

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	14
シンポジウム講演要旨	16
一般講演要旨	28
ポスター発表講演要旨	41
代表発表者索引	89
糸状菌分子生物学研究会会則	92
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿	93

第9回糸状菌分子生物学コンファレンスプログラム

日時：2009年11月18日(水)-19日(木)
会場：東京大学農学部弥生講堂・一条ホール
／アネックス（東京都文京区弥生 1-1-1）
主催：糸状菌分子生物学研究会
後援：糸状菌遺伝子研究会

11月18日（水）

11:00- 受付開始
12:00-12:05 開会の辞
12:05-14:53 口頭発表（O-1～O-14）
15:10-16:40 ポスター発表（奇数番号）
16:45-17:35 特別講演 Dr. Daniel Cullen
17:35-17:45 総会
18:00- 懇親会（農学部食堂）

11月19日（木）

9:25-12:00 シンポジウム
「ゲノム情報解析とその利用研究の最前線」
12:00-13:00 昼休み
13:00-14:30 ポスター発表（偶数番号）
14:35-16:47 口頭発表（O-15～O-25）
17:00-17:30 表彰式、閉会の辞

発表演題および講演時間

特別講演 11月18日(水) 16:45-17:35

Comparative analysis of white rot and brown rot fungi: genomes, transcriptomes and secretomes

Dr. Daniel Cullen
(Department of Bacteriology, University of Wisconsin / U.S.
Forest Service, Forest Products Laboratory, Madison, WI.)

シンポジウム 11月19日(木) 9:25-12:00

「ゲノム情報解析とその利用研究の最前線」

9:25- 9:30

オーガナイザー挨拶

鮫島 正浩 (東京大学 大学院農学生命科学研究科)

9:30-10:00

S-1 「アグリバイオインフォマティクス教育研究ユニットの活動について」

清水 謙多郎 (東京大学 大学院農学生命科学研究科)

10:00-10:30

S-2 「次世代シーケンシング技術が拓く微生物研究の新潮流」

西 達也 ((株)ジナリス)

10:30-11:00

S-3 「*Aspergillus fumigatus* のヌクレオソームマップ解析」

西田 洋巳 (東京大学 大学院農学生命科学研究科)

11:00-11:30

S-4 「メタゲノム解析とその応用研究」

宮崎 健太郎 ((独)産業技術総合研究所 生物機能工学部門)

11:30-12:00

S-5 「麹菌ゲノム解析が産業界にもたらすもの」

町田 雅之 ((独)産業技術総合研究所 イノベーション推進室/
セルエンジニアリング研究部門)

一般講演（口頭発表）（O-1～O-25）

11月18日（水）

- 12:05-12:17 O-1 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法を用いた木材腐朽に関わる糸状菌群の解析
中田裕治, 久住朝子, 片山葉子, 吉田 誠, 福田清春（農工大・農）
- 12:17-12:29 O-2 菌類に対する遺伝子高発現および発現抑制用バイナリーベクターの開発
奥原 徹¹, 野田知嗣¹, 吉田真澄¹, 稲富 聡², 田口悟朗¹, 下坂 誠¹（¹信州大・繊維・応生系、²ホクトきのご総合研究所）
- 12:29-12:41 O-3 ゲノム科学による麹菌代謝に関わる遺伝子同定と高生産化
小池英明¹, 寺林靖宣¹, 佐野元昭², 山根倫子¹, 丸井淳一朗¹, 相良純一², 堂本美津子², 織田健², 大島栄治³, 立花國治³, 比嘉良喬³, 大箸信一², 町田雅之^{1,2}
(¹産総研、²金沢工大、³三省製薬)
- 12:41-12:53 O-4 麹菌 *A. oryzae* の異種タンパク質生産においてキャリアー融合はUPRを誘導して生産量を改善する
大野 絢子、根本 崇、丸山 潤一、有岡 学、北本 勝ひこ（東大院・農生科・応生工）
- 12:53-13:05 O-5 麹菌の糖タンパク質品質管理機構に関連する遺伝子破壊株を用いた糖鎖構造解析
渡邊泰祐¹, 松尾一郎^{1,2}, 丸山潤一³, 北本勝ひこ³, 伊藤幸成¹（理研・基幹研¹, 群大院・工², 東大院・農生科・応生工³）
- 13:05-13:17 O-6 ウシグソヒトヨタケの Cc.Cdc3 セプチン-EGFP 融合タンパク質の細胞内局在の観察
村口 元¹, 中村宏江¹, 石井律好¹, 鎌田 堯²（¹秋田県立大・生物資源、²岡山大・理）
- 13:17-13:29 O-7 麹菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシス関連因子の探索
樋口裕次郎, 有岡 学, 北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）
- 13:29-13:41 O-8 **Profiling of polarity related gene expression during early growth of *Aspergillus fumigatus***
Ken Oda¹, Susan Cowden¹, Andrew Breakspear², Michelle Momany¹. (¹Dept. of Plant Biology, Univ. of Georgia, USA, ²current address: Dept. of Plant Pathology, Univ. of Minnesota, USA)
- 13:41-13:53 O-9 *Aspergillus nidulans* のキチン合成酵素 CsmA の菌糸内局在化における微小管の役割
對崎真植, 堀内裕之, 太田明德（東大院・農生科・応生工）
- 13:53-14:05 O-10 真菌類の Heavy-metal ATPase (HMA) の系統解析および植物病原糸状菌における trans-golgi network 局在型 HMA の機能解析
齋藤禎一, 泉津弘佑, 森田篤, 田中千尋（京大院・農）
- 14:05-14:17 O-11 植物共生糸状菌 *Epichloë festucae* のもつ植物細胞死誘導タンパク質遺伝子 NLP の相同遺伝子は細胞死誘導活性を失う変異を持つ
赤野史岳, 川北一人, 竹本大吾（名大院生命農・生物機構）

- 14:17-14:29 O-12 いもち病菌の薬剤に対する転写応答解析と特定標的に作用する新剤探索システムの構築
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)
- 14:29-14:41 O-13 トランスポゾン挿入によるトマト萎凋病菌の非病原力遺伝子の機能喪失
稲見圭悟, 森田泰彰*, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大院連農・*高知県農林技術センター)
- 14:41-14:53 O-14 トマト葉かび病菌 *Cladosporium fulvum* の AVR 遺伝子群の変異様式
飯田祐一郎, 窪田昌春, 寺見文宏 (野茶研)

11月19日(木)

- 14:35-14:47 O-15 *Aspergillus fumigatus* 由来メロテルペノイド生合成遺伝子クラスターを用いた非天然型新規ハイブリッド型化合物の創製
徳永欽也¹, 伊藤崇敬¹, 藤井勲², 海老塚豊¹, 久城哲夫¹, 阿部郁朗¹ (東大院・薬,²岩手医大・薬)
- 14:47-14:59 O-16 糸状菌 *Chaunopycnis alba* が生産する M 期キネシン Eg5 阻害剤の生合成遺伝子クラスター
本山高幸¹, 林敏明¹, 廣田洋¹, 植木雅志¹, 清水史郎¹, 臼井健郎², 長田裕之¹ (¹理研・ケミカルバイオロジー,²筑波大・院・生命環境科学)
- 14:59-15:11 O-17 *Trichoderma reesei* 由来 *eglI* の転写活性化における Xyr1 の関与
志田洋介, 古川隆紀, 岡田宏文, 森川康, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)
- 15:11-15:23 O-18 麹菌 *pall* の機能解析
佐野元昭, 北川治恵, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)
- 15:23-15:35 O-19 麹菌転写制御関連遺伝子の網羅的破壊と機能解析
石井智子¹, 戸田智美¹, 小川真弘², 徳岡昌文², 大澤靖子¹, 小池英明¹, 高橋理², 松島健一朗², 小山泰二², 町田雅之¹ (1 産総研、2 野田産研)
- 15:35-15:47 O-20 トランスクリプトーム配列データベースを用いた *Phanerochaete chrysosporium* の全分泌タンパク質 (セクレトーム) 解析
堀 千明, 五十嵐圭日子, 片山 映¹, 鮫島正浩 (東大院・農生科,¹日医大・一生化)
- 15:47-15:59 O-21 **Comparative Genome Analysis of *Trichoderma reesei* Hypercellulase Producing Mutants**
Juliano de Oliveira Porciuncula¹, Mikiko Nitta¹, Takanori Furukawa¹, Kazuki Mori¹, Okada Hirofumi¹, Hideki Hirakawa², Satoru Kuhara², Yashushi Morikawa¹, Wataru Ogasawara¹
(¹Dept. of Bioengineering, Nagaoka Univ. of Tech., ²Grad. School of Genetic Resources Technology, Kyushu University)

- 15:59-16:11 O-22 **β -グルコシダーゼ活性強化型 *Trichoderma reesei* PC-3-7 株**
中澤 光¹, 谷 修治², 炭谷 順一², 川口 剛司², 岡田宏文¹, 森川 康¹, 小笠原 渉¹, (長岡技科大・生物系¹, 阪府大院・生命・応生科²)
- 16:11-16:23 O-23 ***Aspergillus nidulans* における α -1,3-glucan 合成酵素遺伝子の機能解析**
吉見啓¹, 佐野元昭², 藤岡智則³, 水谷治⁴, 萩原大祐¹, 藤川貴史⁵, 西村麻里江⁵, 阿部敬悦¹ (¹東北大・未来研,²金沢工大・ゲノム研,³クミアイ化学工業(株),⁴酒類研,⁵生物研)
- 16:23-16:35 O-24 **麹菌ゲノム解析によって初めて見出された細胞内金属カルボキシペプチダーゼ**
山形洋平¹), 前田浩¹), 楠本憲一²), 小出芳直³), 石田博樹⁴) 竹内道夫¹)
(¹東京農工大院・応生科,²食総研,³天野エンザイム・研究部,⁴月桂冠・総研)
- 16:35-16:47 O-25 **新規麹菌アスパルティックプロテアーゼ AOENA10 の発現および解析における**
岡本綾子¹), 森田寛人¹), 山形洋平¹), 楠本憲一²), 小出芳直³), 石田博樹⁴), 竹内道雄¹ (¹東京農工大学院・応生科,²食総研,³天野エンザイム・研究部,⁴月桂冠・総研)

ポスター発表 11月18日(水) 15:10-16:40(奇数番号)
11月19日(木) 13:00-14:30(偶数番号)

- P-1 麹菌 *Aspergillus oryzae* 菌糸体のアクリルアミド分解特性
若泉賢功、山元宏貴、安田直子、尾関健二、大箸信一(金沢工大・ゲノム研)
- P-2 麹菌による食品中のアクリルアミド低減化技術の開発
桐藤万裕、加座健士郎、坪内宏和、若泉賢功、尾関健二、大箸信一(金沢工大・ゲノム研)
- P-3 新規麹菌バイオリアクターによる飲料中のアクリルアミド分解
加座健士郎、坪内宏和、桐藤万裕、若泉賢功、尾関健二、大箸信一(金沢工大・ゲノム研)
- P-4 麹菌における新規糸状菌エラスターゼ阻害剤の高生産
山下 伸雄¹、西本 遼¹、松永 将義¹、奥村 欣由²、打矢恵一²、松井 健²、小川賢二³、二改俊章²
(¹白鶴酒造・研究開発, ²名城大・薬, ³(独)東名古屋病院・臨床研究部)
- P-5 麹菌 *Aspergillus oryzae* α -アミラーゼ遺伝子破壊株による異種タンパク質生産
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-6 *A. oryzae* の液胞ソーティングレセプター遺伝子破壊による異種タンパク質生産性の向上
尹 載宇、丸山 潤一、北本 勝ひこ(東大院・農生科・応生工)
- P-7 菌体外分泌シグナルの置換による *Aspergillus nidulans* を宿主とした発現系の改善
前田 浩¹、山形洋平¹、楠本憲一²、小出芳直³、石田博樹⁴、竹内道雄¹
(¹東農工大農・応生科, ²食総研, ³天野エンザイム, ⁴月桂冠・総研)
- P-8 麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 株のプレオマイシン耐性による形質転換選抜系の開発
鈴木聡¹、多田功生¹、福岡真里¹、塚越芳樹¹、松下真由美¹、柏木豊²、杉山政則³、楠本憲一¹(食総研¹、東京農大²、広島大³)
- P-9 逆方向反復配列の添加による *Aspergillus nidulans* の形質転換効率の低下機構
松比良和晃¹、伊藤靖夫^{1,2}(¹信大院・工, ²信大・全学教育機構)
- P-10 菌類に対する遺伝子高発現および発現抑制用バイナリーベクターの開発
奥原 徹¹、野田知嗣¹、吉田真澄¹、稲富 聡²、田口悟朗¹、下坂 誠¹(¹信州大・繊維・応生系, ²ホクトきのこ総合研究所)
- P-11 クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* における *ku80* 遺伝子破壊による相同組換え効率の向上
本田裕樹、小林慶一、服部貴澄、桐村光太郎(早大・理工・応化)
- P-12 アカパンカビにおける異種プロモーターの発現解析
石田泰大、田中秀逸、畠山晋(埼大・理・遺伝)
- P-13 ギガシーケンスによる実用麹菌株のゲノム解析
野村孝典¹、小田健太¹、濱田涼子²、岩下和裕^{1,2}、山田修²、三上重明²(1:広島大院・先端研 2:酒総研)
- P-14 糸状菌細胞壁溶解酵素 Yatalase を用いた麹菌菌体量測定法の再検討
妹尾悠平^{1,2}、岩下和裕^{1,2}、山田 修²(1 広島大, 2 酒総研)

- P-15 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法を用いた木材腐朽に関わる糸状菌群の解析
中田裕治, 久住朝子, 片山葉子, 吉田 誠, 福田清春 (農工大・農)
- P-16 非特異的 DNA 増幅を利用した木材腐朽菌叢の定量分析
和田朋子, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)
- P-17 光変換型蛍光タンパク質を用いた麹菌 *Aspergillus oryzae* 分泌経路の解析
若林 奈央, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-18 麹菌 *A. oryzae* における隔壁へ向かうタンパク質分泌経路の分子生物学的解析
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・農生科・応生工、²エジンバラ大・細胞生物学研究所)
- P-19 麹菌 *A. oryzae* における分泌に関わる Rab GTPase AoSec4 の機能解析
中野浩幸¹, 早川雄悟¹, 正路淳也^{1,2}, 有岡学¹, 北本勝ひこ¹
(¹東大院農生科・応生工、²エジンバラ大・細胞生物学研究所)
- P-20 麹菌 *A. oryzae* における AoAtg1 の局在および機能解析
柳澤 晋, 中野 浩幸, 早川 雄悟, 北本 勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-21 麹菌 *A. oryzae* におけるアミノペプチダーゼ I (AoApe1)を用いた Cvt 経路の解析
江部孝太郎, 早川雄吾, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-22 麹菌 *A. oryzae* のビオチン生合成にはペルオキシソームが関与する
田鍋 康子, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-23 麹菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシス関連因子の探索
樋口裕次郎, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-24 *Aspergillus nidulans* のキチン合成酵素 CsmA の菌糸内局在化における微小管の役割
對崎真楠, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- P-25 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の *pkcA* 遺伝子の分生子形成における機能
片山琢也, 内田博教, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- P-26 糸状菌 *Aspergillus nidulans* における *Saccharomyces cerevisiae* CHS4 オルソログの機能解析
西出晶, 對崎真楠, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- P-27 麹菌 *A. oryzae* における小胞体関連分解 (ERAD) 関連遺伝子 *Aohtm1*, *Aoyos9* の機能解析
菊間隆志¹, 北本勝ひこ², 伊藤幸成¹ (¹理研・基幹研, ²東大院・農生科・応生工)
- P-28 麹菌のタンパク質品質管理機構における hyperglycosylation の役割
小野崎保道, 城大介, 横田淳一, 五味勝也, 新谷尚弘 (東北大・生物産業創成)
- P-29 糸状菌の細胞壁ストレスセンサータンパク質の機能解析
二神泰基¹, 城戸弥生¹, 大森俊郎², 後藤正利¹ (¹九大院・農 ²三和酒類フロンティア研)
- P-30 アカパンカビのストレス応答シグナル伝達経路の概日リズムやアミノ酸代謝への関与
山下和宏, 高橋正和, 石川智子, 亀井誠之, 藤村真 (東洋大・生命科)
- P-31 麹菌(*A.oryzae*)のヒストン脱アセチル化関連遺伝子破壊株の解析
河内護之¹, 西浦未華¹, 岩下和裕^{1,2}, 山田修² (1 広島大, 2 酒総研)

- P-32 **麹菌アクアポリン AoAQP1 b の機能解明**
 田中 介, 劉成偉, 松本直, 福元達也, 岩崎郁子, 北林 強, 北川良親 (秋田県立金足農業高校, 秋田県大・生物資源科学部)
- P-33 **麹菌におけるエキソソーム構成サブユニット遺伝子破壊株の造成**
 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-34 **麹菌 *A. oryzae* における接合型遺伝子置換株の作製と有性世代の探索**
 和田 龍太, 山口 悠, 田鍋 康子, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-35 **麹菌 *A. oryzae* AoSO タンパク質のストレス応答性の蓄積機構に関する解析**
 佐伯 圭, 牧野 雄也, Christopher Sarazar ESCAÑO, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-36 **麹菌 *Aspergillus oryzae* における Fus3 ホモログの機能解析**
 佐々木 智江美, 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-37 **トランスクリプトーム配列データベースを用いた *Phanerochaete chrysosporium* の全分泌タンパク質 (セクレトーム) 解析**
 堀 千明, 五十嵐圭日子, 片山 映¹, 鮫島正浩 (東大院・農生科, ¹日医大・一生化)
- P-38 **麹菌の液体培養初期におけるタカアミラーゼ吸着阻害因子の探索**
 佐藤宏樹, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-39 **麹菌 hydrophobin RoIA が cutinase CutL1 と相互作用する際の Lys34 の役割**
 上原健二¹, 高橋徹¹, 村垣公英², 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)
- P-40 **麹菌 *Aspergillus oryzae* の中性セラミダーゼオルソログの機能解析**
 多田 功生¹, 大口 ひかる¹, 松下(森田) 真由美¹, 鈴木 聡¹, 楠本 憲一¹, 柏木 豊² (¹食総研,²東京農大・応生・醸造)
- P-41 ***Aspergillus oryzae* 由来クロロゲン酸特異的加水分解酵素**
 見原好治, 村山哲也, 塩野義人, 小関卓也 (山形大・農)
- P-42 ***Aspergillus aculeatus* 由来 β -glucosidase 1, carboxymethylcellulase 1 へのセルロース結合ドメイン付加**
 尾山真二, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科・応生科)
- P-43 ***Aspergillus aculeatus* 由来 *cbhII* 型セルラーゼ遺伝子のクローニングと高発現**
 内藤篤, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生命・応生科)
- P-44 ***Aspergillus aculeatus* 由来 β -グルコシダーゼ 3 遺伝子の *A. oryzae* における発現**
 難波麻美, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大・生環科・応生科)
- P-45 **Comparative Genome Analysis of *Trichoderma reesei* Hypercellulase Producing Mutants**
 Juliano de Oliveira Porciuncula¹, Mikiko Nitta¹, Takanori Furukawa¹, Kazuki Mori¹, Okada Hirofumi¹, Hideki Hirakawa², Satoru Kuhara², Yashushi Morikawa¹, Wataru Ogasawara¹
 (¹Dept. of Bioengineering, Nagaoka Univ. of Tech., ²Grad. School of Genetic Resources Technology, Kyushu University)

- P-46 **結晶性セルロース表面における糸状菌由来セルラーゼの吸着挙動**
杉本直久, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)
- P-47 **セルラーゼ分解に関与する *Trichoderma reesei* 由来プロテアーゼの同定**
須田直樹, 中沢光, 深谷英嗣, 大瀧友樹, 岡田宏文, 森川康, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)
- P-48 **Heterologous expression of β -glucosidases from termites in *Aspergillus oryzae***
Cristiane A. Uchima¹, Manabu Arioka¹, Gaku Tokuda², Hirofumi Watanabe³, Katsuhiko Kitamoto¹ (¹ Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo; ² Center of Mol. Biosci., Univ. of the Ryukyus; ³ National Inst. of Agrobiol. Sci.)
- P-49 **麹菌 *A. oryzae* を用いて生産したシロアリ由来セルラーゼの性質および利用法の検討**
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, 琉大・分生研, ³農業生物資源研)
- P-50 **麹菌 *A. oryzae* によるシロアリ腸内共生原生生物由来キシラナーゼの生産及びその応用に向けた研究**
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-51 ***Aspergillus fumigatus* 由来 AfSwo1 タンパク質による結晶性セルロースの糖化相乗効果**
石田亘広¹, 陳新愛², 丸山潤一², 戸高眠¹, 中村里沙¹, 北本勝ひこ², 高橋治雄¹
(¹豊田中央研究所, ²東大院・農生科・応生工)
- P-52 **好熱性糸状菌由来のセルラーゼを生産する麹菌を用いたセルロースの糖化**
牧野 雄也, 丸山 潤一, 熊谷 英彦¹, 北本 勝ひこ (東大院・農生科・応生工、¹石川県大・生資研)
- P-53 ***Aureobasidium pullulans* 由来 β -キシロシダーゼ遺伝子の構造解析と異宿主発現**
藤本仁寿, 藤井信哉, 脇山元気, 太田一良 (宮崎大・農・応生科)
- P-54 ***Aspergillus oryzae* および *A. niger* 由来 α -グルコシダーゼの転移および縮合能について**
阿部有希子¹, 佐藤佳奈子¹, 入澤友啓¹, 野口治子¹, 内野昌孝¹, 中西載慶², 高野克己¹
(¹東京農大・応生化学、²東京農大・短醸)
- P-55 ***Aspergillus nidulans* の GT31 ファミリーに属する機能未知糖転移酵素遺伝子の機能解析**
小町裕司¹, 岡拓二¹, 竹川薫², 後藤正利², 野村善幸¹ (¹崇城大・生物生命・応微工、²九大・院・農)
- P-56 **黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の分泌型ロイシンアミノペプチダーゼの機能解析**
松下 (森田) 真由美¹, 多田功生¹, 丸井淳一朗¹, 古川育代¹, 鈴木聡¹, 服部領太¹, 小出芳直², 石田博樹³, 山形洋平⁴, 竹内道雄⁵, 柏木豊⁶, 楠本憲一¹ (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、⁶東京農大・応生・醸造)
- P-57 **黄麹菌ファミリーM1 アミノペプチダーゼの機能解析**
丸井淳一朗¹, 松下 (森田) 真由美¹, 多田功生¹, 古川育代¹, 鈴木聡¹, 服部領太¹, 小出芳直², 石田博樹³, 山形洋平⁴, 竹内道雄⁵, 柏木豊⁶, 楠本憲一¹ (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、⁶東京農大・応生・醸造)

- P-58 **麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来システインプロテアーゼ群の特徴**
 田中良男¹, 小出芳直¹, 天野 仁¹, 山形洋平², 楠本憲一³, 石田博樹⁴, 竹内道雄⁵ (¹天野エンザイム,²東北大院・応生科,³食総研,⁴月桂冠・総研,⁵東京農工大院・応生科)
- P-59 **麹菌由来セリントイプカルボキシペプチダーゼ *OcpA*、*OcpB*、*CpI* の酵素学的性質**
 森田寛人¹, 岡本綾子¹, 山形洋平¹, 楠本憲一², 小出芳直³, 石田博樹⁴, 竹内道雄¹ (¹東京農工大院・応生科,²食総研,³天野エンザイム・研究部,⁴月桂冠・総研)
- P-60 **麹菌における新規ペプチダーゼの大腸菌を用いた発現解析**
 服部領太¹, 松下 (森田) 真由美¹, 多田功生¹, 丸井淳一朗¹, 古川育代¹, 鈴木聡¹, 小出芳直², 石田博樹³, 山形洋平⁴, 竹内道雄⁵, 柏木豊⁶, 楠本憲一¹ (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,⁶東京農大・応生・醸造)
- P-61 **トキイロヒラタケの生産するラッカーゼアイソザイムの発現と発現時期の調査**
 佐々木武馬, 野崎功一, 水野正浩, 神田鷹久, 天野良彦 (信州大・工学部)
- P-62 **シイタケ(*Lentinula edodes*)におけるラッカーゼの機能分化**
 坂本裕一, 中出啓子 (岩手生工研)
- P-63 **Inverted repeat 配列発現によるシイタケ(*Lentinula edodes*)ラッカーゼ遺伝子(*lcc1*)の発現制御**
 中出 啓子, 坂本 裕一、渡邊 久敬, 佐藤 利次 (岩手生工研)
- P-64 **REMI 法によるウシグソヒトヨタケの有性生殖 (子実体形成) 開始不全株の取得とそれらの原因遺伝子の特定**
 中沢 威人*, 中堀 清, 鎌田 堯 (岡山大・自然科学研究科 *学振・特別研究員)
- P-65 **カルモデュリン阻害条件における *Phanerochaete chrysosporium* リグニン分解酵素アイソザイム群の発現様式**
 阪本鷹行, 北浦博法, 南 正彦, 上田暁生, 鈴木一実, 入江俊一 (滋県大院環)
- P-66 **担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* におけるセルロース分解酵素遺伝子の発現に対するセロオリゴ糖の誘導効果**
 鈴木一史, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)
- P-67 **糸状菌と昆虫の共生系 : キクイムシに栽培される微生物群の解析**
 鈴木啓仁¹, 梶村 恒¹, 北本則行², 小林哲夫¹, 加藤雅士¹ (¹名大院・生命農学,²愛知県産技研・食品工技)
- P-68 ***Neurospora crassa* の β -1,3-glucanoyltransferase 遺伝子群の発現解析**
 亀井誠之, 山下和宏, 高橋正和, 石川智子, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命)
- P-69 **低酸素条件下における *Nudix hydrolase* の役割**
 志水元亨, 梶尾俊介, 藤田智也, 藤井達也, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)
- P-70 **麹菌 *atrR* 高発現株及び *atrR* 破壊株のトランスクリプトーム解析**
 大場歩, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・生物産業創成)
- P-71 **麹菌におけるペントース代謝**
 渥美元規, 野口祐二, 金丸京子, 加藤雅士, 小林哲夫 (名大院・生命農学)

- P-72 **麹菌の解糖系酵素遺伝子の選択的転写開始機構の解析**
高間充, 香曾我部恵子, 戸田智美¹, 町田雅之¹, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・生物産業創成,
¹産総研)
- P-73 **Functional analysis of FarA transcriptional factor in *Aspergillus oryzae***
Sharon Marie Garrido¹, Noriyuki Kitamoto², Akira Watanabe¹, Takahiro Shintani¹, and Katsuya Gomi¹
(¹Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Japan; ²Food Research Center, Aichi
Industrial Technology Institute, Japan)
- P-74 **Monacolin K 生合成における Zn(II)₂Cys₆ タイプ転写制御因子 MokH の機能解析**
酒井香奈江, 木下浩, 仁平卓也 (阪大・生物工学国際交流センター)
- P-75 **Isolation of novel bioactive compounds from entomopathogenic fungi by chemical screening**
Sastia Prama PUTRI, Hiroshi KINOSHITA, Fumio IHARA¹, Yasuhiro IGARASHI², Takuya NIHIRA
(ICBiotech Osaka Univ., ¹National Institute of Fruit Tree Science, ²Biotechnology Research Center Toyama
Pref.Univ.)
- P-76 **メロテルペノイド生合成に関わる新規膜結合性テルペン環化酵素の構造機能解析**
松田侑大¹, 徳永欽也¹, 藤井勲², 海老塚豊¹, 久城哲夫¹, 阿部郁朗¹ (¹東大院・薬, ²岩手医大・
薬)
- P-77 ***Aspergillus fumigatus* 由来メロテルペノイド生合成遺伝子クラスターを用いた非天然型新規ハ
イブリッド型化合物の創製**
徳永欽也¹, 伊藤崇敬¹, 藤井勲², 海老塚豊¹, 久城哲夫¹, 阿部郁朗¹ (東大院・薬, ²岩手医大・
薬)
- P-78 ***Aspergillus fumigatus* 由来ヘルボール酸の生合成に関わるオキシドスクアレン閉環酵素の構造
機能解析**
木村美紀, 福嶋大介, 久城哲夫, 渋谷雅明, 海老塚豊, 阿部郁朗 (東大院・薬)
- P-79 ***Aspergillus fumigatus* における pseurotin 生合成遺伝子クラスターの解析**
加藤直樹¹, 高木海¹, 掛谷秀昭^{1,2}, 長田裕之¹ (¹理研・抗生物質, ²京大院・薬)
- P-80 **麹菌における cyclopiazonic acid 生合成遺伝子クラスターの解析**
篠原靖智¹, 加藤直樹², 徳岡昌文¹, 小山泰二¹, 長田裕之² (¹野田産研, ²理研抗生物質)
- P-81 **トマトアルターナリア茎枯病菌における AAL 毒素生合成遺伝子の機能解析**
赤木靖典, 中林賢志, 高尾和実, 中道真由美, 柘植尚志*, 尾谷 浩, 児玉基一郎 (鳥取大・農,
*名大院・生農)
- P-82 **トマトアルターナリア茎枯病菌が保有する AAL 毒素生合成遺伝子 (ALT) クラスター上の
ALT9 および ALT10 の機能解析**
高尾和実, 赤木靖典, 柘植尚志*, 尾谷 浩, 児玉基一郎 (鳥取大・農, *名大院・生農)
- P-83 **トランスポゾン挿入によるトマト萎凋病菌の非病原力遺伝子の機能喪失**
稲見圭悟, 森田泰彰*, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大院連農・*高知県農林技術センター)
- P-84 **イネごま葉枯病菌 (*Bipolaris oryzae*) の 3-dehydroquinase 遺伝子の発現解析**
山口裕一郎, 上野誠, 荒瀬榮, 木原淳一 (島根大・生物資源)

- P-85 灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* の二成分制御系の機能解析
泉津弘佑, 小林甫, 齋藤禎一, 森田篤, 田中千尋 (京大・院・農)
- P-86 イネいもち病菌の DNA 相同組換え修復遺伝子欠失変異株の性質
工藤 亮子, Sali Atanga Ndindeng, 阿部 歩, 芦澤 武人*, 曾根 輝雄 (北大院農・応用菌学, *中央農研)
- P-87 イネいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pia* の発現解析とその遺伝子座の解析
三木慎介, 大塚圭輔, 佐藤佑樹, 安田伸子*, 芦澤武人*, 平八重一之*, 曾根輝雄 (北大院農・応用菌学, NARC*)
- P-88 イネいもち病菌のキチンデアセチラーゼ相同タンパク遺伝子 *CBPI, CBL1* の機能解析
大野優子, 村田紗弥香, 中嶋佑一, 鎌倉高志 (東理大・応生科)
- P-89 イネいもち病菌における細胞壁成分 α -1,3-グルカンの宿主感染に関わる役割
藤川貴史¹・久我ゆかり²・矢野成和³・阿部敬悦⁴・西村麻里江¹ (¹生物研・²広大院総科・³立命館大・⁴東北大未来研)
- P-90 *abaA* は *Fusarium oxysporum* の小型分生子, 大型分生子, bud cell 形成に関与する
金野亜紀, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大院農)
- P-91 *MAT1* イデオモルフを入れ換えた *Fusarium oxysporum* の性状調査
椎葉岳彦, 今井俊介, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大院農)
- P-92 イネいもち病菌に生育阻害をもたらす 2 種のマイコウイルスの性状解析
鈴木佑, 加藤幸栄, 浦山俊一, 青木菜々子, 有江力, 寺岡徹, 福原敏行, 森山裕充 (農工大院・農学府)
- P-93 ABC transporter $\Delta abc-1$ と MFS transporter $\Delta ant-1$ の殺菌剤感受性
高橋正和, 山下和宏, 石川智子, 亀井誠之, 福森文康, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院 生命科)
- P-94 *Cryphonectria parasitica* の新規低分子量 GTP 結合タンパク質 RAS3
高橋拓也¹, Gil H. Choi², Donald L. Nuss², 笠原紳¹ (¹宮城大・食産業・環境、²U. of Maryland Biotech. Inst.)
- P-95 植物共生糸状菌 *Epichloë festucae* のもつ植物細胞死誘導タンパク質遺伝子 NLP の相同遺伝子は細胞死誘導活性を失う変異を持つ
赤野史岳, 川北一人, 竹本大吾 (名大院生命農・生物機構)
- P-96 植物病原および共生糸状菌の菌糸伸長時および宿主植物感染過程におけるカルシウムイオン濃度変動と活性酸素種生成の関与
潮田遼, 川北一人, 竹本大吾 (名大院生命農・生物機構)

特別講演

Comparative analysis of white rot and brown rot fungi: genomes, transcriptomes and secretomes

Amber Vanden Wymelenberg¹, Jill Gaskell², Mike Mozuch², Phil Kersten², Dan Cullen^{1,2}, Grzegorz Sabat³, Diego Martinez⁴, Igor Grigoriev⁵ and Robert Blanchette⁶.

¹Department of Bacteriology, University of Wisconsin, Madison, WI. ²U.S. Forest Service, Forest Products Laboratory, Madison, WI. ³Genetics and Biotechnology Center, University of Wisconsin, Madison, WI. ⁴University of New Mexico, Albuquerque, NM. ⁵U.S. Department of Energy, Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA. ⁶Department of Plant Pathology, University of Minnesota, St. Paul, MN

Lignocellulose in vascular plant cell walls is one of the largest sinks for fixed global carbon and is receiving increased attention as a potential biofuels feedstock. Relatively few organisms can efficiently convert the recalcitrant polymer blend in lignocellulose to monomeric components. The main exceptions are certain basidiomycetes, which attack wood through two main decay types called white-rot and brown-rot. Wood-decaying basidiomycetes are essential contributors to carbon cycling in forest soils, and brown-rot fungi are additionally important because they are a major cause of failure in wooden structures.

White-rot fungi degrade all components of plant cell walls, including cellulose, hemicellulose and lignin. Although they cannot grow on lignin alone, they have the unique ability to completely degrade a large proportion to CO₂ and H₂O. This biodegradative strategy exposes the structural polysaccharides of plant cell walls, thus making them susceptible to hydrolysis by cellulases and hemicellulases. Brown-rot fungi such as *Postia placenta* employ a different approach. Early in the decay process, they rapidly depolymerize cellulose but without concomitant weight loss. As decay progresses, brown-rot fungi modify lignin extensively, but the products remain *in situ* as a polymeric residue. Given the incomplete ligninolysis that occurs during brown-rot, it remains unclear how these fungi gain access to plant cell wall polysaccharides. It seems probable that the two decay types share at least some mechanisms, because molecular phylogeny, morphological considerations, and substrate preference suggest that brown-rot fungi have repeatedly evolved from white-rot fungi (1). *P. placenta* is closely related to the model white-rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*, and recent comparison of their genomes (2) indicate that the derivation of brown-rot is characterized largely by the contraction or loss of multiple gene families that are thought to be important in typical white-rot, such as cellulases, lignin peroxidases (LiPs), manganese peroxidases (MnPs), copper radical oxidases (CROs), cellobiose dehydrogenase (CDH), and pyranose-2-oxidase (POX). This general pattern of simplification is consistent with the view (3) that brown-rot fungi, having evolved novel mechanisms for initiating cellulose depolymerization, have cast off much of the energetically costly lignocellulose-degrading apparatus that is retained in white-rot fungi, such as *P. chrysosporium*.

To further our understanding of lignocellulose degradation, broad computational comparisons of the *P. placenta* and *P. chrysosporium* genomes have been undertaken in conjunction with high throughput examination of transcript profiles and secreted proteins. More specifically, full genome NimbleGen expression arrays and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) are being used to characterize transcriptomes and secretomes of these fungi when cultivated in defined media, in media containing ball milled wood as sole carbon source, and in blocks of colonized wood.

Analysis of the *P. placenta* genome has elucidated a repertoire of genes and expression patterns distinct from those of all known cellulose-degrading microbes, including *P. chrysosporium*. The *P. placenta* genome completely lacks cellulose-binding domains and the number of glycoside hydrolases is relatively low owing in part to the paucity of cellulases. No exocellobiohydrolases and only two potential β -1,4 endoglucanase genes have been identified. Nevertheless, several glycoside hydrolase-encoding genes, including a putative endoglucanase, are highly expressed when *P. placenta* was grown under cellulose induction.

Many investigations of white-rot and brown-rot mechanisms support the participation of low molecular weight oxidants. Hydroxyl radical, generated via the Fenton reaction ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ \Rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH}$), has been repeatedly implicated as a diffusible oxidant in brown rot, and to a lesser extent, in white rot. As reviewed (4), three somewhat overlapping mechanisms of oxidative degradation have been advanced. One view emphasizes the importance of CDH. In the case of *P. placenta*, genome analysis has convincingly shown that CDH is absent (2). Another view invokes the role of low molecular weight glycopeptides that catalyze extracellular iron reduction. Initially identified in *P. chrysosporium* (5), potential orthologs of these glycopeptide-encoding genes were identified in the *P. placenta* genome and in one case, increased transcript levels have been observed in cellulose-containing media. Accordingly, a role for these glycoproteins in a *P. placenta* Fenton system is possible. The third mechanism involves extracellular quinone redox cycling (6). Evidence supporting this system includes cellulose induction of genes encoding quinone reductase, quinate transporter, phenylalanine ammonia lyase and laccase. However, the importance of hydroquinone-driven Fenton chemistry in *P. placenta* remains unclear because this fungus secretes high levels of oxalate (7), and Fe^{3+} -oxalate chelates are poorly reducible by hydroquinones (8).

Transcript levels of Fet3 and Frt1, central components of iron acquisition systems, are substantially increased in cellulose-grown cultures of *P. placenta*, but not in identically grown *P. chrysosporium* cultures (2, 9). While cellulose itself may sequester Fe^{3+} (10), the generation of Fe^{3+} -oxalate and potentially other redox active iron-chelates might also contribute to lower the effective concentration of bioavailable iron that is accessible to the organism. Thus, cellulolytic conditions might switch on the high-affinity iron uptake system to ensure proper levels of intracellular iron in *P. placenta*.

Also compatible with Fenton mechanisms, elevated transcripts and proteins corresponding to structurally divergent oxidases (e.g. copper radical oxidases, glucose-1-oxidases and methanol oxidases) and putative iron reductases have been identified principally in *P. placenta* cultures. Viewed together with the significant number of hemicellulases secreted in cellulose medium, wood decay by *P. placenta* likely involves attack by both oxidative and hydrolytic mechanisms.

1. D. S. Hibbett, M. J. Donoghue, *Syst. Biol.* **50**, 215 (2001).
2. D. Martinez *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1954 (2009).
3. J. J. Worrall, S. E. Anagnost, R. A. Zabel, *Mycologia* **89**, 199 (1997).
4. P. Baldrian, V. Valaskova, *FEMS Microbiol Rev* **32**, 501 (2008).
5. H. Tanaka *et al.*, *J Biotechnol* **128**, 500 (2007).
6. R. Cohen, M. R. Suzuki, K. E. Hammel, *Appl Environ Microbiol* **70**, 324 (2004).
7. S. Kaneko, K. Yoshitake, S. Itakura, H. Tanaka, A. Enoki, *J Wood Sci* **51**, 262 (2005).
8. K. A. Jensen, Jr., C. J. Houtman, Z. C. Ryan, K. E. Hammel, *Appl Environ Microbiol* **67**, 2705 (2001).
9. A. Vanden Wymelenberg *et al.*, *Appl Environ Microbiol* **75**, 4058 (2009).
10. G. Xu, B. Goodell, *J Biotechnol* **87**, 43 (2001).

