

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	13
シンポジウム講演要旨	14
一般講演要旨	25
ポスター発表講演要旨	37
代表発表者索引	87
糸状菌分子生物学研究会会則	90
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿	91

第 8 回糸状菌分子生物学コンファレンスプログラム

日時：2008 年 11 月 17 日(月)-18 日(火)

会場：石川県文教会館

(石川県金沢市尾山町 10-5)

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 17 日 (月)

- 11:30- 受付開始
12:30-12:35 開会の辞
12:35-14:50 口頭発表 (O-1~O-11)
14:55-16:25 ポスター発表 (P-1~P-50)
16:30-17:30 特別講演 Dr. Reinhard Fischer
(University of Karlsruhe)
17:30-17:45 総会
18:00- 懇親会 (金沢ニューグランドホテル)

11 月 18 日 (火)

- 9:20-12:00 シンポジウム (S-1~S-6)
「ポストゲノム解析：ゲノム解析情報を利用した研究開発」
12:00-13:00 昼休み
13:00-14:30 ポスター発表 (P-51~P-99)
14:35-17:05 口頭発表 (O-12~O-23)
17:05-17:40 表彰式、閉会の辞

発表演題および講演時間

特別講演 11月17日(月) 16:30-17:30

On the role of cell end marker proteins and the cytoskeleton in polarized growth of *Aspergillus nidulans*

Dr. Reinhard Fischer
(University of Karlsruhe, Institute for Applied Biosciences, Dept. Applied Microbiology)

シンポジウム 11月18日(火) 9:20-12:00

「ポストゲノム解析：ゲノム解析情報を利用した研究開発」

- 9:20 オーガナイザー挨拶
 大箸信一（金沢工業大学ゲノム生物工学研究所）
- 9:25 S-1 「麹菌の小胞輸送経路の解析からみえてきたもの」
 北本勝ひこ（東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻）
- 9:55 S-2 「イオンビーム照射が麹菌ゲノム構造に与える影響の解析」
 豊島快幸¹、田中寿基¹、渡部 潤¹、茂木喜信¹、山崎達雄¹、岩下和裕²、三上重明²、佐藤勝也³、鳴海一成²³（¹ヤマサ醤油・製造本部、²酒総研、³原子力機構・遺伝子資源）
- 10:20 S-3 「麹菌 2 次代謝生産制御遺伝子 *laeA* の制御下にある遺伝子およびクラスタの検索」
 織田 健、佐野元昭、大箸信一（金沢工業大学 ゲノム生物工学研究所）
- 10:45 S-4 「メタボロミクスを利用した麹菌研究」
 徳岡昌文（財団法人 野田産業科学研究所）
- 11:10 S-5 「*A. oryzae* ゲノム情報から、*A. kawachii* 焼酎用液体麹開発への展開」
 小路博志（アサヒビール株式会社 酒類技術研究所 醸造技術部）
- 11:35 S-6 「清酒の醗酵技術を応用した新事業展開」
 松井圭三（株式会社福光屋 研究開発部）

一般講演（口頭発表）（0-1～0-23）

11月17日（月）

- 12:35-12:47 O-1 極性維持のための微小管プラス端と菌糸先端細胞表層の相互作用の役割
竹下典男, Reinhard Fischer (University of Karlsruhe, Applied Microbiology)
- 12:47-12:59 O-2 *Aspergillus nidulans* キネシンの細胞内局在：MKLP型, Kid型キネシンを中心に
紅 朋浩¹, 堀尾哲也², Berl R. Oakley² (¹名古屋大・院・医・分子標的, ²カンザス大学)
- 12:59-13:11 O-3 光変換型蛍光タンパク質 Dendra2 による麴菌の隔壁孔を介した細胞間連絡の解析
丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- 13:11-13:23 O-4 新規創薬標的遺伝子の機能を麴菌で解析するアッセイ法の開発
安藤朋広¹, 丸井淳一郎^{1,2}, 玉野孝一, ¹石井智子¹, 織田 健³, 佐野元昭³, 小池英明¹, 町田雅之¹, 阿部敬悦² (¹産総研, ²東北大・未来研, ³金沢工大・ゲノム研)
- 13:23-13:35 O-5 麴菌 *A.oryzae* の bZIP 型転写制御因子遺伝子 *atfA*, *atfB* の機能の差について
坂本和俊^{1,2}, 水谷 治¹, 濱田涼子¹, 岩下和裕¹, 山田 修¹, 三上重明¹, 五味勝也² (¹酒総研, ²東北大院農)
- 13:35-13:47 O-6 *Aspergillus nidulans* におけるトランスクリプトーム解析による農薬応答シグナル経路の解明
萩原大祐¹, 浅野祐広², 丸井淳一郎¹, 吉見啓¹, 水野猛², 阿部敬悦¹ (¹東北大・未来研, ²名大院・生命農学)
- 13:47-13:59 O-7 低酸素条件下におけるチアミン生合成の役割
志水元亨, 藤井達也, 榊尾俊介, 高谷直樹(筑波大院・生命環境)
- 13:59-14:11 O-8 麴菌を中心とした真菌類比較ゲノムデータベースの開発
岩下和裕^{1,2}, 坂本和俊¹, 山田 修¹, 三上重明¹, (¹酒総研, ²広島大先端研)
- 14:11-14:23 O-9 黒麴菌 *Aspergillus awamori* NBRC4314 株のドラフトゲノム配列の決定
町田雅之¹, 小池英明¹, 山田修², 細山哲³, 堀川博司³, 加藤裕美子³, 神野浩二³, 服部貴澄⁴, 佐野元昭⁵, 玉野孝一¹, 比嘉賢一⁶, 塚原正俊⁷, 福田和郎⁸, 安原貴臣⁸, 照屋盛実⁶, 大箸信一⁵, 桐村光太郎⁴, 有田正規⁹, 浅井潔⁹, 阿部敬悦¹⁰, 五味勝也¹⁰, 石川雄章¹¹, 三上重明², 仲宗根薫¹², 藤田信之³ (¹産総研, ²酒総研, ³製評機構, ⁴早稲田大, ⁵金沢工大, ⁶沖縄工技セ, ⁷トロピカルテクノセ, ⁸アサヒビール, ⁹東大院, ¹⁰東北大院, ¹¹醸造協会, ¹²近畿大)
- 14:23-14:35 O-10 イネごま葉枯病菌 (*Bipolaris oryzae*) の青色光制御遺伝子破壊株における近紫外線誘導遺伝子の発現解析
木原淳一, 田中のぞみ, 森脇明弘¹, 上野誠, 荒瀬榮 (島根大生資・¹現生物研)
- 14:35-14:47 O-11 植物感染時におけるイネいもち病菌細胞壁成分の局在について
藤川貴史¹, 阿部敬悦², 西村麻里江¹ (¹生物研・²東北大 未来研)

11月18日(火)

- 14:35-14:47 O-12 **ML-236B 生合成遺伝子群の転写活性化因子 MlcR が結合する DNA 配列の同定**
馬場悟史^{1,2}, 木下浩², 仁平卓也², 細渕雅彦¹ (¹第一三共・プロセス技研, ²阪大・
生物工学国際交流セ)
- 14:47-14:59 O-13 **生合成経路改変によるスピロトリプロスタチンBの生産**
加藤直樹, 鈴木宏和, 高木海, 高橋俊二, 長田裕之 (理研・基幹研・抗生物質)
- 14:59-15:11 O-14 **形質転換時の DNA 分子の取り込みに対するポリエチレングリコールの役割**
井川敬介¹, 伊藤靖夫² (¹信大・理, ²信大・全学教育機構)
- 15:11-15:23 O-15 ***Aspergillus aculeatus* における網羅的遺伝子破壊株の作出を目的としたアグロバクテリウム形質転換法の開発**
國武絵美, 谷 修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生命・応生科)
- 15:23-15:35 O-16 **バイオエタノール固体発酵に最適な新規麹菌高発現プロモーターの探索**
坂東弘樹¹, 久田 博元¹, 石田 博樹¹, 秦 洋二¹, 片倉 啓雄², 近藤 昭彦³ (¹月桂冠・総研, ²阪大院・工・生命先端, ³神戸大・工・応化)
- 15:35-15:47 O-17 **麹菌 *A. oryzae* の高頻度相同組換え宿主を用いたプロテアーゼ遺伝子多重破壊株の育種**
尹載宇, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院農生科・応生工)
- 15:47-15:59 O-18 **麹菌 (*Aspergillus oryzae*) プロテアーゼ高生産変異株の解析**
渡部潤^{1,2}, 田中寿基¹, 豊島快幸¹, 茂木喜信¹, 渡邊剛志², 山崎達雄¹ (¹ヤマサ醤油, ²新潟大院・自然研)
- 15:59-16:11 O-19 **麹菌(*A. oryzae*)のセルフクロニングによるプロテアーゼ生産**
石田博樹¹, 秦洋二¹, 楠本憲一², 山形洋平³, 小出芳直⁴, 竹内道雄⁵ (¹月桂冠・総研, ²食総研, ³東北大院農・応生科, ⁴天野エンザイム・研究部, ⁵東京農工大院・応生科)
- 16:11-16:23 O-20 **麹菌 hydrophobin RolA が cutinase CutL1 と相互作用する際の His32 の役割**
上原健二¹, 高橋徹¹, 前田浩², 山形洋平², 長谷川史彦¹, 五味勝也¹, 阿部敬悦¹
(東北大・未来研¹, 東北大・農・応生科²)
- 16:23-16:35 O-21 ***Trichoderma reesei* の固体培養におけるプロテオーム解析**
関口裕久, 齋藤勇司, 佐藤 伸, 岡田宏文, 小笠原 渉, 森川 康 (長岡技科大・生物)
- 16:35-16:47 O-22 **カーボンカタボライト抑制解除環境下における担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* の cel7 遺伝子群の発現挙動に関する定量的解析**
鈴木一史, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)
- 16:47-16:59 O-23 **シイタケ子実体における多糖類分解酵素**
坂本裕一, 中出啓子, 佐藤利次 (岩手生工研)

ポスター発表 P-1 ~P-50: 11月17日(月) 14:55-15:40 (奇数番号)
 15:40-16:25 (偶数番号)
 P-51~P-99: 11月18日(火) 13:00-13:45 (奇数番号)
 13:45-14:30 (偶数番号)

- P-1 *Aspergillus oryzae* RIB40 由来 glutamate decarboxylase の遺伝子工学的的手法による発現
 生田聡, 専弘明, 袴田佳宏, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)
- P-2 アクリルアミドの微生物分解 (1) 麹菌 *A. oryzae* によるアクリルアミド分解
 若泉賢功, 山元宏貴, 藤本直子, 尾関健二 (金沢工大・ゲノム研)
- P-3 アクリルアミドの微生物分解 (2) 麹菌及び糸状菌のアクリルアミド分解能
 藤本直子, 若泉賢功, 山元宏貴, 尾関健二 (金沢工大・ゲノム研)
- P-4 アクリルアミドの微生物分解 (3) 麹菌 *A. oryzae* のアクリルアミド分解に及ぼす炭素源
 枯渇の影響
 山元宏貴, 藤本直子, 若泉賢功, 尾関健二 (金沢工大・ゲノム研)
- P-5 プラスチックに使用される可塑剤の酵素および微生物分解
 浅沼智美, 水野克美, 大澤 敏 (金沢工大・ゲノム研)
- P-6 液-液界面バイオリアクターを用いた beta-caryophyllene の位置選択的エポキシ化反応
 小田 忍, 大箸信一 (金沢工大ゲノム研)
- P-7 液面固定化 (LSI) システムでの *Rhizopus* 属のエタノール生産
 和田真人, 加治木佑紀子, 篠島里江, 中田葵, 橋谷航, 小田忍, 尾関健二, 大箸信一 (金沢工大・
 ゲノム研)
- P-8 麹菌による生分解性プラスチックの分解とそのモノマー成分の資化過程
 森口祥成, 水野克美, 大澤 敏, 大箸信一 (金沢工大院・ゲノム研)
- P-9 麹菌を複合化した有害物質浄化用生分解性高分子材料の開発
 間井幸弘, 成田武文, 大澤敏 (金沢工大・ゲノム研)
- P-10 麹菌高発現ベクター pNEN142 の小型化
 国保友裕, 青砥大輔, 尾関健二, 袴田佳宏, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)
- P-11 麹菌処理したキトサン基板上における皮膚細胞の増殖効果
 高山 登, 成田武文, 大澤 敏 (金沢工大,ゲノム研)
- P-12 バイオマス分解酵素の生産を目指した麹菌プロモーターの改良
 久田博元, 波部悦子, 石田博樹, 秦洋二, 近藤昭彦¹ (月桂冠・総研、¹神戸大工・応化)
- P-13 *Aspergillus aculeatus* ku80 遺伝子破壊株におけるマーカーリサイクリング技術を用いた二重
 栄養要求性株 (*pyrG⁻, argB⁻*) の作製
 辻篤史, 國武絵美, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院生命・応生科)
- P-14 *Aspergillus aculeatus* における網羅的遺伝子破壊株の作出を目的としたアグロバクテリウム
 形質転換法の開発
 國武絵美, 谷 修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生命・応生科)
- P-15 α -アミラーゼ遺伝子発現抑制による麹菌 *A. oryzae* の異種タンパク質高生産宿主の取得
 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-16 ***Rhizopus* 属菌株の分子系統による再分類**
阿部 歩, 浅野行蔵, 曾根輝雄 (北大院農・応用菌学)
- P-17 **adenylyl cyclase 突然変異を抑圧する突然変異体**
清水 聡, 村山肇子 (関東学院大・工学研究科)
- P-18 **アカパンカビ cAMP 信号伝達系に関与する新規遺伝子**
米村晃子, 村山肇子 (関東学院大・工学研究科)
- P-19 **アカパンカビにおける坑カビ物質感受性に関与する遺伝子のクローニング**
川島一剛, 村山肇子 (関東学院大・工学研究科)
- P-20 **アカパンカビにおけるヒゲカビ chitin deacetylase 遺伝子の発現**
長島敏幸, 村山肇子 (関東学院大・工学研究科)
- P-21 **培養環境に応答する麹菌 *A. oryzae* のクロマチンリモデリング関連遺伝子破壊株の解析**
西浦未華^{1,2}, 坂本和俊², 岩下和裕^{1,2}, 山田修², 三上重明² (1 広島大, 2 酒総研)
- P-22 **麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の米麹での低酸素応答に関する研究**
城隆太郎^{1,2}, 濱田涼子², 坂本和俊², 岩下和裕^{1,2}, 山田修², 三上重明² (1 広島大, 2 酒総研)
- P-23 **麹菌 (*Aspergillus oryzae*) におけるアクアポリンの機能解明**
田中大介, 松本直, 岩崎郁子, 北川良親 (秋田県大・生物資源科学部)
- P-24 **ウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*) における胞子欠損性変異検出 STS マーカーの開発**
奥田康仁¹・松本晃幸²・村上重幸³ (1 鳥取大院連農・2 鳥取大学・3 菌蕈研)
- P-25 **麹菌 *A. oryzae* の隔壁における分泌タンパク質と細胞膜トランスポーターの動態解析**
早川雄悟¹、石川絵理¹、正路淳也^{1,2}、有岡学¹、北本勝ひこ¹ (1 東大院・農生化・応生工、2 エジンバラ大・細胞生物学研究所)
- P-26 **麹菌 *A. oryzae* が持つ細胞質型ホスホリパーゼ A₂ の局在および機能の解析**
高谷康平、北本勝ひこ、有岡 学 (東大院・農生科・応生工)
- P-27 **麹菌 *A. oryzae* における Woronin body タンパク質 AoHex1 の選択的エクソンがコードする 50 アミノ酸の機能解析**
岩崎健太郎、丸山潤一、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-28 **麹菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシスおよび先端生長関連因子の解析**
樋口裕次郎、有岡 学、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-29 **麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連遺伝子破壊株の解析**
菊間隆志、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-30 **麹菌 *A. oryzae* におけるペルオキシソーム移行シグナル受容体の機能解析**
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-31 **糸状菌 *Aspergillus nidulans* のミオシン様ドメイン (MMD) を持つキチン合成酵素 CsmA、CsmB の存在する膜環境における MMD の役割**
對崎真植、竹下典男、堀内裕之、太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- P-32 ***Aspergillus nidulans* における細胞壁構築経路と MpkB 経路の関係について**
吉見啓¹、藤岡智則^{2,3}、丸井淳一郎^{1,4}、萩原大祐¹、水谷治^{2,5}、古川健太郎^{2,6}、佐野元昭⁷、阿部敬悦^{1,2} (1 東北大・未来研, 2 東北大院農, 3 現・クミアイ化学工業(株), 4 現・産総研, 5 現・酒類研, 6 現・ヨーテボリ大, 7 金沢工大・ゲノム研)

- P-33 麹菌の液体培養における分泌タカアミラーゼの細胞壁吸着因子の探索
佐藤宏樹, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-34 麹菌の **Hydrophobin** 遺伝子 *hypB, C* の発現と局在性解析
石川絢也, 伊藤舞由子, 萩原義久, 波岡梓, 岡田亜希子, 中島春紫 (明治大・農化)
- P-35 麹菌の細胞表面タンパク質 **Hydrophobin (HypA)** の発現解析
加瀬明日香, 遠藤和代, 大野真尚, 松田彩, 中島春紫 (明大農・農化)
- P-36 *Aspergillus oryzae* **RIB40** 由来キシログルカナーゼの精製及び解析
荒田章観, 国定嵩, 袴田佳宏, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)
- P-37 液面固定化 (LSI) システムでの β -グルコシダーゼ高生産麹菌の酵素生産
橋谷航, 近藤花菜, 中田葵, 和田真人, 小田忍, 尾関健二, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)
- P-38 液体培地で高生産する麹菌 **25kDa** タンパク質の解析
高木義弘, 東祐斗, 織田健, 佐野元昭, 尾関健二, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)
- P-39 担子菌ヒトヨタケにおける糖質加水分解酵素ファミリー7 遺伝子の解析
井上絵律子, 坂本香織 (金沢工大・バイオ・化学・応用バイオ)
- P-40 *Aspergillus nidulans* の糖鎖構造の解析と糖転移酵素の探索
大久保有祐¹, 大橋貴生², 竹川薫², 後藤正利² (¹九州大・院・生資環, ²九州大・院・農)
- P-41 *Aspergillus nidulans* の糖転移酵素 **Pmt** の基質タンパクの探索
伊本亮¹, 松本翔¹, 軸屋博之², 藤原絵美³, 大森俊郎³, 竹川薫⁴, 後藤正利⁴
(九大院生資環¹, 九大バイオアーク², 三和酒類フロンティア研³, 九大院農⁴)
- P-42 **LongSAGE** 法による *Phanerochaete chrysosporium* リグニン分解酵素発現に関与する遺伝子の検索
南 正彦, 鈴木一実, 清水顕史, 大山尚毅, 阪本鷹行, 入江俊一 (滋賀県大院・環)
- P-43 糖質加水分解酵素ファミリー **43** に属する新規麹菌キシログルカナーゼ
鈴木聡¹, 福岡真里¹, 大口ひかる¹, 松下真由美¹, 多田功生¹, 佐野元昭², 尾関健二², 永吉恵美³, 瀧井幸男³, 楠本憲一¹, 柏木豊¹ (1 食総研, 2 金沢工大, 3 武庫川女子大)
- P-44 麹菌ロイシンアミノペプチダーゼの糸状菌及び大腸菌を用いた発現解析
楠本憲一¹, 松下 (森田) 真由美¹, 古川育代¹, 小出芳直², 石田博樹³, 山形洋平⁴, 竹内道雄⁵, 鈴木聡¹, 柏木豊¹ (¹食総研, ²天野エンザイム, ³月桂冠, ⁴東北大・院・応生科, ⁵東京農工大・院・応生科)
- P-45 *Rhizopus oryzae* および *Amylomyces rouxii* によって生産されるスクロース加水分解酵素の比較
渡辺剛志, 小田有二 (帯畜大・食品科学)
- P-46 *Trichoderma reesei* におけるエンドグルカナーゼ **I** 遺伝子の誘導機構の解析
志田洋介, 古川隆紀, 小笠原渉, 森川康 (長岡技科大・生物)
- P-47 *Trichoderma reesei* の固体培養におけるプロテオーム解析
関口裕久, 齋藤勇司, 佐藤 伸, 岡田宏文, 小笠原 渉, 森川 康 (長岡技科大・生物)
- P-48 *Trichoderma reesei* 由来エンドグルカナーゼ **EGVIII (Cel5B)** の機能解析
佐藤直美, 志田洋介, 白幡皓, 岡田宏文, 小笠原渉, 森川康 (長岡技科大・生物)

- P-49 **麴菌由来セリン・システインプロテアーゼ群の解析**
 片瀬 徹¹, 星由紀子¹, 結城健介¹, 小出芳直¹, 竹内道雄², 山形洋平³, 楠本憲一⁴, 石田博樹⁵
 (¹天野エンザイム,²東京農工大院・応生科,³東北大学・院・応生科,⁴食総研,⁵月桂冠・総研)
- P-50 **担子菌 *Coniophora puteana* (イドタケ) 由来糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー6および7に属するセルラーゼの分子生物学的解析**
 加治佐 平, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東京大学大学院・農学生命科学研究科)
- P-51 **麴菌セリントイプカルボキシペプチダーゼ群の解析**
 森田寛人¹, 岡本綾子¹, 山形洋平², 楠本憲一³, 小出芳直⁴, 石田博樹⁵, 竹内道雄¹ (¹東京農工大院・応生科,²東北大院農・応生科,³食総研,⁴天野エンザイム・研究部,⁵月桂冠・総研)
- P-52 **麴菌酸性プロテアーゼ群の発現および解析**
 岡本綾子¹, 森田寛人¹, 山形洋平², 楠本憲一³, 小出芳直⁴, 石田博樹⁵, 竹内道雄¹ (¹東京農工大学院・応生科,²東北大院農・応生科,³食総研,⁴天野エンザイム・研究部,⁵月桂冠・総研)
- P-53 **カーボンカタボライト抑制解除環境下における担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* の *cel7* 遺伝子群の発現挙動に関する定量的解析**
 鈴木一史, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)
- P-54 **シロアリ由来エンドグルカナーゼの麴菌 *A. oryzae* を用いた生産とその精製**
 平山佳代子¹, 徳田 岳², 渡辺裕文³, 北本勝ひこ¹, 有岡 学¹ (¹東大院・農生科・応生工,²琉大・分生研,³農業生物資源研)
- P-55 **シロアリ腸内共生原生生物由来キシラナーゼの麴菌 *A. oryzae* を用いた生産及びその解析**
 笹川哲裕¹, 有岡 学¹, 守屋繁春^{2,3}, 工藤俊章⁴, 北本勝ひこ¹ (¹東大院農生科・応生工,²理研・バイオスフェアU,³横浜市大院・環境分子,⁴長崎大・水産)
- P-56 **麴菌 (*Aspergillus oryzae*) 由来ペプチダーゼ群の基質特異性**
 前田 浩¹, 山形洋平¹, 小出芳直², 石田博樹³, 楠本憲一⁴, 竹内道雄⁵
 (¹東北大院・応生科,²天野エンザイム,³月桂冠・総研,⁴食総研,⁵東農工大農・応生科)
- P-57 ***Aspergillus* 属由来酸性アミノ酸特異的アミノペプチダーゼの高発現と利用**
 中村奈巳, 坂本知大, 小寺智博, 若林秀彦, 丹尾式希 (味の素(株)・ライフサイエンス研究所)
- P-58 **N-結合型糖鎖プローブを用いた麴菌グルコシダーゼ II の解析**
 渡邊泰祐¹, 戸谷希一郎^{1,2}, 松尾一郎^{1,3}, 丸山潤一⁴, 北本勝ひこ⁴, 伊藤幸成¹ (理研・基幹研¹, 成蹊大・理工², 群大院・工³, 東大院・農生科・応生工⁴)
- P-59 **麴菌 *palF* の機能解析**
 北川治恵, 佐野元昭, 小林亜紀子, 織田健, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)
- P-60 **麴菌 *palH* 遺伝子の機能解析**
 井上やよい, 堂本光子, 佐野元昭, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)
- P-61 **大豆オカラを分解する麴菌遺伝子群のアレイ解析**
 桐藤万裕, 福井裕太, 鈴木晃, 舟津尚志, 佐野元昭, 尾関健二, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)
- P-62 **鯉を分解する麴菌遺伝子群のアレイ解析**
 尾関健二, 佐野元昭, 横山定治¹, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研, ¹ヤマキ(株))
- P-63 **小麦フスマを分解する麴菌遺伝子群のアレイ解析**
 山岡隼人, 杉浦浩二, 辰口友則, 金森一剛, 佐野元昭, 柏木豊¹, 瀧井幸男², 尾関健二, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研, ¹食品総合研究所, ²武庫川女子大学)

- P-64 **大吟醸米麴のゲノムワイドな解析**
 福原真一郎^{1,2}、大北由佳²、河野美乃里²、西浦未華^{1,2}、富村健太³、山田修²、岩下和裕^{1,2}、三上重明² (1 広島大、2 酒総研、3 農研機構)
- P-65 **麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 のイントロン構造の解析**
 小松智代¹、小池英明¹、小高正人¹、大山彰²、町田雅之¹ (1 産総研、2 インシリコバイオロジー)
- P-66 **培養条件特異的な発現を示す麹菌遺伝子の解析**
 戸田智美¹、寺林靖宣¹、大澤靖子¹、石井智子¹、小池英明¹、小川真弘²、徳岡昌文²、高橋 理²、小山泰二²、町田雅之¹ (1 産総研、2 野田産研)
- P-67 **麹菌(*Aspergillus oryzae*)分生胞子のストレス処理による mRNA スプライシング阻害と DNA トランスポゾン *Crawler* の転移活性化**
 小笠原博信¹、秦 洋二²、高橋砂織¹、五味勝也³ (1 秋田県農技セ・総食研、2 月桂冠・総研、3 東北大院農・生物産業創成)
- P-68 ***Aspergillus nidulans* の硝酸還元酵素遺伝子(*niaD*)の低酸素条件下での転写制御**
 榎尾俊介、藤井達也、高谷直樹 (筑波大院・生命環境)
- P-69 ***Trichoderma reesei* のセルラーゼ遺伝子誘導発現における転写調節因子群の役割**
 北上巨樹、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-70 ***Trichoderma reesei* 由来 Xyr1 の結合配列認識**
 古川隆紀、志田洋介、岡田宏文、小笠原 渉、森川 康 (長岡技科大・生物)
- P-71 **麹菌の ABC トランスポーター遺伝子 *atrA* のプロモーター解析**
 大場歩、三浦大介、新谷尚弘、五味勝也 (東北大院・生物産業創成)
- P-72 **麹菌のマルトース資化における *MAL cluster* と *MAL homolog cluster* の関与**
 長谷川祥子、五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-73 **EST 配列データを利用した麹菌における poly(A) 付加シグナルの解析**
 田中瑞己¹、酒井義文¹、山田修²、新谷尚弘¹、五味勝也¹ (1 東北大院農・生物産業創成、2 酒総研)
- P-74 **紫外線による *Neurospora crassa* DNA 修復遺伝子の発現誘導の解析**
 高橋 司、中居哲史、藤村 真、一石昭彦 (東洋大・生命科)
- P-75 **ファージディスプレイ法を用いた *neoechinulin A* 結合性ペプチド配列の探索**
 八木毅郎、堀内桃子、鎌倉高志 (東理大院・応生科)
- P-76 ***Aspergillus nidulans* におけるチトクロム *c* 遺伝子の転写制御機構**
 安藤栄里子、杉山純也、小林哲夫、加藤雅士 (名大院生命農・生物機構)
- P-77 **DNA マイクロアレイによる *AoXlnR2* 制御下遺伝子群の網羅的同定**
 金田貴詳、小川真弘¹、野口祐司、金丸京子、加藤雅士、小山泰二¹、小林哲夫 (名大院生命農・生物機構、¹野田産研)
- P-78 **麹菌 2 次代謝物生産制御遺伝子 *laeA* 制御下の 2 次代謝クラスターの探索**
¹織田健、¹佐野元昭、¹小林亜紀子、²濱田涼子、²岩下和裕、¹大箸信一 (1 金沢工大・ゲノム研、2 酒総研)
- P-79 ***Phanerochaete chrysosporium* のメタボロミクスデータからの知識発見**
 梅井聡子 (九大院生資環)、三浦大典 (九大先端融合研究拠点)、一瀬博文 (九大院農)、割石博之 (九大院農・九大先端融合研究拠点・九大バイオアーク)

- P-80 **Geranylgeranyl diphosphate synthase gene essential for helvolic acid biosynthesis in *Metarhizium anisopliae***
Suthitar Singkaravanit, Hiroshi Kinoshita, Takuya Nihira (ICBiotech, Osaka Uni.)
- P-81 **Monacolin K 合成遺伝子 *mokB* の機能解析**
 酒井香奈江, 木下浩, 仁平卓也 (阪大・生物学国際交流センター)
- P-82 **麴菌における *Monascus pilosus* 由来 monacolin K 合成遺伝子クラスターの発現**
 酒井香奈江, 木下浩, 仁平卓也 (阪大・生物学国際交流センター)
- P-83 **高効率遺伝子発現系を用いた麴菌による有用物質の生産**
¹丸井淳一郎, ¹大橋澄子, ¹安藤朋広, ¹町田雅之, ²西村麻里江, ¹小池英明 (¹産総研, ²生物研)
- P-84 **麴菌における GABA 合成酵素遺伝子の解析と他生物との相同性比較**
 寺畑吏得子¹, 永廣美代子¹, 尾関清子², 尾関健二³, 新田陽子¹, 植野洋志¹
 (¹奈良女大・生環・食物, ²奈良女大・院・基盤生活科学, ³金沢工大・ゲノム生物学研)
- P-85 ***Penicillium purpurogenum* IAM15392株におけるモナスカス色素合成遺伝子の同定、及び機能解析**
 川島淳土, 新居鉄平, 小山善幸, 加藤順, 春見隆文, 萩原淳 (日大・生物資源)
- P-86 **トウモロコシごま葉枯病菌における 3 種の MAPK 遺伝子の網羅的機能解析**
 泉津弘佐, 吉見啓, 久保大輔, 田中千尋 (京大・院・農)
- P-87 **灰色かび病菌における Hog1-MAPK シグナル伝達経路の機能解析**
 小林甫, 泉津弘祐, 田中千尋 (京大・院・農)
- P-88 **SST-REX (signal sequence trap by retrovirus-mediated expression screening) 法を用いた *Aspergillus fumigatus* の細胞表面および分泌蛋白質の網羅的同定**
 山越 智, 橋本ゆき, 大川原明子, 田辺公一, 新見昌一, 大野秀明, 宮崎義継
 (国立感染研 生物活性物質部)
- P-89 **病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* の二成分シグナル伝達系に関する分子遺伝学的解析**
 清水公徳¹, 李皓曼¹, 吉見哲^{2,3}, 田中千尋³, 阿部敬悦², 渡辺哲¹, 亀井克彦¹, 山口正視¹, 川本進¹
 (1 千葉大・真菌センター, 2 東北大・未来研, 3 京大院農・地域環境)
- P-90 **いもち病菌におけるヒドロフォビン(Mpg1)の接着能力への影響**
 井上加奈子, 池田健一, 中屋敷均, 朴杓允 (神戸大学・農学研究科)
- P-91 **いもち病菌(*Magnaporthe grisea*)に新規作用を示す化合物の解析**
 森脇明弘¹, 吉村 巧^{2,3}, 阿部敬悦⁴, 西村麻里江¹ (¹生物研, ²クミアイ化学工業(株), ³(株)ケイ・アイ研究所, ⁴東北大学 未来研)
- P-92 **カラシナの新規ディフェンシン遺伝子のイネいもち病菌 *Magnaporthe grisea* に対する抗菌活性**
 提箸祥幸, 高久洋暁¹, 田中宥司, 矢頭治 (農研機構・中央農研, ¹新潟薬科大学)
- P-93 **イネいもち病菌胞子発芽液中に分泌される Concanavalin A 結合型糖タンパク質の Suppressor 様活性**
 岡本泰樹, 新城 亮, 有江 力, 寺岡 徹 (農工大院農)

- P-94 ベトナムのばか苗病罹病イネから分離された *Fusarium* 属菌の分子系統解析
加藤亮宏, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大院農)
- P-95 市販トマトに付随する糸状菌の検出および分離された *Penicillium* spp. のパツリン産生能の調査
日野愛子, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大院農)
- P-96 ソラマメ火ぶくれ病菌 *Olpidium viciae* の 18S rDNA 部分塩基配列の変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法を用いた解析
稲見圭悟¹, 山下修一², 寺岡 徹¹, 有江 力¹ (1 農工大院農, 2 東大院農)
- P-97 トマト萎凋病菌レースの土壌中からの特異的検出の試み
吉岡千津¹, 對馬誠也², 寺岡 徹¹, 有江 力¹ (1 農工大院農・2 農環研)
- P-98 イネいもち病菌の *AVR-Pia* 遺伝子とその周辺領域の解析
三木慎介, 大塚圭輔, 安田伸子*, 曾根輝雄 (北大院農・応用菌学, *中央農研)
- P-99 イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* の二成分情報伝達系は二次代謝を制御する
本山高幸¹, 林敏明¹, 工藤俊章², 長田裕之¹ (1 理研・基幹研, 2 長崎大・水産)

Special Lecture

On the role of cell end marker proteins and the cytoskeleton in polarized growth of *Aspergillus nidulans*

N. Takeshita, N. Zekert, S. Herrero de Vega and R. Fischer

University of Karlsruhe, Institute for Applied Biosciences, Dept. Applied Microbiology, Hertzstr. 16, D. 76187 Karlsruhe, Germany. Reinhard.Fischer@KIT.edu

The interplay of the actin and the microtubule (MT) cytoskeleton in polarized growth of fungi has recently been revealed. In *Schizosaccharomyces pombe*, Tea1 is a key protein – a so-called cell end marker protein - in this process. Tea1 is transported to the plus ends of MTs by the kinesin Tea2, and is delivered to cell ends by hitchhiking with the growing MTs. Mod5, which is posttranslationally modified by prenylation, anchors Tea1 at the cell ends, where Tea1 recruits formin (Snaith & Sawin, 2003). Formin initiates actin assembly and the establishment of cell polarity. We characterized recently homologues of several cell end marker proteins in *Aspergillus nidulans* and showed the functions are essentially conserved (Higashitsuji, et al., 2008; Konzack, et al., 2005; Takeshita et al., 2008). This was surprising because sequence homology between the *S. pombe* and the *A. nidulans* proteins is sometimes very low and it was speculated that the proteins do not exist in filamentous fungi. In contrast to *S. pombe* transportation of TeaA was independent of the motor KipA (Tea2). However, growth directionality and correct localization of the cell end marker proteins depends on KipA, suggesting further proteins transported by KipA. In order to identify such proteins, we performed a yeast-two-hybrid analysis using the tail of the motor as bait. Several proteins were identified. The interactions were proven by bimolecular fluorescence microscopy. Down regulation of some of them caused meandering hyphal growth, indicating indeed a role in the regulation of polarized growth.

During the characterization of the cell end marker proteins, we discovered a novel role for TeaA in the control of MT polymerization. We showed that TeaA interacts with the MT plus-end localized MT polymerase AlpA (XMAP215) and triggers the enzymatic activity (Takeshita et al., unpublished).

Recently, there is increasing evidence that endocytosis plays an important role for polarized growth. We characterized two Unc-104 related motor proteins and discovered that one of them, which is involved in endocytic vesicle transportation, preferentially moves along a dephosphorylated MT. This is the first evidence for different MT populations in filamentous fungi (Zekert and Fischer, 2008).

Higashitsuji, Y., Herrero, S., Takeshita, N. & Fischer, R. (2008) The cell end marker protein TeaC determines growth directionality and controls formin activity in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell, in revision*.

Konzack, S., Rischitor, P., Enke, C. & Fischer, R. (2005). The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **16**, 497-506.

Snaith, H. A. & Sawin, K. E. (2003). Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1p at cell tips. *Nature* **423**, 647-651.

Takeshita, N., Higashitsuji, Y., Konzack, S. & Fischer, R. (2008). Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **19**, 339-351.

Zekert, N. & Fischer, R. (2008) The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 UncA motor moves vesicles along a subpopulation of microtubules. *Mol. Biol. Cell, in revision*.

