- 2) J. Maruyama *et al.* *Fungal Genet. Biol.* **43**, 642-654 (2006)
- 3) G. Jedd and N. H. Chua *Nat. Cell Biol.* **2**, 226-231 (2000)
- 4) 内田博教ら、日本農芸化学会 2006 年度大会要旨集 p. 98
- 5) 丸山潤一ら、日本農芸化学会 2007 年度大会要旨集 p. 31
- 6) 岩崎健太郎ら、日本農芸化学会 2007 年度大会要旨集 p. 31
- 7) P. R. JUVVADI ら、日本生物工学会 2007 年度大会要旨集 p. 127
- 8) 田鍋康子ら、2007 年糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集
- 9) P. R. Juvvadi *et al.* *Biochem. J.* **405**, 533-540 (2007)
- 10) A. Fleissner and N. L. Glass *Eukaryot. Cell* **6**, 84-94 (2007)
- 11) I. Engh *et al.*, *Eukaryot. Cell* **6**, 831-843 (2007)
- 12) C. Escaño ら、日本農芸化学会 2007 年度大会要旨集 p. 31

**Intercellular communication through the septal pore in *Aspergillus oryzae***  
Jun-ichi MARUYAMA, Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo

## S-1-2

# O-グリコシレーションによって制御される糸状菌の正常な形態形成

後藤正利 (九州大学大学院農学研究院 生物機能科学部門)

はじめに

麹菌はその安全性と優れた酵素生産性を示すことから、我が国で盛んに使用されている重要な微生物であり、外来遺伝子の発現分泌宿主菌としても注目を浴びている。真核生物の菌体外へのタンパク質分泌には小胞体、ゴルジ体を経由する過程が必須であり、この過程でタンパク質は糖鎖修飾される。糖鎖修飾にはN-結合型とO-結合型が存在する。前者では酵母菌からヒトに至るまで基本的な部分で多くの共通点が認められるが、タンパク質のSer/Thr残基中の水酸基に糖が結合したO-グリコシレーションでは、N-グリコシレーションのような明確な糖鎖結合アミノ酸モチーフは認められない。また、由来生物種によって構成糖やその結合様式が極めて多様である。本講では、*Aspergillus nidulans* のO-グリコシレーションの役割としての形態維持に関する話題を紹介したい。

### 1. 糸状菌のO-グリコシレーション

真菌類のO-結合型糖鎖は、出芽酵母では直鎖状で1-5残基からなるマンノース鎖、*Aspergillus* 属糸状菌では1-3残基からなる直鎖状及び分岐したマンノース鎖や、量比は低いがガラクトースやグルコースも構成糖として含む。*A. nidulans* のO-結合型糖鎖合成酵素群には、その初発反応であるタンパク質Ser/Thr残基へのマンノースの転移反応を触媒するprotein: O-D-mannosyltransferase (Pmt)、さらに続く糖転移反応を触媒するα-mannosyltransferase (Mnt) 及びgalactosyltransferase (Gct) が含まれる。*A. nidulans* には少なくとも3種のpmt遺伝子(pmtA、pmtB、pmtC)、3種のmnt (mntA、mntB、mntC)、2種のgctと推定される遺伝子が存在する。

### 2. pmt 破壊株の表現型

pmt 遺伝子はいずれも菌の生育にともなって一定量発現していることから、糸状菌の生育に重要であることが示唆される。*A. nidulans* の各pmt破壊株を構築し、O-グリコシレーションの部分的欠損による形態への影響について調べた。pmtA破壊株では、親株に比べ、特に低浸透圧培地において菌糸伸長能及び分生子形成能が著しく低下する。菌糸は所々にその中程が膨らむ異常構造を形成する。高浸透圧培地では菌糸伸長能や菌糸の異常構造が正常化する。また、pmtA破壊株は細胞壁合成阻害剤に対し高感受性となる。従って、PmtAによる糖鎖付加は細胞壁構造を正常に保つ役割がある。pmtB破壊株では、菌糸伸長には影響しないが、菌糸の分岐度が増す。pmtC破壊株は、親株に比べコロニー形成が著しく遅くなり、分生子形成が不能となる。pmtA破壊株と同様、高浸透圧培地でコロニー形成速度は部分的に回復するが、通常の生育条件では分生子形成は回復しない。菌糸は、全ての部位で膨らんだ構造となる。すなわち、pmtA、pmtB、pmtC破壊株の表現型は互いに異なっており、Pmtは各々分泌タンパク質に対する固有の基質特異性を持っている。pmt破壊株では、糖鎖付加されるべき分泌タンパク質がO-結合型糖鎖付加されないことで、本来の機能を発揮できなくなり、生育に負の影響を及ぼすと考えられる。このことは、わずか3残基程度の単純な糖鎖が糸状菌細胞の生育を制御維持していることを意味している。

### 3. mnt 破壊株の表現型

mntのうちmntA及びmntCは構成的に発現しているが、mntBは培養後期及びストレス条件下で発現が強く誘導されることから、これらmntの機能の相違が示唆される。mntAとmntCのそれぞれの破壊株は、互いに同一の表現型を示す。これらの破壊株のコロニーは極めて小さく、細胞は糸状ではなく丸く膨潤した異常構造となる。また、これらの破壊株はpmt破壊株よりも生育抑制の程度が大きいため、MntA、MntCがN-グリコシレーションにも関与している可能性が示唆される。一方、mntB破壊株では、高温や抗真菌薬剤に対する感受性が増しており、MntBの機能がストレス応答に関与していることが示唆される。

おわりに

出芽酵母においては、PMT の基質タンパク質として、細胞壁のストレスセンサータンパク質 Wscp や Mid2p、細胞融合に関与する Fus1p、出芽位置決定に関与する Axl2p が同定されている。*pmt* 破壊株では、これらのタンパク質は糖鎖の欠損によってプロテアーゼによる分解や不適切な局在へと導かれ、機能が失われる。一方、糸状菌では、Pmt や Mnt の基質タンパク質は同定されていない。出芽酵母 *WSC1* と相同性を示す *A. nidulans wscA* 遺伝子の破壊株は、*pmtA* 破壊株に類似した表現型を示すことから、WscA が PmtA の基質タンパク質の一つであると推定している。*A. nidulans pmt* 破壊株では、特に細胞壁や膜画分のタンパク質において、野生株に比べ特異的に消失、あるいは低分子化したタンパク質が見いだされる。これらの糖タンパク質は、菌糸の伸長や分岐を行ないながら発達し分化を行なう糸状菌の正常な形態形成に重要な機能をもっているものと考えられる。

### **Protein O-glycosylation modulates fungal morphogenesis**

Masatoshi Goto

Department of Bioscience & Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University

### S-1-3

## *Aspergillus nidulans* の隔壁形成と形態形成における各種キチン合成酵素の機能

堀内裕之（東京大学大学院農学生命科学研究科）

糸状菌の隔壁は菌糸の強度を保つ一方で一部の菌糸に起きた菌糸損傷の影響を狭い範囲にとどめる等、糸状菌が生育してゆく上で重要な役割を果たしていると考えられる。子囊菌類に属する糸状菌の隔壁は、キチン、グルカンなどの多糖を主要構成成分とし、その中央に小さな穴が存在するが知られているが、隔壁合成の分子レベルでのメカニズムについてはいまだ未解明の部分が多い。一方、糸状菌は孢子形成器官を分化させることから酵母などに比べて非常に複雑な形態形成を行う。形態形成のメカニズムを解明することは、糸状菌の産業上有用な面の分子レベルでの育種、動植物病原菌に対する抗真菌剤、農薬の開発とうに重要な情報をもたらすと考えられる。糸状菌の形態形成において細胞壁が重要な役割を持つことが明らかにされてきているが、その細胞壁の主要構成成分は子囊菌類の糸状菌においてはやはりキチンとグルカンである。これらのことから演者らのグループではキチン代謝関連酵素に注目してこれら酵素の隔壁形成、形態形成における機能解析を行っている。本講演ではこのうちキチン合成酵素について述べる。

菌類のキチン合成酵素は現在その構造から7種のクラス（クラス I～VII）に分類されており、近年の酵母、糸状菌の全ゲノム配列の解析より酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、*Candida albicans* などではクラス I、II、IV の3種のクラスのキチン合成酵素をコードする遺伝子しか持たないのに対し、糸状菌では数種以上のキチン合成酵素遺伝子を持ち、特に子囊菌類の糸状菌では一般にすべてのクラスのキチン合成酵素をコードする遺伝子を少なくとも一つは持つことが明らかになりつつある。このように糸状菌には多種のキチン合成酵素遺伝子が存在する。*Aspergillus nidulans* にはその全ゲノム配列から8種のキチン合成酵素をコードする遺伝子が存在するが、演者らのグループではこのうちクラス I～VI の6種キチン合成酵素遺伝子産物、それぞれ ChsC、ChsA、ChsB、ChsD、CsmA、CsmB についてその役割の解析を行ってきた（図1）。このうちクラス V と VI のキチン合成酵素 CsmA と CsmB はそれぞれのキチン合成酵素ドメインの N 末端側にアクチンの上を走るモータータンパク質であるミオシンと相同性を示すドメインを有する非常にユニークな構造を持つ。このような構造を持つタンパク質は *S. cerevisiae*、*C. albicans* などには存在しないが、これまで全ゲノム配列が決定された細胞壁のキチン含量が比較的高い二形性酵母、糸状菌には普遍的に存在する。

#### 1. 隔壁形成におけるキチン合成酵素の役割

上記6種の遺伝子の破壊株についてその隔壁の構造について検討したところ、*chsA*、*chsC*、*chsD* の一遺伝子破壊株については異常が認められなかったが *chsA chsC* の二重破壊株においては隔壁が肥厚化し、隔壁孔が大きく、隔壁の形成位置にも異常が見られた(1)。*csmA*、*csmB* の一遺伝子破壊株においては隔壁の構造自体には異常が見られなかったが、隔壁を起点として菌糸の中に新たな菌糸を生じる菌糸内菌糸が観察された(2,3)。*chsB* の一遺伝子破壊株においては隔壁構造の異常も一部観察されたが、菌糸内菌糸の形成も観察された。一方、これまでクラス IV の ChsD を除く5種の

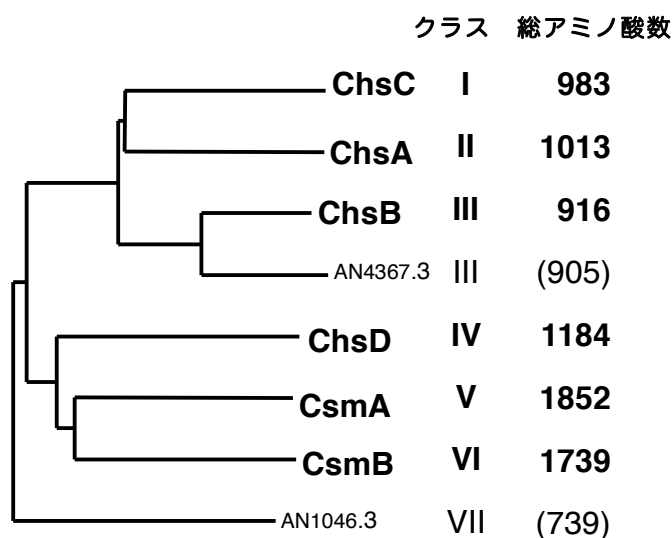


図1 *A. nidulans* のキチン合成酵素  
推定上のアミノ酸数をカッコで示した。

キチン合成酵素についてタグをつけたタンパク質の細胞内における局在性について検討したところそのすべてが形成中の隔壁に存在し、隔壁形成の終了とともに消失することが明らかになった(1-3)。しかしこの局在には2つのパターンがあり、隔壁形成中その隔壁全体に分布するもの(ChsC、CsmA、CsmB)と隔壁の形成に伴ってその先端部分、つまり細胞壁側から菌糸中央部へと移動してゆくもの(ChsA、ChsB)の2種類に分類された。以上のことから少なくともこれら5種のキチン合成酵素が隔壁の形成に関与することが推定された。

## 2. 菌糸先端生長、形態形成におけるキチン合成酵素の役割

キチン合成酵素遺伝子破壊株における菌糸生長・形態形成への影響について検討したところ、*chsB* 破壊株では菌糸生長が大きく阻害され非常に小さなコロニーを形成するのみであり分生子形成も全く起こらなかった。さらにChsBとタグとの融合タンパク質が菌糸先端、分生子形成器官に分布することも示されており、ChsBの先端生長、分生子形成器官の分化への関与が強く示唆された。また*csmA*、*csmB*それぞれの一遺伝子破壊株は類似の性質を示し、菌糸の途中がふくらむバルーンの形成、低浸透圧下での頻繁な溶菌などがみられた。また*csmA csmB*の二重破壊は合成致死を示すことから*A. nidulans*の生育には少なくともこれら遺伝子のどちらかは必須であることが示された(3)。一方、*chsA*、*chsC*は一遺伝子破壊では大きな表現型の変化を引き起こさないが、二重破壊では様々な変化がみられた。この二重変異株では細胞壁のキチン含量が増加しており、何らかの細胞壁修復機構が活性化していることが示唆されたが、*chsA chsC csmA*の3重破壊株は*chsA chsC*二重破壊株、*csmA*の一遺伝子破壊株と比較して生育が非常に悪いことからこの修復機構にCsmAが関与していることが考えられた(4)。また*chsA chsC*二重破壊株では分生子形成効率が極度に低く、その分生子形成器官がMedA、AbaAなどの分生子形成に関わる転写因子、またはその関連遺伝子の変異株と類似した異常な構造を示すが、*chsA chsC*二重変異株において分生子形成の際の*abaA*の発現が遅れることが明らかになった(5)。以上のことから*chsA chsC*二重変異株では何らかのシグナル伝達系が活性化し、CsmAによる細胞壁の修復を誘導するとともに分生子形成を抑えている可能性が示唆された。

以上述べてきたように糸状菌の隔壁形成・形態形成におけるキチン合成酵素の関与は非常に複雑であり、もう一つの細胞壁主要構成成分である $\beta$ -1,3-グルカンの合成酵素をコードする遺伝子が糸状菌には一般に1~2個しか存在しないのとは対照的である。またキチン分解酵素遺伝子も一般に十数種存在することが全ゲノム配列情報より明らかになっており、この中には主に自己溶菌に作用するものも存在するが(6)、何故このように多くの種類のキチン関連酵素が必要であるのかは非常に興味深い問題であり、今後の更なる解析によってこれらの理由が明らかになることが期待される。

## 参考文献

1. Ichinomiya, M., E. Yamada, S. Yamashita, A. Ohta, and H. Horiuchi (2005) *Eukaryot. Cell* **4**:1125-1136.
2. Takeshita, N., A. Ohta, and H. Horiuchi (2005) *Mol. Biol. Cell* **16**:1961-1970.
3. Takeshita, N., S. Yamashita, A. Ohta, and H. Horiuchi (2006) *Mol. Microbiol.* **59**:1380-1394.
4. Yamada, E., M. Ichinomiya, A. Ohta, and H. Horiuchi (2005) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**:87-97.
5. Ichinomiya, M., A. Ohta, and H. Horiuchi (2005) *Curr. Genet.* **48**:171-183.
6. Yamazaki, H., D. Yamazaki, N. Takaya, M. Takagi, A. Ohta, and H. Horiuchi (2007) *Curr. Genet.* **51**:89-98.

## Functions of Chitin Synthases in Septum Formation and Morphogenesis in *Aspergillus nidulans*.

Hiroyuki Horiuchi

Department of Biotechnology, The University of Tokyo.



担子菌ウシグソヒトヨタケ子実体の柄伸長に関わる遺伝子  
*eln1* と *eln6* のクローニング村口 元<sup>1</sup>、鎌田 堯<sup>2</sup>(1秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科、<sup>2</sup>岡山大学大学院自然科学研究科)*eln1* 遺伝子のクローニング

担子菌ウシグソヒトヨタケでは、通常、二核菌糸が子実体を形成する。それゆえ子実体形成過程に欠損を示す突然変異体を得るために、二核菌糸株 (5026+5132) に対して突然変異誘発処理が行われ、様々な欠損を示す優性突然変異体が単離された<sup>1)</sup>。ニトロソグアニジン処理により誘発された NG0398 株は、子実体の柄の伸長が起こらなくなる優性突然変異体 (*elongationless*) であった。その原因遺伝子 *eln1-1* は栄養要求性マーカーとの連鎖解析により第 I 染色体上の *his5* 遺伝子近傍にマッピングされた<sup>2)</sup>。1980 年代の初めに、野外から新たに採取されたウシグソヒトヨタケから単孢子分離によって得られた一核菌糸株の中に、一核菌糸であるにも関わらず子実体形成を行う株 (CopD5-12) が見い出され、この株に対して紫外線照射して、子実体形成過程の劣性突然変異体が単離された<sup>3)</sup>。この中に、*eln1* 遺伝子座の対立遺伝子と思われる *eln1-2* 劣性突然変異が見い出された。*eln1-1* および *eln1-2* 変異体では、柄細胞が伸長せずに膨らむというだけでなく、傘上部にあるヴェール細胞も伸長せずに膨らむという表現型を示す。

アメリカのマサチューセッツ工科大学のブロード研究所で、本菌の Okayama-7 株を使ってゲノムプロジェクトが行われ、2003 年にドラフトシーケンスが公開された<sup>4)</sup>。私たちは、Okayama-7 株のゲノム DNA を使って、BAC (Bacterial artificial chromosome) ライブラリーを構築し、FPC (FingerPrintContig) 解析を行い、BACfinder プログラムを用いて、公開ゲノム情報上に BAC クローンを位置付けて行った。BAC ベクターには本菌の *trp1* 遺伝子を組み込んでいるので、*trp1* 栄養要求性株の形質転換実験に BAC DNA を直接使うことができる<sup>5)</sup>。

*eln1* 野生型遺伝子を特定するために、形質転換受容菌株である B87 (*eln1-2 trp1-1, 1-6*) 株を構築し、*eln1* 遺伝子座を含むと期待される *his5* 遺伝子座近傍の BAC DNA を導入して行ったところ、s2F7 クローンに *eln1*<sup>+</sup>活性があることを突き止めた。オーバーラップクロンの s14B9 クローンにも *eln1*<sup>+</sup>活性があったので、s14B9 よりサブクローンを作って *eln1*<sup>+</sup>活性を調べ、活性領域を 15 kb ほどに狭めることができた。この領域にゲノムブラウザ上で出芽酵母の Cdc3 様セプチンをコードしている遺伝子が予測されていたので、セプチン遺伝子の前後 1 kb ほどを含む約 3 kb のゲノム DNA を PCR によって増幅し、*trp1*<sup>+</sup>遺伝子とともに DNA 導入実験を行ったところ、*eln1*<sup>+</sup>活性を確認することができた。優性突然変異 *eln1-1* では、第 5 イントロンの 5'-junction の GT が TT に変異していた。劣性突然変異 *eln1-2* では、プロモーター領域の変異であろうと思われる。これらの変異と表現型がどのように結びついているのかについて、さらに実験を進めているところである。

*eln6* 遺伝子のクローニング

1980 年代の初めに、交配型因子 A および B の両方に突然変異を持つ *AmutBmut* 株が構築され、一核性子実体形成を示すことが示された<sup>6)</sup>。この *AmutBmut* 株を片親にした F<sub>1</sub> 子孫をマッピング集団として、RAPD および RFLP マーカーによる連鎖地図を作成し、本菌の各染色体に対応する 13 の連鎖群を明らかにした<sup>7)</sup>。この *AmutBmut* 株に紫外線照射して、柄の伸長しない *eln6-1* 劣性突然変異体 (#57') を得た。この変異体の柄細胞は、まっすぐに伸長せず、蛇行していた。この株を野生型株と交配し、得られた F<sub>1</sub> 子孫における遺伝子型の分離を調べ、連鎖する RAPD マーカーを検索したところ、第 XIII 染色体に *eln6* 遺伝子が座乗することが判明した。形質転換受容菌株 (*eln6-1 trp1-1, 1-6*) を構築し、第 XIII 染色体に位置付けた BAC クローンを導入して行ったところ、s3G11 クローンに *eln6*<sup>+</sup>活性のあることを突き止めた。サブクローンおよび候補遺伝子の PCR 断片の形質転換活性を調べ *eln6* 遺伝子を特定したところ、*eln6* 遺伝子は、すでに本菌で *eln3* 遺伝子産物として同定されていた糖転移酵素<sup>8)</sup> と非常によく似たタイプの糖転移酵素をコードしていることが分かった。

今後は、柄の伸長欠損突然変異体から同定できた遺伝子産物が細胞内で互いにどのように機能して子実体成熟期の急激な柄細胞の伸長を可能にしているのかを明らかにしたい。

参考文献

- 1) Takemaru, T. & Kamada, T. (1972) *Bot. Mag. Tokyo* **85**, 51-57.
- 2) Takemaru, T. (1982) in *Experimental Methods in Microbial Genetics*, ed. Ishikawa, T. (Kyoritsu Publishing Company, Ltd., Tokyo), pp. 355-356.
- 3) Muraguchi, H., Takemaru, T. & Kamada, T. (1999) *Mycoscience* **40**, 227-235.
- 4) [http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/coprinus\\_cinereus/Home.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/coprinus_cinereus/Home.html)
- 5) Muraguchi, H., Kamada, T. & Yanagi, S. O. (2005) *Mycoscience* **46**, 49-53.
- 6) Swamy, S., Uno, I. & Ishikawa, T. (1984) *J. Gen. Microbiol.* **130**, 3219-3224.
- 7) Muraguchi, H., Ito, Y., Kamada, T. & Yanagi, S. O. (2003) *Fungal Genet. Biol.* **40**, 93-102.
- 8) Arima, T., Yamamoto, M., Hirata, A., Kawano, S. & Kamada, T. (2004) *Fungal Genet. Biol.* **41**, 805-812.

**Cloning of the *eln1* and *eln6* genes involved in stipe elongation of *Coprinus cinereus*.**

Hajime Muraguchi<sup>1</sup>, Takashi Kamada<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Okayama University

## 麹菌が生産する有用な二次代謝産物について

堤 浩子 (月桂冠 総合研究所)

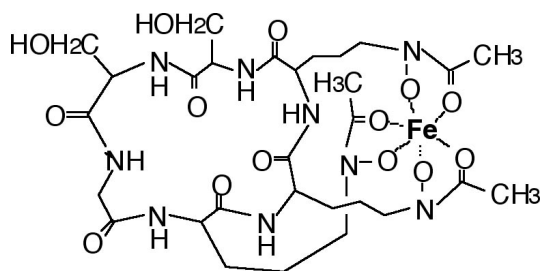
### 1. はじめに

麹菌 *Aspergillus oryzae* は伝統的な醸造産業になくてはならない微生物であり、各種酵素タンパク質だけでなく、様々な代謝物を生産することから「代謝物の宝庫」といわれている。2005年に *A. oryzae* ゲノム解析が行われて以来、DNA マイクロアレイ解析やプロテオーム解析などのポストゲノム解析が行われている。ゲノム情報からも二次代謝産物の生産に関わる遺伝子を、他の麹菌に比べ多く保有することからも、二次代謝産物を豊富に生産する機能があると考えられている<sup>1)</sup>。分析技術も進歩し代謝物を網羅的に解析することが可能となり、今まで知られていない有用な二次代謝産物が見つかる可能性も大きい。麹菌が生産する二次代謝産物について網羅的に解析することで、有用な代謝物を見出すことができる。今回、麹菌が生産する二次代謝産物の生合成経路とあわせて網羅的な代謝物解析について紹介する。

### 2. フェリクリシン

フェリクリシンを代表とするフェリクローム類は、清酒中の着色原因物質として1967年蓼沼らによって同定されている。フェリクリシンは、3分子のアセチル化されたヒドロキシオルニチン、2分子のセリン、1分子のグリシンが環状に結合したオリゴペプチドである。3価の鉄イオンに対して、非常に特異的かつ強力に結合する。そのペプチド鎖（デフェリフェリクリシン）を麹菌が細胞外に分泌し鉄と結合することで鉄を可溶化し、麹菌にとって鉄供与体として機能をしている。

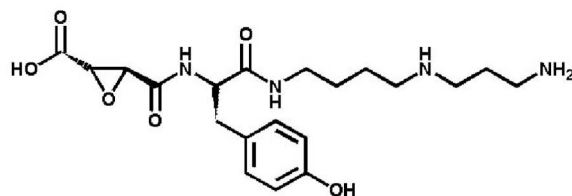
この環状ペプチドは通常のタンパクのようにリボソームで合成されるのではなく、ペプチドシンターゼと呼ばれる巨大酵素蛋白によって合成される<sup>2)3)</sup>。また鉄イオンをキレートする「腕」の部分は、オルニチンに対してヒドロキシル化・アセチル化などの修飾が必要である。我々はこのフェリクリシンのペプチド合成酵素、修飾酵素、膜輸送タンパク、転写制御因子などフェリクリシン生合成に必要な遺伝子群が、麹菌染色体上で約63 kbの大規模な遺伝子クラスターを形成していることを明らかにした。このように二次代謝産物の生合成遺伝子群が、麹菌ゲノム上で巨大なクラスターを形成していることは非常に興味深い。



フェリクリシンの構造

### 3. エポキシコハク酸誘導体

1998年我々は清酒中からシステインプロテアーゼを阻害する物質を発見した。システインプロテアーゼには、カテプシンB, H, Lなどのカテプシンファミリーが属しており、生体内でアレルギーの発症や骨粗鬆症などの疾病に関与していると考えられている。このシステインプロテアーゼの阻害物質の構造決定を行ったところ、エポキシコハク酸の誘導体であることを見出した。これらはエポキシコハク酸、アミノ酸、直鎖ジアミンの3つのユニットがペプチド結合によって連結した構造である。アミノ酸やジアミンの種類により、5種類の誘導体が存在する。これらのエポキシコハク酸誘導体は、システインプロテアーゼを特異的に阻害し、特に人体でアレルギーの発症に関与すると推定されているカテプシンLに対して強い阻害活性を示した。



エポキシコハク酸誘導体の一種 (CP-1)

このエポキシコハク酸誘導体の生合成条件を検討したところ、麹菌の固体培養により生産されることを見出した<sup>4)</sup>。特に米麹の培養末期にその生合成が大きく上昇する。これらの化合物は、3

種の構成ユニットがペプチド結合で連結されていることから、その合成にはリボソームを介さないペプチド合成酵素の関与が推定される。

#### 4. 麹菌のメタボロミクス

LC/MS, GC/MS, CE/MS など高度分析技術を用いたメタボロミクスは、様々な生物種における代謝物を網羅的に解析する技術として注目されている。麹菌にもメタボロミクス手法を用いることで、従来の分析技術では検出できない代謝物が検出されるように、代謝物プロファイルが見出されることが期待される。特に2次代謝産物に関しては、従来はなんらかの生理活性を有する物質に着目して単離精製されることが多く、二次代謝産物に着目した網羅的解析例は無い。

そこで、高分解能を持つ FT-ICR MS (フーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分離装置) を用いて、培養別の固体培養や液体培養の菌体抽出物の分析を行った。麹菌は、培養方法によって遺伝子発現が異なるため、その代謝物にも違いが出ると考えられる。各菌体抽出物を FT-ICR MS で分析した結果、約 500 種の分子種が検出され、その精密分子量から代謝物予測を行った。さらに、主成分分析やクラスター解析により、培養条件によって細胞内代謝物が大きく変化することを見出したので紹介する<sup>5)</sup>。

#### 5. おわりに

麹菌は、固体培養や液体培養で、代謝物の生産性が異なっており、各代謝物の生体内での機能を探ることや生合成経路を明らかにすることは非常に重要である。さらに、メタボロミクスによって麹菌は「代謝物の宝庫」であることが裏付けられてきた。麹菌の代謝物を有効利用するためには、Omics といわれる網羅的解析や機能性研究など様々な方面からのアプローチが必要であると考えている。

- 1) 秦洋二: 化学と生物, 39, 113 (2001)
- 2) 石田博樹ら 2002 年度農芸化学会要旨集 p.199
- 3) O.Yamada et al *J.Biosci Bioeng*,**95** ,82(2003)
- 4) T. Yamada et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, **62**, 907 (1998)
- 5) 堤 浩子ら 2007 年度農芸化学会要旨集 p.189

#### **Valuable secondary metabolites from *Aspergillus oryzae***

Hiroko Tsutsumi

*Gekkeikan Sake Co.Ltd, Research Institute*

## S-2-2

### トリコテセン系毒素の構造多様性を生み出すメカニズムの解明と生産制御にむけて

木村 真 (理化学研究所・中央研究所／微生物代謝制御研究ユニット)

コムギなどの重要穀類に感染し、収穫に大きな打撃を与えるムギ類赤かび病菌 (*Fusarium graminearum*) は、セスキテルペンであるトリコテセン系毒素 (図1) を穀粒に蓄積させ、食の安全を脅かす。*F. graminearum* は C-8 位にケト基を持ち、側鎖に様々な置換基が特定の組み合わせで入るB型トリコテセンを生産する。二次代謝産物を生産する微生物に

おいて、同じ種の菌株がこのように多様な類縁体を生産するケースは稀であるが、この多様性がどのような遺伝因子によって決まるのかは全く分かっていない。トリコテセン生合成研究史上、モデル系として用いられてきた T2-toxin のようなA型トリコテセンでは、全生合成遺伝子 (*Tri* 遺伝子) が同定され、それらの機能が示された<sup>1)</sup>。しかし、これらの知見でB型トリコテセンの生合成まで説明できるのであろうか? 本研究では、*Tri* 遺伝子の機能を分子遺伝学的手法や生化学的手法によって徹底的に検証し、B型トリコテセンの構造多様性を生み出す機構を解明し、さらに TRI6 転写因子の上流に位置する情報伝達系の因子を同定して毒素生産制御のメカニズム解明のための切り口とすることを目指している<sup>2)</sup>。

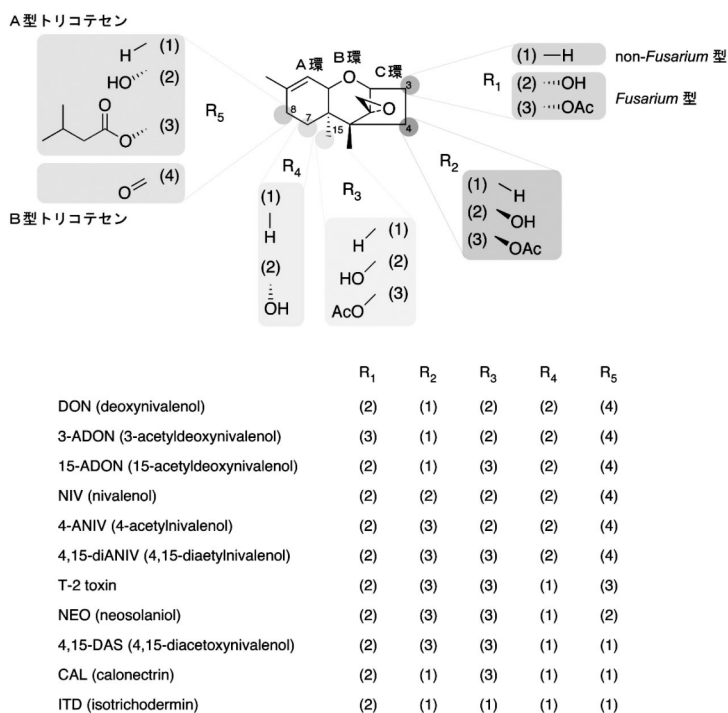


図1：トリコテセン系毒素の構造

### B型トリコテセンの生合成経路

トリコテセン基本骨格ができるまでの初期生合成経路はA型およびB型トリコテセンで共通で、ファルネシルピロリン酸 (FPP) の環化反応を担う *Tri5*<sup>3)</sup> と直後の4連続水酸化ステップを担う *Tri4*<sup>4)</sup> によって行われる。一方、穀粒での汚染が問題となるB型トリコテセンでは、基本骨格ができてからの後期生合成経路は全く分かっていない。そこで 4-ANIV / 4,15-diANIV (図1) を同時生産する菌株を用いて全経路遺伝子の破壊体を作製し、蓄積する中間体の構造を決定した。さらに、 $\Delta Tri5\Delta Tri101$  二重破壊体、 $\Delta Tri5\Delta Tri3$  二重破壊体、 $\Delta Tri5\Delta Tri8$  二重破壊体を作製し、それらの菌株に対して各種中間体のフィーディングを行った。これらの実験結果から、(1) C-15 位の水酸化には C-3 位にアセチル基が必要なこと、(2) A環の修飾には C-3 位と C-15 位の両方にアセチル基が必要なこと、(3) C-4 位が先に修飾されているA型トリコテセン中間体はB型トリコテセン生合成経路に入れず、A環の修飾が起こらない (つまりA型トリコテセン生合成とは異なってC環の C-4 位よりA環が先に修飾されなければならない) こと、(4) C-4 位の水酸化、アセチル化には C-3 位のアセチル基が必要だが C-15 位のアセチル基は必要ないこと、(5) C-3 アセチラーゼは C-4 位にアセチル基があることによって反応性が低くなり、逆に C-3 デアセチラーゼは C-4 位にアセチル基があることによって反応性が高くなること示され、図2に示す経路に沿って生合成が進むことが明らかとなった<sup>2)</sup>。4-ANIV / 4,15-diANIV は最も反応ステップ数の多いB型トリコテセンであり、後期生合成経路の遺伝子 (*Tri13*, *Tri7*, *Tri8*) の欠損や機能の進化 (コードする酵素の基質特異性の変化) を経て、側鎖構造の多様性が生じたと考えられる。



本研究は生研センター基礎研究推進事業「天然環境毒素による重要穀類の汚染低減化にむけた技術創成」の一環として推進しているものである。

- 1) Desjardins, A. E. (2004) *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics, and biology, APS press, St. Paul MN
- 2) Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., and Fujimura, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press (2007).
- 3) Hohn, T. M., and Beremand, P. D., *Gene*, **79**, 131-138 (1989).
- 4) Tokai, T., Koshino, H., Takahashi-Ando, N., Sato, M., Fujimura, M., and Kimura, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **353**, 412-417 (2007).
- 5) Ochiai, N., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Fujimura, M., and Kimura, M., *FEMS Microbiol. Lett.*, **275**, 53-61 (2007).
- 6) Ochiai, N., Tokai, T., Nishiuchi, T., Takahashi-Ando, N., Fujimura, M., and Kimura, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press (2007).
- 7) Nishiuchi, T., Masuda, D., Nakashita, H., Ichimura, K., Shinozaki, K., Yoshida, S., Kimura, M., Yamaguchi, I., and Yamaguchi, K., *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **19**, 512-520 (2006).

