

449 麹菌 *Aspergillus oryzae* 単核分生子変異株を用いた宿主の開発

○石 一智¹, 丸山潤一², 中島春紫¹, 北本勝ひこ¹ (¹ 東大院・農生・応生工, ² 生研機構)

【目的】麹菌 *A.oryzae* が多核の分生子を形成する性質は醸造特性の遺伝的安定性に寄与しているが、変異株取得及び形質転換体からのホモカリオン体取得が容易ではない。演者らは *A. oryzae* niaD300 株に *h2b-egfp* を *niaD* を選択マーカーとするプラスミドにより導入し核を可視化した。今回、この株を親株として取得した単核分生子を約 80% 形成する変異株 uni10¹)を用いた形質転換用宿主の開発を行った。

【方法および結果】*niaD*⁺ 株では生育できない塩素酸塩を含む培地に uni10 を植菌し、生育してきたコロニーより硝酸塩を資化できず、EGFP 蛍光を有さない株を取得した。この株について、サザン解析および PCR により、染色体に組み込まれていたプラスミドの脱落により *niaD*⁻ に戻ったことが示された。この株に *niaD* を持つプラスミドを導入したところ、形質転換体を取得できた。現在、この株における形質転換効率とホモカリオン体取得効率を検討中である。また、*sC*⁻ との 2 重栄養要求性株の取得を試みている。

1) 石ら、日本農芸化学会 2002 年度大会 (仙台) 講演要旨集 p 198

The breeding of the host strain using the uninucleate conidia mutant of *Aspergillus oryzae*

○Kazutomo Ishi¹, Jun-ichi Maruyama², Harushi Nakajima¹, Katsuhiko Kitamoto¹ (¹Dept. Biotech., Univ. Tokyo, ²BRAIN)

Key words *Aspergillus oryzae*, conidium, *niaD*, host, transformation

451 黒麹菌 *Aspergillus niger* No.12 株由来エキソ型イヌリナーゼ遺伝子のクローニングと解析

○森山 聡, 田中秀典, 上瀧正智, 六車三治男, 太田一良 (宮崎大・農・応生科)

【目的】*A. niger* No.12 株は、多糖イヌリンの非還元末端より順次フルクトース単位で加水分解するエキソ型イヌリナーゼ P-I 及び P-II を細胞外に生産する。本報では、エキソ型イヌリナーゼ P-I の構造解析を目的として本酵素遺伝子 *inuE* をクローニングした。

【方法・結果】本酵素の N 末端アミノ酸配列とエキソ型イヌリナーゼに保存された内部アミノ酸配列を基に一对のオリゴヌクレオチド (21 mer) を合成した。これをプライマーとして本菌株の染色体 DNA から *inuE* 遺伝子の一部 (900 bp) を PCR で増幅した。この増幅産物を DIG 標識し、プローブとして染色体 DNA から *inuE* 遺伝子を含む *Bam*HI 断片 (3660 bp) をクローニングした。その ORF はアミノ酸 19 残基のシグナル・ペプチドと 518 残基の成熟タンパク質をコードし、ORF 内に 60 bp のイントロンが介在した。また、翻訳開始コドンの 75 bp 上流に TATA ボックス (TATAAA) が認められた。成熟タンパク質には 1 個のシステイン残基、9 個の N-グリコシド結合型糖鎖付加部位が存在し、その推定分子量は 59,142 Da、等電点は 5.14 であった。分泌シグナルを含む *inuE* cDNA をベクター pPIC3.5 によりメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* GS115 株に導入した結果、エキソ型イヌリナーゼが分泌発現した。

Cloning and characterization of an exoinulinase gene from *Aspergillus niger* strain 12

Satoshi Moriyama, Hidenori Tanaka, Masato Uwataki, Michio Mugu-
ruma, Kazuyoshi Ohta (Dept. Biochem. Appl. Biosci., Miyazaki Univ.)