シンポジウム

S-1

麹菌の小胞輸送経路の解析から見えてきたもの

北本勝ひこ（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

ゲノム情報と細胞生物学的なツールの発達から、これまで、ほとんど手のつけられてこなかった麹菌 (*A. oryzae*) の細胞内の構造が明らかになりつつある。演者らは麹菌をセルファクトリーとして利用することを目的として、小胞輸送経路を解析しているが、その解析からみえてきたことを紹介したい。

1. 麹菌細胞の構造

麹菌は、球状の分生子から菌糸を発芽することで極性生長を開始する。菌糸先端は、生長が起こる唯一の場所である。加えて菌糸先端は加水分解酵素などのタンパク質分泌のおこる場所であり、生命活動が最も活発であると考えられている。麹菌は、先端生長に伴って隔壁と呼ばれる細胞間の仕切りを形成することで菌糸を多細胞化させる。こうしてできた麹菌の先端細胞では幅 4 μm 程度に対し長さは 100 μm 以上に及ぶ。隔壁には隔壁孔と呼ばれる連絡口が開いており、これにより隣接する細胞は細胞質成分やオルガネラの交換が可能である。

2. 小胞輸送経路におけるオルガネラの空間的配置

細胞内の各オルガネラがそれぞれに固有の機能を発揮するには、必要なタンパク質が正しく輸送される必要がある。多くのオルガネラへのタンパク質輸送は、小胞輸送により行われる。分泌タンパク質や液胞の加水分解酵素は、小胞体において適切なフォールディングや糖鎖修飾を受けた後、輸送小胞中に集められゴルジ体へと移行される。ゴルジ体において更なる糖鎖修飾を受けた後、分泌タンパク質は細胞膜へと、液胞タンパク質はエンドソームを経由して液胞へと輸送される。また、エンドサイトーシスにより細胞外/細胞膜から取り込まれた物質はエンドソームにおいて選別され、細胞膜へリサイクルされるか、液胞へ運ばれて分解される。

輸送小胞が正しい標的オルガネラと融合するための特異性は、SNARE と呼ばれる一群の膜タンパク質により担われている。SNARE はオルガネラ特異的に局在することから、しばしばオルガネラのマーカータンパク質として、またオルガネラの可視化のために用いられている。演者らは、糸状菌における小胞輸送の全体像をつかむことを目的とし、*A. oryzae* の全 21 個の SNARE タンパク質と EGFP (enhanced green fluorescent protein) との融合タンパク質を用いることで小胞輸送経路のオルガネラを可視化した。これにより、これまで局在が明らかではなかったゴルジ体や後期エンドソームなどの構造を同定することができた。また、酵母では出芽部位の細胞膜に存在する AoSnc1 や AoSso1 が麹菌では菌糸先端のみならず、隔壁にも局在することを明らかにした。

3. 麹菌における小胞体の極性依存的な局在

演者らは、顕著な極性を有する糸状菌細胞での小胞体の分布に興味を持ち、小胞体シャペロンである BipA と EGFP との融合タンパク質を用いて小胞体の局在を観察した。可視化された小胞体は、他の生物と同様の網目状の構造として観察されたが、菌糸先端細胞では小胞体が先端部で特に発達し、基部に向かうにつれてその局在が少なくなる傾向があった。このような極性的な配置は、菌糸の先端生長に重要な役割を果たしていると考えられる。より基部の細胞においても、同様に先端方向へ向かう極性を持って分布していた。このようにして可視化した麹菌を低浸透圧ショックにより先端細胞をバーストさせると、数時間のうちに、生き残った 2 番目の細胞が隔壁孔のすぐ脇から先端生長を始めるのが観察された。このことは、隔壁は先端細胞の機能をあわせもつことを示唆している。

4. 隔壁は菌糸先端の機能をもつ？

上記のように、これまで単に細胞間の仕切りとして捉えられてきた隔壁は、先端から 2 番目以降

の細胞にとって菌糸先端と等価な存在とみることが可能と考えている。糸状菌においてはこれまで、分泌は菌糸先端で起こるとされてきたが、細胞膜 SNARE の隔壁への局在も考慮すると、隔壁に向かう分泌の存在が浮かび上がる。隔壁への分泌酵素の動態についても簡単に紹介したい。

おわりに

麹菌のもつ蛋白質高分泌能に関して、ゲノム解析終了後、分子レベルでの解析が急速に進んでいる。しかし、まだ、どうして麹菌がすぐれているかという決定的な答えは得られていない。モデル生物である酵母での詳細な知見をもとにした解析は効率的な研究方法ではあるが、そこには限界がある。やはり、「麹菌のことは麹菌に聞かなくてはならない」というのが実感であり、今後、困難を乗り越えて、この道を進むべきと考えている。

なお、詳細については、下記の総説を参照されたい。

(関連総説)

Differential distribution of the endoplasmic reticulum network in filamentous fungi

J. Maruyama, K. Kitamoto, FEMS Microbiology Letters, 272, 1-7 (2007)

Dissecting cellular components of the secretory pathway in filamentous fungi: insights into their application for protein production.,J. Shoji, M. Arioka, K. Kitamoto

Biotechnol Lett.30,7-14 (2008)

糸状菌オルガネラの形態とその極性依存的な配置 - 麹菌の小胞輸送経路の解析からみえてきたもの、正路淳也、樋口裕次郎、丸山潤一、北本勝ひこ、蛋白質核酸酵素、53、753-759 (2008)

What came into view from analysis of vesicular trafficking pathway in *A. oryzae*

Katsuhiko Kitamoto, Department of Biotechnology, University of Tokyo

イオンビーム照射が麹菌(*Aspergillus oryzae*)ゲノム構造に与える影響の解析

豊島快幸¹、田中寿基¹、渡部 潤¹、茂木喜信¹、山崎達雄¹、岩下和裕²、三上重明²、佐藤勝也³、
鳴海一成²³ (¹ヤマサ醤油・製造本部、²酒総研、³原子力機構・遺伝子資源)

1. 背景および目的

麹菌は日本の産業にとって非常に重要な微生物である。その用途は幅広く、古くから醤油、味噌、清酒などの様々な食品への利用の他、化成品・医療向けの酵素および代謝産物などにも利用されている。このように、様々な産業応用の事例がある一方で、麹菌は有性生活環を持たないことや、多核であることなどから、古典的遺伝解析が適用できず、遺伝的育種改良が遅れていた。しかし、近年、麹菌のゲノム情報が公開、整備されたことにより逆遺伝学的な麹菌の解析が可能となった。醤油醸造においても、より醸造に特化した麹菌株の育成を行うために、ゲノム情報を有効活用した新しい麹菌育種方法が求められている。そこで、我々は植物の育種などで目覚ましい成果をあげているイオンビームに着目した。イオンビームは多くの DNA 2 本鎖切断を生じ、遺伝子の大規模な欠損を誘発することが知られており、突然変異誘発方法として有用な技術である。ガンマ線に比べ、遺伝子への変異誘発効果が高く、変異スペクトルも様々であり、今まで得られなかった変異株の取得が可能であるという報告がなされている。そのため、まず、麹菌へのイオンビーム照射の影響や遺伝子の変異スペクトルの解析を行い、イオンビーム照射が麹菌ゲノム構造に与える影響を解析した。

2. 方法および結果

2-1. 麹菌へのイオンビーム照射

麹菌へのイオンビーム照射には、麹菌 (niaD300 株) の分生子 10^7 個程度を $0.2 \mu\text{m}$ のメンブレインフィルターに吸着させ、凍結乾燥を行ったものを用いた。イオンビーム照射は独立行政法人日本原子力研究開発機構・高崎量子応用研究所のイオン照射施設 (TIARA) において行った。照射は AVF サイクロトロンを用いて $^{12}\text{C}^{5+}$ を加速し、220 MeV のエネルギーで 300~700 Gy 照射した。イオンビーム照射したサンプルを麹エキス培地に播種し、生菌数を測定、未照射区の生菌数から生存率を算出した結果、生存率が照射線量の増加に伴い再現性よく低下した。次に、セレン酸 (SeO_4^{4-}) 耐性を指標に変異率を求めた。Se は S のアナログであり、麹菌体内に取り込まれるとイオウ代謝経路を経て異常アミノ酸を形成し致死となるため、セレン酸を含む培地では生育できない。しかし、イオウ代謝経路内の遺伝子 (sulfate permease をコードする *sB*、および ATP sulfurylase をコードする *sC*) などが変異することで、セレン酸耐性株がポジティブスクリーニングされる。そこで、得られたセレン酸耐性株の出現数から変異率を算出した。その結果、変異効果の高い照射条件は 400 Gy であることが分かった。

2-2 イオンビーム照射による麹菌遺伝子への影響

得られた変異株において、セレン酸耐性の原因遺伝子である *sB* および *sC* 遺伝子の解析を行った。ゲノム情報をもとに *sB* および *sC* の遺伝子領域から上流と下流それぞれ約 1 k bp 離れた部位にプライマーを設計し、PCR 解析を行うことで麹菌遺伝子へのイオンビーム照射の影響を検討した。その結果、得られた全 51 株のセレン酸耐性株のうち、11 株の *sB* 遺伝子領域、3 株の *sC* 遺伝子領域について、DNA の増幅が認められなかった。これらの株について、各遺伝子領域にプローブを作成し、ゲノミックサザン解析を行った結果、親株と比べてバンドパターンが大きく異なっており、遺伝子に大規模な変異が生じていると考えられた。また、バンドが確認されない株もあり、この株については遺伝子コード領域の染色体 DNA に大きな欠損が生じていることが認められた。これらのセレン酸耐性株については現在、DNA シークエンス解析を進めており、イオンビーム照射により生じた麹菌遺伝子のブレイクポイントや、ゲノム構造の変化について解析を進めている。

このように、麹菌への最適なイオンビーム照射条件が見出され、麹菌においても植物で報告されているような大規模な遺伝子の欠損や構造変化の誘発が可能であることが明らかとなった。実際に一部の株において、麹菌全遺伝子を搭載した麹菌フルゲノムアレイを用いて各遺伝子の CGH

(Comparative Genomic Hybridization) 解析を行なったところ、染色体の一部に大規模な領域欠損が起きていることが確認された。このような性質を利用して、従来からの酵素活性の改良や表現型の改良などの育種に加えて、ゲノム構造の大きく変化した株や不要な遺伝子を欠失させた株など、大規模な変異を指標にスクリーニングを行う、新しい麹菌育種法が確立できた。

今後は、さらに効果的な育種法を開発するために、イオン種を変えることなどにより、変異スペクトルがどのように変化するのか検討することを予定している。このように、麹菌育種においてより最適なイオンビーム照射条件を検討していくことにより、ゲノム情報をもとに効率よく変異処理及びスクリーニングを行う、次世代型の麹菌育種方法の最適化と効果的な利用法の確立を目指していきたいと考えている。

Analysis of the mutagenic effect of ion beams on *Aspergillus oryzae* genome

Yoshiyuki Toyoshima¹, Hisaki Tanaka¹, Jun Watanabe¹, Yoshinobu Mogi¹, Tatsuo Yamazaki¹, Kazuhiro Iwashita², Shigeaki Mikami², Katsuya Satoh³, Issay Narumi³

(¹Yamasa corporation, ²NRIB, ³Quantum Beam Science Directorate, JAEA)

ド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ、エノラーゼなど解糖系遺伝子にも影響を及ぼしており、2次代謝のみならず解糖系などにも影響を及ぼしていることが示唆された。

麹菌 2次代謝遺伝子クラスターのマッピング

麹菌は、他の種と比較してゲノムサイズも大きく 2次代謝関連遺伝子の数が多いことが報告され、多種多様な 2次代謝産物を生産できる能力を有している可能性が示唆されている²⁾。現在までにゲノムシーケンスが終了している糸状菌に対して 2次代謝クラスターを SMURF (Secondary Metabolite Unique Region Finder, <http://www.jcvi.org/smurf/index.php>) プログラムにて予測したところ、

Summary of secondary metabolite genes in *Aspergilli* ²⁾.

Gene	<i>A. oryzae</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. nidulans</i>
PKS	30	14	27
NRPS	18	14	14
FAS	5	1	6
Sesquiterpen cyclase	1	not detected	1
DMATS	2	7	2

ろ、*Aspergillus* 属で非常に多く存在することが明らかとなった。麹菌では 57 個のクラスターが見出され、他種のクラスターを参考にアノテーションを付加し、麹菌 2次代謝クラスターマップを作製した。次に、*laeA* 破壊株と高発現株の遺伝子発現の比較をマイクロアレイ解析により行い、上記マップに当てはめたところ、シクロピアゾン酸クラスターが *laeA* の制御を受けて

いることが明らかとなった。現在、さらに培養条件を検討し、新たな *laeA* 制御下のクラスターの探索を行っている。

おわりに

今後、麹菌の眠れるクラスターが解明され有用な代謝物が得られること、また、麹菌の安全な特性を生かして異種の 2次代謝クラスターを導入することで新規な 2次代謝物生産工場としての利用が発展することを期待したい。

1) Jim Woo Bok and N.P. Keller, *Eukaryotic Cell*, 3, 527-535 (2004)

2) N. P. Keller, G. Turner, and J.W. Bennet, *Nature reviews microbiology*, 3, 937-944 (2005)

Searching secondary metabolite genes and clusters regulated by *laeA* in *Aspergillus oryzae*.

Ken Oda, Motoaki Sano, Shinichi Ohashi

Genome biological laboratory, Kanazawa Institute of Technology

メタボロミクスを利用した麹菌研究

徳岡昌文（財団法人 野田産業科学研究所）

はじめに

代謝産物を網羅的に解析し、生物間の違いや生育状況の変化を明らかに出来るメタボロミクスは、技術の進歩に伴い注目が高まっており、その有用性は数多くの研究で示されている。これらの研究は、フォーカストメタボロミクスとノンフォーカストメタボロミクスに大きく分類でき、前者は既知の代謝物や代謝経路に注目した戦略であるのに対して、後者はメタボライト全体に対して、特定の代謝経路に注目することなく解析する戦略である。我々は、*Aspergillus oryzae* において、ゲノム情報を利用した遺伝子破壊株作製と、メタボロミクスを利用した解析を行い、上記の両観点から遺伝子機能の解明を行ってきたので紹介する。

(1) 転写因子破壊株ライブラリーにおけるメタボローム解析

我々は *A. oryzae* の転写制御因子の網羅的な解析を目指し、ゲノム情報を利用した遺伝子破壊ライブラリーの作製を行っている。その作製段階において見出された、分生子形成に異常を来す機能未知遺伝子の破壊株について、既知の分生子形成関連遺伝子の破壊株とともに、代謝産物の網羅的な解析を試みた。実験は二次代謝産物が多く含まれると考えられる非極性化合物に注目して行い、マルツ寒天培地において一週間培養した菌体と培地より、抽出溶媒¹⁾で抽出した代謝産物を、LC/ESI-MS により解析した。得られた代謝産物のデータを主成分解析した結果、分生子形成過程で中心的な機能を持つ *brlA* や複数の二次代謝産物合成遺伝子の制御に関与している *laeA*, *veA* などを含むグループ、*brlA* の下流に位置する *abaA*, *wetA* の遺伝子破壊株や野生株を含むグループ、および、*brlA* の上流に位置すると考えられている *fluG* や *fluB* などが含まれるグループに分類された。これら結果は未知遺伝子の機能を予測するのに有用であるとともに、分生子形成と（二次）代謝が深く関連することを示唆する。

(2) シクロピアゾン酸生合成遺伝子クラスターの解析

シクロピアゾン酸 (CPA) は筋小胞の $Ca^{2+}/ATPase$ 活性を阻害するマイコトキシンシであり、*Aspergillus* 属では *A. flavus* が主な生産菌であるが、*A. oryzae* の一部の株が生産能を有することが知られている²⁾。*A. oryzae* および *A. flavus* のゲノム情報より、*cpaA*, *cpaB*, *cpaC*, *cpaD*, *cpaE*, *cpaT* 及び *cpaR* から構成される CPA 生合成遺伝子クラスターが推定されたことから³⁾、我々は各遺伝子の破壊株を作製し、代謝産物を解析することで、CPA 生合成における各々の遺伝子機能を明らかにすることを試みた。その結果、CPA 生合成経路は、生化学的に推定されていた *Penicillium cyclopium* のものと同じであり、3段階の生合成ステップは、*cpaA*, *cpaB* 及び *cpaC* がコードする酵素により触媒されることが明らかとなった。一方、*cpaE*, *cpaT* および *cpaR* の遺伝子破壊は CPA 生産に影響を与えなかったが、*cpaD* の遺伝子破壊により、CPA 誘導体と考えられる新規化合物が生産されなくなることを見出した。*A. flavus* においては *cpaD* が部分的欠失により機能していないと考えられ、*A. oryzae* のみがこの反応を行うことは興味深く、現在解析を進めている。

(3) メタボローム解析を利用したシクロピアゾン酸合成関連遺伝子の解析

CPA 非生産株である *A. oryzae* RIB40 株は、テロメアが *cpaA* 配列内で付加することで、*cpaR* の全体と *cpaA* 配列の一部を失っている⁴⁾にもかかわらず、CPA 生合成遺伝子クラスターの遺伝子が発現しているが、*veA* および *laeA* の遺伝子破壊により、RIB40 株(CPA-)と NBRC4177 株(CPA+)の両菌株とも CPA 合成遺伝子クラスターの遺伝子発現が低下した。そこで、RIB40 株をベースに作製されている遺伝子破壊株ライブラリーが CPA 生合成の制御に関連する遺伝子の探索に利用できることを考え、(1)で行ったメタボローム解析の結果を参考に、各遺伝子破壊株における CPA 合成遺伝子の発現を調べた。その結果、*veA* や *laeA* 破壊株と同様にいくつかの分生子形成制御遺伝子破壊株で CPA 生合成遺伝子の発現が低下していることが分かった。この結果は、(1)の結果と同様に、分生子形成などの分化と二次代謝が関連していることを示している。

おわりに

麹菌の代謝物は多くが未知であるため、これまではメタボロミクスを利用した研究を具体的な成果に結びつけることが難しかった。しかし、今後はゲノム情報や様々なオミクス技術を併用することで、メタボロミクスを用いた効率的な遺伝子機能解析が可能になると考えている。

1) J. Smedsgaard, *J. Chromatogr. A*, **760**, 264-270 (1997)

2) R. Orth, *Ann. Nutr. Alim.*, **31**, 617-624 (1977)

3) 勢ノ康代ら 2007年糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p. 91

4) 徳岡昌文ら 2007年糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p. 93

Functional genome analysis by metabolomics in *Aspergillus oryzae*

Masafumi Tokuoka

Noda Institute for Scientific Research

A. *oryzae* ゲノム情報から、A. *kawachii* 焼酎用液体麹開発への展開

小路博志（アサヒビール株式会社 酒類技術研究所 醸造技術部）

麹菌は固体培養時に高い酵素生産性を有しているため、酵素生産における宿主および醸造における栄養源分解酵素の供給源として工業的に幅広く利用されている。一方、麹菌を液体培養した時は、固体培養時と比較して麹菌の酵素生産性が著しく低下することが知られており、またその現象の詳細な制御機構は十分に解明されていない。我々はこの現象の謎を解くべく、液体培養で酵素を高生産させる方法について研究を行ってきました。まずは焼酎事業への展開を考慮し、焼酎用白麹菌 (*Aspergillus kawachii* NBRC4308) を用い、焼酎製造に主要な酵素であるグルコアミラーゼ (GA) と耐酸性 α -アミラーゼ (ASAA) の同時高生産を可能とする液体培養法を検討した。A. *kawachii* NBRC4308 株を Czapek-Dox 培地をベースに炭素源として難消化性デキストリンを含む培地にて培養すると、グルコアミラーゼなどの糖分解酵素群が高生産されることを発見した。培養中の培地中のグルコース濃度が低く維持されていたことより、グルコースによる酵素生産リプレッションが回避されたことが要因の一つと推測された。A. *kawachii* はゲノム配列が解読されていないので、解読済みの A. *oryzae*RIB40 株を同培地にて培養し、cDNA2000 のマイクロアレイにて詳細な解析を行った。その結果、A. *oryzae* においても難消化性デキストリンを含む培地では糖分解酵素群が高生産され、そのとき栄養源枯渇およびグルコース抑制解除に応答する遺伝子、さらにアミノ酸異化代謝などのエネルギー生産経路に関わる遺伝子が特異的に上昇していることが確認された。これらをヒントに、再び A. *kawachii* NBRC4308 株を用い、グルコアミラーゼ (GA) と耐酸性 α -アミラーゼ (ASAA) の同時高生産を目指した。各種原料を用い麹菌の液体培養を試みたところ、穀皮によりデンプン質が覆われた状態の大麦を用いることで、液体培養において両酵素の同時高生産が可能であることを見出した。精白歩合の異なる大麦を用いた培養試験を行ったところ、95%精白麦を用いた場合に GA と ASAA が同時に高生産され、95%精白麦の粉碎物や65%精白麦を用いた場合では、酵素生産性が著しく低下した。各精白麦の培地中でのグルコース放出速度を調べたところ、95%精白麦は65%精白麦に比べグルコース放出速度が低いことがわかった。つまり、95%精白麦は穀皮により大麦デンプン質が覆われた構造であるために、デンプン質分解に由来するグルコースの遊離が抑制されていると考察された。また、定量PCRを用いた遺伝子発現解析により、95%精白麦を用いた場合は各酵素の転写が高まることが確認された。さて、この酵素同時高生産機構をより詳しく解析するため、再度ゲノム解析の可能な A. *oryzae*RIB40 株を Czapek-Dox 培地をベースに炭素源として95%精白麦を粉碎したもの、粉碎しないものを用い、培養中での物質変化、遺伝子発現の面から解析を行った。培養前期においては培養液中のグルコースや有機酸濃度は低く推移し、解糖系の代謝に関する遺伝子発現が抑制されるなど、炭素源枯渇による脱抑制作用が酵素遺伝子高発現に関与することが示唆された。培養後期においては培養液中の硝酸イオンが取り込まれ続けながらアンモニウムイオン濃度が低値で維持され続けていた。培養期間を通じて窒素代謝が維持されることが酵素高生産につながるものと推移され、従来のアミラーゼ系酵素群発現様式とは異なる機構が存在する可能性が考えられた。*Aspergillus kawachii* NBRC4308 の窒素源について、再度検討を行ったところ、酵母菌体や大麦糠の併用により、酵素生産性をさらに高めることが出来るようになった。今後、*Aspergillus kawachii* NBRC4308 のゲノム配列解読及びマイクロアレイ解析が可能となれば、更なる産業上の有用性が示されるものと予想される。

The development of liquid koji for shochu using the genome information of A. *oryzae*.

Hiroshi Shoji (Department of Brewing Process, Technology Research Laboratories of Brewing Technology, Asahi Breweries, LTD.)

「清酒の醗酵技術を応用した新事業展開」

松井圭三 (株式会社福光屋 研究開発部部长)

福光屋は寛永二年(1625年)創業。金沢で最も長い歴史と伝統を誇る酒蔵である。百年の時をかけて酒蔵に湧き出る仕込み水と契約栽培した上質の酒米を用いて、伝統の酒造りを継承し、一切の添加物をしない「純米酒」だけを造り続けている。

古くから「酒は百薬の長」と言われる通り、日本酒は適量の飲酒であれば健康に効果があることが最近の研究で明らかになってきている。

また、酒蔵で働く杜氏さんの手はすべすべしてきれい、金沢の芸妓は白粉をつける前に日本酒を化粧水として使う、酒を扱う料亭の女将の肌はつやつやしている、などと言われるように日本酒は飲んで健康になるだけでなく、美容にも優れた効果を示すことが次々と分かってきた。

福光屋では、そのきれいの秘密に迫るため、永年にわたり米醗酵の研究を進めてきた結果、米や酵母の種類により、生み出される有効成分量が異なることに着目。米選びから始まり、米の磨き方、酵母の選定まで、試行錯誤を重ね、まさに醗酵が生み出す天然の美容液、「コメ発酵液FRS」を開発し、化粧品事業をはじめ「清酒の醗酵技術を応用した新事業」を展開しているので報告する。

「コメ発酵液FRS」の機能性の一つに抗酸化力がある。老化につながる酸化を引き起こす「活性酸素」を退治するのが、抗酸化作用を持つ物質であるが、「コメ発酵液FRS」の抗酸化力は、すぐれた抗酸化力を持つビタミンCを上回るという結果が得られた。抗酸化力が高いほど肌を保護する能力に優れているといわれており、このことからコメ発酵液FRSはお肌を整え、お肌を保護する能力があることが示された。

また、アミノ酸は、水分保持力が高いことで知られる。美肌の条件のひとつは、角質層に水分が15~20%含まれている状態。この水分を保持するのが角質細胞の中にあるNMF(天然保湿因子)であり、NMFの主成分はアミノ酸である。「コメ発酵液FRS」と他の成分の保湿力を比較測定したところ、「コメ発酵液FRS」の保湿力は、すぐれた保湿力を持つコラーゲンやヒアルロン酸など他の成分を上回るという結果が得られた。このことから「コメ発酵液FRS」は保湿力に優れ、うるおいに満ちた肌へと導く力があることが示された。

お米と水。「コメ発酵液FRS」の原料はこれだけであるが、お米や酵母、醗酵方法などを変えるだけで、「コメ発酵液FRS」の種類は無限に広がる。

「コメ発酵液FRS-12」は、コメ発酵液のスタンダードともいえるエキスである。肌に潤いを与えるアミノ酸や清浄作用のある天然のアルコール、保湿にいいグリセリンなど、醗酵から生まれるさまざまな成分がバランスよく含まれている。

「コメ発酵液FRS-01」は、独自の醗酵方法により、アミノ酸を通常のコメ発酵液の3倍含み、ビタミンやミネラル類も非常に豊富なコメ発酵液である。また、アルコール分を含まないので、アルコールに刺激を感じる方にも最適であり、保湿能力にもっとも優れる。

「コメ発酵液FRS-H」は、コメ発酵液でハーブを抽出することで水溶性、脂溶性両方の有効成分を引き出した、これまでにないオリジナルのエキスである。

これら3種類の「コメ発酵液」から、福光屋ではそれぞれ「すっぴんエッセンシャルズ」、「アミノリセ」、「フレナバ」の3つのスキンケア化粧品ブランドを開発し、展開している。

化粧品は、あくまでも主役ではなく、肌の機能を正常に促す脇役であるべきだという考えのもと、肌に刺激となり得る成分、香料や防腐剤はいっさい使わず、とことん自然に、肌にやさしい化粧品を目指した。“本当に肌が望むもの”だけを作ることがいつでも福光屋の化粧品作りの根本である。

時代は日本人の良さを見直す気運が高まっており、衣食住のあらゆる分野で「和」が見直されてきている。日本では、古くから日本酒、みそ、醤油などの伝統的醗酵食品の恩恵が知られており、最近では、国内外においてさまざまな醗酵食品の研究が進み、最先端の科学的な分析手法を取り入れることで、健康と美容に良い成分が次々と特定され、その働きについても次第に明らかになりつつある。

西洋人に比べ日本人の肌は美しいと言われているが、キメの整った潤いのある肌の理由には、食生活が大きく関与しているといわれている。

日本人の美しい肌が、より一層美しくなれるよう、肌が自ら潤いを取り戻し、健やかになるために、お米の力と醗酵の力は肌に必要な成分だけを生み出し、本来の力を取り戻させていく。

日本人が主食としてきた「米」、そして「醗酵」という自然の神秘、この2つを掛け合わせることにより、まだまだ美容と健康に貢献出来る無限の可能性が秘められていると考える。

The new project applied the *sake* fermentation procedure.

Keizo Matsui (Department Manager, R&D Department, Fukumitsuya Sake Brewery)

一般講演(口頭発表)

O-1

極性維持のための微小管プラス端と菌糸先端細胞表層の相互作用の役割

竹下典男, Reinhard Fischer (University of Karlsruhe, Applied microbiology)

細胞の極性は、様々な種類の細胞の機能に必須である。極性により、細胞内でのタンパク質、mRNA、オルガネラ等の非対称的な局在化がもたらされ、細胞機能に適した形態が形成される。分裂酵母からヒト繊維芽細胞にいたる形態形成の過程において、微小管は位置情報を細胞表層の適当な部位に伝達する役割を持つことが明らかになってきている。いったん微小管とその関連タンパク質が極性部位を決定すると、微小管の安定化とアクチン細胞骨格の再編成を介したポジティブフィードバックループにより、その部位での極性が増強、維持され始める。その役割を果たすため、微小管は細胞表層の特定の部位を認識し、いったんそこまで伸長した後、伸長を停止しなければならない。微小管の伸長と収縮は、チューブリンの重合または脱重合の活性により制御されているが、極性部位におけるこれらの活性制御の機構はほとんど明らかになっていない。今回、私達は *Aspergillus nidulans* において、微小管ポリメラーゼである XMAP215 ファミリーのタンパク質 AlpA の活性が、細胞表層において位置情報を司るタンパク質 TeaA によりネガティブに制御されることを明らかにした。TeaA は伸長する微小管のプラス端に局在し、微小管の細胞表層への伸長を利用し、細胞表層へ輸送される。AlpA も微小管のプラス端に局在するが、両者の相互作用は細胞表層でのみ観察された。この相互作用は、微小管プラス端と細胞表層の極性部位との相互作用を表しており、微小管がどのように極性部位を認識し、また、どのように極性部位で微小管の動態が制御されるかについて新しい洞察を与えるものである。

Interaction between microtubule plus end and hyphal tip cortex for polarity maintenance and regulation of microtubule organization in *Aspergillus nidulans*

Norio Takeshita, Reinhard Fischer

(Applied Microbiol., Univ. of Karlsruhe)

O-2

Aspergillus nidulans キネシンの細胞内局在：MKLP 型, Kid 型キネシンを中心に

紅 朋浩¹, 堀尾哲也², Berl R. Oakley² (¹名古屋大・院・医・分子標的, ²カンザス大学)

キネシンファミリーは微小管モーター活性を持つ一群のタンパク質であり、微小管が関与する様々な生命活動に関わっている。糸状菌においても、菌糸成長といった基本的な生命活動に関わることは間違いないが、多種多様なキネシンが存在することもあり、一部の断片的な情報しかないのが現状である。私たちは、このキネシンファミリーの総合的な理解を目指し、*Aspergillus nidulans* において、ゲノム上に見つかっている 11 種類のキネシンについて解析を行ってきた。これまでのところ、(1) 11 種のうち 9 種がそれぞれ固有の細胞内局在を示し様々な存在様式を持つこと、一方、(2) 1 つの遺伝子破壊によって表現形が現れることは稀であり、それぞれの機能はその他の分子で補完され得る可能性が高いことを報告してきた (2007 年第 7 回糸状菌分子生物学コンファレンス)。細胞内局在についてのより正確な理解を目的として、今回、標識を mCherry から GFP に変えて観察を行なった。よりシグナルが強く、安定な GFP を用いることで、mCherry を用いたこれまでの結論をより明確に確認できた。一方で、mCherry では確認できなかった新たな観察結果が得られた。AN3721.2 は、紡錘体が形成され始める分裂期のごく初期に一過的に核内に現れ、初期紡錘体に局在しながら、速やかに消失することが観察された。また AN3124.2 については、mCherry で観察された分裂後期紡錘体の中間部への局在に加え、隔壁形成の初期に現れ、隔壁形成後もしばらくそこに居続け、その後消失することを見出した。これらはシグナルが弱く、mCherry では観察が難しかったものと考えられる。いずれも極めて特徴的な細胞内局在であり、それぞれの機能を反映するものであると考えられた。

Localization analysis of two novel kinesins in *Aspergillus nidulans*.

Tomohiro Akashi¹, Tetsuya Horio², Berl R. Oakley²

(¹Nagoya Univ. Grad. Sch. of Med, ²Kansas Univ.)

O-3

光変換型蛍光タンパク質 Dendra2 による麹菌の隔壁孔を介した細胞間連絡の解析

丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

麹菌 *Aspergillus oryzae* の菌糸は多細胞からなり、隣接する細胞は隔壁により仕切られている。隔壁には隔壁孔と呼ばれる小さな穴が開いていることから、隣接する細胞は隔壁孔を介して細胞間連絡を行っていると考えられる。しかし *A. oryzae* において、生きた細胞で細胞間連絡が観察されることがないため、隔壁孔を介した細胞間連絡が実際に存在するかは不明であった。本研究では、青紫色光の照射でその蛍光が緑色から赤色に変換する光変換型蛍光タンパク質 Dendra2 を用いることによって、*A. oryzae* における隔壁孔を介した細胞間連絡の解析を行った。*A. oryzae* において Dendra2 を発現したところ、細胞質に緑色の蛍光が観察された。細胞の一部の Dendra2 蛍光を赤色に光変換したところ、その蛍光は速やかに細胞全体に拡散した。さらに、隔壁孔を介して隣接する細胞にも赤色の蛍光が観察されるようになった。このことから、*A. oryzae* における隔壁孔を介した細胞間連絡の存在が明らかになり、細胞間連絡の状態を生きたまま観察する実験系が確立された。次に、先端細胞と2番目の細胞間での細胞間連絡について、生育段階を追って解析を行った。発芽して間もない菌糸では、先端細胞と2番目の細胞間での Dendra2 の移行が観察された。それに対し、生育が進み先端細胞が長くなった場合や、2番目の細胞が分岐している際は、Dendra2 の細胞間移行が観察されなくなる傾向が見られた。これらの結果より、隔壁を介した細胞間連絡が菌糸の生育段階によって調節されている可能性が示唆された。

Analysis of intercellular communication through the septal pore using a photoswitchable fluorescence protein Dendra2 in *Aspergillus oryzae*

Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto

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

O-4

新規創薬標的遺伝子の機能を麹菌で解析するアッセイ法の開発

安藤朋広¹, 丸井淳一郎^{1,2}, 玉野孝一¹, 石井智子¹, 織田 健³, 佐野元昭³, 小池英明¹, 町田雅之¹, 阿部敬悦² (¹産総研, ²東北大・未来研, ³金沢工大・ゲノム研)

優れた抗真菌剤を創出するため、その開発プロセスの効率化が常に求められている。本研究開発は、麹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データベースを作製することを目的としている。我々はこれまでに麹菌の薬剤ストレス応答について解析し、麹菌の生理機能の状態を個別に観察するためのアッセイ系を構築した。今回、このシステムを新規創薬標的候補遺伝子の機能解析に用いることの有効性を検証したので報告する。

2種類の生理機能に対し、それらの状態を観察できるアッセイ系を導入した麹菌では、それぞれの生理機能に作用する薬剤ストレス応答を検出することができた。また、これらの麹菌では、標的とする生理機能に関連した遺伝子の変異によりその応答性の増大を検出することができ、新規創薬標的候補遺伝子の機能解析への有効性を示すものである。なお、本研究は NEDO 知的基盤創成・利用促進研究開発事業の一環として実施した。

Analytical method for exploring novel antifungal targets in *Aspergillus oryzae*

Tomohiro Ando¹, Junichiro Marui^{1,2}, Koichi Tamano¹, Tomoko Ishii¹, Ken Oda³, Motoaki Sano³, Hideaki Koike¹,

Masayuki Machida¹, Keietsu Abe²

(¹AIST, ²NICHe, ³KIT)

O-5

麴菌 *A.oryzae* の bZIP 型転写制御因子遺伝子 *atfA*、*atfB* の機能の差について

坂本和俊^{1,2}、水谷 治¹、濱田涼子¹、岩下和裕¹、山田 修¹、三上重明¹、五味勝也² (1 酒総研、2 東北大院農)

これまで我々は麴菌に存在する ATF/CREB 型転写制御因子遺伝子 *atfB* について解析を行い、*atfB* が分生子形成期の遺伝子発現を制御することを明らかにしてきた。麴菌には *atfB* と DNA 結合ドメインがほぼ一致する別の ATF/CREB 型タンパク質をコードする遺伝子 *atfA* が存在している。これまで我々は、*atfA* 破壊株の分生子が酸化ストレス感受性になるなど、*atfB* 破壊株より強い形質がみられることを報告している。また、*atfB* 破壊株と同様に *atfA* 破壊株でも *catA* の発現が減少している他、対照株に比べて分生子のトレハロース含量が低下していることが確認できた。そこで、*atfA* と *atfB* の差をより詳細に解析するために、麴菌 DNA chip による遺伝子発現解析を行った。

Differences between *atfA* and *atfB*, two bZIP transcription factor of *A. oryzae*

Kazutoshi Sakamoto, Osamu Mizutani, Ryoko Hamada, Kazuhiro Iwashita, Osamu Yamada, Shigeaki Mikami, Ken Kobayashi, Akihiro Mizuno, Katsuya Gomi
(NRIB, Univ. of Tohoku)

O-6

Aspergillus nidulans におけるトランスクリプトーム解析による農薬応答シグナル経路の解明

萩原大祐¹、浅野祐広²、丸井淳一郎¹、吉見啓¹、水野猛²、阿部敬悦¹ (1 東北大・未来研、2 名大院・生命農学)

糸状菌特異的農薬として用いられる fludioxonil や iprodione は、His-Asp リン酸リレー情報伝達系の因子であるグループ III 型 histidine kinase (HK) を標的にした作用機構を持つことがこれまでに明らかになっている。実際、*A. nidulans* のグループ III 型 HK である NikA の遺伝子破壊株は fludioxonil に耐性を示す。NikA の下流因子として働くと考えられる response regulator (RR) の SskA と SrrA の二重遺伝子破壊株も fludioxonil に対して耐性を示す。つまり、農薬のシグナル (生育阻害効果) は NikA から SskA, SrrA を経由して伝達されると考えられる。そこで、この His-Asp リン酸リレー情報伝達系が制御している因子群、およびシグナル伝達メカニズムを解明するために、DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行った。その結果、fludioxonil に対する転写応答は SrrA には全く依存しておらず、SskA とその下流の HogA MAPK cascade が主に関与していることがわかった。さらに、HogA の下流因子として機能することが示唆されている bZip 型転写因子 AtfA に着目して転写応答を解析したところ、HogA-AtfA 間のシグナル伝達の存在を強く支持するデータが得られた。AtfA の農薬に対する生育阻害効果を試験するとともに、His-Asp リン酸リレー情報伝達系、およびその下流も含めたシグナル伝達メカニズムについて考察したい。

Transcriptome analysis revealing a fungicide responsive signaling pathway in *Aspergillus nidulans*

Daisuke Hagiwara¹, Yoshihiro Asano², Junichiro Marui¹, Akira Yoshimi¹, Takeshi Mizuno², Keietsu Abe¹
(NICHe, Tohoku Univ.¹, Grad. Sch. Bioagricultural Sci. Nagoya Univ.²)

O-7

低酸素条件下におけるチアミン合成の役割

志水元亨, 藤井達也, 梶尾俊介, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

【目的】 嫌気的な環境下において、*Aspergillus nidulans* は、細胞質における酸化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。これは、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ことを意味する。これまでに、プロテオミクス的手法などを用いた解析から、低酸素条件下の菌体では好気条件下のそれと比較してチアミン合成に関与する ThiA の発現量が増加すること、菌体内のチアミン含量が2倍に増加することを見出している。そこで、本研究では、低酸素条件下におけるチアミンの生理的な役割について検討した。

【方法および結果】 菌体および培地中の代謝物を GC-MS にて分析したところ、低酸素条件下において、乳酸およびバリン、ロイシン、イソロイシンを含む種々のアミノ酸が培地中に蓄積していたのに対し、好気条件下ではそれらは検出されなかった。また、リアルタイム PCR を用いた解析から、これらの合成に関与する遺伝子の発現が低酸素条件下にて増加することが示された。一方、野生株と比較して $\Delta thiA$ 株では、培地中の乳酸の量は変化していなかったものの、バリン、ロイシン、イソロイシンの量が顕著に減少していた。また、 $\Delta thiA$ 株を培養する際、培地にチアミンを添加することによって、培地中のバリン、ロイシン、イソロイシン量は野生株と同程度まで回復した。これらのアミノ酸の合成における初発の反応を触媒するアセト乳酸シンターゼ (AHAS) は、補酵素としてチアミンニリン酸を要求することから、低酸素条件下では、バリン、ロイシン、イソロイシンを合成するために、チアミンの供給が重要であることが示唆された。AHAS の酵素活性については、好気条件下と比較して、低酸素条件下にて 1.6 倍高かった。低酸素条件下では、細胞内の NAD(P)H:NAD(P)⁺ バランスが高くなることから、バリン、ロイシン、イソロイシンの合成に伴う NAD(P)⁺ への再酸化は低酸素条件下において重要な役割を果たすことが考えられた。

The role of thiamine biosynthesis in *Aspergillus nidulans* grown under hypoxic conditions.