### **Recent progress in molecular genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: structural diversity and regulatory network**

Makoto Kimura (Plant & Microbial Metabolic Engineering Research Unit, DRI, RIKEN)

矢部希見子<sup>1</sup>、中島廣光<sup>2</sup>( <sup>1</sup>農業・食品産業技術総合研究機構、<sup>2</sup>鳥取大農学部)

カビが生産する二次代謝産物の中には、動物や人に健康被害を及ぼす物質、つまりカビ毒(マイコトキシン)があり、これまで300種以上のカビ毒が報告されてきている。種々のカビ毒の中で、アフラトキシンは極めて強力な発ガン性及び毒性を有する物質として恐れられている。アフラトキシンは主として *Aspergillus parasiticus* や *Aspergillus flavus* に属する一部のカビが生産する二次代謝産物であり、カビが生産するアフラトキシンは主として4種(アフラトキシン B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>)であるが(図1)、中でもAFB<sub>1</sub>が最も発ガン性及び毒性が高く、またカビが多量に作る。アフラトキシン生産カビは熱帯・亜熱帯地方の土壤に常在するが、温帯地域においても干ばつ等の気候変動によりアフラトキシンによる穀物汚染が発生することがあり、また世界における穀物の貿易によって、アフラトキシン汚染は世界的に深刻な問題となっている。

カビ生体内において、アフラトキシンはアセチル CoA から18種以上の酵素反応を経て作られ、関与する25種以上の遺伝子群は染色体上70 kb以上の領域に遺伝子クラスターを形成する。その内部には制御遺伝子 *aflR* が存在し、他の酵素遺伝子群の発現をポジティブに制御している。一方、アフラトキシンの前駆体の一つ、ステリグマトシスチンを生産するカビは *Aspergillus nidulans* をはじめとして20種以上が報告されており、ステリグマトシスチン生合成経路はアフラトキシン生合成経路と同一で、関与する遺伝子群は配置は異なるもののやはり遺伝子クラスターを形成している。従って、アフラトキシン生産菌はステリグマトシスチン生産菌が有する遺伝子群に加えてアフラトキシン生産に特異的に関与する遺伝子群を有するカビと考えることができる。

アフラトキシン生合成経路中ステリグマトシスチンからアフラトキシンまでの経路について、我々は既に、ステリグマトシスチン(sterigmatocystin)は *O*-methylsterigmatocystin (OMST) を経て AFB<sub>1</sub> と AFG<sub>1</sub> に変換し、dihydrosterigmatocystin は dihydro-*O*-methylsterigmatocystin (DHOMST) を経て AFB<sub>2</sub> と AFG<sub>2</sub> に変換することをフィーディング実験によって明らかにした。酵素反応においても B-グループアフラトキシン (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>) はそれぞれ OMST と DHOMST から OrdA monooxygenase 酵素によって形成することを確認した。一方、G-グループアフラトキシン (AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>) の生産については、OrdA 酵素以外に可溶性酵素が必要であることを確認していたが、その詳細は不明であった。我々は最近、アフラトキシン遺伝子クラスターの末端に位置する *nadA* 遺伝子を破壊して新たに蓄積した中間体の検索や破壊株の酵素反応の解析を行うことによって、*nadA* 遺伝子が G-グループアフラトキシンの形成に必要な可溶性酵素であることを明らかにした。そこで、本シンポジウムでは遺伝子破壊実験及び酵素反応実験を組み合わせることによって明らかになった G-アフラトキシンの生合成経路に関する知見について報告する。

さらに、世界の穀物の4分の1がカビが原因で廃棄されていると言われているが、その中でアフラトキシン汚染が大きな割合を占めていると予想される。しかし、アフラトキシンは安定な物質であり、未だ効果的な汚染防御法は得られていない。そのため多くの国が穀物のアフラトキシン汚染について規制値を設け厳密な検査態勢を敷いているが、それによる経済的負担は極めて大きいものがある。我々は、アフラトキシン汚染防御法を開発することを目的としてアフラトキシン生産を阻害する微生物のスクリーニング及び阻害物質の解析を行ってきている。それについても紹介する予定である。



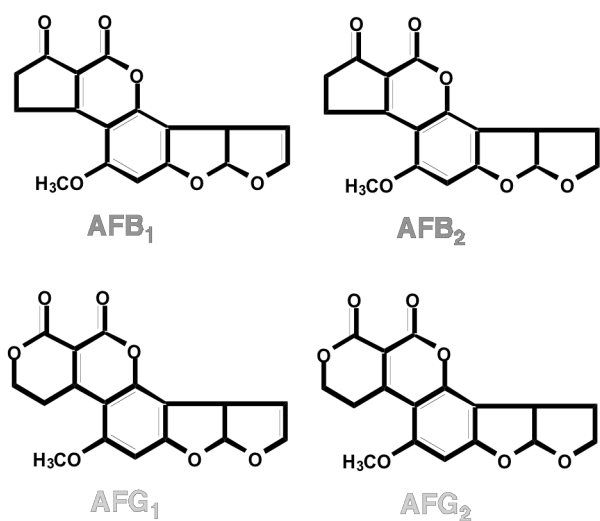


図1. カビが生産する主要なアフラトキシン

### Mechanism and inhibition of aflatoxin biosynthesis

Kimiko Yabe<sup>1</sup> and Hiromitsu Nakajima<sup>2</sup>

<sup>1</sup> National Agriculture and Food Research Organization (NARO)

<sup>2</sup> Faculty of Agriculture, Tottori University

糸状菌ポリケタイド合成遺伝子の機能解析  
岩手医科大学薬学部天然物化学講座  
藤井 勲

### はじめに

糸状菌のポリケタイド合成酵素 polyketide synthase (PKS) は、タイプI繰返し型と呼ばれる多機能型酵素であり、1本の大きなポリペプチド上にポリケタイド生成反応に関わる機能ドメインである縮合酵素 KS、アシル基転移酵素 AT、アシルキャリアープロテイン ACP の基本ドメインの他、ケト還元 KR、脱水 DH、メチル化 MeT、閉環 CYC などの修飾ドメインが存在し、これらが機能的に協調し、見掛け上、繰返して反応に関与し、最終的に各 PKS に特異的な炭素骨格が構築される。この基本的に同一の architecture をもつ糸状菌 PKS により生み出される化合物は、多環性芳香族化合物から高度に官能基化を受けた還元型化合物に至るまで、炭素鎖長、閉環様式など非常に多様性に富み、これが糸状菌タイプI繰返し型 PKS の特徴となっている。しかし、その反応制御機構、例えば生成物の炭素鎖長の制御や還元段階の制御などの機構については、現在のところ、ほとんど不明である。この制御機構を明らかにすることができれば、逆に所望の炭素骨格をもつ化合物を生成する PKS タンパクをもデザインすることが可能になることが期待される。

我々は、糸状菌 PKS を異種糸状菌、特に麹菌 *Aspergillus oryzae* を宿主として発現させることにより、芳香族 PKS の発現、機能解析を進めてきた。糸状菌のゲノム遺伝子中には、数十 bp 程度ながらもいくつかのイントロンを含む場合があり、また、発現させた PKS が活性型となるためには、その ACP ドメインの Ser 残基がホスホパンテテイル化されなければならない。しかし、異種糸状菌を宿主として用いることにより、PKS のゲノム遺伝子を直接用いた場合でも、正常な splicing とホストのホスホパンテテイル転移酵素の働きにより ACP がホロ化された活性型 PKS の発現が可能となる。実際、我々は、*Aspergillus terreus* よりクローニングした atX 遺伝子を  $\alpha$ -アミラーゼプロモーターを利用して *Aspergillus oryzae* で発現させ、6-メチルサリチル酸が生産されることから、ATX が *A. terreus* の MSAS (6-メチルサリチル酸合成酵素) であること示した。また、ペンタケタイド合成酵素である *Colletotrichum lagenarium* の PKS1、同ヘプタケタイド合成酵素である *Aspergillus nidulans* の WA、*Aspergillus fumigatus* の Alb1p、*Phoma* sp. のノナケタイド合成酵素 PNK2 などの発現、機能同定にも成功している。WA PKS では、C-末のチオエステラーゼ TE とされていた領域が、単に PKS から生成物を加水分解的に遊離させる TE ではなく、芳香環生成のクライゼン型閉環に関わるクライゼンサイクラーゼドメイン CYC であることを明らかにした。この CYC ドメインは、他の糸状菌芳香族型 PKS、例えば、上記 PNK2 や、ステリグマトシスチンやアフラトキシン生合成の PKS にも存在する基本的なドメインと考えられる。

また、還元型 PKS についても、ソラナピロン生産菌であるバレイシヨ夏疫病菌 *Alternaria solani* より遺伝子クローニングを試み、pksN、pksF などの PKS 遺伝子を取得した。pksN の *A. oryzae* での発現では、新規化合物アルタナピロンの生産が確認された。アルタナピロンは、デカケタイド鎖にメチオニン由来の8個の側メチルが導入され生成する化合物であり、PKSN 酵素タンパクの中央に存在するメチルトランスフェラーゼ MeT ドメインの働きにより、9回の縮合反応のうち、8回の各縮合反応後にアシルキャリアープロテイン ACP 上の  $\beta$ -ケトアシル中間体の  $\alpha$  位にメチル基を導入するものと考えられる。また、pksF の発現では、PKSF が新規ポリエン化合物アスラニピロン、アスラニオールを主生成物として、11 以上のポリエン化合物を与える興味深い PKS であることを明らかにした。これらの化合物、あるいはその誘導体は、*A. solani* の代謝産物としては得られておらず、生合成遺伝子を強制的に誘導発現させることにより、これまで隠されていた化合物生産能を明らかにすることができたものと考えられる。*A. solani* より PKS 遺伝子のクローニングを更に進めたところ、新たに4つの還元型 PKS 遺伝子断片の取得に成功した。ゲノムウォーキングにより全長 PKS 遺伝子、並びにその近傍領域の塩基配列決定を進めたところ、そのうちの1つがソラナピロン生合成に必要な各遺伝子をコードする生合成遺伝子クラスターを構成しているものと推定された。実際、本遺伝子クラスターの PKS 遺伝子 solI の発現は、*A. solani* のソラナピロン生産開始時期と一致していた。そこで、solI 遺伝子を *A. oryzae* で誘導発現させたところ、ソラナピロン生合成前駆体であるデスメチルプロソラナピロン I の生産を確認し、この遺伝子クラスターがソラナピロン生合成の遺伝子クラスターであると同定した。ところで、ソラナピロンのデカリン骨格は、プロソラナピロン II の酸化と続く Diels-Alder 反応により構築されることが知られていたが、この反応を触媒する Diels-Alderase と呼ぶべき酵素の詳細は不明であった。

*sol* 遺伝子クラスターには、*sol5* と名付けた酸化酵素をコードする遺伝子が存在しており、この酸化酵素が Diels-Alder 反応を触媒するものと考え、その発現を試みた。大腸菌での発現などを種々検討したものの、活性は見られず、*A. oryzae* での発現により初めてその酵素活性の確認に成功した。非酵素的な Diels-Alder 反応では、エンド選択的に生成物を与えるが、*Sol5* の触媒する反応では、エキソ選択的な生成物を与えることが確認された。

このように糸状菌発現系は PKS の機能解析系としても、また、化合物生産のための生物合成系としても優れた系であるが、糸状菌の形質転換効率の低さなどが問題点となる。そこで、現在、酵母を宿主とする糸状菌 PKS の発現についても検討を進めている。

#### おわりに

ポリケチド合成酵素 PKS は非常に巨大なタンパクであったり、あるいは酵素複合体であったりするため、直接 *in vitro* での反応に用いて化合物を得ることは、少なくとも現在のところ実用的ではない。しかし、基本的に同一のアーキテクチャーでありながら、多様な炭素骨格の化合物を生み出すことができる糸状菌タイプ I 型 PKS の合成ポテンシャルは非常に高い。今後、発現系の改良やドメイン交換などの遺伝子工学的手法を用いて、繰返し型タイプ I PKS を基盤とした生物合成系の構築などへと展開させていきたい。

なお、本研究は、演者の前所属である東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室において進めてきたものであり、海老塚豊教授、並びにともに研究を進めてきた学生諸氏に深く感謝いたします。

#### Functional analysis of fungal polyketide biosynthesis genes

Isao Fujii

Laboratory of Natural Products Chemistry, School of Pharmacy, Iwate Medical University

## S-2-5

### ML-236B (compactin)生合成遺伝子群の解析と高生産株育種への応用 ○馬場悟史、阿部有生（第一三共株式会社）

高脂血症治療剤 Mevalotin<sup>®</sup>(一般名:pravastatin)は、世界初の HMG-CoA 還元酵素阻害剤として 1989 年に日本で上市されて以来、その強力な生体内コレステロール合成抑制効果によって高コレステロール血症治療に貢献してきた。これまでに約 100 カ国で販売され、スタチン系高脂血症治療薬の代表的存在として、世界中で広く使用されている。

Pravastatin は、二種類の微生物を利用した二段階発酵により生産される、天然物由来の医薬品である。すなわち、まず糸状菌 *Penicillium citrinum* により前駆体 ML-236B (compactin) が発酵生産され、さらに放線菌 *Streptomyces carbophilus* による微生物変換により ML-236B の 6β位に水酸基が導入されて pravastatin となる。ML-236B は HMG-CoA 還元酵素阻害作用を有する世界初の化合物であったが、より効果的な化合物探索の結果、*S. carbophilus* 変換物である pravastatin が見出された。

Pravastatin 発酵生産の工業化研究は、前駆体 ML-236B の生産量向上による生産コスト低減を目標に進められた。その中心は化学変異剤や UV を用いた ML-236B 高生産変異株の分離、生産に最適な培地の作製、さらにはコンピュータによる培養制御法の確立で、長期にわたる研究の結果、大幅な生産コストの低減に成功し現在の生産プロセスに結びついている。

広く使用される conventional な変異の誘発と高生産株の分離という育種法は、膨大な手間、労力、時間を要する。そこで近年、遺伝子工学的手法による不要遺伝子の破壊、有用遺伝子の増幅、ゲノムシャッフリングなど、より短期間で菌株を分子育種する手法が試みられており、これまでもいくつかの成功例が報告されている。

我々はこれまでに、ML-236B 生合成遺伝子群の単離と、個々の遺伝子産物の機能解析や発現制御機構の解析を実施し、得られた知見を利用して、高生産変異株の ML-236B 生産能をさらに向上させることに成功した。

#### 1. ML-236B(compactin) 生合成遺伝子群の単離と機能解析

ML-236B の生合成遺伝子群は、その類縁化合物ロバスタチン同様、約 40 kb の範囲でクラスターを形成し、ゲノム上に single copy で存在していた<sup>1)</sup>。そのクラスターは、6 つの生合成関連遺伝子、2 つの耐性遺伝子、1 つのレギュレーターから構成される。*m1cA* と *m1cB* は、ポリケタイド合成酵素 (Polyketide synthase, PKS) をコードし、ML-236B の主鎖と側鎖の形成に関与する。*m1cC*、*F*、*G*、*H* はそれぞれ、P450、oxidoreductase、dehydrogenase、transesterase と相同性を持つ post-PKS 修飾酵素をコードし、ML236B の骨格形成に関与している。これら 6 つの遺伝子は *m1cR* がコードする制御因子によって発現調節される。*m1cD* および *F* はそれぞれ、HMG-CoA reductase、efflux pump に相同性をもつタンパク質をコードし、*P. cترینum* の ML-236B に対する自己耐性を付与している。決定した ML-236B 生合成遺伝子クラスター塩基配列には、野生株と高生産変異株間に変異点はなく、またサザン解析から、ML-236B 生合成遺伝子クラスター自身のコピー数にも変化はないことが明らかになっている<sup>2)</sup>。

#### 2. ML-236B(compactin) 生合成遺伝子群の発現調節機構

ML-236B 生合成に関与する 6 遺伝子の転写は ML-236B の生産開始と密接にリンクしている<sup>3),4)</sup>。この転写活性化は、Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> DNA 結合モチーフを有する GAL4 型転写因子様タンパク質 MlcR が、ML-236B 生合成遺伝子プロモーター領域近傍の特定の結合配列に結合することにより引き起こされる。高生産変異株における ML-236B 生合成遺伝子の転写量は野生株と比べて大きく増加しており、育種過程で誘発された変異により *mlcR* の転写量が増加したことが要因であると考えられる<sup>2)</sup>。

### 3. 生合成遺伝子を用いた ML-236B 高生産株の育種

高生産変異株の *mlcR* コピー数を人為的に増加させたところ、ML-236B 生産量が導入された *mlcR* コピー数に応じて最大で約 1.5 倍増加し、高生産変異株においてもまだ *mlcR* 転写量増加による ML-236B 生産量向上の余地があることがわかる。また、*mlcR* を含むクラスター全体のコピー数を増加させた場合でも、約 1.5 倍の生産量増加が見られた。これら形質転換株は 30L 発酵槽を用いた検討でも良好な生育および ML-236B 生産能を示し、ML-236B 高生産変異株のさらなる生産量向上に成功した<sup>5)</sup>。

### 4. 今後の展望

変異処理により得られた高生産株は、育種の過程でどのような変異が入って高生産化に至ったのであろうか。その一因である *mlcR* の転写量増加につながった変異は、ML-236B 生合成遺伝子クラスター取得のために塩基配列を決定した約 70 kb の塩基配列には存在しない。また、*mlcR* プロモーター周辺には MlcR 結合配列は存在せず、自身の転写を活性化する能力はない。*mlcR* 転写を活性化するネットワークの解明が、遺伝子工学的手法を用いた簡便かつ迅速な高生産株育種法の確立につながると考えている。

- 1) Mol. Genet. Genomics, 267, 636 (2002)
- 2) J. Gen. Appl. Microbiol., 50(3), 169 (2004)
- 3) Mol. Genet. Genomics, 268, 352 (2002)
- 4) Biochim. Biophys. Acta, 1759, 410 (2006)
- 5) Mol. Genet. Genomics, 268, 130 (2002)

### **Analysis of ML-236B (compactin) biosynthetic gene cluster and its application to construction of high-producing strain.**

Satoshi Baba, Yuki Abe (DAIICHI SANKYO CO., LTD.)

## 一般講演(口頭発表)

### O-1

#### 担子菌シイタケの Myb 型転写因子 Le.CDC5 と相互作用する新規 DNA 結合性タンパク質 CIPB

中沢威人, 金子真也, 宮崎安将<sup>1</sup>, 山崎丘<sup>2</sup>, 勝川志穂<sup>3</sup>, 宍戸和夫 (東工大・生命理工 1 現・森林総研 2 現・JAXA 3 現・日本製紙)

担子菌シイタケの子実体形成に関わると考えられる遺伝子 *Le.cdc5* は、*Schizosaccharomyces pombe cdc5+* のホモログ遺伝子であり、真核生物で高度に保存されている Myb 型 DNA 結合性転写因子をコードしている。以前に Le.CDC5 のロイシンジッパーを含む C 末端領域 と相互作用する 2 つの新規タンパク質 CIPA, CIPB(CDC5 Interaction Partner A or B)を同定していたが、今回いくつかの DNA プローブを用いてゲルシフト解析を行った結果、CIPB が DNA 結合性タンパク質であることが明らかになった。そこで、CIPB がどのような DNA 塩基配列を認識し結合するのかを SELEX により解析した結果、結合コンセンサス配列は 5'AACAB(C/G/T)3'であることが分かった。以上から、CIPB は Le.CDC5 (または他の DNA 結合性タンパク質) とともに DNA 結合性の転写因子として遺伝子の転写調節を行っている可能性が考えられる。

#### ***Lentinula edodes* CIPB, Le.CDC5 Interaction Partner B, is a DNA-binding protein**

Takehito Nakazawa, Shinya Kaneko, Yasumasa Miyazaki, Takashi Yamazaki, Shiho Katsukawa and Kazuo Shishido (Dept. of Life Science, Tokyo Tech)

### O-2

#### 担子菌シイタケの Myb 型転写因子 Le.CDC5 およびそのパートナー CIPB の標的遺伝子 *ctg1*

中沢威人, 金子真也, 宮崎安将<sup>1</sup>, 城島透<sup>2</sup>, 山崎丘<sup>3</sup>, 勝川志穂<sup>4</sup>, 宍戸和夫 (東工大・生命理工 1 現・森林総研 2 現・RITE 3 現・JAXA 4 現・日本製紙)

担子菌シイタケの子実体形成過程において、Myb 型転写因子 Le.CDC5 は子実体原基時以降に存在しており、その間に子実体形成に関わる遺伝子の転写を調節していると考えられる。以前に Le.CDC5 の標的遺伝子を検索する目的で Genomic Binding Site (GBS) Cloning が行われ、Le.CDC5 が特異的に結合する可能性のある 3.7kbp の *Hind*III 切断断片が得られていた。今回、本断片とその 5'隣接領域には 159 アミノ酸をコードする遺伝子 (*ctg1* と命名) が存在しており、その翻訳開始点下流領域内に Le.CDC5 結合コンセンサス配列 (5'GCAATGT3') に似た配列が複数存在することが確認できた。次にゲルシフト法およびクロマチン免疫沈降法により Le.CDC5 がそのうちの 1 つに対して子実体形成時期・子実体部位特異的に結合していることが明らかとなった。さらに、CIPB が *ctg1* の上流域および転写領域内に複数結合することが明らかとなった。以上の結果は、Le.CDC5 と CIPB が協調して *ctg 1* の転写を調節している可能性を示唆する。

#### **Binding of *Lentinula edodes* CDC5 and CIPB to a newly isolated target gene *ctg1***

Takehito Nakazawa, Shinya Kaneko, Yasumasa Miyazaki, Toru Jojima, Takashi Yamazaki, Shiho Katsukawa and Kazuo Shishido (Dept. of Life Science, Tokyo Tech)

### O-3

#### 木材腐朽担子菌においてセルロース分解酵素系の違いを与える分子生物学的因子

加治佐 平, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科・生材料)

木材腐朽担子菌は、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。両者における大きな差異はリグニン分解酵素の生産にあると考えられているが、植物細胞壁多糖の主成分であるセルロースを分解する酵素パターンも2種類の腐朽菌で大きく異なることが報告されている。すなわち白色腐朽菌が結晶性、非晶性セルロースを共に分解する酵素を生産するのに対して、褐色腐朽菌は非晶性セルロースを分解する酵素のみを生産することが知られている。そこで本研究ではセルロース分解系の酵素について、分子生物学的なアプローチを試みるとともに、木材腐朽担子菌の進化について考察した。

糸状菌による結晶性セルロースの分解に重要な役割を担っている糖質加水分解酵素ファミリー6,7に属するセロビオヒドロラーゼ (Cel6, Cel7)、そして白色腐朽菌のセロビオース代謝に関与するセロビオース脱水素酵素 (CDH) をコードする遺伝子に関して、様々な木材腐朽担子菌の全 DNA を鋳型に CODEHOP-PCR を行った。その結果、白色腐朽菌では全ての菌より Cel6, Cel7, CDH 遺伝子のバンドが確認できたが、褐色腐朽菌は Cel6, Cel7, CDH 遺伝子のバンドが確認できたグループと、いずれの遺伝子においても全くバンドが出なかったグループとに分かれた。さらに糖代謝酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GPD) 遺伝子と rDNA の ITS 配列によって作成した分子系統樹からも褐色腐朽菌は2つの異なった枝に分けられることが明らかとなり、それらはセルロース分解酵素系の遺伝子解析におけるグループと一致した。以上の結果から、褐色腐朽菌はセルロース分解酵素系の遺伝子を有するものと、完全に欠失した2つのグループに分けられる可能性が示唆された。

#### Molecular biological factor for the difference in enzymatic system of cellulose degradation by wood-rotting basidiomycetes

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

### O-4

#### *Gibberella fujikuroi* のフェロモンレセプター遺伝子の単離と破壊株の作出

關波直子・寺岡 徹・有江 力 (東京農工大・院農生物制御)

生物は一般的に有性生殖 (sexual reproduction) によって遺伝的多様性を維持してきたと考えられており、植物病原菌の病原性や薬剤抵抗性などの獲得、進化にも有性生殖が関与してきたと考えられる。しかし、重要植物病原糸状菌の中には *Fusarium oxysporum* のように交配不全性 (交配しないあるいは交配が未だに観察されていない) のものが数多く存在する。そこで本研究では、*F. oxysporum* の交配不全性の解明の一環として、近縁種で交配能を持つサトウキビしょう頭腐敗病菌 *Gibberella fujikuroi* mating population B (不完全世代名: *F. sacchari*) の交配応答シグナル伝達経路を解析している。今回は本菌においても機能していると想定される *Neurospora crassa* フェロモンレセプター (PRE1, PRE2) ホモログ遺伝子 (*pre1*, *pre2*) を *G. fujikuroi* と *F. oxysporum* から単離した。両種の PRE1, PRE2 はアミノ酸レベルで高い相同性を示した。また、それらの機能解析のために *G. fujikuroi* において二回相同組換えによってそれぞれの破壊株を作出した。

#### Cloning and functional analysis of *Gfp2* and *Gfp1* genes in *Gibberella fujikuroi*

Naoko Sekinami, Tohru Teraoka, Tsutomu Arie

(Tokyo Univ. of Agric.&Tech.)

## O-5

### イネいもち病菌の非相同末端再結合に関与する遺伝子 *Khm70*, *Khm80* の欠損変異株の解析

曾根輝雄<sup>1</sup>, 阿部 歩<sup>1</sup>, 芦澤武人<sup>2</sup> (<sup>1</sup>北大院農・応用菌学, <sup>2</sup>中央農研)

イネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) の圃場分離株は、染色体長多型を示すことが報告されており、DNA のダイナミックな組換えを行っていることが予想されている。細胞内の DNA 組換えには、相同組換え (Homologous recombination) と非相同末端再結合 (Non homologous end joining, NHEJ) が有り、それぞれに関与する遺伝子群がすでに出芽酵母その他の生物で明らかにされている。我々は、イネいもち病菌における NHEJ の DNA 組換えへの関与を明らかにする目的で、ヒト KU70 及び KU80 のイネいもち病菌ホモログ、*Khm70*, *Khm80*(=*MgKU80*<sup>1)</sup>) をクローニングし、それらが *N. crassa* のホモログと高い相同性を示すことをすでに報告している。pDEST<sup>2)</sup> を用いてこれらの欠損変異株 Ina86-137 Δ*Khm70*, Ina86-137 Δ*Khm80*, Ina168 Δ*Khm70*, Ina168 Δ*Khm80* を作成した。Ina86-137 Δ*Khm70*, Ina86-137 Δ*Khm80* は共に MMS (メチルメタンサルホン酸) への感受性が増大し、アデニン要求性を指標とした *AdeA* 遺伝子の相同組み換えによる破壊実験でも、95%以上の高い相同組換え率を示した。一方、Ina168 Δ*Khm70* Ina168 Δ*Khm80* では、MMS 感受性、遺伝子破壊に於ける相同組換え率は共に野生株 Ina168 と同等であった。また、各変異株共にイネに対する病原性は野生株と同等であった。これらの結果は、イネいもち病菌において、*Khm70*, *Khm80* は病原性発現に必須ではないこと、また、*N. crassa* 等の糸状菌同様、NHEJ に必須であるが、一部の菌株では *Khm70*, *Khm80* に依存しない NHEJ の主な経路が存在する可能性を示している。

1) Villalba *et al.*, *Fungal Genetics and Biology* (in press).

2) Abe *et al.* *Current Microbiology*, **52**, 210-215 (2006).

#### Deletion mutants of *Khm70* and *Khm80*, genes involved in NHEJ in *Magnaporthe oryzae*

Teruo Sone<sup>1</sup>, Ayumi Abe<sup>1</sup> and Taketo Ashizawa<sup>2</sup>(<sup>1</sup>Hokkaido Univ., <sup>2</sup>NARC)

## O-6

### *Agrobacterium tumefaciens* による形質転換法を利用したアラキドン酸生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 株の脂肪酸組成改変

安藤晃規, 魚田洋輔, 櫻谷英治, 小川 順, 清水 昌 (京大院農・応用生命)

【目的】我々はこれまでに *Mortierella alpina* 1S-4 及びその誘導変異体によるアラキドン酸をはじめとした種々の高度不飽和脂肪酸の工業的生産を実現している。本菌の分子生物学的アプローチにおいて、従来は遺伝子銃を用いた形質転換を行ってきたが、実用性の点において物理的損傷による生産性の低下、不安定な形質、遺伝子挿入数のばらつきなどの問題を有していた。今回、実生産への応用を視野に入れ、従来の方法に変わるより穏やかな条件下での形質転換が可能な *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) 法により、本菌を題材とした過剰発現の構築ならびに脂肪酸組成改変を試みたので、報告する。

【方法・結果】T-DNA 領域にマーカー遺伝子である *ura5* 遺伝子発現用カセットと本菌由来の *w3 desaturase* 遺伝子発現カセットを複数個タンデムに挿入したバイナリーベクターを構築した。本ベクターをエレクトロポレーションにより *A. tumefaciens* C58C1 株に導入し、*M. alpina* 1S-4 を形質転換した。得られた 70 % の形質転換体は、形質を安定して保持し、一様に旺盛な生育を示した。また、*w3 desaturase* 遺伝子発現至適条件下にて培養後、菌体より脂肪酸を抽出し、脂肪酸組成を分析したところ、*w3 desaturase* 遺伝子過剰発現株では、全脂肪酸当たり 30 % 以上のエイコサペンタエン酸の蓄積が認められた。以上のことより、*M. alpina* 1S-4 における ATMT 法の応用面での有効性を示すことができた。

#### Improvement of fatty acid in *M. alpina* 1S-4 by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation

Akinori Ando, Yosuke Sumida, Eiji Sakuradani, Jun Ogawa, Sakayu Shimizu

(Division of Applied Life Sciences Graduate School of Agriculture, Univ. of Kyoto)



## O-7

### 抽出液面固定化システムを用いたカビによる抗カビ物質 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone (6PP) の高濃度生産

小田 忍・一色邦夫 (メルシャン・生物資源研)

【目的】カビ-マイクロスフェア(MS) 複合マットの上部に低毒性な疎水性有機溶媒を重層し、生産される脂溶性二次代謝産物を *in situ* に抽出する新規な発酵法(抽出液面固定化システム)を開発した。本システムを抗カビ性香料であり、biocontrol agent としての用途が期待される 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone(6PP) の発酵生産に適用し、その有用性を確認することを目的とした。

【方法・結果】土壌より分離した 6PP 生産性 *Trichoderma* sp. の NTG 変異により、6PP 分解能を欠損した AG2755-5NM398 株を得た。本株を用いた標題システムについて、MS 種、抽出溶媒種、炭素源、窒素源、初発 pH、培養温度、植菌量、前培養時間等の最適化を行い、また、6PP の前駆体である linoleic acid の添加効果を調べた。MS 種としては無機材コートなしの MFL-80SDE (平均粒径 20~40  $\mu$ m、真比重 0.06)、抽出溶媒としては低粘性シリコンオイル KF-96L-1CS (粘度 1 cP)、炭素源と窒素源はそれぞれ fructose もしくは glucose と malt extract が最適であった。6PP 前駆体である linoleic acid は有機層中 1%レベルの添加で有効であった。最適条件下での発酵試験により、有機層中濃度 7 g/L 以上の 6PP が生産され、液体培養法における世界記録の 10 倍以上の蓄積濃度に達した。

### Production of high concentration of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone (6PP), a fungicidal secondary metabolite, in an extractive liquid-surface immobilization (Ext-LSI) system

Shinobu Oda, Kunio Isshiki (Bioresource Lab., Mercian Corp.)

## O-8

### 網羅的菌代謝物の比較解析システム

岡崎孝映<sup>1</sup>、中島大輔<sup>1</sup>、細内敦<sup>1</sup>、櫻井望<sup>1</sup>、飯島陽子<sup>1</sup>、青木考<sup>1</sup>、鈴木秀幸<sup>1</sup>、中島琢自<sup>2</sup>、小牧久幸<sup>2</sup>、原山重明<sup>2</sup>、柴田大輔<sup>1</sup> (<sup>1</sup>かずさ DNA 研究所、<sup>2</sup>NITE)

生物学はゲノム情報の利用によって変革を遂げた。そしていま DNA の情報のみならず、RNA、蛋白質、代謝化合物などにおいても、構成要素の全て情報を余すところなく取り出してデータベース化し、利用しようという時代になった。しかし代謝化合物情報に関してはまだ完全に把握できる段階とは言い難く、メタボロームという言葉が使われていても、実際はゲノム情報からの推定と、一部の既知化合物の把握を指しているのが現状である。フーリエ変換質量分析器を使うと分子量を高精度で測定できることから、化合物の組成式が割り出すことが可能になる。私たちは、精密分子量(予想組成式)、高速液体クロマトグラフィーの溶出時間、化合物イオンのフラグメンテーションパターンに基づいて、抽出サンプルに含まれる化合物を、サンプル間で自動比較するシステムを構築し、微生物代謝物を未知物質も含めてデータベース化を進めている。いくつかの菌類について解析事例を報告する。

### Automated Comparison System for Fungal Metabolome

Koei Okazaki,<sup>1</sup> Daisuke Nakajima,<sup>1</sup> Tsutomu Hosouchi,<sup>1</sup> Nozomu Sakurai,<sup>1</sup> Yoko Iijima,<sup>1</sup> Koh Aoki,<sup>1</sup> Hideyuki Suzuki,<sup>1</sup> Takuji Nakashima,<sup>2</sup> Hisayuki Komaki,<sup>2</sup> Shigeaki Harayama,<sup>2</sup> Daisuke Shibata<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Kazusa DNA Res. Inst., <sup>2</sup>NITE)

## O-9

### 糸状菌 *Aspergillus nidulans* ヒスチジンキナーゼの機能解析

金丸京子, 松井哲児, 鈴木麻子, 山崎ゆかり, 加藤雅士, 小林哲夫 (名大・生命農)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* には、His-Asp リン酸リレー情報伝達機構に関与する因子として、ヒスチジンキナーゼ 15 種類、レスポンスレギュレーター 4 種類、リン酸基転移中間因子 1 種類が存在し、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 15 種類のヒスチジンキナーゼのうち、*Aspergillus* 属に特異的に存在し有性生殖期に多く発現するヒスチジンキナーゼ HK8-2 に焦点をおいてその機能解析を行った。まず、HK8-2 欠失変異株 ( $\Delta$ 8-2 株) を作製し、生育への影響を観察した。有性生殖を誘導するためにプレートの周りにテープを巻いて酸素を制限すると  $\Delta$ 8-2 株は野生株と同程度の生育を示したが、クライストセシアの形成率が低下していた。His-Asp リン酸リレー経路の下流に HOG 経路が存在すること、及び HogA が有性生殖にネガティブに影響することがすでに分かっていたため、次に  $\Delta$ 8-2 株における HogA 制御遺伝子の発現レベルを Real Time PCR により解析した。その結果、有性生殖期において *catA*, *gldB* の発現レベルが野生株に比べ上昇していた。さらに、*hk8-2* 遺伝子を *alcA* プロモーターの下流においた株を用いた解析結果もふまえて、HK8-2 の機能について考察する。

#### Analysis of Histidine kinase for His-Asp phosphorelay in *Aspergillus nidulans*

Kyoko Kanamaru, Tetsuji Matsui, Asako Suzuki, Yukari Yamazaki, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi

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

## O-10

### 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞壁構築シグナル伝達経路の解析

藤岡智則<sup>1</sup>, 水谷治<sup>2</sup>, 古川健太郎<sup>2</sup>, 佐藤奈津子<sup>2</sup>, 吉見啓<sup>3</sup>, 山形洋平<sup>2</sup>, 中島佑<sup>2</sup>, 阿部敬悦<sup>2,3</sup> (<sup>1</sup>クミアイ化学・生科研, <sup>2</sup>東北大院・農, <sup>3</sup>東北大・未来研)

真菌の細胞壁構築は cell wall integrity 経路と呼ばれる MAP kinase シグナル伝達経路によって制御されており、出芽酵母において研究が進んでいる。*Aspergillus* 属糸状菌においてもこの経路の存在が明らかとなっており、本経路が糸状菌の形態形成において非常に重要な働きを担っていると考えられているものの、知見はほとんど得られていない。我々は、糸状菌-酵母間での細胞壁の構造や形態における差異が、経路下流の MAP kinase-転写因子-標的細胞壁関連遺伝子の関係に起因すると推定し、この三者の関係に注目した糸状菌の細胞壁構築の制御機構の解析を行った。

出芽酵母の MAP kinase Mpk1p、転写因子 Rlm1p, Swi4/6p (SBF) の *A. nidulans* におけるホモログである MpkA, RlmA, AnSwi4/6 の遺伝子破壊株を造成した。 $\beta$ -1,3-グルカン合成酵素阻害剤 micafungin 処理による経路活性化時の *mpkA* 遺伝子の転写解析から、*A. nidulans* では出芽酵母と異なり、*mpkA* 遺伝子の転写制御は RlmA, SBF 以外の、MpkA 下流の未知の転写因子が行っていることが明らかになった。また、*mpkA*, *rlmA* 遺伝子破壊株における細胞壁関連遺伝子の転写解析により、*A. nidulans* では  $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子の転写制御は cell wall integrity 経路を介して RlmA が行っていること、さらに cell wall integrity 経路以外に細胞壁関連遺伝子の転写制御を行う未知のシグナル伝達経路が存在し、その経路は主に、 $\beta$ -1,3-グルカンとキチンの合成関連遺伝子の転写制御を行っていることが明らかとなった。

#### Analysis of the cell wall integrity signaling pathway in *Aspergillus nidulans*

Tomonori Fujioka<sup>1</sup>, Osamu Mizutani<sup>2</sup>, Kentaro Furukawa<sup>2</sup>, Natsuko Sato<sup>2</sup>, Akira Yoshimi<sup>3</sup>, Youhei Yamagata<sup>2</sup>, Tasuku

Nakajima<sup>2</sup>, Keietsu Abe<sup>2,3</sup> (<sup>1</sup>Kumiai Chem. Indust. Co., Ltd., <sup>2</sup>Tohoku Univ., Grad. Sch. Agri. Sci., <sup>3</sup>Tohoku Univ., NICHe)

## O-11

### *Aspergillus fumigatus* の産生するトリプロスタチン類の生合成遺伝子クラスターの同定

加藤直樹, 鈴木宏和, 高木海, 高橋俊二, 長田裕之 (理研・中央研・抗生物質)

*Aspergillus fumigatus* の産生するトリプロスタチン (TPS) 類は細胞周期を制御するジケトピペラジン化合物である。類縁体の構造によって微小管重合に対して阻害、あるいは促進する作用を示し、構造活性相関が非常に興味深く、そのファーマコアは抗ガン剤のリード化合物として期待される。そこで特定の TPS 類縁体の選択的生産、さらには新規類縁体の創製を目的に、生合成遺伝子クラスターの同定を行った。

*A. fumigatus* ゲノム情報中の推定 TPS 生合成遺伝子クラスターに含まれる 9 つの遺伝子のノックアウト株を作製した。初発の反応を担うと予測された非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS) 遺伝子の欠失により、TPS 生産が消失し、本遺伝子を含むクラスターが *A. fumigatus* において TPS 生産を担っていることが明らかとなった。NRPS による brevianamide F (cyclo-L- Trp-L-Pro) 生成に次いで、プレニル基の付加による TPS-B、インドール環へのメトキシ基の付加による TPS-A への変換が順に起きる。さらに環化反応、水酸化反応、プレニル基付加反応を経て、fumitremorgin C (FTM-C)、dihydroxy-FTM-C、FTM-B が生産される。野生株 (BM939 株) ではこれら複数の TPS 類が培地中に検出されるのに対し、ノックアウト株では、それが担う反応よりも下流の代謝産物生産が欠損し、特定の化合物の蓄積が認められた。また、異宿主発現させた酵素を用いた *in vitro* 反応により生成物を確認し、この一連の生合成経路の各段階を担う酵素遺伝子を同定した。今後は遺伝子欠失と過剰発現を組み合わせた生合成経路改変により、有用な生物活性を示す TPS 類、例えば、微小管重合促進活性を示す cycloTPS-D の効率的生産を目指していきたい。

#### Identification of tryprostatin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*

Naoki Kato, Hirokazu Suzuki, Hiroshi Takagi, Shunji Takahashi, Hiroyuki Osada  
(Antibiotics Lab., Discovery Res. Institute, RIKEN)

## O-12

### *Aspergillus nidulans* の低酸素応答に関するプロテオーム解析

志水元亨, 藤井達也, 梶尾俊介, 藤田健作, 北爪達也, 伊藤尚志, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

嫌気的な環境下において、糸状菌 *Aspergillus nidulans* は、細胞質における酸化的リン酸化に伴い硝酸をアンモニアへと変換することによりエネルギーを獲得すること (アンモニア発酵) が見出されている。このことから、カビは低酸素条件に応答してエネルギー代謝を変化させるユニークな機構を有していると考えられた。一方、*A. nidulans* の全ゲノム塩基配列中には少なくとも約 10,000 の遺伝子が存在すると予測されており、細胞内の様々な代謝において、これらが複雑な機能ネットワーク構造を形成することが予想される。そこで、本研究では、低酸素条件下におけるカビの嫌気代謝機構を明らかにするために、プロテオミクス的手法を用いて低酸素 (アンモニア発酵) 条件下におけるタンパク質の発現挙動の変化を経時的に追跡した。

硝酸を窒素源として、低酸素条件下にて 6,12,24 時間培養後、菌体からタンパク質を抽出し、二次元電気泳動に供した。好気条件下と泳動パターンを比較したところ、低酸素条件下において発現挙動が変化するタンパク質が多数確認された。MALDI-TOF-MS によるペプチドマスフィンガープリントから発現量が変化したタンパク質の同定を行った。その結果、嫌気条件下において、ペントースリン酸回路、グルタミン酸、脂肪酸、チアミン、ヌクレオチドおよび含硫アミノ酸の代謝経路の構成酵素をはじめとした種々のタンパク質の発現量が増加することが明らかとなった。特に、チアミンおよびヌクレオチド代謝とペントースリン酸回路の間のクロストークが、アンモニア発酵条件下において重要な役割を果たしていると考えられた。

#### Proteomic Analysis of *Aspergillus nidulans* under Anaerobic Conditions.

Motoyuki Shimizu, Tatsuya Fujii, Shunsuke Masuo, Kensaku Fujita, Tatsuya Kitazume, Takashi Ito, Naoki Takaya  
(Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

## O-13

### 米麴造りのポストゲノム解析

岩下和裕<sup>1,2</sup>、大北由佳<sup>1</sup>、河野美乃里<sup>1</sup>、西浦未華<sup>2</sup>、富村健太<sup>1</sup>、坂本和俊<sup>1</sup>、山田 修<sup>1</sup>、三上重明(1 酒総研・基盤, 2 広島大院・先端・生命機能)

麴菌の全ゲノム配列が報告され、醸造分野へのゲノム情報の利用が期待されている。しかし、これまでに米麴での経時的な全遺伝子発現及びタンパク質生産について検討した例はない。そこで、今後の清酒製造での研究開発の基盤情報とするため、米麴での全遺伝子の発現と生産タンパク質のプロファイル解析を行った。

使用菌株としては、清酒用麴菌の代表である RIB128 株を使用し、精米歩合 70% 日本晴を用い箱製麴を行った。盛、仲仕事、仕舞仕事、最高温度、出麴時に複数箇所からサンプリングを行い、直ちに液体窒素で凍結後 RNA 抽出を行った。続いて麴菌 DNACHIP により全遺伝子のトランスクリプトーム解析を行うと共に、出麴時の麴タンパク質のプロテオーム解析を行った。トランスクリプトーム解析の結果、盛から出麴にかけて麴菌の遺伝子発現は大きく変動することが明らかとなった。遺伝子の変動は、仲仕事から仕舞仕事の間で大きく、以前の NRIB3000 アレイの研究で報告された変曲点が観察された。また、出麴時の米麴抽出タンパク質のプロファイルを解析したところ、これまでに米麴の研究で知られているタンパク質に加えて多数のタンパク質が同定された。

#### Postgenomic analysis of rice koji making

Kazuhiro IWASHITA<sup>1,2</sup>, Yuka OHKITA<sup>1</sup>, Minori KOUNO<sup>1</sup>, Mika NISHIURA<sup>2</sup>, Kenta TOMIMURA<sup>1</sup>, Kazutoshi SAKAMOTO<sup>1</sup>, Osamu YAMADA<sup>1</sup>, Shigeaki MIKAMI<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>National Research Institute of Brewing, <sup>2</sup>Hiroshima Univ.)