Key words *Aspergillus niger*, exoinulinase, inulin

450 麹菌 *A. oryzae* における *S. cerevisiae* VAM3 相同遺伝子の単離と解析

○正路淳也, 丸山潤一, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生・応生工)

【目的】液胞は細胞内イオンの恒常性維持、膨圧の調節、タンパク質などの分解、再利用など重要な機能を有しているが、植物や酵母に比べ麹菌においては研究が遅れている。また、産業的に重要な液胞内局在酵素の輸送という観点からも興味が持たれる。本研究では麹菌の液胞機能に関する知見を得ることを目的とし、*S. cerevisiae* の液胞膜 t-SNARE をコードする *VAM3* 遺伝子の、麹菌 *A. oryzae* における相同遺伝子のクローニングを試みた。

【方法及び結果】*A. oryzae* EST database の情報をもとに、*S. cerevisiae* *VAM3* 相同遺伝子ならびに cDNA を取得した。この遺伝子は一つのイントロンを含み 271 アミノ酸からなるタンパク質をコードすると推定された。予想されるアミノ酸配列は、*S. cerevisiae* の *Vam3* と 24%、プレ液胞コンパートメントの t-SNARE である *Pep12* と 29% の相同性を有していた。単離した cDNA は、*S. cerevisiae* *vam3* 破壊株の液胞形態の異常、Ca²⁺ 感受性および *pep12* 破壊株の CPY 活性欠損、温度感受性の形質をそれぞれ相補した。また、この遺伝子産物の N 末に EGFP を融合して *A. oryzae* において発現させたところ、蛍光は液胞膜およびより小さな丸い構造体に観察された。現在機能解析を目的として、遺伝子破壊株の作製を行っている。

Cloning and characterization of a putative homologue of yeast *VAM3* gene from *A. oryzae*.

○Junya Shoji, Jun-ichi Maruyama, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto (Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

Key words *Aspergillus oryzae*., VAM3, PEP12, t-SNARE, vacuole

452 *Aspergillus nidulans* の 2 種の protein O-mannosyl-transferase の構造機能解析

○岡 拓二, 濱口 哲, 野中真由子, 後藤正利, 古川謙介 (九大院・生資環)

【目的】O-マンノース型糖鎖生合成は protein O-D-mannosyltransferase (Pmt) によるペプチド鎖の Ser/Thr 残基へのマンノース転移に始まる。*Aspergillus* 属麹菌の O-型糖鎖は主に 1-3 残基のマンノースからなり、糖鎖の結合様式は α 1,2-, α 1,3- に加え、 α 1,6- 結合による分岐構造も認められる。本報では、麹菌の O-型糖鎖生合成機構の解明を目的として O-型糖鎖生合成の初発酵素である麹菌 *pmt* 遺伝子の構造及び機能解析を行った。

【方法及び結果】*A. nidulans* から *pmt* と推定される 2 つの遺伝子 (*pmtA*, *pmtB*) を取得した。*pmtA*, *pmtB* は、それぞれ 740, 761 アミノ酸をコードしており、分子進化系統樹解析の結果、*pmtA* は ScPmt2p, *pmtB* は ScPmt1p のサブグループに属していた。ノーザンブロット法による転写解析の結果、*pmtA*, *pmtB* は培養 24 時間から 48 時間まで一定の転写を示した。また、*pmtA* の機能を解析するために *A. nidulans* *pmtA* 破壊株 (P3 株) を構築し解析を行った。P3 株ではマンノースルトランスフェラーゼ活性が野生株の 6% にまで低下し、菌糸の途中が膨らむバルーン構造の形成、分生子形成能の低下、菌糸成長阻害など表現形が野生株とは異なっていた。これらの結果より、P3 株では細胞内の様々な O-型糖鎖付加タンパク質の機能が低下もしくは消失しているものと考察した。一方、麹菌の代表的な分泌タンパク質であり O-型糖鎖付加酵素として知られる *A. awamori* 由来グルコミラーゼ I (GAI) についても解析した。GAI をコードする遺伝子 *glaA* を野生株及び P3 株に導入した株を構築し、それぞれの株由来の分泌 GAI を抗-GAI 抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。GAI の SDS-PAGE における移動度は異なっており O-型糖鎖の減少が確認された。現在、*pmtB* における遺伝子破壊株の構築を試みており、*pmtA* との機能の相違を解析している。

Structural and functional analyses of the two *pmt* genes from *Aspergillus nidulans*

○Takuji Oka, Tetsu Hamaguchi, Mayuko Nonaka, Masatoshi Goto, Kensuke Furukawa (Dept. Biosci. Biotech., Kyushu Univ.)

Key words *Aspergillus nidulans*, O-glycosylation, mannosyltransferase