Motoyuki Shimizu, Tatsuya Fujii, Shunsuke Masuo, Naoki Takaya

(Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

O-8

麴菌を中心とした真菌類比較ゲノムデータベースの開発

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

麴菌 (*Aspergillus oryzae*) をはじめとして、*A. nidulans* や *A. fumigatus*、*Neurospora crassa* など多くの糸状菌や真菌類のゲノム解析がなされ、各菌株のゲノム情報のデータベースも整備されている。ゲノム情報は現在も増加をしており、これに応じて BROAD institute では比較ゲノムデータベースを提供している。しかしながら、これらのデータベースでは、海外サーバーのためアクセス速度に問題や、使用できる情報数や検索機能の不備、酵母等良く整備されているデータベースとの連携など、様々な点で不十分な状況にある。また、海外機関が作成しているため、日本の研究者の要望が反映されない等の問題もある。そこで今回、*A. oryzae* を中心として比較ゲノムデータベースの作成を行った。

データベースの作成は、平成 20 年 3 月時点でゲノム情報が公開されている糸状菌類を中心に、14 菌株について行った。また、*A. oryzae* では、NITE により公開されている遺伝子予測の他に、ゲノム解析プロジェクトの中で最も予測遺伝子数が多かった ACE33 バージョンも対象とした。本データベースでは、各遺伝子の Locus 情報、アノテーション情報、CDS 情報の他、機能ドメインや機能分類について幅広く検索すると共に、情報を掲載した。また、データベース中の菌株間での双方向検索を行い、ホモログ、パラログの情報について掲載し、周辺領域も含めてシンテニーが比較できるようグラフィカルな表示機能を持たせた。また、各遺伝子について、アクセスした研究者がコメントし、今後のデータベースの改善に反映できるようコメント欄を備えた。現在、本データベースについては、ベータ版を当所内に公開し検証作業を行っている。

Development of the comparative fungal genome database

K. Iwashita^{1,2}, K. Sakamoto^{1,2}, O. Yamada^{1,2}, S. Mikami^{1,2} (1 NRIB, 2 Hiroshima Univ.)

O-9

黒麹菌 *Aspergillus awamori* NBRC4314 株のドラフトゲノム配列の決定

町田雅之¹, 小池英明¹, 山田修², 細山哲³, 堀川博司³, 加藤裕美子³, 神野浩二³, 服部貴澄⁴, 佐野元昭⁵, 玉野孝一¹, 比嘉賢一⁶, 塚原正俊⁷, 福田和郎⁸, 安原貴臣⁸, 照屋盛実⁶, 大箸信一⁵, 桐村光太郎⁴, 有田正規⁹, 浅井潔⁹, 阿部敬悦¹⁰, 五味勝也¹⁰, 石川雄章¹¹, 三上重明², 仲宗根薫¹², 藤田信之³ (¹産総研, ²酒総研, ³製評機構, ⁴早稲田大, ⁵金沢工大, ⁶沖縄工技セ, ⁷トロピカルテクノセ, ⁸アサヒビール, ⁹東大院, ¹⁰東北大院, ¹¹醸造協会, ¹²近畿大)

黒麹菌は沖縄の泡盛や九州の焼酎製造に用いられ、日本の伝統的発酵産業に重要な糸状菌である。黒麹菌は、有機酸の生産性等が黄麹菌とは異なり、*A. niger* に近いなど、産業利用・学術の両面からゲノム解析の対象として非常に興味深い。黒麹菌の遺伝的多様性について、rDNA ITS 領域などの塩基配列情報を用いて解析した結果、黒麹菌は2つのグループに分かれ、一方は *A. niger* に近縁であることが分かった。ゲノム解析対象株は *A. niger* から遠縁のグループに属する *Aspergillus awamori* NBRC 4314 株 (= RIB 2604 株) を選択し、サンガー法で塩基配列解析を行うことにより、全ゲノムのドラフト塩基配列の解読に成功した。この結果、ゲノムサイズは約 35M 塩基対、遺伝子が 12,000 個程度であることが分かった。現在、黄麹菌、*A. niger*、およびその他の近縁種などとの比較ゲノム解析を進めている。

Determination of draft genome sequence of *Aspergillus awamori* NBRC4314

Masayuki Machida, Hideaki Koike, Osamu Yamada, Akira Hosoyama, Hiroshi Horikawa, Yumiko Kato, Koji Jinno, Takasumi Hattori, Motoaki Sano, Koichi Tamano, Kenichi Higa, Masatoshi Tsukahara, Kazuro Fukuda, Takaomi Yasuhara, Morimi Teruya, Shinichi Ohashi, Kohtarō Kirimura, Masanori Arita, Kiyoshi Asai, Keietsu Abe, Katsuya Gomi, Takeaki Ishikawa, Shigeaki Mikami, Kaoru Nakasone, Nobuyuki Fujita (AIST, NRIB, NITE, Waseda U., U. Tokyo, KIT, Asahi, TTC, OITC, Tohoku U., Brew Soc. Japan, Kinki U.)

O-10

イネごま葉枯病菌 (*Bipolaris oryzae*) の青色光制御遺伝子破壊株における近紫外線誘導遺伝子の発現解析

木原淳一, 田中のぞみ, 森脇明弘¹, 上野誠, 荒瀬榮 (島根大生資・¹現生物研)

イネごま葉枯病菌 (*Bipolaris oryzae*) のメラニン生合成遺伝子及び光回復酵素遺伝子の発現が近紫外線 (波長 300-400nm) 照射によって増加することが明らかとなっている。今回、Suppression Subtractive Hybridization (SSH)法を用いて、近紫外線照射によって発現が増加する遺伝子を探索した結果、近紫外線照射によって発現が5-100倍に増加する新規の近紫外線誘導遺伝子を同定した。一方で、我々は、アカパンカビの青色光制御遺伝子 (*WC-1*) と相同な *BLR1* 遺伝子をクローニングしている。そこで、これら近紫外線誘導遺伝子の発現増加に青色光制御因子 (青色光受容体) が関与するか否かを明らかにするため、*BLR1* 遺伝子破壊株を用いて近紫外線誘導遺伝子の発現解析を行なった。その結果、*BLR1* 遺伝子破壊株において、近紫外線誘導遺伝子は、①近紫外線照射による増加が認められなくなる遺伝子群 (光回復酵素遺伝子など) と、②野生株と同様に近紫外線照射による増加が認められる遺伝子群 (メラニン合成遺伝子など) に大きく類別できた。以上の結果から、近紫外線照射によって発現が増加する近紫外線誘導遺伝子には、①青色光制御因子 (青色光受容体) を介する遺伝子群 (光回復酵素遺伝子など) と、②青色光制御因子 (青色光受容体) とは異なる未知の光受容体を介する遺伝子群 (メラニン合成遺伝子など) があることが示唆された。

Expression analysis of near-ultraviolet radiation-induced genes in blue-light regulator-deficient mutant of the rice brown spot fungus *Bipolaris oryzae*

Junichi Kihara, Nozomi Tanaka, Akihiro Moriwaki¹, Makoto Ueno, Sakae Arase (Fac. Life Env. Sci., Shimane Univ., ¹Present address: NIAS)

O-11

植物感染時におけるイネいもち病菌細胞壁成分の局在について

藤川貴史¹・阿部敬悦²・西村麻里江¹ (¹生物研・²東北大 未来研)

動植物は病原菌の感染時に、病原菌の細胞壁成分を認識する事で生体防御反応を引き起こし感染を阻止する。一方で病原菌は自身の細胞壁成分を再構築することで宿主の認識を回避していることが知られている。いもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) は主にイネ科穀類に感染する病原糸状菌であり、イネによる細胞壁の認識を回避する何らかの機構を持っていると考えられるが、感染時の細胞壁成分に関する知見はこれまでほとんどなかった。いもち病菌がイネによる認識を回避する機構は明らかになっていない。そこで、いもち病菌の主要な細胞壁成分の局在について、イネ葉鞘表面接種時に蛍光標識による観察を行ったところ、 α -1,3-グルカンが発芽菌糸や未成熟な付着器及び侵入菌糸で検出されたが、キチンは侵入菌糸ではほとんど検出されず、 β -1,3-グルカンは菌全体でほとんど検出されなかった。しかし精製 α -1,3-グルカナーゼを処理すると侵入菌糸でそれまで検出できなかったキチン及び β -1,3-グルカンが検出されるようになった。このことから α -1,3-グルカンは細胞壁主要成分であるキチン及び β -1,3-グルカンの外側をカバーしていることがわかった。

イネゲノム情報からイネには α -1,3-グルカナーゼがないと考えられており、これらの結果から、いもち病菌はイネが攻撃できない α -1,3-グルカンで細胞壁をカバーすることにより、イネによる認識から回避しているのではないかと推測される。

(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。)

Localization of cell wall components in *Magnaporthe grisea* during infection.

Takashi Fujikawa¹, Keietsu Abe², Marie Nishimura¹ (¹NIAS, ²Tohoku Univ., NICHe)

O-12

ML-236B 生合成遺伝子群の転写活性化因子 MlcR が結合する DNA 配列の同定

馬場悟史^{1,2}, 木下浩², 仁平卓也², 細瀬雅彦¹ (¹第一三共・プロセス技研, ²阪大・生物学国際交流セ)

糸状菌 *Penicillium citrinum* により生産される ML-236B (compactin) の生合成遺伝子群はレギュレータータンパク質 MlcR により転写が活性化される。MlcR は Zn(II)₂Cys₆ DNA 結合モチーフを有する zinc cluster タンパク質であり、他の zinc cluster タンパク質と同様に 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で転写を活性化していることが予想される。そこで本研究では、ゲルシフトアッセイおよびレポーターアッセイを用いて、MlcR の結合配列を同定することを目的とした。

MlcR に発現制御されることが明らかになっている 6 つの ML-236B 生合成遺伝子のうち、bidirectional に存在する *mlcA*–*mlcC* 間に複数のプローブを作製し、大腸菌で発現させた組換え MlcR を用いたゲルシフトアッセイを実施した。その結果、他の zinc cluster タンパク質結合配列に多く見られる CG 繰り返し配列を含む 5'-ACGGCGTTATTCGG-3' という配列に MlcR が結合していることが示唆された。変異導入プローブを用いたゲルシフトアッセイおよび GUS 遺伝子を用いたレポーターアッセイから、MlcR が 4 塩基からなる direct repeat 構造 (5'-(A/T)CGG-N₆-TCGG-3') に結合することで標的遺伝子の転写を活性化していることがわかった。類似配列は他の MlcR 制御下にある遺伝子のプロモーター領域近傍にも存在しており、これらの結果から MlcR 結合コンセンサスモチーフが 5'-(A/T)CGG-N_{6,9}-TCGG-3' であることを明らかにした。

Identification of the sequence recognized by MlcR, a GAL4-type transcriptional activator of ML-236B (compactin) biosynthetic genes

Satoshi Baba^{1,2}, Hiroshi Kinoshita², Takuya Nihira², Masahiko Hosobuchi¹

(¹DAIICHI SANKYO CO., LTD., ²ICBiotech, Osaka Univ.)

O-13

生合成経路改変によるスピロトリプロスタチンBの生産

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

フミトレモルジン類は *Aspergillus fumigatus* が生産するジケトピペラジン化合物である。我々はこれまでに、フミトレモルジン生産株である *A. fumigatus* BM939 株を対象に、遺伝子破壊と異宿主発現系を利用した機能解析により、3種類のシトクロム P450 が鍵となる生合成経路の全体像を解明することが出来た。しかしながら、スピロオキシインドール構造を有するスピロトリプロスタチンのように、これまでに明らかにした主要経路では説明できない微量類縁体も代謝産物として同定されている。これら微量類縁体の生合成機構解明を目的に、生合成経路改変による取得を試みた。

通常の生合成ではスピロトリプロスタチンの前駆体が蓄積せず、かつその前駆体に対する酵素反応性が低いことが、生産性の低い理由として考えられる。そこで、経路の分岐に関わると予想される2種のシトクロム P450 に着目し、中間体であるトリプロスタチンBを高度に蓄積させることが出来る *ftmC* 遺伝子破壊と、環化反応に関わる *ftmE* 遺伝子の過剰発現とを組み合わせた経路改変株を作製した。得られた形質転換株の代謝産物を分析した結果、これまで取得が困難であったスピロトリプロスタチンBをはじめとするいくつかの微量類縁体の生産を確認することが出来た。現在、それらの単離・精製、構造同定を進めている。

Spirotryprostatin B production by pathway engineering in *Aspergillus fumigatus*

Naoki Kato, Hirokazu Suzuki, Hiroshi Takagi, Shunji Takahashi, Hiroyuki Osada

(Antibiotics Lab., Advanced Science Institute, RIKEN)

O-14

形質転換時の DNA 分子の取り込みに対するポリエチレングリコールの役割

井川敬介¹, 伊藤靖夫² (¹信大・理、²信大・全学教育機構)

1978年のアカパンカビでの報告以来、ポリエチレングリコール(PEG)とカルシウムイオン(Ca²⁺)を用いた形質転換法は現在でも汎用されている。しかし、これらの分子の役割は現在でも不明である。ポリエチレンイミン(PEI)は哺乳類の形質転換に汎用されるポリカチオンであり、プロトンスポンジ効果によってエンドソームを不安定化し、細胞質へDNA分子を放出させると考えられている。PEGと同様に、PEIでも *Aspergillus nidulans* のプロトプラストを形質転換することができた。PEGとPEIでは、添加するカチオンに対する反応性が異なっていた。また、哺乳類細胞に対する結果と比較すると、PEIの有効濃度はより高く、Ca²⁺を必要とする点で異なっていた。PEIはDNA分子と直接的に相互作用し、プロトプラストとDNAの相互作用も促進させた。しかし、そのような効果はPEGでは観察されなかった。さらに、PEGによって誘導されるプロトプラストの融合とDNA分子の取り込みは相関しなかった。これらの結果から、DNA分子の取り込み時に、PEGは細胞外では機能していない可能性が考えられた。標準的な条件としたPEGの最終濃度(36.8%)では、形質転換時のプロトプラスト懸濁液の浸透圧を半減させると、再生可能なプロトプラスト数あたりの形質転換数は10-50倍上昇した。PEGを添加しない場合には、プロトプラストの生存率は変化せず、形質転換体も得られなかった。さらに、PEG、プロトプラスト、DNAを混合した時点で、形質転換頻度は決定されていた。これらの結果は、原形質膜およびエンドソームの安定性に対してPEGが関与している可能性を支持すると考えられた。現在、その詳細について検討を進めている。

Role of polyethylene glycol on DNA uptake during transformation of *Aspergillus nidulans*

Keisuke Ikawa¹, Yasuo Itoh² (¹Fac. Science, ²Sch. Gen. Ed. / Shinshu Univ.)

O-15

Aspergillus aculeatus における網羅的遺伝子破壊株の作出を目的としたアグロバクテリウム形質転換法の開発

國武絵美、谷 修治、炭谷順一、川口剛司 (阪府大院・生命・応生科)

【目的】 T-DNA を宿主染色体内にランダムに挿入する性質を利用したアグロバクテリウム形質転換法 (AtMT) は網羅的に遺伝子破壊株を作出できるだけでなく、T-DNA 配列を基に破壊箇所を特定することができる。*Aspergillus aculeatus* No. F-50 株は多種の (ヘミ) セルラーゼを生産するが、それら遺伝子発現制御機構は未解明な部分が多く存在する。そこで、*A. aculeatus* の新奇セルラーゼ遺伝子発現制御因子の同定を目的として、AtMT の確立を行った。【方法と結果】 形質転換には T-DNA 領域内にハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hph*) を持つバイナリーベクター pBIG2RHPH2¹⁾ を用いた。高効率な形質転換条件を決定するために、アグロバクテリウムと *A. aculeatus* 胞子の混合比を検討した。その結果、OD₆₆₀=0.4 のアグロバクテリウムの培養液 100 ml と胞子 10⁴ 個を共培養した際に高い形質転換効率が得られ、T-DNA は *A. aculeatus* のゲノム DNA 上の任意の座位に約 8 割の確率でシングルコピー組み込まれていた。次に、共培養時間を検討した。時間の延長と共に効率の向上が見られたものの、48 時間以上では有意な差はなかった。また、プロトプラストの使用や、1 プレートあたりの共培養量の増加に関わらず得られる形質転換体数に相違は見られなかった。このように決定した最適条件で、10⁴ 個の胞子当たり 4~20 株の形質転換体を得られた。TAIL-PCR (thermal asymmetric interlaced PCR) とシーケンス解析を行った結果、挿入された T-DNA の周辺配列の取得に成功した。

1) Tsuji, G. et. al.: J. Gen. Plant Pathol., **69**, 230-239 (2003)

Development of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for random insertional mutagenesis in *Aspergillus aculeatus*

Emi Kunitake, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi
(Grad. Schl. of Life & Env. Sci., Osaka Pref. Univ.)

O-16

バイオエタノール固体発酵に最適な新規麹菌高発現プロモーターの探索

坂東弘樹¹, 久田博元¹, 石田博樹¹, 秦 洋二¹, 片倉啓雄², 近藤昭彦³ (¹月桂冠・総研, ²阪大院・工・生命先端, ³神戸大・工・応化)

【目的】 植物系バイオマスの糖化とエタノール発酵・回収を固体状のままで行うことで、発酵槽の小型化や蒸留操作の省略が可能となり、生産コストの大幅な削減につながる。本研究では、固体反応を利用したバイオエタノール生産システム構築のために、その第一段階である固体状バイオマスの糖化を目的として、麹菌を宿主とした固体培養でのバイオマス分解酵素の大量生産に最適なプロモーターの探索を行った。

【方法及び結果】 既知のプロモーター5種類、及び麹菌小麦フスマ固体培養時の DNA マイクロアレイ解析から選抜した新規プロモーター候補3種類について、麹菌 OSI1013 株を宿主として、それぞれのプロモーター制御下で麹菌エンドグルカナーゼ遺伝子 *celA* を発現させた。その結果、マイクロアレイ解析で選抜した機能未知遺伝子の新規プロモーターが、小麦フスマ固体培養において最も高い *celA* 発現能を示した。また、その生産量は、麹菌の物質生産で多用される *amyA* プロモーターよりも優れていることが確認できた。さらに、本プロモーターの高発現に最適な小麦フスマ培養条件や、発現誘導に関与する推定シス因子領域を決定した。また、本プロモーターを用いた固体培養での種々のバイオマス分解酵素の生産性についても報告する。

【謝辞】 本研究は NEDO バイオマスエネルギー高効率転換技術開発の一環として実施した。

Isolation of a novel promoter used for efficient protein expression by *Aspergillus oryzae* for solid-state bioethanol fermentation.

Hiroki Bando¹, Hiromoto Hisada¹, Hiroki Ishida¹, Yoji Hata¹, Yoshio Katakura², Akihiko Kondo³

(¹Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., ²Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ³Dept. Chem. Sci. Eng., Kobe Univ.)

O-17

麹菌 *A. oryzae* の高頻度相同組換え宿主を用いたプロテアーゼ遺伝子多重破壊株の育種

尹載宇, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院農生科・応生工)

【目的】麹菌 *A. oryzae* は、培地中にタンパク質を大量に分泌する能力をもつことから、異種タンパク質生産の宿主として利用されている。しかし、糸状菌由来タンパク質と比べ、高等生物由来タンパク質の生産量は一般に低く、その原因のひとつとしてプロテアーゼによる分解がある。これまでに我々は、*tpaA*, *pepE* 遺伝子の2重破壊により、ヒトリゾチームおよびウシキモシンの生産量が上昇することを明らかにした。^{1,2)}しかし、*A. oryzae* は134個のプロテアーゼ遺伝子を有し、多数の遺伝子を同時に破壊するためには多大な労力と時間を要する。そこで、本研究では、高頻度相同組換え宿主を作製し、プロテアーゼ遺伝子多重破壊株の育種を行った。【結果】非相同組換えに関与する *ligD* 遺伝子を、4重栄養要求性株 NSAR1 において破壊した。さらに、*pyrG* 遺伝子を破壊することでウリジン要求性を付与し、*pyrG* をマーカーとしてプロテアーゼ遺伝子の破壊を行った。また、標的遺伝子の上流 300 bp を Direct repeat として *pyrG* の両端に付加することによって *pyrG* マーカーをリサイクリングし、プロテアーゼ遺伝子の多重破壊を可能とした。これまでに、*tpaA* および *pepE* 遺伝子の2重破壊株を取得したが、それぞれの遺伝子において高い破壊効率(約90%)が確認された。³⁾現在、この2重破壊株に対しさらに4個のプロテアーゼ遺伝子の破壊を行い、6重破壊株を作製している。1) Jin et al. (2007) Appl. Microbiol. Biotechnol. 76, 1059-1068. 2) 根本ら、日本農芸化学会2007年度大会要旨集 p. 179. 3) Maruyama & Kitamoto (2008) Biotechnol. Lett. DOI 10.1007/s10529-008-9763-9.

Multiple protease gene disruptions by marker recycling with highly efficient gene-targeting background in *Aspergillus oryzae*

Jaewoo Yoon, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto
(Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

O-18

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) プロテアーゼ高生産変異株の解析

渡部潤^{1,2)}, 田中寿基¹⁾, 豊島快幸¹⁾, 茂木喜信¹⁾, 渡邊剛志²⁾, 山崎達雄¹⁾ (¹⁾ヤマサ醤油, ²⁾新潟大院・自然研)

醤油業界では原料利用率の向上を目的にプロテアーゼ活性を指標とした麹菌の育種を古くから行ってきた。現在製造に使用されている菌株はこのような育種を繰り返すことで選抜された高プロテアーゼ活性麹菌であるが、その原因遺伝子の同定は遅れていた。そこで、当社実用菌株 *A. oryzae* No. 18 株から UV 照射により得られた No. 93 株(プロテアーゼ高生産変異株)をモデルとして原因遺伝子の同定を試みた。

ミルクカゼインとグルコースを含有する培地でハローアッセイを行った結果、No. 93 株のプロテアーゼ生産はグルコース抑制を受けていない可能性が示唆された。そこで、*A. nidulans* において変異が導入されることでプロテアーゼ生産の上昇を引き起こすことが知られている遺伝子、*creB*, *creC*, *xprF1* のホモログを *A. oryzae* のゲノムデータベースから抽出し、No. 18 株と No. 93 株についてこれらの遺伝子のシーケンスを比較した。その結果 No. 93 株の *creB* にはミスセンス変異が1ヶ所、*creC* にはフレームシフト変異が1ヶ所、*xprF1* にはサイレント変異が2ヶ所あることが明らかとなり、この株のプロテアーゼ高生産の原因は *creC* の変異であることが示唆された。そこで、麹菌において *creC* の変異がプロテアーゼ高生産の原因となることを確認するために $\Delta ligD$ 株を親株として *creC* 破壊株を作成した。その結果、 $\Delta creC$ 株はプロテアーゼを高生産しており、*A. oryzae* においても *creC* の欠損がプロテアーゼの高生産を引き起こすことが確認された。

以上のことから、*creC* をターゲットにした育種を行うことで、効率的なプロテアーゼ高生産株の取得が可能であると考えられる。

Analysis of protease high production mutants from *Aspergillus oryzae*

Jun Watanabe, Hisaki Tanaka, Yoshiyuki Toyoshima, Yoshinobu Mogi, Takeshi Watanabe and Tatsuo Yamazaki
(Yamasa corporation, Univ. of Niigata)

O-19

麹菌 (*A. oryzae*) のセルフクローニングによるプロテアーゼ生産

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

【目的】 麹菌 *A. oryzae* のゲノム配列が公開され、麹菌のポストゲノム解析はわが国で急速に発展し、これらの成果のわが国の食品産業での現実的な利用が一日も早く望まれている。そこで、麹菌を麹菌由来の遺伝子で組み換えるセルフクローニングによる物質生産を試みた。その一例として、麹菌由来のプロテアーゼの生産を検討した。

【方法と結果】 まずは、麹菌アルカリプロテアーゼのセルフクローニング生産を検討した。麹菌由来 *sodM* プロモーター、アルカリプロテアーゼ遺伝子、麹菌 *glaB* ターミネーターの順に遺伝子を連結し、この遺伝子と隣接して麹菌の選択マーカー *leuA* をサブクローニングしたプラスミドを構築した。このプラスミドの麹菌遺伝子部分のみを PCR で増幅し、麹菌ロイシン要求性変異株を宿主として形質転換を行った。形質転換体のサザン解析を行った結果、プラスミド部分の遺伝子は検出されず、液体培養で菌体外に著量のアルカリプロテアーゼを分泌生産した。同様の手法を用いることで、麹菌のセルフクローニングにより、麹菌由来の中性プロテアーゼ、酸性プロテアーゼの分泌生産にも成功したので報告する。

【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。

Protease production of self-cloning *Aspergillus oryzae*.

Hiroki Ishida¹, Yoji Hata¹, Ken-Ichi Kusumoto², Youhei Yamagata³, Yoshinao Koide⁴, Michio Takeuchi⁵ (Gekkeikan¹, NFRI², Univ. of Tohoku³, Amano Enzyme⁴, Tokyo Univ. of Agric. And Technol.⁵)

O-20

麹菌 hydrophobin RolA が cutinase CutL1 と相互作用する際の His32 の役割

上原健二¹、高橋徹¹、前田浩²、山形洋平²、長谷川史彦¹、五味勝也¹、阿部敬悦¹

(東北大・未来研¹、東北大・農・応生科²)

Hydrophobin は糸状菌に広く分布し、疎水性が高く、菌糸や分生子の細胞壁に局在していることから、糸状菌の動植物への感染に重要なタンパク質であると考えられている。産業微生物として知られる *Aspergillus oryzae* を、生分解性ポリエステルである polybutylene succinate-coadipate (PBSA) を含む液体培地で培養すると、hydrophobin RolA を発現する。この条件下では、*A. oryzae* は同時に PBSA を分解する酵素として cutinase CutL1 も産生しており、PBSA の疎水表面に吸着した RolA は、この CutL1 をリクルートする事で、PBSA 表面に CutL1 を濃縮し、PBSA の分解を促進している。現在、我々は部位特異的変異導入による方法と化学修飾を用いた方法とで、RolA と CutL1 の相互作用に参与しているアミノ酸残基の特定を行っている。方法としては、まず RolA もしくはその誘導体 (H32S mutant, DEPC-treated RolA) を Teflon 微粒子 (直径 100-200 nm) に結合させて表面をコートした後、CutL1 溶液とインキュベートし、遠心分離によって上清と沈殿に分画する。Teflon-RolA 複合体にリクルートされた CutL1 を、SDS、2-mercaptoethanol を用いて遠心分離された沈殿から抽出し、SDS-PAGE 解析によって結合した量を定量した。その結果、我々は RolA の His32 が RolA と CutL1 の相互作用に必要な重要なアミノ酸残基である事を見出した。

H32S of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA is important for RolA-cutinase CutL1 interaction.

Kenji Uehara¹, Toru Takahashi¹, Hiroshi Maeda², Youhei Yamagata², Fumihiko Hasegawa¹, Katsuya Gomi¹, Keietsu Abe¹

(NICHe., Tohoku Univ.¹, Grad.Sch., Tohoku Univ.²)

O-21

Trichoderma reesei の固体培養におけるプロテオーム解析

関口裕久, 齋藤勇司, 佐藤 伸, 岡田宏文, 小笠原 渉, 森川 康 (長岡技科大・生物)

Trichoderma reesei はセルラーゼ生産能力に優れた糸状菌として見出された。野生株である QM6a 株を基に液体培養におけるセルラーゼ生産能の向上が図られ、変異を加えることで世界的に標準株として使用される QM9414 株、さらにセルラーゼ高生産変異株である PC-3-7 株が作成された。*T. reesei* は液体培養で分泌されるタンパク質の解析は行われているが、自然条件に近い固体培養においては未だ不明である。そこで QM6a 株、QM9414 株と PC-3-7 株の固体培養におけるセルラーゼ活性の比較を行い、固体培養における株間の挙動の解析を行った。

固体培養の培地として吸水させた小麦フスマを用い、湿度飽和条件下で固体培養を行った。培養後の分泌タンパク質を緩衝液で抽出し、セルラーゼ活性を測定したところ PC-3-7 株が最も高い結果となった。PC-3-7 株のセルラーゼ生産性は液体培養だけでなく固体培養においても優れていることが明らかとなった。PC-3-7 株が液体と固体で分泌する既知糖質加水分解酵素遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で比較したところ、セロビオヒドロラーゼの発現比率が低下する一方、エンドグルカナーゼやキシラナーゼの比率が増加することが分かった。このため、固体培養に特異的なタンパク質の発現が期待され、二次元ゲル電気泳動を使って液体培養と固体培養で分泌されるタンパク質の比較を行った結果、液体培養では認められないタンパク質スポットが固体培養において多数認められた。現在、固体培養特異的なスポットを MALDI TOF-MS を用い同定を試みている。

Proteome analysis of *Trichoderma reesei* grown under solid-state fermentation.

Hirohisa Sekiguchi, Yuji Saito, Shin Sato, Hirofumi Okada, Wataru Ogasawara, Yasushi Morikawa
(Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.)

O-22

カーボンカタボライト抑制解除環境下における担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* の *cel7* 遺伝子群の発現挙動に関する定量的解析

鈴木一史, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* は、高い相同性を持つ少なくとも 6 個の Glycoside hydrolase family 7 に属するセロビオヒドロラーゼ遺伝子(*cel7A-F*)をゲノム中に保有しており、その発現はグルコース存在下において強いカタボライト抑制を受けることが知られている。発表者らは、*cel7D* に関してこの抑制の解除が発現量の増加に重要な役割を持つことを明らかにしてきた。本研究では、この抑制の解除が他の *cel7* 遺伝子の発現量に与える影響について、リアルタイム RT-PCR による定量的な解析を行った。

グルコースを炭素源として 3 日間前培養した *P. chrysosporium* の菌体を炭素源を含まない培地で 6 時間培養した後、異なる濃度のグルコースを含む培地に移してさらに 6 時間の本培養を行った。本培養中 1 時間ごとに菌体を回収し、得られた菌体を mRNA 抽出、cDNA 合成および定量 RT-PCR 解析に供した。また、各 *cel7* 遺伝子の 3' 非翻訳領域の配列を用いてそれぞれに特異的な増幅が可能なプライマー対を設計した。

結果、本培養中にグルコースが完全に消費された時に転写産物量の指数関数的な増加が見られるのは *cel7D* のみであったが、*cel7C* においても本培養 6 時間後に発現量の増加が見られ、転写産物量はグルコースを 50 μ M 添加した培養系よりも添加しない場合の方が多くなることが明らかとなった。一方、*cel7A*, *cel7B*, *cel7E*, *cel7F* に関しては本培養中に発現量の顕著な変化はみられなかった。このことから、各 *cel7* 遺伝子間にはグルコースによる発現抑制の解除に対する応答に明確な挙動の差があり、抑制解除環境下においてそれぞれ異なる発現制御を受けていることが示唆された。

Quantitative analysis of carbon catabolite derepression of *cel7* genes expressed in the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.

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

O-23

シイタケ子実体における多糖類分解酵素

坂本裕一, 中出啓子, 佐藤利次 (岩手生工研)

レンチナン (β -1, 3-1, 6-グルカン:シイタケ子実体細胞壁構成成分) は、シイタケから抽出/生産されている抗悪性腫瘍剤である。レンチナンは、収穫後にグルカナーゼ活性が上昇することで、急速に分解されてしまう。収穫後のシイタケより β -1, 3-グルカナーゼを精製したところ、Glycoside hydrolase (GH)5 ファミリー (EXG1)、及びGH55 ファミリー(EXG2)に属する2種の *exo*-グルカナーゼが精製された。また、植物の抗菌タンパク質 (PR5) と相同性の高い *endo*-グルカナーゼ (TLG1) が精製された。EXG2 と TLG1 は収穫後に発現量が上昇し、レンチナン分解活性を持つことから、収穫後のレンチナン分解に関わることが示唆された。また、PCR-subtraction 法により、収穫後に発現量の上昇する細胞壁分解関連酵素遺伝子群の解析を行った。その結果、GH16 ファミリー (*mlg1*)、及びGH30 ファミリー(*ghf30*)に属するグルカナーゼ遺伝子が単離された。またキチン分解関連酵素の解析を行ったところ、キチナーゼ遺伝子(*chi1*, *chi2*, *chi3*)、キチンデアセチラーゼ遺伝子(*chd1*)、キトサナーゼ遺伝子(*cho1*)が単離された。これらの遺伝子は保存過程で発現量が上昇することがリアルタイム PCR 法により確認されたことから、収穫後の細胞壁分解に関わることが予想される。

Glycoside hydrolase family enzymes in the *Lentinula edodes* fruiting body

Yuichi Sakamoto, Keiko Nakade, Toshitsugu Sato

(Iwate Biotech. Res. Center)

P-1

***Aspergillus oryzae* RIB40 由来 glutamate decarboxylase の遺伝子工学的的手法による発現**

生田聡, 専弘明, 袴田佳宏, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)

Aspergillus oryzae RIB40 では 8 種類の glutamate decarboxylase (GAD) を生産することが知られており、この内 4 種の GAD 遺伝子のクローニングを行った。GAD(AO090010000341)の性質を調べるために組換えタンパク質としての発現を試みた。クローニングによって得られたキメラプラスミド (pGad341) を用いて、*A.oryzae* *niaD* 400 を形質転換した。その結果、得られた形質転換体のゲノムを調製し、PCR により、目的の GAD 遺伝子がゲノム中に組み込まれていることを確認したが、GAD 活性が向上した株は得られなかった。そこで 2 つの方法による組換え GAD の発現を試みた。1 つ目の方法では *A.oryzae* RIB40 の mRNA を調製し、cDNA を作製した後、目的の遺伝子断片を pCold I に導入し、このキメラプラスミドにより *E.coli* JM109 を形質転換して組換え GAD タンパク質の発現を試みた。2 つ目の方法では、*glaA* 遺伝子の下流に GAD 遺伝子を連結し、複合タンパク質として発現することを試みた。

Expression of glutamate decarboxylase from *Aspergillus oryzae* RIB40 by genetic engineering technique

Satoru Ikuta, Hiroaki Sen, Yoshihiro Hakamada, Shinichi Ohashi

(Genome Biotechnology Lab., KIT)

P-2

アクリルアミドの微生物分解 (1) 麹菌 *A. oryzae* によるアクリルアミド分解

若泉賢功, 山元宏貴, 藤本直子, 尾関健二 (金沢工大・ゲノム研)

麹菌 *Aspergillus oryzae* がアクリルアミド (AA) を分解可能であれば、加熱加工食品中の AA 低減に利用し得る可能性がある。そこで、本研究では、Czapek-Dox 最小培地 (CD 培地) の炭素源及び/又は窒素源として AA を添加した培地で、麹菌 *A.oryzae* を培養し、AA 分解能を検証した。その結果、*A.oryzae* RIB40 分生子は窒素源を含まない培地で生育を示したことから、AA 分解能を有していると考えられた。次に、PDB 培地で前培養した *A.oryzae* RIB40 (菌糸体) を、AA を含む CD 培地で培養した結果、培地中の AA 濃度の低下がみられた。また、*A.oryzae* RIB128、*A.oryzae* RIB315、*A.oryzae* 白峯、*A.oryzae* BF1 でも AA 濃度の低下がみられ、*A.oryzae* 白峯が AA 濃度を最も低下させた。一方、*A.oryzae* 白峯分生子を、炭素源及び/又は窒素源として AA を添加した CD 培地で培養した結果、培地中の AA 濃度低下と生育がみられた。*A.oryzae* RIB40、*A.oryzae* RIB128、*A.oryzae* RIB315 でも同様の結果であった。以上の結果によって、麹菌 *A.oryzae* は AA 分解能を有することが示された。

Acrylamide biodegradation.(1) Degradation of acrylamide by *Aspergillus oryzae*.