## O-14

### 麴菌 *Aspergillus oryzae* の Non-Syntenic 領域の転写制御解析

玉野孝一<sup>1</sup>、佐野元昭<sup>2</sup>、山根倫子<sup>1</sup>、寺林靖宣<sup>1</sup>、戸田智美<sup>1</sup>、砂川美佐緒<sup>1</sup>、小池英明<sup>1</sup>、畑本修<sup>3</sup>、海附玄龍<sup>3</sup>、高橋理<sup>3</sup>、小山泰二<sup>3</sup>、旭井亮一<sup>4</sup>、阿部敬悦<sup>5</sup>、町田雅之<sup>1,2</sup> (1 産総研・セルエンジニアリング, 2 金沢工業大・ゲノム研, 3 野田産研, 4 産総研・生命情報工学研究センター, 5 東北大院農・応生科)

麴菌全ゲノム配列解析の結果、麴菌の遺伝子総数は約 12,000 個で近縁菌の *A. fumigatus* や *A. nidulans* に比べて 3,000 個ほど遺伝子が多いことが明らかとなった。更にこれらの麴菌固有の遺伝子群は麴菌ゲノムに特異的な領域 (Non-syntenic 領域, NSB) に存在することが認められた。NSB は加水分解酵素などの代謝系遺伝子が数多く存在していることから発酵に重要であるものと推測されるが、本研究では NSB の発酵の固体培養やその他培養条件での発現を解析することで、NSB の役割を解析することを目標とした。

麴菌 DNA マイクロアレイを用いた解析により、NSB の遺伝子群は固体培養で最も誘導され、逆に 42°C の培養で最も抑制されることが認められた。更に固体培養で誘導される NSB の遺伝子について調べた結果、代謝に関係する遺伝子で発酵に働く菌体外分泌酵素をコードする遺伝子群が主に誘導されることが明らかとなった。一方で NSB に存在する二次代謝物質合成に係る遺伝子は固体培養で全く誘導されていなかった。本研究から、NSB は麴菌による発酵生産に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

#### Transcriptional regulation of genes on the non-syntenic blocks of *Aspergillus oryzae*

Koichi Tamano<sup>1</sup>, Motoaki Sano<sup>2</sup>, Noriko Yamane<sup>1</sup>, Yasunobu Terabayashi<sup>1</sup>, Tomomi Toda<sup>1</sup>, Misao Sunagawa<sup>1</sup>, Hideaki Koike<sup>1</sup>, Osamu Hatamoto<sup>3</sup>, Genryou Umitsuki<sup>3</sup>, Tadashi Takahashi<sup>3</sup>, Yasuji Koyama<sup>3</sup>, Ryoichi Asai<sup>4</sup>, Keietsu Abe<sup>5</sup>, Masayuki Machida<sup>1,2</sup> (1 AIST RICE, 2 KIT, 3 NISR, 4 AIST CBRC, 5 Tohoku Univ.)

## O-15

### Woronin body 形成に関与する麹菌 *Aohex1* 遺伝子の選択的スプライシングの生理的意義

岩崎健太郎<sup>1</sup>, 山下修一<sup>2</sup>, 丸山潤一<sup>1</sup>, 北本勝ひこ<sup>1</sup> (東大院・農生科・<sup>1</sup>応生工・<sup>2</sup>生環生)

【目的】Woronin body は、菌糸損傷時に溶菌の伝播を防ぐため隔壁孔を塞ぐ糸状菌特有のオルガネラである。*A. oryzae* の Woronin body を形成する *Aohex1* 遺伝子の転写産物は選択的スプライシングを受け、スプライシング型と 50 アミノ酸長い非スプライシング型の 2 つのタンパク質を発現する<sup>1)</sup>。本研究では、*Aohex1* 遺伝子の選択的スプライシングが与える Woronin body の機能や形態への影響について解析した。

【方法・結果】*Aohex1* 遺伝子破壊株では、低浸透圧ショックによって菌糸の先端細胞が溶菌した際、隣接する細胞に溶菌が伝播する割合が高くなることが既に分かっている。また、破壊株では Congo red と micafungin に対する感受性を示す。この破壊株にスプライシング型の AoHex1 のみを発現させた場合、これらの表現型は相補されるが、非スプライシング型の AoHex1 のみでは完全には相補できなかった。現在、各種 AoHex1 発現株での Woronin body の違いを解析するために、透過型電子顕微鏡による形態観察や、ショ糖密度勾配による Woronin body の分画を行っている。

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

### Analysis of the effects caused by alternative splicing of *Aohex1* transcripts on Woronin body in *A. oryzae*.

Kentarō Iwasaki<sup>1</sup>, Shuichi Yamashita<sup>2</sup>, Jun-ichi Maruyama<sup>1</sup>, Katsuhiko Kitamoto<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, Dept. <sup>2</sup>Agric. and Envir. Biol., Univ. of Tokyo)

## O-16

### Localization and functional analyses of the AoSO protein in *Aspergillus oryzae*

Cristopher Salazar ESCAÑO, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

A network of interconnected hyphae is usually formed in mycelial colonies of filamentous ascomycete fungi. Cytoplasmic continuity via septal pores and hyphal fusion facilitate translocation of nutrients within colonies. In *Aspergillus* species, molecular mechanism regulating such mycelial network has not been intensively studied. Recently, it has been reported that 2 homologous proteins, SO (*Neurospora crassa*) and Pro40 (*Sordaria macrospora*) localize at the septal pore, similarly to Woronin bodies which plug during hyphal injury. These proteins are known to be necessary for hyphal fusion and sexual development in the ascomycete fungi. Here we report the characterization of the SO/Pro40 homolog (AoSO) from *Aspergillus oryzae*. Microscopic investigations of AoSO-EGFP fusion protein showed localization of AoSO in the septal pore as a punctuate dot under various stress conditions (high/low temperature, extreme acidic/alkaline pH, nitrogen/carbon starvation). This suggests that AoSO may regulate intercellular communication during environmental changes. In the *Aohex1* deletion strain lacking Woronin bodies, accumulation of the protein on the central portion of the septum was still evident under these stress conditions, although its migration to the septal pore was delayed. Furthermore, *Aoso* disruptants were obtained and will be phenotypically analyzed.

## O-17

### 麹菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシスの生理学的機能解析

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】我々はこれまでに細胞膜タンパク質 AoUapC と EGFP を融合した 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した。しかし、糸状菌においてはエンドサイトーシスの詳細な機構や役割に関してはほとんどわかっていない。本研究では、*S. cerevisiae* におけるエンドサイトーシス関連遺伝子である *SLA2/END4* の *A. oryzae* におけるホモログ *Aoend4* の条件発現株を作製し、糸状菌におけるエンドサイトーシスの生理学的機能の解析を行った。

【方法と結果】*AoEnd4* の発現抑制条件下においては、菌糸の生育が著しく阻害され、先端生長に異常をきたしていることが示唆された。また、さまざまなストレス条件下においても生育は阻害され、ストレス感受性であることが示された。さらに、AoUapC-EGFP およびエンドサイトーシス経路を染色する試薬である FM4-64 を用いてエンドサイトーシスが起こらないことを確認した。*AoEnd4* の発現抑制条件下では、細胞膜上にエンドサイトーシスによる取り込み不全が原因と考えられる陥入様構造が観察された。この陥入様構造は細胞壁の染色試薬である Calcofluor White と、FM4-64 により染色されたことから、エンドサイトーシスが欠損したことにより、取り込み部位に細胞壁成分が蓄積したものと示唆された。また、電子顕微鏡観察によっても陥入様構造に細胞壁が蓄積していることが確認された。次に、エンドサイトーシスによる取り込み部位に関する解析を行うため、エンドサイトーシス小胞形成の際のアクチン重合に関与し、エンドサイトーシスにおける取り込み部位に局在すると考えられている *S. cerevisiae* Abp1p の *A. oryzae* におけるホモログ *AoAbp1* と mDsRed の融合タンパク質を発現する株を作製した。*AoAbp1-mDsRed* は菌糸の細胞表面に存在し、先端で多く観察され、さらに菌糸の中程および基部でも観察されたことから、糸状菌においてエンドサイトーシスはそれらの部位で行われていることが示唆された。

#### **Analysis of physiological function of endocytosis in *Aspergillus oryzae***

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

## P-1

### リンゴ斑点落葉病菌の AM 毒素生合成遺伝子は複数コピー存在する。

播本佳明<sup>1</sup>, 児玉基一朗<sup>2</sup>, 山本幹博<sup>3</sup>, 尾谷 浩<sup>2</sup>, 柘植尚志<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名大院生農・<sup>2</sup>鳥取大農・<sup>3</sup>岡山大農)

リンゴ斑点落葉病菌は、宿主特異的 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 (*AMT1* および *AMT2*) を単離し、これら遺伝子が小型の CD 染色体にコードされていることを明らかにした。さらに、*AMT* 遺伝子を含む BAC クローン の塩基配列を決定し、118 kb の領域から新たに 23 個の推定読み枠(ORF)を同定した。毒素生産時と非生産時におけるこれら ORF の発現レベルの比較によって、*AMT1*、*AMT2* および 11 個の ORF が毒素生産時に高発現することを見出し、これら遺伝子を含む 69 kb 領域が毒素生合成遺伝子クラスターであると推定した。今回、これら遺伝子のうち *AMT2*、ORF6(チロクローム P450)および ORF11(チオエステラーゼ)の機能を遺伝子破壊によって解析した。遺伝子破壊株の解析によって、3 遺伝子はどれも本菌のゲノム中に 3 コピー存在することが明らかとなった。各遺伝子の 1 コピー破壊株は野生株に比べ毒素生産量が有意に減少し、ORF6 と ORF11 も毒素生合成に関与することが明らかとなった。そこで、これら ORF を *AMT3*、*AMT4* とそれぞれ命名した。さらに、*AMT2* と *AMT3* の 2 コピー破壊株を作出したところ、毒素生産量がさらに減少した。これら破壊株の病原性を検定したところ、各遺伝子の 1 コピー破壊株と *AMT3* の 2 コピー破壊株は野生株とほぼ同様な病原性を示した。一方、*AMT2* の 2 コピー破壊株は、正常な *AMT2* 遺伝子を 1 コピー有しているにもかかわらず、病原性をほとんど失った。以上の結果は、本菌の病原性発現には、少なくとも 2 コピーの *AMT2* が必要であることを示唆した。

### Presence of multiple copies of AM-toxin biosynthetic genes in the apple pathotype of *Alternaria alternata*

Yoshiaki Harimoto<sup>1</sup>, Motoichiro Kodama<sup>2</sup>, Mikihiro Yamamoto<sup>3</sup>, Hiroshi Otani<sup>2</sup>, Takashi Tsuge<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Fac. Agric., Tottori Univ., <sup>3</sup>Fac. Agric., Okayama Univ.)

## P-2

### トマトアルターナリア茎枯病菌において宿主特異的 AAL 毒素生合成遺伝子 (*ALT*) クラスターが座乗する conditionally dispensable (CD)染色体

赤木靖典, 赤松創, 尾谷浩, 柘植尚志<sup>1</sup>, 児玉基一朗 (鳥取大農, <sup>1</sup>名大院生農)

トマトアルターナリア茎枯病菌 (*Alternaria alternata* tomato pathotype) は、病原性因子である宿主特異的 AAL 毒素を生産する。AAL 毒素生合成を支配する *ALT* クラスターは、ポリケチド合成酵素 (PKS) 遺伝子 (*ALTI*) などを含む少なくとも 13 遺伝子群から構成されており、茎枯病菌のみが保有する 1.0 Mb CD 染色体に座乗している。世界各地から分離された茎枯病菌株における PFGE 核型分析の結果、本菌の CD 染色体は、菌株の由来には関わらず全て共通サイズ (1.0 Mb) を示した。そこで本研究では、茎枯病菌におけるこれら CD 染色体の起源・由来について検討した。CD 染色体および他の主要 (essential) 染色体 (E 染色体) 上の遺伝子に関して、分子系統学的解析を行った。その結果、各菌株の CD 染色体に座乗する *ALTI* および他の PKS 遺伝子の塩基配列はすべて同一であったのに対し、E 染色体上の遺伝子では菌株間で差異がみられた。またテロメア配列、反復配列などを用いた fingerprinting 解析の結果、各菌株間において多型が認められた。さらに rare cutting enzyme を用いた RFLP 解析においても、E 染色体座乗 PKS 遺伝子をプローブとした場合、菌株間で多型がみられるのに対し、CD 染色体上の *ALTI* をプローブとした場合では、バンドパターンは全ての茎枯病菌株で一致した。これらの結果から、茎枯病菌 CD 染色体の遺伝的バックグラウンドは他の染色体群とは異なっていると考えられた。さらに、茎枯病菌と他の *A. alternata* 菌株間における細胞融合により得られたハイブリッド株の解析結果から、茎枯病菌由来の CD 染色体が菌株間で選択的に移行および保持されることが明らかとなった。以上の結果より、茎枯病菌 CD 染色体は本菌における病原性染色体であり、本 CD 染色体が水平移動により茎枯病菌株の集団中に拡散した可能性が示唆された。

### A gene cluster on a conditionally dispensable (CD) chromosome controlling AAL-toxin biosynthesis in the tomato pathotype of *Alternaria alternata*

Yasunori Akagi, Hajime Akamatsu, Hiroshi Otani, Takashi Tsuge, Motoichiro Kodama

(Fac. Agric., Tottori Univ., <sup>1</sup>Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

### P-3

#### ***Fusarium oxysporum* におけるピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子の破壊**

本山 愛, 中原光一\*, 川端砂矢香\*, 金山典生\*, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大院農・\*サントリー)

*Fusarium oxysporum* はアルコール発酵能を有する (Shigh et al., 1991). アルコール発酵の初期反応であるピルビン酸からアセトアルデヒドへの変換はピルビン酸脱炭酸酵素が司っている. *F. graminearum* のゲノム情報を参考に, 縮重 PCR 法によって, トマト萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*: FOL) からピルビン酸脱炭酸酵素をコードすると考えられる遺伝子 (*pdcl*) をクローニングした (平成 18 年本学会で発表). FOL NBRC 6531 株を用いて *pdcl* 破壊株を作出した. *pdcl* 破壊株は好気条件下での菌糸生育, 胞子形成能に変化はみられなかったが, 嫌気条件 (アネロパックケンキ使用, 酸素濃度約 0%) 下での生育は遅延した. また, 液体振盪培養時のアセトアルデヒド, エタノール等の生産量の著しい低下がみられた. FOL は酸素分圧が低いと想定される植物の道管内で生育するため, 嫌気条件下での生育と病原性の関連性に興味を持たれた. そこで, *pdcl* 破壊株のトマトに対する病原性検定を行ったところ, 病原性の低下やレースの変化, 植物組織内進展速度に変化は認められなかった. 逆に, FOL の PDC1 過剰発現による表現型の変化をみるためにベクターを構築している.

#### **Disruption of pyruvate decarboxylase gene in *Fusarium oxysporum***

Ai Motoyama, \*Koichi Nakahara, \*Sayaka Kawabata, \*Norio Kaneyama, Tohru Teraka, Tsutomu Arie  
(Tokyo Univ. of Agric. & Tech., \*Suntory)

### P-4

#### **交配不全性糸状菌 *Fusarium oxysporum* における交配型遺伝子領域 (*MATI*) イディオモルフ入換え体の作出**

今井峻介・寺岡 徹・有江 力 (農工大院農・植物病理)

植物病原性糸状菌 *Fusarium oxysporum* は交配不全性 (asexual) である. ゲノム上に交配型遺伝子領域 (*MATI*) を持つこと, *MATI* には 2 つのイディオモルフ (*MATI-1*, *MATI-2*) が存在すること (Arie et al. 2000), *MATI* 領域に存在する遺伝子が近縁で交配能を持つ *Gibberella fujikuroi* のものと極めて高い相同性を示すこと, 各々の遺伝子が発現していること (Yun et al. 2000) 等から, 本菌は本質的に self incompatible な交配能を保持していると想定される. 一方, *F. oxysporum* の 1 分化型であるトマト萎凋病菌 (FOL) では同一 VCG (vegetative compatibility group) に属する菌株間でのみ菌糸融合及びヘテロカリオンを形成できるが, 同一 VCG 内には単一の交配型の菌株しか存在しない (Kawabe et al. 2005). さらに, FOL の染色体パターンをパルスフィールドゲル電気泳動で調査したところ, 同一 VCG に属する菌株間でも多様性が認められたことから, FOL の交配不全性の原因として「交配可能な集団内における異交配型菌株の不在」を想定した. この仮説を検証するために, 同一 VCG に属し, 染色体パターンも同一で, 異なる交配型の菌株を人工的に作出することを試みた. FOL Tomino1-c 株 (*MATI-2*) の *MATI* 領域約 3.5 kb を 880621a-1 株 (*MATI-1*) の *MATI* 領域約 4.5 kb に入換えた形質転換体 Tomino1-c ( $\Delta$ *MATI-2*:*MATI-1*) 株を二回相同組換えによって作出した. 同時に, 異交配型の *MATI* 領域が異所に挿入され, ゲノム上 *MATI-2* と *MATI-1* を併せ持つ Tomino1-c (*MATI-2*:*MATI-1*) 株も作出した. 現在, これらの形質転換体の交配能を検定している.

#### **Replacement of *MATI* idiomorph in an asexual ascomycetes *Fusarium oxysporum***

Shunsuke Imai, Tohru Teraoka, Tsutomu Arie  
(Lab. of Plant Pathology, Tokyo Univ. of Agri. and Tech. (TUAT))



## P-5

### *Fusarium oxysporum* の病原性遺伝子変異株の生物防除活性

緒方 綾<sup>1</sup>, 飯田祐一郎<sup>1</sup>, 黒田克利<sup>2</sup>, 柘植尚志<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>名大院生農, <sup>2</sup>三重県科学技術振興センター)

*Fusarium oxysporum* 病害では、非病原性の *F. oxysporum* 菌株を各種作物に前接種することによって病害発生を抑制できること、すなわちこれら菌株が生物防除活性を有することが見出されている。しかしながら、全ての非病原性菌株が生物防除活性を示すわけではなく、有効な菌株の生理学的、遺伝学的特徴についてはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、生物防除に有効な非病原性株を作出するための遺伝学的情報の提供を最終目的として、先に同定したメロンつる割病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *melonis*) の病原性遺伝子のうち、*FOW2* と *FoPCK1* の変異株についてメロンつる割病に対する生物防除活性を検定した。*FOW2* は Zn(II)2Cys6 タイプの転写制御因子をコードし、その変異株は根表皮細胞への侵入能力を失い、メロンに対して全く病原性を示さない。*FoPCK1* は糖新生の鍵酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードし、その変異株は低頻度ではあるが、根表皮細胞へ侵入し、根組織中である程度増殖するが、病原性をほとんど失っている。各種濃度 ( $10^6$ ,  $10^7$  および  $10^8$  細胞/ml) の変異株の bud cell 懸濁液を本葉が 1 枚展開したメロン苗に浸根接種した後、汚染土壌 (野生株の bud cell を  $10^5$  細胞/g の濃度で添加) で 3 週間栽培し、継時的に発病程度を観察した。変異株無接種区では、20 日後には全ての苗が枯死した。 $\Delta$ *FOW2* 変異株を前接種した場合には、前接種 bud cell 濃度に依存して顕著な発病抑制が認められ、 $\Delta$ *FOW2* 変異株が高い生物防除活性をもつことが明らかとなった。一方、 $\Delta$ *FoPCK1* 変異株を前接種した場合には、むしろ発病が助長され、本変異株は生物防除活性をもたないことが明らかとなった。以上の結果は、同じ菌株由来の非病原性変異株でも、変異遺伝子によって生物防除活性が異なることを示した。

#### Biological control activity of pathogenicity mutants of *Fusarium oxysporum*

Aya Ogata<sup>1</sup>, Yuichiro Iida<sup>1</sup>, Katsutoshi Kuroda<sup>2</sup>, Takashi Tsuge<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Mie Pref. Sci. Technol. Prom. Cent.)

## P-6

### アブラナ科野菜類炭疽病菌の効率的な遺伝子ターゲティング実験系の確立

寺田 寛, 坪井基枝, 牛丸拓磨, 辻 元人, 久保康之 (京府大院・農)

アブラナ科野菜類炭疽病菌はモデル植物シロイヌナズナに感染することから、病原菌-植物間相互作用を解析する上で有用な病原系状菌である。本菌における遺伝子機能解析を進めるにあたり、相同組み換えを利用した標的遺伝子破壊実験系の確立は重要である。しかしながら、本菌より単離した 2 種の遺伝子、ポリケチド合成酵素遺伝子 *ChPKS1* および酵母 *SSD1* オルソログ *ChSSD1* について、アグロバクテリウム形質転換 (AtMT) 法による標的遺伝子破壊実験を行ったところ、その破壊効率はそれぞれ 2.4%、0.6% と極めて低く、破壊株作出が困難であることが明らかとなった。近年、非相同組換えに関与する遺伝子 *mus-51* を欠損させたアカパンカビにおいて、相同組換え効率が上昇するとの報告がされている。そこで、degenerate PCR 法によりアブラナ科野菜類炭疽病菌から *mus-51* オルソログ (*ChMUS51*) を単離し、*chmus51* 破壊株を作出した。その性状解析を行ったところ、菌糸生育、胞子形成、感染器官分化および病原性のいずれにおいても野生株との差は認められなかった。そこで、本系統を親株とした *ChPKS1* および *ChSSD1* 破壊実験を行った結果、破壊効率はそれぞれ 97.5%、98.3% と野生株と比較して大きく上昇した。以上の結果から、AtMT 法を用いた本菌の効率的な遺伝子破壊株の作出に *chmus51* 破壊株が有用であると考えられた。

#### Establishment of efficient gene targeting system in *Colletotrichum higginsianum*.

Hiroshi Terada, Kie Tsuboi, Takuma Ushimaru, Gento Tsuji, Yasuyuki Kubo

(Grad. Sch. Agri., Kyoto Pref. Univ.)

## P-7

### ウリ類炭疽病菌の分裂酵母 *tea1* ホモログ変異株を利用した付着器形成に関与する $\text{Ca}^{2+}$ シグナル関連遺伝子の探索

坂口 歩・辻 元人・久保康之（京府大院農）

ウリ類炭疽病菌における分裂酵母 *tea1* ホモログ *ClaKEL2* の遺伝子破壊株は、人工基質上で異常形態の付着器を形成するが、宿主上では正常付着器を形成する。このことから、本菌の付着器分化には少なくとも2つ以上の情報伝達経路が存在することが考えられ、また、この *clakel2* 破壊株の正常付着器分化には、植物因子により誘導される  $\text{Ca}^{2+}$ シグナル伝達経路が関与していることを示す結果がすでに得られている。本研究では、AtMT法を用いて *clakel2* 破壊株を親株とした T-DNA 挿入変異株を作出し、付着器分化に関与する  $\text{Ca}^{2+}$ シグナル関連遺伝子の探索を行った。最初に、得られた 8485 株の T-DNA 挿入株について、400 mM  $\text{CaCl}_2$  添加 PDA 上で培養し  $\text{CaCl}_2$  に対して耐性または感受性を示す株、およびコロニー形態が親株と異なる株 945 株を  $\text{Ca}^{2+}$ シグナル伝達関連遺伝子変異候補株として選抜した。次に、得られた候補株の宿主上での付着器形態を観察し、付着器形態異常を示した 30 株を選抜した。現在、これら異常付着器形成株の *ClaKEL2* 相補試験を行い、宿主上で正常付着器形成を示す株を、宿主上での *clakel2* 破壊株の正常付着器形成に関与する遺伝子破壊候補株として同定を行っている。

#### **A search for $\text{Ca}^{2+}$ signaling related genes involve in appressorium development by using *Schizosaccharomyces pombe tea1* homologue mutant of *Colletotrichum lagenarium*.**

Ayumu Sakaguchi, Gento Tsuji, Yasuyuki Kubo.

(Grad. Sch. Agri., Kyoto Pref. Univ.)

## P-8

### ウリ類炭疽病菌の NADPHoxidase をコードする *ClaNOX1*、*ClaNOX2* 遺伝子の機能解析

太澤貴紀, 辻 元人, 久保康之（京府大院・農）

ウリ類炭疽病菌から NADPHoxidase をコードする遺伝子 *ClaNOX1*、*ClaNOX2*、*ClaNOX3* を単離した。そのうち *ClaNOX1*、*ClaNOX2* の破壊株の作出に成功し、遺伝子の機能解析を行った。*clanox1* 破壊株は野生株と比べて孢子形成量の減少が見られたが孢子発芽や付着器の分化、病原性に違いは見られなかった。一方、*clanox2* 破壊株はキュウリ子葉を用いた病原性試験で野生株と比較して顕著な病斑形成率の低下が認められた。また、有傷接種では *clanox2* 破壊株は野生株様の病斑を示し、*ClaNOX2* は宿主内進展に関与していないことが示唆された。一方、セルロース膜上では、*clanox2* 破壊株は孢子発芽から付着器形成過程における形態形成は野生株と同様であったが、侵入菌糸の形成は全く見られず貫穿糸の形成も見られなかった。このことから、*clanox2* 破壊株の病原性の低下は貫穿糸が形成できないことによると考えられた。しかしながら、*clanox2* 破壊株をキュウリ子葉の裏表皮に接種し、侵入菌糸を観察したところ、一部で侵入菌糸の進展が観察された。このことから、*ClaNOX2* は付着器からの侵入菌糸形成過程に関与するが、植物体上では *ClaNOX2* を介さない経路が働く可能性が考えられた。

#### **Characterization of *ClaNOX1* and *ClaNOX2* genes coding for NADPHoxidase in *Colletotrichum lagenarium*.**

Takanori Osawa, Gento Tsuji, Yasuyuki Kubo

(Grad. Sch. of Agric., Kyoto Prefectural Univ)

## P-9

### Mglig4 は *Magnaporthe grisea* の非相同末端結合修復に関与する

鬼頭英樹, 藤川貴志, 西村麻里江 (生物研)

糸状菌を含めた多くの真核生物における二本鎖 DNA 切断の修復機構の一つに非相同末端結合修復がある。真核生物の非相同末端結合修復に重要な機能を持ついくつかの遺伝子のうち、ヒトの Ku70 ホモログ (Mgku70) および Lig4 ホモログ (Mglig4) の植物病原性糸状菌 *Magnaporthe grisea* における機能を調べた。

*MgKU70* と *MgLIG4* の構造遺伝子領域を Hygromycin phosphotransferase 遺伝子で置換し遺伝子破壊を行った。*mgku70*、*mglig4* 破壊株では栄養成長、交配能、病原性については野生型株との間に違いが見られなかった。野生株、*mgku70* 破壊株、*mglig4* 破壊株に対して形質転換をした場合の遺伝子ターゲティング効率は *mgku70* 破壊株で野生株の約 2 倍、*mglig4* 破壊株で約 5 倍に上昇した。*mgku70* 破壊株は各種二本鎖切断因子に対して野生株と同等の耐性を示した。*mglig4* 破壊株では UV、4-Nitroquinoline 1-oxide, camptothecin に対し感受性が増したが、ethylmethanesulfonate、Hydroxyurea、Etoposide、Bleomycine では変化がなかった。*mglig4* 破壊株に *MgLIG4* を再度導入した相補株では、遺伝子ターゲティング効率、薬剤耐性が野生型を回復した。

以上のことから、*M. grisea* の非相同末端結合修復において、*Mgku70* と異なり *Mglig4* は重要な機能を持つことが明らかになった。

(本研究は生研センター異分野融合研究事業により支援を受けた。)

### Mglig4, a human Lig4 homolog, is involved in non-homologous end-joining events in *Magnaporthe grisea*.

Hideki Kito, Takashi Fujikawa, Marie Nishimura

(NIAS)

## P-10

### イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* のキチン合成酵素の生長、分化、病原性における役割の解析

本山高幸<sup>1</sup>, 落合奈緒子<sup>1</sup>, 工藤俊章<sup>2</sup> (<sup>1</sup>理研・中央研、<sup>2</sup>長崎大・水産)

【目的】キチンは糸状菌細胞壁の主要成分であり、糸状菌の生長分化において重要な役割を持つ。一方、植物と植物病原糸状菌との相互作用においてはキチンは重要なシグナル物質として働くことが知られている。特にイネといもち病菌の系ではイネにおけるキチンレセプターがクローニングされるなど解析が進んでいる。本研究では、イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* のキチン合成酵素がイネとの相互作用においてどのような役割を持つかについて明らかにすることを目的とする。

【方法・結果】イネいもち病菌のゲノム中にはクラス I からクラス VII まで合計 7 種のキチン合成酵素遺伝子が存在する。まず、発現量の多いクラス I キチン合成酵素遺伝子の破壊株を作製したが、野生株との顕著な違いは認められなかった。次に、クラス I キチン合成酵素と重複した機能を持つことが知られているクラス II キチン合成酵素との二重遺伝子破壊株を作製したところ、顕著な生育の遅延、キチン合成酵素阻害剤感受性の上昇、分生子形成能の低下、感染特異的器官 (付着器) の形成能と機能の低下が認められた。

### Analysis on roles of chitin syntases of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in growth, differentiation, and pathogenicity

Takayuki Motoyama<sup>1</sup>, Naoko Ochiai<sup>1</sup>, Toshiaki Kudo<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Discovery Res. Institute, RIKEN, <sup>2</sup>Fac. Fish., Univ. Nagasaki)

## P-11

### *Aspergillus niger* の分生子を用いたシアン非感受性呼吸系酵素遺伝子(*aox1*)の視覚的な発現解析

服部貴澄, 本田裕樹, 木野邦器, 桐村光太郎 (早大・理工・応化)

【目的】クエン酸生産系状菌 *Aspergillus niger* WU-2223L には、alternative oxidase(AOX)が触媒するシアン非感受性呼吸系が存在する。演者らは、AOX 遺伝子(*aox1*)と EGFP 遺伝子(*egfp*)の融合遺伝子を用いた視覚的な発現解析系を構築し、菌糸における *aox1* の構成的発現を確認した<sup>1)</sup>。本研究では、単核かつ単細胞の *A. niger* の分生子を発現解析に供し AOX-EGFP の蛍光測光により、代表的なストレスである熱および浸透圧に対する *aox1* の発現応答について解析した。

【方法および結果】上流領域を含む *aox1* の下流に *egfp* を連結した融合遺伝子を、*A. niger* WU-2223L 由来の *aox1* 破壊株に導入した AOXEGFP-1 株を供試菌として使用した。AOXEGFP-1 株の菌糸においては AOX-EGFP の蛍光強度と AOX 活性が正に相関し蛍光強度による発現解析が可能である<sup>1)</sup>。さらに、AOXEGFP-1 株の分生子を用いた AOX-EGFP の蛍光測光により、*aox1* の視覚的かつ定量的な発現解析を可能とした<sup>2)</sup>。一方、*aox1* の上流領域には HSE や STRE が存在する。そこで、AOXEGFP-1 株の分生子を利用した AOX の生理学的機能の解析例として熱等に対する *aox1* のストレス応答の解析を行った。40°C で 1 時間処理し熱ストレスを与えた分生子において予想通り AOX-EGFP の蛍光強度の増大を検出した。以上より、AOXEGFP-1 株の分生子を用いて、*aox1* のストレス応答の視覚的な発現解析に成功し、AOX が熱等のストレスに関連した生理学的機能と関連する可能性が示唆された。

- 1) K. Kirimura, et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 210-214 (2006)
- 2) T. Hattori, et al., *J. Biosci. Bioeng.*, submitted.