シンポジウム

S-1

アグリバイオインフォマティクス教育研究ユニットの活動について

清水謙多郎（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】

東京大学大学院農学生命科学研究科では、平成 16 年度より、農学分野のバイオインフォマティクス教育研究組織であるアグリバイオインフォマティクス教育研究プログラムを実施している。アグリバイオインフォマティクスとは **Agricultural Bioinformatics** の略であり、生命現象を解明するための情報科学であるバイオインフォマティクスと、農学生命科学（アグリバイオ）の実践的研究の融合を意味する。

現在、農学分野には、食、環境、生命に関わるさまざまな社会問題に対する対応が求められているが、バイオインフォマティクスは、これらの問題を解決するための手法として必要不可欠であり、基盤となるものである。また、さまざまな分野の広範な研究情報を統合し、新たな教育研究リソースとして体系的な利活用を図る上でもバイオインフォマティクスは重要である。しかしながら、アグリバイオの分野におけるバイオインフォマティクスの利用は、医・薬の分野に比べて複雑な側面も多く遅れており、研究者も不足している。本プログラムでは、アグリバイオの研究に携わる大学院生や社会人にバイオインフォマティクスの講義と実習を行うとともに、研究指導を行って、実験研究者が、バイオインフォマティクスの知識や技術を身につけ、使いこなし、自身の研究に役立たせることのできる融合型の人材を養成することを目指している。

【プログラムの概要】

本プログラムでは、以下の 2 つのコースを用意している。

- (1) コース 1: アグリバイオの研究を行っている大学院学生や社会人に対し、バイオインフォマティクスの基礎知識およびアグリバイオの研究で一般に役立つ利用技術を、実習を大幅に採り入れたカリキュラムにより習得させる。
- (2) コース 2: これらの知識・技術の習得を前提に、担当教員の指導のもと、バイオインフォマティクスを利用した研究を指導し、大学院学生については、修士・博士論文の指導を補助する。

コース 1 の講義・実習科目は、基礎、方法論、先端トピックスの 3 つのカテゴリーからなる。

基礎の科目は、生命科学のための各種データベースの利用法やバイオインフォマティクスを利用した様々なツールの利用法、およびそれを補助するようなプログラミング技術、および統計の基礎を学ぶためのものである。方法論の科目は、基礎の科目を土台として、様々なバイオインフォマティクスの手法について、その原理から利用法を豊富な実例を通して学ぶ。先端トピックスの科目は、バイオインフォマティクスを利用したアグリバイオ研究のケーススタディである。外部の研究者を非常勤講師として招き、オムニバス形式で講義する。

これらの科目は研究科の共通科目として、すべての専攻の学生が受講し単位を取得することができるようにしている。また、これらの科目のほとんどは平日の夜や夏休み期間の集中講義として開講され、既存の科目の履修と重ならないようにしている。基礎および方法論の科目の多くでは、受講者に 1 人 1 台ノート PC を配布し、実習を伴う実践的な教育を行っている。

コース 2 では、個々の研究の現場で学位論文を直接的に指導する。こうした大学院生の指導を通して、実験研究者とインフォマティクス研究者、つまりウェットとドライが密接に協力し、現場に即したバイオインフォマティクスを模索していこうとしている。

【セミナー・シンポジウムの開催】

本プログラムでは、「アグリバイオインフォマティクスセミナー」と題して、随時、関連分野のセミナーを開催している。これらは、本プログラムの教員・受講者だけでなく一般に公開しており、

この分野の内外の最先端の研究を紹介する役割をもっている。また、年に1回シンポジウムを開催し、本プログラムの教育・研究成果を発表している。学会活動としては、日本バイオインフォマティクス学会に「アグリバイオインフォマティクス研究会」を設置した。また、バイオインフォマティクス標準カリキュラムの検討に参加し、食品インフォマティクスのカリキュラムの策定が行われた。今後、この分野のインフォマティクスの進展にあわせて、本プログラムの教育にも反映させていきたい。

【実施体制】

本プログラムは、平成16年度から20年度までは、文部科学省振興調整費、平成21年度以降は、文部科学省特別教育研究経費（教育改革）をもとに運営されている。東京大学大学院農学生命科学研究科および生物生産工学研究センターの教員のほか、企業、他大学、他研究科の教員も招聘し、常勤・非常勤の特任教員を新たに雇用して教育を実施している。

本プログラムの特徴の一つとして、産業界との連携がある。非常勤の特任教員として、多数の企業の研究者を招聘し、企業の現場で行われているバイオインフォマティクスを利用研究、企業が求めているバイオインフォマティクス技術を講義やセミナーで紹介していただくとともに、企業の現場での技術開発と人材養成の経験を生かした学位論文の指導をお願いしている。

【過去5年間の実績】

本プログラムでは、一定の単位を取得した受講生（コース1）とバイオインフォマティクスを利用した研究で修士・博士の学位を取得した受講生（コース2）に修了認定書を発行している。昨年度までの5年間で、コース1は合計91名、コース2は合計28名が修了した（両コースの修了者は21名である）。また、303名（延べ1174名）が本プログラムの講義・実習を受講した。受講者の多くは農学生命科学研究科の大学院生であるが、ほとんどの専攻から受講があり、他研究科（他大学、社会人を含める）からも40名以上の受講があった。さらに、本プログラムの活動を通して30件以上の共同研究が発足した。授業アンケートによると、受講者の87.1%が自身の研究に役立つと回答し、講義資料は93.5%、実習は92.3%が有効であったと回答している。進学者・卒業者を対象にしたアンケートでは、回答した73名中66名（90.4%）が本プログラムの受講がその後の自分の研究に役立ったという回答であった。

【フォーラム活動】

平成21年度からは、新たに、研究課題ごとにフォーラムを作り、セミナー、シンポジウムの開催から、企業との共同研究、学生への研究指導など、それぞれの分野において、研究・教育の活性化を重点的に行うことを目指した体制をとっている。本年4月、まず、バイオインフォマティクスを基盤とする次世代の微生物学の展開を目指し、微生物インフォマティクス・フォーラムが立ち上がった。その後、食品インフォマティクス・フォーラム、アグリ/バイオ・センシングと空間情報フォーラム、基盤インフォマティクス・フォーラムなどが順次発足している。フォーラムのメンバーは、本研究科の教員のほか、他大学、企業、試験研究機関の研究者で構成される。今後も、随時フォーラムを立ち上げ、ウェットとドライの連携はもちろん、産学官の連携、国際的な連携を推し進め、バイオインフォマティクスを基盤として、分野間で真の統合が行えるよう、努力していきたいと考えている。

アグリバイオインフォマティクス教育研究ユニットの詳細については、以下のURLを参照されたい。

<http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/>

Professional Programme of Agricultural Bioinformatics

Kentaro SHIMIZU

Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo

次世代シーケンシング技術が拓く微生物研究の新潮流

西 達也 (株式会社ジナリス、代表取締役社長)

【はじめに】

次世代シーケンサーの登場により、微生物研究は真の意味でゲノム情報活用時代に突入した。微生物は多様な遺伝子資源を容易に収集できることから、新規酵素の探索にも利用されてきたが、次世代シーケンシング技術により配列レベルでの酵素探索が加速化される。さらに、次世代シーケンサーを用いた RNA の網羅的解析は、多くの点で DNA マイクロアレイ解析と比べて優れた技術であり、マイクロアレイ研究にも大きな衝撃を与えることになる。本発表では、真核微生物ゲノムの新規配列決定、変異同定および RNA 解析について、我々が利用している技術を紹介する。

【次世代シーケンシング技術による新規ゲノム配列決定】

次世代シーケンサーとしては、Roche 454 Genome Sequencer FLX Titanium (FLX Titanium と略す)、Illumina Genome Analyzer Iix (Illumina GAIix)、Applied Biosystems SOLiD3 System (SOLiD3) の3機種がよく利用されている。微生物ゲノムの新規配列決定に向いている機種は FLX Titanium である。断片化した染色体 DNA の両端の配列を決定するためのメイトペア・ライブラリー (ただし、約半数はフラグメント・ライブラリーを含む) を作製し、通常ゲノムサイズの 15 倍以上の配列を決定した後、コンティグ配列を得る。膨大な数のコンティグ配列が生じるので、従来はサンガー法によるシーケンシング (サンガーシーケンシング) を平行して実施する必要があった。一方、メイトペア・ライブラリーを採用した場合、コンティグ配列を連結したスキュフォールド配列が得られることから、必ずしもサンガーシーケンシングを併用する必要がなくなった。さらに各コンティグ末端の配列情報をもとにしたプライマーウォーキング法などにより、スキュフォールド配列の連結と未決定配列の解明が容易に行える。なお FLX Titanium の場合、ホモポリマー領域で挿入・欠失エラーが生じることが多いので、配列決定精度を向上させるためには、サンガーシーケンシング以外に、Illumina GAIix シーケンシングの併用も有効である。

【次世代シーケンサーデータ解析】

真核微生物ゲノムは、細菌ゲノムと異なり、倍数体であることが多い。この染色体の倍数性にもかかわらず、従来のゲノム配列決定ではアセンブル処理により強制的にコンセンサス配列を作成し、研究に用いてきた。次世代シーケンシング技術の発展により、真核微生物ゲノム配列を大きな冗長度で安価に決定できるようになったので、倍数性による染色体間の配列の違いも解析できる。我々が開発したゲノム解析システム GiGS (Genaris integrated Genome Server) を用いると、倍数性に基づく配列の相違を容易に検索・分析できる。また複数種の次世代シーケンサーのデータを比較することにより、配列決定エラーと倍数性に基づく配列の相違を判別できる。しかも、各配列相違箇所に対してアミノ酸置換などのアノテーションを付与し、データベース化を行うので、倍数性の解析以外に変異株間のゲノム配列の比較解析が容易になる。変異同定に関しては、SOLiD3 が、再配列決定の精度が優れていることから、頻繁に利用されている。

【遺伝子同定】

我々は、原核生物ゲノムからの遺伝子同定に関しては、独自開発アルゴリズム GeneLook と相同性解析を統合した手法により、感度・特異性の指標とともに 99%以上の精度で翻訳領域を同定できる技術を確認した¹⁾。本手法を改良することにより、真核微生物の cDNA から翻訳領域を高精度に同定する技術も確立した。一方、真核微生物の遺伝子はエキソン・イントロン構造を有することから、その高精度予測は難しい課題である。我々は、多数の真核微生物ゲノムの遺伝子予測において複数の遺伝子予測プログラム (geneid、GlimmerM、GlimmerHMM、Augustus など) を試したところ、個々のケースでプログラムごとに予測精度が異なることがわかった。この経験をもとに、遺伝子予

測については、これら複数のプログラムによる予測を実際に行い、最も精度が高いと思われる予測結果を採用している。

コンピュータによるエクソン・イントロンの予測だけでは同定精度向上に限界があることから、多様な生育条件の菌体から抽出した mRNA をもとに cDNA ライブラリーを作製し、FLX Titanium により網羅的に cDNA 配列を決定し、翻訳領域（エクソン）を実験的に同定することも有効な手法である。この際、できるだけ少ない配列決定量で多くの mRNA 種をカバーするために、均一化 cDNA ライブラリーを作製する手法も頻繁に採用している。

【翻訳領域（タンパク質）に対するアノテーションと比較ゲノム解析】

我々は、翻訳領域に対する標準的な解析として、BLASTP、Pfam/PRINTS/Prosit のタンパク質モチーフ解析、COG と KOG ベースのカテゴリー分類、E C 番号の付与、シグナルペプチド予測、膜貫通領域予測などのアノテーションを行っている。さらに、これら解析結果をデータベース化した後、我々が開発したゲノム解析システム GiGS を利用することにより、迅速な検索・分析を簡易に実施できる環境を提供できる。また近縁種間のオーソログ解析を行った後、GiGS を用いて遺伝子間の関連付けを行い、比較ゲノム解析を実施できる。

【次世代シーケンシング技術の新しい応用】

ChIP-chip は、転写因子の結合部位、DNA メチル化部位、クロマチン構造変化の研究に活用されてきたが、最近では次世代シーケンシング技術を利用した ChIP-Seq が主流になりつつある。また次世代シーケンシング技術は mRNA や small RNA などの RNA 研究にも大きな影響を与えつつある。トランスクリプトーム解析は主に DNA マイクロアレイを利用して行われてきた。mRNA から逆転写された cDNA 自体を分析できれば、その分析法は原理的に最良の方法であることは自明であるが、この分析（デジタル遺伝子発現）を次世代シーケンシング技術は可能にした。mRNA の 3' または 5' 端配列を決定する SAGE に類似した方法、そして cDNA または mRNA をランダムに断片化した後に配列を決定する mRNA-Seq 法がよく用いられている。遺伝子発現量の比較であれば精度が優れている前者の利用が好ましい。一方、後者の mRNA-Seq 法は、遺伝子発現量の比較のみならず、スプライシングバリエーションの検出やエクソンの検証などの目的にも利用される。なお次世代シーケンシング技術の利用により mRNA の絶対的定量が原理的に可能になるが、特に Illumina GAIIx と SOLiD3 の場合は GC 含量による配列出現のバイアスが大きいので、絶対的定量値の算出には留意が必要である。

【おわりに】

オミックス研究は膨大なコストがかかる上、異なるプラットフォームのオミックスデータの統合化も簡単でないと言われてきた。ところが、次世代シーケンサーの登場により、ゲノム解析、比較ゲノム、トランスクリプトーム解析、変異解析、エピジェネティクスなどの多様な解析について、同一プラットフォームで研究を進めることが可能となった。しかも、以前と比べると格段に安い経費で実施できる。次世代シーケンシングの各アプリケーションは、分子生物学研究における制限酵素や DNA 精製キットのような身近なものになっていくだろう。また、ゲノム情報は多くの生命科学研究の基礎になるものであり、また古い配列データを新しい技術により精度を向上させることも可能である。したがって、次世代シーケンサーから産生される膨大なデータを安価に管理・保管することは重要な課題になるだろう。

1) T. Nishi *et al.* *Gene* **346**, 115–125 (2005).

A new tide of microbial researches created by next-generation sequencing technologies

Tatsunari Nishi

CEO, Genaris, Inc.

Aspergillus fumigatus のヌクレオソームマップ解析

西田 洋巳(東京大学大学院農学生命科学研究科)
 本山 高幸(理化学研究所長田抗生物質研究室)
 山本 尚吾(東京大学先端科学技術センター)
 油谷 浩幸(東京大学先端科学技術センター)
 長田 裕之(理化学研究所長田抗生物質研究室)

【序】

Aspergillus fumigatus はアスペルギルス症の原因菌として知られており、多くの二次代謝産物を生産する。その全ゲノム塩基配列(29,384,958 bp)は2005年に発表されている¹⁾。*Aspergillus* においてもヒストン修飾を介したクロマチン構造の変化による二次代謝産物の生産調節の制御機構の存在が示された²⁾。そこで、我々は次世代シーケンサーを用いて*A. fumigatus* のクロマチン構造解析の基盤となるヌクレオソームマップの作製を行った³⁾。

【方法】

A. fumigatus クロマチンに対し、Micrococcal Nuclease (MNase) 処理を行い、その後、切断 DNA 断片をアガロースゲル電気泳動により分離し、単一、単二ヌクレオソーム由来の DNA を切り出した。次にそれらの DNA 断片を Illumina Genome Analyzer を用いて、両末端 36 塩基を決定し、それら塩基配列ペアをゲノムにマップした。その際、切り出した長さを考慮し、単一ヌクレオソーム DNA 断片では 236 塩基以上、単二では 436 塩基以上の長さでマップされたものは除いた。

【結果】

単一ヌクレオソーム DNA 断片 7,715,001 および単二ヌクレオソーム DNA 断片 8,565,279 をマップした。そのデータの中で完全に両末端配列が一致したものは同一位置としてカウントし、単一ヌクレオソーム 5,975,567 および単二ヌクレオソーム 6,995,122 の異なる位置を 1 塩基の精度をもって決定した。これは、単一ヌクレオソームの位置を平均 4.9 塩基密度、単二ヌクレオソームの位置を平均 4.2 塩基密度で決定したことになる。それらの長さの分布を調べたところ、単一ヌクレオソームでは 135 および 150 塩基長の 2 つのピーク、単二では 285 塩基長の 1 つのピークがあった³⁾。

次に、単一ヌクレオソームにおける 2 つのピークの違いを調べるため、*A. fumigatus* の全遺伝子発現(9,887 遺伝子)を検出できるマイクロアレイを作製し、それを用いて遺伝子発現レベルを評価した。そのデータに基づき、リボソーム RNA を除く遺伝子の中で、最も高発現であったものから 50 遺伝子、最も低発現であったものから 50 遺伝子を選び、それぞれを高発現遺伝子群、低発現遺伝子群とした。

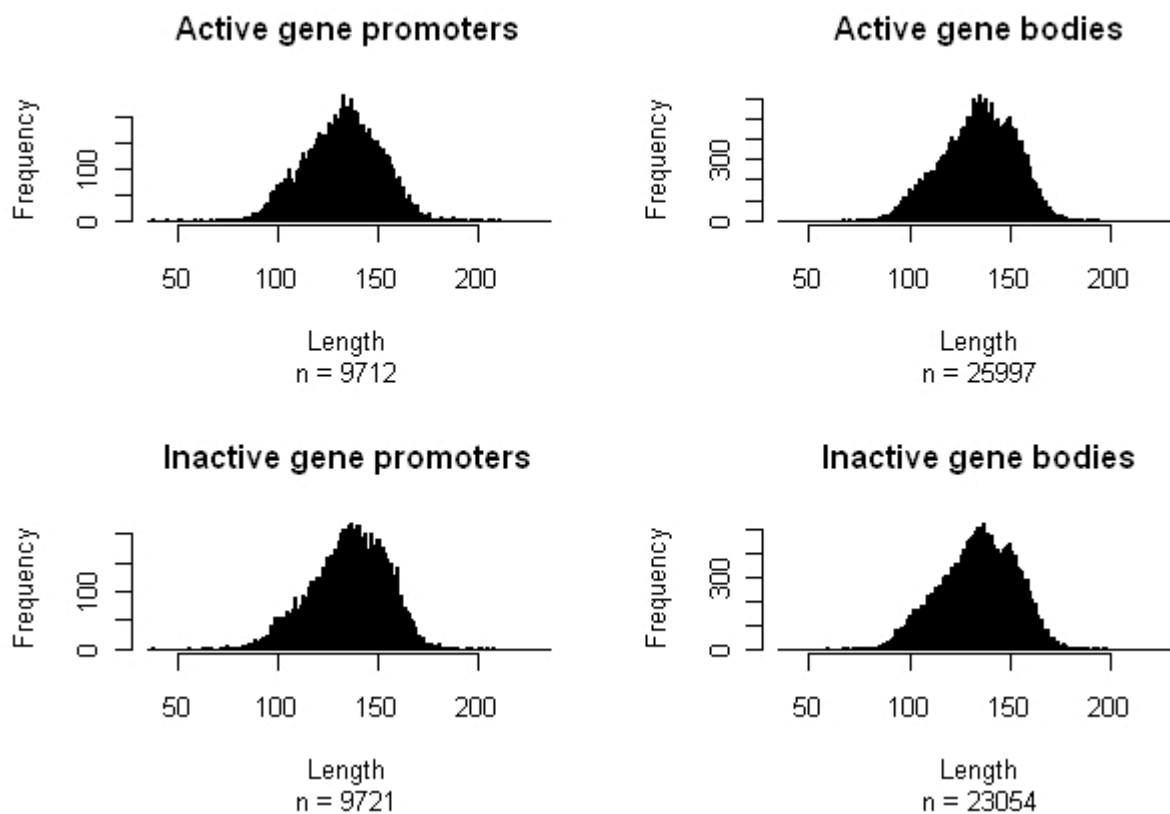
これらの遺伝子領域をプロモータ領域、ボディ領域(翻訳開始から終結まで)に分け、ヌクレオソームマップからのヌクレオソーム DNA 長の分布を調べた。その結果、高発現遺伝子群ボディ領域、低発現遺伝子群プロモータおよびボディ領域における単一ヌクレオソームの長さの分布には違いがなく、2 つのピーク(135 および 150 塩基長)を持ったが、高発現遺伝子群プロモータ領域においては 150 塩基長のピークが欠落し、135 塩基長のピークのみとなっていた(図 1)。また、個々の遺伝子領域のヌクレオソームマップにおいて、150 塩基長のヌクレオソームが高発現遺伝子プロモータで少ないことを確認した³⁾。なお、単二ヌクレオソームの長さの分布についてはこれら 4 つの領域における差は認められなかった。

また、単一ヌクレオソームの前駆体として単二ヌクレオソームを考え、MNase に対する感受性を各塩基位置において評価した結果、高発現遺伝子プロモータ領域が他の領域よりも特に MNase 感受性が高いとはいえないことがわかった。よって、高発現遺伝子プロモータ領域における 150 塩基長のピーク欠落を MNase 感受性の違いだけでは説明できない。

【考察】

このことは、MNase 処理後により長い DNA が巻きついているヌクレオソームは遺伝子プロモータ領域において、遺伝子の高発現に対して抑制的に働いていることを示唆し、今後、ヒストンの修飾やバリエーション

分布との関連を解析することにより、その機能の詳細がわかると考えている。



【図1】 単一ヌクレオソームの長さの分布

References

- 1) W.C. Nierman *et al. Nature* **438**, 1151-1156 (2005)
- 2) J.W. Bok *et al. Nat. Chem. Biol.* **5**, 462-464 (2009)
- 3) H. Nishida *et al. Bioinformatics* **25**, 2295-2297 (2009)

Nucleosome maps of *Aspergillus fumigatus*

Hiromi NISHIDA

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo

Takayuki MOTOYAMA

Antibiotics Laboratory, Advanced Science Institute, RIKEN

Shogo YAMAMOTO

Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo

Hiroyuki ABURATANI

Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo

Hiroyuki OSADA

Antibiotics Laboratory, Advanced Science Institute, RIKEN

メタゲノム機能解析とその応用研究

宮崎 健太郎 ((独)産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門 グループ長)

【はじめに】

従来、微生物由来の有用酵素を取得するには、集積培養と純粋分離により、目的酵素の生産菌を探し当てる手法がとられてきた。しかし、近年の分子生物学的手法を駆使した環境中の微生物群衆解析から、環境中には従来予想されていたよりもはるかに多種多様な微生物が存在していることが明らかとなった^{1,2)}。環境により程度の差こそあれ、99%以上の微生物は、実験室での分離培養が困難な「難培養性」ということになるらしい。この事実を鑑みると、これまで我々がとってきた培養に基づく酵素スクリーニングは、基質による集積・選択にも増して、培養ができるか否かという点において、強い選択がかけられてきたことになる。培養に手こずるような微生物など、酵素生産・精製にも苦勞し、微生物触媒としても使えない、従来法はこれを加味した選抜であったと解釈できなくもないが、難培養性微生物の持てる力を正當に評価することも必要ではなからうか。では、難培養性微生物の遺伝子資源を活用するにはどうしたらよいであろうか？ —その方法の一つがメタゲノム解析である。培養できないなら諦める。そのかわりそのゲノムだけは丸ごと頂戴する（単一ゲノムではなく、高次のゲノムという意味で“メタ”という接頭辞が付いている）という寸法で、環境から抽出したさまざまな微生物由来のゲノムを直接ライブラリ化する。クローン化された遺伝子は匿名化され、もはやその起原をたどることも生理的役割を解明することも困難になるが、この斬新なアプローチは未利用微生物資源の新たな探索法として脚光を浴びている。

【メタゲノムライブラリの作成とスクリーニング】

本講演では、芳香族化合物の分解系酵素およびバイオマス糖化酵素についての研究例を紹介する。前者については、各種芳香族化合物で汚染された工業廃水を処理する活性汚泥よりメタゲノムを調製し、後者については木質堆肥などを利用した。これらの環境試料よりメタゲノムを調製し、フォスミド（平均インサート長 30~40 kb）あるいはプラスミド（平均インサート長 5~10 kb）をベクターに、大腸菌を宿主としてライブラリを構築した。前者の場合は、分解系遺伝子をオペロンとして捕捉することにも興味があったため、長いインサートのクローニングに適したフォスミドを用いている。これらのライブラリを芳香族分解系酵素としてはカテコール分解酵素の一種、エキストラジオール ジオキシゲナーゼ（EDO）を、バイオマス糖化酵素としては β -グルコシダーゼ（Bgl）を標的に活性スクリーニングを行った。

【メタゲノム由来 EDO】

EDO はカテコールを解裂し、黄色化合物を産生する反応を触媒する。肉眼での活性検出が容易なこの反応を指標に、我々はメタゲノムライブラリをスクリーニングした。組換え大腸菌の培養条件や酵素反応条件などを至適化した結果、91 もの陽性クローンを取得することができた。この過程で我々は自動液体分注ロボットを使用した。これは組換え大腸菌を寒天培地上に生育させ、カテコールを噴霧するという、自然界からの微生物スクリーニングのときに用いられる常套手段では一つも陽性クローンを得られなかったからである。感度の違いは明白で、溶液系で取得された活性の強いクローンを寒天培地に展開し、カテコールを噴霧してみたが、余程目を凝らしても「黄色」には見えなかった。単純ではあるが、スクリーニング系を改良することで、「メタゲノムらしきとは何か？」を議論するに足る多くのクローンを得たことは我々にとって大きな意義を持った。すなわち得られたクローンの遺伝子解析、酵素解析から、新規遺伝子の発見と環境中での EDO 遺伝子の

分布³⁾、適応進化⁴⁾、オペロンレベルでのダイナミックな遺伝子進化⁵⁾などに関し、多くの知見を得ることができた。より詳細には、新規な EDO サブファミリーを 4 種提唱し³⁾、そのうちのひとつ (I.2.G) が少なくとも我々の構築したライブラリ中には優先的に存在すること (ライブラリ構築からスクリーニングまで各種バイアスがあるため、これがそのまま環境中の分布を反映しているとは言い難いが・・・)、I.2.G サブファミリーに属する EDO には遺伝子多型が見られ、一遺伝子変異を蓄積しながら高活性タイプの酵素へと進化していくこと⁴⁾、I.2.G EDO 遺伝子に隣接する遺伝子について、オペロンレベルで大きな変動があること⁵⁾、I.2.G EDO 遺伝子を含むいくつかの遺伝子断片を組み合わせると、環状プラスミドが再構築されること⁵⁾、などである。この他にも論文上では未報告の結果として、偽遺伝子が結構な頻度存在することや遺伝子間のリピート配列の多型により転写レベルでの発現調節がなされているであろうことなど機能スクリーニングと徹底した遺伝子解析により、環境中での遺伝子動態を垣間見ることができた。世間では DNA シーケンス解析を主軸に、これと生物情報以外の各種知見を統合した、よりマクロなレベルでのメタゲノム解析が主流ではあるが、我々の方法はあくまでもターゲットとしている生物機能に焦点を当て、遺伝子解析との結果を照らし合わせる方法であり、同じ「メタゲノム解析」と言っても方法が異なる。この方法では、ゲノム情報とインフォマティクスからウェットデータ無しに推定の議論を重ねるよりも、よりマイクロなレベルで精緻な議論ができるのではないかと思っている。

【メタゲノム由来 Bgl】

Bgl は、生成物 (グルコース) により競争阻害を受けることが知られている。BRENDA データベース (http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.21) を検索してもわかるとおり、一部の例外を除き、既知 Bgl の大半はこのよくない性質を持っている。そこでメタゲノム手法により、グルコース耐性を持つ Bgl をスクリーニングすることとした。メタゲノムのソースは、木質由来堆肥としたが、これは当然、分解菌が集積されていることを見込んでのことである。芳香環分解系の場合とは異なり、Bgl 遺伝子のサイズはせいぜい 3 kb 程度に収まると思われたため、堆肥メタゲノムを 5-10 kb 程度に剪断し、プラスミドに組み込み、大腸菌を宿主としてライブラリ化した。先の EDO の例では、生成物が水溶性であるため、液体評価系が功を奏したが (寒天中では生成物が拡散)、Bgl のスクリーニングには不溶性生成物を与える X-β-Glucoside を用いることができたため、大腸菌ライブラリを X-β-Glucoside を含む寒天培地に塗布し、青色コロニーを選択するという方法をとった。本研究では、「ものとり」以外にもいくつかの興味をもち研究を進めた。(i) 果たしてグルコース耐性 Bgl は存在するか? (ii) 環境による違いは? (iii) 酵素学的性質は? (iv) 遺伝子の性質は? ーなどである。俯瞰的立場で環境中の Bgl の分布、頻度を捉えるとともに、個別酵素の性質の特異性を明らかにするという二点 (バイオマス糖化に役立てば尚喜ばしい) である。結果、堆肥といえども各々製造工程が異なるためかヒット率もまちまちで、青色コロニーの出現数は数万コロニーをスクリーニングし、2~768 個と開きがあった。このうち、5% (278 mM)、10% (556 mM) という高濃度のグルコース存在下でも活性をある程度維持する (既知酵素の多くが $K_i=1\sim 10$ mM である) ものは、すべての環境由来のものを合わせると 32 クローン得られた。このうち 10% グルコースでも全く阻害を受けないものもあった。詳細な酵素学的解析、遺伝子解析を進めている最中であるが、メタゲノム手法を用いることで、新規 Bgl が得られたものと考えている。

【おわりに】

メタゲノムを有用酵素の宝庫としてその探索に乗り出している研究室は、世界的にもまだまだ少ない。かけ声以上に有用な酵素が見つかってきていないというのも一因だろうが、酵素の発掘を難しくしている最大の要因は「遺伝子発現問題」であろう。起源微生物の異なる微生物が大腸菌の転写・翻訳装置できちんと認識されるかどうかは不明で、恐らくかなり効率が低いであろうと推測

される。スクリーニング系の工夫でいくらか改善も見られたが、取りこぼしがどの程度なのかもよくわからないのが現状である。我々は、メタゲノムならではこの抜本的な問題を中心課題に据え、遠回りのようであるが、最も正攻法の方法でメタゲノム攻略に取り組んでいる。

- 1) R. I. Amann *et al.* *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169 (1995)
- 2) 鎌形洋一、*化学と生物* **46**, 600-607 (2008)
- 3) H. Suenaga *et al.* *Environ. Microbiol.* **9**, 2289-2297 (2007)
- 4) H. Suenaga *et al.* *FEMS. Microbiol. Ecol.* **69**, 472-480 (2009)
- 5) H. Suenaga *et al.* *ISME J.* doi: 10.1038/ismej.2009.76

Functional metagenomics for industrial applications

Kentaro MIYAZAKI

Institute for Biological Resources & Functions, AIST

麹菌ゲノム解析が産業界にもたらすもの

○町田雅之^{1*}、小池英明^{1*}、神野浩二²、堀川博司²、細山哲²、喜久里育也^{3*}、照屋盛実^{4*}、塚原正俊^{5*}、藤森一浩^{1*}、鼠尾まい子^{5*}、佐藤友紀^{3*}、三輪友希乃^{5*}、矢野修一^{5*}、今田有美^{5*}、和地陽二^{3*}、河原林裕^{1*}、山田修⁶、服部貴澄⁷、佐野元昭⁸、玉野孝一¹、福田和郎⁹、安原貴臣⁹、比嘉賢一⁴、大箸信一⁸、桐村光太郎⁷、有田正規¹⁰、浅井潔¹⁰、阿部敬悦¹¹、五味勝也¹¹、石川雄章¹²、三上重明⁶、仲宗根薫¹³、藤田信之²、平野隆^{1*}（¹産総研、²製品評価、³沖縄科技振センター、⁴沖縄工技センター、⁵トロピカルテクノセンター、⁶酒総研、⁷早稲田・理工、⁸金沢工大、⁹アサヒビール、¹⁰東京大院・新領域、¹¹東北大院・農、¹²醸造協会、¹³近畿大、*沖縄先端バイオ）

【はじめに】

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、酒、味噌、醤油などの日本の伝統的な発酵産業に広く利用される産業微生物であり、最近では酵素生産にも利用されている。黄麹菌は長い食経験があり、米国 FDA の GRAS にも記載されるなど、世界的にも安全な微生物と認識されている。黒麹菌 *A. awamori* は、沖縄の泡盛や九州の焼酎の製造に用いられているが、有機酸の高生産性や酸性領域での高い糖質分解活性など、温暖な地域での醸造に優れた性質を持っている。黒麹菌は、九州で焼酎醸造に利用される白麹菌 *A. kawachii* や、欧州でクエン酸生産に利用される *A. niger* に近く、黄麹菌とも近縁であることなどから、比較ゲノム解析による学術・産業利用の両面からの研究対象として重要である。

日本の伝統的発酵産業では、原料となる米、大豆、麦などを水溶液あるいは懸濁状態で用いるのではなく、蒸すなどして水分を含ませた固体の状態で発酵を進めることに特色がある。これは「麹（こうじ）」と呼ばれる固体培養法であるが、固体培養では液体培養時よりも大量の酵素が分泌生産されることが知られている^{1,2)}。

【麹菌ゲノムの特徴】

黄麹菌のゲノム解析は 2005 年末に完了し、他の近縁種との比較解析によって、黄麹菌は比較的大きなゲノムサイズを有し、増加した遺伝子の多くが non-syntenic block (NSB) 上に位置すること、NSB 上には加水分解酵素や二次代謝系をコードする遺伝子が集積していることが分かった³⁾。*A. awamori* NBRC4314/RIB2604 株のゲノム配列決定は、製品評価技術基盤機構 (NITE) によって Sanger 法で行われている⁴⁾。rDNA の塩基配列などにより、*A. awamori* は、*A. kawachii* あるいは *A. niger* に近縁な 2 つ株に分けられたが、NBRC4314 株は前者に属する。これまでの解析により、非重複塩基配列の総延長は 34.6 Mb、57 の super-contig となっている。比較ゲノム解析には、次世代シーケンサーである ABI SOLiD を用い、上記の Sanger 法から得られたゲノム塩基配列を基準配列として用いて、迅速で効果的な比較ゲノム解析を行っている。*A. awamori* と *A. niger* の間には高い synteny が存在するが、明かに相同性が低い部分が存在し、*A. awamori* と *A. niger* は明確に 2 つのグループに分けられることが明らかとなった⁵⁾。

【発酵技術への利用】

固体培養を含む様々な条件で遺伝子発現について、DNA マイクロアレイを用いて解析した結果、NSB 上には固体培養で誘導される遺伝子が多く存在し、強く誘導される遺伝子の多くは、細胞外酵素をコードする遺伝子であった⁶⁾。NSB 上には、発酵に深く関わる遺伝子および有用物質の生産に関する遺伝子が存在している。そこで、DNA マイクロアレイを用いて固体培養を含む様々な条件で遺伝子発現を解析した結果、NSB 上には、飢餓状態、タンパク質含有培地、固体培養で誘導される遺伝子が多く存在することが明らかとなった。特に、これらの遺伝子は、固体培養で最も強く誘導された。また、固体培養で強く誘導される遺伝子の多くは、細胞外酵素をコードする遺伝子であつ

た。一方、NSB上に多く存在する polyketide synthase や non-ribosomal peptide synthetase 遺伝子は、1 遺伝子を除いて同様の条件で全く誘導されなかった。ヒートショック (42°C) の状態では、syntenic block (SB)上には誘導される遺伝子が多く存在するに対して、NSB上の遺伝子の多くはその発現が顕著に抑制された。SB上の遺伝子で発現が誘導された遺伝子は、主として heat-shock response 遺伝子であった。

醤油の生産時には、製麴 (せいきく) 時に時々麴の混合 (手入れ) を行うことが必要である。NSB上に存在する細胞外加水分解酵素などの遺伝子の発現は、固体培養で誘導されるが、ヒートショックでは逆に強く抑制がかかることから、手入れによって温度を低下させることにより、NSB上にコードされた発酵に重要な遺伝子の発現の抑制を抑えている可能性が高い。NSB上の遺伝子の発現の絶対強度は、一般的にSB上の遺伝子のそれよりも低く抑えられているが、一部のNSB上の加水分解酵素遺伝子はSB上の遺伝子と同様の高い発現レベルを示す。麴菌が特徴的に有するNSB上の遺伝子と麴菌を用いた発酵方法の比較は、麴菌と発酵産業との関係を調べる上で非常に興味深い。

【新たな産業への利用】

麴菌は、様々な薬剤や化合物に対する耐性が高いことが知られている。ゲノム解析の結果、麴菌は他の近縁種に比較しても多数の P450 や輸送体の遺伝子を有することが明らかとなり、これらが麴菌が高い耐性を有する原因になっているのではないかと推測される。また、このことを利用して、麴菌に対して効果の高い薬剤を開発することによって、他の糸状菌にも効果の高い薬剤の開発が行えることが考えられる。これまでに、東北大学、金沢工業大学との共同研究によって、麴菌の遺伝子のシステム的な破壊を行い、多数の致死性や生育を阻害する遺伝子を解析した。また、これらの薬剤標的となり得る遺伝子の機能が抑制された際に、どのようなメカニズムで麴菌の生育が遅れたり死に至るかを明らかにすることを目的として、レポーター遺伝子の開発を行った⁷⁾。これらは、細胞骨格系、エネルギー系、細胞壁系などの障害によって特異的に応答し、GUS や GFP 遺伝子を発現する。これらの解析系を利用することにより、効率的な抗真菌剤の開発を行うことが可能であり、抗真菌剤の開発の効率化が図れると期待される。

【おわりに】

ゲノム科学の利用によって、生物を利用した研究開発速度を飛躍的に高めることができる。しかし、ゲノム情報を産業に利用することは簡単なことではなく、大規模の解析と情報処理だけでなく、利用に関するノウハウの蓄積にかなりの時間を要する。演者らは、1996年に開始した麴菌のEST解析の頃から、大学、研究所、企業との多数の連携を築き、2001年にゲノム解析の開始、2003年に麴菌DNAマイクロアレイの開発、2005年に代謝物質の解析など、基盤情報の拡充を行ってきた。今回の発表内容は、これらの積み重ねの成果でもある。次世代シーケンサーの普及により、ゲノム科学は新たな時代に入ったと言える。これまではモデル生物のゲノム解析を行うことがやっとであったが、今後は、全生物種、多数の変異株、個体の解析を行うことも不可能ではない。ゲノム科学の本格的な産業利用はあと一步のところまで来ているが、これらの情報を駆使することにより、真の意味でのゲノム産業の実用化が一気に加速すると考えられる。今後、数年以内に、ライフサイエンス分野でのゲノム科学の利用は飛躍的に進み、多数の成果が産出されるものと期待される。

文献

- 1) Hata, Y. et al. Comparison of two glucoamylases produced by *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (koji) and in submerged culture. *J. Ferment. Technol.*, 84, 532-537 (1997).
- 2) Ishida, H. et al. Regulation of the glucoamylase-encoding gene (*glaB*), expressed in solid-state culture (koji) of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Bioeng.*, 86, 301-307 (1998).
- 3) Machida, M. et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438, 1157-1161

(2005).