Masanori Wakaizumi, Hiroataka Yamamoto, Naoko Fujimoto, Kenji Ozeki (K.I.T.)

P-3

アクリルアミドの微生物分解（2） 麹菌及び糸状菌のアクリルアミド分解能

藤本直子, 若泉賢功, 山元宏貴, 尾関健二 (金沢工大・ゲノム研)

微生物の一部がアクリルアミド (AA) 分解能を有することは知られているが、麹菌や糸状菌等のAA分解能に関する報告は極めて少ない。そこで、本研究では、麹菌及び糸状菌実用株を対象に、AA分解能を測定し、AA高分解株の探索を行った。*A.oryzae*18株及び糸状菌9株の分生子を、AA0.02% (w/v) 添加したCzapek-Dox最小培地 (窒素源0%に改変) に接種し、30°C、120rpm、64時間振とう培養した。また、*A.oryzae* 18株はPDB培地で前培養して菌糸体を得、AA0.02% (w/v) 添加Czapek-Dox培地 (炭素源0.01%に改変) に植え継ぎ、同条件で振とう培養した。培養後、培地中のAA濃度を測定した。その結果、*A.oryzae* 18株及び糸状菌9株の分生子にはAA分解能を示す複数の菌株が存在した。また、*A.oryzae*菌糸体もAA分解能を示し、高分解を示す株は分生子の結果と共通性がみられた。

Acrylamide biodegradation.(2) Comparison of acrylamide degradation between *Aspergillus* sp. and filamentous fungus.

Naoko Fujimoto, Masanori Wakaizumi, Hiroataka Yamamoto, Kenji Ozeki (K.I.T.)

P-4

アクリルアミドの微生物分解（3） 麹菌 *A.oryzae* のアクリルアミド分解に及ぼす炭素源枯渇の影響

山元宏貴, 藤本直子, 若泉賢功, 尾関健二 (金沢工大・ゲノム研)

先行研究で麹菌 *Aspergillus oryzae* がアクリルアミド (AA) 分解能を有することが確認され、炭素源を枯渇させた時にその分解量が顕著に上昇することが判明した。本研究は同条件において分解量が上昇するメカニズムを明らかにすることを目的として行なった。PDB培地で培養した *A.oryzae* RIB40株の菌糸体を、炭素源を除きAAを添加したCzapek-Dox最小培地に植え継ぎ、経時的に培地を回収し、AA濃度を測定した。その結果、AA分解量は加速度的に増加し、炭素源を枯渇させることによりAA分解能が誘導されることが示唆された。また、分解活性の誘導にはAAの存在が必須であり、濃度依存性が確認された。これらの結果を基に、炭素源枯渇時のAA分解活性の誘導メカニズムについて考察する。

Acrylamide biodegradation.(3) Effect of carbon source starvation on acrylamide degradation in *Aspergillus oryzae*.

Hiroataka Yamamoto, Naoko Fujimoto, Masanori Wakaizumi, Kenji Ozeki (K.I.T.)

P-5

プラスチックに使用される可塑剤の酵素および微生物分解

浅沼智美、水野克美、大澤 敏 (金沢工大・ゲノム研)

【目的】汎用プラスチックや生分解性プラスチックなど、プラスチック中には、成形性を向上させるために、可塑剤などの様々な添加剤が用いられている。このようなプラスチックを埋立廃棄した場合、あるいは農業用資材として使用した場合には、製品の劣化に伴い可塑剤が溶出して土壌中に蓄積して、環境に悪影響を与える可能性がある。こうした問題を、バイオレメディエーションによって解決するためには、まず可塑剤の分解に有効かつ安全な酵素や微生物を見出す必要がある。そこで、本報では、安全性の高い酵素と微生物を選択し、それらの可塑剤や、その分解生成物に対する分解能を調べた。

【方法・結果】実験には、代表的な可塑剤であるアジピン酸ジオクチル(DOA)、アジピン酸ジイソノニル(DINA)、フタル酸ジオクチル(DOP)を用いた。これらの可塑剤はエステル結合を有するため、分解に使用した酵素として、油脂のエステル結合に対して高い分解活性を有する *Aspergillus niger* 由来の Lipase A を選択した。一方、微生物としては、安全性が高い *Aspergillus oryzae* を選択した。分解試験の結果、DOA と DINA は Lipase A によってエステル結合が加水分解されることが認められた。また、*A.oryzae* によってアジピン酸とアルコールに分解されその後、資化されることが明らかになった。しかし、DOP は Lipase A によっても、*A.oryzae* によっても分解されなかった。

Enzymatic and microbial degradations of additives used in plastics

Tomomi ASANUMA, Katsumi MIZUNO, Satoshi OSAWA

(Genome Biotechnology Laboratory, Kanazawa Institute of Technology)

P-6

液-液界面バイオリアクターを用いた beta-caryophyllene の位置選択的エポキシ化反応

小田 忍、大箸信一 (金沢工大ゲノム研)

【目的】液体培地と疎水性有機溶媒との界面に増殖する糸状菌を用いて有機溶媒中の基質を微生物変換する標題システムは、基質と産物の毒性を著しく回避しつつ高濃度の疎水性産物を与えることができる。本研究においては、抗カビ性セスキテルペンである beta-caryophyllene の環内オレフィンを選択的にエポキシ化し得る微生物を探索し、それをを用いた標題システムによる反応条件の最適化を図ることを目的とした。

【方法・結果】寒天平板と低比重シリコンオイル (KF-96L-1CS) との固-液界面反応によるスクリーニングの結果、caryophyllene の環内オレフィンのみを選択的にエポキシ化し得る株として担子菌 *Nemania aenea* SF 10099-1 株をヒットした。表題システムにおいて、本株は CaCO₃ 被覆マイクロスフェア(MFL-80GCA)を用いた場合に高い変換活性を示し、また、最適な炭素源と窒素源は D-キシロースとトリプトンであった。この抗カビ性基質は有機層中 20% も添加可能であり、その際に得られる産物の濃度は 30 g/L 以上に達した。

Regioselective Epoxidation of beta-Caryophyllene in a Liquid-Liquid Interface Bioreactor

Shinobu Oda, Shinichi Ohashi

(Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

P-7

液面固定化 (LSI) システムでの *Rhizopus* 属のエタノール生産

和田真人、加治木佑紀子、篠島里江、中田葵、橋谷航、小田忍、尾関健二、大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)

【目的】 *Rhizopus* 属糸状菌はアミロ法として研究されており、エタノールの生産と共に、デンプン質系、セルロース系、ヘミセルロース系の分解が可能である。*Rhizopus* 属のエタノール生産を高めることによりバイオエタノール生産が 1 つの微生物で可能となり、省力化の面で非常に有利である。最近開発されたポリアクリロニトリルを主成分とするマイクロスフェアの液面浮上性を利用して、糸状菌の胞子を同時に懸濁し、数日間の液体静置培養を行うことにより強固な複合マットを形成し、液面固定化 (LSI) システムとして菌蓋培養が可能となる。今回エタノール生産が報告されている *Rhizopus* 属を用いて、嫌氣的培養法である LSI 培養でエタノールの生産条件を検討した。

【方法および結果】 *Rhizopus* 属数種類をマイクロスフェアの量、初発の胞子数、培地の種類および pH、攪拌条件、培養温度、培養日数などの条件を種々変更してエタノールの生産量を測定した。*Rhizopus* 属の最適条件では数%のエタノールを生産することが分かった。現在培養条件を更に変更し、最適なエタノール生産条件を検討している。また変異処理でのエタノールの生産性についても報告する。

Ethanol production of *Rhizopus* sp. by the liquid-surface immobilization (LSI) system.

Masato Wada, Yukio Kajiki, Rie Shinojima, Aoi Nakada, Wataru Hashitani, Sinobu Oda, Kenji Ozeki, Shinichi Ohashi (KIT)

P-8

麹菌による生分解性プラスチックの分解とそのモノマー成分の資化過程

森口祥成、水野克美、大澤 敏、大箸信一 (金沢工大院・ゲノム研)

本研究では、安全性が高く、有用酵素高生産能を有する麹菌(*Aspergillus oryzae*)を生分解性プラスチックの分解に応用することを目的として、培養条件の違いによる分解性、分解時の構造解析変化、モノマー成分の資化過程といった分解挙動について調査した。生分解性プラスチックには PCL と PBSA の 2 種類を使用した。分解試験は YPD, PD の 2 種類の液体培地を用いて、液面に試料を浮かせた場合と、液中に試料を浸漬させた場合での、経時的な分解挙動を SEM および X 線解析により調査した。また、同時に SDS-PAGE, TOF-MS にて PCL, PBSA 分解酵素の同定を試みた。さらに、エステル分解後のモノマー成分の資化過程を HPLC により定量評価した結果、PCL のモノマー成分である 6-ヒドロキシカプロン酸は、1 ヶ月程度で完全に資化されることがわかり、PBSA のモノマー成分は、コハク酸 > アジピン酸 > 1,4-ブタンジオールの順で資化されることがわかった。

Degradation behavior of biodegradable polymers and assimilating process of the monomer components by *Aspergillus oryzae*

Yoshiaki Moriguchi, Katsumi Mizuno, Satoshi Osawa, Shinichi Ohashi (Genome Biotechnology Laboratory, Kanazawa Institute of Technology)

P-9

麴菌を複合化した有害物質浄化用生分解性高分子材料の開発

間井幸弘, 成田武文, 大澤敏 (金沢工大・ゲノム研)

近年、バイオレメディエーション技術に関する研究が行われているが、環境中で直接この方法を用いる場合には、安全性の高い微生物を生分解性高分子に固定化させた材料が必要とされている。本研究では、食品分野で使用されている麴菌を生分解性高分子基板上に固定化させることにより、有害物質を分解し、使用後はそのまま環境中で分解される環境浄化用基盤材料作製の構築を目的とした。

本報告では、ホルムアルデヒド等を有害物質とし、微生物固定化生分解性高分子を用いた分解試験について述べる。生分解性高分子には柔軟で微生物(酵素)分解型であるポリブチレンサクシネートアジペート(PBSA)を用いた。微生物には安全でかつPBSA分解能を有する麴菌(*Aspergillus oryzae*)を用いた。また、真菌のPBSAへの吸着がマイクロ構造に強く依存することから、20 μ mの微細メッシュを転写した高分子基盤を作製し、これに麴菌を吸着させてホルムアルデヒドの分解を試みた。ホルムアルデヒド500ppm溶液に麴菌の胞子を懸濁させた場合と麴菌吸着基盤を浸漬させた場合でその分解性を比較した。ホルムアルデヒドの定量はHPLCを用いて評価した。麴菌の胞子を懸濁した場合は、0ppmまで分解されるまでに8週間を要した。一方、麴菌吸着基盤を用いた場合は、3週間で0ppmになった。このように、麴菌を吸着させて固定化した生分解性高分子基盤はホルムアルデヒドの分解速度を速めることが明らかとなった。

Development of *A.oryzae* /biodegradable polymer composite for bioremediation.

Yukihiro Mai, Takehumi Narita, Satoshi Osawa,

(Genome Biotechnology Laboratory, Kanazawa Institute of Technology)

P-10

麴菌高発現ベクターpNEN142の小型化

国保友裕, 青砥大輔, 尾関健二, 袴田佳宏, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)

Aspergillus oryzae における汎用性プラスミドベクターを構築するため、既存の麴菌用発現ベクターpNEN142(大関酒造)を元に小型化、プロモーター領域とターミネーター領域、およびマルチクロニングサイトの改良を行っている。今回はpNEN142の小型化を行った。

pNEN142は*niaD*下流に γ -tubrincomplex様タンパク質(約0.73kb)とNADH-cytochromb-5-reductase(約0.84kb)の領域を持っている。これら領域が、*A.oryzae*への形質転換に必要なものであるかを調べるため、 γ -tubrincomplex様タンパク質の遺伝子領域及び、その遺伝子領域を含めたNADH-cytochromb-5-reductaseの遺伝子領域を削除するために、*Xho* Iを付加したプライマーを用いてインバースPCRを行い、pNEN870(8.70kb)とpNEN758(7.58kb)の小型化プラスミドを構築した。更にこれら小型化プラスミド上に存在する*E.coli*由来の β -galactosidaseの領域を削除した小型化プラスミドpNEN800(8.00kb)とpNEN688(6.88kb)の作製を行い、計4種類の小型化プラスミドを構築した。[pNEN870(8.70kb), pNEN758(7.58kb), pNEN800(8.00kb), pNEN688(6.88kb)]

これら4種のプラスミドベクターを用いて*A.oryzae niaD* 400を形質転換した結果、いずれも形質転換体を得ることができた。以上の結果から、削除した領域は、*A.oryzae*の形質転換において必須の領域ではないと考えられた。

Construction of a truncated high-expression vector for *Aspergillus oryzae*

Tomohiro Kokubo, Daisuke Aoto, Kenji Ozeki, Yoshihiro Hakamada, Shinichi Ohashi

(Genome Biotechnology Lab., KIT)

P-11

麴菌処理したキトサン基板上における皮膚細胞の増殖効果

高山 登、成田武文、大澤 敏 (金沢工大,ゲノム研)

天然由来の高分子であるキトサンは、抗菌性および生体適合性を有するため、創傷被覆材としており、皮膚組織再生用基板としても有用であると考えられる。そこで、皮膚組織が速やかに再生されるキトサン系基板の作製を試みた。

昨年までの研究で、麴菌を液体培地で培養し、生産酵素をプロテオーム解析した結果、キチナーゼを発現していることから、麴菌によるキトサンフィルムの表面処理に着目した。本研究では、麴菌培養液で処理したキトサンフィルム上における皮膚繊維芽細胞および角化細胞の吸着・伸展性を定量により評価した。その結果、麴菌処理したキトサンシートの方が未処理のキトサンシートに比べ、繊維芽細胞で約 3 倍、角化細胞で約 1.5 倍の生細胞数が認められた。これより、麴菌処理したキトサンフィルムは、速やかな皮膚細胞の吸着・伸展させる基板であることが明らかとなった。麴菌処理前後のキトサンフィルムを、FT-IR スペクトルと X 線回折を用いて分析した結果、FT-IR では、キチン由来の官能基であるアセチルアミド基のピークが若干減少していた。また、X 線回折では、結晶構造の変化が認められた。これより、麴菌処理することで起こったキトサンフィルムの化学構造および結晶構造の変化が皮膚細胞の吸着・伸展性の向上に寄与したことが示唆された。

Effect of *A.oryzae* treatment of chitosan film on the adsorption and growth of skin cells

Noboru Takayama, Takehumi Narita, Satoshi Osawa

(Kanazawa Institute of Technology, Genome Biotechnology Laboratory)

P-12

バイオマス分解酵素の生産を目指した麴菌プロモーターの改良

久田博元、波部悦子、石田博樹、秦洋二、近藤昭彦¹ (月桂冠・総研、¹神戸大工・応化)

【目的】石油の将来的な枯渇や価格高騰において、石油由来化成品原料の代替品製造が求められている。更に昨今の穀物高騰の観点からも、非食用のバイオマスを酵素分解して、乳酸やコハク酸などの原料となるグルコースを供給することが望ましい。我々は、稲わら、バガス及びコーンストーバーなどのリグニン含量が低いソフトバイオマスを、麴菌で発現させた糖質分解酵素で糖化するために、麴菌の物質生産ツールであるプロモーターの高発現化を試みた。

【方法と結果】麴菌の高発現プロモーター4種類(peptidyl *cis-trans* isomerase 遺伝子、small V-ATPase 遺伝子、histone H2A 遺伝子及び cruciform binding protein 遺伝子) の下流に、レポーターである *uidA* 遺伝子を連結させた。それぞれのプロモーター領域を約 200bp 単位で欠失させるデリーション解析を行い、レポーター活性を指標に転写活性に重要な領域を決定した。決定した約 100-300bp 領域の転写活性促進効果を評価するために、これらの配列を麴菌 *amyB*、*glaA* 及び *sodM* プロモーター中に挿入し、得られた融合プロモーターの活性をレポーターにより評価した。元のプロモーターと比較して約 2 倍近く転写活性が向上し、プロモーターを改良することが出来た。

【謝辞】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の一環として行なわれたものである。

Improvement of *Aspergillus oryzae* promoters for production of biomass degrading enzymes

Hiro moto Hisada, Etsuko Habe, Hiroki Ishida, Yoji Hata, Akihiko Kondo¹

(Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., ¹Dept. Chem Sci. Eng., Kobe Univ.)

P-13

Aspergillus aculeatus ku80 遺伝子破壊株におけるマーカーリサイクリング技術を用いた二重栄養要求性株 (*pyrG*⁻, *argB*⁻) の作製

辻篤史, 國武絵美, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院生命・応生科)

【目的】 *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。この発現制御に関わる遺伝子の機能解析等、本菌株の遺伝子操作を行うためには多重栄養要求性宿主を取得することが不可欠である。本研究では、まず以前に取得した高頻度相同組換え宿主 *ku80* 遺伝子破壊株 (*ΔAaku80*) の標的遺伝子破壊効率を解析した。さらに *ΔAaku80* を宿主として、前回の同会で報告したマーカーリサイクリング技術を用いた *pyrG*, *argB* 二重欠損株の作製を試みたので報告する。

【方法・結果】 *A. nidulans pyrG* マーカー (*pyrG*) の両端に ornithine carbamoyltransferase 遺伝子 (*argB*) の 5' と 3' の隣接領域約 1 kb を持つ *argB* 破壊カセットを用いて *A. aculeatus pyrG*⁻ 株と *ΔAaku80 (pyrG*⁻) を形質転換した。形質転換体を解析した結果、*Aaku80* の破壊によって標的遺伝子破壊効率は 3% から 94% と飛躍的に向上したことが明らかとなった。続いて、前回に報告した *pyrG* のリサイクリング技術を利用して、宿主 *Aaku80* 破壊株 (*pyrG*⁻) からの *pyrG*, *argB* 二重栄養要求性株の作製を目指した。まず *pyrG* の両端に *argB* の 5' と 3' の相同配列 1-1.5 kb および *argB* 座位導入後 *pyrG* が分子内相同組換えにより切除されるようなダイレクトリピート(DR) を含む破壊カセットを PCR によって作製した。この際、*pyrG* マーカーの切除に最低限必要な DR の長さを調べるために、20bp, 98bp, 495bp の長さの DR を持つカセットをそれぞれ作製した。現在はこれらの破壊カセットを用いて *ΔAaku80* の形質転換を行っており、*argB* 破壊株を取得でき次第、5-fluoroorotic acid (5-FOA) 含有培地上で *pyrG* マーカーの切除を試みる。

Construction of the *pyrG* & *argB* double mutant using marker recycling technique in the *ΔAaku80*.

Atsushi Tsuji, Emi Kunitake, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, and Takashi Kawaguchi.

(Grad. Sch. of Life & Env. Sci., Osaka Pref. Univ.)

P-14

Aspergillus aculeatus における網羅的遺伝子破壊株の作出を目的としたアグロバクテリウム形質転換法の開発

國武絵美, 谷 修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生命・応生科)

【目的】 T-DNA を宿主染色体内にランダムに挿入する性質を利用したアグロバクテリウム形質転換法 (AtMT) は網羅的に遺伝子破壊株を作出できるだけでなく、T-DNA 配列を基に破壊箇所を特定することができる。*Aspergillus aculeatus* No. F-50 株は多種の(ヘミ)セルラーゼを生産するが、それら遺伝子発現制御機構は未解明な部分が多く存在する。そこで、*A. aculeatus* の新奇セルラーゼ遺伝子発現制御因子の同定を目的として、AtMT の確立を行った。【方法と結果】 形質転換には T-DNA 領域内にハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hph*) を持つバイナリーベクター pBIG2RHPH2¹⁾ を用いた。高効率な形質転換条件を決定するために、アグロバクテリウムと *A. aculeatus* 胞子の混合比を検討した。その結果、OD₆₀₀=0.4 のアグロバクテリウムの培養液 100 ml と胞子 10⁴ 個を共培養した際に高い形質転換効率が得られ、T-DNA は *A. aculeatus* のゲノム DNA 上の任意の座位に約 8 割の確率でシングルコピー組み込まれていた。次に、共培養時間を検討した。時間の延長と共に効率の向上が見られたものの、48 時間以上では有意な差はなかった。また、プロトプラストの使用や、1 プレートあたりの共培養量の増加に関わらず得られる形質転換体数に相違は見られなかった。このように決定した最適条件で、10⁴ 個の胞子当たり 4~20 株の形質転換体を得られた。TAIL-PCR (thermal asymmetric interlaced PCR) とシーケンス解析を行った結果、挿入された T-DNA の周辺配列の取得に成功した。

1) Tsuji, G. et. al.: J. Gen. Plant Pathol., **69**, 230-239 (2003)

Development of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for random insertional mutagenesis in *Aspergillus aculeatus*

Emi Kunitake, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi

(Grad. Schl. of Life & Env. Sci., Osaka Pref. Univ.)

P-15

α -アミラーゼ遺伝子発現抑制による麹菌 *A. oryzae* の異種タンパク質高生産宿主の取得

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麹菌 *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、RNAi を用いた α -アミラーゼの発現抑制により、ウシキモシンの生産量が増加することを報告している¹⁾。また *tppA pepE* プロテアーゼ遺伝子 2 重破壊株 NS-tApE²⁾、また NS-tApE 株から得られた高分泌変異株 AUT³⁾を異種タンパク質生産の宿主として取得している。そこで今回は、NS-tApE 株、AUT 株において α -アミラーゼの発現抑制を行い異種タンパク質高生産宿主の取得を試みた。

【方法と結果】 α -アミラーゼ遺伝子の第 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 *niaD* マーカーにより NS-tApE 株に形質転換した。取得した株を液体培地で培養後、培地上清について α -アミラーゼ活性測定を行い、親株よりも α -アミラーゼが減少していることを確認した。さらに AUT 株に対しても同様に α -アミラーゼ発現抑制のためのプラスミドを形質転換し、異種タンパク質の高生産を目的とした宿主を取得した。

1) 根本ら、2008 年度農芸化学学会大会講演要旨集、p.118、2) 根本ら、2006 年度生物工学会大会講演要旨集、p.131、3)根本ら、2007 年度農芸化学学会大会講演要旨集、p.179

Breeding of *A. oryzae* hosts for higher-level production of heterologous protein by suppression of α -amylase

Takashi Nemoto, Jun-ichi Maruyama, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto

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

P-16

Rhizopus 属菌株の分子系統による再分類

阿部 歩, 浅野行蔵, 曾根輝雄 (北大院農・応用菌学)

糸状菌の多くで依然として形態学的特徴による分類が行われている。一方で塩基配列情報を知ることが簡単になった今日では、多くの遺伝子が解析されデータベース化が進んでいる。我々は、ITS, *act-1*, *EF-1 α* 遺伝子の系統解析の結果から、GCPSR(genealogical concordance phylogenetic species recognition)にもとづき *Rhizopus oryzae* が 2 種に再分類されることを示した¹⁾。また、*Rhizopus* 属に分類されている菌株において、rDNA 遺伝子の配列から 3 グループに分けられることを報告した²⁾。

今回、以前解析を行っていなかった *R. niveus* と *R. microsporus* var. *tuberosus* についても加え、*Rhizopus* 属全体での *act-1*, *EF-1 α* , rDNA の塩基配列に基づく分子系統分類を行った。その結果、rDNA による解析で認められた 3 つのクラスターが再度出現した。さらにグループ内での GCPSR により、現在 *R. microsporus* の variety (変種) として登録されている菌株間ではほとんど遺伝的差異が認められず、同種として分類すべきと考えられた。一方で *stolonifer* グループとされている *R. stolonifer* var. *lyococcos* は他の *stolonifer* グループの菌とは異なり、variety ではなく別種として再分類するのが適当であると考えられた。

1) Abe et al. *Mycologia* **99**, 714-722 (2007).

2) Abe et al. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **70**, 2387-2393 (2006).

Reclassification of Genus *Rhizopus* by molecular phylogeny

Ayumi Abe, Kozo Asano, Teruo Sone

(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

P-17

adenylyl cyclase 突然変異を抑圧する突然変異体

清水 聡, 村山肇子 (関東学院大・工学研究科)

cAMP(サイクリックAMP)は adenylyl cyclase により ATP から合成される様々な生物の信号伝達系において重要な細胞内仲介物質として知られている。アカパンカビなどの糸状菌類では cAMP を介在する信号伝達系が動植物への感染や菌糸成長に関与されていると考えられている。アカパンカビの cAMP 合成酵素である adenylyl cyclase 遺伝子の突然変異体 *cr-1* は形態に異常を持ち菌糸成長が著しく遅い。この *cr-1* 株を長期間培養したところ、成長と形態異常を回復させる突然変異が起こった。このうちの1株を back cross したところ、*cr-1* 突然変異は依然として存在し、新たに *cr-1* 突然変異を抑圧する第2の突然変異(*br*)が引き起こされることが分かった。この抑圧突然変異遺伝子 *br* について形態、連鎖群、温度感受性、cAMP の影響を調べたのでこれらについて報告する。

A suppressor mutant which suppresses an adenylyl cyclase mutation

Satoshi shimizu, Tadako murayama

Univ.of Kanto Gakuin

P-18

アカパンカビ cAMP 信号伝達系に関与する新規遺伝子

米村晃子, 村山肇子 (関東学院大・工学研究科)

糸状菌 *Neurospora crassa* において、細胞の分化および増殖を制御するシグナル伝達系に関与する遺伝子の突然変異体は様々な形態を示す形態的突然変異体であることが知られている。野生型は slant 上では菌糸体形成の後、菌糸体上に気中菌糸を形成し、その先端に無性孢子である分生子を形成する。一方、adenylyl cyclase 遺伝子の突然変異により cAMP level が低下している *cr-1* 株は、slant 上では菌糸体上に直接多数の分生子を形成し気中菌糸を形成しない。この *cr-1* 株を長期培養したところ気中菌糸成長が回復した菌株が得られた。このうちの1株には、*cr-1* 突然変異は依然として存在し、新たに *cr-1* 突然変異を抑圧する第2の突然変異 (*wh*) が引き起こされていることが分かった。*wh* 株は分生子をまったく形成せず、double mutant *wh cr-1* 株も *cr-1* 突然変異の影響を受けず、分生子を形成せず *wh* 株とほとんど区別がつかなかった。炭素源として quinic acid のみが存在する培地では野生型は成長するのに対し *wh* と *wh cr-1* は全く成長しなかった。quinic acid の利用に必要な *qa-2* 遺伝子は glucose effect を受けること、*cr-1* で *qa-2* の発現が異常に高まっている事が報告されており、glucose effect は cAMP 濃度を高めることにより起こると考えられることから、*wh* 突然変異は cAMP cascade に関係した遺伝子の突然変異であり、glucose の存在しない培地でも glucose effect を受けた状態、即ち cAMP 濃度が高い状態になっていることを示唆している。このような状態を引き起こす *wh* 遺伝子の cloning を進めている。

A novel gene which is concerned with the cAMP signal Transduction pathway of *Neurospora crassa*

Akiko Yonemura, Tadako Murayama

(Grad.Sch.of Engineering.,Kanto Gakuin Univ.)

P-19

アカパンカビにおける抗カビ物質感受性に関与する遺伝子のクローニング

川島一剛, 村山肇子 (関東学院大・工学研究科)

本研究室では 120°C で 20 分間の熱処理に対しても高い安定性を示す抗カビ物質を分泌するバクテリア HK-c を分離した。この抗カビ物質には少なくとも 3 種類が含まれており、生物農薬としてすでに知られている Iturin グループの環状ペプチドに属するであろうと考えられた。Iturin グループの環状ペプチドは何種類か報告されているが、その作用機作についての報告は全く無い。我々はこの抗カビ物質がどのような仕組みで抗カビ活性を示すのかを調べる事にした。この抗カビ物質は糸状菌の何らかの遺伝子または遺伝子産物に作用し、成長阻害を引き起こすと考え、抗カビ物質による成長阻害を受ける遺伝子についての知見を得る為、モデル糸状菌であるアカパンカビで、この抗カビ物質に抵抗性を示す突然変異体 10 株を分離し、その中でも抵抗性の高い YS-5 遺伝子について遺伝解析を行なった。その結果、YS-5 遺伝子は第 6 染色体の左腕、ylo-1 から末端方向に 7% の部位にある遺伝子であると推察された。ylo-1 から末端方向 7% 周辺の DNA 断片を PCR 法で増幅し、形質転換により、YS-5 遺伝子の存在を確認しすることによるクローニングを目指している。

Cloning of the gene related to anti-fungal antibiotic sensitivity in *Neurospora crassa*

Kunitaka Kawashima, Tadako Murayama

(Univ. of Kanto Gakuin)

P-20

アカパンカビにおけるヒゲカビ chitin deacetylase 遺伝子の発現

長島敏幸, 村山肇子 (関東学院大・工学研究科)

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

現在キトサンの工業的生産には、キチンを高濃度のアルカリ処理によって脱アセチル化する方法が用いられているが、そのときに生じる高濃度アルカリ廃液は環境破壊の原因となっている。そのため、高濃度アルカリ処理法に代わる方法としてキチンを脱アセチル化してキトサンを生成する酵素キチンデアセチラーゼに着目した。ヒゲカビはキチンデアセチラーゼを持つ菌類の一つであるが、ヒゲカビを大量に培養しても得られる酵素はわずかである。本研究室ではキチンデアセチラーゼの活性には糖鎖修飾が必要であることが確認され、糖鎖修飾のためには糸状菌などの真核生物での発現が必要であろうと考えられた。

そこで、本研究では遺伝学的情報が豊富であり大量培養が可能なアカパンカビにヒゲカビのキチンデアセチラーゼ遺伝子(*PbCD*)を導入し、キチンデアセチラーゼを大量に発現・分泌させることを目的とし、セレクションマーカーとして *QA-2*、アカパンカビの標準的な炭素源であるスクロースで誘導をかけ培地に分泌させるために invertase のプロモーターとシグナル配列を含む N 末端領域と PolyA 領域の間に *PbCD* の ORF をはさみ pUC118vector に連結し、組換えプラスミドを作製し、*QA-2* 突然変異体の形質転換を行った。PCR によって形質転換体に *PbCD* が導入されたことを確認した。現在、形質転換体の酵素活性を調べている。

Expression of chitin deacetylase gene from *Phycomyces blakesleeanus* in *Neurospora crassa*

Toshiyuki Nagashima, Tadako Murayama

(Grad.Sch.of Engineering.,Kanto Gakuin Univ.)

P-21

培養環境に応答する麹菌 *A.oryzae* のクロマチンリモデリング関連遺伝子破壊株の解析

西浦未華^{1,2}, 坂本和俊², 岩下和裕^{1,2}, 山田修², 三上重明² (1 広島大, 2 酒総研)

麹菌は、周囲の環境条件に合わせて遺伝子の発現パターンを変化させ環境条件に適応していることが明らかとなってきた。これまでの研究で、我々は浸透圧に対する麹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した時点での遺伝子発現について、液体培養とメンブレプレート培養を行い、麹菌 DNACHIP により検討を行っている。その結果、液体培養時の応答遺伝子に加え、メンブレプレート培養では、さらに多くの遺伝子が応答するということを報告している。

本研究においては、この遺伝子発現応答の違いを制御するメカニズムについて明らかにすることを目的に、まず、麹菌 DNACHIP 解析の結果、浸透圧や培養形態により発現が変動し、かつ遺伝子発現制御に関連する可能性のある遺伝子の抽出を行った。これらの遺伝子群には、*sskA* など *Aspergillus* 属ですでにシグナル伝達に関与することが報告されている遺伝子が含まれていた他に、これまでに解析の行われていないクロマチンのリモデリングに関連すると思われる遺伝子群も存在していた。そこで、後者の遺伝子群について破壊株を作成し検討を行った。まず、*adeA* を maker 遺伝子とし、fusion PCR により遺伝子破壊カセットを作成し、NSR- Δ LD2 株(*niaD*⁻, *sC*⁻, *adeA*⁻, *ligD*⁻)に導入し形質転換体を取得した。得られた形質転換体について、PCR および Southern blotting 解析を行い、遺伝子破壊株を選抜した。作成した遺伝子破壊株の中には、分生子形成や気中菌糸形成、生育などの phenotype に異常が見られるものが含まれていた。現在、取得したこれらの破壊株を用いて、浸透圧への適応などの phenotype についてより詳細に解析を行っている。

Analysis of mutants disrupted the chromatin remodeling concerning genes which response to the culture condition in *Aspergillus oryzae*.

Mika Nishiura^{1,2}, Kazutoshi Sakamoto², Osamu Yamada², Kazuhiro Iwashita^{1,2}, Shigeaki Mikami²(1 Hiroshima Univ., 2 NRIB)

P-22

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の米麹での低酸素応答に関する研究

城隆太郎^{1,2}, 濱田涼子², 坂本和俊², 岩下和裕^{1,2}, 山田修², 三上重明² (1 広島大, 2 酒総研)

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は好気的な微生物であり、培養環境中の酸素濃度は麹菌の代謝産物生産に大きな影響を与えると考えられている。実際に、製麹期間中に酸素濃度は 5-20% 程度の範囲で変動する。しかし、これまでに麹菌の生理と酸素濃度の関係について米麹で解析した例はきわめて少ない。そこで本研究では、固体培養環境下で低酸素濃度が麹菌の生理と麹の品質に与える影響について研究を行った。

麹菌 RIB40 株の低酸素ストレスに対する応答について、低酸素濃度条件下と大気条件下で、プレート培養と α 米を用いたシャーレ製麹試験を行い、菌体の生育や生産タンパク質のプロファイル、遺伝子発現の変化について比較検討した。まず、プレート培養では、低酸素条件になるにつれ菌体の生育の違いや分生子形成の遅れなどが見られ、酸素濃度が麹菌の生育、分化に影響を与えることが明らかになった。次に、プレート培養で差が見られた酸素濃度 4% 条件下と大気条件下でシャーレ製麹を行い、米麹中の麹菌の遺伝子発現や生産タンパク質を比較した。その結果、プレート培養で見られた分生子形成の遅れが米麹でも見られると共に、多くの遺伝子の発現や生産タンパク質に変化が見られ、低酸素濃度が米麹での麹菌の遺伝子発現、タンパク質生産や生理、形態形成に影響を及ぼしていることが明らかになった。特に、低酸素濃度で解糖系やエタノール合成などの代謝経路に関わる遺伝子やタンパク質の発現に増加が見られ、低酸素濃度で解糖、エタノール発酵が活性化することが示唆された。また、酸素濃度によって発現の変化した遺伝子について実際の製麹時の遺伝子発現を検証したところ、製麹時の酸素濃度と遺伝子発現に相関がみられ、低酸素濃度は、実際の製麹時の遺伝子発現に影響を及ぼす重要な環境因子であることが示唆された。

Genomic and proteomic analysis of hypoxic adaptation of *Aspergillus oryzae* in rice koji

Ryutaro Jo^{1,2}, Ryoko Hamada², Kazutoshi Sakamoto², Kazuhiro Iwashita^{1,2}, Osamu Yamada², Shigeaki Mikami² (1, Hiroshima Univ., 2, NRIB)

P-23

麴菌 (*Aspergillus oryzae*) におけるアクアポリンの機能解明

田中大介, 松本直, 岩崎郁子, 北川良親 (秋田県大・生物資源科学部)

アクアポリンは、多くの生物種に普遍的に存在し細胞内外の水透過性および物質透過性に関与している膜タンパク質である。近年、*Aspergillus oryzae* RIB40 株のゲノム解析が完了し、コウジカビにもアクアポリン遺伝子が見出された。コウジカビは日本の伝統的な発酵・醸造に利用される有用微生物であり、このアクアポリンの機能解明はコウジカビの機能向上や応用を見据えた有益な知見と考えられる。本研究ではコウジカビを用いてアクアポリン遺伝子の単離、機能解明をおこなった。RIB40 株から 3 種類のアクアポリン遺伝子を単離した。そこで、膜タンパク質の水透過性を評価するため単離した遺伝子 AoAQP1-3 を鋳型に cRNA を作成し *Xenopus* oocyte で swelling assay をおこなった。その結果、この分子種は低い水透過性を示した。以上の結果から、コウジカビアクアポリンは水透過よりも、むしろグリセロール等の浸透圧調節物質輸送に役立っていると推測された。今後、グリセロール透過性について検討する予定である。

Characterization of three aquaporins in *Aspergillus*

Daisuke Tanaka, Tadashi Matsumoto, Ikuko Iwasaki, Yoshichika Kitagawa

(Faculty of Bioresource Sciences, Akita Pref. Univ.)