#### Visual Expression Analysis of the Alternative Oxidase Gene (*aox1*) in the Conidia of *Aspergillus niger*

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

## P-12

### クエン酸生産系状菌 *Aspergillus niger* における NADP<sup>+</sup>依存性 isocitrate dehydrogenase 遺伝子(*icdA*)の高発現による代謝改変

林理恵, 服部貴澄, 木野邦器, 桐村光太郎 (早大・理工・応化)

【目的】クエン酸は TCA 回路内の主要な中間体の一つであり、クエン酸生産系状菌 *A. niger* におけるクエン酸の大量蓄積には、NADP<sup>+</sup>依存性 isocitrate dehydrogenase (NADP<sup>+</sup>-ICDH) が関連するとされている。本研究では、クエン酸生産系状菌 *A. niger* WU-2223L において NADP<sup>+</sup>-ICDH 遺伝子(*icdA*)の高発現を行い、クエン酸生産量をはじめとする代謝改変を検討した。

【方法および結果】系状菌用高発現プロモーター *P-No8142* の下流に *A. niger* WU-2223L 由来の *icdA* cDNA<sup>1)</sup> を連結したプラスミドを WU-2223L に導入し、WU-2223L と比較してクエン酸生産条件において約 4 倍の NADP<sup>+</sup>-ICDH 比活性を示す OPI-1 株を取得した。また、同条件で 12 日間培養した場合、OPI-1 は WU-2223L と比較してクエン酸生産量が約 25%、消費グルコース量が約 15%減少した。これは NADP<sup>+</sup>-ICDH 比活性の上昇によりイソクエン酸の分解が促進されるとともに、TCA 回路の進行により解糖系の進行が抑制されたものと考えられる。以上より、*icdA* の発現量を変化させることにより人為的にクエン酸生産性を改変しうる可能性が示唆された。

- 1) K. Kirimura, et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 136-144 (2002)

#### Metabolic Changes by Overexpression of NADP<sup>+</sup>-specific Isocitrate Dehydrogenase Gene (*icdA*) in Citric Acid-Producing *Aspergillus niger*

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

## P-13

### 麹菌 *A. oryzae* における後期エンドソーム構造の同定

正路淳也, 辰巳晶紀, 菊間隆志, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】真核微生物の液胞は、細胞質の恒常性を維持するとともに、産業上重要な多くの加水分解酵素を含む。これまで我々は、糸状菌 *Aspergillus oryzae* において液胞への小胞輸送および液胞機能の解析を行ってきた。しかし、液胞への輸送において重要な中間構造体である後期エンドソームに関する知見の不足が更なる解析を妨げていた。そこで本研究では、出芽酵母の後期エンドソームに局在する複数のタンパク質の相同タンパク質を用いることで、*A. oryzae* における後期エンドソーム構造の同定を行った。

【方法と結果】出芽酵母において後期エンドソームに局在する Vps23p、Snf7p、Syn8p の *A. oryzae* における相同タンパク質 AoVps23p、AoSnf7p、AoSyn8p と EGFP の融合タンパク質を発現し、その局在を蛍光顕微鏡により観察した。その結果、いずれの融合タンパク質も液胞近傍の粒状構造体に局在することが分かった。さらに AoVps23p-EGFP 融合タンパク質と AoSnf7p-mDsRed または mDsRed-AoSyn8p 融合タンパク質がこの粒状構造体において共局在することを明らかにした。このことから、これら融合タンパク質が局在する液胞近傍の粒状構造体は、出芽酵母の後期エンドソームと同等な機能を持つ構造体、すなわち *A. oryzae* における後期エンドソームであることが示唆された。さらに今回用いた融合タンパク質を後期エンドソームのマーカーとして用いることで、液胞膜上の t-SNARE タンパク質 AoVam3p が後期エンドソームにも局在すること、後期エンドソームの機能に関わると考えられる *Aovps24* の破壊によって、液胞と後期エンドソーム両者の性質を持つ複合オルガネラが生じることを明らかにした。

#### Identification of the late endosome in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

Jun-ya Shoji, Akinori Tatsumi, Takashi Kikuma, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto  
(Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

## P-14

### 麹菌 *A. oryzae* における Rab family GTPase の網羅的解析

平田恭子, 正路淳也, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】真核生物の細胞内において小胞輸送に関わる Rab GTPase は、輸送小胞が出芽する際に輸送小胞表面に集められ、小胞がその目的のオルガネラへ間違いなく輸送されるためのタグのような働きをしている。これまでに我々は、小胞輸送において中心的に働く全 21 個の SANRE タンパク質の局在を明らかにすることで、*A. oryzae* における小胞輸送の大まかな全体像を把握することに成功している。本研究においては、糸状菌細胞を小胞輸送という側面から細胞生物学的に理解し細胞内構造のより詳細な全体像を捉えるために、*A. oryzae* ゲノム情報から予想された 10 個の Rab GTPase の局在を、EGFP との融合タンパク質を用い網羅的に解析することを目的とする。

【方法と結果】*A. oryzae* において Rab GTPase をコードすると予想される遺伝子に対し、MultiSite Gateway Cloning System を用いることにより *egfp* との融合遺伝子(各遺伝子の 5' 末端側に *egfp* を融合)を *amyB* promoter 下において発現するベクターを順次構築し、これらを用いて *A. oryzae* niaD300 株の形質転換を行っている。さらに、蛍光顕微鏡を用いて各形質転換体の EGFP 蛍光を確認し、その局在を細胞染色等の結果と比較することにより各 Rab GTPase の細胞内局在部位を観察する予定である。これまでに Rab11、Sec4 のホモログである AoRab11、AoSec4 について形質転換体を取得し、EGFP 蛍光を観察した。その結果、いずれの融合タンパク質も、細胞質と同時に何らかのオルガネラ上に蓄積していることが分かった。今後、FM4-64 を用いた細胞染色によって局在部位の同定を行う予定である。また、その他の Rab GTPase についても同様に解析を進めていく。

#### Comprehensive analysis of Rab family GTPases in *Aspergillus oryzae*.

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

## P-15

### ***A. oryzae* 小胞体の糖タンパク質品質管理機構に関連する遺伝子群の機能解析**

渡邊泰祐<sup>1,2</sup>, 松尾一郎<sup>1,2</sup>, 戸谷希一郎<sup>1,2</sup>, 丸山潤一<sup>3</sup>, 北本勝ひこ<sup>3</sup>, 伊藤幸成<sup>1,2</sup> (理研<sup>1</sup>, CREST<sup>2</sup>, 東大院農生科・応生工<sup>3</sup>)

【目的】真核生物の小胞体において、アスパラギン結合型糖鎖を介した糖タンパク質の品質管理機構の存在が示唆されている。麹菌 *A. oryzae* のゲノム配列情報から、*A. oryzae* では糖タンパク質品質管理機構に関連する遺伝子群 (カルネキシン (CNX)、グルコシダーゼ II (GII)、UDP-グルコース-糖タンパク質グルコース転移酵素 (UGGT)、マンノシダーゼ等) の存在が明らかとなっている。しかしながら、これに関与するタンパク質としての機能を解析した研究は限られている。そこで我々は、*A. oryzae* の糖タンパク質品質管理機構を包括的に理解することを目的として、これらの遺伝子を系統的に破壊し、表現型解析を行った。

【方法と結果】MultiSite Gateway<sup>TM</sup> System を用いることにより、CNX, GII  $\alpha$  サブユニット, GII  $\beta$  サブユニット, UGGT をコードする遺伝子に *adeA* マーカーを挿入した遺伝子破壊用 DNA 断片を作製した。これらを *A. oryzae* *ligD* 欠損株 NAR-AID3 (*niaD* *sC* *adeA*  $\Delta$  *ligD*) に導入することにより、遺伝子破壊株を取得した。各遺伝子の破壊は、サザン解析により確認した。現在、各遺伝子破壊株の小胞体を含む膜画分を用いて、グルコシダーゼ II 活性、UGGT 活性に対する遺伝子破壊の影響を検討している。グルコシダーゼ II 活性は、蛍光タグが結合した Glc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> 糖鎖に対するグルコース切断反応、UGGT 活性に関しては、蛍光タグが結合した Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> 糖鎖に対するグルコース転移反応について、HPLC を用いた定量解析を行っている。

### **Functional analysis of the genes related with ER glycoprotein quality control in *Aspergillus oryzae***

Taisuke Watanabe<sup>1,2</sup>, Ichiro Matsuo<sup>1,2</sup>, Kiichiro Totani<sup>1,2</sup>, Jun-ichi Maruyama<sup>3</sup>, Katsuhiko Kitamoto<sup>3</sup>, Yukishige Ito<sup>1,2</sup> (RIKEN<sup>1</sup>, CREST<sup>2</sup>, Dept. of Biotech., Univ. of Tokyo<sup>3</sup>)

## P-16

### **麹菌 *A. oryzae* における分泌タンパク質 AmyB の動態解析**

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)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* は優れたタンパク質分泌能力を有しており、有用タンパク質生産の宿主として利用されていることから、その分泌機構の解明は重要である。糸状菌において分泌は主に菌糸先端から起こると考えられているが、隔壁など菌糸先端以外からの分泌が存在することも示唆されている。本研究では、*A. oryzae* において大量に分泌されるアミラーゼである AmyB を利用することにより、菌糸先端や隔壁への分泌を含む *A. oryzae* の分泌機構の全容を明らかにすることを目的とした。

【結果】AmyB の観察のため、AmyB に EGFP を付加した融合タンパク質を発現する株を使用した。この株を液体培地で培養すると、菌糸の先端と隔壁に EGFP 蛍光の局在が見られた。このことから、タンパク質分泌は菌糸先端及び隔壁の両方へ起こっていることが示唆された。一方、0.8%アガロースを含んだ培地で培養すると、EGFP 蛍光は菌糸の先端には見られたものの隔壁には見られず、かわりに細胞全体に小胞体様の蛍光が見られた。これに対し、アガロースを含む培地で生育させた菌糸に液体培地を添加したところ、隔壁においても EGFP 蛍光が見られるようになった。以上の結果から、菌糸先端へのタンパク質分泌はある程度恒常的に起こるものの、隔壁への分泌は環境条件によって制御されていることが示唆された。現在、隔壁への分泌が隔壁形成時のみ起こるのか、構成的に起こっているのかの検討を行っている。

### **Dynamics analysis of EGFP fused AmyB in *Aspergillus oryzae***

Eri Ishikawa, Jun-ya Shoji, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

## P-17

### 麹菌 *A. oryzae* におけるペルオキシソーム生合成因子 AoPex11 の機能解析

Praveen Rao JUVVADI<sup>1</sup>, Cristopher Salazar ESCAÑO<sup>1</sup>, 金鋒傑<sup>2</sup>, 高橋理<sup>2</sup>, 小山泰二<sup>2</sup>, 丸山潤一<sup>1</sup>, 北本勝ひこ<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>野田産研)

【目的】ペルオキシソームは真核生物に普遍的に存在するオルガネラであり、多数の peroxin と呼ばれるペルオキシソーム生合成因子がその形成に関与している。Woronin body タンパク質 Hex1 はC末にペルオキシソーム局在配列(PTS1)を有することから、これまでに Woronin body 形成へのペルオキシソームの関与が指摘されている。しかし、ペルオキシソームから Woronin body が分化・独立する機構についてはあまりわかっていない。peroxin のひとつである Pex11 はペルオキシソームの分裂・増殖に必要なことから、本研究では *A. oryzae* の *pex11* 相同遺伝子に着目し機能解析を行った。

【方法と結果】*PEX11* 遺伝子と同一性を有する遺伝子を *A. oryzae* ゲノムデータベースで検索した結果、2つ見出し、それぞれ *Aopex11-1*、*Aopex11-2* と命名した。これらの遺伝子について、*A. oryzae* Ku70 欠損株 NSRku70-1-1 (*niaD sC ΔargB adeA Δku70::argB*)を宿主とし、*adeA* マーカーを用いて破壊株を取得した。グルコースを炭素源とした培地では生育に影響は見られなかったが、オレイン酸を炭素源にすると *Aopex11-1* 遺伝子破壊株で生育阻害が認められた。また、ペルオキシソームおよび Woronin body を蛍光タンパク質で可視化したところ、*Aopex11-1* 遺伝子破壊により両オルガネラが肥大化しているのが観察された。現在、各遺伝子破壊株における Woronin body の機能への影響を解析している。

#### Functional characterization of AoPex11 involved in peroxisome biogenesis in *Aspergillus oryzae*

<sup>1</sup>Praveen Rao JUVVADI, <sup>1</sup>Cristopher Salazar ESCAÑO, <sup>2</sup>Feng Jie JIN, <sup>2</sup>Tadashi TAKAHASHI, <sup>2</sup>Yasuji KOYAMA, <sup>1</sup>Jun-ichi MARUYAMA, <sup>1</sup>Katsuhiko KITAMOTO (<sup>1</sup>Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>Noda Inst. Sci. Res.)

## P-18

### 麹菌 *A. oryzae* におけるキネシン様タンパク質 AoKin3 を用いたエンドソームの動態解析

滝口鉄也、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】エンドソームは、エンドサイトーシスにより取り込まれた輸送小胞およびトランスゴルジ網からの輸送小胞と融合し、運び込まれたタンパク質の分類と選別を行うオルガネラである。我々は麹菌 *A. oryzae* を用いて、糸状菌におけるエンドソームの動態解析を試みている。これまで、細胞膜タンパク質である AoUapC と EGFP の融合タンパク質 AoUapC-EGFP を用いて、エンドソームが菌糸中を平均 5  $\mu$ m/s で微小管依存的に動くことを示した<sup>1)</sup>。本研究ではエンドソームの動態とモータータンパク質との関係を明らかにするため、まずキネシン様タンパク質の可視化を行った。

【方法と結果】*Ustilago maydis* において微小管プラス端方向へのエンドソーム輸送に関与するとされる UmKin3 のホモログ AoKin3 と EGFP との融合タンパク質を発現する株を作製し、その動態を解析した。その結果、AoKin3-EGFP は AoUapC で観察されたエンドソームと同様の挙動を示し、菌糸中を先端および基部の両方向へ移動した。また薬剤を用いた実験から、この動態が AoUapC-EGFP で可視化されたエンドソームの動態と同様に、アクチン非依存的であり、微小管依存的であることが分かった。次にエンドサイトーシス経路の染色試薬である FM4-64 との共染色を行った。その結果、AoKin3-EGFP が FM4-64 と共局在しながら菌糸内部を移動している様子が観察された。以上のことから AoKin3 はエンドソームに局在し、エンドソームの動態を制御するキネシンであることが示唆された。現在、AoKin3 のより詳細な動態解析を行うため、異なる蛍光タンパク質と融合した  $\alpha$ -チューブリンおよび AoKin3 を同時に発現する株の作製を行っている。

1) Higuchi Y. et al.(2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 784-791.

#### Analysis of the movement of endosome using AoKin3 in *Aspergillus oryzae*

Tetsuya TAKIGUCHI, Yujiro HIGUCHI, Jun-ya SHOJI, Manabu ARIOKA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

## P-19

### 麹菌 *A. oryzae* におけるペルオキシソーム局在配列レセプターAoPex5,7の機能解析

田鍋康子, 岩崎健太郎, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】ペルオキシソームは真核細胞に存在するオルガネラであり、過酸化水素の無毒化や脂肪酸β酸化など様々な機能を持つことが知られている。ペルオキシソームへのタンパク質の輸送には、ペルオキシソーム局在配列であるPTS1、PTS2によって運ばれる2つのタイプがある。このときPTS1、PTS2配列を認識するレセプターがそれぞれPex5,7である。また、Woronin bodyは菌糸損傷時に溶菌の伝播を防ぐため隔壁孔を塞ぐ糸状菌特有のオルガネラであるが、これを形成するタンパク質AoHex1もPTS1配列を有している。本研究では、*A. oryzae*におけるペルオキシソーム局在シグナルレセプターPex5,7、およびAoHex1のPTS1配列の機能解析を行った。

【方法・結果】PEX5遺伝子の配列をもとに*A. oryzae*のゲノムデータベースで検索した結果、相同な遺伝子を見出し、*Aopex5*と命名した。AoPex5は、*Saccharomyces cerevisiae*、*Homo sapiens*のPex5とそれぞれ25.5%、20.1%の相同性を有する。*Aopex5*遺伝子について、*A. oryzae* Ku70欠損株NSRKu70-1-1を宿主として用い、*adeA*マーカーで置換することで破壊した。

一方で、Woronin body機能不全を示す*Aohex1*遺伝子破壊株を用いた相補実験により、AoHex1のPTS1配列の機能を調べた。その結果、PTS1欠損AoHex1発現によって*Aohex1*破壊株は相補されなかった。このことから、AoHex1のペルオキシソーム局在配列がWoronin bodyの機能発現に必要であることがわかった。今後は*Aopex7*破壊株の取得とともに、各遺伝子破壊株におけるペルオキシソームおよびWoronin bodyの機能を調べる予定である。

#### Functional analysis of the peroxisome targeting signal receptors AoPex5,7 in *A. oryzae*.

Yasuko TANABE, Kentaro IWASAKI, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO

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

## P-20

### 麹菌の産生する生分解性プラスチック分解促進蛋白質 RolA の疎水面への吸着部位の特定

上原健二<sup>1</sup>, 高橋徹<sup>1</sup>, 前田浩<sup>2</sup>, 山形洋平<sup>2</sup>, 長谷川史彦<sup>1</sup>, 五味勝也<sup>1</sup>, 阿部敬悦<sup>1</sup>

(東北大・未来研<sup>1</sup>, 東北大・農・応生科<sup>2</sup>)

[目的]我々は麹菌を用いた生分解性プラスチックの大規模分解リサイクル系の構築を目指している。麹菌はcutinase CutL1を分泌して生分解性プラスチックの一種であるPBSAを分解する(1)。我々は麹菌がPBSA分解時、CutL1以外に界面活性蛋白質hydrophobin RolAを産生し、RolAがCutL1をPBSA表面にリクルートして分解を促進する事を明らかにした(2)。またRolAが疎水表面に吸着後、表面上を水平方向に可動するという特殊な物理化学的な現象を見出した(2)。疎水表面に吸着した蛋白質がこのような現象を示すことは知られていない。本研究では、RolAの疎水表面における水平方向可動機構を解明すべく、RolAの疎水面への吸着部位の特定を試みた。

[方法・結果]1) RolA合成ペプチドを用いた競合阻害実験: RolAの全アミノ酸配列をカバーする6種のペプチドを合成した。疎水性物質への吸着に関わる領域が含まれるペプチドはRolAと競合的に疎水性物質に吸着すると考えられた。RolAの疎水性物質への吸着を阻害する合成ペプチドを探索し、阻害するペプチドを見出した。2)変異体RolAの疎水性物質への吸着実験: RolAのアミノ酸配列から、吸着に関与していると考えられる疎水性アミノ酸の集中する部位を置換した変異体を作製した。変異体の吸着能を調べたところ、吸着能が減少している変異体が見出された。

(1)Maeda *et al. Appl Microbiol Biotechnol* (2005) 67: 778–788

(2)Takahashi *et al. Mol Microbiol* (2005) 57(6), 1780–1796

#### Assignment of the binding region of *A.oryzae* hydrophobin RolA to hydrophobic surface

Kenji Uehara<sup>1</sup>, Toru Takahashi<sup>1</sup>, Hiroshi Maeda<sup>2</sup>, Youhei Yamagata<sup>2</sup>, Fumihiko Hasegawa<sup>1</sup>, Katsuya Gomi<sup>1</sup>, Keietsu Abe<sup>1</sup> (NICHe., Tohoku Univ.<sup>1</sup>, Grad.Sch., Tohoku Univ.<sup>2</sup>)



## P-21

### 麴菌の Ski 遺伝子群の探索と nonstop mRNA 分解への関与

田中瑞己<sup>1</sup>, 徳岡昌文<sup>2</sup>, 五味勝也<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>東北大院農・生物産業創成,<sup>2</sup>野田産研)

麴菌において異種遺伝子を発現させた場合、異種遺伝子 ORF 内への異常 poly(A) 付加が起こり、ストップコドンをもたない nonstop mRNA が生成され、nonstop mRNA decay (NSD) によって分解されることが示唆された。NSD の機構についてはこれまでに発芽酵母において、Ski7p による nonstop mRNA 認識に伴うエキソソームによる 3'→5' 分解モデル、および Ski7p 非依存的な 5'→3' エキソヌクレアーゼ Ski1p による 5'→3' 分解モデルが示されている。発芽酵母の Ski タンパク質と相同性を持つタンパク質を *Aspergillus* 属カビのゲノムデータベースから探索したところ、興味深いことに発芽酵母において NSD に重要な役割を担う Ski7p と相同性を示すタンパク質は存在しなかった。一方で、5'→3' エキソヌクレアーゼ Ski1p, エキソソームによる 3'→5' mRNA 分解に必須な因子である Ski 複合体の構成タンパク質の 1 つである Ski2p, エキソソームの構成サブユニットの 1 つである Ski4p と高い相同性を持つタンパク質が見いだされた。麴菌においてこれらの遺伝子破壊株を作製したところ、*ski1* 破壊株では発芽酵母と同様に著しい生育低下を示した。しかし、*ski4* 破壊株については、発芽酵母では致死性を示すことが報告されているのにも関わらず、麴菌においては生育にほとんど影響が現れなかった。一方、親株および *ski4* 破壊株において nonstop mRNA を発現させた結果、親株では nonstop mRNA 量が正常 mRNA 量と比較して著しく減少したのに対し、*ski4* 破壊株においては nonstop mRNA の減少が抑制された。このことから、麴菌においては nonstop mRNA はエキソソームによる 3'→5' 分解によって分解されることが示唆された。

#### Identification of Ski genes and their involvement in nonstop mRNA decay in *A.oryzae*

Mizuki Tanaka<sup>1</sup>, Masafumi Tokuoka<sup>2</sup>, Katsuya Gomi<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.,<sup>2</sup>Noda.Inst.Sci.Res.)

## P-22

### *Aspergillus nidulans* における protein O-mannosyltransferase 遺伝子群の機能解析

原田祐佳, 松本翔, 後藤正利 (九大院・生資環)

Protein O-mannosyltransferase(PMT)は、O-マンノース型糖鎖の初発合成酵素であり *Aspergillus nidulans* には、少なくとも *pmtA*, *pmtB*, *pmtC* の 3 種が存在する。先の研究で *A. nidulans* の *pmtA* 遺伝子破壊株が菌糸伸長能や分生子形成能の低下、バルーンの形成、高温、抗真菌薬剤への高感受性を引き起こすことを明らかにした。本研究では、*A. nidulans* の *pmtB*, *pmtC*, *pmtApmtB* 二重遺伝子破壊株を構築し、3 つの *pmt* 遺伝子の機能と相互関係に注目することで、O-マンノース型糖鎖の糸状菌細胞における機能の解明を目指した。

*A. nidulans* A89-AKU(*akuB::aurA*)を宿主として、相同組換えにより *pmtB*, *pmtC* 遺伝子破壊株( $\Delta pmtB$ ,  $\Delta pmtC$ )を取得した。また、 $\Delta pmtB$  株を宿主として *pmtApmtB* 二重遺伝子破壊株( $\Delta pmtApmtB$ )を構築した。 $\Delta pmtB$  株では、分生子形成能が宿主の約 50%に低下し、菌糸の分岐構造が増加していた。 $\Delta pmtApmtB$  株は菌糸伸長能や分生子形成能が著しく低下しており、菌糸では高頻度にバルーンが見られた。 $\Delta pmtC$  株では、菌糸が隔壁間で膨張した異常構造をしており、分生子形成能が欠損していたが、高温、高浸透圧条件下で培養することで分生子形成能が回復した。抗真菌薬剤については、 $\Delta pmtA$  株はキチン結合薬剤 Calcofluor white、 $\beta$ -グルカン合成阻害剤 Congo red に対し感受性を示すが、 $\Delta pmtB$  株及び  $\Delta pmtC$  株は Congo red に対してのみ感受性を示すことが明らかとなった。以上、各 *pmt* 遺伝子破壊株においてそれぞれ固有の異なる表現型が見られたことから、各 Pmt は *A. nidulans* 細胞内で異なる基質特異性を持ち機能していることが示唆された。

#### Functional analysis of the genes encoding protein O-mannosyltransferase of *Aspergillus nidulans*

Yuka HARADA, Sho MATSUMOTO, Masatoshi GOTO

(Grad.Sch.Biores.Bioenviron.Sci.,Kyushu Univ.,)

## P-23

### 麹菌 *Aspergillus oryzae* の潜在的な $\alpha$ -マンノシダーゼ活性について

芳賀 楓<sup>1</sup>、赤尾 健<sup>2</sup>、山田 修<sup>2</sup>、大町鉄雄<sup>1</sup>、吉田 孝<sup>1</sup> (<sup>1</sup>弘前大・農学生命、<sup>2</sup>酒総研)

麹菌の分泌糖タンパク質の糖鎖成形メカニズムを探る目的で、*A. oryzae* のゴルジ体型 1,2- $\alpha$ -マンノシダーゼ欠損株 ( $\Delta$ ManIB 株、2002 年糸状菌分子生物学コンファレンスで報告) 及びその親株 (*niaD* 株) からタカアミラーゼ (TAA) を精製し、その Asn 結合型糖鎖構造を比較した。酵素的に切り出された糖鎖をピリジルアミノ化後、HPLC により分析した結果、*niaD* 株と  $\Delta$ ManIB 株由来の TAA はいずれも M5 及び M6 と思われる糖鎖を有していた。一方、 $\Delta$ ManIB 株の培養上清について調べた所、ゴルジ体型 1,2- $\alpha$ -マンノシダーゼ活性は消失している事が確認された。これらの結果から今までに知られていないマンノシダーゼの関与が推定された。次に、菌体を破碎後、遠心分離した上清液より粗酵素液を調製し、高マンノース糖鎖、マンノピオース (1,2- $\alpha$  結合、1,3- $\alpha$  結合、1,6- $\alpha$  結合) 及び *pNP*- $\alpha$ -Man 等の基質に対する分解活性を調べた。その結果、マンノピオース基質については  $\Delta$ ManIB 株由来の粗酵素による加水分解は見られなかった。一方、*niaD* 株と  $\Delta$ ManIB 株由来のいずれの酵素ともに M8A、M5、*pNP*- $\alpha$ -Man に対する加水分解活性を示した。 $\Delta$ ManIB 株の  $\alpha$ -マンノシダーゼ活性に関し、さらに詳細な検討を進めている。

### A cryptic $\alpha$ -mannosidase activity in *Aspergillus oryzae*

Kaede Haga<sup>1</sup>, Takeshi Akao<sup>2</sup>, Osamu Yamada<sup>2</sup>, Tetsuo Ohmachi<sup>1</sup>, Takashi Yoshida<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Hirosaki Univ., <sup>2</sup>NRIB)

## P-24

### 糸状菌 *Aspergillus nidulans* のクラス III キチン合成酵素 ChsB の分生子形成、菌糸生長における役割

山田和成<sup>1</sup>、福田一治<sup>1</sup>、山下修一<sup>2</sup>、堀内裕之<sup>1</sup>、太田明德<sup>1</sup> (東大院・農生科・<sup>1</sup>応生工・<sup>2</sup>生環生)

糸状菌の形態を決める上で細胞壁の主要構成成分の一つであるキチンが重要な役割を担っていることが明らかにされている。*A. nidulans* にはそのゲノム配列よりクラス I-VII のキチン合成酵素をコードする遺伝子の存在が明らかになっているが、このうちクラス III のキチン合成酵素 ChsB をコードする遺伝子の破壊株は菌糸生長が大きく阻害され、菌糸は多分岐で分生子を全く形成しないことが明らかにされている。本研究ではまず ChsB の分生子形成への関与を検討するため、EGFP を ChsB の N 末端に連結した融合タンパク質 EGFP-ChsB を発現する株においてその分生子形成器官における局在観察を行った。その結果、EGFP-ChsB は分生子形成時には頂囊の表面、メトレの先端、メトレとフィアライドの境面、分生子の表面などへの局在がこれら器官の形成の進行に伴い順次観察されたが、頂囊およびメトレにおいて液胞と予想されるオルガネラでの蛍光も観察され、急速に分解されることが示唆された。一方、菌糸生長における役割を検討するため *chsB* 破壊株の菌糸について透過型電子顕微鏡を用いて観察を行ったところ菌糸の中に細胞壁が二重、三重に存在すると思われるものが多数確認され、ChsB が菌糸細胞壁の合成の極性を含めた制御において重要な働きを担うことが示唆された。

### Function of class III chitin synthase, ChsB, in the morphogenesis and hyphal growth of *Aspergillus nidulans*.

Kazunari Yamada<sup>1</sup>, Kazuharu Fukuda<sup>1</sup>, Shuichi Yamashita<sup>2</sup>, Hiroyuki Horiuchi<sup>1</sup>, and Akinori Ohta<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Biotechnol., Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>Dept. Agric. and Envir. Biol., Univ. of Tokyo)

## P-25

### *Rhizopus oryzae* のキチン合成酵素新規クラス VIII について

阿部 歩, 浅野 行蔵, 曾根 輝雄 (北大院農・応用菌学)

*Rhizopus oryzae* のゲノムには、担子菌類や子囊菌類に属する他の菌と比較して2倍以上の、26個ものキチン合成酵素遺伝子が存在している。この中には、これまでに報告のあるキチン合成酵素とは異なる新規なクラス (Class VIII) に属する遺伝子が2つ存在することを報告した。また、接合菌類の中でゲノム解析が行われている *Phycomyces blakesleeanus* についても解析したところ、クラス VIII に属する遺伝子があり、この新規なクラスは接合菌類特有のクラスであると推測された。一方これら接合菌類のゲノムにはクラス III や VI に属する遺伝子は見つからなかった。クラス VIII のキチン合成酵素の推定アミノ酸配列を他のクラスのものと比較したところ、ミオシンモータードメインやシトクローム b5 ドメインを持たず、系統樹からは近い位置にあるクラス V やクラス IV とは異なっていた。また、クラス VI とは CHS ドメインの位置が異なっていた。このようにクラス VIII に属するキチン合成酵素はこれまでに報告のあるものと異なった構造をもつと推測される。実際にキチン合成酵素として機能するか確認するために、*R. oryzae* (= *R. delemar*) CBS120.12 より、クラス VIII に属する遺伝子 RO3G\_08731 及び 11625 について遺伝子の全長を取得した。RT-PCR によりこれらの遺伝子の転写が行われていることを確認した。さらに、3'-RACE により全長 cDNA を取得し、大腸菌にてタンパク質発現を行っている。

#### New class VIII of chitin synthase gene in *Rhizopus oryzae*

Ayumi Abe, Kozo Asano, Teruo Sone

(Lab. of Appl. Microbiol., Univ. of Hokkaido)

## P-26

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

内田博教, 一宮維幸, 堀内裕之, 太田明徳 (東大院・農生科・応生工)

糸状菌には、発酵産業や酵素生産、異種タンパク質生産への利用など産業上有用なものが存在する一方、動植物に対する病原菌も存在する。糸状菌は、菌糸体を枝分かかれさせた複雑な形態形成を行うが、この構造上の特徴は上記両面の働きと密接に関与していると考えられている。細胞壁は、糸状菌が形態を維持する上で必須の構造であり、細胞壁合成・分解は糸状菌の生長・分化の各段階において厳密に制御されていると考えられる。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、細胞壁ストレスに対し細胞壁の完全性を維持する機構が存在し、プロテインキナーゼ C (PKC) が中心的な役割を担っていることが明らかにされているが、糸状菌においては、PKC の機能解析は遅れている。これまで当研究室では、糸状菌 *Aspergillus nidulans* における PKC ホモログをコードする *pkcA* 遺伝子の機能解析を目的として *pkcA* 欠失株が作製され、その致死性が示唆されていた。今回、*ku* 遺伝子破壊株を用いて *pkcA* 欠失株を作製したところ、菌糸生長が野生株に比べ著しく遅く多数の枝分かかれや溶菌が見られコロニーを形成できなかったことから、*pkcA* は *A. nidulans* の生育に必須であることが強く示唆された。さらに、*alcA* プロモーター下で *pkcA* を発現する株を作製し、高発現条件下における表現型を観察したところ、*alcA* の発現を誘導する完全培地上で野生株に比べ生育の低下が見られ、細胞壁合成を阻害する各種薬剤に感受性を示した。この結果は、*pkcA* の高発現により細胞壁合成制御に何らかの異常をきたしていることを示唆している。現在 *pkcA* 高発現条件下において、細胞壁合成酵素をコードする遺伝子の転写量を定量 PCR 法により解析中である。

#### Functional analysis of a protein kinase C gene from *Aspergillus nidulans*

Hirota Uchida, Masayuki Ichinomiya, Hiroyuki Horiuchi, and Akinori Ohta

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

## P-27

### 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 のドメイン互換性の解析

對崎真植、竹下典男、堀内裕之、太田明徳（東大院・農生科・応生工）

キチンは糸状菌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。*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) を持つタンパク質をコードする遺伝子が *csmA*、*csmB* の二種存在する。これまでに、各々の単独破壊株の生育遅延、形態異常等の表現型の類似性、二重破壊の合成致死性が示されている。また CsmA、CsmB は菌糸先端、隔壁形成部位に局在することが示されている一方<sup>1)</sup>、両者の機能的差異も示唆されている<sup>2)</sup>。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、*csmA* 破壊株 ( $\Delta A$  株) 及び *csmB* 破壊株 ( $\Delta B$  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 を発現させたところ、MACB $\Delta A$  株は  $\Delta A$  株における生育遅延や形態異常が回復せず、MBCA $\Delta A$  株は生育遅延が回復したが、形態異常は完全には回復しなかった。一方、MACB $\Delta B$  株は  $\Delta B$  株における生育遅延、形態異常が回復したが、MBCA $\Delta B$  株は回復しなかった。以上の結果から、CsmA の MMD は CsmB の MMD により機能の一部を代替できること、CsmB の MMD は CsmA の MMD により機能を代替できること、両者の CSD は相互に機能を代替できないこと等が示唆された。

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

2) 對崎ら、第 6 回糸状菌分子生物学コンファレンス講演要旨集、p. 79

#### Functional analysis of the domains of two chitin synthases, CsmA and CsmB, in *Aspergillus nidulans*

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

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

## P-28

### *Aspergillus nidulans* における cell wall integrity 経路の解析と MAP kinase 遺伝子 *mpkB* の機能解析

吉見啓<sup>1</sup>、藤岡智則<sup>2,3</sup>、丸井淳一郎<sup>1</sup>、萩原大祐<sup>1</sup>、佐藤奈津子<sup>2</sup>、水谷治<sup>2,4</sup>、古川健太郎<sup>2,5</sup>、阿部敬悦<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>東北大・未来研、<sup>2</sup>東北大院農・応生科、<sup>3</sup>現・クミアイ化学工業(株)、<sup>4</sup>現・酒類研、<sup>5</sup>現・ヨーテポリ大)

我々はこれまでに *A. nidulans* の cell wall integrity 経路について、MpkA MAPK をはじめとした経路構成遺伝子の機能解析、細胞壁合成関連遺伝子の転写解析、酵母相同遺伝子との比較解析を行ってきた。その結果、*A. nidulans* の cell wall integrity 経路は、酵母のものとは全く異なる様相を呈する事が判明した。特筆すべき点として、*A. nidulans* の MpkA は、 $\alpha$ -1,3-glucan 合成遺伝子群の転写を制御しており、 $\beta$ -1,3-glucan 合成遺伝子群の転写は別経路によって制御されていたことが挙げられる。*A. nidulans* には、MpkA と相同なリン酸化モチーフを有する MpkB MAPK が存在する。そこで、MpkB の cell wall integrity 経路への関与を明らかにするため、*mpkB* 遺伝子の破壊株を造成し、*mpkB* 破壊株における細胞壁合成関連遺伝子の転写解析、ミカフエンギンをはじめとする細胞壁合成阻害剤への感受性試験およびウエスタン分析によるリン酸化解析を行ったので報告する。また、*mpkA* 遺伝子破壊株におけるマイクロアレイ解析ならびに MpkA と MpkB の相互関係についても議論したい。(本研究は生研センター異分野融合研究事業により支援を受けた。)

#### Analysis of cell wall integrity pathway and functional analysis of MAP kinase gene *mpkB* in *Aspergillus nidulans*

Akira Yoshimi<sup>1</sup>, Tomonori Fujioka<sup>2,3</sup>, Junichiro Marui<sup>1</sup>, Daisuke Hagiwara<sup>1</sup>, Natsuko Sato<sup>2</sup>, Osamu Mizutani<sup>2,4</sup>,

Kentaro Furukawa<sup>2,5</sup>, Keietsu Abe<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Tohoku Univ., NICHe, <sup>2</sup>Tohoku Univ., Grad. Sch. Agri. Sci., <sup>3</sup>Kumiai Chemical Industry Co., Ltd, <sup>4</sup>National Research Institute of Brewing, <sup>5</sup>Göteborg Univ.)

## P-29

### 糸状菌 *A. nidulans* の速い先端成長を支える分子機構の研究

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

先端成長は、糸状菌の細く伸びた形態を形成する特徴的な成長様式で、多数の分子がネットワークを形成し協調的に機能する事により達成されると考えられている。我々は GFP 標識チューブリン等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を明らかにした。先端成長における微小管の必須な機能としては、①先端成長分子ネットワークの構造を維持するための骨組み、②成長端マーカー分子の運搬と成長点への埋め込み、③成長に必要な分子の成長端への運搬、等が考えられる。①については、微小管の破壊により成長端近傍に局在するパッチ状アクチンが散逸する事が分っている。アクチンパッチの散逸により、先端における膜融合を司る SNARE タンパク質の回収が阻害される。微小管はこれらの分子ネットワークが空間的に正しく配置されるための構造的な基盤となっていると考えられる。③について検討するために、*A. nidulans* ゲノム中に存在する 11 種のキネシンについて、蛍光標識タンパク質による局在の検討と遺伝子破壊を行った。キネシンの局在は大まかに、核/スピンドルに局在するもの、細胞質中にドット状に局在し細胞先端に集積するもの、特に特徴的な局在を示さないものに分類された。また全 11 種のキネシンの内、既に必須である事が報告されている BIMC を除いた 10 種については、すべて生育に必須でない事が明らかになった。これらの結果は、それぞれのキネシンの機能が互いにオーバーラップしている事を示唆する。

#### Analysis of molecular mechanism that supports rapid and steady tip growth of a filamentous fungus *A. nidulans*.

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

## P-30

### エノキタケがセルロース培養系において生産するグリコシダーゼに関する研究

石黒真希, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大・農生科)

エノキタケ(*Flammulina velutipes*)は、食用キノコを生産する担子菌として広く栽培されており、培地基材としては広葉樹材だけでなく針葉樹材も利用できることが知られている。このため、セルロース系バイオマスの変換利用という位置づけにおいても、本菌は有用な担子菌であると言える。しかしながら、本菌がセルロース系バイオマス分解時に菌体外に生産する酵素に関する研究は限られており、菌体外酵素の主成分であり細胞壁構造多糖のセルロースおよびヘミセルロースの分解に関与する糖質加水分解酵素の情報ほとんど得られていない。そこで本研究では、本菌がセルロース培養系において生産する菌体外糖質加水分解酵素群のキャラクタライズを試みた。

コットン由来の結晶性セルロースを 2%含む YP 培地 (pH 5.0) において、本菌を 26.5°C で 4 日間培養し、得られた菌体外酵素をカラムクロマトグラフィーにより分画した後、モデル基質に対する分解活性を測定した。その結果、糖質加水分解酵素ファミリー 7 に属するセロビオヒドロラーゼのほか、 $\beta$ -キシロシダーゼ、 $\alpha$ -アラビノフラノシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼおよび  $\beta$ -マンノシダーゼ活性を持つタンパク質がそれぞれ分画された。針葉樹におけるヘミセルロースは、主に、広葉樹キシランにはない L-アラビノフラノースの側鎖を有するアラビノグルクロノキシランやグルコマンナンおよびガラクトタンから構成されていることから、本菌が針葉樹細胞壁構造多糖の分解に関与する酵素を生産していることが示唆された。

#### Study of glycosidases produced in cellulose-degrading culture of *Flammulina velutipes*

Maki Ishiguro, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima  
(Dept. Biomat. Sci., Univ. of Tokyo)

## P-31

### 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来 Cel6A の反応特性

五十嵐圭日子、石田卓也、和田昌久、鮫島正浩（東大院・農生科）

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* は、セルロースを含む培地中において糖質加水分解酵素（GH）ファミリー6 に属するセロビオヒドロラーゼ（PcCel6A）を生産する。しかしながら、本酵素の諸性質に関する知見が少ないことから、本研究では、*P. chrysosporium* の全ゲノム配列情報を利用して Cel6A をコードする cDNA を取得し、メタノール資化性酵母を用いて PcCel6A を異宿主発現した。さらに、得られた酵素を、二段のカラムクロマトグラフィーによって精製し、シオグサ由来の高結晶性セルロースを基質として、吸着および分解挙動を調べ、表面密度に基づく解析を行った。その結果、PcCel6A は、糸状菌由来のセルラーゼの中で最も研究が盛んな *Trichoderma* 属由来 Cel7A と同程度の吸着が観察され、また分解産物であるセロビオースの生成量もほぼ同程度であった。しかしながら、*Trichoderma* 属由来 Cel7A とは異なり、表面密度の増加に対して反応生成物の生成速度が低下しないことが明らかとなった。このことから、PcCel6A は非生産的結合をしにくい酵素であると考えられた。

### Characterization of Cel6A from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*

Kiyohiko Igarashi, Takuya Ishida, Masahisa Wada, Masahiro Samejima

(Dept. Biomat. Sci., Univ. Tokyo)

## P-32

### シイタケの子実体形成に特異的な新規ファスシンクリン遺伝子 *Le.flp1*

宮崎安将<sup>1</sup>、金子真也<sup>2</sup>、砂川政英<sup>1</sup>、山崎丘<sup>2,3</sup>、宍戸和夫<sup>2</sup>、中村雅哉<sup>1</sup>、馬場崎勝彦<sup>1</sup>（<sup>1</sup>森林総研、<sup>2</sup>東工大院生命、<sup>3</sup>現・JAXA）

シイタケの子実体形成に特異的に働く遺伝子を網羅するため、遺伝子サブトラクション cDNA-RDA (cDNA-Representational Difference Analysis) を行った結果、105 クローン(子実体原基期51種、成熟子実体期54種)の遺伝子群が単離された<sup>1)</sup>。これら遺伝子は必須な代謝、細胞構築、シグナル伝達など多岐に係わることが推定されたほか、40 クローンについては機能未知であり、子実体形成に関与する「きのこに特有な未知遺伝子」であると考えられた。これらのクローンの1つ、子実体形成過程を通じて発現する新規遺伝子 *Le.flp1* は、細胞接着活性を有し動・植物などの形態形成にきわめて重要な働きをする「ファスシンクリン」様のタンパク質をコードしていた<sup>2)</sup>。In situ ハイブリダイゼーションの結果、*Le.flp1* 転写産物はシイタケ子実体において、(1)かさ、柄(茎)及び子実体原基の外側(表面)部分、(2)「ひだ」に局所的に分布していた。きのこを含む菌類界において、ファスシンクリンが見出されたのは初めてのことであり、*Le.flp1* 産物は細胞接着を介してきのこの子実体形成に重要な役割を担っていると考えられる。

1) Miyazaki et al.(2005) *Fungal.Genet.Biol.* **42**(6)493-505.