- 4) Machida et al., *2008 JSPS-KOSEF Joint Seminar* (2008).
- 5) Kikuzato et al., *2008 JSPS-KOSEF Joint Seminar* (2008).
- 6) Tamano, K. et al. Transcriptional regulation of genes on the non-syntenic blocks of *Aspergillus oryzae* and its functional relationship to solid-state cultivation. *Fungal. Genet. Biol.*, (2007).
- 7) Marui et al., *International Conference on Fungal Molecular Biology* (2008)

Impact of genomics of *Aspergillus oryzae* on industries

Masayuki Machida^{1*}, Hideaki Koike^{1*}, Koji Jinno², Hiroshi Horikawa², Akira Hosoyama², Ikuya Kikuzato^{3*}, Morimi Teruya^{4*}, Masatoshi Tsukahara^{5*}, Kazuhiro E. Fujimori^{1*}, Maiko Nezu^{5*}, Yuki Satou^{3*}, Yukino Miwa^{5*}, Shuichi Yano^{5*}, Yumi Imada^{5*}, Youji Wachi^{3*}, Yutaka Kawarabayasi^{1*}, Osamu Yamada⁶, Takasumi Hattori⁷, Motoaki Sano⁸, Koichi Tamano¹, Kazuou Fukuda⁹, Takaomi Yasuhara⁹, Kenichi Higa⁴, Shinichi Ohashi⁸, Kotaro Kirimura⁷, Masanori Arita¹⁰, Kiyoshi Asai¹⁰, Keietsu Abe¹¹, Katsuya Gomi¹¹, Takeaki Ishikawa¹², Shigeaki Mikami⁶, Kaoru Nakasone¹³, Nobuyuki Fujita⁶, Takashi Hirano^{1*} (¹Natl. Inst. Advanced Inst. Sci. Technol., ²Natl. Inst. Technol. Eval., ³Okinawa Sci. Technol. Promotion Center, ⁴Okinawa Ind. Technol. Center, ⁵Tropical Technol. Center, ⁶Natl. Res. Inst. Brewing, ⁷Waseda U., ⁸Kanazawa Inst. Technol., ⁹Asahi Breweries, ¹⁰U. Tokyo, ¹¹Tohoku U., ¹²Brewing Soc. Japan, ¹³Kinki U., *Okinawa Cutting-edge Genome Project)

O-1 (P-15)

変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法を用いた木材腐朽に関わる糸状菌群の解析

中田裕治, 久住朝子, 片山葉子, 吉田 誠, 福田清春 (農工大・農)

木材の微生物による生物劣化(腐朽)は複数の微生物によって進行することが知られている。著者らは、木材腐朽の主要な原因菌である糸状菌に着目し、その多様な菌叢を分子生物学的手法で解析することを試みた。本発表では、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE法)により、腐朽した木材に存在する糸状菌群を同定したので報告する。

腐朽形態の異なる6種の腐朽材からゲノムDNAを抽出し、得られたゲノムDNAを鋳型にしてPhi29 DNAポリメラーゼを用いて非特異的にゲノムDNAの増幅を行った後、糸状菌のITS領域に特異的なプライマーを用いてPCRを行った。その結果、増幅産物は2%のアガロースゲル中でそれぞれ2~3本のバンドとして観察された。一方、この反応液をDGGE解析に供したところ、アガロースゲル電気泳動と比較して、より多くのバンドが観察された。また、ゲル中におけるバンドの出現パターンは各腐朽材で異なっていた。これにより得られたバンドを切り出し、塩基配列を決定した後、塩基配列データベースをBLAST検索したところ、様々な種類の糸状菌が同定された。以上の結果から、DGGE法により、腐朽材中に存在する複数の菌由来のITS領域に相当するDNA断片を分離することが可能となったと言える。したがって、本法は、多様な菌種からなる腐朽材中の菌叢の解析に有効である。

Analysis of fungal community in decayed wood using denaturing gradient gel electrophoresis

Yuji Nakada, Asako Kusumi, Yoko Katayama, Makoto Yoshida, Kiyoharu Fukuda

(Tokyo Univ. of Agric. and Teach.)

O-2 (P-10)

菌類に対する遺伝子高発現および発現抑制用バイナリーベクターの開発

奥原 徹¹, 野田知嗣¹, 吉田真澄¹, 稲富 聡², 田口悟朗¹, 下坂 誠¹ (¹信州大・繊維・応生系、²ホクトきのこ総合研究所)

我々は、担子菌エノキタケにおいて、子実体形成特異的に発現する遺伝子群の機能解析を目指してきた。既に、*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT)法を用いて、エノキタケ菌糸へ簡便に遺伝子を導入できるバイナリーベクターを構築した。これを基にして、菌類における汎用的な高発現タイプおよび遺伝子発現抑制(RNAi)タイプのバイナリーベクターの構築を目指した。

作成したバイナリーベクター(pFungwayシリーズ)の特徴として、1) Gatewayテクノロジーを用いて目的断片の挿入を容易にしたこと、2) 選択マーカーとしてHygromycin BとG418耐性の2タイプを揃えたこと、3) 遺伝子発現には、エノキタケ由来glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*)プロモーターを用いたこと、が挙げられる。

既に、エノキタケでは、RNAiベクターを用いて幾つかの遺伝子の発現を抑制できることを確認した。今回は、さらに*Fusarium*菌を用いて上記ベクターの有効性を検証した。

*Fusarium oxysporum*の分生子に対して、高発現ベクター(Hygromycin B耐性マーカー)を用いて、蛍光レポーター遺伝子を導入したところ、菌糸において強い蛍光の発現を確認した。この株に対して、さらにRNAiベクター(G418耐性マーカー)を用いて、レポーター遺伝子の一部を導入したところ、蛍光発現の抑制を確認できた。

Construction of binary vectors used for overexpression and RNA interference in fungi

Toru Okuhara¹, Tomotsugu Noda¹, Masumi Yoshida¹, Satoshi Inatomi², Goro Taguchi¹, and Makoto Shimosaka¹

(¹Division Appl. Biol., Fac. Tex. Sci. Tech., Shinshu Univ., ²Mushroom Lab. Hokuto Co.)

O-3

ゲノム科学による麹菌代謝に関わる遺伝子同定と高生産化

小池英明¹、寺林靖宣¹、佐野元昭²、山根倫子¹、丸井淳一郎¹、相良純一²、堂本美津子²、織田健²、大島栄治³、立花國治³、比嘉良喬³、大箸信一²、町田雅之^{1,2} (1産総研、2金沢工大、3三省製薬)

麹菌をはじめとする糸状菌の代謝は多様であることが知られており、それらの代謝物は有用物質として様々な分野で利用されている。麹菌 *Aspergillus oryzae* が二次代謝として生産するコウジ酸は、美白成分、抗酸化剤、抗生物質として利用されてきた。麹培養中にコウジ酸の生産が同定されたのは1907年と早かったが、100年以上にわたって、その遺伝子および代謝経路やその制御機構は解明されてこなかった。コウジ酸はグルコースの変換効率も高く、その生産機構の解明は、他の物質・代謝への応用性が期待される。

麹菌のゲノム配列が解明されたことから、ゲノム科学を応用した方法によって、その生合成遺伝子の解明を目指した。その結果、生産状態において発現の高かった遺伝子群の中から、破壊によりその生産が著しく影響されるものを特定した。本研究では明らかにした遺伝子を基にして、コウジ酸の生産の機構について解析するとともに、その高生産化を目指している。解析の現状について発表する。

Reverse genetic analysis reveals genes involved in kojic acid biosynthesis in *Aspergillus oryzae*

Yasunobu Terabayashi^{1*}, Motoaki Sano^{2*}, Noriko Yamane¹, Junichiro Marui¹, Junichi Sagara², Mitsuko Dohmoto², Ken Oda², Eiji Ohsima³, Kuniharu Tachibana³, Yoshitaka Higa³, Shinichi Ohashi², Hideaki Koike^{1,4}, and Masayuki Machida^{1,2} (1National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 2Kanazawa Institute of Technology, 3Sansho Seiyaku Co., Ltd)

O-4

麹菌 *A. oryzae* の異種タンパク質生産においてキャリアー融合はUPRを誘導して生産量を改善する

大野 絢子、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】 *A. oryzae* は優れたタンパク質生産能力をもつが、高等生物由来のタンパク質を生産させた場合には一般に生産量が高くない。その解決策として、宿主が大量に分泌するタンパク質をキャリアーとして融合する異種タンパク質発現方法が頻繁に用いられる。しかし、キャリアー融合により異種タンパク質の生産量が増加する理由について、その詳細は明らかにされていない。本研究では、*A. oryzae* の異種タンパク質生産におけるキャリアーの有無による分泌生産過程や遺伝子発現応答の違いについて解析を行った。

【方法及び結果】 ウシ・キモシンにキャリアーとして α -アミラーゼ(AmyB)を融合し生産を行ったところ、キャリアーを用いない場合と比べて生産量が増加することが確認された。キャリアーを融合した際、菌体内にAmyBとキモシンの融合タンパク質が検出されたことから、ゴルジ体で切断されるように融合部位に挿入した Kex2 プロテアーゼ認識配列の切断が起こっていないのがわかった。さらに、キャリアー融合時には、融合していないときと比べて培養初期におけるキモシンの培地中への分泌が遅れたことから、キモシンはキャリアー融合により小胞体に長く留まっていることが示唆された。さらに、キャリアー融合キモシンを発現する株において、BiP、カルネキシンなどの小胞体関連遺伝子の発現が大幅に上昇し、これらの遺伝子の発現誘導に関与する *hacA* の活性化型 mRNA がより多く検出された。以上の結果から、キャリアー融合によりUPR(Unfolded Protein Response)がより強く誘導され、キモシンが正しいフォールディングをとるために小胞体に滞留し、その結果、生産量が増加している可能性が考えられた。

A carrier fusion significantly induces unfolded protein response and improves heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*

Ayako OHNO, Takashi NEMOTO, Jun-ichi MARUYAMA, Manabu ARIOKA, Katsuhiko KITAMOTO
(Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

O-5

麹菌の糖タンパク質品質管理機構に関連する遺伝子破壊株を用いた糖鎖構造解析

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

我々は麹菌 *Aspergillus oryzae* のアスパラギン (N-) 結合型糖鎖を介した糖タンパク質品質管理機構の解明を目的として研究を行っている。これまでに、合成糖鎖プローブをツールとして、糖タンパク質品質管理機構に関わる糖鎖認識分子カルネキシン (CNX) のレクチン活性¹⁾およびグルコシダーゼ II (GII) の機能²⁾について、活性レベルで解析した結果を報告している。今回は、糖タンパク質品質管理機構に関連する4分子、CNX, GIIの α および β サブユニット, UDP-グルコース-糖タンパク質グルコース転移酵素の遺伝子破壊株を用いて糖鎖構造解析を行った結果を報告する。各破壊株の膜画分に含まれるタンパク質および分泌タンパク質上のN-結合型糖鎖を酵素処理によって切り出し、ラベル化糖鎖を調製した。MALDI-TOF-MS解析の結果、野生株の膜画分からHex₈₋₉HexNAc₂と推定される糖鎖構造が検出された。一方、GIIの α および β サブユニット破壊株では、Hex₈₋₁₁HexNAc₂と推定される糖鎖構造が見出された。この構造の相違は、GII遺伝子破壊による糖切断活性の低下に起因すると考えられた。また、分泌糖タンパク質上の糖鎖構造に対する遺伝子破壊の影響を検討した。その結果、 α -アミラーゼの分泌量および活性への影響は認められなかったが、GII破壊による糖鎖構造の相違が認められた。現在、HPLCおよびMALDI-TOF-MSを用いて、詳細な解析を進めている。

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

2) Watanabe, T. *et al.*, *Glycobiology*, **19**, 834 (2009)

Carbohydrate structures of disruptants of genes related to ER glycoprotein quality control in *Aspergillus oryzae*

Taisuke Watanabe¹, Ichiro Matsuo^{1,2}, Jun-ichi Maruyama³, Katsuhiko Kitamoto³, Yukishige Ito¹

(RIKEN¹, Dept. of Chemistry and Chemical Biology, Gunma Univ.², Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo³)

O-6

ウシグソヒトヨタケのCc.Cdc3セプチン-EGFP融合タンパク質の細胞内局在の観察

村口 元¹, 中村宏江¹, 石井律好¹, 鎌田 堯² (¹秋田県立大・生物資源, ²岡山大・理)

担子菌ウシグソヒトヨタケの子実体の柄が伸長しない突然変異体 (elongationless) 株 Uad435 の劣性突然変異を、出芽酵母の Cdc3 とよく似たセプチンをコードするゲノム領域 (Cc.cdc3 領域) が相補することを見出した (第7回本コンファレンスシンポジウムにて報告)。

Cc.Cdc3 セプチンが柄細胞の伸長にどのように関わっているのかを調べるために、Cc.Cdc3 セプチンの C 末端側に EGFP を融合し、細胞内局在性を観察した。まず、劣性突然変異体に Cc.cdc3-egfp 連結コンストラクトを導入し、Cc.Cdc3-EGFP が正常に機能し、柄が伸長することを確認した。Cc.Cdc3-EGFP の蛍光は、伸長前の細胞では多くがパッチ状に見え、伸長しつつある柄細胞では細胞膜直下に長軸方向に向いた多数の細い繊維として観察された。伸長後には、細胞質全体が蛍光を発生し、その後消失していくように思われた。

ノーザン解析の結果は、Cc.cdc3 が伸びつつある柄細胞で強く発現していることを示すと同時に、栄養菌糸でもわずかに発現していることを示していたので、栄養菌糸での Cc.Cdc3-EGFP の蛍光を観察してみたところ、伸長中の細胞である菌糸先端細胞だけで蛍光体を観察することができた。大部分の菌糸先端に1つあるいは2つの点状体として見えると同時に、先端と核の中間あたりに、小球体として観察された。幾つかの先端細胞では、棒状体として見られたり、小球体と棒状体が同時に見られる菌糸も存在した。

菌糸先端の点状体は、菌糸の先端成長に関与していると推察でき、polarisome や spitzenkörper との関係が興味深い。しかし、小球体や棒状体として見える Cc.Cdc3 セプチンが、菌糸成長にとってどのような役割を担っているのかは現在のところ不明である。

Subcellular localization of the Cc.Cdc3-EGFP fusion protein in *Coprinopsis cinerea*

Hajime Muraguchi¹, Hiroe Nakamura¹, Noriyoshi Ishii¹, Takashi Kamada²

(¹Dept. of Biotechnology, Akita Prefectural Univ.; ²Dept. of Biology, Okayama Univ.)

O-7 (P-23)

麹菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシス関連因子の探索

樋口裕次郎, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】エンドサイトーシスにおいて機能すると考えられる AoAbp1, AoEnd4 の局在解析から, 糸状菌におけるエンドサイトーシスは菌糸先端部において最も活発に行われていると示唆された。また, エンドサイトーシス欠損株では菌糸生長が著しく阻害されたことから, エンドサイトーシスは先端生長と密接に関連していることが示唆された¹⁾。以上のことから, 菌糸先端部において, 糸状菌特異的なエンドサイトーシスの機構の存在が予想された。そこで本研究では, エンドサイトーシスにおけるタンパク質間相互作用において機能する SH3 ドメインを C 末端に 2 つ有する AoAbp1 を bait とし, yeast two-hybrid スクリーニングによって *A. oryzae* におけるエンドサイトーシス関連因子の探索を行った。

【方法と結果】 AoAbp1 を bait とし, *A. oryzae* の cDNA ライブラリーを prey とした yeast two-hybrid スクリーニングを行った。prey から得られた cDNA クローンの 1 つから, AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPase をコードすると予想される遺伝子の一部を見出した。yeast two-hybrid 解析により, この prey は AoAbp1 の 2 つの SH3 ドメインと相互作用することが示された。そこで, この prey をコードする遺伝子を *aipA* (AoAbp1 interacting protein) と名付けた。RACE 解析により *aipA* 全長をクローニングした結果, AipA は 784 アミノ酸から構成されると予想された。また, モチーフ検索の結果, AipA は C 末端付近に AAA ATPase ドメインを持ち, N 末端付近に coiled-coil 領域を持つと推定された。AipA の細胞内局在を解析するため, EGFP-AipA および AoAbp1-mDsRed 発現株を作製したところ, それらは共局在したことから, AipA がエンドサイトーシスにおいて機能している可能性が示唆された。現在, AipA と AoAbp1 の *in vitro* および *in vivo* の相互作用解析や, *aipA* 破壊株等の取得による AipA の機能解析を進めている。

1) 樋口裕次郎ら、第 8 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p. 50

Exploration of components related to endocytosis in *Aspergillus oryzae*

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

O-8

Profiling of polarity related gene expression during early growth of *Aspergillus fumigatus*

Ken Oda¹, Susan Cowden¹, Andrew Breakspear², Michelle Momany¹

(¹Dept. of Plant Biology, Univ. of Georgia, USA, ²current address: Dept. of Plant Pathology, Univ. of Minnesota, USA)

A. fumigatus is the most common airborne pathogen causing fatal mycoses in immunocompromised patients. Polarized growth is one of the critical factors for establishing fungal pathogenesis, but little is known about the genes involved in early polar growth and their regulation. The purpose of this study was to find polar growth related genes in *A. fumigatus*. *A. fumigatus* Af293 was cultured in complete medium and total RNA was extracted at set time points. DNA microarray experiments were performed comparing dormant cells (0hr) with isotropically growing cells (4hr), isotropically growing cells with cells showing emerging germ tubes (6hr), and with more mature hyphae (8hr). Polarity related gene lists were created by referring published data in filamentous fungi and were applied to microarray data sets and expression of selected genes was confirmed by RT-PCR. Surprisingly, the expression of most polarity genes did not change at polarity establishment time period (4-6hr) and these genes had higher expression much earlier during isotropic growth. These data suggest that a post-transcriptional mechanism such as RNA transport or protein modification might be more important than gene transcription in establishing polarity.

O-9 (P-24)

Aspergillus nidulans のキチン合成酵素 CsmA の菌糸内局在化における微小管の役割

對崎真植, 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, クラス V に属するキチン合成酵素をコードする遺伝子 *csmA* が存在し, 菌糸型の生育を示す真菌類にのみ存在する。これまでに, CsmA は菌糸先端のアクチン近傍に局在し, その正常な局在にアクチンとの相互作用が必要であることが示されているが¹⁾, 菌糸先端への局在化機構は不明である。そこで今回, 野生型 CsmA の代わりに EGFP-CsmA を発現する株を用いて菌糸先端への局在化における微小管の役割について解析した。微小管重合阻害剤である benomyl 処理により, 菌糸先端における CsmA の局在は大部分が拡散するかあるいは菌糸先端の一部にドット状に観察された。また微小管系モータータンパク質であるキネシンをコードするいくつかの遺伝子の単独破壊株においても benomyl 処理の場合と同様に菌糸先端における CsmA の局在異常が観察された。更に, 微小管上に結合したままとなる変異型キネシン mRFP-KinA^{rigor}²⁾ と EGFP-CsmA を同時に発現する株を用いて微小管との局在比較を行なったところ, 菌糸先端以外にも, 先端から後方の菌糸内において mRFP-KinA^{rigor} の局在する微小管上に EGFP-CsmA の局在が観察された。これらの結果から, CsmA の菌糸先端への局在化には微小管と一部のキネシンが関与することが示唆された。

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

2) Zekert, N. and Fischer, R., (2009) *Mol. Biol. Cell*, **20**: 673-684

The roles of microtubule in the localization of chitin synthases, CsmA, in *Aspergillus nidulans*

Makusu Tsuizaki, Hiroyuki Horiuchi, and Akinori Ohta. (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

O-10

真菌類の Heavy-metal ATPase (HMA) の系統解析および植物病原糸状菌における trans-golgi network 局在型 HMA の機能解析

齋藤禎一, 泉津弘佑, 森田篤, 田中千尋 (京大院・農)

銅は生物の様々な酸化酵素の補酵素として働く必須微量元素であるが, 活性酸素種の発生源となるなど強い毒性も併せ持つ。P-type ATPase の一種である Heavy metal ATPase (HMA) は哺乳類や植物において細胞内の銅の輸送や排出に関与していることが明らかとなっている。しかしながら, 真菌類, 特に糸状菌における HMA の役割はほとんどわかっていない。そこで, 本研究ではまず真菌類 HMA の系統解析を行った。その結果, 真菌類は細胞膜に局在し銅の排出ポンプとして機能する 2 グループと trans-golgi network に局在し, 酸化酵素群に銅を活性中心として受け渡す機能をもつグループの計 3 グループの HMA を有することが明らかとなった。次に, 本研究では trans-golgi network 局在型 HMA に着目し, 植物病原糸状菌であるトウモロコシごま葉枯病菌ならびに灰色かび病菌におけるその役割を遺伝子破壊株の作出により調べた。その結果, 両菌の遺伝子破壊株でメラニン化および分生子形成に異常が見られた。さらに両菌の遺伝子破壊株では宿主植物に対する病原性に著しい低下が認められた。トウモロコシごま葉枯病菌と灰色かび病菌は分類学的に大きく異なる植物病原糸状菌であり, 宿主とする植物種のみならず宿主植物への感染戦略も大きく異なる。それにも関わらず両菌の遺伝子破壊株で共通して病原性の著しい低下が認められたことから, trans-golgi network 局在型 HMA の病原性における役割は広範な植物病原糸状菌において保存されている可能性が考えられる。

Phylogenetic analysis of heavy-metal ATPases in fungi and characterization of copper-transporting ATPases localized to the trans-golgi network in phytopathogenic filamentous fungi

Yoshimoto Saitoh, Kosuke Izumitsu, Atsushi Morita, Chihiro Tanaka

(Grad. school of Agriculture, Kyoto Univ.)

O-11 (P-95)

植物共生糸状菌 *Epichloë festucae* のもつ植物細胞死誘導タンパク質遺伝子 NLP の相同遺伝子は細胞死誘導活性を失う変異を持つ

赤野史岳, 川北一人, 竹本大吾 (名大院生命農・生物機構)

Epichloë festucae は牧草ペレニアルライグラスの細胞間隙で伸長し、共生関係を保っている糸状菌エンドファイトである。糸状菌、卵菌、細菌など様々な生物から同定され、植物の細胞死を誘導することが知られている分泌タンパク質 NLP (Nep1-like proteins) 遺伝子の相同配列を *E. festucae* のゲノム配列から探索したところ 2 種類の NLP 遺伝子 (*EfNLP1*, *EfNLP2*) が見いだされた。さらに詳しく調べたところ、*EfNLP1* は 2 つのイントロンのスプライシングが正常に行われず、偽遺伝子化していた。また *EfNLP2* には NLP で保存性の高い領域のアミノ酸に変異があることが解った。細胞死誘導活性が強い *Phytophthora sojae* の NLP (*PsojNIP1*) の保存領域に *EfNLP2* に見られる変異を導入した *PsojNIP1*(QY) をアグロバクテリウム を介してベンサミアナタバコに発現させたところ、*PsojNIP1* で認められる細胞死誘導活性が失われることが明らかとなった。このことより、共生糸状菌が進化の過程で細胞死誘導タンパク質の保存領域への変異を獲得し、宿主との共生を可能にした可能性が考えられた。

Mutations in genes for secretory protein NLP from *Epichloë festucae* compromised cell death-inducing activity of NLP.

Fumitake AKANO, Kazuhito Kawakita, Daigo Takemoto

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

O-12

いもち病菌の薬剤に対する転写応答解析と特定標的に作用する新剤探索システムの構築

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)

我々は抗真菌剤の開発プロセス効率化のために、植物病原糸状菌のモデル生物であるイネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) を用い各作用点別薬剤に対する転写応答解析を行っている。イネいもち病菌野生株 Guy11 を液体培地で培養後、作用点既知の薬剤を添加した菌体から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、薬剤に曝されたいもち病菌において、Cytochrome P450 や輸送体などの一般的な解毒排出機構に加え、薬剤およびその作用点に対して特異的な遺伝子発現応答が多数見出された。我々は、この特異的な発現遺伝子を用いて、特定の標的に作用する薬剤の暴露に対して視覚的に応答するレポーターアッセイ系を構築した。このアッセイ系の導入株では、特定標的に作用する薬剤に対するストレス応答をレポーターとして検出することができた一方、標的外の作用点薬剤に対しては応答せず、本システムの特異性を確認することができた。

このような本システムの概要は、化合物スクリーニングの効率化に寄与するものと期待することができ、現在ハイスループット化に向けた最適化を検討し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.)

Construction of a high-throughput screening system for novel antifungals using 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)

O-13 (P-83)

トランスポゾン挿入によるトマト萎凋病菌の非病原力遺伝子の機能喪失

稲見圭悟, 森田泰彰*, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大院連農・*高知県農林技術センター)

植物病原菌であるトマト萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* はトマト品種に対して病原力を異にする3つの「レース」に分化している。トマト品種と萎凋病菌レースの親和性/非親和性は、各品種が有する萎凋病抵抗性遺伝子と各レースが保持する非病原力遺伝子 *AVR* の相互関係で決定される。例えば、レース1は *AVR1* を持ち、*AVR1* を認識する抵抗性遺伝子 *I* を保持するトマト品種はレース1に抵抗性であるため、非親和性の関係である。レース1が *AVR1* を失うと、*I* による抵抗性が無効化するので、親和性の関係になる。こうして新たなレースが出現する。つまり、*AVR1* を保持しているのはレース1のみである (Houterman *et al.* 2008)。2008年秋に高知県日高村でレース1抵抗性品種に発生した萎凋病の分離株 KoChi-1 のゲノムを鋳型に、*AVR1* 特異プライマーを用いてPCRを行ったところ増幅が見られた。しかしその断片(約1500 bp)はレース1から得られる断片(約700 bp)よりも大きかった。KoChi-1 から得られた断片の内部には759 bpのトランスポゾンが挿入され、*AVR1* のORFが破壊されていた。本トランスポゾンは *hAT* ファミリーに属し、トランスポザーゼをコードしない非自律性のものであった。また、Broad Institute のゲノムデータベースによると、*F. oxysporum* のゲノム中に同様のトランスポゾンが70コピー以上散在していた。KoChi-1 のゲノムにレース1由来の *AVR1* を導入した形質転換株は、*AVR1* に対応する抵抗性遺伝子 *I* のみを保持するトマト品種に萎凋病を引き起こさなくなった。従って、KoChi-1 はトランスポゾンの挿入のために *AVR1* としての機能を喪失していることが明らかになった。この様にトランスポゾンが挿入された *AVR1* 領域は調べた限りのトマト萎凋病菌にはみられず、病原性進化の一つの視点を示すものである。

The loss of function of the avirulence gene *AVR1* in the tomato wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by transposon-insertion

Keigo Inami, Yasuaki Morita*, Tohru Teraoka, Tsutomu Arie

(Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. of Agric. & Tech.; *Kochi Agric. Res. Center)

O-14

トマト葉かび病菌 *Cladosporium fulvum* の *AVR* 遺伝子群の変異様式

飯田祐一郎, 窪田昌春, 寺見文宏 (野茶研)

葉かび病菌 (*Cladosporium fulvum*) は、近年トマトの重要病害とされている病原性糸状菌である。本菌には、宿主植物がもつ抵抗性遺伝子に対して、多くの病原性系統(レース)が存在し、国内では日本特有の3種のレースを含む9レースが同定されている。レースを決定するエフェクター因子として、本菌からはこれまでに4つの *AVR* 遺伝子 (*AVR2*, *AVR4*, *AVR4E*, *AVR9*) および6つの *ECP* 遺伝子 (*ECP1*, *ECP2*, *ECP4*, *ECP5*, *ECP6*, *ECP7*) が単離されており、これら遺伝子に欠失や塩基置換などの突然変異が起こることでレースに分化する。Stergiopoulosら(2007)は葉かび病菌81株について、*AVR* および *ECP* 遺伝子群の塩基配列の比較を行った。その結果、同じレースでも菌株によって変異様式が異なり、また *AVR* 遺伝子が他の遺伝子領域と比較して変異しやすいことを明らかにした。しかしながら、これら菌株はほとんどが欧米からの分離株で、地理的バラエティに乏しかった。本研究では、葉かび病菌のレース分化における遺伝的背景の解明を目的に、国内の分離菌株について *AVR* および *ECP* 遺伝子群の塩基配列を比較し、変異部位の同定を行った。これまでに国内で分離された281菌株のうち、分離地域・分離年・レースの重複しているものを省いた126菌株について、それぞれの遺伝子をPCR法によって増幅した。その結果、*AVR4E* および *AVR9* が増幅されない菌株があり、一方で *ECP* 遺伝子群は全ての菌株で増幅断片が確認された。これら増幅断片の塩基配列を決定したところ、*AVR* 遺伝子に海外の菌株にはない新たな変異部位が見いだされた。この突然変異は日本特有のレースから見いだされ、本菌が国内で独自の進化を遂げていることが示唆された。

Allelic variation in the effector genes of *Cladosporium fulvum* in Japan

Yuichiro Iida, Masaharu Kubota, Fumihiko Terami

(National Institute of Vegetable and Tea Science)

O-15 (P-77)

Aspergillus fumigatus 由来メロテルペノイド生合成遺伝子クラスターを用いた非天然型新規ハイブリッド型化合物の創製

徳永欽也¹, 伊藤崇敬¹, 藤井勲², 海老塚豊¹, 久城哲夫¹, 阿部郁朗¹ (東大院・薬,²岩手医大・薬)

糸状菌 *Aspergillus fumigatus* が産生する pyripyropene は、ポリケタイドとテルペノイドの構造を併せ持つ特異なハイブリッド型化合物であり、強力な ACAT 酵素阻害により顕著なコレステロール低下作用を有する。糸状菌が産生するメロテルペノイドにはこれ以外にも重要な生理活性を示すものが数多く報告されており、それゆえにメロテルペノイドの生合成機構の解明や生合成経路の改変による構造多様性の拡大は、医薬品開発の観点から重要である。今回、我々は *A. fumigatus* のゲノム data base 上で、ポリケタイド合成酵素 (PKS) 遺伝子と prenyltransferase (PT) 遺伝子を併せ持つ遺伝子クラスターを検索し、9 遺伝子からなる約 22 kb の pyripyropene 生合成遺伝子クラスターを同定した。糸状菌発現用ベクターを用いて pyripyropene の予想生合成経路の順番に、クラスター内の各遺伝子全長を *A. oryzae* M-2-3 にて異種発現させることで、各遺伝子の機能解析を行うとともに生合成経路の再構築を行った。その結果、pyripyropene 骨格を構築する 5 つの遺伝子の機能解析に成功した。さらに、これら遺伝子を発現させた *A. oryzae* の株を用いて、安息香酸を投与することで pyripyropene のピリジン環がベンゼン環に置換されたアナログを産生させることにも成功した。本化合物は選択的 AchE 阻害作用を示す arisugacin の基本炭素骨格を有し、この系によるさらなる新規化合物の産生が期待される。

Production of a novel meroterpenoid analog using pyripyropene biosynthetic gene cluster from *Aspergillus fumigatus*

Kinya Tokunaga¹, Takayuki Itoh¹, Isao Fujii², Yutaka Ebizuka¹, Tetsuo Kushiro¹, Ikuro Abe¹

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

O-16

糸状菌 *Chaunopycnis alba* が生産する M 期キネシン Eg5 阻害剤の生合成遺伝子クラスター

本山高幸¹, 林敏明¹, 廣田洋¹, 植木雅志¹, 清水史郎¹, 臼井健郎², 長田裕之¹ (¹理研・ケミカルバイオロジー, ²筑波大・院・生命環境科学)

M 期キネシン Eg5 は動物細胞の細胞周期進行に必須であり、副作用の少ない抗ガン剤のターゲットとして注目されている。我々は、terpendole E を天然物初のキネシン Eg5 阻害剤として報告したが (Chem. Biol. 2003)、生産能と活性が低いという問題点がある。terpendole E の生産能上昇と、新規の高活性類縁体取得を目的として、生合成遺伝子クラスターの単離と解析を行った。

terpendole E は、子囊菌門に属する糸状菌 *Chaunopycnis alba* が生産するインドールジテルペンに属する化合物である。インドールジテルペンは一部の糸状菌により生産され、多くはマイコトキシンとして働く。インドールジテルペン生合成において共通に働く P450 遺伝子のホモログ *terP* をクローニングして、遺伝子破壊したところ、terpendole E と新規類縁体 11-ketopaspaline を大量生産できることが明らかとなった。新規類縁体は、動物細胞に対して terpendole E より強い細胞周期阻害活性を示した。これらの化合物は、インドールジテルペン生合成の共通中間体 paspaline から特異的な酵素で変換されて生じることが予想される。*terP* の周辺領域をクローニングしたところ、terpendole E 生合成に関与する、P450、プレニル転移酵素、膜酵素、FAD 依存モノオキシゲナーゼをコードすることが推定される遺伝子群を含む生合成遺伝子クラスターが見出された。

Biosynthetic gene cluster for the kinesin Eg5 inhibitors in a filamentous fungus *Chaunopycnis alba*

Takayuki Motoyama¹, Toshiaki Hayashi¹, Hiroshi Hirota¹, Masashi Ueki¹, Siro Simizu¹, Takeo Usui², Hiroyuki Osada¹

(¹Chem. Biol., RIKEN, ²Univ. of Tsukuba)

O-17

***Trichoderma reesei* 由来 *egl1* の転写活性化における Xyr1 の関与**

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

[目的] *Trichoderma reesei* において種々のセルラーゼ遺伝子は誘導条件下で同調して発現する。それぞれの転写量は大きく異なるがその量比は用いた誘導物質にかかわらずほぼ一定である。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。現在までにセルラーゼ遺伝子群の中心的な転写活性化因子である Xyr1 を含め、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めた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、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、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に新たな知見を与え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。*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、これら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明らかとなった。ゲルシフトアッセイでは、*E. coli* で発現させた Xyr1 の DNA 結合ドメインは前者の配列に対して非常に高い親和性を示すことが明らかとなった。さらに、フットプリント解析から Xyr1 2 分子が一つの GGCTAA モチーフと相互作用していることを示唆する結果が得られた。この Xyr1 の結合様式について現在さらなる解析を進めている。

The participation of Xyr1 on the transcription activation of *egl1* from *Trichoderma reesei*

Yosuke Shida, Takanori Furukawa, Hirofumi Okada, Yasushi Morikawa, Wataru Ogasawara

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

O-18

麹菌 *pal1* の機能解析

佐野元昭, 北川治恵, 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。そこで我々は、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* と *pal* シグナル経路に注目して研究を進めてきた。今までに *palF*¹⁾, *palH*²⁾ の破壊株を作製しその影響を解析してきた。今回、*pal1* 遺伝子破壊株について解析を行ったので報告する。

【方法および結果】 *A. oryzae* Δ *ligD* Δ *pyrG* 株を宿主に用いて *pal1* 遺伝子破壊株の作製を行った。*pal1* 遺伝子破壊株では、*pacC* 遺伝子の発現量が減少していることが確認でき、ALP 酵素活性も著しい活性の減少が確認できた。この解析結果より、*pal1* 遺伝子が ALP の発現制御に関与することが明らかとなった。現在、DNA マイクロアレイ解析により *pal* 遺伝子を破壊した事による他の遺伝子への影響について詳細な解析を行っている。

1) 佐野ら :2008 年日本生物工学会大会講演要旨集 P.150

2) 井上ら :2009 年日本農芸化学学会大会講演要旨集 P.284

Characterization of *pal1* gene from *Aspergillus oryzae*

Motoaki Sano, Harue Kitagawa, Shin-ich Ohashi (KIT)

O-19

麹菌転写制御関連遺伝子の網羅的破壊と機能解析

石井智子¹, 戸田智美¹, 小川真弘², 徳岡昌文², 大澤靖子¹, 小池英明¹, 高橋理², 松島健一朗², 小山泰二², 町田雅之¹ (1 産総研, 2 野田産研)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、近縁の *Aspergillus* 属 (*A. nidulans*, *A. fumigatus*) と比較してゲノムサイズが大きく、麹菌に特有の領域には代謝や加水分解酵素に関連する遺伝子が集積していることから、多種多様な代謝物質を生産する能力を有していると考えられる。本研究では、麹菌が有する全転写制御因子を対象とした網羅的な遺伝子破壊を行い、それらの機能解明に向けた研究に取り組んでいる。

麹菌ゲノム情報を基に、既知の転写因子との相同性とモチーフ検索によって推定された 300 以上の転写制御関連遺伝子を破壊した遺伝子破壊ライブラリーを作製し、これまでに 250 株以上の破壊株を取得した。作製した遺伝子破壊株の解析を行ったところ、代表的な二次代謝物の生産が増加している株や低下している株が確認された。これら破壊株の細胞抽出液代謝物を質量分析法により、解析した結果を報告する。

Functional analysis of transcription factors in *Aspergillus oryzae* by efficient gene targeting

Tomoko Ishii, Tomomi Toda, Masahiro Ogawa, Masafumi Tokuoka, Yasuko Oosawa, Hideaki Koike, Tadashi Takahashi, Kenichiro Matushima, Yasuji Koyama, Masayuki Machida

O-20 (P-37)

トランスクリプトーム配列データベースを用いた *Phanerochaete chrysosporium* の全分泌タンパク質 (セクレトーム) 解析

堀 千明, 五十嵐圭日子, 片山 映¹, 鮫島正浩 (東大院・農生科, ¹日医大・一生化)

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* は、バイオマスを炭素源として成長するときに、様々なタンパク質を菌体外に生産する。それら分泌タンパク質のうち主要な酵素に関してはすでに精製され、アミノ酸配列や活性などの情報が得られているが、依然として数多くの未知タンパク質が生産されていると予想される。しかしながら、本菌の全ゲノム配列情報およびそこから *in silico* アノテーションによって抽出された全推定タンパク質の配列を用いたプロテオーム解析では、主に他生物種における既知タンパク質のホモログのみが同定され、担子菌に特有なバイオマス変換酵素などの同定は難しい。

そこで我々は、12 種類のバイオマスを用いて本菌を培養し、抽出して得られた mRNA から作製された cDNA ライブラリーをノーマライズ化・サブトラクション化し、大規模シーケンサ (454 GS FLX Titanium) に供してトランスクリプトーム配列情報を得ると共に、本データベースを用いて全分泌タンパク質 (セクレトーム) 解析を行った。その結果、セルロース分解性培地中に、これまで本菌の全ゲノム配列や全推定タンパク質データベースでは同定できなかった糖質加水分解酵素ファミリー45 に属するエンドグルカナーゼ (Cel45A) が同定されたことから、本手法が既知タンパク質とは相同性が低いバイオマス変換酵素を探索・同定することに適していることが示された。

Secretome analysis of *Phanerochaete chrysosporium* using transcriptomic sequence database

Chiaki Hori, Kiyohiko Igarashi, Akira Katayama¹, Masahiro Samejima

(Dept. Biomat. Sci., Univ. of Tokyo, ¹Dept. Biochem. Mol. Biol., Nippon Medical School)

O-21 (P-45)

Comparative Genome Analysis of *Trichoderma reesei* Hypercellulase Producing Mutants

Juliano de Oliveira Porciuncula¹, Mikiko Nitta¹, Takanori Furukawa¹, Kazuki Mori¹, Okada Hirofumi¹, Hideki Hirakawa², Satoru Kuhara², Yashushi Morikawa¹, Wataru Ogasawara¹

¹Dept. of Bioengineering, Nagaoka Univ. of Tech., ²Grad. School of Genetic Resources Technology, Kyushu University

Trichoderma reesei is one of the most studied cellulolytic fungi, which produces a wide variety of cellulases and hemicellulases during growth on cellulose. For several industrial purposes, mutant strains have been developed by mutagenesis to improve the producibility of these enzymes. By comparing the profile of mutations in these strains we can understand why they have enhanced hydrolase producibility. In this work, the genome sequence of five mutant strains were revealed by Next-Generation Sequencer (SOLiD™ System, ABI) and compared to the wild-type strain of *T. reesei* (QM6a). Consequently, there were numerous single nucleotide polymorphisms (SNP) in the genome of these mutants. Among the genes with SNP, we found that *cre1* gene encoding the carbon catabolite repressor of *T. reesei* has a change in the amino acid sequence (threonine to proline) in its DNA-binding domain. Because CRE1 has been identified as a regulator of cellulase and hemicellulase genes, the binding properties of the mutant CRE1 were analyzed *in vitro* by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The results showed that native CRE1 bound to its consensus binding sequence (5'-SYGGRG-3'), but the mutant CRE1 could not bind to it. Furthermore, PC-3-7 strain harboring mutant *cre1* showed relieved glucose repression profile of cellulases compared with the QM9414 strain with the wild-type *cre1*. These results suggest that the mutation in *cre1* is one of the reasons that provide hypercellulase producibility in the *T. reesei* mutants.

