

## 2A13-5 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の *impala* 様 DNA トランスポゾン *Aoimp1* の転移活性

○小笠原 博信<sup>1,3</sup>, 小畑 浩<sup>2</sup>, 秦 洋二<sup>2</sup>, 高橋 砂織<sup>1</sup>, 五味 勝也<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>秋田県総合食研・生物機能, <sup>2</sup>月桂冠・総研, <sup>3</sup>東北大院・農・生物産業創成)

【目的】実用麹菌 *Aspergillus oryzae* OSI1013株から見出された新規トランスポゾン *Aoimp1* は、転移活性が高い *Fusarium* 属の *impala* とアミノ酸レベルで高い相同性を有し、麹菌における転移活性が期待された。高温培養や  $\text{CuSO}_4$  添加培養時にトランスポゼース (*aotA*) の転写量上昇が認められた<sup>1)</sup> ことから、トランスポゾンを用いた優良変異株の育種や Tagging 法の開発を目的として、転移誘発条件と転移機能について解析した。【方法と結果】ストレス条件下の培養で形成させた分生子を用い、 $\text{KClO}_3$  培地で耐性株として選択したコロニーについて、硝酸資化性関連遺伝子 (*crnA*, *niaD*, *areA*, *nirA*) による Transposon-Trapping を行った。その結果、 $\text{CuSO}_4$  培地で形成させた分生子から、*crnA* プロモーター領域への挿入 (順位, 逆位) 株が高頻度で得られた。定量 RT-PCR により *crnA* 転写量を測定したところ、両方向の挿入株ともに親株の 1/10 に低下していた。さらに、高濃度  $\text{CuSO}_4$  培地で形成させた分生子では、*crnA* 挿入効率が低下する一方で、*niaD* プロモーター領域への挿入株が得られた。また、高温条件下で  $\text{KClO}_3$  耐性株を取得した場合にも、*crnA* コード領域への様々な挿入株が得られることから、*Aoimp1* はストレス条件下で転移活性を示すことが明らかとなった。

1) 小笠原ら, 日本農芸化学会 2005 年度大会要旨集, p60

## Transposition of *impala*-like DNA transposon *Aoimp1* in *Aspergillus oryzae*

○Hironobu OGASAWARA<sup>1,3</sup>, Hiroshi OBATA<sup>2</sup>, Yoji HATA<sup>2</sup>, Saori TAKAHASHI<sup>1</sup>, Katsuya GOMI<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>Akita Reg. Inst. Food and Brewing, Bioeng., <sup>2</sup>Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., <sup>3</sup>Div. Biosci. Biotech. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, transposon, *crnA*, transposon-trapping

## 2A14-2 麹菌 *A. oryzae* における *Aovps24* 遺伝子の単離と機能解析

○辰巳 晶紀, 菊間 隆志, 有岡 学, 北本 勝ひこ  
(東大院・農生科・応生工)

<背景及び目的> VPS (vacuolar protein sorting) 遺伝子は出芽酵母 *S. cerevisiae* において液胞酵素 carboxypeptidase Y (CPY) を細胞外に分泌する変異に関する遺伝子であり、タンパク質輸送機構や液胞機能などに関与することが知られている。近年、後期エンドソームから液胞への輸送を司る multivesicular body (MVB) の形成に関わるタンパク質が酵母や糸状菌に存在し、それらがアルカリ性 pH 応答を制御する Rim101 経路にも関与することが報告されている。本研究では *A. oryzae* における pH 応答と液胞機能、タンパク質輸送機構を解明することを目的に、MVB の形成に関わる *Aovps24* 遺伝子の機能解析を行った。<方法及び結果> *A. oryzae* のゲノムデータベースを基に *VPS24* と相同性の高い遺伝子 (*Aovps24*) を単離した。*Aovps24* は 1 つのイントロンを含み、228 個の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。*AoVps24* は *S. cerevisiae*, *S. pombe* の *Vps24* とそれぞれ 34.1%、30.7% の相同性を示した。*Aovps24* の機能を調べるため、同遺伝子の破壊株を作成した。得られた破壊株は著しい生育阻害を示し、また菌糸先端の多分岐や膨潤といった形態異常も見られた。また分生子形成も見られなかった。これらのことから、*Aovps24* が多面的な機能を持つこと、あるいは糸状菌における液胞輸送が形態形成や分化にも関与することが示唆された。さらに *AoVps24* と EGFP の融合タンパク質を発現させ、細胞内局在を観察している。また pH 応答に関しての *Aovps24* の機能を解析中である。