2) Miyazaki et al.(2007) *Curr.Genet.* **51**(6)367-375.

### The fruiting-specific *Le.flp1* gene, encoding a novel fungal fasciclin-like protein, of the basidiomycetous

mushroom *Lentinula edodes*. Yasumasa Miyazaki<sup>1</sup>, Shinya Kaneko<sup>2</sup>, Masahide Sunagawa<sup>1</sup>, Kazuo Shishido<sup>2</sup>, Takashi Yamazaki<sup>2,3</sup>, Masaya Nakamura<sup>1</sup>, Katsuhiko Babasaki<sup>1</sup>. (<sup>1</sup>Dept. Appl. Microbiol., FFPRI, <sup>2</sup>Dept. Life. Sci., Tokyo Tech., <sup>3</sup> Present address: JAXA)

## P-33

### 担子菌 *Coprinus cinereus* 由来糖質加水分解酵素ファミリー6 遺伝子の発現挙動

吉田 誠, 福田清春 (農工大・農)

【目的】担子菌は地球上で唯一、木材を完全分解可能な生物である。担子菌の生産するセルラーゼとして、セロビオヒドロラーゼ(CBH)およびエンドグルカナーゼが知られており、前者はさらに CBHI と CBHII に分けられる。また、これら CBH は、アミノ酸配列の相同性に基づく分類においては、前者は糖質加水分解酵素ファミリー7(GH7)に、後者はファミリー6(GH6)にそれぞれ属する。現在までに、様々な担子菌から両酵素をコードする遺伝子がクローニングされてきており、GH7 遺伝子をゲノム上に多コピー保持する担子菌が多数見出されているのに対して、GH6 遺伝子は多くの担子菌において単一コピーとして存在している。しかしながら、演者らが担子菌 *Coprinus cinereus* のゲノムデータベースを検索したところ、GH6 遺伝子に相同性を示す領域が5箇所見出された。そこで本研究では、これらの遺伝子をクローニングし、さらに、様々な培養条件における遺伝子の発現挙動を解析した。

【結果】ゲノム検索により見出された *C. cinereus* 由来 GH6 遺伝子の cDNA をクローニングし、塩基配列から予想されるアミノ酸配列をそれぞれ比較したところ、互いに高い相同性を示した。また、全ての GH6 遺伝子が分泌シグナルを有しており、そのうちの1種のみがN末端にファミリー1に属する糖質結合モジュールを有していることが明らかとなった。また、*C. cinereus* をグルコース、セルロースおよびキシランそれぞれを単一の炭素源とする培地で培養し、各酵素の遺伝子発現を調べたところ、それぞれの遺伝子が異なる発現挙動を示した。各遺伝子の発現挙動をさらに詳細に調べるために、*C. cinereus* を様々な単糖類および二糖類を炭素源とした培地で培養し、各遺伝子の発現挙動を比較した。

#### Transcript analysis of the genes encoding GH6 enzyme from the basidiomycete *Coprinus cinereus*

Makoto Yoshida, Kiyoharu Fukuda

(Faculty of Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

## P-34

### シイタケにおけるリグニン分解酵素の解析

坂本裕一・中出啓子・佐藤利次 (岩手生工研)

担子菌類におけるリグニン分解酵素は栄養成長期の養分獲得だけでなく、子実体形成や子実体の着色等にも寄与していると考えられる。また、近年ラッカーゼ等のリグニン分解酵素を用いたバイオレメディエーション等の応用研究が進められており、注目されている。そこで、日本において栽培量の多い担子菌類であるシイタケのリグニン分解酵素の解析を行った。これまで既に、シイタケにおいてラッカーゼ (Lcc)、マンガネルオキシダーゼ(MnP)活性が確認されていたことから、Lcc, MnP 遺伝子のクローニングを行った。その結果、シイタケから Lcc を4遺伝子 (*lcc1-4*)、MnP を2遺伝子(*mnp1,2*)クローニングすることが出来た。*lcc1* は、培養菌糸中で高い発現が認められ、培養時に分泌されるラッカーゼ Lcc1 をコードすることが明らかになった。*lcc4* は、収穫後に褐変したひだで発現し、褐変化に関わるラッカーゼをコードすることが明らかになった。*lcc2,3* は子実体の傘で発現し、*lcc2* はさらに収穫後に褐変したひだにおいても発現することが明らかになった。*mnp1,2* はともに液体培養ではほとんど発現せず、木粉培地で培養した菌糸で発現が認められた。しかしながら、*mnp2* のみが MnP 活性の上昇と相関して発現量が上昇することが明らかになった。また、木粉培地中に分泌される MnP を精製したところ、*mnp2* のペプチド抗体でのみ検出されることから、木粉培地中で分泌される MnP は MnP2 であることが明らかになった。

#### Lignin degrading enzymes in *Lentinula edodes*

Yuichi Sakamoto, Keiko Nakade, Toshitsugu Sato (Iwate Biotech. Res. Center)

## P-35

### 竹バイオマス分解過程において担子菌が生産する菌体外タンパク質の解析

堀 千明、五十嵐圭日子、鮫島正浩（東大院・農生科）

竹材は日本において古くから利用されていたが、放置された竹林による生態系への影響が問題となっていることから、新たな利用法の開発が望まれている。そこで本研究では、竹材をきのこ培地として利用することを視野に入れて竹材の生物変換の可能性を考察した。まず竹粉固体培地で食用担子菌 *Flammulina velutipes* (エノキタケ) を培養したところ、培地重量減少は木紛固体培地と同様な傾向がみられ、菌体の増加に伴い竹粉培地成分中の  $\alpha$ -グルカンが減少した。さらに竹粉を炭素源とする液体培地で *F. velutipes* を培養したところ、セルロースを炭素源とする場合より初期菌体生長が良好であった。この培養系で回収した菌体外タンパク質について糖質加水分解活性を調べたところ、セルロース培地との顕著な差として  $\alpha$ -グルカン分解活性を示した。以上から、竹材中の  $\alpha$ -グルカンが担子菌の生長にとって重要であり、竹材が生物変換によって利用できること、特にきのこ培地基材および初期生長を促進する栄養剤として利用できる可能性が示唆された。

#### Analysis of extracellular protein produced by basidiomycetes in bamboo degrading process

Chiaki Hori, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima

(Dept. Biomat. Sci., Univ. Tokyo)

## P-36

### 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来ピラノース酸化酵素のクローニングと大腸菌による生産

福田 明、五十嵐圭日子、鮫島正浩（東大院・農生科）

ピラノース酸化酵素 (POX) は、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を補欠分子族として含む酸化還元酵素であり、様々な単糖の C2 位または C3 位を酸化する反応を触媒することが知られている。本研究では POX の機能解析を目的として、担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来 POX をコードする cDNA (*pox*) をクローニングし、大腸菌を宿主として組換えタンパク質を生産した。塩基配列から推定されたアミノ酸配列を解析した結果、POX が菌体内に存在するタンパク質であると考えられ、グルコース-メタノール-コリン (GMC) 酸化還元酵素ファミリーに属する他の酸化酵素と同様、フラビントタンパク質のモチーフ、GMC 酸化還元酵素モチーフを有し、FAD 結合ドメインと基質結合ドメインの 2 つのドメインからなるタンパク質であることが示唆された。種々の単糖に対する反応性を測定した結果、得られた組換えタンパク質はグルコースに対して最も高い活性を示し、次いでキシロースに対して高い活性を示すことが明らかになった。両基質に対する反応速度パラメーターを算出したところ、それぞれの  $k_{cat}$  値に大きな違いは見られなかったがグルコースに対する  $K_m$  値はキシロースに対する  $K_m$  値の 1/40 程度であった。グルコースとキシロースの化学構造の比較から C6 位の構造の違いが酵素と基質の親和性に影響を与えている可能性が示唆された。

#### Cloning and expression of pyranose oxidase cDNA from *Phanerochaete chrysosporium* in *Escherichia coli*.

Akira Fukuda, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima

(Univ. of Tokyo)



## P-37

### バイオエタノール固体発酵に供する麹菌固体培養でのバイオマス分解酵素の大量生産

坂東弘樹, 久田博元, 石田博樹, 秦洋二 (月桂冠・総研)

【目的】 植物系バイオマスからのバイオエタノール生産において、その糖化発酵過程は液体反応であり、最終的にエタノールの蒸留操作が必要となる。この蒸留操作の無駄を回避すべく、バイオマスの糖化と発酵が固体反応で同時進行する、バイオエタノール高効率回収システムの構築に着手した。具体的には、固体状態のバイオマスを、麹菌のエンド型酵素で液化し、エキソ型酵素を表層提示したアーミング酵母で糖化発酵する、バイオエタノール生産システムである。その第一段階であるバイオマスの液化を目的として、麹菌 (*Aspergillus oryzae*) を宿主とした固体培養でのエンド型バイオマス分解酵素の大量生産を試みた。

【方法及び結果】 麹菌ゲノム配列からエンド型酵素遺伝子の候補を 11 個選抜し、これらを麹菌 OSI1013 において *amyB* プロモーター制御下で発現させた。それぞれの形質転換株の固体培養におけるバイオマス分解酵素発現を SDS-PAGE により解析した結果、2 種類のエンドグルカナーゼおよび 4 種類のキシラナーゼについて、菌体外での発現が認められ、これらの酵素が固体培養において大量生産していることが判明した。なお、本研究は NEDO バイオマスエネルギー高効率転換技術開発/バイオマスエネルギー先端技術研究開発/微生物固体発酵による高効率なリグノセルロース完全利用システムの研究開発の一環として実施した。

### Over expression of biomass degradation enzymes in solid-state culture of *Aspergillus oryzae* for solid-state bioethanol fermentation.

Hiroki Bando, Hiromoto Hisada, Hiroki Ishida, Yoji Hata  
(Res. Inst., Gekkeikan Sake Co.)

## P-38

### バイオマスのグルコース変換を目指した麹菌液体培養でのセルロース分解酵素の大量生産

久田博元<sup>1</sup>, 長谷山陽平<sup>1</sup>, 石田博樹<sup>1</sup>, 秦洋二<sup>1</sup>, 近藤昭彦<sup>2</sup> (<sup>1</sup>月桂冠・総研, <sup>2</sup>神戸大工・応化)

化石燃料の枯渇・地球温暖化防止の観点から、再生可能な植物性バイオマスから生分解性のプラスチックを生産することが望まれる。生分解性のプラスチックは発酵有機酸を用いて合成されるが、その有機酸は植物性バイオマスから変換したグルコースを発酵原料とすることが環境面で望ましい。植物性バイオマスからグルコースへの糖化処理法としては、濃硫酸法や希硫酸法が主流であるが、廃液の環境への負荷や大幅なコストの低減ができないなどの問題がある。そこで硫酸処理法に代わる方法としては、糖化酵素を用いる方法が最も有望と考えられるが、最大のネックはその糖化酵素 (セルラーゼ等) のコストである。そこで我々は、酵素の分泌生産性の高い麹菌を用いてセルラーゼ系分解酵素を液体培養で高生産させることを検討した。

麹菌 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* と *Aspergillus nidulans* 由来のエンドグルカナーゼ遺伝子、セロピオハイドラーゼ遺伝子と  $\beta$ -グルコシダーゼ遺伝子を各種遺伝子データベースから抽出し、*sodM* プロモーターの下流に各遺伝子を接続し、発現プラスミドを作成した。各発現プラスミドを麹菌 OSI1013 *Leu* 株に形質転換し、得られたそれぞれの形質転換体の液体培養でのタンパク質生産量を比較した。SDS-PAGE 解析とタンパク質の定量から、DPY 培地で最大約 1g/L-broth の生産能を示すものも存在した。また、AZCL-セルロース分解試験においては、いずれの形質転換体も寒天プレート上で青色のハロを形成することから、生産された酵素はセルロース分解活性を持つことが判明した。

なお、本研究は NEDO 微生物機能を活用した高度製造技術開発プロジェクト (環境調和型ソフトバイオマス糖化技術の開発) の一環として行われたものである。

### Overproduction of fungal cellulases in submerged culture of *Aspergillus oryzae*.

Hiromoto Hisada<sup>1</sup>, Youhei Haseyama<sup>1</sup>, Hiroki Ishida<sup>1</sup>, Yoji Hata<sup>1</sup>, Akihiko Kondo<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., <sup>2</sup>Dept. Chem. Sci. Eng., Kobe Univ.)

## P-39

### *Trichoderma reesei* の転写活性化因子 Xyr1 の機能解析

北上巨樹, Taki Koffi Alphonse, 古川隆紀, 志田洋介, 小笠原 渉, 岡田宏文, 森川 康 (長岡技科大・生物)

*T. reesei* におけるセルロース・キシラン分解酵素遺伝子群の誘導発現は唯一の C 源としてセルロース系、あるいはキシラン系の誘導物質が存在する場合でのみ起こる。近年、*Aspergillus niger* のキシラナーゼ遺伝子群の発現に関わる転写活性化因子 XlnR のオルソログである Xyr1 が *T. reesei* から単離された。Xyr1 は主要なセルラーゼ・キシラナーゼ遺伝子の転写を活性化していることが報告されている。しかしながら、他の遺伝子群の誘導発現への関与は明らかとなっていない。本研究では *xyr1* 高発現株および破壊株を構築し、野生株の遺伝子発現パターンと比較することで、Xyr1 の支配下にある遺伝子を網羅的に解析することを目的としている。

キシラナーゼ III 遺伝子(*xyn3*)のプロモータ支配下で *xyr1* を発現させ、その転写量が向上した変異株を構築した。破壊株においては、同様に *xyr1* の ORF 内にアセトアミダーゼ遺伝子(*amdS*)を挟むことで機能を欠損させた。*T. reesei* PC-3-7 株の形質転換はプロトプラスト PEG 法を用いた。その際の形質転換体のスクリーニングは選択マーカーとして *amdS* を用い、唯一の N 源としてアセトアミドを含む培地で行った。現在、得られた *xyr1* 高発現株および破壊株における遺伝子の発現パターンをリアルタイム定量 PCR により解析中である。

### Comprehensive analysis of genes regulated by Xyr1 in *Trichoderma reesei*

Naoki Kitagami, Taki Koffi Alphonse, Takanori Furukawa, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara, Hirohumi Okada, Yasushi Morikawa  
(Dept. Of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech)

## P-40

### *Trichoderma reesei* 由来 Xylanase regulator 1 (Xyr1) の結合配列の解析

古川隆紀<sup>1</sup>、志田洋介<sup>1</sup>、小笠原 渉<sup>1</sup>、岡田宏文<sup>1</sup>、加藤雅士<sup>2</sup>、小林哲夫<sup>2</sup>、森川 康<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>長岡技科大・生物、<sup>2</sup>名大院・生命農)

【目的】 *Trichoderma reesei* の Xylanase regulator 1 (Xyr1) は、最近単離された転写活性化因子であり、セルラーゼ・キシラナーゼ遺伝子群の誘導発現において中心的な役割を果たしていることが明らかにされている。これまでにキシラナーゼ I 遺伝子プロモーター領域の解析から、Xyr1 は 5'GGCTAA-N10-TTAGCC3' 配列に結合することが報告されている。しかし、機能的な Xyr1 結合配列に関する報告はこれ以外になく、結合様式などを含めてその詳細は不明である。我々は Xyr1 支配下にあると推定される遺伝子プロモーター領域の解析において、複数の Xyr1 結合配列様配列が転写活性化に関与していることを明らかにしており、Xyr1 の結合配列にはいくつかの揺らぎが存在すると推察している。本研究では、Xyr1 の結合配列を決定することを目的とし、様々な Xyr1 結合配列様配列に対する Xyr1 の結合特異性を解析した。

【方法と結果】 Xyr1 の DNA 結合ドメインおよび coiled-coil ドメインをコードする領域を PCR によりクローニングし、GST 融合タンパク質として発現させた。融合タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーによって精製したのち、GST 部分を除去し、得られた組換え Xyr1 をゲルシフト解析に供した。各セルラーゼ・キシラナーゼ遺伝子のプロモーター領域から抽出した様々な Xyr1 結合配列様配列をプローブとして解析を行った結果、5'GGCTAT3' および 5'GGCAA3' 配列に対して特異的な Xyr1 の結合が観察された。さらに *cbh2* activating element (CAE) として報告されている 5'GGGTAA3' 配列に対しても特異的な結合が観察された。以上の結果より、Xyr1 の結合配列認識には比較的広い揺らぎが存在していることが明らかとなった。現在、これら以外の Xyr1 結合配列様配列に対する Xyr1 の結合特異性を解析している。

### *In vitro* recognition of specific DNA targets by the transcriptional activator Xyr1

Takanori Furukawa<sup>1</sup>, Yosuke Shida<sup>1</sup>, Wataru Ogasawara<sup>1</sup>, Hirofumi Okada<sup>1</sup>, Masashi Kato<sup>2</sup>, Tetsuo Kobayashi<sup>2</sup>, Yasushi Morikawa<sup>1</sup>(<sup>1</sup>Dept.of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.,<sup>2</sup>Grad.Sch.Bioagricultural Sci. Nagoya Univ.)

## P-41

### *Trichoderma reesei* の固体培養条件下での糖質加水分解酵素遺伝子の発現解析

齋藤勇司、関口裕久、小笠原 渉、岡田宏文、森川 康 (長岡技科大・生物)

*Trichoderma reesei* は菌体外セルラーゼを多量に分泌することが知られ、その性質解明や遺伝子発現解析がなされてきた。しかし、これら研究のほとんどが液体培養でされており、自然環境下において固体基質で生育する *T. reesei* の潜在能力のすべてを解析しているとは言えない。そこで小麦フスマを用いて固体培養を行い、糖質加水分解酵素を中心とした遺伝子発現パターンを解析することを目的とした。さらに、固体培養特異的な酵素・タンパク質の同定を試みた。

固体培養の培地として吸水させた小麦フスマを用い、湿度飽和条件下で培養を行った。液体培養は小麦フスマあるいはアビセルを炭素源として行った。それぞれ培養中の菌糸から total RNA を抽出し、リアルタイム定量 PCR によって糖質加水分解酵素遺伝子の転写量を解析した。解析した結果、固体培養では液体培養に比べて、エンドグルカナーゼやキシラナーゼ遺伝子の発現比率が増加すること、およびそれぞれの中でも発現比率大きく異なっていることが明らかとなった。現在、固体培養で特異的に発現する遺伝子の探索を行っている。また、固体培養時のみに検出されるタンパク質を二次元電気泳動と MALDI-TOF MS を用いて解析を進めている。

### Expression analysis of glycosyl hydrolase gene from *Trichoderma reesei* in solid state fermentation

Yuji Saito, Hirohisa Sekiguchi, Wataru Ogasawara, Hirofumi Okada, Yasushi Morikawa

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

## P-42

### セルラーゼ高生産麹菌を用いた結晶性セルロースの分解

中井喬彦<sup>1</sup>, 有岡学<sup>1</sup>, 川口剛司<sup>2</sup>, 荒井基夫<sup>3</sup>, 北本勝ひこ<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>阪府大院・生環科, <sup>3</sup>中部大・応生)

【目的】我々は、これまでに木質バイオマスの糖化を目的として、*A. aculeatus* 由来セルラーゼ (FI-CMCase,  $\beta$ -glucosidase 1, cellobiohydrolase I) を *tefl* プロモーター下で同時に生産する麹菌株 (MBH 株<sup>1)</sup>) を育種した<sup>1)</sup>。今回、異なる3つのプロモーターを用いることで、セルラーゼ3重発現株の酵素生産量の改善を試みた。更にこの株において、セルラーゼ遺伝子の発現を制御する転写因子 AoXlnR を高発現させることで内在性セルラーゼの発現を誘導し、セルロース分解能の向上が認められるかどうかを検討した。

【方法及び結果】*A. oryzae* プロテアーゼ遺伝子2重破壊株 NS-tApE 株を親株として、3つの *A. aculeatus* 由来セルラーゼ遺伝子をそれぞれ *tefl*, *pgkA*, *glaA142* プロモーター下で同時に発現する麹菌株 (TPG 株) を育種した。酵素生産性を比較したところ、今回作製した TPG 株は MBH 株よりも高い酵素生産量を示すことがわかった。特に、 $\beta$ -glucosidase の生産量は MBH 株の約10倍の約1.0 g/lであった。更に、TPG 株に対して UV 変異処理を行うことによって、*pyrG* マーカーが付与された株を取得し、このマーカーを用いて転写因子 AoXlnR の高発現を行った。現在、作製したこれらの株について結晶性セルロースの分解能等を調べている。  
1)中井ら、日本農芸化学会大会要旨集 p61 (2007)

### Degradation of crystalline cellulose by *A. oryzae* highly producing cellulases

Takahiko Nakai<sup>1</sup>, Manabu Arioka<sup>1</sup>, Takashi Kawaguchi<sup>2</sup>, Motoo Arai<sup>3</sup>, Katsuhiko Kitamoto<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>Dept. Appl. Life Sci., Osaka Pref. Univ., <sup>3</sup>Dept. Environ. Biol., Chubu Univ.)

## P-43

### *Trichoderma reesei* 由来 3 種エンドグルカナーゼの酵素学的性質

中澤 光, 岡田和士, 小林遼太, 小野寺朋子, 窪田哲也, 小笠原 渉, 岡田宏文, 森川 康

(長岡技科大・生物系)

セルラーゼ高生産菌として知られる *Trichoderma reesei* は 2 種の Cellobiohydrolase (CBH) I,II および 少なくとも 6 種の Endoglucanase(EG) I-VI を分泌する。このうち CBH については、結晶セルロースの還元末端側から CBH I が、非還元末端から CBH II がそれぞれ作用するということが知られているが、EG についてはなぜ多種が生産されるのか、それぞれがセルロース分解においてどのような役割を担うのかほとんどわかっていない。そこで *T.reesei* EG の酵素学的性質を明らかにするために、EG I および EG II の CBD とリンカーを除いた触媒ドメインのみを大腸菌を宿主として発現させた。そして同様に大腸菌で発現させた EG III と比較した。触媒ドメインのみをコードする *egl1-cd* および *egl2-cd* を発現ベクター pET22b および pET15b にそれぞれ導入し、*E.coli* Rosetta-gami B(DE3)pLacI を宿主として発現させたところ、いずれも 37°C では封入体を形成したが、培養温度を下げることで可溶性画分に活性を有する形で培地 1ml 当たりそれぞれ 12mg の EG I-CD (培養温度 15°C) および 72mg の EG II-CD (培養温度 20°C) が得られた。精製酵素の pH 特性、耐熱性および種々の基質に対する特異性を調べた。その結果、3 種の EG で基質特異性が異なり、EG II-CD はセルロース、リケナンおよび  $\beta$ -グルカンに特異性を示し、EG III はそれに加えてキシログルカンにも活性を示した。EG I-CD は更にマンナンおよびキシランに活性を示す広い基質特異性を持っていた。

#### **Enzymatic properties of three endoglucanases from *Trichoderma reesei***

Hikaru Nakazawa, Katsunori Okada, Ryouta Kobayashi, Tomoko Onodera, Tetsuya Kubota, Wataru Ogasawara, Hirofumi Okada, Yasushi Morikawa. (Bioeng., Nagaoka Univ.Tech.)

## P-44

### *Aspergillus oryzae* における AoXlnR 類似転写因子の機能同定

金田貴詳, 海附玄龍\*, 野口祐二, 金丸京子, 加藤雅士, 小山泰二\*, 小林哲夫

(名大院生命農・生物機構, \*野田産研)

麹菌 *Aspergillus oryzae* の転写因子 AoXlnR は、キシラン・セルロース代謝を正に制御する転写因子である。*A. oryzae* はこの AoXlnR のホモログを 1 種有しており、我々はこれを AoXlnR2 (仮名) と名付けた。AoXlnR2 は、AoXlnR と全長に渡って相同性を示すが、DNA 結合ドメインの相同性は比較的低い。従って、転写活性化メカニズムは AoXlnR に類似しているが、制御する遺伝子群は異なると考えられた。

*A. oryzae* AoXlnR2 破壊株の糖の資化能を検討したところ、L-アラビノースの資化能に欠損が見られたため、L-アラビノース資化に関与する L-アラビノースレダクターゼ、L-アラビニトールデヒドロゲナーゼ遺伝子の発現を RT-PCR により解析した。いずれの遺伝子についても、L-アラビノースによる誘導発現が大幅に低下していた。また、培養上清を SDS-PAGE に供し、破壊株において生産量の著しい低下が見られる蛋白質の N 末端アミノ酸配列を決定したところ、エキソアラビナーゼであった。RT-PCR により本酵素遺伝子の発現量が低下していることも確認された。以上から、AoXlnR2 はアラビナン代謝の正の制御因子であると考えられる。一方、欠損株ではアラビノースによるエンドキシラナーゼ XynG2 の発現誘導が観察された。これは、キシラン代謝に対して AoXlnR2 が負に関与することを示唆している。

#### **Physiological roles of a novel XlnR-type transcription factor in *Aspergillus oryzae*.**

Takayoshi Kanada, Gennryo Umitsuki\*, Yuji Noguchi, Kyoko Kanamaru, Masashi Kato, Yasuji Koyama\*, Tetsuo Kobayashi (Dept. of Biological Mechanisms and Function, Grad. Sch. of Nagoya Univ., \*Noda Institute for Scientific Research)

## P-45

### *Aspergillus japonicus* が産生する細胞外 $\beta$ -キシロシダーゼをコードする遺伝子の構造解析

吉原浩司<sup>1</sup>、脇山元気<sup>1</sup>、林 幸男<sup>1</sup>、太田一良<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>宮崎大・工・物質環境、<sup>2</sup>宮崎大・農・応生科)

〔目的〕糸状菌 *Aspergillus japonicus* MU-2 株は、分子量 113.2 kDa の  $\beta$ -キシロシダーゼ XylA を菌体外に生産する。本報では、XylA をコードする遺伝子 *xylA* の構造解析を目的とする。

〔方法および結果〕精製 XylA を V8 プロテアーゼ処理して得られたペプチド断片のアミノ酸配列を基に縮重プライマーを作製し、染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。DIG 標識した約 1.0 kbp の増幅断片をプローブとして、サザン・ハイブリダイゼーションを行った結果、*xylA* 遺伝子は *A. japonicus* の染色体上に 1 コピー存在する事が示唆された。クローニングした 4.9 kbp の *EcoR* I 断片を用いて、*xylA* 遺伝子の完全長 ORF と周辺領域の塩基配列を決定した。*xylA* 遺伝子の ORF は、イントロンを含まない 2412 bp から成り、17 アミノ酸残基の分泌シグナルと 787 アミノ酸残基の成熟酵素 (推定分子量 84,638 Da) をコードした。XylA には 18 箇所の N 型糖鎖付加のためのコンセンサス配列、708 bp の 5' 非コード領域には 5 箇所のカタボライト抑制因子 CreA 結合可能部位や 3 箇所の転写誘導因子 XlnR 結合可能部位が存在した。

#### Sequence analysis of beta-xylosidase gene from *Aspergillus japonicus*

Koji Yoshihara<sup>1</sup>, Motoki Wakiyama<sup>1</sup>, Sachio Hayashi<sup>1</sup>, Kazuyoshi Ohta<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Dept. Appl. Chem., Univ. of Miyazaki, <sup>2</sup>Dept. Biochem. Appl. Biosci., Univ. of Miyazaki)

## P-46

### *Aspergillus japonicus* には 2 種類の糖質加水分解酵素ファミリー 11 キシラナーゼ遺伝子が存在する

脇山元気<sup>1</sup>、吉原浩司<sup>1</sup>、林 幸男<sup>1</sup>、太田一良<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>宮崎大・工・物質環境、<sup>2</sup>宮崎大・農・応生科)

〔目的〕糸状菌 *Aspergillus japonicus* MU-2 株は、エンド型グリコシダーゼの一種であるキシラナーゼを菌体外に産生する。本報では、この細胞外キシラナーゼを精製し、コードする遺伝子をクローニングした。

〔方法および結果〕カラス麦製キシランを炭素源として培養した *A. japonicus* の培養上清より、塩析、各種クロマトグラフィーも用いてキシラナーゼを電気泳動的に単一に精製した。精製酵素の N 末端および内部アミノ酸配列をそれぞれ 1 箇所ずつ決定した結果、本酵素は糸状菌由来の糖質加水分解酵素ファミリー 11 (GH-11) のキシラナーゼと高い相同性を示した。内部アミノ酸配列および GH-11 にコンセンサスな配列を基にして縮重プライマーを設計し、染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。その結果、約 200 bp の増幅断片を得た。その配列は 2 種類存在し、それぞれは、他の糸状菌由来の GH-11 のキシラナーゼと高い相同性を示した。それらの配列をプローブとしてサザン・ハイブリダイゼーションを行った所、異なった検出バンドのパターンを示した事から、2 種類のキシラナーゼ遺伝子は染色体上の異なった位置に存在する事が示唆された。

#### Existence of two copies of glycoside hydrolase family 11 xylanase gene from *Aspergillus japonicus*

Motoki Wakiyama<sup>1</sup>, Koji Yoshihara<sup>1</sup>, Sachio Hayashi<sup>1</sup>, Kazuyoshi Ohta<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Dept. Appl. Chem., Univ. of Miyazaki, <sup>2</sup>Dept. Biochem. Appl. Biosci., Univ. of Miyazaki)

## P-47

### 糸状菌を用いたヤマイモ由来キチナーゼ E の発現

太田康司, 西北広信, 池 正和, 小笠原 渉, 岡田宏文, 森川 康 (長岡技科大・生物)

【目的】ヤマイモ由来のキチナーゼは 5 種類 (YamE, F, G, H1 および H2) 生産することが明らかにされている。その中で、糖質加水分解酵素ファミリー 19 のクラス IV に属する YamE は、病原性真菌に対して高い溶菌活性を持つことが報告されている。さらに、YamE は耐熱性や pH 安定性にも優れていることから、酵素農薬としての応用が期待されている。しかしながら YamE はヤマイモにおいて少量しか生産されず、工業的に生産し農薬として用いるためには、微生物等を用いた大量発現系の構築が必要である。そこで本研究では、YamE の大量発現を目的とし、糸状菌 *Aspergillus oryzae* および *Trichoderma reesei* を宿主とした YamE の分泌発現を試みた。

【方法と結果】*A.oryzae* での発現では、分裂酵母での分泌発現用に改良した *T.reesei* 由来 cellobiohydrolase II (*cbh2*) 遺伝子の分泌シグナルを付加し、2 種類の発現ベクター (pNAN8142 および pNEN142) を用いての分泌発現を試みた。その結果、培養上清中に最大で 822 mU/ml の活性が検出され、49 mg-protein /L の発現量と算出された。一方、*T.reesei* での発現では、*cbh2* 遺伝子の分泌シグナルを付加した YamE の cDNA を、CBH II プロモーター支配下に導入し、分泌発現を試みた。その結果、培養上清中に最大で 151 mU/mL の活性が検出され、16 mg-protein/L の発現量となった。*T.reesei* を宿主とした植物由来タンパク質の発現は過去に報告がなく、本研究で初めて成功したこととなるが、工業的に利用するためには更なる発現量が必要である。

現在、発現量増大を目指し *T.reesei* 由来 CBH I プロモーターを用いた発現系の構築を試みている。

### Expression of chitinase E from yam tuber in filamentous fungi

Koji Ota, Hironobu Nishikita, Masakazu Ike, Wataru Ogasawara, Hirohumi Okada, Yasushi Morikawa  
(Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.)

## P-48

### 麹菌ポストゲノム解析を支援する *Aspergillus nidulans* 発現用プラスミドの構築

石田博樹<sup>1</sup>、秦洋二<sup>1</sup>、楠本憲一<sup>2</sup>、山形洋平<sup>3</sup>、小出芳直<sup>4</sup>、竹内道雄<sup>5</sup> ( <sup>1</sup>月桂冠・総研、<sup>2</sup>食総研、<sup>3</sup>東北大院農・応生科、<sup>4</sup>天野エンザイム・研究部、<sup>5</sup>東京農工大院・応生科)

【目的】 麹菌のゲノム解析が完了し、そのゲノム配列が公開されたが、麹菌ゲノム中に 135 種類存在するプロテアーゼも、そのほとんどが機能未知である。これらの機能を特定するために、麹菌よりも遺伝子操作が容易な *Aspergillus nidulans* を宿主として、前記遺伝子を高発現させるための基本プラスミドを構築した。

【方法と結果】 まず、麹菌遺伝子を発現させるための *A. nidulans* の宿主ベクター系として、*A. nidulans* A89 (*argB*) とオーレオバシジン耐性遺伝子 *A. nidulans aurA'* を選択した。

菌体外プロテアーゼ分泌発現用プラスミドについては、*A. nidulans aurA'* を含むプラスミドに、麹菌 *amyA* プロモーター、マルチクローニング部位、Factor Xa 認識配列、His タグ、終止コドン、麹菌 *amyA* ターミネーターの順でサブクローニングした。なお、種々の遺伝子のフレームに対応するため、マルチクローニング部位直後に 0-2 塩基挿入したタイプの 3 種類のプラスミドを構築した。マルチクローニング部位としては、*SacI*, *SacII*, *NotI*, *Eco52I*, *SpeI*, *BamHI*, *EcoRV*, *EcoO109I*, *ApaI* の 9 種類が使用可能である。

一方、菌体内プロテアーゼ分泌発現用プラスミドについては、菌体外プロテアーゼ分泌発現用プラスミドの、麹菌 *amyA* プロモーターとマルチクローニング部位の間に、麹菌酸性プロテアーゼのプレ、プロ配列をサブクローニングした。マルチクローニング部位としては、前記 9 種類が使用可能である。なお、いくつかのプロテアーゼについては、当該プラスミドを使用して発現が確認されている。

【謝辞】 本研究は、生研センター基礎研究推進事業の一環として行われたものである。

### Construction of expression plasmids in *Aspergillus nidulans* for post-genomics of *A. oryzae*.

Hiroki Ishida<sup>1</sup>, Yoji Hata<sup>1</sup>, Ken-Ichi Kusumoto<sup>2</sup>, Youhei Yamagata<sup>3</sup>, Yoshinao Koide<sup>4</sup>, Michio Takeuchi<sup>5</sup>  
(Gekkeikan<sup>1</sup>, NFRI<sup>2</sup>, Univ. of Tohoku<sup>3</sup>, Amano Enzyme<sup>4</sup>, Tokyo Univ. of Agric. And Technol.<sup>5</sup>)

## P-49

### *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, 金政真<sup>1</sup>, 荒井基夫<sup>1</sup>, 川口剛司 (阪府大院・生命・応生科,<sup>1</sup>中部大・応生)

【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、外来遺伝子を相同組換えで同一遺伝子座に 1 コピー導入でき、形質転換体の選択を簡便に行え、且つ *A. aculeatus* 自身を宿主とした形質転換系の開発が必須である。そこで本研究では、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】*sC* 欠損変異株 (*sC*) は、硫酸のアナログであるセレン酸含有培地で生育できることを利用して取得した。自然変異により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できず、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。*A. aculeatus* からクローニングした *sC* 遺伝子を用いて *sC* 候補株 4 株を形質転換した結果、全てにおいて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。*A. aculeatus sC* 及び *sC* 遺伝子の有用性が示されたため、*sC* 選択マーカーによる形質転換系が構築された。4 株の *sC* の表現型は *sC* 座位での大規模な欠損に起因しない事がサザンブロット分析より示されたことから、変異点をシークエンス解析により同定した。結果、3 株では点変異が、1 株では 38bp の欠失が起こっていたため、相同組換えの宿主として利用可能であることが示された。現在、この系を用いた形質転換を行い、相同組換え効率およびコピー数等について検討中である。

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

Hiroimi Adachi, Shuji Tani, Junichi Sumitani, Shin Kanamasa<sup>1</sup>, Motoo Arai<sup>1</sup>, Takashi Kawaguchi (Life & Env. Science, Osaka Pref. Univ., <sup>1</sup>Biochem., Chubu Univ.)