O-22

β-グルコシダーゼ活性強化型 *Trichoderma reesei* PC-3-7 株

中澤 光¹, 谷 修治², 炭谷 順一², 川口 剛司², 岡田宏文¹, 森川 康¹, 小笠原 渉¹, (長岡技科大・生物系¹, 阪府大院・生命・応生科²)

糸状菌 *Trichoderma reesei* は、大量のセルラーゼを生産する事から、セルロース系バイオマス酵素糖化のための酵素生産宿主として期待されている。*T. reesei* PC-3-7 株はセルラーゼ活性を高めるために野生株 (QM6a 株) から 9 段階の変異を経ているセルラーゼ生産能強化株である。しかしながら、糖化の最終段階を担っているβ-glucosidase (BGL) の活性が不足している事により、低い糖化率および生成物阻害物質であるセロビオースの蓄積によるトータルのセルラーゼ活性の低下を招いている。我々はこれまでに、BGL 活性向上を目的として、*T. reesei* 自身の BGL I について、セルラーゼと同調して発現し、転写量が多く、かつ構造遺伝子の欠損がトータルのセルラーゼ活性に影響しないキシラナーゼⅢのプロモーターを用いて生産させ、約 7.5 倍に BGL 活性を高めた株を得ている。*Aspergillus aculeatus* BGL I (AaBGLI) は *T. reesei* BGL I と同じ GH Family 3 に属するが、*T. reesei* BGL I よりも Cellobiase 比活性が約 18 倍高い高活性型 BGL である。

そこで本研究では AaBGLI 遺伝子 (*AabglI*) をキシラナーゼⅢのプロモーターを用いて *T. reesei* PC-3-7 株で発現させβ-glucosidase 活性の増強を試みた。取得した 9 株の形質転換体について、1% Avicel 培養し、上清の Cellobiase 活性を測定したところ、親株である PC-3-7 株に対して最大で約 60 倍高い値を示した。SDS-PAGE 分析を行ったところ、130 kDa に PC-3-7 株には見られない明確なタンパク質バンドが検出できた事から、糖付加されて発現していると予想された。現在、トータルのセルラーゼ活性および糖化反応における効果を調べている。

β-glucosidase activity enhanced *Trichoderma reesei* PC-3-7

Hikaru Nakazawa¹, Shuji Tani², Jun-ichi Sumitani², Takashi Kawaguchi², Hirofumi Okada, Yasushi Morikawa¹, Wataru Ogasawara¹ (Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.¹, Dept. Appl. Life Sci., Osaka pref. Univ.²)

O-23

Aspergillus nidulans における α -1,3-glucan 合成酵素遺伝子の機能解析

吉見啓¹, 佐野元昭², 藤岡智則³, 水谷治⁴, 萩原大祐¹, 藤川貴史⁵, 西村麻里江⁵, 阿部敬悦¹ (¹東北大・未来研, ²金沢工大・ゲノム研, ³クミアイ化学工業(株), ⁴酒類研, ⁵生物研)

我々は, *Aspergillus nidulans* の細胞壁構築シグナル伝達 (CWIS) 経路について, MAP キナーゼ MpkA 経路を中心に解析を進めてきた. これまでに, 本菌の MpkA 経路は, 出芽酵母の CWIS 経路とは大きく異なり, β -1,3-グルカンおよびキチン合成酵素遺伝子群の転写は制御しておらず, 出芽酵母には存在しない α -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *agsA*, *agsB* の転写を制御していることを明らかにしている. 近年, 病原真菌 *Histoplasma capsulatum* や植物病原性のイネいもち病菌において, α -1,3-グルカンが感染過程で重要な役割を担うことが明らかになり, 糸状菌における α -1,3-グルカンの重要性が認識されつつある. 今回, *A. nidulans* における α -1,3-グルカン合成酵素遺伝子の役割を明らかにするため, *agsA*, *agsB* の破壊実験をおこなった. まず, 各遺伝子破壊株の造成を試みたところ, *agsA* 破壊株のみ取得可能であった. このことは *agsB* 遺伝子の欠損が致死性であることを示唆しており, *agsA* 破壊株に顕著な表現型変化が確認できなかったことと併せて, *A. nidulans* の α -1,3-グルカン合成には *agsB* が主として機能しているのではないかと考えられた. そこで, 発現制御可能なプロモーターを用いて *agsB* の転写量を調節した条件的破壊株を造成し, その表現型解析を試みた. その結果, *agsB* の転写量変化に伴い, β -1,3-グルカン合成酵素遺伝子群や *agsA* の転写量が変動することが明らかになった. また, *agsB* 発現抑制状態での生育試験や細胞壁合成阻害剤に対する感受性試験の結果についても考察した. (本研究は生研センター異分野融合研究事業により支援を受けた.)

Functional analysis of α -1,3-glucan synthase genes in *Aspergillus nidulans*

Akira Yoshimi¹, Motoaki Sano², Tomonori Fujioka³, Osamu Mizutani⁴, Daisuke Hagiwara¹, Takashi Fujikawa⁵, Marie Nishimura⁵, Keietsu Abe¹ (¹Tohoku Univ. NICHe, ²KIT, ³Kumiai Chemical Industry Co., Ltd, ⁴NRIB, ⁵NIAS)

O-24

麹菌ゲノム解析によって初めて見出された細胞内金属カルボキシペプチダーゼ

山形洋平¹, 前田浩¹, 楠本憲一², 小出芳直³, 石田博樹⁴, 竹内道夫¹

(¹東京農工大院・応生科, ²食総研, ³天野エンザイム・研究部, ⁴月桂冠・総研)

麹菌ゲノム解析の結果, 麹菌にも metallo-carboxypeptidase 遺伝子が 12 配列存在することが明らかとなった. これらの carboxypeptidase と推定されるタンパク質は, シグナルペプチド配列を持たず, すべて細胞内で発現しているものと考えられた. このうち Family M20D、すなわち Family M20 に配列上は分類されるものの non-peptidase homologue とされているものが 8 配列存在する. この non-peptidase homologue に分類される carboxypeptidase は, これまで解析されたことがない. そこで, これらのタンパク質が carboxypeptidase としての活性を持つのか, またどのような性質を持つのかを明らかにするために, このうち 2 つのタンパク質 (AOEXE305, AOEXE306) について大腸菌を宿主として発現させた. この 2 つのタンパク質を精製し活性を調べたところ, いずれも carboxypeptidase としての活性を発揮することが明らかとなった. しかし, 2 つの酵素はいずれも細胞内に局在すると考えられるにも関わらず, 至適 pH をアルカリ側に持っていた. さらに, 基質となるペプチドの C 末端のアミノ酸の認識が特徴的で AOEXE305 は, 酸性アミノ酸を C 末端から遊離できる酵素であった. 一方, AOEXE306 は, Pro を遊離することができた. また, AOEXE306 は, 非常に安定な酵素であり, 90°C で処理しても未処理のときの 7 割以上の活性を保持することが明らかになった.

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.

Characterization of newly found intracellular metallo-carboxypeptidases by genomic sequencing of *A. oryzae*.

Youhei Yamagata¹, Hiroshi Maeda¹, Ken-Ichi Kusumoto³, Yoshinao Koide⁴, Hiroki Ishida⁵, Michio Takeuchi¹

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

O-25

新規麹菌アスパルティックプロテアーゼ AOENA10 の発現および解析における

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

麹菌ゲノム解析の結果、麹菌ゲノムにはアスパルティックプロテアーゼ(APase)と推定される遺伝が 11 種類、存在することが分かった。そのうち 4 種類についてはすでに報告した。今回は、塩基配列から推定されるアミノ酸配列より、従来の APase の活性中心モチーフ DTG/DTG とは異なる DTA/DTD を有する AOENA10 について検討を行った。その結果、従来の APase とは異なる性質を示すことが明らかになったので報告する。

AOENA10 遺伝子を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、得られた形質転換体の培養上清から酵素を精製し、その精製酵素を用いて性質決定を行った。

AOENA10 は、予測通り菌体外に分泌・生産される酵素であった。精製酵素は塩基性タンパク質であるサルミンに pH3.0 でよく作用したが、通常の APase が作用するカゼイン、BSA などにはほとんど作用しなかった。また、APase 阻害剤であるペプスタチンによっては阻害されなかった。以上の結果から AOENA10 は特異的な性質を示す酵素であ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 new APase AOENA10 in *Aspergillus oryzae*

Ayako Okamoto¹, Hiroto Morita¹, Yohei Yamagata¹, Ken-Ichi Kusumoto², Yoshinao Koide³, Hiroki Ishida⁴, Michio Takeuchi¹

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

P-1

麹菌 *Aspergillus oryzae* 菌糸体のアクリルアミド分解特性

若泉賢功、山元宏貴、安田直子、尾関健二、大箸信一（金沢工大・ゲノム研）

【目的】アクリルアミド（AA）は食品を加熱することで生じる遺伝毒性発がん性が懸念される有害化学物質のひとつであり、食の安全性確保のためには低減することが望ましい。我々は、これまでの研究で、麹菌 *Aspergillus oryzae* が水溶液或いはほうじ茶浸出液中の AA 濃度の低減させることを報告した。その後、研究を進める過程で、*A. oryzae* 分生子を栄養培地で培養することで形成する球状の菌糸塊（菌糸体）を、AA を唯一の炭素源とした最少培地（Czapek-Dox 液体培地）で培養することで、AA 分解能が顕著に向上する知見を得た。そこで本研究では、*A. oryzae* 菌糸体の AA 分解能の向上に適した培養条件を調査したので報告する。

【方法】*A. oryzae* RIB40 株菌糸体を、培養時間（12～96 時間）、AA 添加濃度（0～2000 μ g/ml）、培地 pH（5.5～9.5）、及び菌体量（0.9～1.3g）で培養し、その影響を検討した。次に、選択した最適培養条件で *A. oryzae* 4 株の AA 分解能を比較調査した。更に、高分解株を用いてほうじ茶浸出液中の AA の低減効果を検証した。

【結果】*A. oryzae* RIB40 株菌糸体の AA 分解能は、培養 48 時間、AA 添加濃度 200 μ g/ml、培地 pH9.5、菌体 1.3g の各条件を組み合わせることで培養することによって、最も向上した。次に、選択した最適培養条件では *A. oryzae* KBN1010 株及び No.100 株は、*A. oryzae* RIB40 株よりも高い AA 分解能を示した。そこで、この 2 株の菌糸体を前述の培養条件で培養した後、ほうじ茶浸出液中の AA 濃度の低減効果を検討したところ、8 時間で半減し、24 時間後には検出限界以下まで低減可能であった。よって、*A. oryzae* 菌糸体を前記条件で培養することで AA 分解能が顕著に向上し、更に、ほうじ茶浸出液中の AA 分解時間が短縮可能であることが明らかとなった。

Acrylamide degradation characteristic of *Aspergillus oryzae* mycelia.

Masanori Wakaizumi, Hirotaka Yamamoto, Naoko Yasuda, Kenji Ozeki, and Shinichi Ohashi (KIT)

P-2

麹菌による食品中のアクリルアミド低減化技術の開発

桐藤万裕、加座健士郎、坪内宏和、若泉賢功、尾関健二、大箸信一（金沢工大・ゲノム研）

【目的】近年、加熱処理された加工食品中にアクリルアミド（AA）が含まれていることが判明し、健康被害が懸念されている。しかし、食品中に生成された AA を分解・除去することは、安全性や品質保持という観点から容易でない。そこで本研究では、国菌である麹菌を利用し、安全で安心な食品用酵素剤の開発を目的として、AA 分解能の高い麹菌によって食品中の AA 低減化を試みた。また食品の品質への影響を最小限に抑えるため、菌処理の短時間化を目指し、その効率化(AA 分解能の誘導)について検討した。

【方法および結果】バイオリアクターを作製するため、AA 分解能の高い No.100 (*Aspergillus oryzae*) の胞子をアルギン酸ソーダにより包括固定した。これを YPD 培地 (pH 6.5) で 3 日間培養 (菌体増殖) した後、固定化菌体をリアクターのカラムに充填し、AA 10ppm を添加した滅菌水を循環させた。その結果、3 日間で AA をほぼ分解できた。一方、この YPD 培地による前培養の後、AA 200ppm を添加した CD 培地 (C-, N-, pH 9.5) において 3 日間誘導培養させ、AA 分解能の誘導を図った。その結果、24h で AA をほぼ分解することができ、麹菌の AA 分解能は最少培地のアルカリ側による誘導が効果的であることが示された。これから誘導における最適培養時間や最適 pH を検討していく。

Developed technique for reducing acrylamide in foods by *Aspergillus oryzae*

Kazuhiro Kirifuji, Kenshiro Kaza, Hirokazu Tsubouchi, Masanori Wakaizumi, Kenji Ozeki, Shinichi Ohashi (KIT)

P-3

新規麹菌バイオリアクターによる飲料中のアクリルアミド分解

加座健士郎, 坪内宏和, 桐藤万裕, 若泉賢功, 尾関健二, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)

【目的】これまで麹菌の種類により、飲料中のアクリルアミド (AA) の分解性に差があることなどを報告してきた。AA 分解 (アミダーゼ) 遺伝子を取得し、利用することを大きな目的としているが、アミダーゼ酵素の利用では分解物のアクリル酸の毒性が懸念される。そこで飲料の風味の変化を最小限に抑える短時間の菌体処理法を開発することは重要である。麹菌胞子をアルギン酸 Na で包括固定化し、栄養培地で菌体増殖させ、ほうじ茶、水中の AA を分解できるバイオリアクターを開発してきた。今回 AA の分解効率の高いリアクターとして、ヘチマを利用して麹菌自然付着型について検討した。

【方法・結果】麹菌は AA 分解能が高い *Aspergillus oryzae* No.100 を用い、胞子をアルギン酸 Na で包括固定化し、YPD 培地で菌体増殖 (前培養) し、200ppmAA を単一 N, C 源とする最少培地 (pH9.5) で AA 分解能を誘導し、洗浄後、10ppmAA を添加したほうじ茶、水を処理したところ、24 時間で AA はほぼ分解された。一方ヘチマを用いた自然付着型リアクターは、ヘチマの体積、栄養分の吸着処理などを検討し、これまでの最適条件では、栄養分の吸着処理が有効であり、AA 分解能の誘導培養後の AA 分解試験では、6 時間でほぼ分解できる条件を確認できた。現在、菌体量との関係や更なる分解効率の高い条件を検討している。

Effect of new *Aspergillus oryzae* bioreactor system on acrylamide degradation in drinks.

Kenshiro Kaza, Hirokazu Tsubouchi, Kazuhiro Kirifuji, Masanori Wakaizumi, Kenji Ozeki, Shinichi Ohashi (KIT)

P-4

麹菌における新規糸状菌エラスターゼ阻害剤の高生産

山下 伸雄¹, 西本 遼¹, 松永 将義¹, 奥村 欣由², 打矢恵一², 松井 健², 小川賢二³, 二改俊章² (¹白鶴酒造・研究開発, ²名城大・薬, ³(独)東名古屋病院・臨床研究部)

日和見感染性 *Aspergillus* より見出された新規エラスターゼ阻害剤 (AFUEI) は 68 残基のアミノ酸からなるポリペプチドであり、病原因子である糸状菌由来エラスターゼに対して強力な阻害活性を示した。またヒト好中球エラスターゼにも強い阻害を示すことから肺アスペルギルス症や好中球エラスターゼの亢進疾患への臨床応用が期待される。演者らは AFUEI を効率的に高生産するため、AFUEI 生産株 *A. fumigatus* AFU-12 のゲノムより AFUEI をコードする遺伝子を単離した。AFUEI 遺伝子は 371-bp であり、2 つのイントロンを含んでいた。これをタカアミラーゼプロモーターの制御下に連結し、麹菌 *A. oryzae* HL-1105 (*sC*⁻) に導入した。デキストリンを炭素源とする液体培地で形質転換株を培養した結果、*A. fumigatus* AFU-12 が生産するのに 10 日間要する量の約 10 倍量の AFUEI を形質転換体は 2 日間で生産した。また液体培地を単純化することで、限外ろ過の 1 パスで電気泳動的に単一な精製標品が得られた。リコンビナント AFUEI は AFUEI と同等な性質をもち、簡便かつ大量に得られることから、現在、これを用いて動物実験が行われている。

High production of filamentous fungal elastase inhibitor in *Aspergillus oryzae*.

Nobuo Yamashita¹, Haruka Nishimoto¹, Masayoshi Matsunaga¹, Yoshiyuki Okunura², Kei-ichi Uchita², Takeshi Matsui², Kenji Ogawa³, Toshiaki Nikai² (¹Res. and Dept., Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd., ²Faculty of Phar., Meijo Univ., ³Dept. of Pulmonary Med., Higashi Nagoya Hospital)

P-5

麹菌 *Aspergillus oryzae* α -アミラーゼ遺伝子破壊株による異種タンパク質生産

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 *Aspergillus oryzae* は、異種タンパク質生産の宿主として使用されている。しかし、*A. oryzae* は α -アミラーゼを多量に分泌しており、異種タンパク質の生産時には分泌経路の様々な段階で競合している可能性が考えられる。これまでに我々は、RNAi により α -アミラーゼの発現を抑制することで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⁾。そこで今回は、 α -アミラーゼ遺伝子の破壊株の作製と破壊株による異種タンパク質生産を試みた。

【方法と結果】*A. oryzae* RIB40 株には3つの α -アミラーゼ遺伝子(*amyA*, *amyB*, *amyC*)が存在し、それらのプロモーターから遺伝子領域までの約3.2 kbp の DNA 配列はほぼ同一である。そのため、共通している領域の間で遺伝子領域の前半1 kbp を *pyrG* マーカーに置換し、3つの α -アミラーゼ遺伝子すべてにターゲット可能な α -アミラーゼ遺伝子破壊用断片を作製した。さらにこの断片を NSPID-tApE 株(*niaD⁻ sC Δ pyrG Δ ligD Δ tpa Δ pepE*)²⁾に導入することで、3種類の単独破壊株(Δ *amyA*, Δ *amyB*, Δ *amyC*)と2種類の2重破壊株(Δ *amyA* Δ *amyC*, Δ *amyB* Δ *amyC*)を取得した。しかし、3つ全てが破壊された株は取得できなかったため、*pyrG* マーカーサイクリング法²⁾により1つずつ破壊していくことで α -アミラーゼ3重破壊株(Δ *amyA* Δ *amyB* Δ *amyC*)を作製した。そして取得した α -アミラーゼ遺伝子破壊株にグルコアミラーゼをキャリアーとしてウシキモシンを発現させ、その生産性を検討した。その結果、2重破壊株(Δ *amyB* Δ *amyC*)ではウシキモシン生産の改善が認められたが、3重破壊株(Δ *amyA* Δ *amyB* Δ *amyC*)では逆に生産量が減少した。

1) Nemoto et al, Biosci. Biotechnol. Biochem., in press, 2) Maruyama & Kitamoto, Biotechnol. Lett., 30, 1811-1817, (2008)

Heterologous protein production in α -amylase genes disruptants of *Aspergillus oryzae*

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

P-6

A. oryzae の液胞ソーティングレセプター遺伝子破壊による異種タンパク質生産性の向上

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 *Aspergillus oryzae* は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。以前、我々はEGFPを融合した分泌タンパク質の局在解析を行い、菌糸先端および液胞に蛍光を観察した。このことは、発現した異種タンパク質の一部が液胞にソーティングされている可能性を示唆する結果である。出芽酵母 *S. cerevisiae* において液胞ソーティングレセプターVps10pはゴルジ体に局在し、液胞タンパク質を液胞にソーティングする役割をもつ。本研究では、*A. oryzae* において *VPS10* 相同遺伝子 *Aovps10* を破壊し、異種タンパク質生産における効果を検討した。

【結果】*pyrG* マーカーを用い、高頻度相同組換え宿主 NSPID1 株¹⁾ (*niaD⁻ sC Δ ligD Δ pyrG*)を用いて *Aovps10* 遺伝子を破壊した。液胞タンパク質である Carboxypeptidase Y (CpyA)にEGFPを融合して局在を調べたところ、野生株で液胞に見られた緑色蛍光が *Aovps10* 破壊株において観察されなくなった。このことから、*A. oryzae* の AoVps10 は液胞タンパク質のソーティングレセプターであることが確認された。さらに、 α -アミラーゼをキャリアーとしてウシキモシンを発現するプラスミドを *Aovps10* 破壊株に導入し、培地中の生産量を測定した。その結果、*Aovps10* 破壊株は野生株に比べウシキモシンの生産量が約3倍に増加していた。これらの結果から、*A. oryzae* の液胞タンパク質ソーティング機構が異種タンパク質の分泌過程の制御において何らかの役割をしていることが示唆された。1) Maruyama & Kitamoto (2008) Biotechnol. Lett. 30: 1811-1817.

Disruption of a vacuolar protein sorting receptor gene, *Aovps10*, enhances production level of the heterologous protein by *Aspergillus oryzae*

Jaewoo YOON, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO

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

P-7

菌体外分泌シグナルの置換による *Aspergillus nidulans* を宿主とした発現系の改善

前田 浩¹, 山形洋平¹, 楠本憲一², 小出芳直³, 石田博樹⁴, 竹内道雄¹

(¹東農工大農・応生科, ²食総研, ³天野エンザイム, ⁴月桂冠・総研)

【目的】 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の全ゲノム配列が明らかとなり、ポストゲノム研究において、より効率的なタンパク質発現系の構築が求められている。我々は麹菌ゲノム中より見出された全ての protease / peptidase の高発現系を構築し、精製および酵素学的性質を明らかとすることを目的に研究を進めている。しかしながら、推定菌体外分泌シグナルを有するにも関わらず、*A. nidulans* を発現宿主とする発現系において、その発現が認められないものも多くあった。また、酵素学的性質を解析するにあたっては、発現産物の翻訳後修飾の影響も考慮にいれなければならない。同族糸状菌を発現宿主として選択する必要性もある。そこで、本報告では異種タンパク質の菌体外分泌シグナルを利用することの有効性を検討することとした。

【方法・結果】 これまでに *A. nidulans* を発現宿主とした発現系において、alanyl dipeptidyl peptidase (DPP Va, DPP Vb) の菌体外分泌量が大きく異なることを見出している (DPP Va: 43 mg/L, DPP Vb: 9 mg/L)。この両者の分泌量の差は、菌体外分泌シグナル配列のアミノ酸分布に差にあると推定している。そこで同様の発現系で菌体外への高分泌が確認できなかった neutralprotease-III (NP-III) の菌体外分泌シグナル配列を DPP Va のものに置換した。その結果、本来の菌体外分泌シグナルを用いた場合と比較して、異種タンパク質である DPP Va のものに置換したものでは、約 11 倍の azocasein 分解活性の菌体外への発現が確認された。

なお本研究は、生研センター基礎研究推進事業の一環として行なわれたものである。

An improvement of expression system, using *Aspergillus nidulans*, by replacement of signal peptide.

Hiroshi Maeda¹, Youhei Yamagata¹, Ken-Ichi Kusumoto², Yoshinao Koide³, Hiroki Ishida⁴, Michio Takeuchi¹

(¹Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, ²NFRI, ³Amano Enzyme Inc., ⁴Gekkeikan Sake Co. Ltd.)

P-8

麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 株のブレオマイシン耐性による形質転換選抜系の開発

鈴木聡¹, 多田功生¹, 福岡真里¹, 塚越芳樹¹, 松下真由美¹, 柏木豊², 杉山政則³, 楠本憲一¹ (食総研¹, 東京農大², 広島大³)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は種々の薬剤に対して高度な耐性を示すため、微生物の遺伝子操作に一般的に用いられる Hygromycin などを用いた形質転換株の選抜を行うことができない。麹菌の薬剤耐性選抜法としては現在ピリチアミン耐性のみが汎用されているが、使用可能な薬剤耐性選抜の選択肢を増やすことが望まれる。そこで本研究ではブレオマイシン生産菌由来の自己耐性遺伝子をマーカーとする *A. oryzae* RIB40 株の形質転換選抜系を開発した。

糸状菌プロモーター及びターミネーター制御下にブレオマイシン耐性遺伝子 *blmB* を発現する耐性カセット BmR を作成した。次に BmR を用いて麹菌 *ligD* 破壊カセットを作成し、*A. oryzae* RIB40 株プロトプラストへ PEG 法にて導入した。再生胞子塗布法にて分生子を 30 μ g/ml 濃度ブレオマイシンを含む培地上に塗布し生育した耐性コロニーを回収した。

計 6 回の形質転換実験を行い、任意の 72 株のブレオマイシン耐性株を選抜し、サザン解析及びコロニー PCR にて確認したところ、うち 33 株(46%)が *ligD* 破壊株であった。また、TEF1 プロモーターにて GUS を発現するベクター pNAGMTEF の *niaD* マーカーを BmR に置換し、PEG 法にて RIB40 株に導入したところ、GUS の発現が確認された。従って、*blmB* は麹菌形質転換の薬剤耐性マーカーとして利用可能であることが明らかとなった。

Transformation of *Aspergillus oryzae* RIB40 with the bleomycin-resistance gene as a selection marker

Satoshi Suzuki¹, Sawaki Tada¹, Mari Fukuoka¹, Yoshiki Tsukakoshi¹, Mayumi Matsushita¹, Yutaka Kashiwagi², Masanori Sugiyama³, Ken-Ichi Kusumoto¹ (NFRI¹, Tokyo Univ. of Agriculture², Hiroshima Univ.³)

P-9

逆方向反復配列の添加による *Aspergillus nidulans* の形質転換効率の低下機構

松比良和晃¹, 伊藤靖夫^{1,2} (¹信大院・工, ²信大・全学教育機構)

形質転換時に直鎖ベクター分子が連結し、同方向反復配列(DR)および逆方向反復配列(IR)が形成されることがある。しかし、あらかじめ IR としての DNA 分子を添加すると、直鎖分子のみを用いた場合と比較して、形質転換効率が低下する。本研究ではこの原因について検討した。まず、染色体上に組み込まれた IR 部分に二次的構造が形成され、その欠失時にゲノムが不安定化する可能性を考えた。この問題について、*pyr-4* と 5-FOA によるポジティブネガティブ選択を用いて細胞単位で検証した。その結果、組み込まれた IR の欠失は主な原因ではなかった。したがって、組み込み時またはその直前・直後に形質転換効率の低下原因が存在すると考えられた。ここで、ベクター分子の染色体への組み込みは宿主の DNA 二重鎖切断修復系に依存する。そして、相同性を持たないベクター分子の染色体への組み込みは、Ku70/80 を中心とした非相同末端結合 (NHEJ)装置によって行われる。さらに、ヒトでは、Ku70/80 と複合体を形成する DNA-PKcs がホリデイジャンクションに結合する。そこで、核内において、二次的構造を形成した IR が、直接または間接的に NHEJ 装置の構成因子をリクルートするモデルを想定した。そのために、NHEJ 装置の活性が低下し、ベクター分子の染色体への組み込みが拮抗的に阻害されると考えている。

Possible titration of NHEJ machinery by inverted-repeat during transformation of *Aspergillus nidulans*

Kazuaki Matsuhira¹, Yasuo Itoh^{1,2}

(¹Grad.Sch. Dev. Sci., ²Sch. Gen. Ed. / Shinshu Univ.)

P-10 (O-2)

菌類に対する遺伝子高発現および発現抑制用バイナリーベクターの開発

奥原 徹¹, 野田知嗣¹, 吉田真澄¹, 稲富 聡², 田口悟朗¹, 下坂 誠¹ (¹信州大・繊維・応生系, ²ホクトきのこ総合研究所)

我々は、担子菌エノキタケにおいて、子実体形成特異的に発現する遺伝子群の機能解析を目指してきた。既に、*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT)法を用いて、エノキタケ菌糸へ簡便に遺伝子を導入できるバイナリーベクターを構築した。これを基にして、菌類における汎用的な高発現タイプおよび遺伝子発現抑制 (RNAi) タイプのバイナリーベクターの構築を目指した。

作成したバイナリーベクター (pFungiway シリーズ) の特徴として、1) Gateway テクノロジーを用いて目的断片の挿入を容易にしたこと、2) 選択マーカーとして Hygromycin B と G418 耐性の 2 タイプを揃えたこと、3) 遺伝子発現には、エノキタケ由来 glyceraldehyde-3-phosphphate dehydrogenase (*gpd*)プロモーターを用いたこと、が挙げられる。

既に、エノキタケでは、RNAi ベクターを用いて幾つかの遺伝子の発現を抑制できることを確認した。今回は、さらに *Fusarium* 菌を用いて上記ベクターの有効性を検証した。

Fusarium oxysporum の分生子に対して、高発現ベクター (Hygromycin B 耐性マーカー) を用いて、蛍光レポーター遺伝子を導入したところ、菌糸において強い蛍光の発現を確認した。この株に対して、さらに RNAi ベクター (G418 耐性マーカー) を用いて、レポーター遺伝子の一部を導入したところ、蛍光発現の抑制を確認できた。

Construction of binary vectors used for overexpression and RNA interference in fungi

Toru Okuhara¹, Tomotsugu Noda¹, Masumi Yoshida¹, Satoshi Inatomi², Goro Taguchi¹, and Makoto Shimosaka¹

(¹Division Appl. Biol., Fac. Tex. Sci. Tech., Shinshu Univ., ²Mushroom Lab. Hokuto Co.)

P-11

クエン酸生産系状菌 *Aspergillus niger* における *ku80* 遺伝子破壊による相同組換え効率の向上

本田裕樹, 小林慶一, 服部貴澄, 桐村光太郎 (早大・理工・応化)

【目的】クエン酸生産系状菌 *Aspergillus niger* はクエン酸をはじめ各種の有用代謝産物の工業的生産に利用されている。*A. niger* の育種では、ゲノム情報を利用した遺伝子工学的あるいは代謝工学的な改変に期待が寄せられているが、*A. niger* における遺伝子の相同組換え効率の低さが課題となっている。一方、近年、*A. oryzae* 等の糸状菌において非相同組換えに関与する *ku70* や *ku80* の遺伝子破壊により相同組換え効率が飛躍的に上昇することが報告されている。本研究では、クエン酸生産系状菌 *A. niger* WU-2223L 由来の *ku80* 破壊株を作製し、相同組換え効率について検討した。

【方法および結果】*A. oryzae* や *A. sojae* における *ku80* 遺伝子の塩基配列を参考にして、約 2.6 kb の *A. niger* WU-2223L 由来 *ku80* ホモログ遺伝子をクローニングした。さらに当該遺伝子の 5' 末端から約 0.6 kb (断片 A)、約 0.9 kb (断片 B)、約 1.1 kb (断片 C) の 3 断片を PCR で増幅し、マーカー遺伝子 *pyrG* と連結することによって、*ku80* 破壊用カセット (5'-断片 B-*pyrG*-断片 A-断片 C-3') を作製した。この *ku80* 破壊用カセットは、相同組換えにより染色体上の *ku80* ホモログの遺伝子座に導入された際に、断片 A において direct repeat を形成するように設計した。この *ku80* 破壊用カセットを用いて、*A. niger* WU-2223L 由来 *pyrG* 欠損株を宿主として形質転換を実施し、*ku80* ホモログ破壊株を取得した。*A. niger* WU-2223L を宿主として取得した形質転換体に占める相同組換え株の比率 (相同組換え効率) は 1-2% であるのに対して、*ku80* ホモログ破壊株を宿主とした相同組換え効率は約 16% に向上した。以上より、ホモログ遺伝子として取得したものが供試菌における *ku80* であることが示唆された。また、*ku80* ホモログ破壊によるクエン酸生産性への影響は見られなかった。

Improvement of homologous recombination frequencies by *ku80* disruption in citric acid-producing *Aspergillus niger*

Yuki Honda, Keiichi Kobayashi, Takasumi Hattori, Kohtaro Kirimura

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

P-12

アカパンカビにおける異種プロモーターの発現解析

石田泰大, 田中秀逸, 畠山晋 (埼大・理・遺伝)

遺伝子の機能を解析するためには、目的の遺伝子を破壊することが常套とされている。しかしながら、生存に必須な遺伝子の場合にはこの手法は有効ではない。そのため温度感受性変異株を作出することも行われるが、アカパンカビにおいて温度感受性株の設計と作製は困難であるため、解析に至るまでに膨大な時間がかかることが難点とされている。そこで、アカパンカビにおいてコンディショナルに遺伝子発現を制御する系を確立するために、異種生物の誘導性プロモーターが機能するか検討した。

キシラナーゼプロモーターは糖源の違いにより遺伝子発現の ON / OFF が制御されることが知られている。麹菌 *Aspergillus nidulans* のキシラナーゼ遺伝子のプロモーターの下流に大腸菌由来のハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hyg^R*) を挿入し、アカパンカビの細胞に導入した。得られた形質転換株を解析したところ、1% キシロースの条件下で *hyg^R* 遺伝子の発現が誘導されたが、1% グルコースでは *hyg^R* 遺伝子の発現はほとんど検出されなかった。さらに、ソルボースを同時に添加することによって遺伝子発現誘導が増強されることも確認された。本検討によって *A. nidulans* のキシラナーゼ遺伝子のプロモーターが、アカパンカビにおけるコンディショナルな遺伝子発現を可能にすることが示唆された。

Analysis of gene expressions using xenogeneic promoter in *Neurospora crassa*

Yasuhiro Ishida, Shuuitsu Tanaka, Shin Hatakeyama

(Dept. of Genet., Saitama Univ.)

P-13

ギガシーケンスによる実用麹菌株のゲノム解析

野村孝典¹、小田健太¹、濱田涼子²、岩下和裕^{1, 2}、山田修²、三上重明² (1: 広島大院・先端研 2: 酒総研)

[目的] 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は日本の伝統醸造産業に大きく関与し、実際の醸造現場では様々な特性を有する、多様な菌株が使用されている。我々は、これまでの麹菌 DNAchip を用いた解析の結果、各種麹は多様なゲノム構造を有し、その用途と関連があることを明らかにしている。また、これらゲノム構造の多様化には染色体の欠失、配列の変化、新規の配列、染色体間組換えなどが関連していることを示唆している。そこで本研究では、清酒製造に使用された経緯が明らかで、ゲノムの系統が異なる株について、次世代シーケンサーを用いて解析を行った。

[方法・結果] まず、大吟醸麹由来の麹菌で高品質の清酒が醸成可能な RIBOIS01 株について、次世代シーケンサー 454FLX (Roche 社) により解析を行った。その結果、RIBOIS01 株のゲノムサイズは約 36.9Mbp で、RIB40 株と共通する遺伝子の相同性は、平均 94.34% であった。また、RIBOIS01 株には、のべ 727Kbp の新規配列が存在すると共に、頻繁に染色体間組換えを起こしていることが明らかとなった。現在、より詳細な解析を行うと共に、これまで清酒用麹菌株の代表とされてきた RIB128 株についても同様の解析を行っている。

The Giga-sequencing analysis of the industrial *Aspergillus oryzae* genome

Takanori Nomura¹、Kenta Oda¹、Ryoko Hamada²、Kazuhiro Iwashita^{1, 2}、Osamu Yamada²、Shigeaki Mikami²

(1: Hiroshima Univ. 2: NRIB)

P-14

糸状菌細胞壁溶解酵素 Yatalase を用いた麹菌菌体量測定法の再検討

妹尾悠平^{1, 2}、岩下和裕^{1, 2}、山田 修² (1 広島大, 2 酒総研)

米麹中の麹菌体量を測定するには、一般的に麹菌細胞壁から遊離する N-acetyl glucosamine (GlcNAc) を比色定量し、菌体量に換算する方法が用いられている。これまでに、本法に基づいた菌体量測定キットが販売されていたが、販売中止となっている。そこで、糸状菌細胞壁溶解酵素である Yatalase を用いて麹菌細胞壁を分解し、生成した GlcNAc 量から菌体量を算出する方法が報告されていることから、より正確に GlcNAc 量を測定する為に、HPLC を用いて測定を行ったところ、問題があることが明らかとなった。そこで、Yatalase による麹菌菌体量の測定法について再検討を行った。

Yatalase と GlcNAc 等の単糖の標準液を混合したところ、各単糖の量が減少することが明らかとなった。そこで、Yatalase 溶液を限外ろ過により高分子画分と低分子画分画したところ、低分子画分に含まれる物質が、単糖の量を減少させる事が明らかになった。さらに、低分子画分を除いた Yatalase 剤と麹菌体を相互作用させることによっても、単糖の量を減少させる物質が生産される事が明らかとなった。そこで、まずは、液体培養した菌体と限外濾過処理を行った Yatalase 剤を用い、麹菌体由来の GlcNAc 量を正確に測定する方法の開発を行った。さらに、米麹を用いて固体培養での菌体量測定法についても再検討を行ったので報告する。

なお、研究にあたり Yatalase をご提供頂き、かつ多大な助言を頂きました大関株式会社様に感謝申し上げます。

Improvement of the method for the determination of the mycelial dry weight of *Aspergillus oryzae* using cell-wall lytic enzyme of Yatalase

Yuhei Senoo^{1, 2}、Kazuhiro Iwashita^{1, 2}、Osamu Yamada² (1 Hiroshima Univ., 2 NRIB)

P-15 (O-1)

変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法を用いた木材腐朽に関わる糸状菌群の解析

中田裕治, 久住朝子, 片山葉子, 吉田 誠, 福田清春 (農工大・農)

木材の微生物による生物劣化(腐朽)は複数の微生物によって進行することが知られている。著者らは、木材腐朽の主要な原因菌である糸状菌に着目し、その多様な菌叢を分子生物学的手法で解析することを試みた。本発表では、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE法)により、腐朽した木材に存在する糸状菌群を同定したので報告する。

腐朽形態の異なる6種の腐朽材からゲノムDNAを抽出し、得られたゲノムDNAを鋳型にしてPhi29 DNAポリメラーゼを用いて非特異的にゲノムDNAの増幅を行った後、糸状菌のITS領域に特異的なプライマーを用いてPCRを行った。その結果、増幅産物は2%のアガロースゲル中でそれぞれ2~3本のバンドとして観察された。一方、この反応液をDGGE解析に供したところ、アガロースゲル電気泳動と比較して、より多くのバンドが観察された。また、ゲル中におけるバンドの出現パターンは各腐朽材で異なっていた。これにより得られたバンドを切り出し、塩基配列を決定した後、塩基配列データベースをBLAST検索したところ、様々な種類の糸状菌が同定された。以上の結果から、DGGE法により、腐朽材中に存在する複数の菌由来のITS領域に相当するDNA断片を分離することが可能となったと言える。したがって、本法は、多様な菌種からなる腐朽材中の菌叢の解析に有効である。

Analysis of fungal community in decayed wood using denaturing gradient gel electrophoresis

Yuji Nakada, Asako Kusumi, Yoko Katayama, Makoto Yoshida, Kiyoharu Fukuda

(Tokyo Univ. of Agric. and Teach.)

P-16

非特異的DNA増幅を利用した木材腐朽菌叢の定量分析

和田朋子, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)

木材腐朽菌は、木質構造物の劣化を引き起こすことから、木質住宅や木製外構材の維持管理のために、木材腐朽菌叢のモニタリングは極めて重要である。これまでの腐朽菌の同定では、腐朽材から採取した菌を培養し、その形態を観察するという目視による手法が主流であった。しかしながら、この手法は手間と経験が必要とされる上、難培養性の菌が検出されない可能性や未知の有害菌を培養してしまう危険性がある。そこで近年、rDNAのITS領域による同定手法が用いられ始めたが、木材含有成分がPCRを阻害したり、非破壊的に鋳型DNAを確保することの難しさから、現実的なモニタリング法としては課題が残されている。

そこで我々はこれまでに、Phi29 DNAポリメラーゼによる非特異的なDNA増幅をrDNAのITS領域のPCR増幅に組み合わせ、極微量の試料中の担子菌を同定する手法を確立した。しかしながら、実際の菌叢に含まれる菌の存在比については必ずしも定量的な評価はされていないことから、本研究ではこの手法の定量性について評価を行った。

最初にPhi29 DNAポリメラーゼによるDNA増幅条件について、鋳型DNA量および増幅反応時間に関して検討を行った。また、2種類の木材腐朽菌から得られたゲノム溶液を一定の量比で混合し、これを鋳型として非特異的増幅後ITS領域の増幅を行い、増幅産物についてPCR-RFLPおよび解離曲線解析に供した。その結果、DNAの非特異的増幅行程では反応条件に関わらず菌の存在比は保たれていたが、PCRによる増幅行程ではサイクル数の増加に伴って菌叢に偏りが生じることが示された。以上の結果から、Phi29 DNAポリメラーゼによる増幅を組み合わせると、少量のサンプルから鋳型DNAを得られるだけでなく、菌叢の偏りを引き起こすPCRのサイクル数を減らすことが可能になることが示された。

Quantitative analysis on flora of wood rotting fungi using Phi29 DNA polymerase

Tomoko Wada, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima (Dept. of Biomaterial and Science, Univ. of Tokyo)

P-17

光変換型蛍光タンパク質を用いた麹菌 *Aspergillus oryzae* 分泌経路の解析

若林 奈央, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】 麹菌 *A. oryzae* はその高いタンパク質分泌能力から、有用タンパク質生産の宿主として利用されている。以前、我々は *A. oryzae* の分泌タンパク質に EGFP を融合して可視化したところ、特に菌糸先端に Spitzenkörper 様の緑色蛍光が観察されたことから、タンパク質の分泌が主に菌糸先端から行われていることが示唆された。しかし、菌糸の基部にある分泌タンパク質がどれくらいの速度で菌糸先端に供給されているかについての知見はまったくない。本研究では、光変換型蛍光タンパク質を利用して分泌タンパク質の挙動を観察することにより、*A. oryzae* が高いタンパク質分泌能力をもつ理由を解明することを目的とした。

【方法・結果】 光変換型蛍光タンパク質 Dendra2 は、紫色光(405 nm) 照射によって緑色から赤色へ蛍光色が変わる性質をもつため、特定の場所に存在するタンパク質をラベルしてその後の挙動を追跡することが可能である。そこで、分泌タンパク質 α -アミラーゼ(AmyB)と Dendra2 との融合タンパク質を *A. oryzae* に発現させ、分泌経路の詳細を掴もうと試みた。AmyB-Dendra2 発現株を蛍光顕微鏡で観察したところ、菌糸先端に Spitzenkörper 様の緑色の蛍光が見られた。この緑色の蛍光について光変換を行った結果、蛍光が赤色に変換されるのが確認された。菌糸先端より 5-10 μm ほど基部側の Dendra2 蛍光を光変換すると、光変換後 10 分ほどで菌糸先端に Spitzenkörper 様の赤色蛍光を確認できた。現在、この AmyB-Dendra2 発現株を用いて菌糸先端からの距離により AmyB の菌糸先端へ輸送される速度がどのように変化するかについて解析を行っている。

Analysis of secretory pathway by a photoswitchable fluorescent protein in *Aspergillus oryzae*.