P-24

ウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*) における孢子欠損性変異検出 STS マーカーの開発

奥田康仁¹・松本晃幸²・村上重幸³ (¹鳥取大院連農・²鳥取大学・³菌蕈研)

食用きのこ栽培において、子実体から放出される大量の孢子は栽培従事者の健康被害や施設の汚染などの原因となる。この有効な解決策のひとつとして 2, 3 のきのこ種では突然変異育種による孢子欠損性変異株が利用されている。しかしながら、突然変異育種は多大な時間と労力を要することから効率的な孢子欠損性変異株の育種法の開発が期待されている。これまでに我々は単一の劣性変異によるウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*) の孢子欠損性変異株 (TMIC-30058) を材料として、AFLP マーカーに基づく遺伝連鎖地図を作製し、孢子欠損性変異領域の座乗部位を推定した。また、Bulked segregant analysis を利用することで孢子欠損性変異領域と同じ位置に座乗する 12 マーカーを含めた近傍 20 マーカーを同定した。本研究ではマーカーアシスト選抜による孢子欠損性変異株の育種に利用できる DNA マーカーの開発を目的に、これまでに得られた近傍マーカーの STS (Sequence Tagged Sites) 化を実施した。

近傍マーカーの増幅断片はクローニングし、配列を決定した。この配列を基に孢子欠損性変異検出のためのプライマーペアを設計し、各プライマーペアによる増幅の有無と遺伝連鎖地図作製に用いた分離世代 150 株の表現型との関係を調査した。さらに孢子欠損性変異株 (TMIC-30058) と任意の野生株 15 菌株における増幅の有無についても解析し、孢子欠損性変異の検出能力を評価した。

マーカー配列を基に設計したプライマーペアのうち、SD192 および SD296 は供試菌株における孢子欠損性変異の検出に有効であった。特に SD192 は供試した全ての菌株の表現型に対応する結果を示した。このことから、これら 2 プライマーペアは孢子欠損性変異株の育種に有用であると考えられる。

Development of STS markers for the selection of sporeless mutants in *Pleurotus pulmonarius*

Yasuhito Okuda¹, Teruyuki Matsumoto², Shigeyuki Murakami³

(¹UGSAS, Tottori Univ., ²Tottori Univ., ³Tottori Mycol. Inst.)

P-25

麹菌 *A. oryzae* の隔壁における分泌タンパク質と細胞膜トランスポーターの動態解析

早川雄悟¹、石川絵理¹、正路淳也^{1,2}、有岡学¹、北本勝ひこ¹ (¹東大院・農生化・応生工、²エジンバラ大・細胞生物学研究所)

【目的】糸状菌において、タンパク質分泌は主に菌糸先端で起こると考えられている。しかし、麹菌 *Aspergillus oryzae* においてアミラーゼ (AmyB) などの分泌タンパク質と EGFP の融合タンパク質が隔壁にも局在することから、隔壁においてもタンパク質分泌が起こる可能性も考えられている。本研究では、分泌タンパク質や細胞膜タンパク質の局在とその動態を解析することにより、*A. oryzae* の隔壁における分泌の有無を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】これまでに我々は、培養条件の違いにより AmyB の隔壁への局在の有無が変化することを見出している。今回、RNase T1 (RntA)、 β -*N*-acetylglucosaminidase (NagA)、細胞膜プリントランスポーター (UapC) と EGFP の融合タンパク質の挙動を観察したところ、これらのタンパク質では培養条件による隔壁への局在の差異は見られなかった。また、FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) 解析によってこれらの融合タンパク質の動態を解析したところ、菌糸先端の蛍光は、退色後 1 分程度で回復したのに対し、隔壁においては蛍光の回復に 20~30 分要することが明らかとなった。このことから、これらのタンパク質の先端と隔壁への輸送は異なる分子機構で行われていることが示唆された。

Dynamics of secreted proteins and a plasma membrane transporter at septa in *Aspergillus oryzae*

Yugo Hayakawa¹, Eri Ishikawa¹, Jun-ya Shoji^{1,2}, Manabu Arioka¹, Katsuhiko Kitamoto¹

(¹Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, ²Institute of Cell Biol., Univ. of Edinburgh)

P-26

麹菌 *A. oryzae* が持つ細胞質型ホスホリパーゼ A₂ の局在および機能の解析

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 A₂ (PLA₂) 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、脂肪酸とリン脂質を遊離する酵素である。哺乳類では細胞質型 PLA₂ (cytosolic PLA₂; cPLA₂) が最もよく研究されており、Ca²⁺刺激に応じて細胞質から核膜等に移行し、アラキドン酸を遊離することでその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、微生物では出芽酵母や分裂酵母は cPLA₂ 遺伝子を持たないが、糸状菌はそのゲノム中に 1 個の cPLA₂ 遺伝子を持つことが分かった。本研究では、微生物における cPLA₂ の生理機能を解明することを目的として、*A. oryzae* が持つ唯一の cPLA₂ 遺伝子である *AoplaA* の解析を行った。

【方法と結果】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ところ、哺乳類 cPLA₂ と異なり予想外にもミトコンドリアへの局在が認められた。この局在に必要な領域について調べたところ、N 末端の約 60 アミノ酸残基がミトコンドリアへの局在に必要十分であることが分かった。また、麹菌から Ni²⁺ カラムを用いて精製した AoPlaA-HA-His₆ 融合タンパク質の N 末端アミノ酸シーケンス解析から、72 残基目のアミノ酸が成熟 AoPlaA の N 末端であることが分かった。以上の結果から、AoPlaA はミトコンドリアに輸送されたのち、N 末端に存在するミトコンドリア局在配列が切断除去されている可能性が考えられた。現在、この精製タンパク質を用いて、異なる基質・反応条件での AoPlaA の酵素学的性質を検討している。一方、*AoplaA* 破壊株を取得して様々な培養条件下で生育を観察したが、野生株と比較して顕著な表現型は見出されていない。今後さらに破壊株についてミトコンドリアの形態観察を行い、その表現型の探索を行う予定である。

Molecular characterization of cytosolic phospholipase A₂ in *Aspergillus oryzae*

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

P-27

麹菌 *A. oryzae* における Woronin body タンパク質 AoHex1 の選択的エキソンがコードする 50 アミノ酸の機能解析

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】Woronin body は真正子囊菌綱に属する糸状菌特異的に存在するオルガネラであり、菌糸損傷時に溶菌の伝播を防ぐため隔壁孔を塞ぐ機能をもつ。*A. oryzae* において、Woronin body 形成に必要な AoHex1 タンパク質は選択的スプライシングにより 50 アミノ酸だけ長さの異なる 2 つのタンパク質として生産される。これまでに、スプライシング型 AoHex1 タンパク質は単独で機能できるが、非スプライシング型のみでは機能が不十分であることを明らかにしている。そこで、この 2 つの AoHex1 タンパク質の違いを生じさせる選択的エキソンがコードする 50 アミノ酸の機能を調べた。【方法・結果】選択的エキソンが持つヒスチジンを多く含む配列に着目し、選択的エキソンをヒスチジン領域とその前後の領域に 3 分割してそれぞれを 1 つ又は 2 つ欠失した非スプライシング型 AoHex1 を発現させた。その結果、選択的エキソンの長さが Woronin body の機能に重要であり、選択的エキソンの領域を 2/3 以上欠失することで十分機能することを明らかとした。また、ウエスタン解析を行ったところヒスチジン領域を持つ AoHex1 が他に比べて多量に検出された。しかし、*Aohex1* 遺伝子の転写量はこのヒスチジン領域の有無により変化していなかった。このことから、このヒスチジン領域によって AoHex1 タンパク質がより安定な構造体を形成している可能性が示唆された。

Analysis of 50 amino acids encoded by the alternative exon in the *Aohex1* gene for a Woroninbody protein in *A. oryzae*.

Kentaro Iwasaki, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto.

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

P-28

麹菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシスおよび先端生長関連因子の解析

樋口裕次郎、有岡 学、北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）

【目的】これまでに、AoEnd4 を抑制したエンドサイトーシス欠損条件下では、細胞膜に異常な陥入構造が見られ、糸状菌においてエンドサイトーシスが活発に行われていることが示唆されている。また、エンドサイトーシスにおいて機能する AoAbp1 の解析から、エンドサイトーシスは菌糸先端部において最もよく行われていることが示唆されている¹⁾。細胞壁合成酵素などの先端生長に必要な因子はエンドサイトーシスによって先端にリサイクリングされていると考えられてきたが、その直接的な証拠はあまり示されていない。そこで、本研究ではエンドサイトーシスと先端生長との関わりについて、より詳細な解析を行った。

【方法と結果】*S. cerevisiae* において、エンドサイトーシスによる取り込み部位の構成因子であるエイソソームの主要タンパク質 Pil1p の *A. oryzae* におけるホモログ *Aopill* の破壊株を作製した。しかし、*Aopill* 破壊株では AoEnd4 抑制条件下で観察された異常な陥入構造が見られなかったことから、エイソソーム様の構成因子は糸状菌のエンドサイトーシスには主要な働きをしていないことが示唆された。次に、エンドソームに局在し、分泌に関与する SNARE である AoSnc1 を用いて、菌糸先端部におけるエンドサイトーシスのリサイクリングを可視化した。FRAP を用いた解析により、EGFP-AoSnc1 は主に菌糸先端部に局在し、先端部をリサイクリングしていることが示唆された。一方、AoEnd4 抑制条件下ではエンドサイトーシスによるリサイクリングに異常をきたし、EGFP-AoSnc1 は細胞膜全体に局在することが示された。さらに、先端生長に関連する細胞壁合成酵素群の発現量を解析したところ、AoEnd4 抑制条件下では AoEnd4 発現時より発現の上昇が確認された。このことから、エンドサイトーシス欠損により細胞壁合成酵素群がリサイクリングされず、発現が上昇している可能性が考えられた。

1) 樋口裕次郎ら、第 7 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p.46

Analysis of endocytosis and apical growth related-components in *Aspergillus oryzae*

Yujiro HIGUCHI, Manabu ARIOKA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-29

麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連遺伝子破壊株の解析

菊間隆志, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】オートファジーは糸状菌を含む真核生物において、栄養飢餓に対する生存戦略、細胞内浄化、分化および発生時の細胞内再構築などに寄与する細胞内分解機構である。我々はこれまでに、*A. oryzae* におけるオートファジーを解析するため、マーカータンパク質である AoAtg8 と蛍光タンパク質との融合タンパク質 (EGFP-AoAtg8) によるオートファジーの可視化および *Aoatg8* 破壊株の観察により、*A. oryzae* においてオートファジーが分生子形成および分生子発芽に関与することを示した¹⁾。本研究は、他のオートファジー関連遺伝子破壊株による、*A. oryzae* におけるオートファジーのさらなる解析を目的としている。

【方法・結果】*Aoatg8* 以外の遺伝子として、酵母において Atg8 のプロセッシングに関与すると予想される *atg4* の *A. oryzae* におけるホモログ *Aoatg4* の破壊株を作成した。その結果、*Aoatg8* 破壊株と同様に、気中菌糸および分生子形成の欠損が観察された。また *Aoatg4* 破壊株に EGFP-AoAtg8 を発現する株を作成し、蛍光顕微鏡により観察を行った結果、細胞内にドット状の構造体 (PAS) の他に、PAS の 2~4 倍の直径を持つ構造体が観察された。これは *AoAtg8* のプロセッシングが行われなかったことにより、PAS に AoAtg8 が蓄積したものであると考えられる。また、液胞内で autophagic body の分解に関与すると予想されるリパーゼ様遺伝子 *Aoatg15* の破壊株を作成中であり、液胞内分解が行われない条件下での AoAtg8 の挙動および *A. oryzae* に与える影響を観察する予定である。

1) Kikuma *et al.* (2006) *Eukaryot. Cell*, 5, 1328-36

Analysis of autophagy-related gene disruptants in *Aspergillus oryzae*.

Takashi Kikuma, Katsuhiko Kitamoto

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

P-30

麹菌 *A. oryzae* におけるペルオキシソーム移行シグナル受容体の機能解析

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、過酸化水素の無毒化や脂肪酸 β 酸化を行うオルガネラとして知られている。しかし、組織や環境、生物種によって、ペルオキシソームはより多様な機能を持つことが明らかにされてきている。ペルオキシソームへのタンパク質の輸送には、ペルオキシソーム移行シグナル PTS1、PTS2 を介する 2 つの経路がある。このとき PTS1、PTS2 を認識する受容体がそれぞれ Pex5p、Pex7p である。今回、ペルオキシソーム移行シグナル受容体の機能解析を行うことで、糸状菌におけるペルオキシソームの役割を明らかにしようと試みた。

【方法・結果】Pex5p、Pex7p に相同なタンパク質をコードする *A. oryzae* 遺伝子 *Aopex5*、*Aopex7* について、それぞれ破壊株を取得し、表現型の解析を行った。*Aopex5*、*Aopex7* のそれぞれの破壊株はオレイン酸を炭素源にした培地で生育が阻害された。*Aopex5* 破壊株においては、グルコースを炭素源とした培地でも生育および分生子形成の著しい低下が見られた。また、これらの破壊株において、ペルオキシソームから分化することが知られている、糸状菌に特有なオルガネラ Woronin body の機能についても調べた。その結果、*Aopex7* 破壊株では野生株と同様に正常であったが、*Aopex5* 破壊株ではその機能が欠損していた。これらのことから、Woronin body の機能発現には AoPex5 による PTS1 を介した輸送経路が必要であることがわかった。さらにその他の表現型として、それぞれの破壊株において、分生子発芽時の極性異常が観察された。以上のことから、ペルオキシソームの糸状菌特有の機能が新たに存在することが示唆された。

Functional analysis of peroxisomal protein import receptors in *Aspergillus oryzae*

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

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

P-31

糸状菌 *Aspergillus nidulans* のミオシン様ドメイン (MMD) を持つキチン合成酵素 CsmA、CsmB の存在する膜環境における MMD の役割

對崎真植、竹下典男、堀内裕之、太田明德 (東大院・農生科・応生工)

キチンは糸状菌細胞壁の主要構成成分の一つであり、その生合成は形態形成、分化に重要な役割を持つ。*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、隔壁形成部位のアクチン近傍に局在することが示されている¹⁾。一方、両者は膜タンパク質であり、界面活性剤による膜の可溶化条件の相違等からその機能的差異も示唆されている²⁾。今回、MMD 欠失型 CsmA、CsmB にそれぞれ HA、FLAG タグをつないだ CSDMA-HA、CSDMB-FLAG を発現する株を用いてこれらの融合タンパク質の膜からの可溶化条件について検討したところ、野生型 CsmA-HA、CsmB-FLAG と各々同様の傾向を示したことから、両者の存在する膜環境の違いは基本的には各々の CSD に依存することが示唆された。また各々の存在する膜環境における MMD の役割について更に検討するため、CsmA の MMD と CsmB の CSD の融合タンパク質に FLAG タグをつないだ MACB-FLAG、及び CsmB の MMD と CsmA の CSD の融合タンパク質に HA タグをつないだ MBCA-HA の膜の可溶化条件等について現在検討している。

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

2) 對崎ら、日本農芸化学会 2006 年度大会要旨集、p. 98

The roles of myosin motor-like domains of chitin synthases, CsmA and CsmB, in *Aspergillus nidulans*

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

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

P-32

Aspergillus nidulans における細胞壁構築経路と MpkB 経路の関係について

吉見啓¹、藤岡智則^{2,3}、丸井淳一郎^{1,4}、萩原大祐¹、水谷治^{2,5}、古川健太郎^{2,6}、佐野元昭⁷、阿部敬悦^{1,2} (東北大・未来研,²東北大院農,³現・クミアイ化学工業(株),⁴現・産総研,⁵現・酒類研,⁶現・ヨーテポリ大,⁷金沢工大・ゲノム研)

我々はこれまでに *A. nidulans* の細胞壁構築シグナル伝達 (CWIS) 経路について、MpkA MAPK 経路を中心に解析を行ってきた。その結果、本菌の CWIS 経路は酵母のものとは異なる様相を呈し、MpkA 経路は α -1,3-glucan 合成酵素遺伝子 *agsA*、*agsB* の転写を制御しており、 β -1,3-glucan 合成酵素遺伝子群の転写は別経路に支配されていることが明らかになった。一方、別の MAPK 遺伝子 *mpkB* の破壊株の解析から、*agsA* の転写応答には MpkB も関与していることが判明した。また、*mpkB* 破壊株が細胞壁合成阻害剤に対して感受性を示すことから、MpkB 経路も細胞壁構築に関与していることが示唆されている。今回、MpkB 経路と CWIS 経路の関係についてさらに理解を深めるため、*mpkB* 破壊株においてマイクロアレイ解析を行ったので、その結果について報告する。また、マイクロアレイ解析より同定した MpkB 経路特異的に応答する数種の遺伝子について転写応答解析を行ったので、これらと CWIS 経路の関係について考察する。さらに、*mpkA*、*mpkB* 遺伝子のコンディショナル破壊実験および *agsA*、*agsB* 遺伝子の破壊実験の結果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。)

Relationships of cell wall integrity signaling pathway and MAP kinase MpkB pathway in *Aspergillus nidulans*

Akira Yoshimi¹, Tomonori Fujioka^{2,3}, Junichiro Marui^{1,4}, Daisuke Hagiwara¹, Osamu Mizutani^{2,5}, Kentaro Furukawa^{2,6}, Motoaki Sano⁷, Keietsu Abe^{1,2} (Tohoku Univ.,¹NICHe,²Grad. Sch. Agri. Sci.,³Kumiai Chemical Industry Co., Ltd,⁴AIST,⁵NRIB,⁶Göteborg Univ.⁷KIT)

P-33

麹菌の液体培養における分泌タカアミラーゼの細胞壁吸着因子の探索

佐藤宏樹, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

【目的】麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の液体培養において、培養液中に分泌生産されるタカアミラーゼ量を経時的に追跡したところ、培養 36 時間から 48 時間にかけて培養上清中のタカアミラーゼ活性が急激に消失する現象が認められた。このタカアミラーゼの消失の原因は培地上清中のプロテアーゼによる分解ではなく、タカアミラーゼが菌体表面の細胞壁への“吸着”現象であることが示唆された。そこで、液体培養した麹菌の細胞壁画分を分画することにより、吸着現象の原因因子の特定を試みた。

【結果】培養後期の菌体から調製した細胞壁画分をアルカリ溶液により分画し、各画分に精製タカアミラーゼを加えたところ、強アルカリ溶液中で煮沸処理した細胞壁画分でも高い吸着能が確認された。この結果より細胞壁のアルカリ不溶性画分に吸着原因因子が存在する可能性が示唆された。そこで、アルカリ不溶性画分に含まれる多糖である β -1,3-グルカン、キチンを酵素処理により除いた細胞壁画分を調製し、吸着能を調べた。その結果、キチンを除いた細胞壁画分で吸着能の減少が見られたことから、キチンが吸着原因因子であると示唆された。一方、吸着現象が見られない培養前期の菌体から調製したアルカリ不溶性画分においても同様に吸着能が認められた。以上の結果より、培養時間によらず麹菌細胞壁に吸着原因因子が存在するが、培養初期には何らかの因子により吸着が阻害されている可能性が示唆された。現在、吸着阻害因子の探索を行っている。

Identification of cell wall factor(s) adsorbing Taka-amylase in submerged culture of *Aspergillus oryzae*

Hiroki Sato, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-34

麹菌の Hydrophobin 遺伝子 *hypB, C* の発現と局在性解析

石川絢也, 伊藤舞由子, 萩原義久, 波岡梓, 岡田亜希子, 中島春紫 (明治大・農化)

Hydrophobin は空気中に分生子頭や子実体を伸長する糸状菌・担子菌類の気中菌糸および胞子・分生子の表層に撥水性を与える低分子量タンパク質であり、1つの菌株が互いに相同性の低い Hydrophobin 遺伝子を 2～5 個有している。

日本では古来より清酒・味噌・醤油の醸造に用いられてきた麹菌 (*Aspergillus oryzae*) について Hydrophobin をコードすると推定される遺伝子を 5 つ (*hypA, B, C, D, E*) 単離している。このうち *hypA* 遺伝子については HypA-eGFP 融合タンパク質が固体培養特異的に発現し、麹菌の気中菌糸表層および分生子に局在することを観察している。

本研究では *hypB* および *hypC* 遺伝子について、ORF の C 末端側に eGFP を結合した HypB-eGFP, HypC-eGFP タンパク質をそれぞれ *hyp* 遺伝子自身のプロモーターにより発現する融合遺伝子を作製し麹菌に導入した。

蛍光顕微鏡により、HypB および HypC の分生子頭への局在が観察された。

一方、各々の Hydrophobin の局在を比較観察するために、*hypA* 遺伝子の C 末端側に赤色蛍光タンパク質 *dsred2* を連結させた遺伝子を作製し、HypA-DsRed2, HypB-eGFP および HypA-DsRed2, HypC-eGFP の組み合わせで麹菌に co-toransformation を行い、それぞれの同時発現株を取得した。その結果、HypB-eGFP および HypC-eGFP は気中菌糸および分生子頭において HypA-DsRed2 と異なる局在を示すことが観察された。

Localization and expression of hydrophobin gene *hypB, C* in *Aspergillus oryzae*

Junya Ishikawa, Mayuko Ito, Yoshihisa Hagiwara, Azusa Namioka, Akiko Okada, Harushi Nakajima

(Dept. Agric. Chem., Meiji Univ.)

P-35

麴菌の細胞表面タンパク質 Hydrophobin(HypA)の発現解析

加瀬明日香, 遠藤和代, 大野真尚, 松田彩, 中島春紫 (明大農・農化)

Hydrophobin は糸状菌・担子菌類の細胞表面に普遍的に存在して、気中菌糸および胞子・分生子の表面に撥水性を与えるタンパク質であり、細胞外に分泌された後、細胞表面に自己集合して外側に疎水性の面が露出した両親媒性の層を形成する。これまでに麴菌(*Aspergillus oryzae*)の Hydrophobin をコードすると考えられる遺伝子として *hypA(rolA)*, *hypB*, *hypC*, *hypD*, *hypE* の5つを単離しているが、糸状菌における複数の Hydrophobin の使い分けに関して系統的な解析はほとんど行われていない。そこで麴菌のこれらの Hydrophobin 遺伝子の転写について、RT-PCR により解析を行ったところ、各種培養条件を通じて *hypA* 遺伝子が最も多く発現していることが観察された。

hypA 遺伝子がコードしている HypA の局在および性質を解析するため、*hypA* 遺伝子 ORF の C 末端に GFP または His6 を結合した HypA-GFP、HypA-His6 融合タンパク質を *hypA* 自身のプロモーターにより発現する融合遺伝子を作製し、それぞれ麴菌に導入した。

一般に Hydrophobin は気中菌糸形成過程で発現するタンパク質であり、*hypA* 遺伝子は基本的に固体培養特異的に発現し、合成された単量体は自動的に細胞表面に自己集合する。しかし Hydrophobin の自己集合性タンパク質としての性質を解析し、工学的な応用について検討する目的で、液体培養による HypA 融合タンパク質の単量体の生産に関する条件を検討した。その結果、*hypA* 遺伝子の発現はグルコースリプレッションを受けており、培地中の C 源として有機酸等を用いることにより HypA 融合タンパク質の単量体が大量に培地中に生産されることを見出した。

Characterization of cell surface protein hydrophobin(HypA) in *Aspergillus oryzae*

Asuka Kase, Kazuyo Endo, Masahisa Ono, Aya Matsuda, Harushi Nakajima

(Dept. Agric. Chem., Meiji Univ.)

P-36

Aspergillus oryzae RIB40 由来キシログルカナーゼの精製及び解析

荒田章観, 国定嵩, 袴田佳宏, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)

Aspergillus oryzae RIB40 由来のキシログルカン特異的エンド- β -1,4-グルカナーゼ(XEG,キシログルカナーゼ)は、フスマ培養時に高発現している酵素の1種である。XEGは、植物細胞間を架橋しているキシログルカンを分解する酵素で、麴菌が米ヌカやフスマなどの植物体上で生育増殖する上で重要な役割を果たしていると考えられる。*A.oryzae* ゲノム情報から、*A.oryzae* RIB40は4種類のXEGを有していると考えられる(分子量25.6k、26.1k、29.2k、36.5k)。そこで、本研究では *A. oryzae* RIB40 由来のキシログルカナーゼ(AoXEG40)の諸性質を検討すべく、フスマ培養から得られた粗酵素液中の XEG の精製を試みた。

精製の方法として、陰イオン交換体および疎水性交換体によるカラムクロマトグラフィーを用い、SDS-PAGE 上でほぼ単一のバンドにまで精製した。この精製酵素を用いて AoXEG40 の諸性質を調べた結果、最適反応 pH4.5、最適反応温度は 50°Cであった。温度安定性では、50°C20 分の処理では安定であった。また、基質特異性ではキシログルカン(タマリンド)に対し高い活性を示した他、AZCL-キシログルカンに対しても高い活性を示したことから、AoXEG40 はエンド型であると考えられた。本酵素を TOF-MAS に供した結果、タンパク質の特定はできなかったが、分子量から 29.2k の XEG であると推察された。

Purification and characterization of a xyloglucan-specific glycosyl hydrolase from *Aspergillus oryzae* RIB40

Shokan Arata, Takashi Kunisada, Yoshihiro Hakamada, Shinichi Ohashi

(Genome Biotechnology Lab., KIT)

P-37

液面固定化 (LSI) システムでの β -グルコシダーゼ高生産麹菌の酵素生産

橋谷航、近藤花菜、中田葵、和田真人、小田忍、尾関健二、大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)

【目的】最近開発されたポリアクリロニトリルを主成分とするマイクロスフェアの液面浮上性を利用して、糸状菌の胞子を同時に懸濁し、数日間の液体静置培養を行うことにより強固な複合マットを形成し、液面固定化 (LSI) システムでの培養が開発された。本研究では、 β -グルコシダーゼ高生産麹菌の酵素生産性についてバッチ培養と連続培養について検討した。

【方法および結果】 β -グルコシダーゼ高生産麹菌の液体培養では菌体外に β -グルコシダーゼを分泌生産しない。一方 LSI 培養ではかなりの量の β -グルコシダーゼを培地中に分泌生産し、遺伝子組換えによる有用菌体内酵素の分泌生産が行える培養方法である可能性がある。さらに LSI でのバッチ培養と数回の繰り返しの連続培養における β -グルコシダーゼの生産について良好な結果が出たので報告する。

Overproduction of *Aspergillus oryzae* β -glucosidase by the liquid-surface immobilization (LSI) system.

Wataru Hashitani, Kana Kondo, Aoi Nakada, Masato Wada, Sinobu Oda, Kenji Ozeki, Shinichi Ohashi (KIT)

P-38

液体培地で高生産する麹菌 25kDa タンパク質の解析

高木義弘、東祐斗、織田健、佐野元昭、尾関健二、大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)

<目的>麹菌 RIB40 とキシラナーゼ (XynF1) 高生産麹菌を用いた YPD 液体振とう培養と液面固定化 (LSI) 培養との生産タンパク質の比較実験において、液体培地で高生産されるタンパク質を発見した。このタンパク質は YPD 液体振とう培養で培養初期(3日目)から後期(11日目)にかけて安定して生産され、菌体外に分泌されることを確認した。この遺伝子のプロモーター領域、分泌シグナルを利用した異種タンパク質生産について検討することを目的とした。

<方法および結果>YPD 液体振とう培養と LSI 培養との生産タンパク質のプロテオーム解析の結果、本タンパク質は、25kDa で機能未知であった。次に、本タンパク質の誘導物質の特定を行った。RIB40 を用いて YPD 液体培地以外での培養を行ったが、本タンパク質の生産は確認されなかった。よって、YPD の成分、Yeast extract、Peptone、Dextrose をそれぞれ、CD 培地 (C⁻, N⁻) に 3% 加えた液体培地で培養を行ったところ、Yeast extract でのみ本タンパク質の生産が確認された。また、YPD 液体培養 (1, 3, 5, 7 日目) と小麦フスマ培養でのノーザンハイブリダイゼーション、*Aspergillus* 属とのサザンハイブリダイゼーションの結果についても報告する。

Analysis of *Aspergillus oryzae* 25kDa protein in liquid culture.

Yoshihiro Takagi, Yuto Higashi, Ken Oda, Motoaki Sano, Kenji Ozeki, Shinichi Ohashi (KIT)

P-39

担子菌ヒトヨタケにおける糖質加水分解酵素ファミリー7 遺伝子の解析

井上絵律子, 坂本香織 (金沢工大・バイオ・化学・応用バイオ)

担子菌ウシグソヒトヨタケ (*Coprinopsis cinerea*) は子実体を形成する腐生菌で、菌糸から子実体形成までに要する時間が格段に短いため、モデル担子菌として形態形成などの様々な研究に用いられている。また、同種の Okayama-7 株がゲノムプロジェクトに採用され、全ゲノムシーケンスが既に公開されている¹⁾。ウシグソヒトヨタケのゲノムには、リグニン分解酵素として知られるリグニンペルオキシダーゼやマンガンペルオキシダーゼをコードする遺伝子は存在しない。一方で、セルラーゼをコードする遺伝子は、ゲノム上に多数存在する。数種の担子菌のセロビオヒドロラーゼ I (CBH I) およびセルラーゼのアミノ酸配列を用いて、ウシグソヒトヨタケのゲノムデータベースを検索したところ、相同性を示す座位が 6 つ見出された。また、これらの座位はいずれも、糖質加水分解酵素ファミリー7 (GH7) の遺伝子を含むことが分かった。6 つの座位のうち 5 つは遺伝子の全長を含み、推定されるアミノ酸配列は互いに非常に高い相同性を示した。また、5 つの推定アミノ酸配列はいずれも N 末端にシグナル配列を有し、真菌に特有の糖質結合モジュール (fCBM) はいずれにも存在しなかった。

ヒトヨタケ菌糸をグルコース、セルロース、カルボキシメチルセルロース (CMC) を単一炭素源とする培地またはそれぞれの炭素源の混合培地で生育させたところ、セルロース及び CMC を含む培地で子実体の形成が促進された。また、各 GH7 遺伝子の発現を同様の条件下で RT-PCR により調べたところ、発現量が炭素源に影響されない遺伝子と、セルロースや CMC の存在下で発現量が增大する遺伝子に分類された。

1) http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/coprinus_cinereus.2/Info.html

Analysis on Glycoside Hydrolase Family 7 genes in basidiomycetous fungus *Coprinopsis* sp.

Eriko Inoue, Kaori Inoue-Sakamoto

(Dept. of Appl. Biol. Sci., College of Biotech. & Chem., K.I.T)

P-40

Aspergillus nidulans の糖鎖構造の解析と糖転移酵素の探索

大久保有祐¹, 大橋貴生², 竹川薫², 後藤正利² (¹九州大・院・生資環, ²九州大・院・農)

本研究は、*Aspergillus nidulans* の糖タンパク質に結合している糖鎖の生合成機構の解明を目的としている。糖鎖は多様な構造を持っている。そのため、タンパク質の構造の安定化やシグナル伝達など、細胞内で多様な機能を担っている。糖タンパク質に結合している糖鎖は、N-結合型糖鎖と O-結合型糖鎖に大別される。N-結合型糖鎖は Asn 残基に結合しており、生物種間で共通するコア構造を持っている。一方、O-結合型糖鎖は Ser もしくは Thr 残基に結合しており、生物種によってさまざまな構造をとりうる。本報では *A. nidulans* の糖鎖構造の詳細が明らかにされていないため、まず N-結合型、O-結合型糖鎖の構造決定を目指した。また、糖鎖の生合成において糖の付加反応を触媒する糖転移酵素の探索と機能解析も行った。

糖鎖の構造解析は、HPLC を用いた。菌体をオートクレーブすることで抽出した糖タンパク質において、N-結合型糖鎖は、主にコア構造 Man₃GlcNAc₂ にマンノースが 2 個から 6 個結合した構造からなると推定した。一方、O-結合型糖鎖の構造は、二糖が多くを占めることが明らかとなった。また、*Aspergillus* 属では、ガラクトースが O-結合型糖鎖に含まれていると報告されているので、その生合成に関与する糖転移酵素を探索した。*Schizosaccharomyces pombe* の O-結合型糖鎖のガラクトース転移酵素 GMA12 を基に *A. nidulans* のホモログを探索した。その結果 3 つの遺伝子 (AN7562.3, AN1969.3, AN10041.3) を見出した。各遺伝子破壊株を構築し、野生株との表現型や糖鎖構造の比較を行ったが、現在までに明確な相違は確認されていない。

Structural analysis of oligosaccharide and quest for glycosyltransferase in *Aspergillus nidulans*

Yusuke Okubo¹, Takao Ohashi², Kaoru Takegawa², Masatoshi Goto²

(¹Grad.Sch.Biores.Bioenviron.Kyushu Univ., ²Fac.Agri.Kyushu Univ.)

P-41

Aspergillus nidulans の糖転移酵素 Pmt の基質タンパクの探索

伊本亮¹、松本翔¹、軸屋博之²、藤原絵美³、大森俊郎³、竹川薫⁴、後藤正利⁴
(九大院生資環¹、九大バイオアーク²、三和酒類フロンティア研³、九大院農⁴)

【目的】*Aspergillus nidulans* において、タンパク質への O-マンノース型糖鎖付加の初発反応を触媒する protein O-mannosyltransferase(PMT)は PmtA、B、C の 3 種類が存在する。*pmt* 遺伝子破壊株 (*pmtΔ*) では、菌糸伸長能・分生子形成能の低下、高温・薬剤への高感受性、異常な菌糸及び分生子柄構造の形成などの表現型を示した。本研究ではこれら表現型異常の原因を明らかにすることを目的とし、Pmt の基質となるマンノシル化タンパク質の網羅的解析と細胞壁ストレスセンサータンパク質に焦点をあて、解析を行った。

【方法・結果】野生株 (wt) と *pmtAΔ* 間の比較プロテオーム解析による PmtA の基質タンパク質の同定を試みた。wt と *pmtAΔ* の細胞壁、ミクロソーム、細胞外タンパク質の画分を調製し、各々 2 次元電気泳動を行った。細胞壁タンパク質の糖タンパク染色でいくつかのスポットの差異が見られた。これらのうち 15 種のタンパク質を MS 解析により同定した。中でも glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase は、グリセロールを介した浸透圧維持に関与しており、低糖鎖付加型 GAPDH による *pmtAΔ* の異常表現型生起への関連が示唆された。一方、出芽酵母において PMT の基質である細胞壁ストレスセンサー ScWsc1p と約 30% の相同性を示す AnWscA、AnWscB を見出した。*wscAΔ* と *pmtAΔ* の表現型の一部は類似していた。wt と *pmtΔ* において WscA-3HA 発現株を作成した。発現した WscA-3HA は wt に比べ *pmtAΔ* と *pmtCΔ* では、WscA-3HA は低分子側にバンドがシフトしており、さらに WscA-3HA は分解されていた。以上の結果から、WscA は PmtA と PmtC の基質の 1 つであると推察した。

Quest for glycoproteins mannosylated by Pmt in *Aspergillus nidulans*

¹Ryo Imoto, ¹Sho Matsumoto, ²Hiroyuki Jikuya, ³Emi Fujihara, ³Toshiro Omori, ⁴Kaoru Takegawa, ⁴M. Goto
(¹Grad.Sch.Biores.Bioenviron., ²Bio-Arch.Cent., ⁴Fac.Agric., Kyushu Univ., ³Sanwa Shurui Co. Ltd)

P-42

LongSAGE 法による *Phanerochaete chrysosporium* リグニン分解酵素発現に関与する遺伝子の検索

南 正彦, 鈴木一実, 清水顕史, 大山尚毅, 阪本鷹行, 入江俊一 (滋賀県大院・環)

白色腐朽菌におけるリグニン分解酵素発現に関与する遺伝子の検索を目的とし、LongSAGE 法による *Phanerochaete chrysosporium* RP78 株の網羅的発現解析を行った。リグニン分解酵素発現前の培養 2 日目、発現開始時の培養 3 日目に加え、アトロピン添加により分解酵素の発現を抑制した培養 3 日目の菌体から LongSAGE ライブラリーを作成した。3 種のライブラリー間で発現量が有意に 2 倍以上変化した遺伝子は 595 個確認され、4 種の推定的リグニン分解酵素遺伝子 (*lipH8*、*lipH2*、*mnp2*、*mnp3*) が含まれていた。Cai らの方法 (SAGE data analysis using a Poisson approach, Genome Biol., Cai et al. 2004) を用いて、これら 595 個の遺伝子を発現パターンにより 11 のクラスターに分類した。リグニン分解酵素遺伝子とクラスター (3 クラスター) を形成した遺伝子は 164 個存在し、Ca²⁺シグナリングに関与する可能性があるホスホリパーゼ D、カルモデュリンや cytochrome P450 などが含まれていた。また、主要アイソザイム遺伝子である *lipH8*、*mnp3* や、それら 164 個の遺伝子の多くについて、CDS の上流 1 kb 領域に CRE 配列、CRE-BP 結合配列、AP-1 が結合する TRE 配列などが確認された。

The search for genes related to ligninolytic enzyme expression in *Phanerochaete chrysosporium* using LongSAGE

Masahiko Minami, Kazumi Suzuki, Akifumi Shimizu, Naoki Ohyama, Takaiku Sakamoto, Toshikazu Irie
(Environ. Sci. Grad. Sch., Univ. of Shiga Pref.)