## P-50

### *Aspergillus aculeatus ku80* 遺伝子破壊による高頻度相同組換え宿主の開発

辻篤史, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院生命・応生科)

【目的】近年糸状菌において、非相同組換えに関与する *ku70* または *ku80* 遺伝子破壊株を宿主として用いたターゲティング効率の極めて高い形質転換系が開発されている。*Aspergillus aculeatus* No. F-50 株 (*A. aculeatus*) は環境に応答して誘導的に多種のセルラーゼ・ヘミセルラーゼを生産することから、これら遺伝子群の発現調節機構解明のために、*A. aculeatus ku* 破壊株を宿主としたターゲティング効率の高い形質転換系の構築を目指している。【方法・結果】まず *A. aculeatus* 染色体 DNA を鋳型とし、近縁種の *ku* 遺伝子間の相同性を基に設計した縮重プライマーを用いて PCR を行い、*A. aculeatus ku80* ortholog (*Aaku80*) の一部 DNA 断片を得た。この DNA 断片をプローブとして行ったサザンブロット分析より、約 6.4 kb の *Sph* I 消化断片が *Aaku80* 全長とその周辺領域を含むことが示された。作製したゲノムライブラリーからその DNA 断片をクローニングし、シークエンス解析を行った結果、*Aaku80* は、9 個のイントロンを含む 2,178 bp の ORF から成り、アミノ酸レベルで他の *Aspergillus* 属 *Ku80* と約 75% の相同性を示した。*Aaku80* を破壊するために、まず fusion PCR 法により、両端に約 1.5 kb の *Aaku80* 相同配列、その内側に選択マーカーである *A. nidulans pyrG* と遺伝子導入後 *Aaku80* 隣接配列と direct repeat を形成するための約 1 kb の配列を含む遺伝子破壊カセットを構築した。形質転換体約 40 株についてサザンブロット分析を行った結果、1 株の *Aaku80* 破壊株を取得した。この株の分生糸を 5-FOA 含有培地に塗布し、生育した菌株のサザンブロット分析を行ったところ、そのうちの約 9 割の株において direct repeat 間の相同組換えによる *pyrG* 遺伝子の脱落が確認された。

#### Development of highly efficient gene targeting in *Aspergillus aculeatus ku80* mutant

Atsushi Tsuji, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi (Grad. schl. of Life & Env. Sci., Osaka Pref. Univ.)

## P-51

### *Aspergillus aculeatus* における *pyrG*, *sC*, *niaD* 三重欠損株の作出

國武絵美, 足立浩美, 谷修治, 炭谷順一, 荒井基夫<sup>1</sup>, 川口剛司 (阪府大院生命・応生科, <sup>1</sup>中部大応生・環境生化)

【目的】*Aspergillus aculeatus* F-50 株は多種の糖化力に優れたセルラーゼをセルロース性基質存在下で誘導的に生産する。この遺伝子発現制御機構に関する知見を得るためには形質転換系が必須である。我々はオロチジン脱炭酸酵素遺伝子 (*pyrG*), ATP スルフリラーゼ遺伝子 (*sC*) を選択マーカーとして用いた形質転換系を構築している。本課題では, セルラーゼ遺伝子発現誘導因子の探索を目的として, 硝酸還元酵素遺伝子 (*niaD*) を選択マーカーに用いた形質転換系の開発を行い, さらに *pyrG*, *sC*, *niaD* 三重欠損株を作出したことを報告する。

【方法・結果】まず *niaD* をマーカーとした形質転換系の構築を行った。*niaD* 欠損 (*niaD*) 候補株は, 自然突然変異により塩素酸に耐性を示した株の中から, 硝酸資化能がなく, 亜硝酸, アデニン資化能のある株として選択された。その後クローニングした *A. aculeatus niaD* 遺伝子を用いて *niaD* 候補株を形質転換した結果, 全ての株の表現型が相補された。またサザンブロット分析により *niaD* 株において *niaD* 座位で大規模な欠失が起こっていないことを確認し, *niaD* を選択マーカーとした形質転換系を確立した。次に, セレン酸耐性株から取得した *sC* 欠損株から 5-フルオロオロチン酸耐性を示す, *pyrG*, *sC* 二重欠損株を単離した。この二重欠損株に上記と同様の方法で *niaD* を付与し, *pyrG*, *sC*, *niaD* 三重欠損株を作出した。現在, この三重欠損株を用いてセルロースにより発現が誘導される *cbhI* 遺伝子発現制御因子のスクリーニング系を構築している。

#### Construction of *Aspergillus aculeatus pyrG sC niaD* triple mutant

Emi Kunitake, Hiromi Adachi, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Motoo Arai, Takashi Kawaguchi  
(Grad. schl. of Life & Env. Sci., Osaka Pref. Univ., Biochem., Chubu Univ.)

## P-52

### 麴菌(*Aspergillus oryzae*)NS4 株における *niaD* 及び *sC* 遺伝子変異部位の同定

山田 修, 林 梨咲, 池田涼子, 坂本和俊, 岩下和裕, 三上重明 (酒総研)

麴菌(*Aspergillus oryzae*)は、清酒をはじめとした醸造産業に広く利用されている有用糸状菌＝「国菌」であり、その高い安全性から米国FDAよりGRAS (Generally Recognized As Safe) グレードとして記載されている。また、麴菌ゲノムシーケンスが報告されるとともに、伝統的な利用のとどまらず有用タンパク質の生産ホストとしても注目を集めている。麴菌 NS4 株<sup>1)</sup>は、ゲノム解析株 RIB40 より UV 変異による取得された株であり、nitrate reductase 遺伝子(*niaD*)及び ATP sulfurylase 遺伝子(*sC*)に変異を有し、形質転換用ホストとして比較的広く利用されている。しかし、どのような変異が原因となり、*niaD* 及び *sC* となっているのかについては不明であった。そこで、NS4 株及びその親株である *niaD300* 株について変異部位の同定を行うこととした。

麴菌 *niaD300* 及び NS4 株ゲノム DNA より *niaD* 及び *sC* 遺伝子についてプロモーター及びターミネーター領域をそれぞれ 1-kb 含む断片を PCR により増幅し、ダイレクトシーケンスを行った。*niaD* 遺伝子の PCR 増幅産物は、*niaD300* 及び NS4 両株において RIB40 と比較して移動度の増加が観察され、何らかの欠失が予想された。シーケンスの結果、両株では、*niaD* 遺伝子の第 6 exon からターミネータ部分へかけて 769-bp が欠失しており、結果として C 末に位置する oxidoreductase NAD-binding domain が大きく欠落し、これが硝酸イオン資化性欠如の原因と推定された。一方、*sC* 遺伝子について *niaD300* 及び NS4 株について比較したところ、ORF 内にもみ 2 塩基の変異とアミノ酸置換 (CTT→CCC, L44P) が確認された。しかし、この変異は Pfam による推定機能ドメイン外に位置していることから、現在、NS4 株の硫酸イオン非資化性への寄与について、さらに解析を行っている。

1) Yamada *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1367 (1997)

#### Identification of the mutated region in *niaD* and *sC* genes from *Aspergillus oryzae* NS4.

Osamu Yamada, Risa Hayashi, Ryoko Ikeda, Kazutoshi Sakamoto, Kazuhiro Iwashita, and Sigeaki Mikami (NRIB)



## P-53

### 麴菌のプロリルアミノペプチダーゼ様遺伝子産物の組換え麴菌による生産と蛋白質の性質

松下真由美<sup>1</sup>、楠本憲一<sup>1</sup>、古川育代<sup>1</sup>、鈴木 聡<sup>1</sup>、小出芳直<sup>2</sup>、石田博樹<sup>3</sup>、山形洋平<sup>4</sup>、竹内道雄<sup>5</sup>、柏木豊<sup>1</sup> (<sup>1</sup>食総研、<sup>2</sup>天野エンザイム、<sup>3</sup>月桂冠、<sup>4</sup>東北大・院・応生科、<sup>5</sup>東京農工大・院・応生科)

[目的] N末端にプロリン残基を有するペプチドは一般的にプロテアーゼでは分解されないが、prolyl aminopeptidase (PAP) はN末端からプロリンを遊離する活性を有する。PAP はこれまで細菌でのみ知られていたが、*Aspergillus niger* から PAP が見出された。その推定アミノ酸配列に対し、麴菌ゲノム情報 (<http://www.bio.nite.go.jp/dogan/Top>) から 79% の同一性を示す蛋白質をコードする遺伝子 *AopapA* (AO090003000302) を見出した。そこで、本遺伝子の翻訳産物の生産と性質の解明を目的とした。

[方法と結果] *AopapA* の推定コーディング領域 1.8 kb を麴菌 RIB40 株のゲノムから PCR により取得した。目的蛋白質のC末端に His-tag を付加し、これを AmyB プロモーター下流に組み込んだベクターを作成し、麴菌 RIB40 株に形質転換した。形質転換株は AmyB 誘導条件下で培養後、菌体を凍結破砕し、細胞抽出液を得た。RIB40 株に比べて約 10 倍の Pro-*p*-nitroanilide (P-pNA) 分解活性を示す高活性株が得られ、His-Tag 抗体を用いたウエスタンブロットによって、蛋白質の発現生産を確認した。現在、P-pNA 分解活性画分の精製を進めている。

本研究は、生研センター基礎研究推進事業の一環としておこなわれたものである。

#### Isolation and characterization of a prolyl aminopeptidase gene from *Aspergillus oryzae*

Mayumi Matsushita<sup>1</sup>, Ken-Ichi Kusumoto<sup>1</sup>, Ikuyo Furukawa<sup>1</sup>, Satoshi Suzuki<sup>1</sup>, Yoshinao Koide<sup>2</sup>, Hiroki Ishida<sup>3</sup>, Youhei Yamagata<sup>4</sup>, Michio Takeuchi<sup>5</sup>, Yutaka Kashiwagi<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Natl. Food Res. Inst., <sup>2</sup>Amano Enzyme, <sup>3</sup>Gekkeikan, <sup>4</sup>Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., <sup>5</sup> Tokyo Univ. of Agric. Tech.)

## P-54

### 麴菌 *A. oryzae* による異種タンパク質生産に及ぼす $\alpha$ -amylase 発現抑制の効果

根本崇, 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麴菌 *A. oryzae* は、異種タンパク質生産の宿主として使用されている。これまでに我々は、*tpaA pepE* プロテアーゼ遺伝子 2 重破壊株 NS-tApE<sup>1)</sup>、また NS-tApE 株から得られた高分泌変異株 AUT1<sup>2)</sup>が野生株に比べて高いキモシン生産能を示すことを報告している。*A. oryzae* は  $\alpha$ -amylase を多量に分泌するが、異種タンパク質の生産を目的としたときには精製の障害となると考えられる。また、様々な細胞内プロセスで競合している可能性もある。しかし、*A. oryzae* には 3 つの  $\alpha$ -amylase 遺伝子が存在し破壊株を作製することは難しい。最近、RNAi による  $\alpha$ -amylase の生産抑制が報告された<sup>3)</sup> ことから、今回は、キモシン生産株において RNAi 法による  $\alpha$ -amylase の発現抑制を試みた。

【方法と結果】まず、キャリアタンパク質としてグルコamilラーゼ(GlaA)を用いたプロキモシン発現プラスミドを作製し、*sC* マーカーを用いて NS-tApE 株に形質転換した。取得した株は 5×DPY 液体培地で培養後、その培地上清について凝乳活性測定およびウエスタン解析を行い、キモシンの生産を確認した。さらに、 $\alpha$ -amylase 遺伝子の第 9 番目のエキソン領域を dsRNA として発現しスパーサー配列にイントロン領域を用いたプラスミドを作製し、*niaD* マーカーを用いてキモシン生産株に形質転換した。取得した株を 5×DPY 液体培地で培養後、培地上清について  $\alpha$ -amylase 活性測定および凝乳活性測定を行ったところ、親株よりも  $\alpha$ -amylase が減少し、キモシンの生産量が増加していた。

1) 根本ら、2006 年度生物工学会大会講演要旨集、p.131、2) 根本ら、2007 年度農芸化学学会大会講演要旨集、p.179、3) Yamada *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71 (1), 138-144, (2007)

#### Effect of suppression of $\alpha$ -amylase on heterologous protein production in *A. oryzae*

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

## P-55

### 麹菌 *Aspergillus oryzae* による cellobiose phosphorylase の分泌生産の検討

多田功生, 熊谷明夫<sup>1</sup>, 鈴木 聡, 楠本憲一, 天野良彦<sup>1</sup>, 佐々木 堯, 柏木豊

(食総研,<sup>1</sup>信州大院・工)

(目的) 細菌 *Cellvibrio gilvus* 由来の cellobiose phosphorylase (CBPase) はセロビオースを加リン酸分解し、グルコース-1-リン酸とグルコースを生成する反応を触媒する酵素で、分子量は約90kDa、細胞内において二量体あるいは四量体を形成することが報告されている。この酵素は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、タンパク質分泌能に優れた麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いた CBPase の分泌生産について検討した。

(方法と結果) CBPase 遺伝子の upstream に分泌のためのキャリアーとしてグルコアミラーゼ (*glaA*) 遺伝子と KexB 認識配列を連結した融合遺伝子を *A. oryzae* に導入し、形質転換株を取得した。得られた形質転換株の培養上清には、抗 CBPase 抗体を用いたウエスタン解析により CBPase が確認されたが、その量は非常にわずかであった。また、同様に細胞壁中にも CBPase とその分解産物が確認された。現在、*Trichoderma reesei* など、O 型結合糖鎖が付加されたタンパク質の分泌量の向上に効果があるとの報告がある酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の dolichol phosphate mannose synthase (DPM1) 等を用いて、分泌量の改善を試みている。本研究は、生研センター異分野融合研究支援事業の一環として行われたものである。

#### Production and secretion of cellobiose phosphorylase in *Aspergillus oryzae*

Sawaki Tada, Akio Kumagai<sup>1</sup>, Satoshi Suzuki, Ken-Ichi Kusumoto, Yoshihiko Amano<sup>1</sup>, Takashi Sasaki, Yutaka Kashiwagi (NFRI, <sup>1</sup>Grad.Sch.Engineering, Shinshu Univ.)

## P-56

### アラキドン酸生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 における新規選択薬剤の探索及びマーカー遺伝子の評価

安藤晃規, 櫻谷英治, 小川 順, 清水 昌 (京大院農・応用生命)

【目的】本研究室で見出された *Mortierella alpina* 1S-4 はアラキドン酸をはじめとする各種高度不飽和脂肪酸 (PUFA) を菌体内に著量蓄積することから、PUFA 合成系機構解明におけるモデル生物として注目されている。我々はこれまでに本菌の PUFA 合成機構の解明及び生産制御を目的として栄養要求性を指標とした基礎的な形質転換系の開発に成功している。今回新たに宿主に依存しない汎用的な形質転換系の開発を目的として本菌に有効な新規薬剤の探索及び、マーカー遺伝子の評価を行ったので報告する。

【方法・結果】様々な抗生物質、抗真菌剤を通常の G Y 培地 (グルコース 1%、酵母エキス 0.5%) に添加し生育実験を行った結果、担子菌に特異性の高い薬剤カルボキシシンが本菌にも有効であることがわかった。本薬剤のターゲットであるコハク酸脱水素酵素複合体 Ip サブユニット (SdhB) 遺伝子を本菌より単離し、耐性機構に参与する 1 塩基変異を挿入しヒスチジンからロイシンへの 1 アミノ酸置換を導入した。本変異導入遺伝子と *ura5* 遺伝子の発現カセットをタンデムに挿入した pSDura5 を構築し、耐性遺伝子を過剰発現した形質転換株を選抜、その後カルボキシシン含有 G Y 培地上に移し、評価を行ったところ形質転換株は有意な耐性能を獲得した。結果、組み換え体選抜のためのマーカー遺伝子としての利用の可能性を示すことができた。

#### Screening of fungicide and investigation of novel selective marker for the arachidonic acid producing filamentous fungus *Mortierella alpina* 1S-4

Akinori Ando, Eiji Sakuradani, Jun Ogawa, Sakayu Shimizu (Division of Applied Life Sciences Graduate School of Agriculture, Univ. of Kyoto)

## P-57

### DNA リガーゼ遺伝子破壊による *Cryptococcus neoformans* 相同組換え効率への影響

清水公徳, 李皓曼, 渡辺哲, 亀井克彦, 山口正視, 川本進 (千葉大・真菌センター)

酵母からヒトに至る真核生物では, DNA 二重鎖切断は主として非相同末端結合(non-homologous end-joining; NHEJ)と相同組換え(homologous recombination; HR)によって修復される。ところが, ヒト病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* では, NHEJ による遺伝子修復機構により, 標的とする遺伝子の相同組換え(遺伝子ターゲティング)による遺伝子破壊操作が困難であることが問題となっていた。近年, *Neurospora crassa* において DNA 結合反応を触媒するタンパク質 (DNA リガーゼ) をコードする遺伝子 *LIG4* を破壊することにより, HR 効率が著しく上昇することが報告された。そこで本研究では, *C. neoformans* のもつ *LIG4* 遺伝子ホモログ (*LIG4*) の遺伝子破壊株の作製と HR 効率の向上を目的として実験を行った。まず, *C. neoformans* ゲノムデータベースより *LIG4* 遺伝子ホモログの塩基配列を抽出した。RACE 解析により決定した *LIG4* 遺伝子の cDNA 部分配列をもとに PCR プライマーを構築し, cDNA を増幅し, 塩基配列を決定した。cDNA 配列と染色体 DNA 配列の比較により, 本菌の *LIG4* 遺伝子は 29 個のイントロンを含み 1079 アミノ酸をコードすることが推定された。続いて, 本菌の野生型株 B4500 (血清型 D) および B4500 株由来のウラシル要求性株 TAD1 を用いて *LIG4* 破壊株の作製を行った。*LIG4* 遺伝子の上流および下流それぞれ約 1kb の領域と nourseothricin 耐性遺伝子 *NATR* を PCR により結合し, 遺伝子銃を用いて形質転換を行った。得られた NAT 耐性株の遺伝子型を検定したところ, HR 効率はいずれも 3%程度であったが, 目的の遺伝子型 ( $\Delta$ *LIG4*) をもつものが得られた。この *LIG4* 破壊株について HR 効率, HR に必要な相同領域サイズなどについて報告する。

#### Efficient homologous recombination in *Cryptococcus neoformans* by DNA ligase disruption

[Kiminori Shimizu](#), HaoMan Li, Akira Watanabe, Katsuhiko Kamei, Masashi Yamaguchi, Susumu Kawamoto. (MMRC, Chiba Univ.)

## P-58

### Production of *Aspergillus fumigatus* swollenin in *A. oryzae*

Xinai CHEN, Jun-ichi MARUYAMA, Manabu ARIOKA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

Swollenin (SWOI), an expansin-like protein, was firstly isolated from *Trichoderma reesei* with the ability to swell cotton fibers and disrupt the structure of plant cell walls. We found that there is a predicted swollenin gene present in *A. fumigatus* genome database. To explore the biochemical function of swollenin from *A. fumigatus*, the gene (*Afswol1*, and its protein AfSWOI) was cloned from a clinical isolated strain, *A. fumigatus* TIMM0063. *Afswol1* gene contains 7 exons and encodes a protein of 476 amino acids composing of a signal peptide, an N-terminal fungal type carbohydrate-binding module (CBM), an expansin-like domain in the middle and a C-terminal expansin-like cellulose binding domain. An expression plasmid of *Afswol1* was constructed under the control of *tefl* promoter and introduced into a double-protease gene disruptant, *A. oryzae* NS-tApE (*niaD<sup>-</sup> sC<sup>-</sup>  $\Delta$ argB adeA<sup>-</sup>  $\Delta$ tpaA::argB  $\Delta$ pepE::adeA*). SDS-PAGE analysis indicated that AfSWOI was efficiently secreted into the culture broth and got over-glycosylated with a molecular weight of approximately 75 kDa, 1.5 times higher of its deduced molecular mass. AfSWOI was purified with cellulose affinity chromatography, and its biochemical properties are currently being investigated.

## P-59

### FTA 簡易ゲノム抽出法を用いた PCR-TTGE による味噌中の真菌叢の解析

鈴木 聡, 福岡真里, 竹谷博子, 松下真由美, 多田功生, 楠本憲一, 柏木豊 (食総研)

味噌の醸造には麹菌を始めとする様々な微生物が働いている。近年 PCR 法を利用して、微生物の同定を行う手法が開発され、その簡便、迅速さから広く行われるようになってきている。しかし、味噌等の醗酵食品は混合物であり、種々の PCR 阻害物質を含むうえ、麹菌、酵母等の真菌類は強固な細胞壁を持つため、菌体からの DNA の抽出が難しく、多数のサンプルを一度に扱うことは困難であった。そのため、多検体解析の効率化が求められている。我々は、既に、寒天培地上のコロニーや味噌等から簡便な前処理によって鋳型 DNA を抽出するコロニー-PCR 法について発表した。本手法は、FTA カード (Whatman) を用いて麹菌ゲノム DNA 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、細胞破碎機等の機器を必要とせず、PCR テンプレートとして十分量の DNA を抽出することができる。本手法によって味噌サンプルから真菌ゲノム DNA を抽出し、リボソーム DNA を PCR 増幅することにより、各種味噌中の真菌叢を PCR-TTGE にて解析したので報告する。

#### Analysis of fungal community in miso by PCR-TTGE using genomic DNA extracted by FTA card

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

## P-60

### 液面固定化 (LSI) システムによる麹菌酵素の生産性について

高木義弘、小田 忍\*、尾関健二、大箸信一 (金沢工大・ゲノム研、\*メルシャン・生資研)

<目的>液面固定化 (LSI) システムは、ポリアクリロニトリルを主成分とする微粒子の中空マイクロスフェアの液面浮上性を利用して、液体培地中に分散させて糸状菌の孢子ならびに菌糸を液面に浮上させて培養することにより、培地液面に強固な糸状菌 - マイクロスフェア複合マットを形成する全く新規な培養方法である。今回、この LSI 培養と液体培養とで麹菌とキシラナーゼ高生産組換え麹菌での目的酵素の生産性について比較検討することを目的とした。

<方法および結果>麹菌としては RIB40 とキシラナーゼ (XynF1) 高生産株を用い、YPD 培地での液体振とう培養と LSI 培養法とで経日的に培地中に生産するタンパク質含量、SDS-PAGE、酵素活性、麹菌菌体量について測定した。RIB40 では、LSI 培養のほうが培地中に生産するタンパク質含量が多く、SDS-PAGE で生産するタンパク質のパターンが異なっていた。キシラナーゼ高生産麹菌では、液体培養では培養後期でキシラナーゼのタンパク質が減少するのに対して、LSI 培養では培養期間中キシラナーゼの生産は継続しており、酵素の生産性が良い結果となった。また麹菌菌体量あたりのキシラナーゼの生産性、他の麹菌での SDS-PAGE の結果についても報告する。

#### Productivity of *Aspergillus oryzae* enzymes by the liquid-surface immobilization (LSI) system.

Yoshihiro Takagi, Shinobu Oda\*, Kenji Ozeki, Shinichi Ohashi (K.I.T., \*Mercian Co.)

## P-61

### 麹菌 *A. oryzae* のプロテアーゼ遺伝子発現解析と *nptB* 破壊株によるヒトリゾチーム生産

木村信弥<sup>1</sup>, 丸山潤一<sup>1</sup>, 竹内道雄<sup>2</sup>, 北本勝ひこ<sup>1</sup> (東大院・農生科・応生工<sup>1</sup>, 東農工大・農・応生科<sup>2</sup>)

【目的】麹菌 *A. oryzae* には多数のプロテアーゼ遺伝子が存在し、生産された異種タンパク質の分解に関与している。これまでにプロテアーゼ遺伝子破壊株が複数取得され、異種タンパク質生産に効果的であることが示されている<sup>1)</sup>。しかし、その破壊のターゲットを的確に選択することは難しい。そこで本研究では、DNA マイクロアレイを用いて 132 のプロテアーゼ遺伝子の発現を解析し、破壊のターゲットを絞り込むこととした。

【結果】5X DPY(pH 8.0)培地におけるプロテアーゼ遺伝子の発現パターンに基づき、クラスタ解析を行った。解析の結果、培養前期(2日)から中期(4日)、後期(6日)と経過するにつれて発現量が上昇するプロテアーゼ遺伝子群の存在が認められた。その中には、これまでにヒトリゾチーム生産に効果のあったプロテアーゼ遺伝子 *pepA*、*tpaA*、*alpA* 等が含まれており、中性プロテアーゼ II をコードする *nptB* 遺伝子が同様の発現パターンを示していた。そこで、*nptB* 遺伝子の破壊株を取得し、5X DPY (pH 8.0) 培地でヒトリゾチーム生産を行った。その結果、培養中期において生産量の増加が確認された。

1) Jin et al., (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press

### Monitoring global gene expression of proteases and improvement of human lysozyme production in *nptB* gene disruptant of *Aspergillus oryzae*

Shinya Kimura<sup>1</sup>, Jun-ichi Maruyama<sup>1</sup>, Michio Takeuchi<sup>2</sup>, Katsuhiko Kitamoto<sup>1</sup>

(Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo<sup>1</sup>, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology<sup>2</sup>)

## P-62

### 麹菌 *A. oryzae* における異種タンパク質生産時のマイクロアレイ解析

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】麹菌 *A. oryzae* 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。その解決策のひとつとして、宿主が大量に分泌しているタンパク質(キャリアータンパク質)と異種タンパク質を融合して発現させるという方法がある。しかし、何故キャリアータンパク質を融合すると生産性が向上するかという問題に対して、その詳細は明らかにされていない。本研究ではこの生産量増加の原因を解明することを目的として、キャリアータンパク質の有無による *A. oryzae* の遺伝子発現への影響についてマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。

【方法及び結果】*A. oryzae* を用いたウシ・キモシンの生産では、キャリアータンパク質を融合して発現することにより生産量が増加することが知られている<sup>1)</sup>。そこで、キャリアータンパク質として  $\alpha$ -アミラーゼ(AmyB)とウシ・キモシンの融合タンパク質、または  $\alpha$ -アミラーゼシグナル配列とウシ・キモシンの融合タンパク質をそれぞれ発現するためのプラスミドを作製し、*A. oryzae* niaD300 株に形質転換した。これらの株を液体培地で生育させたところ、 $\alpha$ -アミラーゼを融合することによるキモシン生産量の増加が確認された。さらに、これらの株を用いてマイクロアレイ解析を行い、キャリアータンパク質の有無による遺伝子発現応答の違いを調べた。その結果、 $\alpha$ -アミラーゼとウシ・キモシンの融合タンパク質発現株において小胞体関連遺伝子の発現上昇が認められた。

1) Tsuchiya et al. (1994) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 895-899

### Microarray analysis of the strains producing a heterologous protein in *Aspergillus oryzae*

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

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

## P-63

### 麴菌菌体内タンパク質解析条件の再検討

北川治恵, 佐野元昭, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)

さまざまな培養条件下において麴菌 *Aspergillus oryzae* が生産するタンパク質を網羅的に解析するため、二次元電気泳動、MALDI-TOF 質量分析を用いた麴菌菌体内タンパク質のプロテオーム解析を行っている。これまでに、YPD 液体培地、貧栄養液体培地、フィルター培地などの条件下で発現するタンパク質の解析を行い、それぞれの条件下で特異的に発現するタンパク質を明らかにしてきた。これらの過程において、より厳密な比較を進めるためには、菌体破碎法、タンパク質抽出法、電気泳動条件などの基礎的な条件の再検討が必要であることが明らかになった。

上記諸条件の検討を行い、それぞれの最適条件を確立し、従来よりも著しく再現性を高めることが出来た。中でも、抽出溶媒に少量の SDS を加える効果が顕著で、タンパク質の抽出効率が向上し、従来行っていたタンパク質の濃縮過程が不要になり、所用時間の短縮と共に、再現性が向上した。確立した方法を用い、培地の種類、培養時間による発現タンパク質の変化を明らかにした。

#### Analysis of intracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under various culture conditions.

Harue Kitagawa, Motoaki Sano, Shinichi Ohashi (KIT)

## P-64

### 米ヌカ培地で高発現する $\beta$ - グルコシダーゼの生産条件の比較

尾関健二, 中川浩志, 近藤花菜, 加治木佑紀子, 篠島里江, 佐野元昭, 小田 忍\*, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研 \*メルシャン・生資研)

<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は少なく、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。麴菌は酵素の宝庫であり、米ヌカの有用成分を可溶化できる新規加水分解酵素遺伝子群の取得、市販酵素剤と遺伝子群の組合せ、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。麴菌 DNA アレイの結果、米ヌカの外側の成分で高発現する麴菌遺伝子として  $\beta$  - グルコシダーゼを取得し、麴菌の発現ベクターで高生産株を育種し、 $\beta$  - グルコシダーゼの生産性を比較検討した。

<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)を麴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。その結果、 $\beta$  - グルコシダーゼ遺伝子が高発現する遺伝子の一つであり、麴菌のセルフクローニング株を育種し、各種培養で生産性を検討した。 $\beta$  - グルコシダーゼは、液体培養では培地中には分泌されず、菌体内の酵素活性は親株に比べ 100 倍程度高生産した。小麦フスマ培養では、抽出液は親株に比べ 50 倍程度の生産性を示した。LSI 培養では、培地中に分泌され、親株の 300 倍程度の生産性が確認できた。LSI 培養が菌体内酵素の分泌生産できる培養法である可能性があることが分かった。

#### Production of $\beta$ -glucosidase in *Aspergillus oryzae* under a rice bran cultivation.

Kenji Ozeki, Hiroshi Nakagawa, Kana Kondo, Yukiko Kajiki, Rie Shinojima, Motoaki Sano, Shinobu Oda\*, Shinichi Ohashi(K.I.T., \*Mercian Co.)

## P-65

### 麹菌 *A. oryzae* の細胞質型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の性質と機能

高谷康平、北本勝ひこ、有岡学（東大院・農生科・応生工）

【目的】ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)はグリセロリン脂質の2位のエステル結合を加水分解し、脂肪酸とリゾリン脂質を遊離する酵素であり、哺乳類ではアラキドン酸代謝系を通じた脂質メディエーターの産生に関与することが知られている。一方で、微生物由来の PLA<sub>2</sub> に関する知見は乏しく、その生理的役割は殆ど明らかにされていない。我々はこれまで、麹菌 *A. oryzae* がゲノム中に持つ2つの分泌型 PLA<sub>2</sub> の生理機能の解析を行い、それが分生子および菌糸における酸化ストレス抵抗性などに働く可能性を示した。一方、本研究では麹菌の持つ細胞質型 PLA<sub>2</sub>(cPLA<sub>2</sub>)の機能解析を目的とした。

【方法と結果】麹菌ゲノムから唯一の cPLA<sub>2</sub> 遺伝子である *AoplaA* をクローニングした。その C 末端に HA および His<sub>6</sub> タグを付加した AoPlaA-HA-His<sub>6</sub> 融合タンパク質を高発現する麹菌株の作製を行い、その菌体抽出液から Ni<sup>2+</sup>カラムを用いて AoPlaA タンパクを精製した。現在、精製したタンパク質を用いて Ca<sup>2+</sup>濃度依存性および至適 pH 等の酵素学的性質を検討している。続いて、AoPlaA-EGFP 融合タンパク質を麹菌に発現させその局在を観察した。その結果、AoPlaA-EGFP が細胞内の動的な線状構造体に局在することが分かった。ミトコンドリア染色試薬 MitoTracker との共染色およびミトコンドリアマーカートンパク質を共発現する株の観察により、AoPlaA-EGFP が予想外にもミトコンドリアに局在することが示唆された。この局在については予備的な細胞分画実験による確認を行っている。一方、*AoplaA* 破壊株の取得が可能であったことから、*AoplaA* は必須遺伝子ではないと考えられた。現在、高発現株とともに破壊株の表現型を探索しており、それらを通じて AoPlaA タンパクの生理的な機能が同定できるものと期待している。

#### Molecular characterization of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> in *Aspergillus oryzae*.

Kohei Takaya, Katsuhiko Kitamoto, Manabu Arioka (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

## P-66

### ゲノム情報に基づく麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来プロテアーゼ群の発現

片瀬 徹<sup>1</sup>, 星由紀子<sup>1</sup>, 結城健介<sup>1</sup>, 小出芳直<sup>1</sup>, 竹内道雄<sup>2</sup>, 山形洋平<sup>3</sup>, 楠本憲一<sup>4</sup>, 石田博樹<sup>5</sup>  
(<sup>1</sup>天野エンザイム,<sup>2</sup>東京農工大院・応生科,<sup>3</sup>東北大学・院・応生科,<sup>4</sup>食総研,<sup>5</sup>月桂冠・総研)

【目的】麹菌ゲノム解析の結果、麹菌には他の *Aspergillus sp.* よりも3割ほど多い135種のプロテアーゼ遺伝子の存在が見出された。本研究は、麹菌全プロテアーゼ遺伝子の糸状菌を宿主とした強制発現、網羅的なプロテアーゼの酵素化学的性質の解明、および麹菌全プロテアーゼのカタログ化を目的としている。

【方法・結果】我々はセリンおよびシステインプロテアーゼを中心とした26種のプロテアーゼに関して、塩基配列、推定アミノ酸配列を基に *In silico* 解析を行い、各々の解析結果から判断してその局在を決定した。続いて、月桂冠総研により開発された高発現共通プラットフォームを用い、*A. nidulans* を宿主とする形質転換を実施した。得られた形質転換体を培養した結果、いくつかのプロテアーゼの発現が確認された。以上の事から、本発現系によりプロテアーゼ生産が正常に行われる事が実証された。

なお本研究は、生研センター基礎研究推進事業の一環として行われたものである。

#### Expression of Putative Proteases from *Aspergillus oryzae* Genome Analysis.

Toru Katase<sup>1</sup>, Yukiko Hoshi<sup>1</sup>, Kensuke Yuuki<sup>1</sup>, Yoshinao Koide<sup>1</sup>, Michio Takeuchi<sup>2</sup>, Youhei Yamagata<sup>3</sup>, Ken-Ichi Kusumoto<sup>4</sup>, Hiroki Ishida<sup>5</sup>

(<sup>1</sup>Amano Enzyme Inc., <sup>2</sup>Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, <sup>3</sup>Tohoku Univ., Grad. Sch. Agri. Sci., <sup>4</sup>Natl. Food. Res. Inst., <sup>5</sup>Gekkeikan Sake Co. Ltd)

## P-67

### 液体培養とフィルター培養における麹菌 *Aspergillus oryzae* の熱応答比較解析

寺林靖宣<sup>1</sup>、山根倫子<sup>1</sup>、佐野元昭<sup>2</sup>、小池英明<sup>1</sup>、大箸信一<sup>2</sup>、町田雅之<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>産総研、<sup>2</sup>金沢工大)

<目的> 麹菌をはじめとする糸状菌は産業的にも重要な微生物であり、伝統的醗酵産業や蛋白質分泌生産に広く用いられている。醸造醗酵産業に用いられる培養法は、液体培養と固体培養の2種類に大別される。醗酵生産においては pH、水分、通気性、温度などの最適な制御がなされていると考えられる。一般に、固体培養は重要な酵素の生産に有利とされるが、培地の熱伝導や流動性の低さにより、温度制御は液体培養に比較して難しい。そこで本研究では、固体培養に広く用いられている麹菌の熱ストレス応答性の解析を行った。固体培養のモデルとして、菌体と培地の分離が容易であるフィルター培養<sup>1)</sup>を用い、マイクロアレイによる遺伝子発現量、CE-MSによる代謝物質量の経時的変化を測定することにより、フィルター培養と液体培養における熱ストレスに対する応答の比較を行った。

<方法> *Aspergillus oryzae* RIB40 株の液体培養およびフィルター培養を行い、それぞれに heat shock を与えてサンプルとした。抽出した mRNA より麹菌オリゴ DNA マイクロアレイを用いて発現量を解析し、熱応答による遺伝子発現の経時的変化を測定した。また、抽出物の CE-MS 測定<sup>2)</sup>を行い、熱応答による菌体内の代謝物の変化を測定した。現在、モデル生物との熱ストレス応答性の比較、培養条件特異的な熱ストレス応答の解析を行っている。

1) H. Ishida et al. *J. Ferment. Bioeng.* (86) 301-307 (1998)

2) 寺林ら、日本生物工学会大会講演要旨集 27 (2006)

### Comparative heat shock analysis of *Aspergillus oryzae* between liquid and filter cultivations

Yasunobu Terabayashi<sup>1</sup>, Noriko Yamane<sup>1</sup>, Motoaki Sano<sup>2</sup>, Hideaki Koike<sup>1</sup>, Shinichi Oohashi<sup>2</sup>, Masayuki Machida<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>AIST, <sup>2</sup>KIST)

## P-68

### 黄麹菌菌蓋のプロテオーム解析

神太郎、竹内道雄 (農工大院・応生化)

黄麹菌は多種多様な遺伝子を発現するが、その発現産物であるタンパク質の種類・量は培養条件によって大きく異なることが知られている。この違いを明らかにするため、これまでに数種類の培養条件下で、菌体内タンパク質について研究を行ってきた。振とう培養した麹菌はペレット状となり分生子の形成は認められないが、静地培養した場合には菌蓋を形成し菌蓋上面に分生子の形成が起こる。

今回、*Aspergillus oryzae* RIB40 を液体培地で3日間振とう培養した菌体と、静地培養して得た菌蓋の菌体内タンパク質について比較した。タンパク質は二次元電気泳動・MALDI-TOF/MS を用いた同定と、画像解析ソフトによる発現量の定量化で解析した。その結果、全体で約 400 個のスポットを確認したが、発現量の多いメインのスポットに関しては大きな差は認められなかった。しかし、液体培養菌体に比べ、菌蓋で5倍以上強く検出されるスポットが約 30 個存在していた。一方、振とう培養菌体では約 50 個のタンパク質が多くなっていた。静地培養で多いタンパク質は、低分子側に、振とう培養で多いものは高分子側に集中していた。菌蓋で強く検出されたスポットには分解産物の他、低分子の機能未知なタンパク質も含まれていた。それらの不活化や活性化が菌蓋としての生育に重要である可能性が考えられた。

### Proteome analysis of intracellular proteins from surface pad of *Aspergillus oryzae* RIB40.

Taro Ko, Michio Takeuchi

(Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)