Nao WAKABAYASHI, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO

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

P-18

麹菌 *A. oryzae* における隔壁へ向かうタンパク質分泌経路の分子生物学的解析

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・農生科・応生工、²エジンバラ大・細胞生物学研究所)

糸状菌におけるタンパク質分泌は菌糸先端でのみ起こると考えられてきた。しかしこれまでに我々は、麹菌における分泌タンパク質 AmyB と EGFP の融合タンパク質の動態解析から、隔壁へ向かうタンパク質分泌経路の存在を示している。さらにこの分泌経路は、菌糸先端の分泌経路とは異なり、輸送の効率が低い、アクチンに依存せず微小管のみに依存するなどの特徴を示すことを明らかにしている。そこで本研究では、隔壁へ向かうタンパク質分泌経路の詳細を明らかにすることを目的とした。AmyB-EGFP の隔壁への局在は既に知られているが、これが隔壁の細胞壁にトラップされたものなのか、細胞膜外に分泌されたものなのかはわかっていない。そこで高浸透圧条件下で原形質分離を誘導することによって、細胞膜と細胞壁の間の空間 (ペリプラズム)を拡大させた状態で、AmyB-EGFP の局在を観察した。その結果、AmyB-EGFP は細胞膜より外側のペリプラズムに局在していたことから、AmyB-EGFP は隔壁においても細胞膜外に分泌されていることが明らかになった。また、AmyB-EGFP の隔壁への局在は、細胞膜 SNARE タンパク質 AoSso1 依存的事であること、Exocyst 複合体構成タンパク質 AoSec3 が菌糸先端に加えて隔壁にも局在することから、隔壁へ向かうタンパク質分泌経路においても分泌小胞と細胞膜の膜融合の機構は保存されていることが示唆された。

Molecular analysis of secretory pathway toward 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-19

麹菌 *A. oryzae* における分泌に関わる Rab GTPase AoSec4 の機能解析

中野浩幸¹, 早川雄悟¹, 正路淳也^{1,2}, 有岡学¹, 北本勝ひこ¹

(¹東大院農生科・応生工, ²エジンバラ大・細胞生物学研究所)

【目的】 Rab GTPase は小胞輸送において小胞とオルガネラの融合を仲介する低分子量 GTPase である。我々はこれまでに、*A. oryzae* における 10 の Rab GTPase のクローニングと網羅的局在解析を行った。このうち EGFP-AoSec4 は分泌小胞と Spitzenkörper へ局在することが示唆されている。そこで本研究では *Aosec4* の機能解析を行うことによって、*A. oryzae* における分泌経路をより詳細に理解することを目的とした。

【方法と結果】 まず *Aosec4* 破壊株を作製し、表現型解析を行った。出芽酵母の *SEC4* は必須遺伝子であるが、麹菌においては *Aosec4* 破壊株を取得出来た。*Aosec4* 破壊株は、生育が悪化し、分生子量や気中菌糸量が著しく減少した。経時的な顕微鏡観察では、植菌後 14 時間以降に菌糸が太くなることと先端の肥大化が観察された。また FM4-64 による染色の結果、細胞質に FM4-64 が取り込まれないことが観察された。さらに分泌に関与する v-SNARE である AoSnc1 と EGFP の融合タンパク質は野生株において Spitzenkörper に局在するが、*Aosec4* 破壊株ではその周縁部へ局在が広がって観察された。同じく野生株において Spitzenkörper に局在する α -アミラーゼ (AmyB) と EGFP の融合タンパク質も、破壊株においては Spitzenkörper に局在が見られない菌糸が確認された。また、SDS-PAGE によってタンパク質分泌量の減少も確認された。以上から、*Aosec4* 破壊株は、極性的なエキソサイトーシスに欠損を持つことが示唆された。今後は、分泌タンパク質の動態や細胞内極性への影響を解析する予定である。

Functional analysis of Rab GTPase AoSec4 in *Aspergillus oryzae*

Hiroyuki Nakano¹, Yugo Hayakawa¹, Jun-ya Shoji^{1,2}, Manabu Arioka¹, Katsuhiko Kitamoto¹

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

P-20

麹菌 *A. oryzae* における AoAtg1 の局在および機能解析

柳澤 晋, 中野 浩幸, 早川 雄悟, 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ける細胞内分解機構であり、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。オートファジーの研究は主に酵母や動物細胞において行われており、糸状菌における研究はあまり進んでいない。しかし、糸状菌は多細胞からなり、環境の変化に応じて分生子を形成するなど分化や発生への影響が観察しやすいため、オートファジー研究の対象としても魅力的な微生物である。Atg1 はオートファジー誘導の初期段階に関与しており、Atg1-complex の形成によってオートファジー誘導が開始される重要な因子として働いている。そこで本研究では、AoAtg1 の局在および機能を解析することで、*A. oryzae* におけるオートファジーの更なる理解を目的とした。

【方法・結果】 まず酵母 *S. cerevisiae* Atg1 の *A. oryzae* におけるホモログをコードする *Aoatg1* 遺伝子のクローニングを行った。さらに EGFP を AoAtg1 の N 末端側、C 末端側にそれぞれ付加させた EGFP-AoAtg1、AoAtg1-EGFP を発現する株を作製し、共焦点顕微鏡による観察を行った。その結果 EGFP-AoAtg1、AoAtg1-EGFP はどちらも細胞内においてチューブ状に局在が観察された。この局在は酵母で見られる Atg1 の PAS (Pre-autophagosomal structure、オートファゴソーム前駆体) への局在とは大きく異なるものであった。現在 *Aoatg1* 遺伝子破壊株を作製中であり、破壊株を用いてオートファジー誘導への AoAtg1 の役割を解析するとともに、分化および発生に対する影響を調べる予定である。

Localization and functional analyses of AoAtg1 in *Aspergillus oryzae*

Shin Yanagisawa, Hiroyuki Nakano, Yugo Hayakawa, Katsuhiko Kitamoto

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

P-21

麹菌 *A. oryzae* におけるアミノペプチダーゼ I (AoApe1) を用いた Cvt 経路の解析

江部孝太郎, 早川雄吾, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】オートファジーはオルガネラ当を含む細胞質の一部を膜構造内隔離し液胞で分解する機構であり、栄養飢餓による非選択的オートファジーについて研究が詳しく進んでいる。酵母で確認されている Cytoplasm-to-vacuole targeting (Cvt) 経路は選択的オートファジーであり、Cvt 小胞によって、アミノペプチダーゼ I (Ape1)、 α -マンノシダーゼ (Ams1) の二つの酵素が細胞質から直接液胞に輸送されることが知られている。麹菌 *A. oryzae* などの糸状菌においても同様の経路が存在するかはわかっていない。そこで、本研究では麹菌において Cvt 経路存在するかを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】酵母 *S. cerevisiae* の *Ape1* の麹菌 *A. oryzae* におけるホモログ *Aoape1* のクローニングを行い、AoApe1 の C 末端に緑色蛍光タンパク質 EGFP を付加した AoApe1-EGFP を *amyB* プロモーター制御下で発言する AOEG 株を取得した。この AOEG 株を 24 時間富栄養条件化で培養し細胞内局在を共焦点顕微鏡により観察を行ったところ、AoApe1-EGFP は細胞質にドット状の蛍光として観察され、また液胞内にも蛍光が観察された。これにより麹菌においても Cvt 経路が存在することが示唆された。今後は AoAtg8-DsRed と AoApe1-EGFP の共発現株を作製し蛍光を観察するとともに、麹菌 AoAms1-EGFP 発現株を作製し解析する予定である。

Analysis of Cvt pathway by using amino peptidase I in *Aspergillus oryzae*

Kotaro Ebe, Yugo Hayakawa, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto

(Dept of Biotechnol, Univ. of Tokyo)

P-22

麹菌 *A. oryzae* のビオチン生合成にはペルオキシソームが関与する

田鍋 康子, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】ビオチンは、主にカルボキシル基転移酵素の補酵素として生体内で重要な働きを担っているビタミンの一種である。これまで真核生物におけるビオチンの生合成経路は、植物においてよく研究されている。植物のビオチン生合成では、細胞質で生成した中間体がミトコンドリアに運ばれ、その後ミトコンドリアにある酵素群によってビオチンが合成されると報告されている。今回、我々の麹菌 *A. oryzae* を用いた研究により、ビオチン生合成におけるペルオキシソームの関与を初めて明らかにしたので報告する。

【方法及び結果】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。以前に我々は、*A. oryzae* の *Aopex5*、*Aopex7* それぞれの遺伝子破壊株において、オレイン酸だけではなくグルコースを炭素源とする最少培地でも生育が顕著に低下することを明らかにしたが、この生育低下の原因は不明であった。そこで、培地に様々な成分を加えて生育比較を行った結果、破壊株の生育はビオチンの添加によって回復することを発見した。そこで、*A. oryzae* をはじめとする糸状菌および植物より、ビオチン生合成酵素をコードする遺伝子について相同性検索を行った。そのうち、細胞質に局在すると報告されていた BioF が、糸状菌および植物に共通して PTS1 を有していることを見出した。AoBioF の PTS1 を欠失した *A. oryzae* 株を作製した結果、ビオチンを含まない培地において生育が見られなくなった。以上のことから、*A. oryzae* においてペルオキシソームがビオチンの生合成に関与することが明らかになった。

Peroxisome participates in biotin biosynthesis in *Aspergillus oryzae*

Yasuko TANABE, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO

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

P-23 (O-7)

麹菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシス関連因子の探索

樋口裕次郎, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】エンドサイトーシスにおいて機能すると考えられる AoAbp1, AoEnd4 の局在解析から, 糸状菌におけるエンドサイトーシスは菌糸先端部において最も活発に行われていると示唆された。また, エンドサイトーシス欠損株では菌糸生長が著しく阻害されたことから, エンドサイトーシスは先端生長と密接に関連していることが示唆された¹⁾。以上のことから, 菌糸先端部において, 糸状菌特異的なエンドサイトーシスの機構の存在が予想された。そこで本研究では, エンドサイトーシスにおけるタンパク質間相互作用において機能する SH3 ドメインを C 末端に 2 つ有する AoAbp1 を bait とし, yeast two-hybrid スクリーニングによって *A. oryzae* におけるエンドサイトーシス関連因子の探索を行った。

【方法と結果】AoAbp1 を bait とし, *A. oryzae* の cDNA ライブラリーを prey とした yeast two-hybrid スクリーニングを行った。prey から得られた cDNA クローンの 1 つから, AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPase をコードすると予想される遺伝子の一部を見出した。yeast two-hybrid 解析により, この prey は AoAbp1 の 2 つの SH3 ドメインと相互作用することが示された。そこで, この prey をコードする遺伝子を *aipA* (AoAbp1 interacting protein) と名付けた。RACE 解析により *aipA* 全長をクローニングした結果, AipA は 784 アミノ酸から構成されると予想された。また, モチーフ検索の結果, AipA は C 末端付近に AAA ATPase ドメインを持ち, N 末端付近に coiled-coil 領域を持つと推定された。AipA の細胞内局在を解析するため, EGFP-AipA および AoAbp1-mDsRed 発現株を作製したところ, それらは共局在したことから, AipA がエンドサイトーシスにおいて機能している可能性が示唆された。現在, AipA と AoAbp1 の *in vitro* および *in vivo* の相互作用解析や, *aipA* 破壊株等の取得による AipA の機能解析を進めている。

1) 樋口裕次郎ら、第 8 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p. 50

Exploration of components related to endocytosis in *Aspergillus oryzae*

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

P-24 (O-9)

Aspergillus nidulans のキチン合成酵素 CsmA の菌糸内局在化における微小管の役割

對崎真楠, 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, その合成は形態形成, 分化に重要な役割を持つ。*A. nidulans* には, クラス V に属するキチン合成酵素をコードする遺伝子 *csmA* が存在し, 菌糸型の生育を示す真菌類にのみ存在する。これまでに, CsmA は菌糸先端のアクチン近傍に局在し, その正常な局在にアクチンとの相互作用が必要であることが示されているが¹⁾, 菌糸先端への局在化機構は不明である。そこで今回, 野生型 CsmA の代わりに EGFP-CsmA を発現する株を用いて菌糸先端への局在化における微小管の役割について解析した。微小管重合阻害剤である benomyl 処理により, 菌糸先端における CsmA の局在は大部分が拡散するかあるいは菌糸先端の一部にドット状に観察された。また微小管系モータータンパク質であるキネシンをコードするいくつかの遺伝子の単独破壊株においても benomyl 処理の場合と同様に菌糸先端における CsmA の局在異常が観察された。更に, 微小管上に結合したままとなる変異型キネシン mRFP-KinA^{rigor}²⁾ と EGFP-CsmA を同時に発現する株を用いて微小管との局在比較を行なったところ, 菌糸先端以外にも, 先端から後方の菌糸内において mRFP-KinA^{rigor} の局在する微小管上に EGFP-CsmA の局在が観察された。これらの結果から, CsmA の菌糸先端への局在化には微小管と一部のキネシンが関与することが示唆された。

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

2) Zekert, N. and Fischer, R., (2009) Mol. Biol. Cell, **20**: 673-684

The roles of microtubule in the localization of chitin synthases, CsmA, in *Aspergillus nidulans*

Makusu Tsuizaki, Hiroyuki Horiuchi, and Akinori Ohta. (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-25

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の *pkcA* 遺伝子の分生子形成における機能

片山琢也, 内田博教, 堀内裕之, 太田明徳 (東大院・農生科・応生工)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の分生子形成は, *brlA* 遺伝子の転写が活性化する事により誘導されるが, *brlA* 遺伝子の転写は数種の遺伝子を介したシグナル伝達経路により制御されていることが示されている。これまで当研究室では, 糸状菌 *A. nidulans* における PKC ホモログをコードする *pkcA* 遺伝子の機能解析を目的として *pkcA* 温度感受性株が作製され, その性質の解析が行われている。その中で *pkcA* 温度感受性株は完全培地上, 42°Cでは生育できず, 37°Cでは菌糸生長は野生株の 70~80%であるのに対して分生子形成が著しく阻害されることが示されていた¹⁾。今回, この *pkcA* 温度感受性株の制限温度下における *brlA* 遺伝子, BrlA によって転写が制御される *abaA* 遺伝子の転写量をリアルタイム RT-PCR 法を用いて定量したところ, *pkcA* 温度感受性株では野生株と比較して *brlA*, *abaA* の転写量が著しく低下しており, PkcA が *brlA* 遺伝子の転写活性化に必要な機能を有することが示唆された。さらに, *pkcA* が温度感受性で, BrlA より上流で分生子形成を負に制御するタンパク質をコードする *sfgA* 遺伝子が欠失した株を作製したところ, 37°Cにおける分生子形成抑制の表現型が抑圧されなかった。これらのことから, PkcA は分生子形成に関して *brlA* の上流, SfgA の下流で機能することが示唆された。

1) 内田ら, 日本農芸化学会 2008 年度大会講演要旨集, p. 80

Functional analysis of *pkcA* in the morphogenesis of *Aspergillus nidulans*

Takuya Katayama, Hirotaka Uchida, Hiroyuki Horiuchi, and Akinori Ohta (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-26

糸状菌 *Aspergillus nidulans* における *Saccharomyces cerevisiae* *CHS4* オルソログの機能解析

西出品, 對崎真楠, 堀内裕之, 太田明徳 (東大院・農生科・応生工)

菌類のキチン合成酵素はその構造から 7つのクラスに分類されるが, *S. cerevisiae* のキチン合成酵素 Chs3p はクラスIVに属し, 出芽や細胞質分裂時の一次隔壁形成に必要な細胞壁中のキチン合成の大部分を担っている。Chs3p の正常な局在化と機能には多数の因子が関わっており, Chs4p は, Chs3p を bud neck のセプチンリングヘリクルートする働きとともに, Chs3p の制御サブユニットとしての機能することが示されている。*A. nidulans* には, *CHS4* のホモログ遺伝子が 3つ存在する (*AN1554.3*, *AN3445.3*, *AN8765.3*)。*A. nidulans* の 7つのクラスのキチン合成酵素のうち, クラスIV, V, VIに属するものはそのキチン合成酵素ドメインのハイドロパシープロファイルに類似性が見られることから, *A. nidulans* における *CHS4* オルソログ遺伝子は, クラスV, VIのキチン合成酵素 (CsmA, CsmB) の機能にも関与する可能性が考えられる。

本研究では, A1145株 ($\Delta nkuA$)を親株として, *AN1554.3*, *AN3445.3*, *AN8765.3* の推定上の ORF 全長をそれぞれマーカー遺伝子により置換した破壊株を作製した。*AN1554.3* 破壊株, *AN8765.3* 破壊株については, 野生型株と比較して顕著な表現型の異常は観察されず, 野生型株と同程度の生育速度であったが, キチン結合色素 Calcofluor white を添加した固体培地上では野生型株と比較して生育遅延が見られた。一方, *AN3445.3* 破壊株については, 野生型株と比較して菌糸の多分岐や湾曲, 生育遅延が観察され, Calcofluor white を添加した固体培地上では野生型株と比較して生育速度が早かった。これらの結果から, これら 3つの遺伝子は細胞壁合成に関与した機能を持つことが示唆された。

Functional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* *CHS4* orthologs in *Aspergillus nidulans*

Aki Nishide, Makusu Tsuizaki, Hiroyuki Horiuchi, and Akinori Ohta (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-27

麹菌 *A. oryzae* における小胞体関連分解 (ERAD) 関連遺伝子 *Aohtm1*, *Aoyos9* の機能解析

菊間隆志¹, 北本勝ひこ², 伊藤幸成¹ (¹理研・基幹研, ²東大院・農生科・応生工)

小胞体には分泌タンパク質のアスパラギン結合型糖鎖を介した品質管理機構が存在し、正常にフォールディングされた分泌タンパク質は分泌経路の次のステップであるゴルジ体に輸送される。しかし、フォールディングが正常に行われなかった分泌タンパク質は、小胞体関連分解 (ER associated protein degradation: ERAD) と呼ばれるプロテアソームを介した分解機構により分解される。*S. cerevisiae* の *htm1* および *yos9* は小胞体関連分解に関与する遺伝子であり、*Htm1p* および *Yos9p* は小胞体内腔に存在し、糖鎖を認識するレクチン活性を介して効率的な小胞体関連分解に寄与していると考えられている。本研究は、麹菌における分泌タンパク質の品質管理機構解明の一環として、*htm1* および *yos9* の *A. oryzae* におけるホモログ遺伝子 *Aohtm1* および *Aoyos9* の機能解析を目的とする。

A. oryzae のゲノムデータベースより *htm1* および *yos9* のホモログ遺伝子を探索し、*A. oryzae* RIB40 株より 3, 444 bp の *Aohtm1* および 1, 639 bp の *Aoyos9* を単離した。*Aohtm1* は4個のイントロンを有し、974残基のアミノ酸をコードすると推測された。また mannosidase homology domain (MHD)が高度に保存されていた。*Aoyos9* は1個のイントロンを有し、522残基のアミノ酸をコードすると推測された。C末にはER retention signalが存在した。これらの遺伝子に *egfp* を融合し、*AoHtm1*-EGFP および *AoYos9*-EGFP を発現する株をそれぞれ取得し局在解析を行ったところ、小胞体と考えられる構造体に局在することが観察された。現在、*Aohtm1* および *Aoyos9* の破壊株を作成中であり、破壊株の表現型解析を行う予定である。

Functional analysis of ER associated protein degradation (ERAD)-related genes, *Aohtm1* and *Aoyos9*, in *Aspergillus oryzae*

Takashi Kikuma¹, Katsuhiko Kitamoto², Yukishige Ito¹ (¹RIKEN, ²Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-28

麹菌のタンパク質品質管理機構における hyperglycosylation の役割

小野崎保道, 城大介, 横田淳一, 五味勝也, 新谷尚弘 (東北大・生物産業創成)

【目的】高いタンパク質分泌能を有する麹菌は異種タンパク質生産宿主として期待されている。しかし、カビ由来のタンパク質を発現させた場合に比べ、高等動植物由来のタンパク質の生産性は著しく低いという問題を抱えている。その一因として異種タンパク質が宿主の品質管理機構により異常分泌タンパク質として認識され、細胞内で分解を受けることが考えられる。本研究室では、*Aspergillus saitoi* 由来 1,2- α -mannosidase (MsdS) の443番目のCysをPheに変異させた変異型 MsdS (C443F-MsdS) をモデル基質とし、麹菌のタンパク質品質管理機構を解析してきた。これまで、①生理的な発現条件下では C443F-MsdS は小胞体関連分解により分解を受ける、②過剰発現条件下では C443F-MsdS は分泌されるが、変異型 MsdS 特異的に hyperglycosylation を受け、さらに Unfolded protein response を誘導することが明らかにされた。そこで本研究では、麹菌のタンパク質品質管理機構と hyperglycosylation の関係を調べることを目的とした。

【方法・結果】Hyperglycosylationに関わると考えられる *ochA* 及び *ochB* 遺伝子の破壊株を作製した。*ochA* 破壊株においては hyperglycosylation がわずかに抑えられていたが、*ochB* 破壊株では野生型と糖鎖修飾の程度に差は見られなかった。更に、MsdS に存在する8つの推定N型糖鎖付加部位のAsnをそれぞれGlnに置換したN型糖鎖付加部位変異体を作製し、麹菌で過剰発現させた。現在、取得した株におけるMsdS分泌量や糖鎖付加様式の変化について解析を行っている。

The role of hyperglycosylation in protein quality control mechanism in *Aspergillus oryzae*

Yasumichi Onozaki, Daisuke Shiro, Jun-ichi Yokota, Katsuya Gomi, Takahiro Shintani (Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

P-29

糸状菌の細胞壁ストレスセンサータンパク質の機能解析

二神泰基¹, 城戸弥生¹, 大森俊郎², 後藤正利¹ (¹九大院・農 ²三和酒類フロンティア研)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の O 型糖鎖合成に関わる糖転移酵素遺伝子の破壊株は、異常な形態を示す。その原因のひとつとして、O-グリコシルーションを受けるタンパク質の機能低下によって正常な細胞壁が形成されていないためであることが推定された。そこで、本研究は、細胞壁の維持に関わる標的基質タンパク質候補として cell wall integrity 経路の細胞壁ストレスセンサータンパク質 (WscA および WscB) の機能解析を行った。まず、ウェスタン解析の結果、WscA と WscB は細胞膜に局在することが明らかになった。また、糖転移酵素遺伝子の破壊株である $\Delta pmtA$ 株および $\Delta pmtC$ 株において WscA は分解を受けて分子量が低下した。したがって、WscA は PmtA および PmtC によって O 型糖鎖が付加されることが示唆された。次に、 $\Delta wscA$ 株は低浸透圧条件下で生育が抑制され、浸透圧ストレスに対する感受性が増大したが、 $\Delta wscB$ 株は低浸透圧条件下においても野生株と同様に生育した。よって、WscA は浸透圧ストレスに対する主要なセンサーとして機能していると推定された。さらに、リアルタイム RT-PCR の結果、野生株において *wscA* の転写量は *wscB* よりも約 2 倍高かった。また、野生株において *wscA* および *wscB* 遺伝子は β -1,3-グルカン合成阻害剤であるミカファンギンの添加により転写量が增大した。よって、*wscA* および *wscB* 自身の転写もストレス応答によって制御されることが示唆された。

Functional analysis of cell wall integrity sensors from *Aspergillus nidulans*.

Taiki Futagami¹, Yayoi Kido¹, Toshiro Omori², Masatoshi Goto¹

(¹Faculty of Agriculture, Kyushu Univ. ²Sanwa Shurui, Co. Ltd.)

P-30

アカパンカビのストレス応答シグナル伝達経路の概日リズムやアミノ酸代謝への関与

山下和宏, 高橋正和, 石川智子, 亀井誠之, 藤村真 (東洋大・生命科)

糸状菌のヒスチジンキナーゼ-MAP キナーゼカスケード経路は、浸透圧ストレスに応答するシグナル伝達経路である。アカパンカビでは、MAP キナーゼ (OS-2) の下流で cAMP 応答配列に結合する転写因子 ATF-1 が制御されている。ATF-1 は、分生子特異的に発現するカタラーゼ (*cat-1*) や clock-controlled gene (*ccg-1*) などの発現を制御している。このことから、ストレス応答シグナル伝達経路は、浸透圧ストレス応答だけでなく、分生子形成などの広範な生命現象に影響する可能性がある。

OS-2 の活性化によって発現変動する遺伝子のマイクロアレイ解析から、OS-2 依存的に制御される遺伝子のうち、約 65% は ATF-1 によって制御されることが明らかになった。ATF-1 非依存的に誘導される遺伝子について調べたところ、概日リズムによって制御される *ccg-13*, *ccg-14* が誘導されていた。これらの遺伝子は、MAPK キナーゼ (OS-5) の変異株で、概日リズムに伴う発現量が顕著に低下する。GFP をレポーター遺伝子として *ccg-13* のプロモーターアッセイを行ったところ、プロモーター領域の欠損によって無処理区で *gfp* が構成的に発現した。このことから、ATF-1 非依存的に誘導される遺伝子群を制御する転写因子は、リプレッサー型である可能性が示唆された。また、ATF-1 非依存的に抑制される遺伝子について調べたところ、アミノ酸代謝に関わる遺伝子群が抑制されていた。これらの遺伝子発現を制御する転写因子 CPC-1 の発現解析を行ったところ、OS-2 の活性化によって発現が抑制されていた。これらのことから、ストレス応答シグナル伝達経路は、分生子形成だけでなく、概日リズムやアミノ酸代謝に関わることが示唆される。

Involvement of stress-activated MAP kinase in circadian rhythm and amino acid metabolism in *Neurospora crassa*.

Kazuhiro Yamashita, Masakazu Takahashi, Tomoko Ishikawa, Masayuki Kamei, Makoto Fujimura

(Life Sci., Toyo Univ.)

P-31

麴菌(*A.oryzae*)のヒストン脱アセチル化関連遺伝子破壊株の解析

河内護之¹, 西浦未華¹, 岩下和裕^{1,2}, 山田修² (1 広島大, 2 酒総研)

麴菌は、環境条件によって遺伝子の発現パターンを変化させることで周辺状況に適応することが明らかとなっている。これまでの研究で、固体培養を模倣したメンブレプレート培養及び液体培養における高浸透圧条件への適応について麴菌 DNACHIP を用いて網羅的に発現解析を行った結果、ヒストンアセチル化遺伝子 (HAT)、ヒストン脱アセチル化遺伝子 (HDAC) と、それらの関連遺伝子の発現変化が認められた。ヒストンの修飾は、真核生物では、遺伝子発現制御、細胞分裂などを通して、生育そのものに重要な役割を果たすとともに、様々なストレス応答に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。このことから、麴菌においてもヒストン修飾遺伝子は同様に生育や形態形成、浸透ストレスなどの培養環境応答において重要な役割を果たすことが想定される。

そこで、ヒストン修飾の培養環境応答への影響について解析するため、NSR- Δ LD2 株(*niaD*⁻, *sC*⁻, *adeA*⁻, *ligD*⁻) を用い全ての HDAC 遺伝子破壊株を作成し解析を行った。その結果、遺伝子破壊株の中には、分生子形成や気中菌糸形成、生育などの形態異常が見られる株が認められた。また、破壊を試みた HDAC の内一つは、ヘテロカリオンしか確認されず致死遺伝子である可能性が示唆された。同時に、スライドカルチャーにより、HDAC 破壊によって菌糸の分岐や隔壁形成などに及ぼす影響があることを明らかにした。さらに、浸透圧ストレスの付与により、一層の生育不全を示す株がある一方、分生子形成が回復する株などが認められた。

現在、酸化ストレス、低酸素条件下など、他のストレスについても同様に解析を行い、ヒストン修飾遺伝子と培養環境応答についての体系的な解析を行っている。

Analysis of the histone deacetylases and its associated genes disruptants of *Aspergillus oryzae*.

Moriyuki Kawauchi¹, Mika Nishiura¹, Kazuhiro Iwashita^{1,2}, Osamu Yamada² (1 Hiroshima Univ., 2 NRIB)

P-32

麴菌アクアポリン AoAQP1b の機能解明

田中大介, 劉成偉, 松本直, 福元達也, 岩崎郁子, 北林 強, 北川良親 (秋田県立金足農業高校, 秋田県大・生物資源科学部)

アクアポリンは、細胞内外の水透過性および物質透過性に関与する膜タンパク質である。近年、*Aspergillus oryzae* の EST データベースが構築され、麴菌においてもアクアポリン遺伝子が見出された。麴菌アクアポリンの機能解明は発酵・醸造技術への応用可能性を秘めた有益な知見と考えられる。本研究では、*Aspergillus oryzae* RIB40 株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。我々は、4 種類のアクアポリン遺伝子を単離し、各アクアポリン分子の水透過性を評価するため、単離した遺伝子を鋳型に cRNA を作成し *Xenopus oocyte* による swelling assay をおこなった。その結果、AoAQP1b のみが高い水透過性を示した。今後、培養方法、ステージの違いによる遺伝子発現量の変化、細胞内局在性解析ならびに AoAQP1b 過剰発現株を用いた解析について検討予定である。

Characterization of aquaporins in *Aspergillus*

Daisuke Tanaka, Cheng Wei Liu, Tadashi Matsumoto, Tatsuya Fukumoto, Ikuko Iwasaki, Tsuyoshi Kitabayashi, Yoshichika Kitagawa

(Kanaashi Agricultural High School, Akita Pref., Faculty of Bioresource Sciences, Akita Pref. Univ.)

P-33

麹菌におけるエキソソーム構成サブユニット遺伝子破壊株の造成

田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

エキソソームは 3'→5' RNA 分解複合体であり、全ての真核生物において保存されている。真核生物のエキソソームは 9 個の異なるサブユニットによってリング状のコア構造を形成していることが明らかとなっており、出芽酵母においてはこれら 9 個のサブユニットの遺伝子破壊株はいずれも致死性を示すことが報告されている。一方、シロイヌナズナにおいては、9 個のサブユニットのうち、Rrp4 と Rrp41 の遺伝子破壊株は致死的な表現型を示すのに対し、Csl4 (Ski4) の遺伝子破壊株は生育への影響が観察されないことが報告されている。このことから、個々のエキソソーム構成因子の機能が生物種間において異なる可能性が考えられる。糸状菌においてはエキソソームについての知見が全く報告されていないことから、麹菌におけるエキソソーム遺伝子破壊株の造成を試みた。

麹菌において Rrp4 と Csl4 の遺伝子破壊株の取得を試みた結果、Csl4 については遺伝子破壊株が取得でき、その遺伝子破壊株では生育への影響は観察されなかった。一方、Rrp4 については遺伝子破壊株が取得出来なかったため、5'-非翻訳領域に存在するリボスイッチにより発現量が制御される *nmtA* (N-myristoyl transferase ホモログ) のプロモーターを用いたコンディショナル *rrp4* 遺伝子発現抑制株を構築した。その結果、リボスイッチにより *nmtA* 発現量が抑制されるチアミン存在条件下において *rrp4* 遺伝子発現抑制株の生育が著しく抑制された。以上の結果から、麹菌におけるエキソソーム構成因子の機能は出芽酵母よりも植物に類似している可能性が示された。

Construction of the disruptants for exosome subunit encoding genes in *Aspergillus oryzae*.

Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-34

麹菌 *A. oryzae* における接合型遺伝子置換株の作製と有性世代の探索

和田 龍太, 山口 悠, 田鍋 康子, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】*A. oryzae* は有性世代が見つからないが、ゲノム配列の解析により有性生殖関連遺伝子をもつことが明らかになっている。そのうち、接合型遺伝子である *MAT* がコードするタンパク質は転写調節因子として働き、有性生殖関連遺伝子の発現を制御することが知られている。*A. oryzae* は株によって異なる接合型遺伝子 *MAT1-1* または *MAT1-2* を有することから、ヘテロタリックな有性生殖をおこなう可能性が示唆されている。しかし、*A. oryzae* においてこれらの接合型遺伝子が機能しているかどうかは明らかになっていない。本研究では、接合型遺伝子置換株を作製し、異なる接合型間での有性生殖についての解析を試みた。

【方法と結果】ゲノム解析に用いた RIB40 株は *MAT1-1* 型であり、その *MAT1-1* 遺伝子を *MAT1-2* 型である AO6 株の *MAT1-2* 遺伝子に置換した株を作製した。接合型遺伝子の置換は、*pyrG* を用いたマーカーリサイクリング法により行った。 α -フェロモン前駆体遺伝子 *AoppG* の発現を RT-PCR によって調べた結果、*MAT1-1* 型株と比較して *MAT1-2* 型株での転写産物量が減少していることがわかった。DNA マイクロアレイにより網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、その他にもそれぞれの接合型株によって発現が変動した遺伝子が多数見つかった。現在、*MAT1-1* 型株および作製した *MAT1-2* 型株を用いて有性生殖実験を行っている。

Attempts to identify sexual cycle by replacement of the mating type gene in *Aspergillus oryzae*

Ryuta WADA, Haruka YAMAGUCHI, Yasuko TANABE, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO

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

P-35

麹菌 *A. oryzae* AoSO タンパク質のストレス応答性の蓄積機構に関する解析

佐伯 圭、牧野 雄也、Christopher Sarazar ESCAÑO、丸山 潤一、北本 勝ひこ（東大院・農生科・応生工）

【目的】SO/Pro40は糸状菌に特異的に存在するタンパク質であり、有性生殖や細胞融合に関与することが報告されている。麹菌 *Aspergillus oryzae* もこれと相同性を有するタンパク質 AoSO をもち、当研究室において AoSO がストレスに応答して短時間で隔壁孔に蓄積することを明らかにした。このことから、なんらかの細胞内シグナル伝達経路が AoSO タンパク質に速やかに作用している可能性が考えられた。しかし、AoSO のどの領域がストレスに応答した蓄積に必要なのかはわかっていない。AoSO は 1195 アミノ酸からなる巨大なタンパク質であり、*A. oryzae* において一つ一つの変異体を発現させるのは手間がかかる。そこで本研究では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に AoSO-EGFP 融合タンパク質やその変異体を発現させることにより、ストレス応答性の局在変化を観察した。

【方法及び結果】まず *S. cerevisiae* での発現のために、*A. oryzae* より *Aoso* 遺伝子の cDNA を取得した。これと *egfp* 遺伝子を融合したのち、*S. cerevisiae* 用発現プラスミドに挿入した。作製したプラスミドを *S. cerevisiae* YPH499 株に導入し、形質転換体を蛍光顕微鏡により観察した。その結果、細胞質に緑色の蛍光が観察された。また、低温および高温の温度ストレスにより、AoSO-EGFP タンパク質は点状の構造として蓄積するのが観察された。このことから、*S. cerevisiae* でも AoSO が蓄積するための機構が備わっていることが示唆された。さらに、AoSO がストレスに応答して蓄積するのに必要な領域を調べるため、様々な欠失変異体を作製し、*S. cerevisiae* において EGFP 融合タンパク質として発現した。現在、各種変異体がストレス条件下で蓄積するかどうかを調べている。

Deletion analysis of *A. oryzae* AoSO protein for a study on its accumulation mechanism in response to stresses

Kei SAEKI, Yuya MAKINO, Christopher Sarazar ESCAÑO, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO
(Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-36

麹菌 *Aspergillus oryzae* における Fus3 ホモログの機能解析

佐々木 智江美、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】Fus3 は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の接合フェロモンシグナル伝達経路で働く MAP キナーゼであり、*A. oryzae* は Fus3 ホモログ (AoFus3) を有している。しかし、*A. oryzae* において有性世代が発見されていないため、AoFus3 の機能は未知である。本研究では、AoFus3 の機能および局在解析を行うことで、その生理的役割の解明を目的とした。

【方法・結果】*Aofus3* 遺伝子破壊株および AoFus3-EGFP を *Aofus3* 遺伝子座で発現する株を作製した。AoFus3-EGFP 発現株を蛍光顕微鏡で観察したところ、意外なことに、AoFus3-EGFP が、菌糸先端や核の他に隔壁孔付近に局在することを見出した。また、*Aofus3* 遺伝子破壊株に低浸透圧ショックを与え、菌糸先端の溶菌を誘導したところ、隣接する細胞の溶菌の伝播を防ぐ割合が野生株と比べて有意に減少した。真正子嚢菌綱に属する糸状菌が特異的にもつオルガネラ Woronin body が、菌糸損傷時において、溶菌の伝播を防ぐことは以前から知られているが、AoFus3 がこの過程に関与することを示したのは初めてである。現在、リン酸化部位に変異を導入した AoFus3 発現株およびキナーゼ不活性型 AoFus3 発現株を解析することで、AoFus3 の機能や局在における MAP キナーゼ活性の役割を調べている。

Functional analysis of the Fus3 homolog in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*.