P-43

糖質加水分解酵素ファミリー 43 に属する新規麹菌キシロシダーゼ

鈴木聡¹, 福岡真里¹, 大口ひかる¹, 松下真由美¹, 多田功生¹, 佐野元昭², 尾関健二², 永吉恵美³, 瀧井幸男³, 楠本憲一¹, 柏木豊¹ (1 食総研, 2 金沢工大, 3 武庫川女子大)

麹菌 *Aspergillus oryzae* の小麦ふすま培養では、ヘミセルロース等難分解性バイオマスを資化するための遺伝子が多く発現していると期待される。バイオマス利用のためには、これら遺伝子の単離と解析が必要である。我々はマイクロアレイ解析により小麦ふすま CD 寒天培養で小麦粉 CD 寒天培養に対して 10 倍以上の発現上昇を示した麹菌遺伝子のうち、キシロシダーゼ様遺伝子数種に注目し、それらの解析を行っている。本研究では、*Penicillium herquei* の細胞壁結合型キシロシダーゼにアミノ酸配列で 72%一致する新規麹菌キシロシダーゼの解析を行ったので報告する。本酵素は、糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー 43 に属する。本酵素の解析のため、大腸菌発現系による発現を行った。ゲノム情報 AO090005000698 を PCR 増幅し、pET32b ベクターに連結した発現ベクターを作成し、*E.coli* RosettaTagami(DE3)pLysS 株に形質転換した。Ni カラム精製、陰イオン交換カラム精製、S タグ精製を行って、CBB 染色にてほぼ単一のバンドに精製した。pnp-β-D-キシロピラノシドの分解活性により、酵素活性を測定した。

本研究のいくつかの内容は飯島財団の助成を受けて行われた。

Glycoside Hydrolase Family 43 xylosidase from *Aspergillus oryzae*

Satoshi Suzuki¹, Mari Fukuoka¹, Hikaru Okuchi¹, Mayumi Matsushita¹, Sawaki Tada¹, Motoaki Sano², Kenji Ozeki², Emi Nagayoshi³, Yukio Takii³, Ken-Ichi Kusumoto¹, Yutaka Kashiwagi¹
(1 NFRI, 2 KIT, 3 Mukogawa Women's Univ.)

P-44

麹菌ロイシンアミノペプチダーゼの糸状菌及び大腸菌を用いた発現解析

楠本憲一¹, 松下(森田)真由美¹, 古川育代¹, 小出芳直², 石田博樹³, 山形洋平⁴, 竹内道雄⁵, 鈴木聡¹, 柏木豊¹ (1 食総研, 2 天野エンザイム, 3 月桂冠, 4 東北大・院・応生科, 5 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。ペプチド生成機構解明のため、麹菌ゲノム情報に見出されたアミノペプチダーゼ様遺伝子産物の特性解明を行っている。これらの酵素群の遺伝子組換えによる高生産を行うにあたり、宿主の違いによる生産酵素の特性を比較するため、*Aspergillus oryzae* ロイシンアミノペプチダーゼ (以下、LAP) について、*A. oryzae*, *A. nidulans* 及び大腸菌を宿主として生産し、その特性解明を本研究の目的とする。

【方法及び結果】 LAP コーディング領域約 1.3kb を、*A. oryzae* RIB40 株のゲノム DNA あるいは cDNA を鋳型にした PCR により取得した。*A. oryzae* RIB40 株及び *A. nidulans* A89 株が宿主の場合、*AmyB* プロモーターまたはその改変プロモーター制御下で融合遺伝子 LAP-His タグを高発現する株を作出した。また、*Escherichia coli* BL21 株が宿主の場合、分泌シグナル領域を除いた LAP cDNA の 5' 側に His タグを付加した融合遺伝子を pColdI ベクターに挿入し、LAP 高発現株を作出した。糸状菌 2 株を宿主とした場合は、培養上清に生産された LAP の C 末端から His-tag が消失していた。BL21 株形質転換体の細胞内に蓄積した LAP については、N 末端に付加した His-tag を利用して Ni-IMAC ビーズカラムにより精製した。現在、各宿主で生産した LAP の特性を調べている。本研究は、生研センター基礎研究推進事業の一環として行われたものである。

Characterization of leucine aminopeptidases from *Aspergillus oryzae*

Ken-Ichi Kusumoto¹, Mayumi Matsushita-Morita¹, Ikuyo Furukawa¹, Yoshinao Koide², Hiroki Ishida³, Youhei Yamagata⁴, Michio Takeuchi⁵, Satoshi Suzuki¹, Yutaka Kashiwagi¹ (1 Natl. Food Res. Inst., 2 Amano Enzyme, 3 Gekkeikan, 4 Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., 5 Tokyo Univ. of Agric. Tech.)

P-45

***Rhizopus oryzae* および *Amylomyces rouxii* によって生産されるスクロース加水分解酵素の比較**

渡辺剛志, 小田有二 (帯畜大・食品科学)

Rhizopus oryzae NBRC 4785 および近縁種の *Amylomyces rouxii* CBS 438.76 は、ともにスクロースから乳酸を活発に生成する。両菌株を各種の糖源で培養したところ、*R. oryzae* はラフィノースで生育不能、フルクトオリゴ糖を一部しか利用せず、*A. rouxii* はマルトースから乳酸を生成しなかった。培養時間に伴うスクロース加水分解酵素活性の変化を追跡すると、*R. oryzae* では8日目まで消失したのに対して *A. rouxii* では14日目まで上昇し続けた。そこで両菌株の差異を調べるため、培養ろ液からスクロース加水分解酵素をイオン交換および疎水クロマトグラフィーで精製した。分子量はそれぞれ 59,000 および 68,600 で、エンドグリコシダーゼ H の処理によって 46,900 および 60,200 にまで減少した。いずれの酵素も反応の最適 pH は 4.5 で、活性が最大となる反応温度は *R. oryzae* の酵素が 45°C、*A. rouxii* の酵素が 55°C であった。*R. oryzae* の酵素はスクロース、マルトースおよび可溶性デンプンを完全に、フルクトオリゴ糖を部分的に分解し、*A. rouxii* の酵素は、スクロース、ラフィノース、フルクトオリゴ糖、イヌリンおよびレバンに作用した。*R. oryzae* の酵素の N 末端アミノ酸配列は、*amyB* 遺伝子の推定アミノ酸配列と一致したことからグルコアミラーゼと推定された。*A. rouxii* の酵素は、イヌリンよりもスクロースに対する親和性が高いことからインベルターゼと考えられた。

Comparison of sucrose-hydrolyzing enzymes produced by *Rhizopus oryzae* and *Amylomyces rouxii*

Tsuyoshi Watanabe, Yuji Oda

(Dept. of Food Science, Obihiro Univ. of Agr. Vet. Med.)

P-46

***Trichoderma reesei* におけるエンドグルカナーゼ I 遺伝子の誘導機構の解析**

志田洋介, 古川隆紀, 小笠原渉, 森川康 (長岡技科大・生物)

[目的] *Trichoderma reesei* において種々のセルラーゼ遺伝子は誘導条件下で同調して発現する。それぞれの転写量は大きく異なるがその量は用いた誘導物質にかかわらずほぼ一定である。そのため共通の誘導発現機構が存在すると考えられている。現在までに、転写量のきわめて多いセロビオヒドロラーゼ遺伝子 (*cbh1*、*cbh2*) の誘導発現に関与する数種の転写調節因子が報告されてきたが、すべてのセルラーゼ遺伝子を含む誘導機構の全容解明には至っていない。我々は、エンドグルカナーゼ III 遺伝子 (*egl3*) およびキシラナーゼ III 遺伝子 (*xyn3*) の上流領域の解析から、*T. reesei* におけるセルラーゼ遺伝子の転写活性化因子である Xyr1 が GGC(A/T)₃ に結合し、転写を活性化することを明らかにしてきた。本研究では、*cbh1* の 1/10 の転写量を示すエンドグルカナーゼ I 遺伝子 (*egl1*) の上流領域を *in vivo*、*in vitro* の両面から解析し、セルラーゼ遺伝子群の誘導発現機構と転写量の決定因子について新たな知見を得ることを目的としている。

[方法と結果] *egl1* の上流領域には、Xyr1 の結合配列と考えられる配列が 2カ所 (-552 bp〜 -527 bp の GGCTAA-N14-ATTGCC および -217 bp〜 -194 bp の GGCTAT-N12-ATAGCC) 存在していた。これらの配列に対して *E. coli* で発現させた Xyr1 の DNA 結合ドメインとの相互作用をゲルシフトアッセイにて観察したところ、前者の配列に対する Xyr1 の結合親和性が非常に高いことが明らかとなった。また、*T. reesei* におけるレポーター遺伝子を用いた上流領域の解析からも、この配列を欠失した削除型上流領域は誘導能が著しく低下することが確認できた。現在、Xyr1 の結合様式についてさらなる解析を進めている。

Analysis of induction mechanism of *egl1* from *Trichoderma reesei*

Yosuke Shida, Takanori Furukawa, Wataru Ogasawara, Yasushi Morikawa

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

P-47

Trichoderma reesei の固体培養におけるプロテオーム解析

関戸裕久, 齋藤勇司, 佐藤 伸, 岡田宏文, 小笠原 渉, 森川 康 (長岡技科大・生物)

Trichoderma reesei はセルラーゼ生産能力に優れた糸状菌として見出された。野生株である QM6a 株を基に液体培養におけるセルラーゼ生産能の向上が図られ、変異を加えることで世界的に標準株として使用される QM9414 株、さらにセルラーゼ高生産変異株である PC-3-7 株が作成された。*T. reesei* は液体培養で分泌されるタンパク質の解析は行われているが、自然条件に近い固体培養においては未だ不明である。そこで QM6a 株、QM9414 株と PC-3-7 株の固体培養におけるセルラーゼ活性の比較を行い、固体培養における株間の挙動の解析を行った。

固体培養の培地として吸水させた小麦フスマを用い、湿度飽和条件下で固体培養を行った。培養後の分泌タンパク質を緩衝液で抽出し、セルラーゼ活性を測定したところ PC-3-7 株が最も高い結果となった。PC-3-7 株のセルラーゼ生産性は液体培養だけでなく固体培養においても優れていることが明らかとなった。PC-3-7 株が液体と固体で分泌する既知糖質加水分解酵素遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で比較したところ、セロビオヒドロラーゼの発現比率が低下する一方、エンドグルカナーゼやキシラナーゼの比率が増加することが分かった。このため、固体培養に特異的なタンパク質の発現が期待され、二次元ゲル電気泳動を使って液体培養と固体培養で分泌されるタンパク質の比較を行った結果、液体培養では認められないタンパク質スポットが固体培養において多数認められた。現在、固体培養特異的なスポットを MALDI TOF-MS を用い同定を試みている。

Proteome analysis of *Trichoderma reesei* grown under solid-state fermentation.

Hirohisa Sekiguchi, Yuji Saito, Shin Sato, Hirofumi Okada, Wataru Ogasawara, Yasushi Morikawa
(Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.)

P-48

Trichoderma reesei 由来エンドグルカナーゼ EGVIII(Cel5B)の機能解析

佐藤直美, 志田洋介, 白幡皓, 岡田宏文, 小笠原渉, 森川康 (長岡技科大・生物)

T. reesei における種々のセルラーゼは、唯一の炭素源としてセルロースおよびその誘導体が存在する時のみ同調して発現する。セルロースは不溶性高分子であるため、基礎レベルで微量発現するセルラーゼによりセルロースから生じた低分子の誘導体が細胞内に取り込まれ、誘導物質として機能すると推測される。*T. reesei* の EST 解析により新たに発見された遺伝子である *egl8(cel5b)* は、推定アミノ酸配列の相同性より、GH ファミリー5 に属するエンドグルカナーゼ(EGVIII)をコードすると推測された。また、EGVIIIの C 末端側には GPI アンカー付加配列が存在するため、膜結合型のエンドグルカナーゼであると予想される。本研究では、酵母を用いて異種発現させた EGVIII および *T. reesei* の *egl8* 破壊株を解析する事により、*T. reesei* セルラーゼ群のセルロースによる誘導と EGVIII との関係进行を明らかにする事を目的としている。

T. reesei の cDNA ライブラリーから *egl8* をクローニングし、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を形質転換した。得られた形質転換体の培養上清から CMCase 活性は検出できなかったが、形質転換体の菌体を用いて活性測定をしたところ、*egl8* を含まない形質転換体との間に有意な差が検出された。また、ハローアッセイでは菌体周囲にのみハローが観察された事から、EGVIIIは膜結合型エンドグルカナーゼとして発現することが推察された。*egl8* の発現解析では、*egl8* は他のセルラーゼ遺伝子群と異なり構成的に発現する事が明らかとなり、EGVIIIは *T. reesei* セルラーゼ群のセルロース誘導の一端を担う事が推測された。また、*T. reesei* の *egl8* 破壊株の構築を行った。現在、この破壊株を用いて種々の誘導条件下におけるセルラーゼ遺伝子群の発現解析を行っている。

Functional analysis of endoglucanase EGVIII(Cel5B) in *Trichoderma reesei*

Naomi Sato, Yosuke Shida, Kou Shirahata, Hirofumi Okada, Wataru Ogasawara, Yasushi Morikawa
(Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech)

P-49

麹菌由来セリン・システインプロテアーゼ群の解析

片瀬 徹¹, 星由紀子¹, 結城健介¹, 小出芳直¹, 竹内道雄², 山形洋平³, 楠本憲一⁴, 石田博樹⁵

(¹天野エンザイム,²東京農工大院・応生科,³東北大学・院・応生科,⁴食総研,⁵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 134 種のプロテアーゼ遺伝子の存在が見出された。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着目し、これらのプロテアーゼ遺伝子を発現し、その遺伝子産物の酵素化学的性質の解明することにより麹菌プロテアーゼのカタログ化を目指している。

【方法・結果】我々は上記 26 種のプロテアーゼのうち、3 種の菌体外分泌型セリンプロテアーゼである、oryzin, aorsin A, aorsin B に着目した。これらの遺伝子に関して麹菌を宿主とした発現系を構築し、各プロテアーゼの培養上清中への発現を確認した。中でも Aorsin A は、他の 2 種と比較して高いプロテアーゼ活性を示した。現在これらのプロテアーゼについて精製を実施し、酵素化学的性質を検討している。

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。

Analysis of Putative Serine and Cysteine Proteases in *Aspergillus oryzae*.

Toru Katase¹, Yukiko Hoshi¹, Kensuke Yuuki¹, Yoshinao Koide¹, Michio Takeuchi², Youhei Yamagata³, Ken-Ichi Kusumoto⁴, Hiroki Ishida⁵

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

P-50

担子菌 *Coniophora puteana* (イドタケ) 由来糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー 6 および 7 に属するセルラーゼの分子生物学的解析

加治佐 平, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東京大学大学院・農学生命科学研究科)

担子菌の 1 種である木材腐朽菌は腐朽材の色の違いから白色腐朽菌と褐色腐朽菌に分類されている。セルロース分解系においても、糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー 6 および 7 に属するセルラーゼ遺伝子を白色腐朽菌はゲノム上に普遍的に有しているのに対して、褐色腐朽菌は不完全であることがわかっている。その中で褐色腐朽菌 *Coniophora puteana* (イドタケ) は、褐色腐朽菌では唯一 GH6、7 の両遺伝子を有していることが明らかになっている。そこで、本研究においては分子生物学的な手法を用いて *C. puteana* 由来 GH 6 および 7 の解析を行った。まず、*C. puteana* のゲノム DNA より 2 つの GH6 遺伝子 (*cel6A*, *cel6B*) と 2 つの GH7 遺伝子 (*cel7A*, *cel7B*) を検出した。次にセルロース培養系における菌体より mRNA を抽出し、RT-PCR によってそれらの遺伝子全長を取得した。決定した遺伝子塩基配列より推定されるアミノ酸配列を他の糸状菌由来のものと比較したところ、糸状菌および担子菌由来セロビオヒドロラーゼに共通するループ構造を保持していた。しかしながら、結晶性セルロースに吸着するドメインである糖結合性モジュール (CBM) は *Cel6A* にのみしか存在しないことが明らかとなった。そこで、セルロース培養系における各遺伝子の発現を比較したところ、CBM が付加されている *cel6A* は他の遺伝子と比較して非常に発現量が少ないことが明らかとなった。以上の結果から、*C. puteana* はゲノム DNA 上にセロビオヒドロラーゼと推測される *cel6*, *cel7* 遺伝子を有し、セルロース培養系において発現するものの、発現量の多いものは CBM が欠如しており、また CBM が付加された *Cel6A* は発現量が少ないため、GH6,7 セルラーゼによる結晶性セルロースの分解性は低いことが推察された。

Molecular characterization of glycoside hydrolase family 6 and 7 cellulases from the basidiomycete *Coniophora puteana*

Taira Kajisa, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima

(Graduate School of Agricultural and Life Sciences, Univ. of Tokyo)

P-51

麴菌セリントイプカルボキシペプチダーゼ群の解析

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

麴菌 *A. oryzae* のゲノム解析が終了した結果、*A. oryzae* のゲノムには 12 種類のセリントイプカルボキシペプチダーゼをコードすると推定される遺伝子が存在した。そこで、これらの遺伝子がコードするタンパク質の性質を明らかにすることを目的とし、*A. nidulans* または *A. oryzae* を宿主とした過剰発現株を作製した。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、培養上清を用いてプロテアーゼの活性測定を行った。その結果、野生株に比べて顕著に活性が上昇した株が 4 株、活性が上昇した株が 5 株得られた。そこで、これらの形質転換体の培養上清から陰イオン交換カラム、陽イオン交換カラム、ゲルろ過カラムを用いてそれぞれのセリントイプカルボキシペプチダーゼの精製を行い、カルボキシペプチダーゼ活性、基質特異性、pH 安定性、熱安定性、至適 pH、阻害剤による影響を検討した結果、違いが認められたので報告する。

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 Morita¹, Ayako Okamoto¹, Yohei Yamagata², Ken-Ichi Kusumoto³, Yoshinao Koide⁴, Hiroki Ishida⁵, Michio Takeuchi¹

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

P-52

麴菌酸性プロテアーゼ群の発現および解析

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

麴菌ゲノム解析の結果、麴菌ゲノムにはアスパルティックプロテアーゼと推定される遺伝子が 11 種類、ペプスタチン非感受性酸性プロテアーゼが 3 種類、計 14 種類の酸性プロテアーゼ遺伝子が存在することが分かった。11 種類のアスパルティックプロテアーゼ遺伝子について推定されるアミノ酸配列から系統樹を作成し、解析した。その結果、大きく 3 つのグループに分類でき、それぞれのグループは菌体外分泌型、液胞局在型、細胞壁局在型であることが推定された。この中から菌体外分泌型 034、液胞局在型 102、細胞壁局在型 309、ペプスタチン非感受性型 108 のクローン化を行い、マルトース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遺伝子を組み込んだ。作製したベクターを用いて *A. nidulans* を形質転換し、形質転換体を用いて各 APase の強制発現を試みた。

マルトースを含む液体培地を用いて 4 日間 30°C で培養を行い、カゼイン分解能を持つ培養上清を回収した。その後、FPLC を用いて精製を行い、得られた精製酵素を用いて性質の決定を行った。

これら 4 種類の酵素は基質特異性、熱安定性などの酵素学的性質に違いが認められた。また、トリプシノーゲンキナーゼ活性の有無が活性中心を覆うクラップのアミノ酸配列に依存していることが明らかになった。

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。

Expression and analysis of APase in *Aspergillus oryzae*

Ayako Okamoto¹, Hiroto Morita¹, Yohei Yamagata², Ken-Ichi Kusumoto³, Yoshinao Koide⁴, Hiroki Ishida⁵, Michio Takeuchi¹

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

P-53

カーボンカタボライト抑制解除環境下における担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* の *cel7* 遺伝子群の発現挙動に関する定量的解析

鈴木一史, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* は、高い相同性を持つ少なくとも 6 個の Glycoside hydrolase family 7 に属するセロビオヒドロラーゼ遺伝子(*cel7A-F*)をゲノム中に保有しており、その発現はグルコース存在下において強いカタボライト抑制を受けることが知られている。発表者らは、*cel7D* に関してこの抑制の解除が発現量の増加に重要な役割を持つことを明らかにしてきた。本研究では、この抑制の解除が他の *cel7* 遺伝子の発現量に与える影響について、リアルタイム RT-PCR による定量的な解析を行った。

グルコースを炭素源として 3 日間前培養した *P. chrysosporium* の菌体を炭素源を含まない培地で 6 時間培養した後、異なる濃度のグルコースを含む培地に移してさらに 6 時間の本培養を行った。本培養中 1 時間ごとに菌体を回収し、得られた菌体を mRNA 抽出、cDNA 合成および定量 RT-PCR 解析に供した。また、各 *cel7* 遺伝子の 3'非翻訳領域の配列を用いてそれぞれに特異的な増幅が可能なプライマー対を設計した。

結果、本培養中にグルコースが完全に消費された時に転写産物量の指数関数的な増加が見られるのは *cel7D* のみであったが、*cel7C* においても本培養 6 時間後に発現量の増加が見られ、転写産物量はグルコースを 50 μ M 添加した培養系よりも添加しない場合の方が多くなることが明らかとなった。一方、*cel7A*, *cel7B*, *cel7E*, *cel7F* に関しては本培養中に発現量の顕著な変化はみられなかった。このことから、各 *cel7* 遺伝子間にはグルコースによる発現抑制の解除に対する応答に明確な挙動の差があり、抑制解除環境下においてそれぞれ異なる発現制御を受けていることが示唆された。

Quantitative analysis of carbon catabolite derepression of *cel7* genes expressed in the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.

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

P-54

シロアリ由来エンドグルカナーゼの麹菌 *A. oryzae* を用いた生産とその精製

平山佳代子¹、徳田 岳²、渡辺裕文³、北本勝ひこ¹、有岡 学¹ (¹東大院・農生科・応生工、²琉大・分生研、³農業生物資源研)

【目的】近年、地球温暖化問題や石油高騰によりバイオエタノールへの期待が高まる中、その製造技術開発においてシロアリの木質バイオマス分解システムが注目されている。シロアリはセルロース摂取後、唾液腺に存在するシロアリ自身のエンドグルカナーゼ (EG) が始めにセルロースを分解することから、これらの EG がシロアリの木質バイオマス分解において重要な役割を果たしていると考えられる。現在、大腸菌適応改変シロアリ EG の大量発現が可能となっているが (Ni et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1711, 2005)、天然型活性酵素の大量発現は報告されていない。今回、麹菌 *A. oryzae* を用いて、2 種類のシロアリ由来 EG の生産に成功した。

【方法と結果】GHF9 に属するヤマトシロアリ由来の EG (RsEG) とタカサゴシロアリ由来の EG (NtEG) を、グルコアミラーゼ A との融合タンパク質として発現させるためのプラスミドを作製し、麹菌 NS-tApE 株由来の高分泌生産変異株 AUT-1 に導入した。なお、双方ともグルコアミラーゼ A と目的の EG の間には Kex2 様プロテアーゼ切断配列を挿入した。得られた株の培養上清には高い EG 活性が認められ、さらに Western 解析により目的の EG のバンドが検出された。また、RNAi 法により α -アミラーゼを抑制させるための配列をこれらの生産株に導入したところ、培養上清の EG 活性が上昇した。現在、この RNAi 配列を導入した株の培養上清を用いて各 EG の精製を試みている。

Production and purification of termite endoglucanases using *Aspergillus oryzae*

Kayoko Hirayama¹, Gaku Tokuda², Hirofumi Watanabe³, Katsuhiko Kitamoto¹, Manabu Arioka¹ (¹Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo; ²Ryukyuu Univ.; ³National Inst. of Agrobiol. Sci.)

P-55

シロアリ腸内共生原生生物由来キシラナーゼの麹菌 *A. oryzae* を用いた生産及びその解析

笹川哲裕¹、有岡 学¹、守屋繁春^{2,3}、工藤俊章⁴、北本勝ひこ¹ (¹東大院農生科・応生工、²理研・バイオスフェア U、³横浜市大院・環境分子、⁴長崎大・水産)

近年、化石燃料の枯渇問題やその化石燃料の使用による地球温暖化などの理由から、化石燃料の代替燃料としてバイオエタノールへの期待が高まっている。中でもシロアリは木質バイオマスを高効率で分解することが知られており、そのシステムを利用したバイオエタノール生産が注目されている。シロアリのバイオマス分解はシロアリ自身が持つ酵素による分解と、腸内に共生する原生生物の持つ酵素による分解の二重のシステムによって成り立っていることが知られている。

本研究では、ヤマトシロアリ共生系由来の GHF11 に属するキシラナーゼ、及びコウシュンシロアリ共生系由来の GHF10 に属するキシラナーゼの麹菌 *A. oryzae* による生産を試みた。各々を α -アミラーゼとの融合タンパク質として発現させるプラスミドを作製し、*A. nidulans* sC マーカーを用いて麹菌プロテアーゼ遺伝子 2 重破壊株 NS-tApE 株に導入してキシラナーゼ生産株を取得した。各形質転換株を培養し、培養上清を用いてキシラン分解活性を調べたところ、共にキシラナーゼ活性が認められた。現在、この培養上清からのキシラナーゼの精製、及びその酵素学的性質の検討を行っている。

Production in *A. oryzae* of xylanases from the symbiotic protists in the hindgut of termites and their characterization

Takahiro Sasagawa¹, Manabu Arioka¹, Shigeharu Moriya^{2, 3}, Toshiaki Kudo, Katsuhiko Kitamoto¹ (¹Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo; ²Biosphere U., RIKEN; ³Lab. Environ. Mol. Biol., Yokohama City Univ.; ⁴Fac. of Fisheries, Nagasaki Univ.)

P-56

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) 由来ペプチダーゼ群の基質特異性

前田 浩¹、山形洋平¹、小出芳直²、石田博樹³、楠本憲一⁴、竹内道雄⁵

(¹東北大院・応生科、²天野エンザイム、³月桂冠・総研、⁴食総研、⁵東農工大農・応生科)

【目的】 麹菌 (*A. oryzae*) ゲノムには約 12,000 遺伝子がコードされ、そのうち 134 遺伝子が protease/peptidase をコードしていることが推定されている。しかしながら安全性の高いものとして、既に食品産業等で用いられている麹菌由来の protease/peptidase 群の個々の基質特異性は殆ど明らかになってはいない。これらの基質特異性を知ることは、種々の食品加工や様々な工業プロセスで高い基質特異性が求められる際のアドバンテージとなる。そこで我々は 18 種の metalloproteinase、12 種の metalloprotease、8 種の oligopeptidylpeptidase を分担し、それらの基質特異性の解明を中心とした酵素学的解析を進めている。本報告では特にペプチド生成に重要な働きをしているものと考えられる peptidase 群の基質特異性について報告する。

【方法・結果】 我々は上記 38 種の protease/peptidase のうち、まず分泌 signal を有すると推定される 16 種について *A. nidulans* を宿主とした発現系を構築し、いくつかについて培養上清中への発現を確認した。その中から更に oligopeptidyl peptidase、metalloprotease について精製酵素標品を調製し、合成ペプチド基質等を用いこれらの基質特異性を明らかとした。

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なわれたものである。

Substrate Specificity of Peptidases in *Aspergillus oryzae*

Hiroshi Maeda¹, Youhei Yamagata¹, Yoshinao Koide², Hiroki Ishida³, Ken-ichi Kusumoto⁴, Michio Takeuchi⁵
(¹Tohoku Univ., Grad. Sch. Agri. Sci., ²Amano Enzyme Inc., ³Gekkeikan Sake Co. Ltd., ⁴NFRI, ⁵Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

P-57

***Aspergillus* 属由来酸性アミノ酸特異的アミノペプチダーゼの高発現と利用**

中村奈巳、坂本知大、小寺智博、若林秀彦、丹尾式希 (味の素(株)・ライフサイエンス研究所)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は種々のプロテアーゼ、ペプチダーゼを産生し、これら酵素が発酵食品製造に関与していることが知られている。また、近年のゲノム解析の結果からも、多くのタンパク質分解系遺伝子が存在することが明らかになった。一方、我々はこれまでに、発芽ダイズ子葉を発端に、その後食品微生物を中心に種々の生物より酸性アミノ酸特異的アミノペプチダーゼ (ペプチドの N 末端のグルタミン酸、アスパラギン酸を特異的に遊離、以後 EAP) の探索を行ってきた。*A.oryzae*、*A.niger*、*A.nidulans* についても、ダイズ EAP と相同性の高い遺伝子(*Aoeap*,*Angeap*,*Andeap*)を RACE によりクローニングに成功し、*E.coli* にて発現系を構築、発現した酵素について基質特異性等の酵素特性を確認済みである。また、*Aoeap* の麹菌での生産を目指し、*amyB* プロモーター下に組み込み、麹菌 NS4 に導入したところ、菌体内とともに培地中にも EAP 活性が検出された¹⁾。次に高発現ベクター-pNGA142、pNEN142 (大関(株)製)に組み込み、麹菌 NS4 に導入したところ、*amyB* プロモーターによる発現株と比較して最大約 10 倍の発現量を持つ株が得られた。

更に、食品産業への活用可能性を評価するため、発現酵素について精製後、調味料に作用させたところ、遊離グルタミン酸量を増加させ、官能評価によるうま味強度も増加させることが明らかになり、本酵素の呈味増強酵素としての可能性が示唆された。

1)中村ら、日本農芸化学会 2008 年度大会要旨、p186

High level expression of acidic amino acid specific aminopeptidases from *Aspergillus* sp. and their application.

Nami Nakamura, Tomohiro Sakamoto, Tomohiro Kodera, Hidehiko Wakabayashi, Noriki Nio (Ajinomoto)

P-58

N-結合型糖鎖プローブを用いた麹菌グルコシダーゼ II の解析

渡邊泰祐¹、戸谷希一郎^{1,2}、松尾一郎^{1,3}、丸山潤一⁴、北本勝ひこ⁴、伊藤幸成¹ (理研・基幹研¹、成蹊大・理工²、群大院・工³、東大院・農生科・応生工⁴)

我々は糖タンパク質品質管理機構に関連するアスパラギン結合型 (N-結合型) 糖鎖および人工糖タンパク質の合成を行っており、既に麹菌のカルネキシンが N-結合型糖鎖に対するレクチン活性を有すること¹⁾、N-結合型糖鎖-メトトレキセート複合体がグルコシダーゼ (G-II) の基質となること²⁾を明らかにしている。G-II は α および β サブユニットからなるヘテロ二量体であり、 α サブユニットが活性ドメインとして機能しているのに対して β サブユニットは機能未知である。我々は麹菌の G-II α および β の各サブユニットのホモログ遺伝子破壊株を作製し、その膜画分に対するグルコシダーゼ活性測定を行った。その結果、 β サブユニット破壊株の膜画分は pNP-Glc に対する加水分解活性を示したことから、麹菌の G-II において α サブユニットが活性ドメインとして機能していることが示された。一方、N-結合型糖鎖を基質とした際には、糖切断活性は認められなかった。ここに α サブユニット破壊株の膜画分を加えたところ、糖切断活性が認められた。即ち、 β サブユニットは N-結合型糖鎖のグルコース切断に必須であり、その機能は N-結合型糖鎖の認識であることが示唆された。

1) Watanabe, T. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2688 (2007)

2) Totani, K. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **281**, 31502 (2006)

Analysis of glucosidase II derived from *Aspergillus oryzae* using N-glycan-conjugated probes

Taisuke Watanabe¹, Kiichiro Totani^{1,2}, Ichiro Matsuo^{1,3}, Jun-ichi Maruyama⁴, Katsuhiko Kitamoto⁴, Yukishige Ito¹ (RIKEN¹, Dept. of Materials and Life Science, Seikei Univ.², Dept. of Chemistry and Chemical Biology, Gunma Univ.³, Dept. of Biotechnology, The Univ. of Tokyo⁴)

P-59

麹菌 *palF* の機能解析

北川治恵, 佐野元昭, 小林亜紀子, 織田健, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)

<目的> 麹菌 *Aspergillus oryzae* の生産するアルカリプロテアーゼ(ALP)は、醤油醸造において重要な酵素の1つである。ALPの生産量を適正にコントロールすることは醤油醸造において極めて重要である。そこで今回、ALPの制御機構の解明を行うため、ALPの発現制御に関わる転写因子 *pacC* の活性化に関与する *palF* に注目し解析を行ったので報告する。

<方法および結果> ホモロジー解析により *A. oryzae* の *palF* 遺伝子の特定を行った後、5'-RACEにより開始コドンと推定しORFの決定を行った。その後、相同組換え効率が上昇している $\Delta ligD \Delta pyrG$ 株を宿主に用いて、*palF* 遺伝子破壊株を作製した。作製した $\Delta palF$ 株で、*palA*、*palB*、*pacC* 遺伝子発現への影響を解析した。

1) 佐野ら : 第60回日本生物工学大会講演要旨集 p150

Characterization of *palF* gene from *Aspergillus oryzae*

Harue Kitagawa, Motoaki Sano, Akiko Kobayashi, Ken Oda, Shinichi Ohashi (KIST)

P-60

麹菌 *palH* 遺伝子の機能解析

井上やよい, 堂本光子, 佐野元昭, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)

【目的】日本古来の発酵食品である醤油醸造において、アルカリプロテアーゼを高生産することにより醤油を効率よく醸造することが可能となる。本研究では、アルカリプロテアーゼ制御に関与する転写因子 *pacC* 遺伝子とそのシグナル経路に注目して解析をすすめた。*Aspergillus nidulans* の解析により、外界のpHを感知する因子 *palH*、*palI*、そのシグナルを *pacC* に伝達する *palA*、*palB*、*palC*、*palF* の存在が明らかとなっている。しかし、麹菌 *A. oryzae* では、この一連の経路が明らかとなっていない。そこで、本研究では *A. oryzae* の *palH* 遺伝子に注目し、その機能解析を行なったので報告する。

【方法・結果】*A. oryzae* の全ゲノム配列が明らかになったものの、*palH* 遺伝子は見つかっていない。そこで、*A. nidulans* の *palH* 遺伝子との相同性により *A. oryzae* の *palH* 遺伝子を取得した。*A. oryzae* の *palH* 遺伝子と *A. nidulans* の *palH* 遺伝子との、アミノ酸配列上の相同性を確認したところ、58%の相同性が認められた。その後、Fusion PCR法を用いて *A. oryzae* の *palH* 遺伝子破壊株を作製した。まずアルカリ条件下における *palH* 遺伝子破壊株の生育をみるために、pHの異なる寒天培地で培養させたところ、pH8.3付近において生育がみられなくなった。このことから、*palH* は生育にも大きな影響を及ぼしていると考えられる。現在、*palH* 遺伝子破壊株において、*pacC* 遺伝子とそのシグナル経路に関与する遺伝子への影響も解析している。

Comprehensive analysis of *palH* in *Aspergillus oryzae*.

