

557 *Aspergillus nidulans* の CPY1 相同遺伝子のクローニング

大隅恵介、松田豊、○中島春紫、北本勝ひこ（東大院・応生工）

【目的】糸状菌 *A. nidulans* では菌糸先端部以外の細胞は液胞が大きな体積を占めており形態形成に大きな役割を果たしていると考えられるが、液胞のマーカー酵素が明らかになっていないために、その解析はほとんどなされていない。酵母 *S. cerevisiae* の Carboxypeptidase Y (CPY) は液胞に局在する酵素であり、液胞機能の遺伝生化学的解析の指標となってきた。本研究では、*A. nidulans* の CPY 遺伝子をクローン化することにより、糸状菌の液胞機能の解析を行うことを目的とする。

【方法および結果】*A. nidulans* のゲノムプロジェクト database より見いだされた、CPY と相同性を有する EST の塩基配列をもとに作製したプライマーを用いて *A. nidulans* 染色体 DNA に対して PCR を行った。増幅された 0.4 kb DNA 断片をプローブとして、*A. nidulans* 染色体 DNA ライブラリーを検索することにより、CPY 相同遺伝子を含む領域をクローン化し、*cpyA* と命名した。塩基配列を解析したところ、*cpyA* 遺伝子はイントロンを 1 つ含んでおり、*S. cerevisiae* および *C. albicans* の CPY とそれぞれ 64.2%, 66.5% の相同性を有する 552 アミノ酸の蛋白質がコードされているのが見いだされた。現在、GFP との融合蛋白質を作製して、その局在性について検討を行っている。

Cloning of CPY1 homologous gene from *Aspergillus nidulans*

Keisuke Ohsumi, Yutaka Matsuda, ○Harushi Nakajima, Katsuhiko Kitamoto, (Dept. Biotechnol., Tokyo Univ.)

【Key Words】*Aspergillus nidulans*, vacuole, carboxypeptidase Y, CPY1558 高度不飽和脂肪酸生産性糸状菌 *Mortierella* の NADH-cytochrome b_5 reductase 遺伝子の麹菌での発現とその精製

(京大院農・応用生命) ○櫻谷英治、小林達彦、清水 昌

【目的】我々はこれ迄に、*Mortierella alpina* 1S-4 およびその誘導変異株が、アラキドン酸を始めとする有用な高度不飽和脂肪酸を菌体内に著量蓄積することを報告してきた。このことから本菌株は、多様で特異な高度不飽和脂肪酸生合成系と不飽和化系を兼ね備えていると推測される。そこで、まず我々は脂肪酸不飽和化反応に着目し、本菌株からその反応に関与するミクロソーム電子伝達系の構成要素である NADH-cytochrome b_5 reductase 遺伝子のクローン化に成功した。今回は、本酵素遺伝子の *Aspergillus* 属糸状菌での発現とその精製について報告する。

【方法・結果】既にクローン化した本酵素遺伝子を宿主 *Aspergillus oryzae* (*niaD*⁻) とベクター pNGA8142 から成る宿主ベクター系で発現させることに成功した。本酵素遺伝子を pNGA8142 の *Hind*III-*Xba*I サイトに挿入して発現ベクターを構築し、*A. oryzae* に形質転換した。数個の形質転換株の内、フェリシアン還元活性が最も高い MCR-1 株を得た。MCR-1 株のミクロソーム画分のフェリシアン還元活性はコントロールのそれと比べて 4.7 倍であった。さらに、MCR-1 株で発現した本酵素をほぼ均一に精製することができ、精製酵素標品の比活性は約千倍に上昇した。 Expression of the NADH-cytochrome b_5 reductase cDNA from an arachidonic acid-producing fungus, *Mortierella* in a transgenic fungus, *Aspergillus* and purification of its product

○Eiji Sakuradani, Michihiko Kobayashi, Sakayu Shimizu (Div. Appl. Life Sciences, Kyoto Univ.)

【Key Words】*Mortierella*, NADH-cytochrome b_5 reductase, expression