Chiemi SASAKI, Yasuko TANABE, Kentaro IWASAKI, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO
(Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-37 (O-20)

トランスクリプトーム配列データベースを用いた *Phanerochaete chrysosporium* の全分泌タンパク質 (セクレトーム) 解析

堀 千明, 五十嵐圭日子, 片山 映¹, 鮫島正浩 (東大院・農生科, ¹日医大・一生化)

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* は, バイオマスを炭素源として成長するときに, 様々なタンパク質を菌体外に生産する。それら分泌タンパク質のうち主要な酵素に関してはすでに精製され, アミノ酸配列や活性などの情報が得られているが, 依然として数多くの未知タンパク質が生産されていると予想される。しかしながら, 本菌の全ゲノム配列情報およびそこから *in silico* アノテーションによって抽出された全推定タンパク質の配列を用いたプロテオーム解析では, 主に他生物種における既知タンパク質のホモログのみが同定され, 担子菌に特有なバイオマス変換酵素などの同定は難しい。

そこで我々は, 12 種類のバイオマスを用いて本菌を培養し, 抽出して得られた mRNA から作製された cDNA ライブラリーをノーマライズ化・サブトラクション化し, 大規模シーケンサ (454 GS FLX Titanium) に供してトランスクリプトーム配列情報を得ると共に, 本データベースを用いて全分泌タンパク質 (セクレトーム) 解析を行った。その結果, セルロース分解性培地中に, これまで本菌の全ゲノム配列や全推定タンパク質データベースでは同定できなかった糖質加水分解酵素ファミリー45 に属するエンドグルカナナーゼ (Cel45A) が同定されたことから, 本手法が既知タンパク質とは相同性が低いバイオマス変換酵素を探索・同定することに適していることが示された。

Secretome analysis of *Phanerochaete chrysosporium* using transcriptomic sequence database

Chiaki Hori, Kiyohiko Igarashi, Akira Katayama¹, Masahiro Samejima

(Dept. Biomat. Sci., Univ. of Tokyo, ¹Dept. Biochem. Mol. Biol., Nippon Medical School)

P-38

麹菌の液体培養初期におけるタカアミラーゼ吸着阻害因子の探索

佐藤宏樹, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

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, 培養後期において培養上清中のタカアミラーゼが菌体表面の細胞壁へ”吸着”することにより, 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。麹菌細胞壁をアルカリ溶液や酵素処理を用いて分画することで, この吸着現象の原因因子が細胞壁構成多糖のキチンであると同定した¹⁾。しかし, キチンは細胞壁を構成する主要な多糖であるため, 培養の時期を問わず細胞壁中に存在しており, 培養前期の細胞壁画分では吸着能が見られない現象の説明が困難である。そこで, 培養前期の細胞壁画分のアルカリ処理を行ったところ吸着能が現れたことから, 培養前期においては細胞壁画分の吸着能を阻害する因子の存在が示唆された。弱アルカリ処理を行うことにより吸着能が現れることから, 弱アルカリ処理により細胞壁画分から除かれる, 可溶性タンパク質やアルカリ可溶性多糖が吸着阻害因子と考えられる。本発表では, 弱アルカリ処理以外の方法によって処理した細胞壁画分を調製し, 吸着能への影響を比較解析し, 阻害因子の同定を試みた結果について報告する。

1) 佐藤ら, 日本農芸化学会 2009 年度大会要旨集, p. 250

Search for the factor(s) preventing Taka-amylase adsorption at early-phase of submerged cultivation in *Aspergillus oryzae*

Hiroki Sato, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-39

麹菌 hydrophobin RolA が cutinase CutL1 と相互作用する際の Lys34 の役割

上原健二¹, 高橋徹¹, 村垣公英², 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
(¹東北大・未来研¹, ²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、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)を唯一の炭素源として液体培地で培養すると、cutinase CutL1 と hydrophobin RolA を発現する。RolA は PBSA の表面に吸着して CutL1 をリクルートする事で、CutL1 を濃縮し、分解を促進している 1)。我々は以前に RolA の His32 が CutL1 と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 2)。しかし、CutL1 との相互作用は RolA の His32 を遺伝子工学的に置換、または化学修飾しても、完全になくなることはなく、His32 以外にも CutL1 と相互作用するアミノ酸残基の存在が示唆された。N 末端の His32 の正電荷が重要であることから、His32 付近に存在する正電荷アミノ酸を探索した。Lys34 が CutL1 との相互作用に関与する可能性が推測され、この Lys34 をセリン残基に置換することで His32 置換体と同程度 CutL1 の結合量が減少し、His32 と Lys34 を同時に置換することでは CutL1 との結合量がさらに減少した。以上の結果より、RolA の His32 と Lys34 はそれぞれ CutL1 との結合に関与しているが、近傍に存在することで多価効果を生み出し、CutL1 との結合をより強固にしていることが示唆された。

1)Takahashi *et al. Mol. Microbiol.* 57:1780-1798 (2005)

2)上原ら、第 8 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p.34

Lys34 of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA is important for RolA-cutinase CutL1 interaction.

Kenji Uehara¹, Toru Takahashi¹, Kimihide Muragaki², Hiroshi Maeda², Youhei Yamagata², Fumihiko Hasegawa¹, Katsuya Gomi¹, Keietsu Abe¹ (NICHe.,Tohoku Univ.¹, Grad.Sch.,Tohoku Univ.²)

P-40

麹菌 *Aspergillus oryzae* の中性セラミダーゼオルソログの機能解析

多田 功生¹, 大口 ひかる¹, 松下(森田) 真由美¹, 鈴木 聡¹, 楠本 憲一¹, 柏木 豊²(¹食総研, ²東京農大・応生・醸造)

(目的) セラミドはスフィンゴイド塩基と脂肪酸からなる真核生物の細胞膜を構成する脂質の一種であるだけでなく、セラミド自身とその代謝産物が、アポトーシス、細胞の増殖・分化、ストレス応答などに関与するシグナル伝達物質として機能していることが近年明らかとなってきている。セラミダーゼ(EC 3.5.1.23)はセラミドをスフィンゴイド塩基と脂肪酸に加水分解する酵素であり、中性セラミダーゼはシグナル伝達に関与していることが示唆されている。中性セラミダーゼはバクテリアからヒトまで幅広く存在することが知られているが、真菌ではその存在が明らかにされていなかった。我々は、麹菌*Aspergillus oryzae*ゲノムデータベースから、ヒト中性セラミダーゼに相同性を示す蛋白質をコードする遺伝子*asahA* (AO090001000449)を見出し、その遺伝子産物の性質を明らかにすることを目的とした。

(方法と結果) *asahA* 過剰発現株を作成し、その培養上清から酵素を精製した。精製した *AsahA* の分子量は約 95 kDa、至適 pH は 4.0~4.5、至適温度は 40°Cであった。また、*A. oryzae* に多く含まれるフィトセラミドに対してほとんど活性を示さず、ほとんど含まれないとされているセラミドに対して強い活性を示した。本研究は、生研センター異分野融合研究支援事業の一環として行われたものである。

Characterization of a neutral ceramidase orthologue from *Aspergillus oryzae*

Sawaki Tada¹, Hikaru Ohkuchi¹, Mayumi Matsushita-Morita¹, Satoshi Suzuki¹, Ken-Ichi Kusumoto¹, Yutaka Kashiwagi² (¹Natl. Food Res. Inst., ²Dept. of Ferment. Sci., Tokyo Univ. of Agric.)

P-41

Aspergillus oryzae 由来クロロゲン酸特異的加水分解酵素

見原好治, 村山哲也, 塩野義人, 小関卓也 (山形大・農)

天然に存在するフェルラ酸, カフェ酸等の桂皮酸類はエステルとして植物中に存在し, フェルラ酸は細胞壁に, カフェ酸は各種誘導体として存在し, その一つクロロゲン酸 (5-O-カフェオイルキナ酸) はコーヒー豆に多く含まれる。これらフェノール酸は抗酸化性, 生活習慣病の予防・改善効果など生理活性を有することが報告されており, 食品素材, 飼料素材, 化粧品素材などへの応用が期待されている。一部のフェルラ酸エステラーゼはタンナーゼファミリーに分類され, クロロゲン酸ヒドロラーゼとともにサブファミリーを構成しているが, これらタンナーゼファミリーに属する酵素の特異性, 酵素タンパク質構造, 触媒機構など分子機構については明らかになっていない。本研究は, 麹菌のゲノム情報を活用し, フェノール酸エステル加水分解酵素の X 線結晶構造解析による分子機構解明, 立体構造情報に基づく酵素機能改変, 機能素材の開発を目的とした。

糸状菌ゲノム情報により, 既知のフェルラ酸エステラーゼ, タンナーゼ, クロロゲン酸ヒドロラーゼとは異なるサブファミリーを確認した。その中に *Aspergillus oryzae* 由来の BAE59141 および BAE61730 が含まれ今回 BAE59141 タンパク質の特徴付けを行った。*Pichia pastoris* を用いてタンパク質を生産させ, 精製酵素を用いて検討したところ, フェルラ酸エステラーゼの基質に用いられる種々のフェノール酸メチルおよびタンナーゼの基質に用いられる 3,4,5-トリヒドロキシ安息香酸メチルに対する活性はなく, クロロゲン酸に対してのみ活性を示し, AoCGSH と名付けた。既知のフェルラ酸エステラーゼやクロロゲン酸ヒドロラーゼは広い基質特異性を示すが, AoCGSH はクロロゲン酸特異的に作用するユニークな特徴を有した。

Characterization of a chlorogenate specific hydrolase from *Aspergillus oryzae*

Koji Mihara, Tetsuya Murayama, Yoshihito Shiono, Takuya Koseki

(Dept. of Bioresour. Engineer., Univ. of Yamagata)

P-42

Aspergillus aculeatus 由来 β -glucosidase 1, carboxymethylcellulase 1 へのセルロース結合ドメイン付加

尾山真一, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科・応生科)

A. aculeatus は *Trichoderma* 属のセルラーゼと強い相乗作用を示し, 天然セルロースの糖化に有用なセルラーゼを生産する株として当研究室で単離された。*A. aculeatus* の β -glucosidase 1 (BGL1) は比較的重合度の高いオリゴ糖にも作用し, グルコースのみを生成する。また, carboxymethylcellulase 1 (CMC1) はセルロース結合ドメイン (CBD) を持たないエンドグルカナーゼであり, 最も発現量が多い。これらに CBD を付加することにより, 不溶性セルロースに対する親和性の向上が期待される。そこで, 本研究ではより効率的なバイオマスの糖化を目指し, BGL1, CMC1 に CBD を結合させ, より重合度の高い基質へ分解能を付与する事を目的とした。両酵素の C 末端に *A. aculeatus* の cellobiohydrolase 1 由来の CBD を, リンカーを介して結合させ *A. oryzae* で高発現させた。精製後, CBD を BGL1 に結合させたものについてアルカリ膨潤セルロース (ASC) への吸着や分解活性を調べたところ, ASC への吸着と分解能の向上が確認された。さらに, 同 CBD を CMC1 の C 末端に結合させたものについても検討を行ったところ, ASC や不溶性セロオリゴ糖に対する分解活性の向上が確認された。今後はこれら CBD を結合させた酵素について酵素学的諸性質を検討していく予定である。

Improvement of *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase 1 and carboxymethylcellulase 1 by adding a cellulose-binding domain.

Shin-ichi Oyama, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi (Dept. Life Env. Sci., Osaka Pref. Univ.)

P-43

Aspergillus aculeatus 由来 *cbhII* 型セルラーゼ遺伝子のクローニングと高発現

内藤 篤, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生命・応生科)

セロビオヒドロラーゼ (CBH) は、結晶性セルロースを二糖単位で還元末端側から加水分解する CBHI 型と、非還元末端側から加水分解する CBHII 型に分類される。本研究では *A. aculeatus* *cbhII* 遺伝子をクローニングし、その発現産物の酵素化学的諸性質を検討することを目的としている。クローニングした *A. aculeatus* *cbhII* は、4 つのイントロンに分断された 1410 bp の ORF からなり、N 末端側に Carbohydrate binding module (CBM1)、C 末端側に触媒ドメイン (Glycosyl hydrolase family 6) を持つ推定分子量 48,883 のタンパク質をコードしていた。触媒ドメインは他の *Aspergillus* 属の CBHII と 80% 以上の相同性を示しており、加水分解反応においてプロトン供与体となる Asp が保存されていた。*cbhII* を糸状菌用高発現ベクター pNAN8142 を用いて *A. oryzae* で高発現させた結果、培養 3 日目の培養上清に糖鎖修飾を受けたと考えられる約 70 kDa の CBHII が分泌されていることが観察され、不溶性セロオリゴ糖、アルカリ膨潤セルロースに対する活性が認められた。今後は CBHII を精製し、基質特異性、最適温度、最適 pH などの詳細な酵素化学的性質を検討する予定である。

Cloning and high expression of a *cbhII*-type cellulase gene from *Aspergillus aculeatus*.

Atsushi Naito, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi (Dept. Life & Env. Sci., Osaka Pref. Univ.)

P-44

Aspergillus aculeatus 由来 β -グルコシダーゼ 3 遺伝子の *A. oryzae* における発現

難波麻美, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大・生環科・応生科)

セルラーゼ生産菌 *A. aculeatus* は少なくとも 3 種類の β -グルコシダーゼ (BGL1, BGL2, BGL3) を培養上清中に分泌する。このうち BGL1 と BGL2 はアイソフォームであると考えられており、既に遺伝子も単離され詳細な解析も行われている。しかし BGL3 については遺伝子が単離されただけで詳細な解析は行われていない。そこで本研究では *bgl3* 遺伝子を *A. oryzae* で発現させ、発現産物の機能解析を行うことを目的とした。

bgl3 遺伝子全長を持った陽性クローンと他の *Aspergillus* 属由来酵素の塩基配列を比較することにより、いくつかのイントロンと終止コドンを決めることが出来た。しかし開始コドンの決定には至れず、取得遺伝子の配列情報からだけでは明確な ORF を決定することは困難であると考えられた。そこで可能性のある 2 つの ATG を開始コドンと仮定し、2 種の発現ベクターを構築した。それらを *A. oryzae* で発現させたところ、上流側の開始コドンを持つ形質転換体でのみ、 β -グルコシダーゼ活性が確認された。また *A. oryzae* で発現させた場合、BGL3 は培養上清に分泌されず、菌体表層に付着する形で発現していることが確認された。今後は BGL3 のさらなる機能解析を行っていく予定である。

Expression of *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase 3 gene in *A. oryzae*

Asami Namba, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi

(Dept. Life. Env. Sci., Osaka Pref. Univ.)

P-45 (O-21)

Comparative Genome Analysis of *Trichoderma reesei* Hypercellulase Producing Mutants

Juliano de Oliveira Porciuncula¹, Mikiko Nitta¹, Takanori Furukawa¹, Kazuki Mori¹, Okada Hirofumi¹, Hideki Hirakawa², Satoru Kuhara², Yashushi Morikawa¹, Wataru Ogasawara¹

¹Dept. of Bioengineering, Nagaoka Univ. of Tech., ²Grad. School of Genetic Resources Technology, Kyushu University

Trichoderma reesei is one of the most studied cellulolytic fungi, which produces a wide variety of cellulases and hemicellulases during growth on cellulose. For several industrial purposes, mutant strains have been developed by mutagenesis to improve the producibility of these enzymes. By comparing the profile of mutations in these strains we can understand why they have enhanced hydrolase producibility. In this work, the genome sequence of five mutant strains were revealed by Next-Generation Sequencer (SOLiD™ System, ABI) and compared to the wild-type strain of *T. reesei* (QM6a). Consequently, there were numerous single nucleotide polymorphisms (SNP) in the genome of these mutants. Among the genes with SNP, we found that *cre1* gene encoding the carbon catabolite repressor of *T. reesei* has a change in the amino acid sequence (threonine to proline) in its DNA-binding domain. Because CRE1 has been identified as a regulator of cellulase and hemicellulase genes, the binding properties of the mutant CRE1 were analyzed *in vitro* by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The results showed that native CRE1 bound to its consensus binding sequence (5'-SYGGRG-3'), but the mutant CRE1 could not bind to it. Furthermore, PC-3-7 strain harboring mutant *cre1* showed relieved glucose repression profile of cellulases compared with the QM9414 strain with the wild-type *cre1*. These results suggest that the mutation in *cre1* is one of the reasons that provide hypercellulase producibility in the *T. reesei* mutants.

P-46

結晶性セルロース表面における糸状菌由来セルラーゼの吸着挙動

杉本直久, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)

一般に、糸状菌由来の主要なセルラーゼであるセロビオヒドロラーゼ (CBH) は、セルロース中のグリコシド結合を加水分解する触媒ドメイン (CD) と結晶性セルロースへの吸着を担う糖質結合モジュール (CBM) を有し、ドメイン構造をもつことが知られている。結晶性セルロースの加水分解においては、セルラーゼ分子のセルロース表面への吸着が重要であるが、その際、加水分解を伴う吸着 (生産的結合) と伴わない吸着 (非生産的結合) が存在することが示唆されている。この非生産的結合は、CBM のみで結晶性セルロース表面に結合していることが原因と考えられるが、その吸着挙動の詳細は明らかとなっていない。

そこで本研究では、非生産的結合の分子メカニズムについて定量的な解析を行うことを目的に、その初段として、セルラーゼ分子を構成するドメインのうち結晶性セルロースへの吸着を担う CBM のみによるセルロース吸着能を定量的に測定する系の構築を試みた。

メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて、*Trichoderma reesei* のセルラーゼ (CBHI, CBH II) の CD の代わりに蛍光タンパク質 (GFP, RFP) を連結させたキメラタンパク質の発現に成功した。また、粗酵素液での、セルロースへの特異的吸着も確認した。現在、このキメラタンパク質を精製して、結晶性セルロースへの吸着を定量的に測定している。

Binding behavior of cellulase from fungal on the surface of crystalline cellulose.

Naohisa Sugimoto, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima

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

P-47

セルラーゼ分解に関与する *Trichoderma reesei* 由来プロテアーゼの同定

須田直樹, 中沢光, 深谷英嗣, 大瀧友樹, 岡田宏文, 森川康, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)

セルラーゼ高生産糸状菌 *Trichoderma reesei* はセルロース系バイオマス酵素糖化のための酵素源として最も有望な菌として知られているが、糖化反応中、本菌のセルラーゼは内因性のプロテアーゼによる分解を受けることが分かっている。1%アビセル培養上清を用いてバイオマス糖化反応と同じ pH5.0, 50°Cにて0, 2, 4日間保温し、SDS-PAGE 解析を行ったところ2日目以降セルラーゼ・キシラナーゼのバンド強度の低下が見られ、それに伴い CMCase 活性が74%, Avicelase 活性が72%, Xylanase 活性が92%低下することが示された。そこで、本研究ではセルラーゼ分解に関与するプロテアーゼをノックアウトすることを目的として、精製し、同定することとした。

まず、15種類の基質を用いて1%アビセル培養上清中のプロテアーゼ活性を調べたところ、Ala-Ala-Ala-pNA に対して比較的高い比活性(0.2mU/mg)を示した。この活性を指標とし、1%グルコース培養上清を出発材料として Butyl Sepharose 4 Fast Flow クロマトグラフィーを行い、Ala-Ala-Ala-pNA 活性画分を回収した。この活性画分を *T. reesei* セルラーゼ標品へ添加したところ未添加と比較してセルラーゼの分解が進行した。現在、取得した活性画分中に見られる4種のタンパク質バンドを MALDI TOF-MS を用いて同定を試みている。同時に、更に精製を進め N 末解析を行う予定である。

Identification of cellulase degradative protease in *Trichoderma reesei*

Naoki Suda, Hikaru Nakazawa, Eiji Fukaya, Yuki Otaki, Hirofumi Okada, Yasushi Morikawa, Wataru Ogasawara (Dept.of Bioeng.,Nagaoka Univ.of Tech)

P-48

Heterologous expression of β -glucosidases from termites in *Aspergillus oryzae*

Cristiane A. Uchima¹, Manabu Arioka¹, Gaku Tokuda², Hirofumi Watanabe³, Katsuhiko Kitamoto¹ (¹ Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo; ² Center of Mol. Biosci., Univ. of the Ryukyus; ³ National Inst. of Agrobiol. Sci.)

In recent years, bioethanol is calling attention because it is considered the cleanest liquid fuel alternative to fossil fuels. Although cellulosic biomass is difficult to be degraded, it is well known that termites are efficient decomposers of this material. In the present study we are using *Aspergillus oryzae*, a filamentous fungus that can produce and secrete large amounts of proteins, to express heterologously β -glucosidases (GHF1) of termite origin for further applications in biomass conversion. β -glucosidase is essential for cellulose degradation, catalyzing hydrolysis of cellobiose or cello-oligomers to glucose. For that purpose, we constructed expression plasmids carrying β -glucosidase genes, *G1NkBG*, *G1NtBG1*, and *G1mgNtBG1*, with glucoamylase as a fusion partner, under *glaA* promoter. With *A. nidulans* *sC* as a selectable marker, multiple copies of the expression plasmid can be integrated in the host genome of the strain AUT-1 (*niaD⁻ sC⁻ Δ tppA Δ pepE aut1*). *G1NkBG* was successfully expressed and, so far, the enzyme is partially purified by anion exchange chromatography. Despite the successful expression of *G1NkBG*, heterologous expression of *G1NtBG1* in *A. oryzae* has given no yield, due to premature polyadenylation and resultant truncated transcripts, as observed in 3' RACE experiment. *G1mgNtBG1* is in process of transformation. When the purification is completed, further characterization of these enzymes will be done to improve their applicability in biomass conversion.

P-49

麴菌 *A. oryzae* を用いて生産したシロアリ由来セルラーゼの性質および利用法の検討

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高い資化効率を持つ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, 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。そこで, 麴菌にこれらの酵素を生産させ, その性質を調べることで実際に木質バイオマスを生産する系が構築できないかと考えた。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, 天然型活性酵素の大量生産は報告されていない。そこで本研究では, 麴菌 *A. oryzae* を用いて 2 種類のシロアリ由来 EG の生産を試みた。

【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, Kex2 配列を介してグルコアミラーゼ A に連結し, 高分泌生産変異株 AUT-1 で生産させた。得られた形質転換株の培養上清には高い EG 活性が認められ, 目的の EG が生産されていることが確認された。これらの生産株に対して RNAi 法により α -アミラーゼを発現抑制させるための配列を導入したところ, 培養上清の EG 活性が上昇した。続いて培養上清を用いて各酵素の精製を行い, その性質を調べた。各 EG の性質を踏まえ, それらを用いて実際に木材を分解する方法を提案したい。

Purification and application of termite endoglucanases produced by *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-50

麴菌 *A. oryzae* によるシロアリ腸内共生原生生物由来キシラナーゼの生産及びその応用に向けた研究

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, 木質バイオマスを原料としたバイオ燃料への期待が高まる中, 木材を高効率で分解するシロアリが有する独自のシステムを利用したバイオ燃料生産が注目されている。キシラナーゼは木材構成成分であるヘミセルロースの分解に重要な役割を担い, 効率的なバイオマス分解に必要であることが分かっているものの, これまでシロアリ由来のキシラナーゼに関してはほとんど研究が進んでいなかった。そこで本研究では, 麴菌 *A. oryzae* を用いてシロアリの持つキシラナーゼの生産を試みた。まず, シロアリ腸内共生原生生物由来のキシラナーゼのうち, 合計 8 種類のキシラナーゼについて, 麴菌プロテアーゼ遺伝子二重破壊株 NS-tApE 株を親株として *amyB* プロモーター下で α -アミラーゼとの融合タンパク質として発現させた。その結果, 培養液からコントロール株と比べ高いキシラン分解活性が認められたが, 十分な生産量は得られなかった。そこで強力なプロモーターである *glaA142* プロモーターを用い, また親株として NS-tApE 由来の異種タンパク質高分泌変異株である AUT-1 株を使用するなど, 生産量増加のための改良を施した。その結果, いくつかのキシラナーゼに関して 2~3 倍程度のキシラン分解活性の増加が認められた。今後, これらキシラナーゼや他の分解酵素を用いて木質バイオマス分解への相乗効果や有用性について調べる予定である。

Production and application of xylanases from the symbiotic protists in the hindgut of termites by *Aspergillus oryzae*

Takahiro Sasagawa¹, Manabu Arioka¹, Shigeharu Moriya^{2,3}, Toshiaki Kudo⁴, Katsuhiko Kitamoto¹

(¹Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo; ²Biosphere U., RIKEN; ³Lab. Environ. Mol. Biol., Yokohama City Univ.; ⁴Fac. of Fisheries, Nagasaki Univ.)

P-51

***Aspergillus fumigatus* 由来 AfSwo1 タンパク質による結晶性セルロースの糖化相乗効果**

石田 亘¹, 陳新愛², 丸山潤一², 戸高眠¹, 中村里沙¹, 北本勝ひこ², 高橋治雄¹

(¹豊田中央研究所, ²東大院・農生科・応生工)

【背景・目的】

バイオリファインリーにおいて、バイオマスの主成分である結晶性セルロースの効率的な糖化が課題として指摘されている。我々は、セルラーゼがアタックしやすいようセルロース構造を変化させることが重要であると考え、結晶性セルロースを緩和させる効果を有するタンパク質（エクспанシン）と相乗性をもつ遺伝子を糸状菌 *Aspergillus fumigatus* より単離し、AfSwo1 と命名した。これまでに、本遺伝子を麹菌 *Aspergillus oryzae* に導入し、高分泌生産に成功したことを既に報告している。本タンパク質のもつ糖化相乗効果について解析を行ったので、報告したい。

【方法・結果】

AfSwo1 タンパク質がセルロース結合部位を保持することを利用して、組換え麹菌の培養上清液より、結晶性セルロースを担体としたアフィニティー精製を実施した。精製した AfSwo1 を用いて、セルラーゼとの相乗効果、結晶性セルロースの緩和効果などについて評価した結果、結晶性セルロースの効率的糖化に寄与することが確認された。また、X線回折やSEM観察により、本タンパク質を処理したセルロースの構造変化についても検討した。

Promotion of efficient saccharification with *Aspergillus fumigatus* AfSwo1 towards crystalline cellulose.

Nobuhiro ISHIDA¹, Xin-ai CHEN², Jun-ichi MARUYAMA², Nemuri TODAKA¹, Risa NAKAMURA¹, Katsuhiko KITAMOTO², and Haruo TAKAHASHI¹ (¹TOYOTA Central R&D Labs. Inc., ²Dept. of Biotech. Univ. of Tokyo)

P-52

好熱性糸状菌由来のセルラーゼを生産する麹菌を用いたセルロースの糖化

牧野 雄也、丸山 潤一、熊谷 英彦¹、北本 勝ひこ（東大院・農生科・応生工、¹石川県大・生資研）

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* はアミラーゼを大量に生産することでデンプンを糖化し、日本酒の製造において高濃度のエタノール発酵を可能にしている。麹菌がセルラーゼを大量に生産できれば、同様の原理でセルロースからのバイオエタノール生産につながると考えられる。また、好熱性糸状菌 *Thermoascus aurantiacus* が生産するセルラーゼは耐熱性であるので、糖化反応の効率化が期待される。そこで本研究では、*T. aurantiacus* の主要なセルラーゼ(cellobiohydrolase, endoglucanase, β -glucosidase)を同時に発現する麹菌を育種し、それを用いたセルロースの糖化およびバイオエタノール生産を目的としている。

【方法・結果】*T. aurantiacus* 由来セルラーゼ遺伝子(*cbh1*, *egl*, *bgl1*)を *A. oryzae* プロテアーゼ遺伝子2重破壊株($\Delta tppA \Delta pepE$)に導入して、3種のセルラーゼを同時に発現する株を作製した。小麦ふすまを用いた固体培養の抽出液を用いて酵素活性を調べた結果、高温においてそれぞれの活性の増加が認められた。この抽出液を用いてろ紙の糖化を試みたところ、ろ紙の崩壊が観察され、薄層クロマトグラフィーによりグルコースが生成していることが確認された。現在、この糖化液を用いてエタノール発酵試験を行っている。

Cellulose saccharification by using an *Aspergillus oryzae* strain producing cellulases from the thermophilic filamentous fungus

Yuya MAKINO, Jun-ichi MARUYAMA, Hidehiko KUMAGAI¹, Katsuhiko KITAMOTO

(Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, ¹Res. Inst. for Biores. and Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ.)

P-53

Aureobasidium pullulans 由来β-キシロシダーゼ遺伝子の構造解析と異宿主発現

藤本仁寿, 藤井信哉, 脇山元気, 太田一良 (宮崎大・農・応生科)

【目的】 *A. pullulans* ATCC 20524 株は2種のキシラナーゼを細胞外に生産することを既に報告した。本報では、同菌株からイントロンを含むβ-キシロシダーゼ遺伝子 *xyII* を初めてクローニングし、酵母 *Pichia pastoris* で発現させた。【方法および結果】 *A. pullulans* の培養菌体から細胞破碎液を調製し、分子量 88.5 kDa のβ-キシロシダーゼを電気泳動的に単一に精製した。精製酵素のアミノ酸配列をもとに作成した *xyII* 遺伝子に特異的なプローブにより、同菌株のゲノムから *xyII* 遺伝子とその周辺領域を含む 5.5 kbp の *EcoRI-XbaI* 断片を得た。その塩基配列を解析した結果、*xyII* 遺伝子の ORF は 2415 bp であり、54 bp と 52 bp の2つのイントロンが存在した。*xyII* 遺伝子上流 1.0 kbp には3箇所の XlnR 結合可能部位、7箇所の CreA 結合可能部位が認められた。XyII は20アミノ酸残基の分泌シグナルと785アミノ酸残基の成熟酵素(推定分子量 85045 Da)からなり、16箇所のN型糖鎖付加可能部位が認められた。*xyII* 遺伝子の cDNA による *P. pastoris* 形質転換体は培養5日目の培養液上清中に 14.9 U/ml の高いβ-キシロシダーゼ活性を示した。本研究は文部科学省特別教育研究経費研究推進事業の一環として行われた。

Sequence analysis and heterologous expression of beta-xylosidase gene from *Aureobasidium pullulans*

Hirohisa Fujimoto, Shinya Fujii, Motoki Wakiyama, Kazuyoshi Ohta
(Dept. Biochem. Appl. Biosci., Univ. of Miyazaki)

P-54

Aspergillus oryzae および *A. niger* 由来α-グルコシダーゼの転移および縮合能について

阿部有希子¹、佐藤佳奈子¹、入澤友啓¹、野口治子¹、内野昌孝¹、中西載慶²、高野克己¹
(¹東京農大・応生化学、²東京農大・短醸)

【目的】我々は各種α-グルコシダーゼのエチル-α-グルコシド(α-EG)の生産性を調べ、本酵素は由来生物によりα-EGの生成が転移型と縮合型に分別されることが分かった。さらに系統的に近縁な *A. oryzae* および *A. niger* では、*A. niger* が転移および縮合の両反応を示すのに対し、*A. oryzae* は転移反応のみで縮合反応を持たないことを明らかにした。本研究では両菌種のα-グルコシダーゼを *A. oryzae* で発現させ、本酵素の構造比較や反応性の差異を解析し、α-グルコシダーゼの持つ機能について新たな知見を得ることを目的とした。【方法および結果】*A. oryzae* および *A. niger* のα-グルコシダーゼのアミノ酸配列解析を行ったところ、両酵素の同配列は80%と高い相同性を示した。次に宿主糸状菌として *A. oryzae* RIB 40 株を用いて、両菌種由来α-グルコシダーゼを発現させた。PAGEの結果、野生型と同様 *A. oryzae* はモノマーで、*A. niger* はヘテロダイマーで、タンパク質構造は両種で異なっていることが示唆された。また、両酵素の転移および縮合能は野生型と組換え型で変わらなかったことから、配列の一部の違いが反応性に影響を与えているものと考えられた。

Transglycosylation and condensation of α-glucosidase from *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*

Yukiko Abe¹, Kanako Sato¹, Tomohiro Irisawa¹, Haruko Noguchi¹, Masataka Uchino¹, Kotoyoshi Nakanishi², Katsumi Takano¹ (¹Dept. of Appl. Biol. & Chem., Tokyo Univ. of Agri., ²Dept. of Brew. & Ferm., Tokyo Univ. of Agri.)

P-55

Aspergillus nidulans の GT31 ファミリーに属する機能未知糖転移酵素遺伝子の機能解析

小町裕司¹、岡拓二¹、竹川薫²、後藤正利²、野村善幸¹ (¹崇城大・生物生命・応微工、²九大・院・農)

アスペルギルス属の細胞壁糖鎖は、正常な細胞壁形成や分生子形成に関与していることが知られている。しかし、細胞壁糖鎖の生合成に関与する因子には未知の部分が残されている。モデル糸状菌である *Aspergillus nidulans* のゲノム上には約 91 種類の糖転移酵素遺伝子が存在し、そのうち約 30 種類が機能未知である。現在、本研究室では、これら機能未知糖転移酵素遺伝子の遺伝子破壊株の取得を試みている。本報では、このうち GT (GlycosylTransferase) 31 ファミリーに属する機能未知糖転移酵素遺伝子に注目し、細胞壁形成に関する役割について検討した。GT31 ファミリーに属する 3 つの遺伝子 (AN8677, AN5663, AN2015) は、糸状菌類に特有の遺伝子群であり、アミノ酸レベルで相互に 26.0-33.2%の相同性を有していた。また、ハイドロパシープロット解析の結果より、3 つの遺伝子は全て N-末端に 1 つの膜貫通ドメインを有していることから、タイプ II の膜タンパク質であることが示唆された。

この遺伝子の上流 1 kb と下流 1 kb の間に、選択マーカーである *argB* 遺伝子を挟みこむように作製した遺伝子破壊カセットを、親株である *A. nidulans* Δ aku89 に導入し、相同組み換えさせ遺伝子破壊株を取得した。全ての遺伝子破壊株の表現型を解析したところ、 Δ AN5663 株及び Δ AN2015 株では、顕著な表現型の変化は認められなかった。しかし、 Δ AN8677 株では顕著な細胞壁欠損を示し、分生子形成能及び菌糸伸長能の低下が認められた。このことから AN8677 遺伝子が正常な菌糸及び分生子の形成に必要な不可欠であることが明らかになった。

Functional analyses of GT31 glycosyltransferase genes in *Aspergillus nidulans*

Yuji Komachi¹, Takuji Oka¹, Kaoru Takegawa², Masatoshi Goto², Yoshiyuki Nomura¹

(¹Dept. of Applied Microbial Technology, Sojo Univ., ² Dept. of Bioscience and Biotechnology, Kyushu Univ.)

P-56

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の分泌型ロイシンアミノペプチダーゼの機能解析

松下(森田)真由美¹、多田功生¹、丸井淳一朗¹、古川育代¹、鈴木聡¹、服部領太¹、小出芳直²、石田博樹³、山形洋平⁴、竹内道雄⁵、柏木豊⁶、楠本憲一¹ (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、⁶東京農大・応生・醸造)

【目的】 leucine aminopeptidase (LAP) はペプチド鎖の N 末端のアミノ酸、主にロイシンを遊離する、基質特異性の広いアミノペプチダーゼである。LAP は食品加工利用(苦味の低減、香りの改良など)に関する研究もあり、ペプチドの代謝・アミノ酸生産にかかわる重要な酵素である。昨年度、我々は、麹菌 RIB40 株のゲノム情報から、分泌型の LAP (LapA) (AO090011000052) を見だし、三宿主(*A. oryzae*、*A. nidulans*、*E. coli*) で、LAP 過剰発現株を作成し、宿主の違いによる、酵素特性の相違等を報告した。本年度は *A. oryzae* の LapA 過剰発現株に着目し、LapA の大量生産後、精製と詳細な酵素学的特性の解明を行ったので報告する。

【方法及び結果】 LapA コーディング領域約 1.3 kb を、*A. oryzae* RIB40 株ゲノム DNA を鋳型にし、PCR により取得後、*amyB* プロモーターの下流に連結したベクターを作成し、過剰分泌発現株を得た。LapA の精製は、培養上清を硫酸沈殿し、Butyl FF カラム、MonoQ カラムを用いて行った。精製 LapA の分子量は 33 kDa であり、N 末端アミノ酸配列解析から、成熟 LapA の N 末端は翻訳開始点の Met から 80 番目の Tyr と判明した。また、精製 LapA を Glycopeptidase F による脱糖鎖処理を行った結果、本酵素に約 1 kDa の糖鎖付加が確認された。本研究は、生研センター基礎研究推進事業の一環として行われたものである。

Characterization of recombinant secreted leucine aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*

Mayumi Matsushita-Morita¹, Sawaki Tada¹, Junichiro Marui¹, Ikuyo Furukawa¹, Ryota Hattori¹, Satoshi Suzuki¹, Yoshinao Koide², Hiroki Ishida³, Youhei Yamagata⁴, Michio Takeuchi⁵, Yutaka Kashiwagi¹, Ken-Ichi Kusumoto¹ (¹Natl. Food Res. Inst., ²Amano Enzyme, ³Gekkeikan, ⁴Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ⁵ Tokyo Univ. of Agric. Tech., ⁶ Tokyo Univ. of Agric.)

黄麹菌ファミリーM1 アミノペプチダーゼの機能解析

丸井淳一郎¹, 松下(森田)真由美¹, 多田功生¹, 古川育代¹, 鈴木聡¹, 服部領太¹, 小出芳直², 石田博樹³, 山形洋平⁴, 竹内道雄⁵, 柏木豊⁶, 楠本憲一¹ (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, ⁶東京農大・応生・醸造)

アミノペプチダーゼは、ポリペプチド鎖をN末端側から連続的に加水分解し、細胞内におけるタンパク質品質管理やアミノ酸レベルの恒常性維持に重要な役割を果たすと考えられる。我々は、黄麹菌のゲノム情報から見出された30種類以上のアミノペプチダーゼの機能解析を行っている。様々な基質特異性を有する黄麹菌アミノペプチダーゼ群は、アミノ酸、機能性ペプチド生産への活用が期待できる。今回は、ペプチダーゼファミリーM1に属する黄麹菌アミノペプチダーゼの諸性質について報告する。

黄麹菌アミノペプチダーゼMK-16の推定アミノ酸配列には、ファミリーM1アミノペプチダーゼに特徴的な亜鉛結合モチーフ"HEXXH"が存在した。大腸菌で生産したMK-16タンパク質の酵素活性をアミノ酸-パラニトロアニリド誘導体を基質として解析した結果、リジン、アルギニンに対する高い反応性が見られたのに加え、アラニン、ロイシンに対しても比較的高い反応性が見られた。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。

Characterization of family M1 aminopeptidase of *Aspergillus oryzae*

Junichiro Marui¹, Mayumi Matsushita-Morita¹, Sawaki Tada¹, Ikuyo Furukawa¹, Ryota Hattori¹, Satoshi Suzuki¹, Yoshinao Koide², Hiroki Ishida³, Youhei Yamagata⁴, Michio Takeuchi⁵, Yutaka Kashiwagi⁶, Ken-Ichi Kusumoto¹ (¹Natl. Food Res. Inst., ²Amano Enzyme, ³Gekkeikan, ⁴Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ⁵Tokyo Univ. of Agric. Tech., ⁶Tokyo Univ. of Agric.)

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来システインプロテアーゼ群の特徴

田中良男¹, 小出芳直¹, 天野 仁¹, 山形洋平², 楠本憲一³, 石田博樹⁴, 竹内道雄⁵ (¹天野エンザイム, ²東北大院・応生科, ³食総研, ⁴月桂冠・総研, ⁵東京農工大院・応生科)

【目的】微生物由来の菌体外プロテアーゼは様々な産業分野で利用されている。それに対し、菌体内プロテアーゼは、生理活性に深く関わると考えられているが、その知見は限定されている。麹菌ゲノム解析の結果から、麹菌には134種類のプロテアーゼ遺伝子が存在していることが推定された。なかでもシステインプロテアーゼは少なくとも12種類はあり、*In silico* 解析に従うと、すべて菌体内(細胞質または核)に局在している。本発表では麹菌システインプロテアーゼ群に着目し、その遺伝子発現産物の酵素学的諸性質を調べることで、麹菌プロテアーゼのカタログ化を目的としている。

【方法と結果】麹菌由来各システインプロテアーゼ遺伝子から推定されるアミノ酸配列をそのホモログタンパクの基質特異性から3種類に分類した。大腸菌を宿主として各遺伝子の発現を行うと、得られた組み換えタンパクの基質特異性は各グループで大きく異なるものであった。現在、その詳細について解析を行っている。なお本研究は生研センター基礎研究推進事業の一環として行われたものである。

Characterization of cysteine proteases from *Aspergillus oryzae*

Yoshio Tanaka¹, Yoshinao Koide¹, Hitoshi Amano¹, Youhei Yamagata², Ken-Ichi Kusumoto³, Hiroki Ishida⁴, Michio Takeuchi⁵ (¹Amano Enzyme Inc., ²Tohoku Univ., ³Natl. Food Res. Inst., ⁴Gekkeikan, ⁵Tokyo Univ. of Agric. Tech.)