Yayoi Inoue, Mitsuko Dohmoto, Motoaki Sano, Shinichi Ohashi (K.I.T)

P-61

大豆オカラを分解する麹菌遺伝子群のアレイ解析

桐藤万裕、福井裕太、鈴木晃、舟津尚志、佐野元昭、尾関健二、大箸信一（金沢工大・ゲノム研）

【目的】大豆オカラは血糖値上昇抑制効果の機能性を持ったアラビノースやキシロースを構成糖とするヘミセルロースを含んでいる。しかし、ヘミセルロースはセルロースやペクチン質などが複雑に絡み合った不溶性の食物繊維として存在し、分解することが困難である。このような性質から、これらの素材はほとんど利用されることなく、食品廃棄物として処理されているのが現状である。

そこで、本研究では安全かつ多種多様な酵素を分泌し、まだ多くの遺伝子の機能が解明されていない麹菌を用いて不溶性食物繊維の分解を目指す。その分解に関係する遺伝子群を DNA マイクロアレイにおいて網羅的に解析し、利用することを目的とする。

【方法および結果】大豆オカラと豆乳入りの液体培地と高濃度寒天培地それぞれにおいて RIB40 を培養した。そこから標識した cDNA を調整し、DNA マイクロアレイにハイブリダイゼーション後、スキャニングして外側の大豆オカラで発現する遺伝子の解析を行った。

大豆オカラでは豆乳に比べ、多くの遺伝子発現が見られた。また大豆オカラと同様の方法で小麦フスマ、米ヌカの発現解析では、3 素材共通の遺伝子は液体培養で 10 種類見つかった。

さらに大豆オカラ培地において誘導されたタンパク質と DNA マイクロアレイで高発現した遺伝子の関係や市販酵素剤による大豆オカラの分解能についても報告する。

Microarray analysis of the catabolic enzymes in soybean okara culture of *Aspergillus oryzae*.

Kazuhiro Kirifuji, Yuta Fukui, Akira Suzuki, Takashi Funadu, Motoaki Sano, Kenji Ozeki, Shinichi Ohashi (KIT)

P-62

鰹を分解する麹菌遺伝子群のアレイ解析

尾関健二、佐野元昭、横山定治 1, 大箸信一（金沢工大・ゲノム研, 1 ヤマキ株）

<目的>我々は米ヌカ、小麦フスマ、大豆オカラを可溶化する麹菌遺伝子群の解析と利用研究を進めている。しかしながらこれらの原料は植物性であり、動物性原料では特にタンパク質の分解遺伝子群の発現が異なることが予想される。本研究では、鰹を分解する条件で発現する麹菌遺伝子群を解析することにより、動物性タンパク質の分解に関連するプロテアーゼ遺伝子群がどの程度あるかを推定し、利用することを目的としている。

<方法および結果>動物性タンパク質として鰹を利用し、鰹の分解に関連する麹菌遺伝子群について DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析を行った。鰹麴で中性プロテアーゼ活性を高める製麴条件を検討し、その麴から RNA 調製は至らなかった。種々検討を繰り返して、製麴開始から 30℃で 5 日目の鰹麴から RNA を調製することが可能となった。また比較実験として植物原料として小麦フスマでも同様な培養条件から RNA を調製しアレイ解析を行った。アレイ解析の結果、鰹麴で特異的に発現する麹菌遺伝子数は 1800 程度であることが分かった。また鰹麴で特異的に発現するプロテアーゼ遺伝子は十数種類あることが分かった。現在これらの特異的遺伝子群の解析を進めている。

Microarray analysis of the catabolic enzymes in bonito culture of *Aspergillus oryzae*.

Kenji Ozeki, Motoaki Sano, 1Sadaji Yokoyama, Shinichi Ohashi (KIT, 1 Yamaki Co.)

P-63

小麦フスマを分解する麹菌遺伝子群のアレイ解析

山岡隼人, 杉浦浩二, 辰口友則, 金森一剛, 佐野元昭, 柏木豊¹, 瀧井幸男², 尾関健二, 大箸信一
(金沢工大・ゲノム研、¹食品総合研究所、²武庫川女子大学)

【目的】小麦フスマは、大半がヘミセルロース、セルロース、ペクチン質などの不溶性食物繊維であり、分解しにくい産業廃棄物に近い状況となっている。このヘミセルロースを分解できれば、血糖値上昇の抑制など機能性があるアラビノースやキシロースを生産できることが判明しているが、現在の市販酵素剤ではアラビノースやキシロースは2割程度しか遊離できていない。よって、安全かつ多種多様な酵素を分泌する糸状菌である麹菌を用い、ヘミセルロース分解酵素遺伝子を解明し、不溶性食物繊維から有効利用可能な機能性糖類の高生産を行うことを目的とした。

【方法・結果】本研究では、小麦フスマの分解に関係のある麹菌遺伝子群について DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析をおこなった。また、不溶性食物繊維を多く含む大豆オカラ、米ヌカとの比較をおこなった。その結果、小麦フスマ、大豆オカラ、米ヌカの液体培地、寒天培地で強く発現した遺伝子群を解析できた。また小麦フスマ、大豆オカラ培地で強く発現した共通遺伝子と、米ヌカを含めた3者の共通遺伝子を見つけることができた。

本研究は平成18年度(財)飯島財団の研究助成を受けたものである。

Microarray analysis of the catabolic enzymes in wheat bran culture of *Aspergillus oryzae*.

Hayato Yamaoka, Koji Sugiura, Tomonori Tatsuguchi, Kazutake Kanamori, Motoaki Sano, 1 Yutaka Kashiwagi, 2 Yukio Takii, Kenji Ozeki, Shinichi Ohashi (KIT, 1 Natl Food Res Inst, 2 Mukogawa Women's Univ)

P-64

大吟醸米麹のゲノムワイドな解析

福原真一郎^{1,2}, 大北由佳², 河野美乃里², 西浦未華^{1,2}, 富村健太³, 山田修², 岩下和裕^{1,2}, 三上重明²
(¹広島大、²酒総研、³農研機構)

【背景・目的】清酒醸造において、麹は清酒の香味を左右する重要な要素であると考えられている。しかしながら、菌株の選択や培養の制御などにおいて、経験則に依存している部分が数多く存在し、十分に解明されているとは言えない。本研究では、大吟醸麹菌と普通麹菌の違いを解明することを目的とし、麹菌 DNAchip を用いてこれらのゲノム構造の違い、および遺伝子発現の違いについて解析を行った。

【方法・結果】まず、吟醸用麹菌のゲノム構造の解析を行った。大吟醸用麹から単離した麹菌からゲノム DNA を抽出し、これを麹菌 DNAchip により、ゲノムハイブリダイゼーション解析を行い、これまでに解析していた麹菌 RIB 株との比較を行った。その結果、吟醸用麹菌は、清酒用麹菌スタンダードとして解析されてきた RIB128 株とは大きく異なるクラスターに位置しており、ゲノム構造が大きく異なることが示唆された。また、これまでに我々のグループでは、70%精米の日本晴を使用し、麹菌 RIB128 株により普通麹を製麹し、全遺伝子発現と出麹のプロテオーム解析を行っている。そこで今回、単離した大吟醸麹菌を用い、大吟醸麹を製麹し、普通麹との比較解析を行った。40%山田錦を原料として、盛、仲仕事、仕舞仕事、最高温度、出麹の時点でサンプリングを行い、RNA の調製後、麹菌 DNAchip により解析を行った。また、出麹についてタンパク質抽出を行い、2次元電気泳動によるプロファイリングを行った。その結果、全遺伝子発現、タンパク質生産プロファイルともに異なることが明らかになった。大吟醸麹ではアミノ酸代謝に関わる遺伝子群などの発現量が高く、普通麹では、脂質代謝に関わる遺伝子群などが高発現していた。今回の研究で、大吟醸麹と普通麹の差異がゲノムワイドなスケールではじめて明らかにされた。

The genome wide analysis of *Ginjo-Koji*

Shinichiro Fukuhara^{1,2}, Yuka Okita², Minoru Kono², Mika Nishiura^{1,2}, Kenta Tomimura³, Osamu Yamada², Kazuhiro Iwashita^{1,2}, Shigeaki Mikami² (1 Hiroshima Univ., 2 NRIB, 3 NARO)

P-65

麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 のイントロン構造の解析

小松智代¹, 小池英明¹, 小高正人¹, 大山彰², 町田雅之¹ (¹産総研,²インシリコバイオロジー)

DNA シークエンスの効率化と低コスト化により、比較的ゲノムサイズが大きい真核微生物だけでも 100 種以上のゲノム解析が進行している。ゲノム情報の蓄積が加速する一方で、比較ゲノム解析の方法論はまだ十分とは言えない先端領域であり、今後の手法の開発が必要である。統計解析だけでなく、様々な試行錯誤をビジュアルに表現して、人間のパターン認識力を駆使する新たな方法論が重要と考え、本研究ではグラフィカルな表示に優れたソフトウェア IMC をベースとして、発表者らも関与した麹菌のゲノム配列を中心として解析し、比較ゲノムに必要な機能を付加して解析している。

エキソン-イントロン構造の同定はゲノム解析の第一段階であるが、自動的な同定では誤りを避けることは難しい。必要に応じて境界を再同定するため、視覚的に支援するツールが重要と考えている。境界を確定する基礎として、麹菌のイントロン配列のモチーフ解析を行い、イントロン構造の特徴を解析した。ゲノム配列と EST 配列の比較から、確実と考えられた約 1000 個のイントロン配列を抽出し、5'切断部位、3'切断部位、ブランチサイトのコンセンサス配列や構造的特徴を見出した。さらに、ゲノム解析の結果同定され、麹菌ゲノムのデータベースに登録されている約 20000 のイントロン配列でのモチーフなどイントロンの特徴の保存性を調べ、一部を実験的に検証した。現在、ゲノム配列からエキソン-イントロン構造を再同定しビジュアル表示するツールを開発中である。

Analysis of intron structure of *Aspergillus oryzae*

Tomoyo Komatsu¹, Hideaki Koike¹, Masato Kodaka¹, Akira Ohyama² and Masayuki Machida¹ (¹AIST, ²Insilico Biology)

P-66

培養条件特異的な発現を示す麹菌遺伝子の解析

戸田智美¹, 寺林靖宣¹, 大澤靖子¹, 石井智子¹, 小池英明¹, 小川真弘², 徳岡昌文², 高橋 理², 小山泰二², 町田雅之¹ (¹産総研,²野田産研)

麹菌は様々な培養条件下で生育し、培養条件に応答して特徴的な遺伝子発現パターンを示す。たとえば、醸造発酵産業で用いられる固体培養では酵素生産に関与すると考えられる遺伝子が多く発現し、それらは転写制御因子によって複雑に制御を受けている可能性が示唆されている。しかしながら、それらの遺伝子のうちの多くは機能未知であり、発現制御機構については不明な点が多い。本研究では、麹菌 DNA マイクロアレイの結果をもとに、多様な培養条件下での麹菌の遺伝子発現プロファイルを比較し、各条件に特異的な発現を示す遺伝子の機能及び制御について解析した。いずれかの培養条件で有意に変化した遺伝子を統計学的に解析したところ、培養条件特異的に制御されるいくつかの遺伝子群に分類することができた。このうち、固体培養で特異的に発現誘導された遺伝子は、麹菌に特有のゲノム領域 (Non-syntenic blocks, NSBs) に多く局在することが明らかとなった。現在、これらの転写制御に関連すると推測される遺伝子の破壊株を作製するとともにその制御機構の解明に取り組んでいる。

Expression analysis of genes specifically regulated responding to culture conditions in *Aspergillus oryzae*

Tomomi Toda¹, Yasunobu Terabayashi¹, Yasuko Oosawa¹, Tomoko Ishii¹, Hideaki Koike¹, Masahiro Ogawa², Masafumi Tokuoka², Tadashi Takahashi², Yasuji Koyama² and Masayuki Machida¹ (¹AIST, ²NISR)

P-67

麹菌(*Aspergillus oryzae*)分生胞子のストレス処理による mRNA スプライシング阻害と DNA トランスポゾン *Crawler* の転移活性化

小笠原博信¹、秦 洋二²、高橋砂織¹、五味勝也³

(¹秋田県農技セ・総食研、²月桂冠・総研、³東北大院農・生物産業創成)

【目的】麹菌の活性型 DNA トランスポゾン *Crawler* は、分生胞子での Cu^{2+} や高温などのストレス処理によって転移活性を発現する。このとき、*Crawler*-mRNA はスプライシングや poly(A) 付加を受けた不完全な分子種が減少しインタクトな全長 mRNA 比率が増加することが認められ、*Crawler* の転移促進につながるものと推定された¹⁾。そこで、トランスポゾン転移活性に対する制御機構の解明を目的に、*Crawler* 転移条件下での種々遺伝子の mRNA スプライシングに及ぼすストレス処理の影響について検討した。

【方法と結果】転移促進を引き起こす Cu^{2+} や高温ストレス処理後の分生胞子より total RNA を抽出し、RT-PCR によりスプライシングの有無を観察した。その結果、*gpdA* など代謝に関わる遺伝子ではストレスにより発現量の低下はあるものの正常なスプライシングを受けていることが認められた。一方、*actin* などの細胞構造に関わる遺伝子ではスプライシングが阻害された mRNA が検出された。さらに、スプライシング・ファクターに関連する遺伝子においても、 Cu^{2+} および高温ストレスによって多くの遺伝子でスプライシング阻害が起きていることが明らかとなったことから、スプライシング・ファクターの機能阻害により *Crawler* の転移活性化が促進されるものと推定された。 1)小笠原・他，糸状菌分子生物学コンファレンス要旨,p52(2007)

Effects of stress stimuli on inhibition of mRNA splicing and transposability of DNA transposon *Crawler* in *Aspergillus oryzae* conidiospores.

Hironobu Ogasawara¹, Yoji Hata², Saori Takahashi¹, Katsuya Gomi³

(¹ Inst. Food & Brewing, Akita Pref. Agric., Forest. and Fish. Res. Center, ² Res. Inst., Gekkeikan Sake Co. Ltd, ³ Div. Biosci. Biotech. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.,)

P-68

Aspergillus nidulans の硝酸還元酵素遺伝子(*niaD*)の低酸素条件下での転写制御

梶尾俊介, 藤井達也, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

これまでに我々は、糸状菌 *Aspergillus nidulans* の *niaD* の転写が低酸素条件下で誘導されることを明らかとしてきた。本研究では、引き続き低酸素条件下での *niaD* の転写制御機構の解析を行った。低酸素条件下、窒素源を尿素とした異なる鉄濃度の最少培地で培養した *A. nidulans* の *niaD* の発現をリアルタイム PCR を用いて解析したところ、*niaD* の発現は培地中の鉄濃度の増加に伴い高くなった。また、転写制御因子 HapB および HapX の遺伝子破壊株を作製し、低酸素条件下で培養したところ、*niaD* の発現は、野生型株に比べ $\Delta hapB$ 株では低く、 $\Delta hapX$ 株では高かった。以上のことから、低酸素条件下での *niaD* の転写は、HapB により誘導され、HapX により抑制されることが示唆された。なお、これらの現象は好気条件下では見られないことから、低酸素条件下に特異的なものであると考えられた。HapX は HapB/C/E 複合体に結合することで遺伝子発現を抑制するが、細胞内の鉄により HapB/C/E 複合体から離れることが知られている。何らかの機構によって低酸素条件下で細胞内の鉄濃度が増加し、HapB/C/E 複合体を介した *niaD* の転写活性化が起こる可能性が考えられる。

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

Shunsuke Masuo, Tatsuya Fujii, Naoki Takaya

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

P-69

Trichoderma reesei のセルラーゼ遺伝子誘導発現における転写調節因子群の役割

北上巨樹, 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)

【目的】糸状菌 *T. reesei* のセルラーゼはセルロースおよびその誘導体の存在下でのみ生産される。誘導条件下ではセルラーゼの遺伝子群が同調して発現すること、それぞれの遺伝子の比率は異なる誘導物質を用いた場合でも変化しないことから、共通の機構によって転写レベルで制御されていると考えられている。この誘導発現において、転写調節因子 Xyr1、ACEI および ACEII が見出されている。そのうち、Xyr1 はセルラーゼ遺伝子群の転写活性化における中心的な役割を担っていることが示唆されている。また、ACEI は誘導条件下での転写抑制、ACEII は誘導初期での転写活性化に関与すると推測されている。しかしながら、これらの知見は一部のセルラーゼ遺伝子を対象とした解析の結果から得られたものであり、すべてのセルラーゼ遺伝子の同調した誘導発現においてそれぞれの転写調節因子がどのように寄与しているのかは全く明らかとなっていない。そこで、本研究では *xyr1*、*ace1* および *ace2* 破壊株のすべてのセルラーゼ遺伝子の発現パターンを解析し、誘導発現における個々の転写調節因子の役割を明らかにすることを目的としている。

【方法と結果】*xyr1*、*ace1* および *ace2* の構造遺伝子内にアセトアミダーゼ遺伝子(*amdS*)を挿入した遺伝子破壊用 DNA 断片を構築した。これらの DNA 断片をプロトプラスト PEG 法により導入し、アセトアミド資化能により形質転換体を取得した。得られた *xyr1* 破壊株のセルラーゼ遺伝子群の転写量を測定したところ、ほとんどの遺伝子が誘導されなかった。しかしながら、*cel5b* の転写量のみは野生株と比較して有意な差がなく、Xyr1 の支配下でない遺伝子であることが明らかとなった。現在、*ace1* および *ace2* 破壊株の遺伝子発現パターンを解析中である。

Role of transcriptional regulators on cellulase induction in *Trichoderma reesei*

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

P-70

Trichoderma reesei 由来 Xyr1 の結合配列認識

古川隆紀, 志田洋介, 岡田宏文, 小笠原 渉, 森川 康
(長岡技科大・生物)

【目的】*Trichoderma reesei* の xylanase regulator1(Xyr1)は $Zn(II)_2Cys_6$ 型の DNA 結合ドメインを有する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 はインバーテッドリピート構造の 5'GGCTAA3'配列 (5'GGCTAA-N10-TTAGCC3') に結合することが報告されてきた。しかし、機能的な Xyr1 結合配列に関する情報は少なく、結合様式を含めその詳細は不明である。我々は最近 Xyr1 支配下にある遺伝子上流領域の解析から、同因子が 5'GGC(A/T)₃'配列に結合することを明らかにしており、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と考えている。本研究では Xyr1 の結合配列認識に関する知見を得ることを目的とし、結合に重要な塩基の特定を試みた。

【方法と結果】coiled-coil 領域を含む Xyr1 の DNA 結合ドメインを GST 融合タンパクとして発現させ、アフィニティークロマトグラフィーにより Xyr1(55~195)を精製した。キシラナーゼ III 遺伝子上流の機能的な Xyr1 結合配列 (5'GGCAAA3') を含む 22bp の領域を解析対象として選抜し、5'側から連続的に変異を導入した DNA プローブを作製した。これらのプローブに対する Xyr1(55~195)の結合親和性をゲルシフト法にて解析し、それぞれの塩基が Xyr1 の結合に与える影響を評価した。その結果、 $Zn(II)_2Cys_6$ 型転写因子の DNA 結合に重要とされている GGC トリプレットに加え、その 3'下流の 6 塩基が結合に重要であることが明らかとなった。現在、フットプリント法を用いてさらなる解析を進めている。

In vitro analysis of the Xyr1 recognition sequences

Takanori Furukawa, Yosuke Shida, Hirofumi Okada, Wataru Ogasawara, Yasushi Morikawa
(Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.)

P-71

麹菌の ABC トランスポーター遺伝子 *atrA* のプロモーター解析

大場歩, 三浦大介, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・生物産業創成)

麹菌のアゾール系薬剤に対して耐性を示す自然突然変異株において、薬剤存在下で 3 種類の ATP-Binding Cassette (ABC) transporter 遺伝子の発現が同時に上昇していることが見いだされた。このことから 3 種類の ABC transporter 遺伝子を同時に制御する共通の転写因子の存在が示唆されたので、それらの遺伝子のプロモーター解析を行った。その結果、酵母の多剤薬剤耐性に関わる ABC transporter 遺伝子の発現を制御する転写因子 PDR1/PDR3 が結合するシスエレメントに類似した配列の関与が示唆された。麹菌ゲノムデータから見出された PDR1/PDR3 の zinc finger motif に相同性の高い遺伝子のうち、1 種類を高発現させたところ野生株が薬剤耐性を獲得し、一方でその遺伝子を破壊することにより薬剤に超感受性を示すようになった。高発現株と破壊株のマイクロアレイ解析と定量 PCR により、前に述べた 3 種類の ABC transporter 遺伝子の発現に影響が見られたことから、この転写因子を ABC transporter regulator(AtrR)と命名した。本研究では、AtrR の機能解析の一環として ABC トランスポーター遺伝子プロモーターに存在するシスエレメント配列を明らかにするために、プロモーター領域の欠失および塩基置換変異による解析を行った。以前の解析から予測された配列の欠失や部位特異的に塩基置換を行った株でレポーターアッセイを行ったところ、コンセンサス配列に変異を加えたもので活性の大きな減少が見られた。今後、ゲルシフトアッセイによりシスエレメントの同定を行う予定である。

Promoter analysis of an ABC transporter encoding gene (*atrA*) of *Aspergillus oryzae*

Ayumi Ohba, Daisuke Miura, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-72

麹菌のマルトース資化における *MAL* cluster と *MAL* homolog cluster 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】日本の醸造産業において、麹菌の生産するアミラーゼ系酵素は古くから利用されてきた重要な特徴である。アミラーゼ系酵素は、デンプン、マルトースの存在下で転写因子 AmyR により正の制御を受けるが、私たちはこれまで、マルトース資化には AmyR 非依存的な制御機構を持つ *MAL* cluster が主に機能しており、さらに誘導初期のアミラーゼ系酵素生産へも関与していることを示唆している。本研究では、この *MAL* cluster 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発現制御機構の解明により麹菌の最大の特徴であるアミラーゼ系酵素生産の炭素源取り込みから酵素生産までの経路を総合的に明らかにすることを目的とし、マルトース資化に関与する *MAL* cluster とその homolog cluster の機能解析を行った。

【結果】*MAL* cluster を構成する *malP*、*malT* および *malR* をそれぞれ破壊すると、*malP*、*malR* 破壊株ではマルトース取り込み活性が低下し α -アミラーゼ活性も低下するが、培養時間の経過に伴い徐々に活性の回復が見られた。この原因を探るため誘導初期と後半でのマイクロアレイを行ったところ、*MAL* cluster の homolog 遺伝子が cluster を形成しており、それらの遺伝子発現が上昇している傾向を見出した。そこで、*malP* 破壊株、*malR* 破壊株における homolog cluster 遺伝子の定量 PCR やノーザン解析により、homolog cluster が機能相補する可能性を検討している。

Correlation of *MAL* cluster and *MAL* homolog cluster in maltose utilization in *A. oryzae*

Sachiko Hasegawa, Katsuya Gomi

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

P-73

EST 配列データを利用した麴菌における poly(A) 付加シグナルの解析

田中瑞己¹, 酒井義文¹, 山田修², 新谷尚弘¹, 五味勝也¹ (¹東北大院農・生物産業創成, ²酒総研)

真核生物において poly(A) 付加部位は付加される部位の 10~30 nt 上流に存在する poly(A) 付加シグナルによって決定される事が知られている。我々はこれまでに、麴菌において AT-rich な異種遺伝子を発現させた場合、ORF 内に poly(A) 鎖が付加した異常な mRNA が産出される事を明らかとしてきた。しかし、これらの異種遺伝子 ORF 内には真核生物において poly(A) 付加シグナルとして機能する事が知られている AAUAAA 配列は存在しない。そこで、麴菌 EST 配列データを利用して麴菌の poly(A) 付加シグナルを明らかとする事を目的として配列解析を行った。麴菌 EST 配列データより、遺伝子の下流 1000 nt 以内に poly(A) 鎖が付加している EST 配列を 1073 個取得した。Poly(A) 付加シグナルとして機能する可能性のある配列を調べるため、poly(A) 付加部位上流 100 nt の領域において保存されている配列を探索した結果、AATAAA 配列が存在する EST 配列は僅か 3.7% しか存在せず、他の配列についても保存性の高い特定の配列は見いだされなかった。一方、各塩基の使用頻度を調べた結果、麴菌遺伝子の GC 含量が約 56% であるのに対し、poly(A) 付加部位上流では T の使用頻度が全体の 33% と著しく高い事が明らかとなった。さらに、poly(A) 付加部位の上流 10~30 nt 上流の領域においては A の使用頻度が他の領域よりも高い傾向が見いだされた。以上の結果から、麴菌においては保存性の高い特定の poly(A) 付加シグナル配列は存在しないものの、poly(A) 付加部位上流の U-rich な領域と 10~30 nt 上流に存在する A-rich な配列要素によって poly(A) 付加部位が決定される可能性が示唆された。

Identification of putative polyadenylation signals in *A. oryzae* using EST data

Mizuki Tanaka¹, Yoshifumi Sakai¹, Osamu Yamada², Takahiro Shintani¹, Katsuya Gomi¹

(¹Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²NRIB)

P-74

紫外線による *Neurospora crassa* DNA 修復遺伝子の発現誘導の解析

高橋 司, 中居哲史, 藤村 真, 一石昭彦 (東洋大・生命科)

アカパンカビにはDNAの紫外線損傷を修復するメカニズムとして、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER)、紫外線損傷特異的除去修復 (UV dependent repair; UVDR)、光回復の3つの修復機構が存在する。ヒトや酵母等では、紫外線損傷の除去に関与するDNA修復遺伝子の一部が紫外線により発現誘導されることが報告されている。しかし、アカパンカビではDNA修復遺伝子の破壊株が作製され紫外線感受性など表現型解析は詳細に行われているが、これらの遺伝子の紫外線(変異源)による発現誘導の網羅的解析はほとんど行われていない。そこで本研究では、紫外線がアカパンカビのDNA修復遺伝子の発現に影響を及ぼすかを検証するため、リアルタイムPCR法を用いて発現解析を行った。その結果、NER遺伝子である*mus-40*と*mus-43*遺伝子は紫外線照射により発現量が約16倍増加しており、発現が誘導されることが解った。また、NER遺伝子である*mus-44*遺伝子も約2~3倍増加し、若干の誘導が確認された。一方、UVDR遺伝子である*mus-18*、NER遺伝子である*mus-38*遺伝子は紫外線による発現量の変化は観られなかった。また最近、アカパンカビの浸透圧ストレス応答に関与するシグナル伝達経路であるOS経路が、浸透圧以外のストレスシグナルも受けている可能性が示唆されている。そこで、この経路と紫外線ストレスの関係を調べるため紫外線感受性試験を行ったところ、この経路の遺伝子を欠損した破壊株は紫外線に対し強い感受性を示すことが解った。現在さらに、DNA修復遺伝子の発現誘導を解析中である。

Expression analysis of DNA repair genes in *Neurospora crassa* during UV irradiation.

Tsukasa Takahashi, Satoshi Nakai, Makoto Fujimura, Akihiko Ichiishi (Fac.of Life Sciences, Toyo Univ.)

P-75

ファージディスプレイ法を用いた **neoechinulin A** 結合性ペプチド配列の探索

八木毅郎, 堀内桃子, 鎌倉高志 (東理大院・応生科)

neoechinulin A はパーオキシナイトライトのみに特異的に抗酸化作用を示す *Aspergillus rubber* が生産する微生物二次代謝産物である。また近年、neoechinulin A が神経細胞に対して特異的に作用して神経保護作用を示すことが報告されている。そこで本研究では、これら興味深い活性をもっている neoechinulin A の生合成に関する遺伝子や標的分子のファージディスプレイ法を用いた単離と解析を目指した。その結果、生合成に関する遺伝子として NRPS(non-ribosomal peptide synthetase)等、及び標的分子として keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1)等とアミノ酸レベルで高い相同性が見られた。NRPS と相同性を示したペプチド配列を大腸菌を利用して発現生産し、neoechinulin A ビオチン化誘導体との結合を表面プラズモン共鳴装置(Biacore 3000)で確認した結果、neoechinulin A ビオチン化誘導体と結合し得ると考えた。これらの結果からファージディスプレイ法が標的分子の単離・解析の方法のみならず、二次代謝産物の生合成に関する遺伝子の単離する新たな方法として応用できることが期待される。

Search for The Neoechinulin A binding Peptide Sequences by Using The Phage Display Technique

Takero Yagi, Momoko Horiuchi, Takashi Kamakura (Tokyo Univ. of Science)

P-76

Aspergillus nidulans におけるチトクロム *c* 遺伝子の転写制御機構

安藤榮里子, 杉山純也, 小林哲夫, 加藤雅士 (名大院生命農・生物機構)

【目的】我々は以前に DNA 結合因子 HapX を、糸状菌 CCAAT 結合因子(Hap 複合体)と相互作用する因子として発見した。Hap 複合体は様々な遺伝子の転写を制御する広域転写因子として知られているが、HapX の機能は未知であった。近年、オーストリア、ドイツのグループとの共同研究により、HapX は鉄欠乏時に鉄をコファクターとして含む酵素などの遺伝子の転写抑制因子であることを明らかにした。¹⁾これまでに、HapX は bZip 型の DNA 結合ドメインを有することがわかっており、すべての Hap 複合体結合部位と相互作用するわけではないことから、HapX も何らかの DNA 配列を認識し、結合することが示唆されていた。本研究では、すでに HapX が相互作用することが明らかとなっている *Aspergillus nidulans* のチトクロム *c* 遺伝子 (*cycA*) プロモータを用いて HapX の結合配列の同定を行った。

【方法と結果】大腸菌で発現させたリコンビナント HapX およびリコンビナント Hap 複合体を精製し、フットプリント解析および EMSA に用いた。*cycA* プロモーターにおけるフットプリント解析では、HapX の添加によって Hap 複合体のみのときよりも長い領域が保護されることが確認された。また、*cycA* プロモーター配列に様々な変異を導入したプローブを用いて EMSA 解析を行い、HapX の結合には CCAAT-box 上流の TGAT という配列が重要であることを明らかにした。現在、推定結合配列に変異を導入した *cycA* プロモーターに *lacZ* 遺伝子を融合して *A. nidulans* に導入し、*in vivo* での解析を進めている。

1)Hortschansky et al. EMBO J. 26, 3157-3168 (2007).

Transcriptional regulation of the cytochrome *c* gene in *Aspergillus nidulans*.

Eriko Ando, Junya Sugiyama, Tetsuo Kobayashi, Masashi Kato

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

P-77

DNA マイクロアレイによる AoXlnR2 制御下遺伝子群の網羅的同定

金田貴詳, 小川真弘¹, 野口祐司, 金丸京子, 加藤雅士, 小山泰二¹, 小林哲夫

(名大院生命農・生物機構, ¹野田産研)

麹菌 *Aspergillus oryzae* が有する転写因子 AoXlnR2(仮名)は、キシラン・セルロース代謝の正の制御因子 AoXlnR のホモログで、L-アラビノース代謝を制御する。本報告では、DNA マイクロアレイを用いて AoXlnR2 制御下遺伝子群の網羅的な同定を試みた。

L-アラビノース最小培地で *A. oryzae* IFO4206 の野生株と *AoxlnR2* 欠損株を培養し、遺伝子発現強度を比較することにより、AoXlnR2 依存的に L-アラビノースにより誘導される遺伝子を 55 個同定した。この遺伝子群には、推定 L-アラビノースレダクターゼや L-アラビニトールデヒドロゲナーゼといった L-アラビノース代謝に関わる酸化還元酵素遺伝子が含まれていた。また、GH family に分類される糖加水分解酵素遺伝子が 16 個含まれ、うち 3 個はアラビナン分解に携わるアラビナーゼの遺伝子をコードしていた。対照的に L-アラビノース存在下で AoXlnR2 以外の因子により転写促進される遺伝子を解析したところ 75 遺伝子が同定され、XynG2、XynF1、XylA のようなキシラナーゼがこれに含まれていた。

Comprehensive identification of the genes regulated by a novel XlnR-type transcription factor in *Aspergillus oryzae*.

Takayoshi Kanada, Masahiro Ogawa¹, Yuji Noguchi, Kyoko Kanamaru, Masashi Kato, Yasuji Koyama¹, Tetsuo Kobayashi (Dept. of Biological Mechanisms and Function, Grad. Sch. of Nagoya Univ., ¹Noda Institute for Scientific Research)

P-78

麹菌 2 次代謝物生産制御遺伝子 *laeA* 制御下の 2 次代謝クラスターの探索

¹織田健, ¹佐野元昭, ¹小林亜紀子, ²濱田涼子, ²岩下和裕, ¹大箸信一 (¹金沢工大・ゲノム研, ²酒総研)

2 次代謝制御遺伝子 *laeA* は、クロマチンリモデリングの制御に関与することでゲノムワイドに遺伝子の発現量を変化させている。また、2 次代謝生産のグローバルな制御に関与することが *Aspergillus* 属で報告されている。麹菌は多種多様な 2 次代謝産物を生産するが、その遺伝子クラスターが明らかとなっているものはごく一部で、*laeA* に制御される 2 次代謝産物生産に関与するクラスターの探索を行った。*laeA* 破壊株を宿主として EGFP を融合させた *LaeA* 高発現株の造成を行い、分生子形成能の回復などの表現型を確認した。3 日間の最少液体培地およびメンブレン培養後の菌体を回収して RNA を調製し、*laeA* 破壊株および高発現株のマイクロアレイ解析を行い、2 倍以上発現変動する遺伝子を抽出した。麹菌 2 次代謝クラスターを J.C.V.I. (旧 TIGR) の予測プログラム SMURF (<http://www.jcvi.org/smurf/index.php>) により推定したところ、57 個のクラスターが見出された。マイクロアレイの結果をマッピングすることにより *laeA* 制御下のクラスターの探索を行った結果、液体培養、メンブレン培養共に変動する遺伝子群としてシクロピアゾン酸クラスターが見出された。現在、他の培養条件での詳細な解析を進めている。

Analysis of secondary metabolite gene cluster regulated by *laeA* in *A. oryzae*

¹Ken Oda, ¹Motoaki Sano, ¹Akiko Kobayashi, ²Ryouko Hamada, ²Kazuhiro Iwashita, ¹Shinichi Ohashi (Kanazawa Inst. Tech., NRIB)

P-79

***Phanerochaete chrysosporium* のメタボロミクスデータからの知識発見**

梶井聡子 (九大院生資環), 三浦大典 (九大先端融合研究拠点), 一瀬博文 (九大院農), 割石博之 (九大院農・九大先端融合研究拠点・九大バイオアーク)

メタボロミクスは、ゲノム情報発現におけるプロセス情報ではなく、ゲノム情報の最終表現型ともいえる代謝物を対象とするため、その重要性が強く指摘されている。メタボロミクスの一手法であるメタボリック・プロファイリング (MP) とは、得られた網羅的代謝物データを多変量データとして扱い、統計学的に処理する方法である。膨大な代謝物データに MP を適用することにより、バイオマーカーの探索等が行われている。

本研究では、GC-MS データを用いた MP を白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の代謝解析に適用した。その結果、静置あるいは振盪培養を行った細胞を代謝物レベルで識別でき、静置培養で特異的に蓄積する 11 化合物および振盪培養にて特異的に蓄積する 8 化合物が見出された。

Metabolic profiling analysis of *Phanerochaete chrysosporium* cultured under several conditions

Satoko Kakoi (Dept. For. Prod. Sci., Kyushu Univ.), Daisuke Miura (Innov. Ctr. Med. Redox Navi., Kyushu Univ.), Hirofumi Ichinose (Dept. For. Prod. Sci., Kyushu Univ.), Hiroyuki Wariishi (Dept. For. Prod. Sci., Innov. Ctr. Med. Redox Navi., Bio-Arch. Ctr., Kyushu Univ.)

P-80

Geranylgeranyl diphosphate synthase gene essential for helvolic acid biosynthesis in *Metarhizium anisopliae*

Suthitar Singkaravanit, Hiroshi Kinoshita, Takuya Nihira (ICBiotech, Osaka Uni.)