## Cloning and functional analysis of *Aovps24* gene from *A. oryzae*

○Akinori TATSUMI, Takashi KIKUMA, Manabu ARIOKA, Katsuhiko KITAMOTO  
(Dept. Biotech., Univ. Tokyo)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, vacuolar protein sorting, vacuole

## 2A14-1 クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* における alternative oxidase 遺伝子 (*aox1*) の破壊による活性酸素耐性の低下

○服部 貴澄, 木野 邦器, 桐村 光太郎  
(早大・理工・応化)

【目的】クエン酸生産糸状菌 *A. niger* WU-2223L は通常のシトクロム呼吸系の他にシアン非感受性呼吸系を有する。演者らは、当該呼吸系を構成する酵素 alternative oxidase をコードする遺伝子 (*aox1*) を取得している<sup>1)</sup>。本研究では、*aox1* 遺伝子破壊株を作成し、活性酸素種を含む培地での生存率を測定した。さらに、catalase (CAT) 活性、superoxide dismutase (SOD) 活性を測定し、*aox1* の破壊が活性酸素耐性に及ぼす影響について検討した。【方法および結果】*A. niger* WU-2223L における *aox1* 破壊株 (DAOX-1) は、*pyrG* 破壊株を宿主として相同組換えによって作成した。DAOX-1 では、*aox1* の転写および alternative oxidase 活性が消失したことを確認した。DAOX-1 は、5 mM の過酸化水素を含む培地上での生存率が WU-2223L のその約 20% となり、活性酸素耐性の低下が認められた。また、同条件下で 4 日間生育させた DAOX-1 については、WU-2223L と比較して CAT 比活性が約 1.2 倍、SOD 比活性が 10 倍以上に増大していた。以上の結果は、*aox1* 破壊にとりもなう alternative oxidase 活性の消失により、DAOX-1 菌体内において活性酸素種が増大したことを強く示唆した。

1) K. Kirimura et al., Curr. Genet., 34, 472-477 (1999)

## Decrease of Resistance to Reactive Oxygen Species by Disruption of Alternative Oxidase Gene (*aox1*) in Citric Acid-Producing *Aspergillus niger*

○Takasumi HATTORI, Kuniki KINO, Kohtaro KIRIMURA  
(Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ.)

**Key words** alternative oxidase, *Aspergillus niger*, cyanide-insensitive respiration, reactive oxygen species

## 2A14-3 液胞膜の可視化による麹菌 *Aspergillus oryzae* 液胞の形態解析

○正路 淳也, 有岡 学, 北本 勝ひこ  
(東大院・農生科・応生工)

【目的】糸状菌において液胞は、チューブ状液胞の存在など出芽酵母では見られない特徴を備えている。我々はこれまで、麹菌 *A. oryzae* において EGFP と液胞膜上の t-SNARE として機能すると予想される *AoVam3p* の融合タンパク質 (EGFP-*AoVam3p*) を用いることにより、液胞動態の解析を行ってきた<sup>1)</sup>。今回我々は EGFP-*AoVam3p* を用いた液胞観察系をさらに発展させ、分生子発芽、気中菌糸、基底部の古い菌糸といった様々な発達段階の菌糸における液胞形態を観察した。【結果】細胞染色との比較から、EGFP-*AoVam3p* は液胞に加え、出芽酵母の後期エンドソームに類似したコンパートメントにも局在することが分かった。また、分生子発芽時の液胞形態を観察したところ、分生子の膨潤に伴って液胞が大きく発達していくことが観察された。さらに培地と直接接していない気中菌糸においては、大きく発達した液胞は通常観察されず、かわってチューブ状液胞と小さな液胞によるネットワーク構造が観察された。また古い菌糸においてみられる発達した液胞では EGFP 蛍光が液胞内腔に観察されたことから、これらの菌糸においてはオートファジーによる細胞質成分の分解と、それに伴う液胞膜の取込みがおこっていると考えられる。以上の結果から、糸状菌の液胞は様々な発達段階において特異な働きを担っている可能性が示唆された。

1) 正路ら, 第55回生物工学会大会講演要旨集, p149

## Detailed observations of vacuoles using a fusion protein of EGFP with *AoVam3p* in *A. oryzae*.

○Jun-ya SHOJI, Manabu ARIOKA, Katsuhiko KITAMOTO  
(Dept. Biotech., Univ. Tokyo)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, vacuoles, *Vam3p*