P-59

麴菌由来セリントタイプカルボキシペプチダーゼ OcpA、OcpB、CpI の酵素学的性質

森田寛人¹, 岡本綾子¹, 山形洋平¹, 楠本憲一², 小出芳直³, 石田博樹⁴, 竹内道雄¹ (¹東京農工大院・応生科,²食総研,³天野エンザイム・研究部,⁴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 種類のセリントタイプカルボキシペプチダーゼ(CPase)をコードすると推定される遺伝子が存在した。そこで、これらの遺伝子のうち 3 つの遺伝子の過剰発現株を *A. nidulans* を宿主としてそれぞれ作製し、各遺伝子の翻訳産物 (OcpA、OcpB、CpI) の精製、酵素学的性質の解析を行った。精製した各タンパク質は、アンジオテンシンまたはブラディキニンを基質としたときに C 末端側から 1 つずつアミノ酸を遊離し、これらのペプチド分解活性は PMSF によって阻害されたことから、OcpA、OcpB、CpI はセリントタイプカルボキシペプチダーゼであることが明らかになった。OcpA、OcpB、CpI は pH4 付近で最も高い活性を示したが、合成基質に対する特異性は各々異なっていた。また、OcpB、CpI は pH3-8、55°C 以下で安定であり、OcpA は pH および温度に対してやや不安定であった。さらに、これらの酵素をコードする遺伝子の転写は、培地中に存在する窒素源依存的にパターンが異なることが明らかとなった。また、OcpA の性質は、*A. oryzae* IAM2640 株から精製された CPase O1、O2 と類似していたことから、CPase O1、O2 の N 末端配列と IAM2640 株の *ocpA* ホモログ遺伝子の塩基配列を決定し比較を行ったところ、OcpA と CPase O1、O2 は同じ酵素であ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。

Enzymatic characterization of serine-type carboxypeptidase OcpA, OcpB, and CpI from *A. oryzae*.

Hiroto Morita¹, Ayako Okamoto¹, Yohei Yamagata¹, Ken-Ichi Kusumoto², Yoshinao Koide³, Hiroki Ishida⁴, Michio Takeuchi¹

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

P-60

麴菌における新規ペプチダーゼの大腸菌を用いた発現解析

服部領太¹, 松下(森田)真由美¹, 多田功生¹, 丸井淳一郎¹, 古川育代¹, 鈴木聡¹, 小出芳直², 石田博樹³, 山形洋平⁴, 竹内道雄⁵, 柏木豊⁶, 楠本憲一¹ (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,⁶東京農大・応生・醸造)

【目的】麴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、麴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、我々は麴菌ゲノム情報に見出されたペプチダーゼ様遺伝子産物の特性解明を行っている。本研究では金属ペプチダーゼと推定される新規酵素 MK-08 についての特性解明を行うことを目的とする。

【方法および結果】麴菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 株の mRNA から cDNA を RT-PCR により取得した後、pColdI ベクター (TAKARA) に挿入し、*Escherichia coli* BL21 株を形質転換した。形質転換体の細胞内に蓄積した酵素を、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。精製酵素は Leu-pNA 分解活性を有していた。精製酵素の SDS-PAGE 解析により、推定される 50 kDa 付近にバンドを確認した。また、ゲルろ過クロマトグラフィー分析により 100 kDa 付近にタンパク質のピークが見られたことから、本酵素は 2 量体で存在していると考えられた。現在、精製した酵素の特性を調べている。

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。

Characterization of a novel peptidase from *Aspergillus oryzae*, produced in *Escherichia coli*

Ryouta Hattori¹, Mayumi Matsusita-Morita¹, Sawaki Tada¹, Junichiro Marui¹, Ikuyo Furukawa¹, Satoshi Suzuki¹, Yoshinao Koide², Hiroki Ishida³, Youhei Yamagata⁴, Michio Takeuchi⁵, Yutaka Kashiwagi⁶, Ken-Ichi Kusumoto¹ (¹Natl. Food Res. Inst., ²Amano Enzyme, ³Gekkeikan, ⁴Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ⁵Tokyo Univ. of Agric. Tech., ⁶Tokyo Univ. of Agric.)

P-61

トキイロヒラタケの生産するラッカーゼアイソザイムの発現と発現時期の調査

佐々木武馬, 野崎功一, 水野正浩, 神田鷹久, 天野良彦 (信州大・工学部)

担子菌が生産するラッカーゼは、ダイオキシン類や一部の染料を分解するなどの特徴を有することから、環境修復技術としての利用が期待されている。本研究室ではこれまでに、各種担子菌における染料の脱色能力の検定を行った。その結果、トキイロヒラタケ (*Pleurotus salmoneostramineus*) 由来のラッカーゼが、特にフタロシアニン系染料に対し90%以上の高い脱色活性をもつ結果を得た。また、本酵素にはアイソザイム存在の可能性が示唆されている。そこで本研究は、トキイロヒラタケ由来ラッカーゼアイソザイムの発現と発現時期について調査した。

まず、RT-PCRにより取得したトキイロヒラタケ cDNA を鋳型とし、縮重プライマーを用いてラッカーゼアイソザイムの cDNA の混合物を鋳型とし、内部配列を増幅させた。その後、増幅産物の制限酵素の分解パターンによりグループ分けを行った (PCR-RFLP)。結果、トキイロヒラタケには9つのラッカーゼアイソザイム(lcc1~9)が存在することが明らかとなった。Lcc1~9 cDNA の末端塩基配列は RACE 法により決定した。次にこの配列を基に半定量的 RT-PCR を行い、各培養時期におけるラッカーゼアイソザイム mRNA の転写量を調査した。結果、lcc1, 4, 5, 6 はすべての時期において恒常的な転写が確認され、これら4つのアイソザイムで全体のラッカーゼの7割以上を占めていることが明らかとなった。現在は詳細な機能解析にむけ、本酵素の麹菌における発現系の構築および精製を行っている。

Analysis of expression pattern of laccase isozymes from *Pleurotus salmoneostramineus*

Takema Sasaki, Kouichi Nozaki, Masahiro Mizuno, Takahisa Kanda, Yoshihiko Amano

(Faculty of Engineering, Shinshu Univ.)

P-62

シイタケ (*Lentinula edodes*) におけるラッカーゼの機能分化

坂本裕一, 中出啓子 (岩手生工研)

近年の担子菌類のゲノム解析の結果、担子菌類は多数のラッカーゼ遺伝子を持つことが明らかになっている。また、バイオレメディエーション等への利用の観点からラッカーゼには注目が集まっている。しかし、その生物学的機能の多様性については研究が進んでいない。そこで、日本において重要な食用および薬用きのこであるシイタケ (*Lentinula edodes*) のラッカーゼの機能分化について考察した。

シイタケのラッカーゼに関しては既にこれまでに、シイタケからは液体培養で分泌されるラッカーゼ (Lcc1)、及び子実体保存過程で起きる褐変化現象に関わるラッカーゼ (Lcc4) が存在することが報告されていた。そこで、それらをコードする2種類の遺伝子 (*lcc1*, *lcc4*)、およびその他に4種類のラッカーゼ遺伝子 (*lcc2*, *lcc3*, *lcc5*, *lcc6*) をクローニングした。それらの遺伝子の発現パターンを比較したところ、栄養菌糸体で発現する遺伝子が3種類 (*lcc1*, *lcc5*, *lcc6*)、子実体で発現する遺伝子が3種類 (*lcc2*, *lcc3*, *lcc4*) に分類されることが明らかになった。それらの酵素活性を測定したところ、子実体収穫後のメラニン合成に関わる Lcc4 は L-DOPA を酸化するが、栄養菌糸体で発現する Lcc1, Lcc5, Lcc6 は L-DOPA を酸化しないことが明らかになった。また、ゲノム中に17種類のラッカーゼ遺伝子が存在することが知られている、ウシグソヒトヨタケのラッカーゼ遺伝子とシイタケラッカーゼ遺伝子とで系統樹を作成すると、栄養菌糸体で発現するラッカーゼ遺伝子と、子実体で発現するラッカーゼ遺伝子とでは、異なるグループに分かれることが示唆された。

Functional differentiation of laccase in *Lentinula edodes*

Yuichi Sakamoto, Keiko Nakade

(Iwate Biotech. Res. Center)

P-63

Inverted repeat 配列発現によるシイタケ (*Lentinula edodes*) ラッカーゼ遺伝子 (*lcc1*) の発現制御

中出 啓子, 坂本 裕一, 渡邊 久敬, 佐藤 利次 (岩手生工研)

RNAi は細胞へ 2 本鎖 RNA を導入することで特異的配列の遺伝子抑制が起こる現象である。本研究は食用担子菌シイタケ (*Lentinula edodes*) において、RNAi を利用した特異的な遺伝子抑制技術の確立を目的に行った。標的遺伝子にはシイタケのリグニン分解酵素であるラッカーゼ遺伝子 (*lcc1*) を用いた。合計 147bp の *lcc1* 相同配列を含む Inverted repeat 配列をシイタケ *gpd* プロモータ下に挿入した dsRNA 発現ベクターを構築し、シイタケへ形質転換した。結果、合計 57 株の形質転換株を得て、そのうち 2 株の形質転換株でラッカーゼ活性が著しく低下していることを確認した。ラッカーゼ活性低下株では、*lcc1* 転写量及び Lcc1 分泌量ともに著しく抑制されていることが明らかとなった。以上のことから、食用担子菌シイタケにおいても Inverted repeat dsRNA 発現ベクターを用いた遺伝子抑制が可能であることが明らかとなった。

Down-regulation of the *Lentinula edodes lcc1* gene by expression of homologous inverted repeat dsRNA.

Keiko Nakade, Yuichi Sakamoto, Hisayuki Watanabe and Toshitsugu Sato.

(Iwate Biotechnology Research Center)

P-64

REMI 法によるウシグソヒトヨタケの有性生殖 (子実体形成) 開始不全株の取得とそれらの原因遺伝子の特定

中沢 威人^{*}, 中堀 清, 鎌田 堯 (岡山大・自然科学研究科 ^{*}学振・特別研究員)

担子菌キノコのモデル生物であるウシグソヒトヨタケ (*Coprinopsis cinerea*) において、REMI法 (Restriction Enzyme-Mediated Integration) による子実体形成 (有性生殖) 開始に不全をきたす変異体の取得とそれらの原因遺伝子の特定を試みている。現在までに特定した 6 種類の遺伝子について報告する。

クロマチンリモデリング因子である SWI/SNF 複合体に含まれる 2 つのコンポーネント (Snf5, Arp8) をコードする遺伝子がそれぞれ破壊された変異体では、子実体形成の最初の段階である菌糸塊すら形成しない。ヒストンのアルギニンメチル化酵素様タンパクをコードする遺伝子が破壊された株では、暗黒下で誘導される形態形成プロセスが過剰に促進される結果として正常な子実体形成がおこりにくくなっていることが示唆された。タンパク質分泌に関わる SEC61 ホモログをコードする遺伝子が破壊された株では、原基形成直前で発生が停止し、子実体形成と関連すると考えられている培地の褐色化がみられなかった。

一方、中には子実体形成と交配型決定因子下流のシグナル経路の関連を示唆する変異体も存在した。ジंकフィンガーを有する転写因子をコードする遺伝子が破壊された株では無性生殖経路 (Aon で抑制される) が過剰に誘導されていた。 *Ustilago maydis* でフェロモン応答・MAPkinase 活性化 (Bon で活性化) に必須であると報告されているアダプター様タンパクをコードする遺伝子が破壊された株では、実際に MAPkinase のリン酸化が抑制されたが、A 因子に関わる表現型にも影響が現れていた。

Identification of genes essential for sexual development in the model mushroom *Coprinopsis cinerea*.

Takehito Nakazawa, Kiyoshi Nakahori, Takashi Kamada (Graduate School of Nat. Sci. & Tech., Okayama Univ.)

P-65

カルモデュリン阻害条件における *Phanerochaete chrysosporium* リグニン分解酵素アイソザイム群の発現様式

阪本鷹行, 北浦博法, 南 正彦, 上田暁生, 鈴木一実, 入江俊一 (滋県大院環)

白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* は木質バイオマス利用の際に障害となるリグニンやダイオキシン類等の難分解性有機化合物を単独で分解できることから、バイオマスエネルギー生産や環境浄化への応用が期待されている。*P. chrysosporium* におけるリグニン分解の初発反応はリグニンペルオキシダーゼ (LiP) やマンガンペルオキシダーゼ (MnP) 等のリグニン分解酵素が担うと考えられているが、発現機構の詳細は未解明の部分が多い。前年度のコンファレンスにおいて、トランスクリプトーム解析により、*lip* および *mnp* 遺伝子の転写開始時に Ca^{2+} シグナル伝達因子であるカルモデュリン (CaM) 遺伝子の転写が誘導されることを示した。本研究では、リグニン分解酵素発現と CaM との関係について知見を得るため、CaM 阻害剤が LiP および MnP アイソザイム遺伝子発現へ与える影響を調査した。CaM 阻害剤である W-7 は最終濃度 100 μM で MnP 活性をほぼ完全に抑制した。LiP 活性についても同様であったが、W-7 添加時期を遅らせるにつれて抑制効果が減少していき、培養 72 時間後以降の添加では、十分な抑制が観察できなかった。リアルタイム RT-PCR 法により、本研究の培養条件にて発現していた全ての *lip* および *mnp* アイソザイム遺伝子群 (12 遺伝子) は W-7 添加によって転写レベルで抑制されていることが明らかとなった。

Expression manner of isozymes of lignin degrading enzyme under calmodulin inhibitory conditions in *Phanerochaete chrysosporium*

Takaiku Sakamoto, Hironori Kitaura, Masahiko Minami, Akio Ueda, Kazumi Suzuki, Toshikazu Irie
(Envi. Sci. Grad. Sch., Univ. of Shiga Pref.)

P-66

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* におけるセルロース分解酵素遺伝子の発現に対するセロオリゴ糖の誘導効果

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* はセルロース培養下においていくつかのセルロース分解酵素遺伝子を高レベルで発現させることをこれまで定量的に解明してきた。しかし、その発現を誘導する可溶性物質については同定されておらず、本菌のセルロースに対する応答機構の詳細は明らかでない。そこで本研究では、本菌に対するセロオリゴ糖類の誘導物質としての作用を定量 RT-PCR によって解析した。実験には前培養した菌体を用い、またオリゴ糖の酵素分解によるグルコースやより短鎖のオリゴ糖の蓄積を防ぐため添加する糖を少量(100 μM)とした。さらに炭素源の消費に伴う発現量増加(derepression)を防ぐため、培地に 20mM のグリセロールを添加した。結果、本培養方法によって添加した糖に特異的な菌の応答を解析することが可能になった。また、5 種のセルロース分解酵素遺伝子(*cel7C*, *cel7D*, *cel7F/G*, *cel6A*, *cdh*)について、いずれもセロトリオースおよびセロテトラオースの添加によって顕著な発現量の増加が見られた。このことから、これらのオリゴ糖が本菌における強力な誘導物質として働くことが示された。

The inductive effects of cellooligosaccharides for cellulolytic gene expression in the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.

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

P-67

糸状菌と昆虫の共生系：キクイムシに栽培される微生物群の解析

鈴木啓仁¹、梶村 恒¹、北本則行²、小林哲夫¹、加藤雅士¹ (¹名大院・生命農学、²愛知県産技研・食品工技)

キクイムシの中にはアンブロシア菌とよばれる糸状菌を栽培して餌とするグループが存在しており、養菌性キクイムシと呼ばれている。養菌性キクイムシも他のキクイムシ同様に木に坑道を掘り生活を営むが、マイカンギアと呼ばれる孢子貯蔵器官に保管している糸状菌の孢子を坑道に植え、生育した菌体を餌とすることが分かっている。アンブロシア菌は木質を栄養源として生育しているため、木質バイオマスの分解酵素のソースとして重要なみでなく、C/N比が極端に高い木質内部における窒素源の獲得様式についても興味深い。我々は、他の微生物が糸状菌の窒素源獲得に関与していると仮定し、手始めに坑道内に棲息するアンブロシア菌以外の主要な微生物の同定を試みた。数種類の樹木の養菌性キクイムシ(サクキクイムシ、タイコンキクイムシ、トドマツオオキクイムシ、ハンノキキクイムシ)の坑道内から菌体を採取し、DNAを抽出した後、PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法によって微生物群集を解析した。その結果、アンブロシア菌の他にも真菌類に由来すると考えられる複数の DNA断片が検出された。現在、これらの微生物種の同定を進めている。

Symbiosis between insects and filamentous fungi: analysis on microorganisms cultivated by ambrosia beetles.

Yoshihito Suzuki¹, Hisashi Kajimura¹, Noriyuki Kitamoto², Tetsuo Kobayashi¹, Masashi Kato¹

(¹Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., ² Food Research Center, Aichi Industrial Tech. Inst.)

P-68

Neurospora crassa の β -1,3-glucanosyltransferase 遺伝子群の発現解析

魚井誠之、山下和宏、高橋正和、石川智子、一石昭彦、藤村真 (東洋大院・生命)

糸状菌は、 β -1,3-glucan を主成分とする細胞壁をもつが、先端成長や生育ステージにおける形態形成に伴い細胞壁の再構築を必要とする。 β -1,3-glucanosyltransferase (GEL: glucan elongation)は、 β -1,3-glucan の分岐側鎖を伸長させる役割を担う酵素であり、医真菌や植物病原菌の病原性に深く関与していることが報告されている。*N. crassa* は、ゲノム情報の検索から、5種類の *gel* 遺伝子 (*gel-1* ~ *gel-5*) をもち、網羅的破壊株作成プロジェクトにより各遺伝子破壊株がすでに作成されている。これらの *gel* 遺伝子の機能を解析するため、まず、各遺伝子の発現パターンを real-time RT-PCR を用いて比較解析した。菌糸生長時の基礎発現量は *gel-3* 遺伝子をもっとも高く、逆に、*gel-1* 遺伝子はほとんど発現していないことが明らかになった。遺伝子破壊株の形質解析から、 Δ *gel-3* 株のみが顕著な生育遅延を示した。このことから、少なくとも、正常な菌糸生育のためには、GEL-3 が最も重要な酵素であると推定された。細胞壁ダメージが各 *gel* 遺伝子発現に与える影響を調べるために、micafungin (β -1,3-glucan synthase 阻害剤)処理したところ、顕著に誘導される遺伝子はなかったが、*gel-4* 遺伝子の発現が約4倍増加した。一方、fludioxonil (ストレス応答 MAP キナーゼ OS-2 活性化剤) 処理した菌糸では、*gel-1* 遺伝子に少なくとも50倍以上の顕著な誘導が認められた。この発現誘導は、 Δ *os-2* 株ではほぼ完全に消失した。このことから、GEL-1 は、浸透圧などのストレスに応答した細胞壁再構築に関与している可能性が示唆された。

Expression pattern of five β -1,3-glucanosyltransferase genes in *Neurospora crassa*

Masayuki Kamei, Kazuhiro Yamashita, Masakazu Takahashi, Tomoko Ishikawa, Akihiko Ichiishi and Makoto Fujimura (Fac. of Life Sci., Toyo Univ.)

P-69

低酸素条件下における Nudix hydrolase の役割

志水元亨, 梶尾俊介, 藤田智也, 藤井達也, 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的リン酸化に伴い硝酸をアンモニアへと変換することによりエネルギーを獲得すること（アンモニア発酵）が見出されている。これは、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。また、好気条件から低酸素条件に培養をシフトさせた菌体では NADH/NAD⁺のバランスが高くなることが明らかとなった。しかしながら、低酸素条件下に培養をシフトさせた場合、NAD⁺だけでなく NADH も減少していた。本研究では、低酸素条件下における NADH の分解に関わる酵素の探索およびその役割について検討した。

【方法および結果】 近年、NADH の加水分解活性を有する酵素として Nudix hydrolase (NUDT) が報告されている。*A. nidulans* のゲノム中を精査したところ、12 種の Nudix hydrolase (AnNUDT) が存在していた。系統解析を行なったところ、AnNUDT1, 2, 3 は、すでに NADH を基質とすることが明らかな多生物由来の NUDT と同一のクラスターを形成した。AnNUDT1, 2, 3 のリコンビナントを調製し検討したところ、AtNUDT1, 3 は NADH を加水分解した。そこで、AnNUDT1, 2, 3 遺伝子の遺伝子破壊株を作製しさらに検討した。作製した遺伝子破壊株および野生株を低酸素条件下で培養後、無細胞抽出液を調製し NADH hydrolase 活性を測定した。DAnNUDT2, DAnNUDT3 株では野生株と同程度の活性が検出されたのに対して、DAnNUDT1 株では活性が 36%まで減少した。次に、菌体内の NAD(H) 量を測定した。経時的に追跡したところ、NAD⁺の量はすべての株で同程度であった。一方、DAnNUDT1 株でのみ NADH の減少が大きく抑制されていたことから、AnNUDT1 が低酸素条件下における NADH の分解に関わることが示唆された。現在、DAnNUDT1 株を用いて、NADH の蓄積が菌体に及ぼす影響について検討している。

The role of nudix hydrolase in *Aspergillus nidulans* grown under hypoxic conditions.

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

P-70

麴菌 *atrR* 高発現株及び *atrR* 破壊株のトランスクリプトーム解析

大場歩, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・生物産業創成)

糸状菌や酵母によって引き起こされる真菌症は、症例は少ないものの近年その数が次第に増加している。特に、病原性真菌 *Aspergillus fumigatus* の感染によるアスペルギルス症は、糸状菌の示す広域な薬剤に対する耐性により治療が困難な場合が多い。しかし、その耐性機構については、薬剤の標的分子や排出系の変異によることが示唆されているものの、遺伝子レベルでの詳細な解析がほとんど行われていない。本研究では、安全性が高く *A. fumigatus* と同様に広域な薬剤耐性を有する麴菌を糸状菌のモデルとして、薬剤耐性機構の解明を試みている。

これまでにアゾール系薬剤に対し高い耐性を示す自然突然変異株を取得し、この株を用いた解析により、アゾール系薬剤耐性に関与する 3 種類の ABC トランスポーター遺伝子 *atrA*, *atrF*, *atrG* を見出した。さらに、それらを同時に制御すると考えられる転写因子 AtrR を同定している。この転写因子 AtrR の関与する遺伝子発現制御ネットワークを解明するため、*atrR* 高発現株および破壊株において、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。高発現株では野生株（コントロール株）と比較し、エネルギー生産・転換や、糖の輸送・代謝に関与する遺伝子の発現量が上昇していた。その一方で、細胞壁や細胞膜の生合成、及びアミノ酸や核酸の輸送・代謝に関与する遺伝子の発現量が減少していた。現在、破壊株の解析も行っているところであり、その結果についても報告する。

Transcriptome analysis of the overexpression strain and disruptant for the *atrR* gene that regulates the expression of ABC transporters in *Aspergillus oryzae*

Ayumi Ohba, Shintani Takahiro, Katsuya Gomi

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

P-71

麹菌におけるペントース代謝

渥美元規、野口祐二、金丸京子、加藤雅士、小林哲夫 (名大院・生命農学)

麹菌 *Aspergillus oryzae* が有する転写因子 AoXlnR はキシラン・セルロース代謝を正に制御し、D-キシロース代謝も制御する。また、AoXlnR のホモログである AoAraR は L-アラビノース代謝を制御する。糸状菌では D-キシロース、L-アラビノースはそれぞれ 1 段階、3 段階の酸化還元反応によりキシリトールに変換され、さらにキシリトールデヒドロゲナーゼによりキシルロースへと変換されると考えられている。しかし、これら代謝系酵素遺伝子のうち L-アラビノースレダクターゼ、L-キシルロースレダクターゼ遺伝子は未だ同定されていない。本報告では、麹菌におけるペントース代謝系遺伝子の完全同定を目指し、相同性検索ならびに DNA マイクロアレイ解析から予測された候補遺伝子について、遺伝子産物を大腸菌で生産し、基質の同定を行った。

His-tag を連結した推定代謝系酵素を大腸菌で大量生産、ニッケルアガロースを用いて精製し、精製酵素の糖や糖アルコールに対する特異性を解析した。AoXlnR 依存的に D-キシロースにより誘導される推定 D-キシロースレダクターゼは、D-キシロースに対し 14.9 U/mg、L-アラビノースに対し 8.3 U/mg の比活性を示した。一方、AoAraR 依存的に L-アラビノースにより誘導される推定 L-アラビノースレダクターゼでは基質特異性が逆転しており、L-アラビノースに対し 14.7 U/mg、D-キシロースに対し 4.2 U/mg の比活性を示した。以上の結果から、これら酵素がそれぞれ D-キシロース、L-アラビノースレダクターゼであることが確認された。現在、他の推定 D-キシロース、L-アラビノース代謝系酵素についても解析を進めている。

Pentose catabolism in *Aspergillus oryzae*

Motoki Atsumi, Yuji Noguchi, Kyoko Kanamaru, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi
(Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

P-72

麹菌の解糖系酵素遺伝子の選択的転写開始機構の解析

高間充、香曾我部恵子、戸田智美¹、町田雅之¹、新谷尚弘、五味勝也 (東北大院・生物産業創成,¹産総研)

解糖系に関与する遺伝子は構成的に発現しているということもあり、詳細な発現制御機構の解析はあまり行われていない。麹菌の EST 解析とゲノム解析のデータを比較したところ、興味深いことに、高発現遺伝子として知られているエノラーゼ遺伝子 (*enoA*) とグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素遺伝子 (*gpdA*) において、それらの転写開始が培養条件の違いによって異なる 2ヶ所から起こっている可能性が示唆された。固体培養と液体培養で生育させた麹菌からそれぞれ採取した mRNA を用いて 5'-SAGE 法によって網羅的に転写開始点を解析した結果、上記の 2つの遺伝子ともに 2ヶ所から転写されていることが確かめられた。固体培養を一時的炭素源飢餓とみなせば、この転写開始点の違いは培地中の炭素源の種類により起こっているのではないかと考えられる。そこで、両遺伝子について 2つの転写開始点からの産物を区別して様々な炭素源条件で定量 PCR を行った。その結果、解糖に関わる炭素源と糖新生に関わる炭素源とで転写開始点がスイッチされていることが示唆された。本研究では、これら 2つの遺伝子の選択的転写開始機構の解明に向けて、転写に関与するシスエレメントや、この機構に関与する転写因子の同定を目指している。今回は、炭素源による転写開始点の違いが顕著にみられたエノラーゼ遺伝子 (*enoA*) について、プロモーターを含む上流領域を様々に欠失させたものをレポーター遺伝子に連結させた deletion series を作製し、それを用いたレポーターアッセイを行った結果、ならびに *A. nidulans* で糖新生に関与する転写因子である AcuK と AcuM の麹菌におけるオーソログの破壊株における発現について報告する。

Analysis of mechanism for alternative usage of transcription start sites of glycolytic genes in *Aspergillus oryzae*

Mitsuru Takama, Keiko Kosokabe, Tomomi Toda¹, Masayuki Machida¹, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi
(Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.,¹AIST)

P-73

Functional analysis of FarA transcriptional factor in *Aspergillus oryzae*

Sharon Marie Garrido¹, Noriyuki Kitamoto², Akira Watanabe¹, Takahiro Shintani¹, and Katsuya Gomi¹

¹Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Japan; ²Food Research Center, Aichi Industrial Technology Institute, Japan.

FarA is a Zn(II)₂Cys₆ transcription factor which upregulates genes required for growth on fatty acids in filamentous fungi like *Aspergillus nidulans*. FarA is widely conserved in fungi and binds to CCGAGG core sequences in the promoters of their target genes. Homology of all the amino acid sequences and the homology of Zn₂Cys₆ motifs of FarA between the *Aspergillus oryzae* and the *A. nidulans* are 83% and 97.5%, respectively. FarA is also highly similar to the cutinase transcription factor CTF1a of *Nectria hematococca* which binds to the cutinase gene promoter in this plant pathogen. This study determines whether FarA transcriptional factor also works in the regulation of genes responsible for the production of lipolytic enzymes such as cutinase and lipase for the degradation of a biodegradable plastic, poly-(butylene succinate-co-adipate) (PBSA), particularly in *A. oryzae*. FarA disruptant was constructed ($\Delta farA:sC$) and confirmed by Southern blotting analysis. The wild-type (WT) and the disruptant strains were grown in minimal agar medium with 0.4% PBSA and after 5 days of incubation, the wild-type showed clear zone around the mycelia while the disruptant did not. In addition, WT produced the cutinase protein particularly CutC while the disruptant did not. This indicated that the FarA transcriptional factor may be implicated in the expression of lipolytic genes and the production of PBSA-degrading enzymes. Further experiments needed to confirm the gene expression of both the wild-type and disruptant strains are underway.

P-74

Monacolin K 生合成における Zn(II)₂Cys₆ タイプ転写制御因子 MokH の機能解析

酒井香奈江, 木下浩, 仁平卓也 (阪大・生物工学国際交流センター)

糸状菌において二次代謝物質の生合成関連遺伝子は多くの場合、隣接した領域に遺伝子クラスターを形成して存在し、このクラスターには転写制御因子、トランスポーターをコードする遺伝子なども含まれている。これまでに糸状菌二次代謝物質生合成遺伝子クラスター内に見つかっている転写制御因子遺伝子は Zn(II)₂Cys₆ タイプの制御因子をコードしており、この遺伝子産物によりクラスター内の遺伝子群の転写が誘導されることが明らかとなっている。近年紅麹菌 *Monascus pilosus* において配列が明らかになった monacolin K (MK) 生合成遺伝子クラスター内にも Zn(II)₂Cys₆ タイプの転写制御因子と高い相同性を示す遺伝子 *mokH* の存在が確認されている。MK はコレステロール生合成阻害薬の前駆体として使用されている有用な化合物であり、*mokH* 遺伝子産物による MK 生合成遺伝子の転写誘導が明らかとなれば、*mokH* 遺伝子操作による MK の生産性向上に繋がることを期待できる。そこで本研究では MK 生合成における *mokH* 遺伝子の機能解析を行った。

M. pilosus において *mokH* 遺伝子を破壊したところ、MK 生産の消失が観察された。続いて、RT-PCR による転写解析を行ったが、予想に反しクラスター内遺伝子の転写には破壊株と WT の間に大きな差が見られなかった。この結果から MokH は MK 生産に必要であることが明らかとなったが、その機能はこれまでに糸状菌二次代謝物質生合成において報告されている Zn(II)₂Cys₆ タイプの転写制御因子とは異なっていると考えられた。現在 MokH の機能についてさらに解析を進めているところである。

Functional analysis of MokH, Zn(II)₂Cys₆ type transcriptional factor, in monacolin K biosynthesis

Kanae Sakai, Hiroshi Kinoshita, Takuya Nihira (Osaka, Univ. of ICBiotech)

P-75

Isolation of novel bioactive compounds from entomopathogenic fungi by chemical screening

Sastia Prama PUTRI, Hiroshi KINOSHITA, Fumio IHARA¹, Yasuhiro IGARASHI², Takuya NIHIRA (ICBiotech Osaka Univ., ¹National Institute of Fruit Tree Science, ²Biotechnology Research Center Toyama Pref.Univ.)

Screening for secondary metabolites based on their chemical characters (chemical screening) has led to the detection and isolation of compounds independent from their biological activity. Consequently, chemical screening offers an enormous advantage when compared to the conventional bioassay-guided screening because the assay method will no longer be a limiting factor to search for novel compounds. Therefore, this type of screening can increase the possibility of isolating novel compounds with a wider array of chemical structure. We have previously demonstrated that entomopathogenic fungi is a potential source of new compounds active against plant pathogenic oomycetes, *Phytophthora sojae* and *Aphanomyces cochlioides* based on the bioassay-guided screening study. In this report, 38 species belonging to 14 genera of clavicipitoid entomopathogenic fungi were screened for their ability to produce new compounds by means of Chemical Library Analysis (CLA); a chemical screening method using HPLC-DAD combined with the use of an in-house library of natural compounds. Based on the result of CLA, candidate compounds were chosen by the following criteria regardless of whether the candidate producer strain possess antioomycete activity against either *P. sojae* or *A. cochlioides* or not: (1) being produced only by the respective strain or certain genus, (2) possessing unique UV-Vis spectra, (3) showing no match in the in-house library, (4) being produced in high amount. The candidate compounds are of NRPS type (cyclooligomer depsipeptide) that have been reported to display a diverse array of biological activities *in vitro* and PKS-NRPS hybrid type (key structural feature includes decalin and tetramic acid moiety) that have been targeted for anticancer and HIV-1 integrase inhibitors. Since each screening method has its own benefits and drawbacks, the utilization of both CLA and bioassay-guided screening could further expand the possibilities of finding new bioactive compounds from entomopathogenic fungi.

P-76

メロテルペノイド生合成に関わる新規膜結合性テルペン環化酵素の構造機能解析

松田侑大¹, 徳永欽也¹, 藤井勲², 海老塚豊¹, 久城哲夫¹, 阿部郁朗¹ (¹東大院・薬, ²岩手医大・薬)

糸状菌 *Aspergillus fumigatus* が産生する pyripyropene は、強力な ACAT 酵素阻害により顕著なコレステロール低下作用を示す、ポリケタイドとテルペノイドのハイブリッド型化合物である。当研究室において報告した *A. fumigatus* 由来 pyripyropene 生合成遺伝子クラスターがコードする酵素群のうち、テルペン部分の閉環反応を触媒する酵素は、既知のテルペン環化酵素とは配列相同性を示さない、分子量 27 kDa (244 アミノ酸)、七回膜貫通型と予想される、全く新しいタイプのテルペン環化酵素である。本酵素のホモログは、terretonin など、他の糸状菌由来メロテルペノイド生合成遺伝子クラスターや paxilline などをはじめとするインドールジテルペンの生合成遺伝子クラスターなどにも見出されているが、その機能については未同定で今後の研究が待たれている。今回、我々は唯一最初の例となる本環化酵素の構造機能解析に着手した。

Pyripyropene の生合成において、テルペン部分の閉環反応は、オキシドスクアレン閉環酵素の場合と同様に、プロトン化によるエポキシ環の開裂により開始されるものと予想される。そこで、一連のホモログ酵素とのアミノ酸配列比較により見出された保存アミノ酸残基のうち、プロトン化が可能な酸性残基 Glu63 と Asp218 に着目し、これら残基に部位特異的変異を導入した。E63Q, E63A, D218N, D218A 置換体を各々作成し、*A. oryzae* M-2-3 を宿主として環化酵素異種発現体を得た。現在、これら点変異の導入が酵素活性に与える影響を詳細に検討しているところである。また、本酵素の基質特異性、および、人工基質を用いた非天然型化合物の創製についても今後検討の予定である。

Functional studies on a novel membrane-bound terpene cyclase involved in the biosynthesis of fungal meroterpenoids

Yudai Matsuda¹, Kinya Tokunaga¹, Isao Fujii², Yutaka Ebizuka¹, Tetsuo Kushiro¹, Ikuro Abe¹

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

P-77 (O-15)

Aspergillus fumigatus 由来メロテルペノイド生合成遺伝子クラスターを用いた非天然型新規ハイブリッド型化合物の創製

徳永欽也¹, 伊藤崇敬¹, 藤井勲², 海老塚豊¹, 久城哲夫¹, 阿部郁朗¹ (東大院・薬,²岩手医大・薬)

糸状菌 *Aspergillus fumigatus* が産生する pyripyropene は、ポリケタイドとテルペノイドの構造を併せ持つ特異なハイブリッド型化合物であり、強力な ACAT 酵素阻害により顕著なコレステロール低下作用を有する。糸状菌が産生するメロテルペノイドにはこれ以外にも重要な生理活性を示すものが数多く報告されており、それゆえにメロテルペノイドの生合成機構の解明や生合成経路の改変による構造多様性の拡大は、医薬品開発の観点から重要である。今回、我々は *A. fumigatus* のゲノム data base 上で、ポリケタイド合成酵素 (PKS) 遺伝子と prenyltransferase (PT) 遺伝子を併せ持つ遺伝子クラスターを検索し、9 遺伝子からなる約 22 kb の pyripyropene 生合成遺伝子クラスターを同定した。糸状菌発現用ベクターを用いて pyripyropene の予想生合成経路の順番に、クラスター内の各遺伝子全長を *A. oryzae* M-2-3 にて異種発現させることで、各遺伝子の機能解析を行うとともに生合成経路の再構築を行った。その結果、pyripyropene 骨格を構築する 5 つの遺伝子の機能解析に成功した。さらに、これら遺伝子を発現させた *A. oryzae* の株を用いて、安息香酸を投与することで pyripyropene のピリジン環がベンゼン環に置換されたアナログを産生させることにも成功した。本化合物は選択的 AchE 阻害作用を示す arisugacin の基本炭素骨格を有し、この系によるさらなる新規化合物の産生が期待される。

Production of a novel meroterpenoid analog using pyripyropene biosynthetic gene cluster from *Aspergillus fumigatus*

Kinya Tokunaga¹, Takayuki Itoh¹, Isao Fujii², Yutaka Ebizuka¹, Tetsuo Kushiro¹, Ikuro Abe¹

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

P-78

Aspergillus fumigatus 由来ヘルボール酸の生合成に関わるオキシドスクアレン閉環酵素の構造機能解析

木村美紀, 福嶋大介, 久城哲夫, 渋谷雅明, 海老塚豊, 阿部郁朗 (東大院・薬)

多様な構造と生理活性を有するトリテルペンの生合成において、オキシドスクアレン閉環酵素(OSC)はその基本骨格を決定する鍵酵素である。本研究では、フシダン型ステロイド系抗生物質ヘルボール酸を産生する糸状菌 *Aspergillus fumigatus* 由来プロトステロール合成酵素をとりあげる。本酵素が触媒する反応は、オキシドスクアレンがプロトステリルカチオンへ閉環した後、17 位の水素が脱離してシス配置の二重結合を形成して終了する。ラノステロール合成酵素の場合とは異なり、環化に引き続く一連のメチル基と水素の 1,2-転位が起こらないという点でも非常に珍しい反応である。こうした生成物の作り分けは、酵素活性中心の構造の微妙な変化によりもたらされるものと予想される。両酵素の性状の違いを明らかにすることは、一連の転位反応の化学を支配する因子を解明し、酵素の構造機能相関を考える上で不可欠である。

プロトステロールとラノステロールの作り分けに寄与するアミノ酸残基を同定するため、アミノ酸配列の比較により、本酵素において特徴的な置換がみられる領域⁷⁰²APPGGMR⁷⁰⁸に着目した。これをヒト・ラノステロール合成酵素の配列 NKSCAIS に置換した変異酵素を作成して、酵母にて異種発現した。その結果、プロトステロール合成能は消失し、代わりにラノステロールを生成物として与えることを確認した。この C 末端領域は、プロトステロール C-20 カチオン中心の安定化に寄与する Phe701 残基の背後に位置し、このカチオンの安定化が転位反応の化学を支配する大きな要因となるものと推察された。現在、本酵素と変異酵素について、*in vitro* アッセイによる速度論解析を行っており、今後は、酵素の X 線結晶構造解析にも着手する。

Functional analysis of *A. fumigatus* OSC responsible for helvolic acid biosynthesis

Miki Kimura, Daisuke Fukushima, Tetsuo Kushiro, Masaaki Shibuya, Yutaka Ebizuka, Ikuro Abe

(Grad. School of Pharm. Sci., Univ. of Tokyo)

P-79

Aspergillus fumigatus における pseurotin 生合成遺伝子クラスターの解析

加藤直樹¹, 高木海¹, 掛谷秀昭^{1,2}, 長田裕之¹ (¹理研・抗生物質, ²京大院・薬)

Pseurotin 類はヘテロスピロ環構造を有するカビの二次代謝産物であり, 様々な生物活性が報告されている。当研究室において単離された血管新生阻害物質 azaspirene も同一の経路で生合成されると考えられる。Pseurotin A の主骨格形成を担う PKS-NRPS ハイブリッド遺伝子 *psoA* はすでに *A. fumigatus* において同定されているが (Maiya *et al.*, *Chembiochem*, 2007, 8, 1736-1743), その生合成経路の詳細は不明である。

化合物の有する生物活性に加えて興味を持たれる点として, *A. fumigatus* において, pseurotin 生合成遺伝子群が fumitremorgin クラスターと同一の染色体上の近接した位置に存在しており, この計 100 kb の領域に多くの二次代謝関連遺伝子が集積していることが挙げられる。機能未知の遺伝子を除くと, この領域には転写因子が一つしか存在していない。本制御遺伝子は, C6 型の zinc-finger モチーフを有しており, 糸状菌遺伝子クラスターによく見られる経路特異的な転写活性化因子をコードしている遺伝子である。しかしながら, pseurotin, fumitremorgin のどちらのクラスターからも少し離れた位置に存在しており, 領域内のどの遺伝子発現を制御しているのかは不明である。そこで, 本遺伝子の破壊株を作製し, その代謝産物を LC/MS 分析したところ, fumitremorgin 類の生産性には何ら変化は認められなかったが, 一方で, pseurotin 類の生産が消失した。現在, 破壊株において消失したピークに相当する化合物の同定を進めている。

Analysis of pseurotin A biosynthetic gene cluster in *Aspergillus fumigatus*

Naoki Kato, Hiroshi Takagi, Hideaki Kakeya, Hiroyuki Osada
(Antibiotics Lab., RIKEN, Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyoto Univ.)