Isoprenoids are representatives of bioactive compounds, such as gibberellin and carotenoids. Key enzyme for the isoprenoid biosynthesis is prenyltransferase which catalyzes the condensation of an elongation unit, isopentenyl pyrophosphate. We cloned two different geranylgeranyl diphosphate synthase genes (*ggs1* and *ggs2*) by PCR with degenerate primers from entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* which is a biological control agent against agriculture pest and is known to produce bioactive compounds. Transcriptional analysis showed constitutive expression of *ggs1* throughout growth, whereas *ggs2* expression was only detected from 5 days of cultivation, which corresponded to the late log phase, suggesting that *ggs2* was related to secondary metabolism. To analyze its function, the *ggs2* gene was disrupted by homologous recombination. In the *ggs2* disruptant, sporulation was delayed when grew on PDA medium and antibacterial activity on 802 medium was greatly decreased. Metabolites-comparison by C₁₈ HPLC revealed that one peak having antibacterial activity in the wild-type strain was missing in the *ggs2* disruptant, and the peak was verified as helvolic acid by ¹H-NMR and mass spectrometry. The native *ggs2* on plasmid complemented not only production of helvolic acid but also the delay in sporulation, demonstrating that *ggs2* is important for the biosynthesis of helvolic acid and morphological differentiation in *M. anisopliae*

P-81

Monacolin K 生合成遺伝子 *mokB* の機能解析

酒井香奈江, 木下浩, 仁平卓也 (阪大・生物学国際交流センター)

高脂血症薬として用いられているスタチン化合物 Monacolin K(lovastatin)は HMG-CoA reductase の阻害剤として働く物質で *Penicillium* 属 *Aspergillus* 属の他に *Monascus* 属糸状菌においても生産が報告されている。近年、相同性を元に *Monascus pilosus* において monacolin K(MK)生合成遺伝子クラスター (MK クラスター) が同定され、その遺伝子配列情報が利用可能になった。しかし、MK クラスター内にこれまでに見つかった 9 個の ORF(*mokA*~*I*)のうち機能解析が行われたのは 1 つ(*mokA*)だけであり、他の ORF については相同性による機能推定がなされたのみである。今後、この MK クラスターの遺伝子情報を利用して MK 大量生産、誘導体合成など、応用研究を行うには生合成経路のより詳細な情報が必要である。そこで MK クラスター内の遺伝子についてさらなる知見を得るため、*A. terreus* の LDKS と相同性を示す *mokB* の破壊を行い、破壊株における表現型を解析した。

HPLC 解析の結果、破壊株では MK 生産が見られなくなっており、さらに野生型株には見られないピークの蓄積が見られた。現在このピークについて解析を進めているところである。

Functional analysis of *mokB* gene involved in monacolin K biosynthesis

Kanae Sakai, Hiroshi Kinoshita, Takuya Nihira

(Osaka Univ., ICBiotech)

P-82

麴菌における *Monascus pilosus* 由来 monacolin K 生合成遺伝子クラスターの発現

酒井香奈江, 木下浩, 仁平卓也 (阪大・生物学国際交流センター)

近年のゲノム解析により糸状菌は染色体上に多数の二次代謝関連遺伝子を保有していることが明らかになり、糸状菌は生理活性物質の有力な探索源とみなされている。しかしその遺伝子数に比べ実際に生産が確認されている産物は大幅に少なく、遺伝子の多くは未発現と考えられる。この潜在的な二次代謝遺伝子資源の有効利用のために、二次代謝物質生産能に優れた宿主による異種発現系の構築が求められている。

本研究では培養に関する知見が豊富で高い物質生産性を有し、かつ形質転換等、遺伝子工学的手法が確立されている *A. oryzae* を宿主とし、コスミドをベクターとして用いた遺伝子発現系の構築を目指した。近年、*M. pilosus* より monacolin K(MK)生合成遺伝子クラスター (MK クラスター) が同定されたことから発現モデルとしてこの MK クラスター全長の *A. oryzae* への導入を試みた。全長をカバーできるコスミド2つを用いて MK クラスターを *A. oryzae* に導入したところ、形質転換体において導入遺伝子の転写は確認されたものの MK の生産は確認できなかった。そこで *A. oryzae* 由来の *laeA* 遺伝子強発現により *A. oryzae* の二次代謝を強化したところ、*A. oryzae* 形質転換体の培養液抽出物において HPLC で MK 標品と同じ位置に新たなピークが確認された。現在、この物質について解析を行っているところである。

Expression of monacolin K biosynthetic gene cluster in *Aspergillus oryzae*

Kanae Sakai, Hiroshi Kinoshita, Takuya Nihira

(Osaka Univ. ICBiotech)

P-83

高効率遺伝子発現系を用いた麹菌による有用物質の生産

¹丸井淳一郎, ¹大橋澄子, ¹安藤朋広, ¹町田雅之, ²西村麻里江, ¹小池英明 (¹産総研, ²生物研)

抗生物質のペニシリンをはじめ、糸状菌など微生物が生産する有用物質が人類にもたらした恩恵については計り知れないが、一方で、多剤耐性菌の問題など、現代社会においては、新しい機能を持った新規化合物へのニーズは更に増大している。我々は麹菌を生産宿主とし、内在する代謝経路や、それに加えて一部の反応を外来の類似遺伝子などに置き換えた経路を利用し、更にはそれら遺伝子の発現量を人為的に調節することで、新しい有用物質を効率的に生産するシステムの開発を行っている。本発表では、その基盤となる遺伝子発現系の構築と、それを用いた有用物質生産の試みについて報告する。

目的とする遺伝子を宿主内で様々な強度およびタイミングで発現させるため、構成的高発現型、条件特異的誘導型および条件特異的抑制型の遺伝子プロモーターをそれぞれ選択し、発現プラスミドを作製した。これら発現系に対して、麹菌由来か外来かを問わず、目的とする遺伝子を効率よくクローン化するための改変を行っている。現在、このシステムを用いて、麹菌に由来する有用物質の高生産化を試みており、その誘導体の生産についても検討する。なお、本研究は平成 19 年度 NEDO 産業技術研究助成事業の一環として実施した。

Utilization of the versatile gene expression system for secondary metabolite production in *Aspergillus oryzae*

¹Junihiko Marui, ¹ Sumiko Ohashi, ¹Tomohiro Ando, ¹Masayuki Machida, ²Marie Nishimura, ¹Hideaki Koike (¹AIST, ²NIAS)

P-84

麹菌における GABA 合成酵素遺伝子の解析と他生物との相同性比較

寺畑吏得子¹, 永廣美代子¹, 尾関清子², 尾関健二³, 新田陽子¹, 植野洋志¹
(¹奈良女大・生環・食物, ²奈良女大・院・基盤生活科学, ³金沢工大・ゲノム生物学研)

【目的】 麹菌のゲノム解析の結果より、 γ -アミノ酪酸 (GABA) 合成酵素、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) として 8 つの遺伝子がリストされている。高等生物では、GAD65 と GAD67 の 2 種類、大腸菌では、GAD_A と GAD_B の 2 種類のアイソフォームの存在が知られている。しかし、8 種類のアイソフォームの存在は他に類を見なく、個々の GAD の性質を明らかにする必要がある。また、近年、GABA は血圧抑制作用などにより健康食品の有効成分として注目されており、麹菌の GABA 生産の機構解明にもつながるものである。本研究では、8 つの GAD 遺伝子の解析を行い、予想されるタンパク質産物と高等生物・微生物由来の GAD との比較を行ったので報告する。

【方法】 麹菌のゲノムデータベースより、麹菌 GAD 遺伝子 No.1~No.8 を取得し、遺伝子配列を比較した。イントロン・エキソン解析を行った。予想されるタンパク質の一次構造比較を行った。麹菌の固体・液体培養を行い、可溶画分における GAD 活性の測定、Western blot による抗原性の検討を行った。また、8 つの GAD 遺伝子を組み込んだ発現ベクターの作成を試みた。

【結果】 麹菌 GAD 遺伝子 No.1~No.8 に関して、PLP 結合部位、イントロン・エキソン構造などをもとに相同性を比較した結果、高等動物型、植物型、酵母型、その他と分類できた。それぞれのクラスでの活性、抗原性について述べる。

Comparative study on GABA-synthesizing enzyme, glutamate decarboxylase, from *Aspergillus oryzae*

Rieko Terahata, Miyoko Nagahiro, Kiyoko Ozeki, Kenji Ozeki, Yoko Nitta, Hiroshi Ueno (Nara women's Univ.)

P-85

***Penicillium purpurogenum* IAM15392株におけるモノascus色素生合成遺伝子の同定、及び機能解析**

川島淳土, 新居鉄平, 小山善幸, 加藤順, 春見隆文, 荻原淳 (日大・生物資源)

【目的】 *Penicillium purpurogenum* IAM15392 株は特定培地条件下で新規アザフィン系モノascus色素同族体を生産する。本菌株による色素生合成系は *Monascus* spp. と比較して、メチル基転移反応やカルボキシル化反応が特徴的に発現している。本菌株及び、色素生産変異株を用いたプロテオーム解析の結果、色素生産に type I polyketide synthase (PKS) が関与することが示唆された。そこで、本研究では IAM15392 株のモノascus色素生合成系を明らかにするために、本菌株の PKS 遺伝子の機能解析を行うことを目的とした。

【方法及び結果】 *Penicillium citrinum*, *Xylaria* sp. BCC1067, *Aspergillus fumigatus* Af293 の PKS において保存性の高い領域のアミノ酸配列より縮重プライマーを設計し、PCR を行い PKS 遺伝子の部分的な配列情報を得た。さらに、この配列情報を含むクローンをゲノミックファージライブラリーより検索し、PKS 遺伝子の全長の配列情報を決定した。その結果、還元型 PKS に特徴的な KR,ER,DH ドメインを持つことが明らかになった。また、この配列情報より推定した KS ドメインのアミノ酸配列を用いて、neighbor-joining 法により系統樹を作成した結果、*Xylaria* sp. BCC 1067 の PKSKA1 とアミノ酸配列が最も近接していることが明らかとなった。これらのことから IAM15392 株由来 PKS 遺伝子は還元型 PKS であると推定した。現在、本菌株由来 PKS 遺伝子を異種糸状菌 *Aspergillus oryzae* を宿主としての発現を試みている。

Identification and functional characterization of *Monascus* pigment genes in *Penicillium purpurogenum* IAM15392

Atsushi Kawashima, Teppei Arai, Yoshiyuki Koyama, Jyn Kato, Takahumi Kasumi, Jun Ogihara
(Dept of Agricultural and Biological Chemistry, Nihon Univ)

P-86

トウモロコシごま葉枯病菌における 3 種の MAPK 遺伝子の網羅的機能解析

泉津弘佐, 吉見啓, 久保大輔, 田中千尋 (京大・院・農)

“シグナル伝達機構”は、細胞外の「情報」を認識し、適切な「応答」を行うために重要な役割を担っている。菌類は基本的に、分類群を超えて共通のシグナル伝達機構 (MAPK シグナル伝達経路, cAMP シグナル経路など) を保有している事が知られている。一方、認識すべき「情報」や、制御すべき「応答」は生存戦略に応じて大きく異なっている。よって、異なる生存戦略を持つ菌類における同一のシグナル伝達機構の比較研究は、重要な意義を持つと考えられる。

出芽酵母は 5 種類、麴菌は 4 種類の MAPK を保持しているのに対し、植物病原糸状菌類は一般的に 3 種類の MAPK (HOG1 型, KSS1 型, SLT2 型) を保有していることが知られている。本研究では、代表的な植物病原糸状菌であるトウモロコシごま葉枯病菌 *Cochliobolus heterostrophus* をモデルとして、3 種の MAPK (BmHog1, Chk1, BmSlit2) および関連因子の網羅的機能解析を行い、形態形成、ストレス応答、病原性に対する役割を調べた。

HOG1 型の BmHog1 経路は、高浸透圧ストレス適応に極めて重要な役割を持っていた。細胞内酸化ストレス (メナジオン) への適応や、分生子柄形成への影響も認められた。KSS1 型の Chk1 経路は、メラニン化、胞子形成、および有性生殖に極めて重要な役割を担っていた。さらに、細胞外酸化ストレス (H₂O₂) や重金属ストレスへの適応にも重要な役割を持っていた。SLT2 型の BmSlit2 経路も、メラニン化および胞子形成に極めて重要な役割を担っていた。いずれの経路も、宿主植物への病原性に関与していた。

本発表ではより詳しい考察を行いたい。

Functional analysis of three MAPK genes in *Cochliobolus heterostrophus*.

Kosuke Izumitsu, Akira Yoshimi, Daisuke Kubo, Chihiro Tanaka
(Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

P-87

灰色かび病菌における Hog1-MAPK シグナル伝達経路の機能解析

小林直, 泉津弘祐, 田中千尋 (京大・院・農)

菌類の細胞が周囲の環境変化に対して適切な応答を行う上で, MAPK シグナル伝達経路は非常に重要な役割を担っている. MAPK シグナル伝達経路については真菌類のモデル生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を中心に研究がすすめられてきた. 中でも Hog1-MAPK 経路(HOG 経路)は酵母のストレス応答に関与することから, その役割について詳細な研究がなされている. しかし, 植物病原性糸状菌の HOG 経路については未だ不明な点も多い. そこで, 植物病原性糸状菌である灰色かび病菌を用いて, HOG 経路の役割を調べた.

MAPK(BcSak1)・MAPKK(BcPbs2)・MAPKKK(BcSsk2)の遺伝子破壊株の表現型を詳細に調査した. その結果, 灰色かび病菌においても, 他菌種と同様に HOG 経路が高浸透圧適応とある種の殺菌剤の作用に関与していることが確認された. これら既知の働きに加えて, 調査した全ての遺伝子破壊株が病原性を完全に失ったことから, HOG 経路は本菌の病原性発現に必須であることが明らかとなった. また, 分生子が形成されず, 菌核形成にも異常が見られたことから, 形態形成の制御においても非常に重要な役割を果たしていることが示された. さらに, 二成分制御系のレスポンスレギュレーターBcSsk1 についても調査したところ, BcSak1, BcPbs2, BcSsk2, BcSsk1 の遺伝子破壊株の表現型は完全に一致した. このことから, HOG 経路は上記の働きに関してレスポンスレギュレーターBcSsk1 の制御を受けており, BcSsk1 と BcSak1 の間にはシグナルの分岐及び流入はないことが示唆された. 現在, HOG 経路が制御する下流の因子についても解析を進めている.

Functional analysis of Hog1-MAPK signaling pathway in *Botrytis cinerea*.

Hajime Kobayashi, Kosuke Izumitsu, Chihiro Tanaka

(Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

P-88

SST-REX (signal sequence trap by retrovirus-mediated expression screening)法を用いた *Aspergillus fumigatus* の細胞表層および分泌蛋白質の網羅的同定

山越 智, 橋本ゆき, 大川原明子, 田辺公一, 新見昌一, 大野秀明, 宮崎義継

(国立感染研 生物活性物質部)

アスペルギルス症の診断薬の開発, 治療を目指し, その主要な病原真菌である *Aspergillus fumigatus* の分泌蛋白質及び細胞表層の蛋白質を網羅的に同定し, 機能解析をすることを目的とした.

真核生物の蛋白質細胞内輸送メカニズムは種を越えて保存されている. そこで, 哺乳類で細胞膜および分泌蛋白質を網羅的に同定することができる SST-REX (signal sequence trap by retrovirus-mediated expression screening)法(Nature Biotechnology, 17, 487-490, 1999)を, *A. fumigatus* の細胞表層および分泌蛋白質の網羅的同定に応用した. YPD 培地および窒素源飢餓培地で培養した *A. fumigatus* から mRNA を調製し SST-REX 法に供した. 得られた遺伝子の解析により機能不明蛋白質 22 種類を含む 113 種類の遺伝子が同定され, その多くが分泌あるいは細胞表層蛋白質をコードすると推測された. 現在, 同定された遺伝子産物の性状解析を行っている.

SST-REX 法を用いることで, *A. fumigatus* の細胞表層および分泌蛋白質を効率よく網羅的に同定をすることができたと考えている.

Comprehensive analysis of extracellular proteins in *Aspergillus fumigatus* by SST-REX (signal sequence trap by retrovirus-mediated expression screening) method.

Satoshi Yamagoe, Yuki Hashimoto, Koichi Tanabe, Akiko Okawara, Masakazu Niimi, Hideaki Ohno, Yoshitsugu

Miyazaki (Dept. of Bioactive Molecules, NIID)

P-89

病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* の二成分シグナル伝達系に関する分子遺伝学的解析

清水公德¹、李皓曼¹、吉見哲^{2,3}、田中千尋³、阿部敬悦²、渡辺哲¹、亀井克彦¹、山口正視¹、川本進¹ (1 千葉大・真菌センター、2 東北大・未来研、3 京大院農・地域環境)

ハイブリッド型ヒスチジンキナーゼ(HHK) や応答レギュレータータンパク質 (RR) は二成分シグナル伝達系の構成タンパク質であり、薬剤耐性、浸透圧感受性、病原性、菌糸生育などを制御していることが知られている。病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* はゲノム中に7個の HHK 遺伝子、2個の RR 遺伝子をもつ。HHK 遺伝子の一つ *CnNIK1* 遺伝子はフェニルピロール系抗真菌物質フルジオキシニルに対する感受性を制御している。今回、*CnHHK2*、*CnHHK3*、*CnHHK5*、*CnHHK6*、*CnHHK7* (以上 HHK 遺伝子)、*CnSKN7*、*CnSSK1* (以上 RR 遺伝子) の機能を調べるため遺伝子破壊を行ったところ、*CnHHK4* を除く全ての遺伝子破壊株を得ることができた。HHK 遺伝子破壊株のうち、*CnHHK2*、*CnHHK5*、*CnHHK6*、*CnHHK7* 遺伝子破壊株は明確な表現型を示さなかったが、*CnHHK3* 遺伝子破壊株は高温および高浸透圧条件下において生育遅延が認められ、本遺伝子は温度や浸透圧適応に重要な役割を果たしていることが示唆された。RR 遺伝子に関しては、*CnSKN7*、*CnSSK1* 遺伝子破壊株はいずれも高温、高浸透圧に対して感受性を示し、また、フルジオキシニルに対して耐性であった。*C. neoformans* においては、温度、浸透圧、フェニルピロール系薬剤に対して、*CnNIK1*、*CnHHK3* および *CnSKN7*、*CnSSK1* が協調的に応答していることが示唆された。

Genetic analysis of the two-component signaling system in a pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*.

Kiminori Shimizu¹, Hao-Man Li¹, Akira Yoshimi^{2,3}, Chihiro Tanaka³, Keietsu Abe², Akira Watanabe¹, Katsuhiko Kamei¹, Masashi Yamaguchi¹, Susumu Kawamoto¹

(¹MMRC, Chiba Univ, ²NICHe, Tohoku Univ, ³Grad Sch Agric, Kyoto Univ)

P-90

いもち病菌におけるヒドロフォビン(Mpg1)の接着能力への影響

井上加奈子, 池田健一, 中屋敷均, 朴杓允 (神戸大学・農学研究科)

いもち病菌のヒドロフォビンをコードする *Mpg1* は、付着器形成や病原性に影響を及ぼすことが報告されている。しかしながら、ヒドロフォビンの病原性に関わる機構についてはよく理解されていない。ヒドロフォビンは菌体表面の主要な構成要因であることより、ヒドロフォビンと接着性との関連性について調査を行なった。糸状菌サイレンシングベクター-pSilent1 を用い、*Mpg1* のサイレンシング株を作製した。サイレンシングの程度を判定するため、ヒドロフォビンの疎水性の欠損程度を水や SDS 溶液の浸潤性によって評価した。それぞれの変異株の人工基質膜上における分化能力や接着性を調べた結果、分化に関してはいづれの変異株においても付着器形成は遅延し、接着性に関しては疎水性の低下に伴った接着阻害効果が認められた。また、感染過程での *Mpg1* による接着性の影響を調査する目的で、接種後 6 時間後に接種葉を水洗し、その後の病斑形成を調査したところ、サイレンシング株では接着率の低下に伴い感染の顕著な抑制が認められた。以上の結果から、ヒドロフォビンの疎水性が増すことで接着能力が高まり、それが強度に変異すると宿主上での病原性に影響が生じることが明らかとなった。

The effect of hydrophobin on adhesive ability in *Magnaporthe oryzae*.

Kanako Inoue, Ken-ichi Ikeda, Hitoshi Nakayashiki, Pyoyun Park

(Kobe, Univ. Agriculture, Dept.)

P-91

いもち病菌(*Magnaporthe grisea*)に新規作用を示す化合物の解析

森脇明弘¹, 吉村 巧^{2,3}, 阿部敬悦⁴, 西村麻里江¹ (¹生物研,²クミアイ化学工業(株),³(株)ケイ・アイ研究所,⁴東北大学 未来研)

化合物ライブラリーから選抜した化合物 KT-B18650 は、構造的にはある種の呼吸阻害剤に類似するが、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) の野生株 Guy11 および 70-15 の菌糸生育および分生子の発芽・付着器形成は抑制せず、直接いもち病菌の生育には影響を示さない。しかしながら、イネへの病原性に関して調査すると、イネ葉鞘への侵入菌糸形成は 1ppm のきわめて低濃度で阻害し、ポット栽培したイネ葉での病斑形成は 30ppm の濃度ではほぼ完全に抑制した。このことから、本化合物はいもち病菌の感染器官形成過程に関与すると考えられる。そこで、本化合物処理におけるいもち病菌の付着器内膨圧を調査したところ、化合物処理付着器の膨圧は無処理区と比較して著しく低下しており、このことが本化合物のいもち病菌感染を抑制する主要因であると考えられた。しかしながら、付着器内で生成されるグリセロール源と考えられているグリコーゲン顆粒および脂滴(Lipid droplet)の挙動を観察したところ、付着器成熟期でのグリコーゲン顆粒および脂滴の消失時期に若干の遅れはあるものの大きな差は認められなかった。このことは、本剤の作用機作が付着器の膨圧形成後にあり、いもち菌に対する新たな作用性を持つ化合物であることを示唆する。現在、われわれはこれらの情報をもとに本薬剤の作用性を解明するためマイクロアレイを用いた解析を行っているところである。

(本研究は生研センター生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業の一環として実施した。)

Analysis of the compound maintained a novelty action against rice blast fungus *Magnaporthe grisea*.

Akihiro Moriwaki¹, Takumi Yoshimura^{2,3}, Keietsu Abe⁴, Marie Nishimura¹

(¹NIAS, ²Kumiai Chem. Indust. Co. Ltd., ³K·I Chem. Res. Inst. Co. Ltd., ⁴Tohoku Univ. NICHe)

P-92

カラシナの新規ディフェンシン遺伝子のイネいもち病菌 *Magnaporthe grisea* に対する抗菌活性

提箸祥幸, 高久洋暁¹, 田中宥司, 矢頭治 (農研機構・中央農研, ¹新潟薬科大学)

アブラナ科野菜は、発芽時における糸状菌の感染などを防ぐ効果を持つと考えられる抗菌性物質を蓄積していることが知られている。この内の代表的な物質がディフェンシンと呼ばれる一群のポリペプチドである。ディフェンシンは広く生物界に存在し、アミノ酸レベルの構造、抗菌活性スペクトルに各生物種ごとにそれぞれ共通の特徴を有している。アブラナ科野菜のディフェンシンは糸状菌に抗菌活性を示すものが多い。

我々はアブラナ科野菜の一種であるカラシナに注目し、将来的な抗菌剤としての利用を視野に入れ、ディフェンシンの抗菌活性と構造との関係に知見を加えることを目的として、新規ディフェンシン遺伝子の取得を試みた。既知のディフェンシン遺伝子の配列を参考に PCR 法にてカラシナの全 DNA から新規遺伝子を取得した。その結果、既知のディフェンシンと高い相同性を示すもののアミノ酸配列の一部が異なる数種の遺伝子を取得した。取得した遺伝子の成熟型ディフェンシンの全領域と予想される部分を大腸菌発現ベクター pGEX-6P-1 に挿入し、GST タグを付加した蛋白質を可溶性蛋白質として発現させ、タグの切断及び精製・純化をおこなった。

得られた大腸菌発現ディフェンシン蛋白質を用いイネいもち病菌である *Magnaporthe grisea* に対する抗菌活性を測定したところ、全てのディフェンシン蛋白質が抗菌活性を示した。またヒト日和見感染菌である *Candida albicans* に対しても活性を示し、将来的な抗菌薬剤としての使用の可能性の一端が示された。

New defensin genes of *Brassica juncea* and their antimicrobial activities to *Magnaporthe grisea*.

Yoshiyuki Sagehashi, Hiroaki Takaku¹, Hiroshi Tanaka, Osamu Yatou (National Agricultural Research Center, ¹Niigata Univ. of Pharmacy and Applied Life Sciences)

P-93

イネいもち病菌胞子発芽液中に分泌される Concanavalin A 結合型糖タンパク質の Suppressor 様活性

岡本泰樹, 新城 亮, 有江 力, 寺岡 徹 (農工大院農)

イネ-いもち病菌の相互作用は、イネ品種-いもち病菌病原性レースの組合せにより決定される。このような相互作用の決定に関与する物質が、いもち病菌の胞子発芽液中に含まれることを見い出すと共に、マンノース結合型レクチンである Concanavalin A (ConA) をリガンドとしたアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより胞子発芽液を分画し、品種-レース特異性における機能解析をしたところ、イネ品種・愛知旭に対して親和性菌株 (北 1, race007.0) 由来の ConA 結合型糖タンパク質画分は非親和性菌株 (TH68-140, race035.1) の侵入菌糸の伸展助長作用を示した。同様の作用が、イネ品種・関東 51 号に対して親和性菌株由来の ConA 結合型糖タンパク質画分でも観察された。また ConA と非常に類似した糖結合特異性を持ち、イネの病害抵抗性発現機構に関与していると推定されているマンノース結合型イネレクチン (MRL) (Teraoka, 1990) と相互作用を示す物質が同画分に存在することが、抗 MRL 抗体を用いた免疫反応により示唆された。また、同画分の protease 処理、脱糖鎖処理により活性が喪失することから、おそらくイネいもち病菌はイネ-いもち病菌相互作用の場において ConA 結合型糖タンパク質を分泌し、同物質は感染を助長するようなSuppressor様機能を持つことが示唆された。

Suppressor-like activity of Concanavalin A-binding glycoproteins secreted by germinating spores of *Magnaporthe oryzae*

Yasuki Okamoto, Akira Shinjo, Tsutomu Arie, Tohru Teraoka
(Tokyo Univ. of Agri. and Tech.)

P-94

ベトナムのばか苗病罹病イネから分離された *Fusarium* 属菌の分子系統解析

加藤亮宏, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大院農)

ベトナムにおいて採取したイネばか苗病罹病イネ組織から分離された *Fusarium* 属菌 70 株について rDNA internal transcribed spacer (ITS) 領域の塩基配列に基づいた分子系統樹を作成した。*Fusarium moniliforme* / *Gibberella fujikuroi* species complex の Mating Population (MP) A~I それぞれの標準菌株、および日本産イネばか苗病菌 (*G. fujikuroi* MP-C, anamorph *Fusarium fujikuroi*) の情報と合わせることで、ベトナム分離株の *G. fujikuroi* species complex における位置を調査した。同時に各菌株について PCR による交配型(MAT)の判別と、日本産イネ (品種、短銀坊主) に対するばか苗病発病能の有無について調査を行った。

分子系統樹中で、MP-A~I の標準菌株は大きく 2 つのクラスターに大別された。そのうちの MP-C,D,F,G を含むクラスター内には、ばか苗病発病能を示すベトナム分離菌株 (15 株) 全て、発病能を示さないベトナム分離株 (32 株)、日本産イネばか苗病菌が存在した。ベトナム分離株の交配型は MAT1-1,1-2 の両方が存在した。MP-A,B,E,H,I でもう一つのクラスターを形成したが、このクラスター内にベトナム分離株はほとんど存在しなかった。ばか苗病の発病能を示さないベトナム分離株 (19 株) だけで標準菌株とは別に 1 つのクラスターを形成し、このクラスター内の株で交配型の判別ができたものはすべて MAT1-2 だった。

Phylogenetic analysis of *Fusarium* isolated from Bakanae-diseased rice plant in Vietnam.

Akihiro Kato, Tohru Teraoka, Tsutomu Arie
(Tokyo Univ. of Agri. & Tech.)

P-97

トマト萎凋病菌レースの土壌中からの特異的検出の試み

吉岡千津¹, 對馬誠也², 寺岡 徹¹, 有江 力¹ (¹農工大院農・²農環研)

トマト萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: *FOL*) は土壌病原性子のう菌の一つであり、宿主となるトマトの品種によって3つのレース(1-3)に分けられる。農耕地において、多種多様な土壌微生物中から *FOL* を検出、また *FOL* レースを識別することは、病害予防のために重要である。Kawabe (2004) は rDNA-IGS 領域の塩基配列に基づいた *F. oxysporum* の分子系統解析を行い、日本産 *FOL* ではレースと系統樹のクラスターが相関することを示した。また Hirano (2006) は、ポリガラクトナーゼ遺伝子の塩基配列の差に基づき、日本産 *FOL* レース識別用特異プライマーセットを構築した。

本研究では、*FOL* 汚染土壌から抽出した DNA を用い、「多様な土壌菌>*F. oxysporum*>*FOL*>レース」のように、大分類群から小分類群へと段階的に *FOL* を検出する方法を検討した。rDNA-IGS 領域特異プライマーを用いた PCR によって、*F. oxysporum* とその近縁種 *F. moniliforme* が特異的に検出できた。この増幅断片を DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) で分離すると、*FOL* レースが識別出来る可能性が示唆された。また Hirano (2006) が提示したプライマーセットは、土壌抽出 DNA でも有効で、*FOL* 及びレース識別が可能であった。さらに、リアルタイム PCR 検出用に、新たなレース識別用プライマー、プローブセットを作製した。

Specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races in soil

Chizu Yoshioka¹, Seiya Tsushima², Tohru Teraoka¹, Tsutomu Arie¹

(¹Tokyo Univ. of Agri. & tech., ²Natl. Inst. Agro-Environ. Sci.)

P-98

イネいもち病菌の AVR-Pia 遺伝子とその周辺領域の解析

三木慎介, 大塚圭輔, 安田伸子*, 曾根輝雄 (北大院農・応用菌学, *中央農研)

イネいもち病菌の AVR-Pia はイネ品種愛知旭が持つ抵抗性遺伝子 *Pia* に対応する非病原性遺伝子であり、日本産菌株 Ina168 株よりクローニングされた。本遺伝子は愛知旭に非病原性の菌株に保存されているが、病原性の菌株には存在しない。本遺伝子の各菌株におけるコピー数と周辺領域の反復配列の解析を行った。

愛知旭に非病原性の各菌株の DNA を *HindIII* で消化しサザン解析したところ、全ての日本産菌株では 6.5kb に、中国産菌株では約 14kb に1本のシグナルが現れた。さらに Ina168 株と中国産 Y93-165g-1 の DNA を AVR-Pia を内部1カ所で切断する *EcoRI* で消化し、*EcoRI* サイトの両側の DNA 断片を別々にプローブとして解析したところ、Ina168 株ではそれぞれ3本、Y93-165g-1 株ではそれぞれ1本のシグナルが現れ、Ina168 株には3コピー、Y93-165g-1 株には1コピーの AVR-Pia 遺伝子がゲノム上に存在すると考えられた。同様にその他の日本産菌株を解析したところ、1-3 コピーの AVR-Pia 遺伝子を持つことが示唆された。また、周辺領域には *Occan*, *Pot2*, *Pot3* の DNA 型トランスポゾン、レトロトランスポゾン MGL, レトロトランスポゾン *Pyret*, MGLR-3, RETRO6, RETRO7 の solo-LTR がクラスターを形成していることが分かった。

Analysis of AVR-Pia locus in *Magnaporthe oryzae*

Shinsuke Miki, Keisuke Ohtsuka, Nobuko Yasuda* and Teruo Sone

(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., *NARC)

P-99

イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* の二成分情報伝達系は二次代謝を制御する

本山高幸¹, 林敏明¹, 工藤俊章², 長田裕之¹ (¹理研・基幹研, ²長崎大・水産)

糸状菌は高い二次代謝産物生産能を持つ。特にイネいもち病菌を含む子囊菌門の糸状菌は多くの二次代謝遺伝子を持つ。一方、二成分情報伝達系はバクテリアや菌類や植物などにおいて情報伝達に関わる。イネいもち病菌において二成分情報伝達系は、高浸透圧応答、フルジオキソニルなどの薬剤への感受性、病原性に関わる。今回、イネいもち病菌において二成分情報伝達系が二次代謝の制御に関与していることを示す。

イネいもち病菌の三つのレスポンスレギュレーターホモログの遺伝子破壊株 (Δ *Mosk1*、 Δ *Mosk7*、 Δ *Morim15*) において二次代謝産物であるメラニンの形成能を比較した。 Δ *Mosk1* と Δ *Mosk7* ではメラニン形成能が上昇し、 Δ *Morim15* では低下した。メラニン形成能の変化と、メラニン合成遺伝子特異的転写因子 *PIG1* の発現量の変化の間には正の相関があった。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A で処理した場合、野生株、遺伝子破壊株ともメラニン形成が促進されたことから、本薬剤と二成分情報伝達系は独立にメラニン形成を制御していることが示唆された。二次代謝産物を HPLC で解析したところ、遺伝子破壊株では様々な代謝物の生産能の増加が認められた。

Regulation of secondary metabolism by the two-component signal transduction system in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*

Takayuki Motoyama¹, Toshiaki Hayashi¹, Toshiaki Kudo², Hiroyuki Osada¹

(¹Advanced Sci. Institute, RIKEN, ²Fac. Fish., Univ. Nagasaki)

代表発表者索引

F

R. Fischer 13

S

Suthitar Singkaravanit 76

あ

紅 朋浩 25
浅沼智美 39
阿部 歩 44
阿部敬悦 34
荒田章観 54
安藤栄里子 74
安藤朋広 26

い

生田 聡 37
石川絢也 53
石田博樹 34
泉津弘佑 79
伊藤靖夫 31
稲見圭悟 84
井上加奈子 81
井上やよい 66
伊本 亮 57
岩崎健太郎 50
岩下和裕 28

お

大久保有祐 56
大場 歩 72
小笠原博信 70
岡本綾子 62
岡本泰樹 83
奥田康仁 48
尾関健二 67
小田 忍 39
織田 健 18, 75

か

梶井聡子 76
加治佐 平 61
加瀬明日香 54
片瀬 徹 61
加藤亮宏 83
加藤直樹 31

金田貴詳 75
川島淳士 79
川島一剛 46

き

菊間隆志 51
北上巨樹 71
北川治恵 66
北本勝ひこ 14
木下 浩 77
木原淳一 29
桐藤万裕 67

く

楠本憲一 58
國武絵美 32, 43

こ

小池英明 69
国保友裕 41
小林 甫 80

さ

酒井香奈江 77
坂本和俊 27
坂本香織 56
坂本裕一 36
提箸祥幸 82
笹川哲裕 64
佐藤直美 60
佐藤宏樹 53

し

志田洋介 59
清水 聡 45
清水公德 81
志水元亨 28
小路博志 22
城隆太郎 47

す

鈴木 聡 58
鈴木一史 35, 63

せ

関口裕久 35, 60

そ

曾根輝雄 85

た

高木義弘 55
高橋 司 73
高谷康平 49
高山 登 42
竹下典男 25
田中大介 48
田中瑞己 73
田鍋康子 51

つ

對崎真楠 52
辻 篤史 43

て

寺畑吏得子 78

と

徳岡昌文 20
戸田智美 69
豊島快幸 16

な

長島敏幸 46
中村奈巳 65

に

西浦未華 47

ね

根本 崇 44

は

萩原大祐 27

橋谷 航 55
長谷川祥子 72
馬場悟史 30
早川雄悟 49
坂東弘樹 32

ひ

樋口裕次郎 50
久田博元 42
日野愛子 84
平山佳代子 63

ふ

福原真一郎 68
藤川貴史 30
藤本直子 38
古川隆紀 71

ま

間井幸弘 41
前田 浩 64
榊尾俊介 70
町田雅之 29
松井圭三 23
丸井淳一朗 78
丸山潤一 26

み

南 正彦 57

も

本山高幸 86
森口祥成 40
森田寛人 62
森脇明弘 82

や

八木毅郎 74
山岡隼人 68
山越 智 80
山元宏貴 38

ゆ

尹 載宇 33

よ

吉岡千津	85
吉見 啓	52
米村晃子	45

わ

若泉賢功	37
渡部 潤	33
渡邊泰祐	65
渡辺剛志	59
和田真人	40

糸状菌分子生物学研究会 会則

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

以上

補則

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

糸状菌分子生物学会運営委員会名簿

会 長

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)

運営委員

有江 力 (会計担当) 東京農工大学大学院 共生科学技術研究院
(〒183-8509 東京都府中市幸町3-5-8)

有岡 学 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)

尾関 健二 金沢工業大学 ゲノム生物工学研究所
(〒924-0838 石川県白山市八束穂3-1)

加藤 雅士 (編集担当) 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)

川口 剛司 (広報担当) 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科
(〒599-8531 大阪府堺市学園町1-1)

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)

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)

竹内 道雄 (会計担当) 東京農工大学大学院 共生科学技術研究院
(〒183-8509 東京都府中市幸町3-5-8)

秦 洋二 月桂冠株式会社 総合研究所
(〒612-8385 京都市伏見区下鳥羽小柳町101)

堀内 裕之 (庶務担当) 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)

山田 修 酒類総合研究所
(〒739-0046 広島県東広島市鏡山3-7-1)