## P-69

### 麹菌 *Aspergillus oryzae* の孢子形成制御系の解析

小川真弘, 徳岡昌文, 金鋒杰, 松島健一郎, 高橋理, 町田雅之<sup>a</sup>, 小山泰二 (野田産研, <sup>a</sup>産総研)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* の孢子は、「種麹」とよばれ産業利用の上で非常に重要な地位を占めるものであるが、その形成を制御する機構に関する研究は少ないのが現状である。また近年、同じ *Aspergillus* 属であっても *A. nidulans* と *A. fumigatus* では孢子形成制御系に違いがあることが報告されており<sup>1)</sup>、*A. oryzae* の制御系がどのようになっているか興味深い。そこで我々は、*A. oryzae* の孢子形成制御系について遺伝子破壊株を用いた解析を行ったので、その結果について報告する。

【方法および結果】*A. nidulans* において孢子形成に関与すると言われている、シグナル伝達系 (*flbA* など) および転写制御因子 (*brlA*, *abaA* など) の *A. oryzae* でのオーソログ遺伝子の破壊株を作製し、その表現型を調べた。ターゲティングベクターは Fusion PCR を用いて作製しマーカーには *pyrG* を用いた。宿主には *A. oryzae* RIB40 の  $\Delta ku70 \Delta pyrG$  株およびその誘導体を使用した。その結果、*A. oryzae* の *flbA* オーソログ破壊株では *A. nidulans* の *flbA* 破壊株での報告<sup>1)</sup>と同様に孢子形成が見られなくなった。いっぽう *A. fumigatus* の *flbA* 破壊株では孢子形成に大きな変化が現れないことが報告されている<sup>1)</sup>。以上のことから、*A. oryzae* の *flbA* を介した孢子形成制御系は *A. nidulans* と類似していることが示唆された。

また我々は現在、転写制御因子を網羅的に破壊したライブラリーを作製しているが<sup>2)</sup>、そのライブラリーの中から新規の孢子形成制御因子を見出したので、その解析結果についても報告する。

1) J.-H., Mah. and J.-H., Yu.: *Eukaryot. Cell*, **5**, 1585-1595 (2006)

2) 小川真弘, 平成 19 年度糸状菌遺伝子研究会, 第 28 回例会, 講演要旨集

### Analysis of conidiation control in the Koji-mold *Aspergillus oryzae*

Masahiro Ogawa, Masafumi Tokuoka, Feng Jie Jin, Ken-ichiro Matsushima, Tadashi Takahashi, Masayuki Machida<sup>a</sup> and Yasuji Koyama (Noda Institute for Scientific Research, <sup>a</sup>AIST)

## P-70

### 麹菌の培養条件に応答したアミノ酸代謝制御の解析

小池英明<sup>1</sup>, 寺林靖宣<sup>1</sup>, 山根倫子<sup>1</sup>, 佐野元昭<sup>2</sup>, 大箸信一<sup>2</sup>, 町田雅之<sup>1,2</sup> (1産総研セルエンジニア、2金沢工大)

麹菌は、伝統的な食品産業に利用される。それら醸造過程では、培地の栄養価などの環境に合わせて、麹菌は、分解酵素や様々な低分子性の物質を生産して分泌する。この高い物質生産能力は、従来の食品産業でも経験的に利用されているが、その分子機構を解明し、さらに生産・分泌能力を高めて、今後有用物質の生産として応用すべきである。

培地中の栄養価の相違や、液体中と固体上という培養方法の相違による遺伝子発現の比較から、500個以上の遺伝子が転写レベルで制御されることを明らかにした。特にアミノ酸代謝に関わる遺伝子群に注目して、培養条件の違いによる遺伝子発現量の変化、代謝物の変化から、代謝系遺伝子群の制御機構を解析した。DNAマイクロアレイ、CE-MSを用いた解析を行った結果、アミノ酸の生合成系遺伝子は、貧栄養および固体培養の両方で共通して抑制された。その一方で、栄養価の違いでは栄養素に特異的に応答する制御を同定することができた。これらの結果を基に、その変化を司る転写因子や変化を伝達するシグナルの推定を行っている。

### Regulation of amino acid metabolism of *Aspergillus oryzae*

Hideaki Koike<sup>1</sup>, Yasunobu Terabayashi<sup>1</sup>, Noriko Yamane<sup>1</sup>, Motoaki Sano<sup>2</sup>, Shinichi Ohashi<sup>2</sup>, Masayuki Machida<sup>1,2</sup>

(1 RICE, AIST, 2 Kanazawa Institute of Technology)

## P-71

### 麴菌の薬剤に対する転写応答解析と創薬標的遺伝子機能解析システムの構築

丸井淳一郎<sup>1</sup>, 吉見 啓<sup>1</sup>, 玉野孝一<sup>2</sup>, 小池英明<sup>2</sup>, 織田 健<sup>3</sup>, 佐野元昭<sup>3</sup>, 町田雅之<sup>2</sup>, 阿部敬悦<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>東北大・未来研, <sup>2</sup>産総研, <sup>3</sup>金沢工大・ゲノム研)

【目的】糸状菌には動植物に対し病原性を示すものが数多く存在し、優れた選択毒性と効き目を示す新しい抗真菌剤の開発が常に求められている。我々は麴菌をはじめとする微生物ゲノム情報を活用し、抗真菌剤開発に有用な標的遺伝子のデータベースの作成を目的とした研究開発を行っている。本発表では抗真菌剤に対する麴菌遺伝子の転写応答について解析した結果と、創薬標的候補遺伝子の機能解析に有効なアッセイ系の構築について報告する。

【方法および結果】作用点既知の抗真菌剤を添加した最少培地で培養した麴菌より RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行った。作用点の異なる複数の薬剤を使用することにより、麴菌の薬剤応答に関する転写プロファイルの体系的理解を図った。その結果、薬剤に曝された麴菌においては、P450、輸送体などの一般的な解毒排出機構に加え、薬剤に特異的な遺伝子発現応答が見られた。現在、これらの知見を活用し、麴菌の生理機能の状態を観察するアッセイ系の構築を行っている。また、創薬標的遺伝子の機能解析への有効性についても検討する予定である。

#### A genomic approach to develop a reporter system exploring novel antifungal targets

Junichiro Marui<sup>1</sup>, Akira Yoshimi<sup>1</sup>, Koichi Tamano<sup>2</sup>, Hideaki Koike<sup>2</sup>, Ken Oda<sup>3</sup>, Motoaki Sano<sup>3</sup>, Masayuki Machida<sup>2</sup>, Keietsu Abe<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>Tohoku Univ. NICHe, <sup>2</sup>AIST, <sup>3</sup>KIT)

## P-72

### 麴菌の酸化ストレス条件下における遺伝子発現と転写制御因子 *kapA* についての解析

小竹学<sup>1,2</sup>, 坂本和俊<sup>2</sup>, 岩下和裕<sup>1,2</sup>, 山田 修<sup>2</sup>, 下飯仁<sup>1,2</sup>, 三上重明<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>広島大・先端研, <sup>2</sup>酒総研)

麴菌(*Aspergillus oryzae*)は発酵産業から医薬品産業まで広く利用されている微生物であり、培養形態の違いにより生産するタンパク質や代謝産物に違いがあることが知られている。産業的利用の中で麴菌は様々な条件下で生育しており、多種の環境ストレスを受けていると考えられている。このことから、培養形態の違いによる各種ストレスへの応答機構について研究することは重要であると考えられるが、現在のところその多くは明らかになっていない。そこで本研究では麴菌の酸化ストレスへの応答機構について解析を行った。

まず、麴菌(RIB40 株)について、液体培養と固体培養を模倣した条件であるメンブレン培養でのストレス応答について、全遺伝子を搭載した麴菌 DNAChip を使って網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、酸化ストレスによって遺伝子発現が減少する遺伝子群は、液体培養とメンブレン培養間で大きく異なることが分かった。一方で遺伝子発現が上昇する遺伝子群については、共通して発現上昇する遺伝子が多く見られた。

また、他の生物種において酸化ストレス応答遺伝子の発現制御をしていると報告されている転写制御因子 AP-1 について、麴菌のオルソログ遺伝子である *kapA* の破壊株を作成し、液体培養での酸化ストレス応答時の遺伝子発現解析を行った。その結果、RIB40 株において酸化ストレスに応答して発現が上昇していた遺伝子の多くが、*kapA* 破壊株においては発現上昇が起こらないことが明らかになった。また、興味深いことに麴菌の *kapA* 遺伝子の破壊は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 感受性を引きおこすが、その cDNA は、*Saccharomyces cerevisiae* の AP-1 オルソログである *yap1* 遺伝子破壊株の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 感受性を全く相補しなかった。

#### Analysis of gene expression under oxidative stress condition and *kapA*, a transcription-factor gene in *Aspergillus oryzae*.

Manabu Kotake<sup>1,2</sup>, Kazutoshi Sakamoto<sup>2</sup>, Kazuhiro Iwashita<sup>1,2</sup>, Osamu Yamada<sup>2</sup>, Hitoshi Shimoi<sup>1,2</sup>, Shigeaki Mikami<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>Hiroshima Univ., <sup>2</sup>NRIB)

## P-73

### ***Neurospora crassa* の OS-2 MAP キナーゼは体内時計により制御される遺伝子の調節に 関与する**

渡邊節子、高橋正和、山下和宏、坂野真平、福森文康、藤村真 (東洋大・生命)

アカパンカビの OS-2 (MAP キナーゼ) は、浸透圧などのストレスに応答して、グリセロール合成酵素や糖新生成酵素の遺伝子群を制御している。昨年度、体内時計により制御されている *ccg-1/rgg-1* (clock-controlled gene: CCG) が OS-2 により発現調節されていることを報告した。今回は、CCG 群および時計遺伝子に着目し、Universal Probe を用いたリアルタイム RT-PCR 解析を行った。その結果、CCG 群のうち、新たに *ccg-13*, *bli-3* (blue light inducible), *con-10* (conidiation) が、浸透圧およびフルジオキソニル処理により、OS-2 依存的に誘導されることが明らかになった。一方、*ccg-2* や *bli-4* は誘導されなかったことから、CCG 群の一部が OS-2 制御を受けると考えられた。また、体内時計を構成する *frq*, *wc-1*, *wc-2* の発現に浸透圧処理の影響は認められなかった。さらに、アカパンカビの概日リズムは、*ras-1* の点変異である *bd* 変異により band として可視化できるが、*os-1:bd* および *os-5:bd* の二重変異は、バンド形成に影響は認められなかった。このことから、OS-2 と概日時計は、下流で制御される遺伝子に共通性がみられるが、基本的には独立していると考えられた。

#### **OS-2 mitogen activated protein kinase regulates some clock-controlled genes in *Neurospora crassa***

Setsuko Watanabe, Masakazu Takahashi, Kazuhiro Yamashita, Shinpei Banno, Fumiyasu Fukumori, and Makoto Fujimura (Fac.of Life Sci.,Toyo Univ.)

## P-74

### **糸状菌 *Aspergillus nidulans* の His-Asp リン酸リレー系における農薬応答機構の解析**

萩原大祐<sup>1</sup>、水野猛<sup>2</sup>、阿部敬悦<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東北大・未来研、<sup>2</sup>名大院・生命農学)

His-Asp リン酸リレー情報伝達系はバクテリアから高等植物にまで保存された普遍的な環境応答機構である。この機構は糸状菌にも広く保存されており、我々は *Aspergillus nidulans* を対象に体系的な機能解析を進めている。これまでの解析から、*A. nidulans* におけるジカルボキシイミド系およびフェニルピロール系の抗菌剤に対する分子応答および生育感受性は、His-Asp リン酸リレー系の構成因子である NikA(HK)、SrrA(RR)、SskA(RR)に依存していることが示された。*A. nidulans* に限らず、他の糸状菌においてもこれらの因子を中心とした抗菌剤応答モデルが予想されており、新規薬剤開発に向けた基盤知識という点からも詳細な分子機構の解明が期待されている。そこで、この抗菌剤に対する糸状菌の細胞応答の理解を目的として DNA マイクロアレイ実験を行ない、抗菌剤に応答した遺伝子発現挙動を網羅的に解析した。これらのデータをもとにして抗菌剤の作用機序の解明を目指すとともに、糸状菌における His-Asp リン酸リレー情報伝達系の生理機能についても考察したい。

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

Daisuke Hagiwara<sup>1</sup>, Takeshi Mizuno<sup>2</sup>, Keietsu Abe<sup>1</sup>

(NICHe, Tohoku Univ.<sup>1</sup>, Grad. Sch. Bioagricultural Sci. Nagoya Univ.<sup>2</sup>)

## P-75

### *Aspergillus nidulans* ヒスチジンキナーゼ NikA の機能解析

鈴木麻子, 金丸京子, 松林良博, 高見絵里香, 萩原大祐, 水野猛, 加藤雅士, 小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* は、ジカルボキシイミド系およびフェニルピロール系の糸状菌特異的農薬により、著しく生育が阻害される。当研究室におけるこれまでの研究により、他の多くの糸状菌同様、Nik-1 型 histidine kinase である NikA を破壊することで、これらの農薬に対して耐性となることが明らかにされている。また *A. nidulans* が持つ2つの response regulator, SskA と SrrA の二重破壊株は農薬耐性となることから、NikA により認識された農薬シグナルは SskA-HogA 依存的経路と SrrA 依存的経路の両方に伝達されることが、共同研究者の萩原らにより報告されている。

本研究では、*A. nidulans* NikA の機能をより詳細に解析するため、NikA 過剰発現株を作製して様々なストレスに対する応答を検討した。その結果、農薬に対しては NikA 過剰発現株と野生株の生育に顕著な差は見られなかった。一方浸透圧(1M NaCl)に対しては、NikA 過剰発現株は野生株よりも強い感受性を示し、NikA が浸透圧ストレス応答に何らかの関与をしていることが示唆された。また、NikA はシグナル感知に関与する HAMP domain を6つ持っているが、現在その農薬・浸透圧応答における機能についても検討している。

#### Physiological roles of the NikA histidine kinase in *Aspergillus nidulans*.

Asako Suzuki, Kyoko Kanamaru, Yoshihiro Matsubayashi, Erika Takami, Daisuke Hagiwara, Takeshi Mizuno, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi (Dept. of Biological Mechanisms and Functions, Grad. Sch. Bioagricultural Sci. Nagoya Univ.)

## P-76

### 浸透圧アダプテーションにおける麴菌の遺伝子発現解析

西浦未華<sup>1,2</sup>, 坂本和俊<sup>2</sup>, 山田 修<sup>2</sup>, 岩下和裕<sup>1,2</sup>, 三上重明<sup>2</sup>(1 広島大, 2 酒総研)

醸造において麴菌は、「麴」という「固体培養」により使用され、液体培養に比べて固体培養では多種多量の酵素を生産するなど、周囲の環境条件に合わせて遺伝子の発現パターンが異なることが明らかになってきている。これまでの醸造工学上の知見、*glaB* 遺伝子の発現解析から、浸透圧の変化が麴菌の遺伝子発現に影響を与えることが知られている。また酒総研では、2005年に発表された麴菌「RIB40株」のゲノム情報に基づき、麴菌 DNACHIP(Affymetrix 社製)を作成している。

そこで本研究においては、この麴菌 DNACHIP を用いて、浸透圧に対する麴菌遺伝子の発現応答、特に高浸透圧条件にアダプテーションが起こったと考えられる時点での遺伝子発現について検討を行った。炭素源を Glucose または Dextrin とした最少培地で、液体培養及びメンブレンを用いたプレート培養にて前培養を行い、0.8M NaCl 条件に移行後 6hr 経過した時の遺伝子発現について検討を行った。その結果、液体培養と固体培養間では、浸透圧アダプテーションにより発現が上昇する遺伝子群、または発現が減少する遺伝子群が大きく異なることが明らかとなった。このことは、液体培養と固体培養では浸透圧アダプテーションの機構が異なることを示唆している。また、培地の炭素源によって浸透圧アダプテーション時の遺伝子発現が大きく異なることが明らかとなった。

#### Analysis of *Aspergillus oryzae* gene expression in adaptation to osmotic pressure

Mika Nishiura<sup>1,2</sup>, Kazutoshi Sakamoto<sup>2</sup>, Osamu Yamada<sup>2</sup>, Kazuhiro Iwashita<sup>1,2</sup>, Shigeaki Mikami<sup>2</sup>  
(1 Hiroshima Univ., 2 NRIB)

## P-77

### アカパンカビの転写調節因子 ATF-1 は CRE 配列を認識してカタラーゼ *cat-1* を制御する

山下和宏、渡邊節子、塩澤あずさ、福森文康、藤村真 (東洋大・生命)

アカパンカビの OS-2 MAP キナーゼは、浸透圧ストレスおよびフルジオキシニル処理により活性化され、カタラーゼ遺伝子 (*cat-1*)、clock-controlled 遺伝子 (*ccg-1*) などの遺伝子発現を誘導する。CREB (cAMP response element-binding protein) 型の転写調節因子 *atf-1* 遺伝子の破壊株では、これらの遺伝子の発現誘導が、*os-2* 破壊株と同様に顕著に低下する。そこで、ゲルシフト法を用いて ATF-1 タンパク質の結合配列の決定を行った。大腸菌でタグ融合タンパク質として発現した ATF-1 を精製し、各遺伝子上流 500bp について相互作用検出をおこなったところ、*cat-1* および *ccg-1* 遺伝子で DNA-タンパク質複合体形成によるシフトバンドが検出された。*cat-1* のプロモーター領域について更なる解析を行った結果、ATF-1 は CRE 配列 (TGACGTCA) を認識して結合することが示唆された。CAT-1 は、分生子特異的に存在するカタラーゼであるが、フルジオキシニル処理した菌糸で、その酵素活性が検出される。*atf-1* 破壊株では、フルジオキシニル処理による菌糸での CAT-1 の誘導が消失すると同時に、分生子の CAT-1 活性を完全に消失していた。このことから、CAT-1 の発現は、完全に ATF-1 に依存していると考えられる。一方、*os-2* 変異株では、フルジオキシニルによる菌糸の CAT-1 誘導は消失したが、分生子には、野生株よりは低いものの十分な CAT-1 活性が検出された。従って、ATF-1 が OS 経路以外の制御を受けることが示唆された。

#### ATF-1 transcription factor regulates catalase *cat-1* expression through CRE-element in *Neurospora crassa*.

Kazuhiro Yamashita, Setuko Watanabe, Azusa Shiozawa, Fumiyasu Fukumori, Makoto Fujimura (Life Sci., Toyo Univ.)

## P-78

### 麹菌 *A. oryzae* における *Aof1bA* 遺伝子破壊株の表現型解析

山口悠、丸山潤一、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】*A. oryzae* はこれまで有性世代が見つかっていないことから、不完全菌として分類されている。しかしゲノム配列が解読され、接合型遺伝子 *MAT1-1* を初めとする有性生殖関連遺伝子が *A. oryzae* にも存在することが分かった。*S. cerevisiae* の Sst2 は RGS (Regulator of G-protein Signaling) タンパク質をコードしており、3量体 G タンパク質の  $\alpha$  サブユニット Gpa1 を不活性化する GTPase 活性促進因子 GAP である。この欠損株は接合フェロモンに対し高い感受性を示す。本研究では、*SST2* 相同遺伝子破壊により、*A. oryzae* の有性生殖に関する機能解析を行った。

【方法と結果】*A. oryzae* ゲノムデータベースより *SST2* に相同性を有する遺伝子を検索した結果、AO090026000532 を見出した。この遺伝子は 719 アミノ酸からなるタンパク質をコードすると推定され、*Aspergillus nidulans* FlbA と 77.6%の相同性を有するため *Aof1bA* と命名した。*A. oryzae* NSRKu70-1-1 株 (*MAT1-1 niaD<sup>-</sup> sC<sup>-</sup> adeA<sup>-</sup> Dku70*) を宿主に、*adeA* をマーカーを用いて *Aof1bA* 遺伝子破壊株を作製した。破壊株を様々な寒天培地で培養したところ、生育が若干悪くなり、分生子形成能が著しく低下した。PD 培地ではコントロール株と比較して気中菌糸が短いため、コロニーが平らになった。また DPY 培地でコントロール株は菌核を形成するが、破壊株では観察されなくなった。次に破壊株を Mating Type が異なる株である AO6 株 (*MAT1-2* 型) と対峙培養を行い、菌核の形成を調べたところ、破壊株と AO6 との境界に黒い菌核が形成された。さらに、菌核を割って断片を観察したところ、球状の構造体が観察された。

#### Phenotypic analysis of the *Aof1bA* disruptant in *Aspergillus oryzae*

Haruka Yamaguchi, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto  
(Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

## P-79

### NsdD type GATA factor in *Aspergillus fumigatus*

Yoon-Hee Cheon, <sup>1</sup>Hye-Ryun Kim, Jong Hwa Kim, <sup>1</sup>Dong-Min Han and Kap-Hoon Han (Dept of Pharm. Engineering, Woosuk Univ. 565-701, S. Korea, <sup>1</sup>Faculty of Life Sciences, Wonkwang Univ. 570-749, S. Korea)

*Aspergillus fumigatus* is known as a primary causative agent of aspergillosis, which is an opportunistic infectious fungal disease mainly localized in the respiratory system of human and animals. Currently, *A. fumigatus* has no known sexual development process, while a homothallic fungus *Aspergillus nidulans*, which is a close relative of *A. fumigatus*, undergoes complete sexual development process. To dissect hidden sexual development-related process in *A. fumigatus*, we first identified a putative ortholog of the *nsdD* gene, which encodes a GATA type transcription factor required for sexual development in *A. nidulans*. Gene expression study showed that the *A. nidulans nsdD* gene is highly expressed in the hypoxic condition. Similarly, the *A. fumigatus* ortholog of *nsdD*, named *AfnsdD*, behaves very similar to *A. nidulans nsdD*. *AfnsdD* gene encodes a putative GATA type factor consist of 493 aa and has 62% identity with *A. nidulans NsdD*. Knock-out mutant of *AfnsdD* showed highly melanized phenotype which is very similar to *A. nidulans nsdD* mutant. These results indicate that the NsdD-mediated molecular mechanism is conserved in Aspergilli although many of them have no sexual development. This work was supported by grant from KOSEF (R1-2006-000-11204-0).

## P-80

### 糸状菌 CCAAT-box 結合因子によるリボソームタンパク質遺伝子の発現抑制機構

高橋明珠, 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-box 結合因子(Hap 複合体)は産業上重要な酵素遺伝子を始めとする様々な遺伝子の転写を制御することが明らかとなっている。これまでに我々は、麴菌 DNA マイクロアレイ解析により、Hap 複合体がリボソームタンパク質 (RP) 遺伝子の転写を一様に抑制することを明らかにした。

今回、麴菌に加え、遺伝学的解析に優れた *Aspergillus nidulans* の代表的な RP 遺伝子の発現についてもノーザン解析を行ったところ、*A. nidulans* においても Hap 複合体依存の転写抑制が起こることが分かった。従って、Hap 複合体による RP 遺伝子の転写抑制は麴菌特有の現象ではなく、より普遍的な現象であることが明らかとなった。これら RP 遺伝子のプロモータ配列には CCAAT 配列を有するものと有さないもの両方があり、Hap 複合体による抑制はプロモータ領域への直接の結合によるものでなく、間接的なものであることが示唆された。この可能性を検証するために、代表的ないくつかの RP 遺伝子プロモータに *lacZ* 遺伝子を融合して *A. nidulans* に導入し、*in vivo* における CCAAT 配列の機能を解析した。その結果、予想通りプロモータ中の CCAAT 配列は RP 遺伝子の転写抑制に直接関与していないことが示された。プロモータ中の保存配列を詳細に調べると、全ての RP 遺伝子プロモータに共通する 9 塩基の配列 (C T A A G C G A G) が存在していることが明らかとなった。現在、この配列が RP 遺伝子の発現に与える影響に関して詳細な解析を進めている。

### Mechanisms for transcriptional repression of ribosomal protein genes by the CCAAT-box binding factor in filamentous fungi.

Akemi Takahashi, Motoaki Sano\*, Tetsuo Kobayashi, Masashi Kato  
(Grad. Sch. of Bioagricultural Sci., Nagoya Univ., \*KIT)

## P-81

### 糸状菌 CCAAT 結合因子サブユニットの発現・局在性プロファイル

伊奈慎太郎, 小林哲夫, 加藤雅士 (名大院・生命農)

【目的】糸状菌 CCAAT 結合因子である Hap 複合体は、様々な遺伝子の転写制御に関与する広域転写制御因子であり、HapB/C/E の 3 つのサブユニットからなる。我々はこれまでに Hap 複合体のアセンブリ機構や核移行の仕組みなどを明らかにしてきた。本研究では、各サブユニット遺伝子の発現時期や発現部位、発現量についての知見を得ることを目的として、糸状菌 *Aspergillus nidulans* の各 Hap 複合体サブユニットを GFP で蛍光標識し、その発現の様子を観察した。

【方法と結果】*A. nidulans* の各サブユニットの構造遺伝子を PCR により単離し、その C 末端部分に GFP 遺伝子を翻訳の読み枠が合うように連結したプラスミドをそれぞれ作成し、*A. nidulans* 染色体上の各サブユニットの遺伝子座において、相同組換えによりサブユニット遺伝子の下流に GFP 遺伝子を導入した。得られた株を様々な条件で培養し、各サブユニットと GFP との融合タンパク質の発現強度、局在性を蛍光顕微鏡により観察した。その結果、各 GFP 融合サブユニットは菌体のほとんどの部分に存在しており、それらは核に局在化していたが、存在量が低下している部分も見られた。また、経時的な観察から、細胞の分裂にともなう一時的な局在性の低下も観察された。

#### Expression and localization profiles of the subunits of the CCAAT-binding complex in filamentous fungi.

Shintaro Ina, Tetsuo Kobayashi, Masashi Kato

(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.)

## P-82

### 麹菌 *A. oryzae* の MAL クラスターの初期アミラーゼ系酵素生産への関与

長谷川祥子, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

【目的】*A. oryzae* のアミラーゼ系酵素生産は古くから醸造産業に利用されてきた重要な特徴である。アミラーゼ系酵素遺伝子は、培地中のデンプン、マルトースなどのマルトオリゴ糖の存在下で転写因子 AmyR により正の制御を受けている。この AmyR 研究の過程で、*A. oryzae* のマルトース資化遺伝子群である MAL クラスターが見出された。私達は、MAL クラスターを構成するマルトースパーミアーゼ遺伝子 *malP*、菌体内マルターゼ遺伝子 *malT* が、AmyR ではなくクラスター内に存在する転写因子 MalR により発現誘導されていることをすでに明らかにしている。本研究では、この MAL クラスター遺伝子をはじめとするマルトオリゴ糖の分解資化関連遺伝子の総合的な発現制御機構の解明を中心に、*A. oryzae* の最大の特徴であるアミラーゼ系酵素生産機構を、炭素源の取り込みから酵素生産まで総合的に明らかにすることを目的としている。【結果】*malP* 破壊株および *malR* 破壊株は、マルトース培地だけでなくデンプン培地での生育不良を示した。そこで、両株の  $\alpha$ -アミラーゼ活性を調べたところ、マルトースによる誘導後 12 時間までは野生株に比べて著しく活性が低く、その後徐々に活性の上昇が認められ、遺伝子発現量や培地中のアミラーゼタンパク量も同様の傾向が見られた。*malP* は MalR により発現が制御されていることから、この結果は MAL クラスターの MalP により取り込まれたマルトースが AmyR に制御されているアミラーゼ系酵素の誘導初期における生産に直接的または間接的に関与していることを示唆している。*A. nidulans* では *A. oryzae* の MAL クラスターのオーソログは AmyR により制御されていると報告されており、マルトオリゴ糖、デンプンの分解資化には *A. oryzae* 独自の機構が存在するものと考えられる。現在、*malP*、*malR* 各破壊株のフルゲノムアレイを用いた解析により、他の遺伝子発現への影響についても検討している。

#### The MAL cluster in *A. oryzae* is involved in production of amylolytic enzymes at early stage.

Sachiko Hasegawa, Katsuya Gomi

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

## P-83

### 麴菌(*Aspergillus oryzae*)DNA トランスポゾン *Crawler* の転移活性と mRNA 分子種変動に及ぼすストレス処理の影響

小笠原博信<sup>1</sup>、小畑 浩<sup>2</sup>、秦洋二<sup>2</sup>、高橋 砂織<sup>1</sup>、五味 勝也<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>秋田県農技セ・総食研、<sup>2</sup>月桂冠・総研、<sup>3</sup>東北大院農・生物産業創成)

【目的】 *A. oryzae* OSI1013 株より見いだされた活性型 DNA トランスポゾン *Crawler* は、転移が認められない通常培養条件下では transposase ORF 内部での splicing や poly(A)付加が起きており、*Crawler* 遺伝子からは複数の mRNA 分子種が生成していることが明らかとなった<sup>1)</sup>。そこで、麴菌における transposon 転移活性に対する制御機構の解明を目的に種々のストレス条件下における転移活性と *Crawler*-mRNA 分子種比率の変化について解析を行った。

【方法と結果】 転移促進を引き起こす Cu や高温ストレス処理後の分生子より total RNA を抽出し、定量 RT-PCR により *Crawler*-mRNA 分子種の組成を測定した。その結果、転移活性が認められる Cu 処理区や高温処理区に分生子では、ストレス強度の上昇に伴い splicing や poly(A)付加による不完全な mRNA 分子種は減少し、インタクトな全長 mRNA の分子種比率が高くなっていることが認められた。また、致命的に近い条件にもかかわらず転移活性化が僅かしか認められない酸、高浸透圧、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、および UV によるストレスではインタクトな全長 mRNA の分子種比率の増加は認められなかった。さらに、OSI1013 株と同じく活性型 *Crawler* を多コピーで有する RIB128 株および AOK139 株においても Cu および高温ストレス条件下では同様の現象が認められ、ストレス処理による mRNA 分子種の変動が *Crawler* の転移促進につながるものと推定された。

1) 小笠原・他，農化大会要旨，p190(2007)

### Effects of stress conditions on transposability and proportional changes in mRNA of DNA transposon *Crawler* in *Aspergillus oryzae*.

Hironobu Ogasawara<sup>1</sup>, Hiroshi Obata<sup>2</sup>, Yoji Hata<sup>2</sup>, Saori Takahashi<sup>1</sup>, Katsuya Gomi<sup>3</sup>

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

## P-84

### 麴菌 *Aspergillus oryzae* の転写制御関連遺伝子の破壊と機能解析

戸田智美<sup>1</sup>、砂川美佐緒<sup>1</sup>、大澤靖子<sup>1</sup>、小川真弘<sup>2</sup>、徳岡昌文<sup>2</sup>、高橋 理<sup>2</sup>、小山泰二<sup>2</sup>、町田雅之<sup>1</sup> (<sup>1</sup>産総研,<sup>2</sup>野田産研)

麴菌ゲノムの解読により麴菌の遺伝子レベルでの解析が飛躍的に進む一方、麴菌には機能未知遺伝子が未だ多数存在しており、今後遺伝子の機能や発現制御に関する統括的な知見が益々重要になると予想される。本研究では、遺伝子破壊による遺伝子の機能解析を目的とし、その強力なツールとして形質転換効率を向上させた麴菌 *Ku* 遺伝子破壊株<sup>1)</sup>を宿主とした遺伝子破壊ライブラリーの作製を試みた。

まず、麴菌のゲノム情報をもとに、麴菌が有する約 12,000 の全遺伝子から転写制御に関連すると推測される遺伝子を抽出し、100 以上の遺伝子破壊候補を決定した。次に標的遺伝子上流および下流領域を PCR 法により増幅し、マーカー遺伝子である *pyrG* に連結させた遺伝子破壊用 DNA 断片を構築した。この DNA 断片を

相同組み換え頻度を上昇させた麴菌  $\Delta Ku70 \Delta pyrG$  株に導入することにより 95% 以上の高頻度で形質転換体を取得した。得られた形質転換体を PCR あるいは Southern hybridization で確認したところ 75% 以上の確率で目的の遺伝子を破壊していた。現在、取得した破壊株を用いて様々な培養条件下での生育特性を調べるとともに、DNA マイクロアレイ解析により遺伝子発現プロファイルの解析に取り組んでいる。

1) T. Takahashi *et al.* Mol Gen Genomics (2006) 275:460-470

### Gene disruption and functional analysis of transcriptional regulatory factor in *Aspergillus oryzae*

Tomomi Toda<sup>1</sup>, Misao Sunagawa<sup>1</sup>, Yasuko Oosawa<sup>1</sup>, Masahiro Ogawa<sup>2</sup>, Masafumi Tokuoka<sup>2</sup>, Tadashi Takahashi<sup>2</sup>, Yasuji Koyama<sup>2</sup> and Masayuki Machida<sup>1</sup> (<sup>1</sup>AIST, <sup>2</sup>NISR)



## P-85

### 麹菌の低分子金属プロテアーゼ群の解析

山形洋平<sup>1)</sup>, 前田浩<sup>1)</sup>, 阿部敬悦<sup>1)</sup>, 内田隆史<sup>1)</sup>, 竹内道雄<sup>2)</sup>, 楠本憲一<sup>3)</sup>, 小出芳直<sup>4)</sup>, 片瀬徹<sup>1,4)</sup>, 石田博樹<sup>5)</sup> (<sup>1</sup>東北大学・院・応生科, <sup>2</sup>農工大・院・生物工学, <sup>3</sup>食総研, <sup>4</sup>天野エンザイム, <sup>5</sup>月桂冠)

麹菌のゲノム解析の結果、麹菌 *Aspergillus oryzae* ゲノムには、*A. nidulans* や *A. fumigatus* に比べ約 1.4 倍ものタンパク質分解酵素がコードされていることが示された。一般に糸状菌は同種の加水分解酵素を複数持つことがよく知られている。*Aspergillus* 属も同種のタンパク質分解酵素遺伝子を複数有している。しかし、麹菌は同種のタンパク質分解酵素遺伝子中に、他の *Aspergillus* 属と共通の酵素以外にさらにもうひとつ(以上)の酵素を持っていることが示された。これは、外来遺伝子の水平伝達によっていると推定されているが、その詳細は明らかでない。我々は、麹菌がなぜ同種の酵素を複数持つ必要があるのかをタンパク質側から検証しようとしている。麹菌低分子型金属プロテアーゼ群には、3つの酵素が属しているとゲノム解析で報告されている。これら *deuA*、*deuB*、*deuC* のコードする酵素の性質を比較することとした。*deuA*、*deuB* の2つの遺伝子は、イントロン-エキソンの構成等もよく似ており、コードされている酵素も、お互いによく似た酵素化学的な性質を持つが、基質特異性が異なっていた。*deuC* の推定 ORF の構成やそれに由来するアミノ酸配列は、*deuA*、*deuB* とは異なっている。現在、この構成の再検討を行っており、*DeuC* の正しいアミノ酸配列や酵素化学的性質について *DeuA*、*DeuB* との比較検討を行っている。

なお本研究は、生研センター基礎研究推進事業の一環として行われたものである。

#### Studies on low molecular mass metallopeptidases from *Aspergillus oryzae*

Youhei Yamagata, Hiroshi Maeda, Keietsu Abe, Takafumi Uchida, Michio Takeuchi, Ken-Ichi Kusumoto, Yoshinao Koide, Toru Katase, Hiroki Ishida (Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., Dept. Biochem. Biotech. Tokyo Univ. of Agric. Tech., Natl. Food Res. Inst., Amano Enzyme Inc., Research Inst. Gekkeikan Sake Co. Ltd.)

## P-86

### 麹菌機能未知 APase の解析

岡本綾子<sup>1)</sup>, 森田寛人<sup>1)</sup>, 山形洋平<sup>2)</sup>, 楠本憲一<sup>3)</sup>, 小出芳直<sup>4)</sup>, 石田博樹<sup>5)</sup>, 竹内道雄<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>東京農工大学院・応生科, <sup>2</sup>東北大院農・応生科, <sup>3</sup>食総研, <sup>4</sup>天野エンザイム・研究部, <sup>5</sup>月桂冠・総研)

麹菌ゲノム解析の結果、麹菌ゲノムには APase と推定される遺伝子が 11 種類、存在することが分かった。本研究室ではさらにアノテーションの見直しを行った。見直しによって、APase 11 種類中 3 種類で活性中心モチーフ、開始メチオニン、終止コドンが従来のアノテーションとは異なることが推定された。

次にスターチで誘導できる強制発現用プロモーターである AmyA プロモーターの下流に麹菌 APase 遺伝子を組み込み、オーレオバシジンを選択マーカーとした強制発現用ベクターを作製した。作製したベクターを用いて *A. nidulans* の形質転換を行い、*A. nidulans* における APase の強制発現を試みた。

*A. nidulans* を宿主とした形質転換の結果、機能未知である 070319-053 遺伝子の形質転換体を取得した。得られた形質転換体をカゼインプレートに植菌、30℃ 3日間培養した。その結果、野生株に比べて形質転換体では、菌体から分泌されたプロテアーゼがカゼインを分解することによって出現するクリアゾーンの増大が確認された。

この結果、アミノ酸配列を用いた系統樹解析から分泌型 APase と推測された機能未知である 070319-053 遺伝子がカゼイン分解能を持つアスパルティックプロテアーゼをコードしている可能性が示唆された。

なお、本研究は生研センター基礎研究推進事業の一環として行われたものである。

#### Analysis of hypothetical APase genes in *Aspergillus oryzae*

Ayako Okamoto<sup>1)</sup>, Hiroto Morita<sup>1)</sup>, Yohei Yamagata<sup>2)</sup>, Ken-Ichi Kusumoto<sup>3)</sup>, Yoshinao Koide<sup>4)</sup>, Hiroki Ishida<sup>5)</sup>, Michio Takeuchi<sup>1)</sup>

(<sup>1</sup>Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, <sup>2</sup>Univ. of Tohoku, <sup>3</sup>NFRI, <sup>4</sup>Amano Enzyme, <sup>5</sup>Gekkeikan)

## P-87

### 麹菌の新規アミノペプチダーゼ様遺伝子がコードする蛋白質の精製と性質

楠本憲一<sup>1</sup>、松下真由美<sup>1</sup>、古川育代<sup>1</sup>、鈴木 聡<sup>1</sup>、小出芳直<sup>2</sup>、石田博樹<sup>3</sup>、山形洋平<sup>4</sup>、竹内道雄<sup>5</sup>、柏木豊<sup>1</sup> (<sup>1</sup>食総研、<sup>2</sup>天野エンザイム、<sup>3</sup>月桂冠、<sup>4</sup>東北大・院・応生科、<sup>5</sup>東京農工大・院・応生科)

【目的】麹菌を用いた発酵食品に含まれる多種類のペプチドの生成には、麹菌由来ペプチダーゼが深く関与すると考えられる。本研究では、麹菌ゲノム情報 (<http://www.bio.nite.go.jp/dogan/Top>) から、出芽酵母の Aspartyl aminopeptidase と推定アミノ酸配列で 52% の同一性を示す蛋白質をコードする遺伝子 *Aodap1* (AO090005001447) を見出した。そこで本蛋白質を組換え麹菌によって生産し、精製と性質の解明を行った。

【方法及び結果】*Aodap1* の推定コーディング領域約 1.8kb を *Aspergillus oryzae* RIB40 株のゲノム DNA から PCR により取得した。蛋白質の C 端にリンカー-His-tag を付加した合成遺伝子を作製し、これを *AmyB* プロモーターの下流に組み込んだベクターを作製した後、麹菌に導入して高発現株を作出した。高発現株の細胞抽出液から、Ni-IMAC ビーズカラムを用いて Asp-p-nitroanilide (Asp-pNA) 分解活性を指標として蛋白質を精製した。精製蛋白質は、SDS-PAGE で約 54kD の単一なバンドを示し、Asp-pNA 及び Glu-pNA の分解活性を有したが、Gly、Met、Leu、Lys、Arg、Ala、Val、Pro の pNA 誘導体に対しては、分解活性を示さなかった。Angiotensin II を基質とした場合は、N 末端から Asp が除去された Angiotensin III のみが反応生成物として得られた。以上のことから、*Aodap1* は酸性アミノ酸特異的なアミノペプチダーゼをコードすることが明らかになった。本研究は、生研センター基礎研究推進事業の一環として行われたものである。

### Enzymatic characterization of the product of an aminopeptidase-like gene from *Aspergillus oryzae*

Ken-Ichi Kusumoto<sup>1</sup>, Mayumi Matsushita<sup>1</sup>, Ikuyo Furukawa<sup>1</sup>, Satoshi Suzuki<sup>1</sup>, Yoshinao Koide<sup>2</sup>, Hiroki Ishida<sup>3</sup>, Youhei Yamagata<sup>4</sup>, Michio Takeuchi<sup>5</sup>, Yutaka Kashiwagi<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Natl. Food Res. Inst., <sup>2</sup>Amano Enzyme, <sup>3</sup>Gekkeikan, <sup>4</sup>Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., <sup>5</sup>Tokyo Univ. of Agric. Tech.)