P-80

麹菌における cyclopiazonic acid 生合成遺伝子クラスターの解析

篠原靖智¹, 加藤直樹², 徳岡昌文¹, 小山泰二¹, 長田裕之² (¹野田産研, ²理研抗生物質)

Cyclopiazonic acid (CPA) は筋小胞の Ca²⁺/ATPase 活性を阻害するマイコトキシンであり, *Aspergillus* 属では *A. flavus* と *A. oryzae* の一部の株が生産する。これまでに我々は, *cpaA*, *cpaB*, *cpaC*, *cpaD*, *cpaE*, *cpaF* 及び *cpaR* から構成される CPA 生合成遺伝子クラスター(CPA クラスター)を推定し, その機能解析から CPA は, *cpaA*, *cpaB* 及び *cpaC* がコードする酵素により生合成されることを明らかとしてきた。今回, これまでの一連の検討で見出された新規 CPA 誘導体の解析結果について報告すると共に, *Aspergillus* 属の CPA クラスターの比較解析を行ったのでその結果を報告する。

cpaD がコードする酵素の触媒により合成される代謝物を見出し, 構造解析を行ったところ, この代謝物は新規 CPA 誘導体: 2-oxocyclopiazonic acid (2-oxoCPA) であることを明らかとした。この 2-oxoCPA の Ca²⁺/ATPase 阻害活性が CPA に比べ約 1/5 に低下していたことから, *A. oryzae* は *cpaD* により CPA を毒性の低い 2-oxoCPA へ変換していることが示唆された。一方, CPA クラスターの比較解析から, *A. flavus* では *cpaD* が部分的に欠失していることが明らかとなり, *A. flavus* での最終産物は CPA であると考えられた。また, *A. oryzae* と共に醸造用微生物として広く利用されている *A. sojae* では, *cpaA* の 3' 端約 1kb の領域から *cpaF* までの約 20kb が欠失しており, *A. sojae* は CPA の生産能がないことが明らかとなった。醸造用微生物として進化してきた *A. oryzae* や *A. sojae* において, 生合成遺伝子の欠失あるいは代謝酵素の保存といった安全性を担保するメカニズムが備わっていることは非常に興味深く, 現在解析を進めている。

Functional and comparative analysis of the cyclopiazonic acid biosynthesis gene cluster in *Aspergillus* spp.

Yasutomo Shinohara¹, Naoki Kato², Masafumi Tokuoka¹, Yasuji Koyama¹, and Hiroyuki Osada²
(¹Noda Ins. Sci. Res., ²Antibiotics Lab., ASI, RIKEN)

P-81

トマトアルターナリア茎枯病菌における AAL 毒素生合成遺伝子の機能解析

赤木靖典, 中林賢志, 高尾和実, 中道真由美, 柘植尚志*, 尾谷 浩, 児玉基一朗 (鳥取大・農, *名大院・生農)

トマトアルターナリア茎枯病菌 (*Alternaria alternata* tomato pathotype, 茎枯病菌) は宿主特異的毒素である AAL 毒素を生産し, 特定のトマト品種に病気を引き起こす。本毒素はポリケチド構造を有し, *Gibberella moniliformis* が生産するマイコトキシン, フモニシンの構造類縁体である。これまでに, 本毒素の生合成に関与すると推定される AAL 毒素生合成遺伝子 (*ALT*) クラスターを BAC ライブラリーからスクリーニングし, ポリケチド生合成酵素遺伝子 (*ALT1*) などを含む少なくとも 13 遺伝子を同定した。これら遺伝子群はフモニシン生合成遺伝子 (*FUM*) クラスターと高い相同性を示した。本研究では, PCR をベースとして構築した, ハイグロマイシン B 耐性遺伝子を含む線状遺伝子破壊ベクターを用いて, *ALT* 遺伝子群のノックアウト (KO) 株の作出を試みた。得られた形質転換体を PCR およびサザン解析により調査したところ, 今回 KO を試みた 8 遺伝子全てにおいて, ゲノム上複数コピー存在する可能性が示唆された。一方で, 本法の高い相同組換え効率により, 現在までに 6 遺伝子 (*ALT2, 3, 8, 9, 10, 13*) を完全に KO することに成功した。これらのうち 4 遺伝子 (*ALT2, 3, 10, 13*) の KO 株は, AAL 毒素生産能および病原性を失活した。次に, 得られた KO 株において co-transformation により遺伝子相補を試みた。ジェネティシン耐性遺伝子を保有するプラスミド pII99 と PCR で増幅した目的遺伝子断片を PEG 法により KO 株に導入したところ, これまでに, *ALT3, 10, 13* において相補株が作出された。これら一連の形質転換法は迅速かつ簡便であることから, 本菌の遺伝子機能解析において有効な手段であると考えられた。

Functional analysis of the AAL-toxin biosynthetic genes of the tomato pathotype of *Alternaria alternata*.

Yasunori Akagi, Kenji Nakabayashi, Kazumi Takao, Mayumi Nakamichi, Takashi Tsuge*, Hiroshi Otani, Motoichiro Kodama (Fac. Agric, Tottori Univ., *Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

P-82

トマトアルターナリア茎枯病菌が保有する AAL 毒素生合成遺伝子 (*ALT*) クラスター上の *ALT9* および *ALT10* の機能解析

高尾和実, 赤木靖典, 柘植尚志*, 尾谷 浩, 児玉基一朗 (鳥取大・農, *名大院・生農)

トマトアルターナリア茎枯病菌 (*Alternaria alternata* tomato pathotype, 茎枯病菌) が生産する宿主特異的 AAL 毒素は, 本菌の宿主トマトに対する病原性発現において重要である。本毒素は, *Gibberella moniliformis* の生産するマイコトキシン, フモニシンの構造類縁体である。両毒素はともにポリケチド骨格にアミノ基, トリカルボン酸 (TCA) 等が付加された構造を有しているが, ベースとなる炭素数や, 官能基の位置および TCA の数などが異なる。これまでに, 茎枯病菌は AAL 毒素生産に必須であるポリケチド生合成酵素遺伝子 (*ALT1*) を含む, 少なくとも 13 遺伝子群からなる AAL 毒素生合成遺伝子 (*ALT*) クラスターを保有することが明らかとなっている。これら遺伝子群は, フモニシン生合成遺伝子 (*FUM*) クラスター上の遺伝子とアミノ酸レベルで高い相同性を示す。本研究では, mitochondrial tricarboxylate transporter および fatty acyl-CoA synthetase をそれぞれコードすると推定される *ALT9* および *ALT10* の機能解析を行った。遺伝子破壊実験の結果, Δ *ALT9* 株は野生株と同様の毒素生産能および病原性を示した。一方, Δ *ALT10* 株では, 両形質の失活が認められた。そこで, Δ *ALT10* 株に再度, 野生株由来の *ALT10* 遺伝子を導入したところ, 毒素生産能および病原性が回復した。*G. moniliformis* では, *ALT10* ホモログである *FUM10* の破壊株が TCA を欠失したフモニシン誘導体を生産することが報告されており, 茎枯病菌においても *ALT10* が活性を持つ AAL 毒素生産において重要であることが明らかとなった。

Functional analysis of *ALT9* and *ALT10* on the AAL-toxin biosynthetic gene cluster of the tomato pathotype of *Alternaria alternata*.

Kazumi Takao, Yasunori Akagi, Takashi Tsuge*, Hiroshi Otani, Motoichiro Kodama (Fac. Agric, Tottori Univ., *Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

P-83 (O-13)

トランスポゾン挿入によるトマト萎凋病菌の非病原力遺伝子の機能喪失

稲見圭悟, 森田泰彰*, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大院連農・*高知県農林技術センター)

植物病原菌であるトマト萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* はトマト品種に対して病原力を異にする3つの「レース」に分化している。トマト品種と萎凋病菌レースの親和性/非親和性は、各品種が有する萎凋病抵抗性遺伝子と各レースが保持する非病原力遺伝子 *AVR* の相互関係で決定される。例えば、レース1は *AVR1* を持ち、*AVR1* を認識する抵抗性遺伝子 *I* を保持するトマト品種はレース1に抵抗性であるため、非親和性の関係である。レース1が *AVR1* を失うと、*I* による抵抗性が無効化するので、親和性の関係になる。こうして新たなレースが出現する。つまり、*AVR1* を保持しているのはレース1のみである (Houterman *et al.* 2008)。2008年秋に高知県日高村でレース1抵抗性品種に発生した萎凋病の分離株 KoChi-1 のゲノムを鋳型に、*AVR1* 特異プライマーを用いてPCRを行ったところ増幅が見られた。しかしその断片(約1500 bp)はレース1から得られる断片(約700 bp)よりも大きかった。KoChi-1 から得られた断片の内部には759 bpのトランスポゾンが挿入され、*AVR1* のORFが破壊されていた。本トランスポゾンは *hAT* ファミリーに属し、トランスポザーゼをコードしない非自律性のものであった。また、Broad Institute のゲノムデータベースによると、*F. oxysporum* のゲノム中に同様のトランスポゾンが70コピー以上散在していた。KoChi-1 のゲノムにレース1由来の *AVR1* を導入した形質転換株は、*AVR1* に対応する抵抗性遺伝子 *I* のみを保持するトマト品種に萎凋病を引き起こさなくなった。従って、KoChi-1 はトランスポゾンの挿入のために *AVR1* としての機能を喪失していることが明らかになった。この様にトランスポゾンが挿入された *AVR1* 領域は調べた限りのトマト萎凋病菌にはみられず、病原性進化の一つの視点を示すものである。

The loss of function of the avirulence gene *AVR1* in the tomato wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by transposon-insertion

Keigo Inami, Yasuaki Morita*, Tohru Teraoka, Tsutomu Arie

(Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. of Agric. & Tech.; *Kochi Agric. Res. Center)

P-84

イネごま葉枯病菌 (*Bipolaris oryzae*) の 3-dehydroquinase synthase 遺伝子の発現解析

山口裕一郎, 上野誠, 荒瀬榮, 木原淳一 (島根大・生物資源)

イネごま葉枯病菌 (*Bipolaris oryzae*) のメラニン生合成遺伝子や光回復酵素遺伝子の発現が近紫外線(波長300-400 nm)照射によって増加することが明らかとなっている。我々は、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複数の遺伝子を同定した(第8回糸状菌分子生物学コンファレンス)。今回、その中から、芳香族アミノ酸の合成に関わる 3-dehydroquinase synthase 遺伝子(以下 *DHQS* 遺伝子)に着目し、*DHQS* 遺伝子のクローニングと発現解析を行なった。*DHQS* 遺伝子は、3つのイントロンと4つのエキソンで構成され、推定461アミノ酸をコードするORFからなり、BLAST解析の結果、他の糸状菌の3-dehydroquinase synthase と高い相同性が示された。次に、Real-time PCRによる*DHQS* 遺伝子の発現解析を行なった。*DHQS* 遺伝子は暗黒下でも低いレベルで恒常的に発現していたが、1時間の近紫外線照射によって*DHQS* 遺伝子の発現量は10倍以上に増加した。また、*DHQS* 遺伝子の発現量の増加の程度は、近紫外線の照射時間に比例した。各種蛍光灯を用いた実験から、*DHQS* 遺伝子の発現増加は波長の短い紫外線照射で高く、波長の長い赤色光照射で低い傾向が認められた。一方、青色光制御遺伝子破壊株では、光回復酵素遺伝子やオプシン様遺伝子の発現増加が近紫外線照射で認められなかったのに対して、*DHQS* 遺伝子の発現増加は近紫外線照射で認められたことから、*DHQS* 遺伝子の発現増加には青色光制御因子を介さない制御機構が存在することが考えられた。今後、イネごま葉枯病菌のシキミ酸経路における芳香族アミノ酸の合成に及ぼす近紫外線照射の影響について解析を行なっていく予定である。

Cloning and expression analysis of 3-dehydroquinase synthase gene in *Bipolaris oryzae*

Yuichiro Yamaguchi, Makoto Ueno, Sakae Arase, Junichi Kihara

(Fac. Life Env. Sci., Shimane Univ.)

P-85

灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* の二成分制御系の機能解析

泉津弘佑, 小林甫, 齋藤禎一, 森田篤, 田中千尋 (京大・院・農)

菌類は、外界の情報を『感知』し、適切に『応答』するために、多様な細胞内シグナル伝達経路を発達させてきた。二成分制御系 (Two-Component Signaling System) は、原核生物から植物、菌類まで広く保存されているシグナル伝達経路のひとつである。菌類の二成分制御系は、様々なストレス応答や形態形成を制御するのみならず、ある種の殺菌剤 (フェニルピロール系/ダイカルボキシイミド系) の作用ターゲットであることが明らかとなり、近年特に注目されている。

灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) は、200 種を超える広範な宿主植物に感染し、世界の農業生産に年間 100 億 US ドルともいわれる莫大な被害をもたらしている主要植物病原糸状菌のひとつである。フェニルピロール剤やダイカルボキシイミド剤は、特に灰色かび病菌の防除に極めて重要な役割を果たしてきた経緯がある。しかし、二成分制御系の機能は数種のモデル糸状菌で調べられたのみであり、灰色かび病菌を含め多くの菌類ではこれまでほとんど明らかとされていない。

今回我々は、灰色かび病菌の二成分制御系を構成する主要因子群 (BcOS1, BcSSK1, BcSKN7, BcSSK2, BcPBS2, BcSAK1) の網羅的な遺伝子破壊を行い、ストレス応答、形態形成、病原性、薬剤耐性における役割を調べた。その結果、上流因子である OS1 は、高浸透圧ストレス適応および薬剤の作用に極めて重要な役割を持っていること、孢子形成を正に菌核形成を負に制御していること、宿主植物への病原性発現に極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。下流の 2 つの経路 (SSK1-HOG1 経路および SKN7 経路) もこれらの機能に深く関わっていることが明らかとなってきた。本発表では、より詳細な考察を行いたい。

Functional study of two-component signaling system in *Botrytis cinerea*.

Kosuke Izumitsu, Hajime Kobayashi, Yoshimoto Saitoh, Atsushi Morita, Chihiro Tanaka
(Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

P-86

イネいもち病菌の DNA 相同組換え修復遺伝子欠失変異株の性質

工藤 亮子, Sali Atanga Ndindeng, 阿部 歩, 芦澤 武人*, 曾根 輝雄 (北大院農・応用菌学, *中央農研)

イネいもち病菌の非病原性遺伝子の変異は、新たな抵抗性品種への病原性の獲得をもたらす。AVR-Pita, AVR-Pia の解析から、非病原性遺伝子の変異に DNA 組換えが関与していることが予想されている。これまでに、DNA 相同組換え修復に関与すると考えられる *S. cerevisiae* RAD51, RAD52, RAD54 のオーソログ, Rhm51, Rhm52, Rhm54 の解析を進めてきた。これらの遺伝子は少量ながら恒常的に発現し、MMS 処理や Methyl Viologen 処理によって強く誘導される。菌株 Ina168 と Ina86-137 を用い、 $\Delta rhm51$, $\Delta rhm54$ 変異を導入したところ、両変異株ともに生育の遅延、分生子形成量の減少、酸化ストレスへの感受性の増大がみられた。Ina86-137 の $\Delta rhm51$, $\Delta rhm54$ 変異株のイネへの接種試験を行ったところ、両変異株共に病原性は保っていたものの、病斑数の減少が観察された。変異株は、プラスチック上での付着器形成能の減少、付着器の浸透圧感受性が上昇し、構造的に脆弱になっており、これが病原性の低下の原因と考えられた。以上のことにより、イネいもち病菌において、DNA 相同組換え能は生育、分生子形成、病原性に必須ではないが、その効率化に関与していることが示唆された。

Influence of knock-out of DNA homologous recombinational repair genes in Rice Blast fungus.

Ryoko Kudo, Sali Atanga Ndindeng, Ayumi Abe, Taketo Ashizawaa* and Teruo Sone
(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., *NARC)

P-87

イネいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pia* の発現解析とその遺伝子座の解析

三木慎介, 大塚圭輔, 佐藤佑樹, 安田伸子*, 芦澤武人*, 平八重一之*, 曾根輝雄 (北大院農・応用菌学, NARC*)

AVR-Pia はイネ品種愛知旭の抵抗性遺伝子 *Pia* に対応するいもち病菌が持つ非病原性遺伝子で, 日本産菌株 Ina168 株からクローニングされた。*AVR-Pia* は全長 255 bp, そのうち 19 アミノ酸がシグナルペプチドであると考えられている。

AVR-Pia の転写時期を確かめるため, Ina168 株の孢子懸濁液を愛知旭に噴霧接種し, 経時的に接種葉から RNA を抽出した。qRT-PCR 解析を行ったところ, *AVR-Pia* は接種後 24 時間後で発現することが明らかとなった。また *AVR-Pia* の転写開始点と転写終結点を決定するため, 5' RACE と 3' RACE を行った結果, *AVR-Pia* の 80~110 bp 上流から転写され, 61~86 bp 下流で終結していることが明らかとなった。

続いて *AVR-Pia* のコピー数を調べるため, それを持つ 10 菌株の DNA を *EcoRI* により *AVR-Pia* の内部 1 箇所と外側で切断し, そのサイトの両側の DNA 領域をプローブとしてサザン解析を行った結果, Ina168 株では 3 コピー, その他の株では 1~2 コピーの *AVR-Pia* がゲノム上に存在することが分かった。さらに Ina168 株の染色体を PFGE で分離し, サザン解析を行ったところ最長の染色体のみにハイブリダイズしたことから, 3 コピーの *AVR-Pia* は全て同一の染色体上に存在していることが分かった。*AVR-Pia* 領域を含むコスミドクローンの塩基配列情報を基に, Ina168 株と Ina168m95-1 株 (宿主特異性変異株, *avr-Pia*) の違いを調べたところ, DNA 型トランスポゾン *Occan* の 3' 末端近接領域から 3 コピーの *AVR-Pia* を含む領域が, Ina168m95-1 株では大きく欠損していることが分かった。

なお, 本研究は生研センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」の援助を受けて行われた。

Analyses of *Magnaporthe oryzae* *AVR-Pia* locus and its expression

Shinsuke Miki, Keisuke Ohtsuka, Yuki Sato, Nobuko Yasuda*, Taketo Ashizawa*, Kazuyuki Hirayae* and Teruo Sone (Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ., NARC*)

P-88

イネいもち病菌のキチンデアセチラーゼ相同タンパク遺伝子 *CBPI*, *CBL1* の機能解析

大野優子, 村田紗弥香, 中嶋佑一, 鎌倉高志 (東理大・応生科)

イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* はイネに大きな被害をもたらす植物病原糸状菌であり, 付着器と呼ばれる感染特異的器官を形成して宿主植物内へ侵入する。この付着器形成は物理的シグナルまたは化学的シグナルによって誘導されることがわかっている。本菌における付着器形成機構を解明することを目的に, 付着器形成誘導時において高い発現特異性を示す遺伝子としてキチンデアセチラーゼ相同タンパク遺伝子 *CBPI* (chitin binding protein 1) を単離した。物理的シグナルのみが存在する人工固体基質上で *CBPI* 遺伝子破壊株の付着器形成率は低下し, 化学物質の添加によって野生株と同等まで付着器形成率が回復したことから, *CBPI* が物理的シグナルの認識に関与すると考えられた。さらに, *CBPI* とドメインレベルで相同性の高いキチンデアセチラーゼ相同タンパク遺伝子を発見し, *CBL1* (*CBPI* like gene 1) と名付けた。*CBL1* 遺伝子破壊株は野生株と変わらぬ形質を示したが, *CBPI**CBL1* 遺伝子二重破壊株は人工固体基質上で *CBPI* 遺伝子破壊株よりもさらに低い付着器形成率を示し, 化学物質を添加しても付着器形成率は完全には回復しなかった。このことから, *CBL1* が化学シグナルの認識に関与している可能性が示唆された。これらの結果から, *CBPI* と *CBL1* はイネいもち病菌の宿主感染に関わる遺伝子として重要な役割を果たしていると考え, さらに解析を進めている。

Involvement of *Magnaporthe oryzae* Chitin-Binding Protein Gene, *CBPI* and *CBL1*, in Appressorium Differentiation.

Yuko Ohno, Sayaka Murata, Yuichi Nakajima, Takashi Kamakura (Tokyo Univ. of Science)

P-89

イネいもち病菌における細胞壁成分 α -1, 3-グルカンの宿主感染に関わる役割

藤川貴史¹・久我ゆかり²・矢野成和³・阿部敬悦⁴・西村麻里江¹ (¹生物研・²広大院総科・³立命館大・⁴東北大未来研)

昨年度本大会で、我々はイネいもち病菌(*Magnaporthe grisea* = *M. oryzae*)が宿主感染時に α -1,3-グルカン (α -G) を蓄積させることを報告した。今回、 α -G の役割について更なる知見を得たので報告する。いもち病菌の侵入菌糸において、細胞壁主成分であるキチンや β -1,3-グルカン (β -G) が α -G によってマスクされていることは蛍光顕微鏡観察によって前回報告した。これを確かめるために免疫電子顕微鏡観察を行った。観察には α -G 及び β -G を認識する一次抗体とそれぞれに特異的な蛍光標識された二次抗体を用いた。その結果、両グルカンは侵入菌糸の細胞壁内に広く分布していたが、 α -G は β -G よりもより細胞壁の外側に局在する傾向にあることがわかった。次に α -G が菌糸細胞壁に蓄積されることによってキチナーゼに対する耐性に変化があるかどうか調べた。菌糸のキチナーゼ耐性は、無処理時よりも α -G 蓄積時 (植物ワックス成分処理時) の方が高く、また α -1,3-グルカナーゼ処理によってキチナーゼ耐性は低下した。更に α -G を蓄積しない *mpsI* 変異株では α -1,3-グルカナーゼ処理に関わらずキチナーゼ耐性は低く、一方 α -G を恒常的に蓄積する *mkk1^{DD}* 変異株では植物ワックス成分処理時同様にキチナーゼ耐性は高かった。これらのことから α -G はいもち病菌細胞壁で空間的且つ機能的に他の細胞壁主成分をマスクしていることがわかった。これはいもち病菌が宿主感染時に、宿主の免疫システムに積極的に回避していることを示唆する。

(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」、農水省委託プロ「新農業展開ゲノムプロジェクト」により支援をうけた。)

Ref: Fujikawa et al. (2009) Mol. Microbiol. 73: 553-570

Role of a cell wall component, α -1,3-glucan in *Magnaporthe grisea*.

Takashi Fujikawa¹, Keietsu Abe², Marie Nishimura¹ (¹NIAS, ²Hiroshima Univ., ³Ritsumeikan Univ., ⁴Tohoku Univ., NICHe)

P-90

abaA は *Fusarium oxysporum* の小型分生子，大型分生子，bud cell 形成に関与する

金野亜紀，寺岡 徹，有江 力 (農工大院農)

植物病原菌 *Fusarium oxysporum* は無性孢子として、小型分生子，大型分生子，厚膜孢子，さらに、振とう培養時には bud cell を形成する。本菌はトマトなどの宿主に感染した後、導管流とともに孢子が移動することによって迅速に全身に転移する (松尾ら，1982)。そのため、*F. oxysporum* の孢子形成能が病原性に関与していることが想定された。*abaA* は *Aspergillus* 属等の孢子形成時に制御因子として働く遺伝子である (Mirabito et al., 1989)。今回、トマト萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*FOL*) において、*A. nidulans* の *abaA* のホモログ *FoabaA* を同定した。*FoabaA* は PSB 培地上の振とう培養および静置培養のいずれの条件でも転写された。二回相同組換えによって得られた *FOL* の *FoabaA* 破壊株では、PSA 培地上での菌糸成長速度は親株と同等であった。*FoabaA* 破壊株は厚膜胞子を親株と同等に形成したが、小型分生子，大型分生子，bud cell を形成しなかった。従って、*FoabaA* は *F. oxysporum* の小型分生子，大型分生子，bud cell 形成に関与していることが判明した。

abaA controls development of microconidia, macroconidia and bud cells in *Fusarium oxysporum*

Aki konno, Tohru Teraoka, Tsutomu arie
(Tokyo Univ. of Agric. & Tech.)

P-91

MAT1 イディオモルフを入れ換えた *Fusarium oxysporum* の性状調査

椎葉岳彦, 今井俊介, 寺岡徹, 有江力 (農工大院農)

Fusarium oxysporum は交配不全性 (asexual) であるが、ゲノム上に交配型遺伝子 (*MAT1*) 領域を持ち、*MAT1* 領域に 2 型 (*MAT1-1*、*MAT1-2*) が存在し (Arie *et al.* 2000)、*MAT1* 遺伝子が発現する (Yun *et al.* 2000) 等から、本質的には self-incompatible (ヘテロタリック) な交配能を持ち得ると想定されている。一方、*F. oxysporum* の 1 分化型であるトマト萎凋病菌 (*FOL*) には *MAT1-1* と *MAT1-2* の株が存在するものの、*MAT1-1* 株と *MAT1-2* 株の染色体パターンが異なっている (今井ら 2007)。そこで、*FOL* の交配不全の原因が、「異交配型菌株間の染色体パターンの違い」にあると想定、*FOL* tomino1-c 株 (*MAT1-2*) を用い、染色体パターンが同一で、*MAT1-2* 領域を *MAT1-1* 領域に入れ換えた株を作出し、交配試験に供した。現在までに、素寒天培地、V-8 ジュース寒天培地、トマト等の植物組織片を加えた培地を用い、光や温度条件等を変えて入れ換え株と tomino1-c 株の交配試験を行っているが、子囊殻様構造の形成は確認できていない。そこで、*MAT1* 領域を入れ換えた株で形質転換による性状変化が起きていないことを確認するため、培地上での生育速度、気中菌糸の有無、胞子形成、病原性、菌糸合群 (VCG) について調査した。MM 培地及びニンジン寒天培地上での生育速度、トマトに対する病原性は親株である tomino1-c と同等で変化はなかった。入れ換え株の硝酸塩利用能欠損株 (*nit* 変異株) を作出し、VCG テスターである tomino1-c (VCG0033) 及び 880621a-1 (VCG0031) の *nit* 変異株と MM 培地上で対峙培養したところ、tomino1-c とは菌糸会合部で菌糸合したが、880621a-1 とは菌糸合せず、入れ換え株の VCG は親株と同じ VCG0033 であり、*MAT1* 領域は VCG に関与しないことが判明した。

Analysis of properties of *MAT1* idiomorph-replaced transformant of *Fusarium oxysporum*

Takehiko Shiiba, Shunsuke Imai, Tohru Teraoka, Tsutomu Arie
(Tokyo Univ. of Agric. & Tech.)

P-92

イネいもち病菌に生育阻害をもたらす 2 種のマイコウイルスの性状解析

鈴木佐, 加藤幸栄, 浦山俊一, 青木菜々子, 有江力, 寺岡徹, 福原敏行, 森山裕充 (農工大院・農学府)

イネいもち病菌 58 株からマイコウイルス感染株をスクリーニングしたところ、11 株からウイルスゲノム由来の 2 本鎖 RNA が検出された。このうち、MOS47 株は最も多い 8 本の 2 本鎖 RNA セグメント (3.6、3.1、2.9、2.8、2.4、2.2、1.9、1.2 kbp) を有し、高分子側 4 セグメント、低分子側 4 セグメントがそれぞれ独立した挙動を示すことから、少なくとも 2 種のウイルスの混合感染が示唆された。本研究室で解析中である MOS21 株に感染している MoCV1 (*Magnaporthe oryzae* Chrysovirus 1) との塩基配列の相同性比較により、高分子側 4 セグメント (3.6、3.1、2.9、2.8 kbp) は Chrysoviridae 科に属することが示唆され、MoCV2 (*Magnaporthe oryzae* Chrysovirus 2) と仮称した。また、低分子側 4 セグメント (2.4、2.2、1.9、1.2 kbp) はアマさび病菌に内在する 2 本鎖 RNA との相同性を示し、MoEV1 (*Magnaporthe oryzae* Endogenous virus 1) と仮称した。シクロヘキシミドによる治癒処理や継代培養中に起きたウイルスの脱落現象を利用し、混合感染株 (MoCV2+MoEV1)、MoCV2 単独感染株、MoEV1 単独感染株、治癒株 (ウイルスフリー) の 4 株を新たに分離することに成功した。これらの株は 2 種のウイルスの存在パターンによって、菌糸の溶菌現象や分生子形成数などで異なる表現型が観察された。現在、MoCV2、MoEV1 の全塩基配列の解析を行っている。

Characterization of two distinct mycoviruses causing impaired against *Magnaporthe oryzae*

Yu Suzuki, Sachie Kato, Syunichi Urayama, Nanako Aoki, Tsutomu Arie, Tohru Teraoka, Toshiyuki Fukuhara,
Hiromitsu Moriyama
(Faculty of Agriculture, Tokyo Univ. of Agric. & Tech.)

P-93

ABC transporter $\Delta abc-1$ と MFS transporter $\Delta ant-1$ の殺菌剤感受性

高橋正和, 山下和宏, 石川智子, 亀井誠之, 福森文康, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院 生命科)

ATP binding cassette (ABC) family や Major facilitator superfamily (MFS) のトランスポーターは、殺菌剤に対する多剤耐性に関与することが植物病原菌や医真菌で報告されている。両タイプのトランスポーターはゲノムに多数存在するが、アカパンカビでは網羅的な遺伝子破壊株プロジェクトによりすでに多くの破壊株が作出されている。今回は、ABC トランスポーター $abc-1$ 遺伝子と MFS トランスポーター $ant-1$ 遺伝子について解析をおこなったので報告する。 $abc-1$ 遺伝子は、マイクロアレイ解析からフルジオキシニル (OS-2MAP キナーゼ活性化剤) およびメナジオン (酸化剤) により顕著に誘導が認められた。リアルタイム PCR 解析から、同遺伝子の誘導は、OS-2 MAP キナーゼや AP-1 型転写因子 (NAP-1) に非依存的に誘導された。同遺伝子のオルソログである灰色かび病菌の $BcatrB$ は、フルジオキシニルで誘導され、その破壊株はフルジオキシニルに感受性になることが報告されている。しかし、 $abc-1$ 株は、フルジオキシニルあるいはメナジオンに顕著な感受性を示さなかった。一方、トランスポーター遺伝子破壊株の薬剤感受性スクリーニングから、 $\Delta ant-1$ 株がアンチマイシン A に顕著に感受性を示すことを見出した。 $\Delta ant-1$ 株は、二種類のミトコンドリア電子伝達系 Complex III 阻害剤 (アンチマイシン A (Qi 型) とアゾキシストロビン (Qo 型)) に高い感受性を示したが、メナジオンやフルジオキシニル感受性は野生株と同等であった。 $\Delta ant-1$ 株の Complex III 阻害剤感受性は、 $\Delta aod-1$ (alternative oxidase) 株とおよびその転写調節因子 $\Delta aod-5$ 株とほぼ同等であり、ANT-1 はシアン耐性呼吸の誘導に関わる可能性が示唆された。

Characterization of two transporter $\Delta abc-1$ and $\Delta ant-1$ strains in *Neurospora crassa*

Masakazu Takahashi, Kazuhiro Yamashita, Tomoko Ishikawa, Masayuki Kamei, Akihiko Ichiishi, Fumiyasu Fukumori, Makoto Fujimura (Fac.of Life Sci., Toyo Univ)

P-94

Cryphonectria parasitica の新規低分子量 GTP 結合タンパク質 RAS3

高橋拓也¹, Gil H. Choi², Donald L. Nuss², 笠原紳¹ (¹宮城大・食産業・環境、²U. of Maryland Biotech. Inst.)

RAS スーパーファミリーに属する新たな低分子量 GTP 結合タンパク質をクリ胴枯病菌 *Cryphonectria parasitica* に見出し解析した。RAS3 と命名された本タンパク質は、同菌においてすでに確認されている RAS1 および RAS2 とは、アミノ酸のレベルで 40% および 43% の相同性を有していた。本タンパク質は、他の RAS 関連タンパク質にほぼ共通して認められる C-末端領域の脂質付加部位 (CAAX Box) を欠くことが特徴であり、動物の RIN1 および RIT との共通性が認められた。本タンパク質の遺伝子 $ras3$ を破壊してその影響を検討し、また $ras1$ および $ras2$ 遺伝子破壊株とも比較しながら、*C. parasitica* における RAS の全体的な調節機構を推定した。また $gpd-1$ プロモーターによる過剰発現実験を行い、その影響について調べた。さらに脂質付加部位と予想される Cys 残基を置換する変異を導入し、変異タンパク質の細胞内局在性や安定性について検討を加えた。

Identification of *Cryphonectria parasitica* small G-protein RAS3

Takuya Takahashi¹, Gil H. Choi², Donald L. Nuss², and Shin Kasahara¹

(¹Dept. of Environmental Sciences, Miyagi Univ. School of Food, Agricultural and Environmental Sciences,

²Center for Biosystems Research, U. of Maryland Biotec. Inst.)

P-95 (O-11)

植物共生糸状菌 *Epichloë festucae* のもつ植物細胞死誘導タンパク質遺伝子 NLP の相同遺伝子は細胞死誘導活性を失う変異を持つ

赤野史岳, 川北一人, 竹本大吾 (名大院生命農・生物機構)

Epichloë festucae は牧草ペレニアルライグラスの細胞間隙で伸長し、共生関係を保っている糸状菌エンドファイトである。糸状菌、卵菌、細菌など様々な生物から同定され、植物の細胞死を誘導することが知られている分泌タンパク質 NLP (Nep1-like proteins) 遺伝子の相同配列を *E. festucae* のゲノム配列から探索したところ 2 種類の NLP 遺伝子 (*EfnLP1*, *EfnLP2*) が見いだされた。さらに詳しく調べたところ、*EfnLP1* は 2 つのイントロンのスプライシングが正常に行われず、偽遺伝子化していた。また *EfnLP2* には NLP で保存性の高い領域のアミノ酸に変異があることが解った。細胞死誘導活性が強い *Phytophthora sojae* の NLP (*PsojNIP1*) の保存領域に *EfnLP2* に見られる変異を導入した *PsojNIP1(QY)* をアグロバクテリウム を介してベンサミアナタバコに発現させたところ、*PsojNIP1* で認められる細胞死誘導活性が失われることが明らかとなった。このことより、共生糸状菌が進化の過程で細胞死誘導タンパク質の保存領域への変異を獲得し、宿主との共生を可能にした可能性が考えられた。

Mutations in genes for secretory protein NLP from *Epichloë festucae* compromised cell death-inducing activity of NLP.

Fumitake AKANO, Kazuhito Kawakita, Daigo Takemoto

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

P-96

植物病原および共生糸状菌の菌糸伸長時および宿主植物感染過程におけるカルシウムイオン濃度変動と活性酸素種生成の関与

潮田遼, 川北一人, 竹本大吾 (名大院生命農・生物機構)

糸状菌の菌糸成長や病原糸状菌の感染過程において、カルシウムイオン(Ca^{2+})が重要な役割を担っていることが報告されている。植物病原菌であるイネばか苗病菌、イネいもち病菌、ナシ黒斑病菌およびライグラス共生菌に Ca^{2+} センサータンパク質である Yellow Cameleon 3.60 (YC3.60) を導入し、培地上で生育しているそれぞれの菌の菌糸を観察したところ、コロニー成長の速い菌ほど菌糸先端において頻繁な Ca^{2+} 濃度振動が認められた。ナシ黒斑病菌では、孢子発芽直後の発芽菌糸および付着器で特に高い Ca^{2+} の蓄積が恒常的に観察された。一方、イネばか苗病菌は付着器の形成が見られず Ca^{2+} の蓄積も認められなかった。糸状菌の菌糸先端部で生成される活性酸素と Ca^{2+} の関係を調べるため、活性酸素生成阻害剤である DPI を加えた培地で Ca^{2+} 濃度振動を観察したところ、いずれの菌においても顕著な影響は見られなかった。一方、 Ca^{2+} 阻害剤である EGTA を加えた培地での活性酸素生成を O_2 検出試薬 NBT を用いた染色で調べたところ、活性酸素生成が増加する傾向が認められた。この結果は、 Ca^{2+} が糸状菌の活性酸素生成を負に制御している可能性を示唆した。

Monitoring Ca^{2+} concentration and production of reactive oxygen species in plant pathogenic and symbiotic fungi during hyphal growth and plant infection.

Haruka Shiota, Kazuhito Kawakita, Daigo Takemoto

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

代表発表者索引

C

Dan Cullen.....14

G

Sharon Marie Garrido77

P

Juliano de Oliveira Porciuncula 38, 63

Sastia Prama PUTRI78

U

Cristiane A. Uchima.....64

あ

赤木靖典.....81

赤野史岳..... 33, 88

渥美元規.....76

い

飯田祐一郎34

石井智子37

石田亘広66

石田泰大46

泉津弘佑83

稲見圭悟 34, 82

え

江部孝太朗51

お

大野優子84

大場 歩75

岡本綾子40

奥原 徹 28, 45

小関卓也61

Ken Oda31

小野崎保道54

尾山真一61

か

加座健士郎..... 42

片山琢也 53

加藤直樹 80

亀井誠之 74

河内護之 56

き

菊間隆志 54

木村美紀 79

桐藤万裕 41

こ

小池英明 29

小町裕司 68

金野亜紀 85

さ

齋藤禎一 32

佐伯 圭 58

酒井香奈江 77

阪本鷹行 73

坂本裕一 71

笹川哲裕 65

佐々木武馬 71

佐々木智江美 58

佐藤佳奈子 67

佐藤宏樹 59

佐野元昭 36

し

椎葉岳彦 86

潮田 遼 88

志田洋介 36

篠原靖智 80

清水謙多郎 16

志水元亨 75

す

杉本直久 63

鈴木 聡 44

鈴木一史 73

鈴木 佑 86

鈴木啓仁……………74
須田直樹……………64

せ

妹尾悠平……………47

そ

曾根輝雄……………83

た

高尾和実……………81
高橋拓也……………87
高橋正和……………87
高間 充……………76
多田功生……………60
田中大介……………56
田中瑞己……………57
田中良男……………69
田鍋康子……………51

つ

對崎真楠……………32, 52

と

徳永欽也……………35, 79

な

内藤 篤……………62
中沢威人……………72
中澤 光……………38
中田裕治……………28, 48
中出啓子……………72
中野浩幸……………50
難波麻美……………62

に

西 達也……………19
西田洋巳……………21
西出 晶……………53

ね

根本 崇……………43

の

野村孝典……………47

は

服部領太……………70
早川雄悟……………49

ひ

樋口裕次郎……………31, 52
平山佳代子……………65

ふ

藤川貴史……………85
藤本仁寿……………67
二神泰基……………55

ほ

堀 千明……………37, 59
本田裕樹……………46

ま

前田 浩……………44
牧野雄也……………66
町田雅之……………25
松下（森田）真由美……………68
松田侑大……………78
松比良和晃……………45
丸井淳一朗……………69
丸山潤一……………29

み

三木慎介……………84
宮崎健太郎……………23

む

村垣公英……………60
村口 元……………30

も

本山高幸……………35
森田寛人……………70
森脇明弘……………33

や

柳澤 晋	50
山形洋平	39
山口裕一郎	82
山下和宏	55
山下伸雄	42

ゆ

尹 載宇	43
------	----

よ

吉見 啓	39
------	----

わ

若泉賢功	41
若林奈央	49
和田朋子	48
渡邊泰祐	30
和田龍太	57

糸状菌分子生物学研究会 会則

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

以上

補則

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

糸状菌分子生物学研究会運営委員会名簿（2008年度）

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