## P-88

### 麹菌セリントイプカルボキシペプチダーゼの解析

森田寛人<sup>1</sup>、岡本綾子<sup>1</sup>、山形洋平<sup>2</sup>、楠本憲一<sup>3</sup>、小出芳直<sup>4</sup>、石田博樹<sup>5</sup>、竹内道雄<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京農工大院・応生科、<sup>2</sup>東北大院農・応生科、<sup>3</sup>食総研、<sup>4</sup>天野エンザイム・研究部、<sup>5</sup>月桂冠・総研)

麹菌 *A. oryzae* のゲノム解析が終了した結果、*A. oryzae* のゲノムには 12 種類の CPase と推定される遺伝子が存在した。しかし、本研究室においてアノテーションの見直しを行ったところ、12 種類のうち 4 種類は活性中心、開始コドン、終始コドンが従来のアノテーションとは異なると推定された。これら CPase 遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列をもとに系統樹解析を行ったところ、4 つのグループに分類することができた。

また、これら 12 種類の CPase のうち、5 種類は *A. oryzae* の EST 解析において見い出されていない CPase であった。そこで、*amyA* プロモーター下流にこれらの CPase 遺伝子を組み込んだプラスミドベクターを用いて *A. nidulans* の形質転換を行った。得られた形質転換体を *amyA* プロモーター誘導条件下で培養し、Z-グルタミルチロシンを基質として培養上清の CPase 活性を測定した。その結果、これらの CPase には活性を有しているものが含まれていることが分かった。このことから、これらの EST 解析で見い出されなかった CPase と推定された遺伝子が、*A. oryzae* において活性を有する CPase をコードし、その生産物は何らかの機能を有している可能性が示唆された。

なお、本研究は生研センター基盤研究推進事業の一環として行われたものである。

### Analysis of serine-type carboxypeptidase in *A. oryzae*.

Hiroto Morita<sup>1</sup>, Ayako Okamoto<sup>1</sup>, Yohei Yamagata<sup>2</sup>, Ken-Ichi Kusumoto<sup>3</sup>, Yoshinao Koide<sup>4</sup>, Hiroki Ishida<sup>5</sup>, Michio Takeuchi<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, <sup>2</sup>Univ. of Tohoku, <sup>3</sup>NFRI, <sup>4</sup>Amano Enzyme, <sup>5</sup>Gekkeikan)

## P-89

### シクロピアゾン酸生合成に関わる PKS/NRPS ハイブリッド型酵素の機能解析

勢 康代<sup>1</sup>、北本勝ひこ<sup>2</sup>、海老塚豊<sup>3</sup>、藤井勲<sup>1</sup> (<sup>1</sup>岩手医大・薬、<sup>2</sup>東大院・農生科・応生工、<sup>3</sup>東大院・薬)

【目的】シクロピアゾン酸 (CPA) は、*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属の糸状菌が生産するテトラミン酸化合物の一種である。標識前駆体の投与実験から、酢酸、メバロン酸、トリプトファン由来の構造を併せ持つこと、酵素学的な研究から、oxidocyclase、dimethylallyl-cycloacetoacetyl-L-tryptophan synthase (DCAT-S) が関与することが示されているが、その全容は未だ明らかとなっていない。我々は、*A. flavus* のゲノムデータベースから、oxidocyclase、DCAT-S、PKS/NRPS ハイブリッド型酵素、転写因子をコードすると予想される 18 kb の遺伝子クラスターを見出した。この遺伝子クラスターが CPA 生合成に関わること、また、PKS/NRPS ハイブリッド型酵素遺伝子の機能を確認するため、異種発現による生成物の同定を試みたので報告する。

【方法および結果】これまでに提唱されている生合成経路から、PKS/NRPS ハイブリッド型酵素は、トリプトファンと diketide から CPA の前駆体である cycloacetoacetyl-L-tryptophan を生成すると考えられる。*A. flavus* NRRL 3357 から本酵素遺伝子をクローニングし、その配列を決定したところ、PKS に特徴的な KS、AT、ACP と NRPS に特徴的な Condensation、Adenylation、Thiolation、Reductive domains からなる全長 3906 aa の PKS/NRPS をコードすると予想された。本酵素の機能を確認するため、*A. oryzae* M-2-3 株を宿主とした異種発現系を構築した。マルトース存在下で誘導培養後、生成物の分析を行ったところ、培養液および菌体中に、形質転換体に特異的な化合物の生産が認められた。現在、本化合物の単離・精製、各種スペクトルによる構造決定を行っている。

#### Functional analysis of PKS/NRPS hybrid involved in cyclopiazonic acid biosynthesis

Yasuyo Seshime<sup>1</sup>, Katsuhiko Kitamoto<sup>2</sup>, Yutaka Ebizuka<sup>3</sup>, Isao Fujii<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>School of Pharmacy, Iwate Med. Univ., <sup>2</sup>Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo, <sup>3</sup>Grad. School of Pharm. Sciences, Univ. of Tokyo)

## P-90

### 糸状菌由来メロテルペノイド化合物生合成に関与するポリケタイド合成酵素及びプレニル基転移酵素の機能解析

伊藤崇敬<sup>1</sup>、勢 康代<sup>2</sup>、藤井勲<sup>2</sup>、久城哲夫<sup>1</sup>、海老塚豊<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東大院・薬、<sup>2</sup>岩手医大・薬)

糸状菌 *Aspergillus terreus* の生産する terretonin はポリケタイドと farnesyl 基由来のテルペノイドの構造を併せ持つ特異なハイブリッド型化合物である。類縁の化合物には AchE 阻害活性を有する territrem が含まれ、これらメロテルペノイドの生合成遺伝子の解明は、今後の創薬を目指した物質生産において重要である。そこで、*A. terreus* のゲノム data base 上で、ポリケタイド合成酵素 (PKS) 遺伝子と prenyl transferase (PT) 遺伝子を併せもつ遺伝子クラスターを検索したところ、13 遺伝子からなる約 36 kb のクラスターが見出され、terretonin 生合成遺伝子クラスターと推定した。本クラスター内の PKS 遺伝子の機能を確認するため、糸状菌発現ベクター pTAex3R に *A. terreus* ATCC46038 株由来 PKS 遺伝子全長 (ATEG\_10080) を導入した発現プラスミド pTA-PksTI で *A. oryzae* を形質転換した。誘導培養後、PKS 特異的な生産物が確認され構造解析を行ったところ、terretonin 生合成中間体である 2,4-dihydroxy-3,5,6-trimethylbenzoic acid (DTBA) である事が判明した。続いて、同様に PT 遺伝子全長 (ATEG\_10078) を導入したプラスミド pTA-trtPT で *A. oryzae* を形質転換し、形質転換体を DTBA を含む培地中で誘導培養した。その結果、DTBA に farnesyl 基の付加した化合物の生産が確認され、本クラスターが terretonin 生合成に関わる事が強く示唆された。現在、terretonin 生産株における PKS の破壊体を作製中である。

#### Identification of gene clusters involved in the biosynthesis of meroterpenoids from fungi

Takayuki Itoh<sup>1</sup>, Yasuyo Seshime<sup>2</sup>, Isao Fujii<sup>2</sup>, Tetsuo Kushiro<sup>1</sup>, Yutaka Ebizuka<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>School of Pharmacy, Iwate Medical Univ.)

## P-91

### 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、海老塚 豊 (東大院・薬)、藤井 勲 (岩手医大・薬)

6-メチルサリチル酸合成酵素 (MSAS) は、触媒酵素ドメインとして、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 を持つ、糸状菌の繰返し型タイプ I ポリケタイド合成酵素 (PKS) として最小のタンパク質である。我々は、*Aspergillus terreus* 由来の MSAS である ATX について、繰返し型タイプ I PKS の構造と反応機構の解明を目的に、酵母発現系を用いた検討を行ってきた。これまでに、単独では不活性な末端欠失体や、触媒ドメインの変異体を作製、酵母内で共発現させることで、4 量体で機能する ATX が高次構造をとって活性中心を構成するために必要な領域 (ID) や、5 つ全ての触媒ドメインが他のサブユニット上の同一ドメインにより相補されることを明らかにしてきた。これらの結果から、ATX の高次構造として、2 つのポリペプチド鎖が head-to-head/tail-and-tail で近接し、全体として 4 量体を形成するモデルを新たに提案した。

触媒ドメイン変異体の発現実験において、KR 変異体はトリケタイド中間体の環化体である triacetic acid lactone (TAL) を合成したが、DH-KR 共変異体は TAL を合成しなかったことから、DH は中間体の脱水反応を触媒する以外の機能を持つ可能性が示唆されていた。今回、DH についてより詳細な検討を行うため、DH とその下流に位置する ID を併せ持つ、ATXDH を DH 変異体とともに酵母内で共発現させたところ、ATXDH が活性体として DH 機能を相補できることを見出した。さらに、大腸菌を宿主とした発現系を構築し、*in vitro* アッセイにおいても ATXDH の活性を確認することができた。現在、ATXDH の精製、機能解析とともに、全長 ATX の精製についても併せて検討中である。

#### Expression and functional analysis of iterative type I polyketide synthase

Tomomi Moriguchi<sup>1)</sup>, Yutaka Ebizuka<sup>1)</sup>, Isao Fujii<sup>2)</sup>

(1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo)

(2. School of Pharmacy, Iwate Medical University)

## P-92

### 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<sup>1</sup>, 勢ノ康代<sup>2</sup>, 北本勝ひこ<sup>3</sup>, 藤井勲<sup>2</sup>, 海老塚豊<sup>1</sup>

(東大院・薬<sup>1</sup>, 岩手医大・薬<sup>2</sup>, 東大院・農生科・応生工<sup>3</sup>)

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。

PKS 遺伝子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、生産化合物を分析したところ、芳香族型 *Ao1-1* よりノナケタイド topopyrone D、*Ao1-7* よりヘプタケタイド alternariol、*Ao1-8* よりヘプタケタイド YWA1 の生産を確認し、各 PKS の機能を同定した。現在、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 Moriya<sup>1</sup>, Yasuyo Seshime<sup>2</sup>, Katsuhiko Kitamoto<sup>3</sup>, Isao Fujii<sup>2</sup>, Yutaka Ebizuka<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. School of Pharm. Sciences, Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>School of Pharmacy, Iwate Medical Univ., <sup>3</sup>Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

## P-93

### 麹菌のシクロピアゾン酸生産性に関する研究

徳岡昌文<sup>1</sup>, 高橋理<sup>1</sup>, 勢ヶ康代<sup>2</sup>, 藤井勲<sup>2</sup>, 北本勝ひこ<sup>3</sup>, 小山泰二<sup>1</sup> (<sup>1</sup>野田産研、<sup>2</sup>岩手医大・薬、<sup>3</sup>東大院・農生科)

シクロピアゾン酸(CPA)は *Penicillium cyclopium* で最初に発見されたマイコトキシンであり、LD<sub>50</sub>: 36mg/kg(ラット経口投与)の毒性をもつ。これまでの研究から、*Aspergillus flavus* と *A. oryzae* の一部の株において CPA の生産が報告されており、食品の安全性の観点から、生産性を左右する遺伝的要因を明らかにすることが望まれている。そこで我々は *A. oryzae* の CPA 非生産株(RIB40)と生産株(NISL3010, NBRC4177)との比較を行うことで、その要因を明らかにすることを試みた。

*A. oryzae* のゲノム情報から第3染色体末端の遺伝子が、CPA 生合成遺伝子クラスターを形成していると推定された。しかし、*A. flavus* のゲノム情報と比較すると、PKS と予想されている約 4.2 kb の遺伝子は3'側が欠失して、ORF 内でテロメアが付加していると考えられたことから、この欠失と CPA 生産性との関連に注目して研究を行った。まずサザンブロッティングと PCR による解析を行ったところ、CPA 生産株のテロメア配列は非生産株よりも 20 kb 程度下流に存在し、非生産株で欠失していると考えられた遺伝子は、生産菌では完全な ORF をもつことが分かった。また、推定アミノ酸配列から、この遺伝子が CPA 生合成の初発段階を触媒する酵素をコードしている遺伝子である可能性が示唆された。そこで、CPA 生産株においてこの遺伝子の破壊株を作製したところ、CPA 生産能が失われたことから、この遺伝子は CPA 合成に関与していることが明らかとなった。以上の結果より、*A. oryzae* RIB40 株では CPA 生合成に必須な遺伝子の3'領域の大部分が欠失しているため、CPA 生産能を失っていると結論した。

#### Studies on productivity of cyclopiazonic acid in *Aspergillus oryzae* strains.

Masafumi Tokuoka<sup>1</sup>, Tadashi Takahashi<sup>1</sup>, Yasuyo Seshime<sup>2</sup>, Isao Fujii<sup>2</sup>, Katsuhiko Kitamoto<sup>3</sup>, Yasuji Koyama<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Noda Ins. Sci. Res., <sup>2</sup>School of Pharm., Iwate Med. Univ., <sup>3</sup>Univ. of Tokyo)

## P-94

### タイ王国薬用植物からの生理活性物質生産糸状菌のスクリーニング

木下造<sup>1</sup>, Kanoktip Pansukusan<sup>1</sup>, 木谷茂<sup>1</sup>, 五十嵐康弘<sup>2</sup>, 仁平卓也<sup>1</sup> (<sup>1</sup>阪大・生物工学国際交流セ,  
<sup>2</sup>富山県大・工・生工)

【目的】多剤耐性菌や新たな疾病の出現により、新規生理活性物質の発見が求められている。植物内生菌は宿主である植物の生育や諸性質に影響を及ぼすことから、多様な生理活性物質を生産していると考えられ、生理活性物質資源として有望視されている。本研究ではタイ王国に生育する薬用植物から生理活性物質生産能を有している内生糸状菌の単離を目指した。

【方法および結果】タイ王国マヒドン大学の植物園から30種類の薬用植物の葉を単離し、滅菌処理後、培地成分を含まない寒天プレートに静置し、28℃で二週間培養した。生育が見られた菌糸を PDA プレートに植え次ぎ、86菌株を単離した。得られた菌株を植物病原菌 *Phytophthora sojae* および *Aphanomyces cochlioides* を被験菌として固体培地で共培養を行ったところ、内生菌の内、約4分の1が被験菌に対して抗菌活性を示した。続いて生理活性物質の生産・単離を効率的に行うために、液体静置培養法を検討し、生育速度が速く、生理活性物質の生産性の高い二種類の培地を決定した。決定した培地を用いて28℃で三週間培養した菌体の培養液を *n*-ブタノールで抽出、抽出液を蒸発乾固し、得られたサンプルについて HPLC による解析を行った。その結果、サンプル中には多様な二次代謝物質を含んでいることが明らかとなり、本研究で単離された植物内生糸状菌は新規生理活性物質の有望な生物資源であると考えられた。

#### Screening endophytic fungi producing bioactive compounds from medicinal plants in Thailand

Hiroshi Kinoshita<sup>1</sup>, Kanoktip Pansukusan<sup>1</sup>, Shigeru Kitani<sup>1</sup>, Yasuhiro Igarashi<sup>2</sup>, Takuya Nihira<sup>1</sup> (<sup>1</sup>ICBiotech, Osaka Univ., <sup>2</sup>Fac. Eng., Dept. Biotech., Toyama Pref. Univ.)

## P-95

### 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<sup>1</sup>、藤井 勲<sup>2</sup>、海老塚豊<sup>1</sup> (東大院・薬<sup>1</sup>、岩手医大・薬<sup>2</sup>)

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、これに *alb1*、YWA1 の側鎖切断酵素遺伝子 *ayg1*、1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (T4HN) 還元酵素遺伝子 *arp2* を順次共発現させることにより YWA1 から scytalone までの生合成系を酵母内で再構成することに成功した。また、scytalone 脱水酵素をコードすると予想される *arp1* 遺伝子と *alb1* との共発現により、YWA1 がアンギュラー型に環化し脱水したピロン化合物が生産されることを見出した。*in vitro* での解析により、Arp1p が YWA1 を基質として、この変換反応を触媒することを確認した。現在、酸化酵素遺伝子 *abr1*、*abr2* についても発現プラスミドを構築、酵母に導入して、DHN-メラニン生合成系の再構成と反応解析を進めている。

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

Natsuki Nambu<sup>1</sup>, Isao Fujii<sup>2</sup>, Yutaka Ebizuka<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. School of Pharm. Sciences, The Univ. of Tokyo,<sup>2</sup>School of Pharmacy, Iwate Medical Univ.)

## P-96

### ヘルボール酸生合成に関与する糸状菌由来オキシドスクアレン閉環酵素の機能解析

三ツ口尚志<sup>1</sup>、勢ヶ康代<sup>2</sup>、藤井勲<sup>2</sup>、渋谷雅明<sup>1</sup>、久城哲夫<sup>1</sup>、海老塚豊<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東大院・薬、<sup>2</sup>岩手医大・薬)

糸状菌 *Aspergillus fumigatus* が産生する抗生物質ヘルボール酸は、その構造からオキシドスクアレンがオキシドスクアレン閉環酵素 (OSC) により protosta-17(20)Z,24-dien-3b-ol に閉環した後、酸化やアセチル化等を経て生合成されると考えられる。我々はこの新規 OSC の同定を試み、近年公開された *A. fumigatus* のゲノム配列中に既知 OSC の相同性遺伝子の検索を行った。その結果、3 種の該当遺伝子が見出され、そのうちの 1 種 Afu4g14770 は、シトクロム P450 や 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase 遺伝子など、ヘルボール酸の生合成に関わると思われる 8 遺伝子と共に 16.3kb に渡る遺伝子クラスターを形成していた。そこで、本 OSC 遺伝子を *AfuOSC3* と命名し、*A. fumigatus* IFO 8866 株よりクローニング後、酵母発現用ベクター pESC(Ura) に導入した。pESC-*AfuOSC3* でラノステロール合成酵素欠損酵母株 GIL77 を形質転換後、5L の培養液から生成物をヘキササンで抽出し、一部を GC-MS で分析したところ、2 種類の導入遺伝子特異的トリテルペンを検出した。そこで、それらをシリカゲルカラムと硝酸銀 TLC によって分離し、NMR で構造解析を行ったところ、主生成物がヘルボール酸の生合成前駆体である protosta-17(20)Z,24-dien-3b-ol であり、副生成物は二重結合の異性体である (20R)-protosta-13(17),24-dien-3b-ol であることが判明した。AfuOSC3 がヘルボール酸の生合成前駆体を生成したことから、本遺伝子クラスターがヘルボール酸生合成に関与することが強く示唆され、現在、P450 を含めたクラスター内の遺伝子の機能解析を順次進めている。

### Identification of fungal OSC responsible for biosynthesis of helvolic acid

Hisashi Mitsuguchi<sup>1</sup>, Yasuyo Seshime<sup>2</sup>, Isao Fujii<sup>2</sup>, Masaaki Shibuya<sup>1</sup>, Tetsuo Kushiro<sup>1</sup>, Yutaka Ebizuka<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. School of Pharm. Sci., Univ. of Tokyo,<sup>2</sup>School of Pharm., Iwate Med. Univ.)

## P-97

### 麴菌 *LaeA* は、コウジ酸生産に影響を及ぼす

織田 健、佐野元昭、小林亜紀子、\*久田博元、\*石田博樹、\*秦洋二、大箸信一  
(金沢工大・ゲノム研、\*月桂冠・総研)

糸状菌は、多種多様な2次代謝物を生産し、有用な薬剤生産供与体として利用されている。近年、*Aspergillus nidulans* において2次代謝制御遺伝子 *laeA* が見出され、糸状菌の2次代謝制御が明らかにされつつある。*laeA* は、種によって2次代謝生産に及ぼす影響が異なることが報告されている<sup>1)</sup>。そこで、麴菌 *A. oryzae* の *laeA* の2次代謝生産への影響を考察するため、麴菌 *laeA* をクローニングし、その破壊株を取得して解析を行った。*A. nidulans* の *laeA* を元に麴菌ゲノム database にて BLAST 検索を行い、麴菌 *laeA* を見出した。5'-RACE を行い、開始コドンを推定し ORF を決定したところ、アミノ酸配列の相同性は *A. nidulans* や *A. fumigatus* とそれぞれ 76、77%であった。遺伝子破壊株の取得を簡便にするために相同組換え効率を向上させた  $\Delta ligD\Delta pyrG$  株を宿主に用いて *pyrG* を選択マーカーとして推定 S-adenosylmethionine 結合領域を欠失させる形で *laeA* 破壊株を作製した。破壊株は、他の種と同様に色素の低減などの表現型を示した。一方で分生子形成は *A. nidulans* とは異なり、減少した。また、麴菌における代表的な2次代謝産物であるコウジ酸についてコウジ酸生産培地での生産の検討を行ったところ、破壊株では培地中にコウジ酸が検出されなかったことから、*LaeA* は、コウジ酸生産の制御にも寄与することが示唆された。

1) Jin Woo Bok and Nancy P. Keller, *Eucaryotic Cell*, 3, p.527-535(2004)

### *Aspergillus oryzae* *Lae* affects production of kojic acid.

Ken Oda, Motoaki Sano, Akiko Kobayashi, \*Hiromoto Hisada, \*Hiroki Ishida, \*Youji Hata, Shinichi Ohashi(Kanazawa Inst. Tech., \*Res.Inst.Gekkeikan)

## P-98

### *Aspergillus nidulans* の亜硝酸耐性に関わる遺伝子の単離と解析

鳴神寿昭, 行木弥鈴, 榊尾俊介, 星野貴行, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)

亜硝酸は、核酸のアミノ基と反応し変異原性を示すことや、ニトロソ化合物を生成し細胞毒性を示すことが知られている。亜硝酸は *Aspergillus nidulans* に対しても毒性を示すが、その耐性化機構についての報告は少ない。

そこで、本研究では、*A. nidulans* に *A. nidulans* の全 DNA ライブラリーを導入することによって、亜硝酸への耐性化に関わる遺伝子の単離を試みた。その結果、*A. nidulans* の亜硝酸耐性を増強する遺伝子 *AN0121* が単離された。本遺伝子の推定アミノ酸配列は、原核生物から高等真核生物に至る広範囲の生物のポルホピリノーゲンデアミナーゼ(PBG-D)のそれと高い相同性を示した。本遺伝子を2コピー持つ株(PD1株)を作製し、高濃度の亜硝酸に曝露した際の細胞抽出液のPBG-D活性を測定したところ、野生株のそれと比較して約2倍高かった。また、本株は、高濃度の亜硝酸を含む培地でも生育が可能であり、野生型株で見られる亜硝酸による菌糸の形態異常や分生子の発芽阻害を示さなかった。また、PD1株の細胞抽出液中の亜硝酸還元酵素(Nir)活性も約7倍上昇していた。現在のところ、PBG-DとNirの関係の詳細は不明であるが、PBG-Dはヘム合成経路に含まれる酵素であり、Nirはシロヘムを構造内に有していることから、*AN0121*の発現が上昇することによりPBG-D活性が上昇しシロヘムの生成量が増える可能性が考えられた。また、*A. nidulans* は、高濃度の亜硝酸に曝露されたとき、Nirの働きによって亜硝酸を消費し、亜硝酸に耐性化すると考えられた。

### Isolation and analysis of the gene involved in nitrite tolerance from *Aspergillus nidulans*

Toshiaki Narukami, Misuzu Nameki, Shunsuke Masuo, Takayuki Hoshino, Naoki Takaya  
(Graduate School of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba)

## P-99

### *Fusarium oxysporum* の硫黄還元機構

佐藤育男, 安部剛史, 星野貴行, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

【目的】近年、カビが低酸素条件下において硝酸呼吸やアンモニア発酵といった多様なエネルギー獲得機構を発現することが報告されている。また、我々はカビが  $S^0$  を還元し硫化水素を生成し、嫌氣的に生育することを明らかにしている。今回、この反応機構を解明するために *Fusarium oxysporum* JCM11502 の硫黄還元酵素 (SR) について検討した。

【方法および結果】SR 活性は、 $S^0$  の還元により生成する硫化水素をメチレンブルー法で定量することによって測定した。供試菌株は、エタノールを炭素源、 $S^0$  を電子受容体として用い低酸素条件下で培養した。得られた菌体の無細胞抽出液の可溶性画分から NADH および NADPH 依存の SR 活性が検出された。SR 活性は透析により失活したが、これに各種金属イオン、ビタミン、SH 化合物を添加したところ、還元型または酸化型グルタチオンの添加によって SR 活性が回復した。このグルタチオン依存性 SR を各種クロマトグラフィーにより電気泳動的に単一となるまで精製した。本酵素はサブユニットの分子量 55000 のホモダイマーであった。精製 SR の MALDI TOF/MS および N 末端配列解析の結果、本酵素はグルタチオンレダクターゼ (GR) と同定された。また、精製 SR はグルタチオン依存性の SR 活性および GR 活性を有していた。ゲノム情報が公開されている FGSC4286 株の GR 遺伝子配列をもとにプライマーを作製し、PCR を用いて JCM11502 株の SR(GR)遺伝子をクローニングした。JCM11502 の SR (GR) の推定アミノ酸配列は 506 アミノ酸からなり、FGSC4286 株の GR と 99% の相同性を示した。還元型グルタチオンは非酵素的に  $S^0$  を還元し、硫化水素を生成することから、供試菌株はグルタチオンならびに GR によって  $S^0$  を還元していることが示唆された。

#### Sulfur reduction by *Fusarium oxysporum*

Ikuo Sato, Tsuyoshi Abe, Takayuki Hoshino, Naoki Takaya

(Grad. Sch. of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba)



## 人名索引

### A

- 阿部歩 ..... 40, 59  
阿部敬悦 ..... 42, 44, 56, 60, 82, 83, 89  
安部剛史 ..... 96  
阿部有生 ..... 36  
足立浩美 ..... 71, 72  
赤木靖典 ..... 47  
赤松創 ..... 47  
赤尾健 ..... 58  
紅朋浩 ..... 61  
Taki Koffi Alphonse ..... 66  
天野 良彦 ..... 74  
安藤晃規 ..... 40, 74  
青木考 ..... 41  
荒井基夫 ..... 67, 71, 72  
有江力 ..... 39, 48  
有岡学 ..... 46, 53, 54, 55, 67, 73, 75, 77  
旭井亮一 ..... 44  
浅野行蔵 ..... 59  
芦澤武人 ..... 40

### B

- 馬場悟史 ..... 36  
馬場崎勝彦 ..... 62  
坂東弘樹 ..... 65  
坂野真平 ..... 83

### C

- Xinai CHEN ..... 75  
Yoon-Hee Cheon ..... 86

### E

- 海老塚豊 ..... 91, 92, 94  
Cristopher Salazar ESCAÑO ..... 45, 55

### F

- 藤田健作 ..... 43  
藤井勲 ..... 34, 91, 92, 93, 94  
藤井達也 ..... 43  
藤川貴志 ..... 51  
藤村真 ..... 83, 85  
藤岡智則 ..... 42, 60  
福田明 ..... 64  
福田一治 ..... 58  
福田清春 ..... 63  
福森文康 ..... 83, 85  
福岡真里 ..... 76  
古川育代 ..... 73, 90  
古川健太郎 ..... 42, 60  
古川隆紀 ..... 66

### G

- 五味勝也 ..... 56, 57, 87, 88  
後藤正利 ..... 21, 57

### H

- 芳賀楓 ..... 58  
萩原大祐 ..... 60, 83, 84  
Dong-Min Han ..... 86  
Kap-Hoon Han ..... 86  
原田祐佳 ..... 57  
原山重明 ..... 41  
播本佳明 ..... 47  
長谷川史彦 ..... 56  
長谷川祥子 ..... 87  
長谷山陽平 ..... 65  
秦洋二 ..... 65, 70, 88, 95  
畑本修 ..... 44  
服部貴澄 ..... 52  
林梨咲 ..... 72  
林理恵 ..... 52  
林幸男 ..... 69  
樋口裕次郎 ..... 46, 55  
平田恭子 ..... 53  
久田博元 ..... 65, 95  
本田裕樹 ..... 52  
堀千明 ..... 64  
堀尾哲也 ..... 61  
堀内裕之 ..... 23, 58, 59, 60  
星由紀子 ..... 79  
星野貴行 ..... 95, 96  
細内敦 ..... 41

### I

- 一宮維幸 ..... 59  
五十嵐圭日子 ..... 39, 61, 62, 64  
五十嵐康弘 ..... 93  
飯田祐一郎 ..... 49  
飯島陽子 ..... 41  
池正和 ..... 70  
池田涼子 ..... 72  
今井峻介 ..... 48  
伊奈慎太郎 ..... 87  
石田博樹 ..... 65, 70, 73, 79, 89, 90, 95  
石田卓也 ..... 62  
石黒真希 ..... 61  
石川絵理 ..... 54  
一色邦夫 ..... 41  
伊藤尚志 ..... 43  
伊藤崇敬 ..... 91  
伊藤幸成 ..... 54  
岩崎健太郎 ..... 45, 56  
岩下和裕 ..... 44, 72, 82, 84

### J

- Gregory Jedd ..... 17  
城島透 ..... 38  
Praveen Rao JUVVADI ..... 55

## K

加治木佑紀子	78
加治佐平	39
鎌田堯	25
亀井克彦	75
金田貴詳	68
金丸京子	42, 68, 84
金政真	71
金山典生	48
金子真也	38, 62
柏木豊	73, 74, 76, 90
片瀬徹	79, 89
加藤雅士	42, 66, 68, 84, 86, 87
加藤直樹	43
勝川志穂	38
川端砂矢香	48
川口剛司	67, 71, 72
川本進	75
Nancy Keller	16
菊間隆志	53
Hye-Ryun Kim	86
Jong Hwa Kim	86
金鋒杰	81
金鋒傑	55
木村 真	29
木村信弥	77
木野邦器	52
木下浩	93
桐村光太郎	52
北上巨樹	66
北川治恵	78
北本勝心	45, 46, 53, 54, 55, 56, 67, 73, 75, 77, 79, 85, 91, 92, 93
木谷茂	93
北爪達也	43
鬼頭英樹	51
神太郎	80
小林亜紀子	95
小林遼太	68
小林哲夫	42, 66, 68, 84, 86, 87
児玉基一朗	47
小出芳直	70, 73, 79, 89, 90
小池英明	44, 80, 81, 82
小牧久幸	41
近藤昭彦	65
近藤花菜	78
小竹学	82
小山泰二	93
河野美乃里	44
小山泰二	44, 55, 68, 81, 88
久保康之	49, 50
窪田哲也	68
工藤俊章	51
熊谷明夫	74
國武絵美	72

黒田克利	49
久城哲夫	91, 94
楠本憲一	70, 73, 74, 76, 79, 89, 90

## L

李皓曼	75
-----	----

## M

町田雅之	44, 80, 81, 82, 88
前田浩	56, 89
丸井淳一郎	60, 82
丸山潤一	19, 45, 75, 54, 55, 56, 73, 77, 85
榊尾俊介	43, 95
松林良博	84
松井哲児	42
松本翔	57
松尾一郎	54
松島健一朗	81
松下真由美	73, 76, 90
三上重明	44, 72, 82, 84
三ツ口尚志	94
宮崎安将	38, 62
水野猛	83, 84
水谷治	42, 60
森口智美	92
森川康	66, 67, 68, 70
森田寛人	89, 90
守屋智博	92
本山愛	48
本山高幸	51
村口元	25

## N

中川浩志	78
中原光一	48
中井喬彦	67
中島大輔	41
中島廣光	32
中島琢自	41
中島佑	42
中村雅哉	62
中澤光	68
中沢威人	38
中出啓子	63
行木弥鈴	95
南部夏希	94
鳴神寿昭	95
根本崇	73
仁平卓也	93
西北広信	70
西村麻里江	51
西浦未華	44, 84
野口祐二	68

## O

Berl R. Oakley	61
----------------	----

小畑浩	88
落合奈緒子	51
織田健	82, 95
小田忍	41, 76, 78
小笠原博信	88
小笠原渉	66, 67, 68, 70
緒方綾	49
小川順	40, 74
小川真弘	81, 88
大箸信一	76, 78, 80, 81, 95
大北由佳	44
大町鉄雄	58
大野絢子	77
太田明德	58, 59, 60
太田一良	69
太田康司	70
岡田宏文	66, 67, 68, 70
岡田和士	68
岡本綾子	89, 90
岡崎孝映	41
小野寺朋子	68
大澤貴紀	50
大澤靖子	88
長田裕之	43
尾谷浩	47
尾関健二	76, 78

**P**

Kanoktip Pansukusan	93
---------------------	----

**S**

齋藤勇司	67
坂口 歩	50
坂本和俊	44, 72, 82, 84
坂本裕一	63
櫻谷英治	40, 74
櫻井望	41
鮫島正浩	39, 61, 62, 64
佐野元昭	44, 78, 80, 81, 82, 86, 95
佐々木堯	74
佐藤育男	96
佐藤奈津子	42, 60
佐藤利次	63
関口裕久	67
關波直子	39
勢ノ康代	91, 92, 93, 94
渋谷雅明	94
志田洋介	66
清水公德	75
清水 昌	40, 74
下飯仁	82
篠島里江	78
塩澤あずさ	85
宍戸和夫	38, 62
正路淳也	46, 53, 54, 55

志水元亨	43
曾根輝雄	40, 59
角田洋輔	40
炭谷順一	71, 72
砂川政英	62
砂川美佐緒	44, 88
鈴木麻子	42, 84
柴田大輔	41
鈴木宏和	43
鈴木秀幸	41
鈴木聡	73, 74, 76, 90

**T**

多田功生	74, 76
Naimeh Taheri-Talesh	61
高木海	43
高木義弘	76
高橋明珠	86
高橋正和	83
高橋砂織	88
高橋俊二	43
高橋徹	56
高橋理	44, 55, 81, 88, 93
高見絵里香	84
高谷康平	79
高谷直樹	43, 95, 96
竹下典男	60
竹谷博子	76
竹内道雄	70, 73, 77, 79, 80, 89, 90
滝口鉄也	55
玉野孝一	44, 82
田鍋康子	56
田中瑞己	57
谷修治	71, 72
寺林靖宣	44, 80, 81
寺岡徹	39, 48, 49
戸田智美	44, 88
徳岡昌文	57, 81, 88, 93
富村健太	44
戸谷希一郎	54
辰巳晶紀	53
柘植尚志	47
對崎真楠	60
辻篤史	71
堤浩子	27
坪井基枝	49
柘植尚志	47, 49
辻元人	49, 50

**U**

内田博教	59
内田隆史	89
上原健二	56
海附玄龍	44, 68
牛丸拓磨	49

## W

和田昌久	62
脇山元気	69
渡辺哲	75
渡邊節子	83, 85
渡邊泰祐	54

## Y

矢部希見子	32
山田和成	58
山田修	44, 58, 72, 82, 84
山形洋平	42, 56, 70, 73, 79, 89, 90
山口悠	85
山口正視	75
山本幹博	47
山根倫子	44, 80, 81
山下和宏	83, 85
山下修一	45, 58
山崎丘	38, 62
山崎ゆかり	42
吉田誠	63
吉田孝	58
吉見啓	42, 60, 82
吉原浩司	69
結城健介	79

## 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（2006年度）

### 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・総合研究所（〒612-8385 京都市伏見区下鳥羽小柳町 101）

### 会計担当

有江 力

東京農工大学農学部（〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8）

竹内 道雄

東京農工大学農学部（〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8）

### 編集担当

小林 哲夫

名古屋大学大学院生命農学研究科（〒464-8601 名古屋市千種区不老町）

### 広報担当

川口 剛司

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

### 庶務担当

堀内 裕之

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