

2A14-4 麹菌 *Aspergillus oryzae* への細菌由来酵素遺伝子の導入と遺伝子発現の検討

○上條 岳巳^{1,2}, 多田 功生¹, 松下 真由美¹, 鈴木 聡¹,
楠本 憲一¹, 天野 良彦², 柏木 豊¹
(¹食総研, ²信州大・工・物質)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* は醸造発酵生産に不可欠の糸状菌であるとともに、優れた蛋白質分泌生産能を持つため、酵素製剤等の工業的生産にも用いられている。細菌 *Cellvibrio gilvus* 由来の cellobiose phosphorylase はセロビオースの加リン酸分解酵素であるが、逆反応によりヘテロオリゴ糖生成も可能である。しかし、本酵素は生産性が低いため、大量に分泌生産する方法の開発が望まれている。本研究では、*A. oryzae* を用いて、酵素遺伝子を導入した組換え形質転換株を構築し、酵素遺伝子の発現条件を検討した。(方法と結果) *C. gilvus* ATCC13127のゲノムDNAからPCRクローニングによって取得した cellobiose phosphorylase (CBPase) 遺伝子を麹菌の TEF1プロモーターの下流に連結した。本遺伝子のORFを麹菌形質転換ベクター pPTRI (タカラ) に連結した組換えベクターによって *A. oryzae* NFR11599株を形質転換し、ピリチアミン耐性をもつ形質転換株を取得した。得られた形質転換株のゲノムDNAを抽出し、CBPase遺伝子をプローブとしてサザン解析を行ったところ、本形質転換体は目的遺伝子を保持することがわかった。発現制御領域ならびに酵素生産条件の検討を行っている。なお、本研究は生研センター異分野融合研究事業の支援を受けて行われたものである。

Construction and characterization of a recombinant *Aspergillus oryzae* harboring a bacterial enzyme gene

○Takemi KAMIJO^{1,2}, Sawaki TADA¹, Mayumi MATSUSHITA¹,
Satoshi SUZUKI¹, Ken-ichi KUSUMOTO¹, Yoshihiko AMANO³,
Yutaka KASHIWAGI¹
(¹Natl. Food Res. Inst., ²Dept. Chem. Mat. Eng., Shinshu Univ., ³Dept. Chem. Mat. Eng., Shinshu Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, enzyme production, cellobiose phosphorylase

2A15-1 担子菌 *Flammulina velutipes* 由来 chitin deacetylase 遺伝子 (*Fv-pda*) の単離と解析

○藏野 道久¹, 山田 雅人¹, 稲富 聡², 岡崎 光雄¹, 下坂 誠¹
(¹信州大・繊維・応生科, ²ホクトきのこ総合研)

【目的】キチンは菌類細胞壁の主成分である。chitin deacetylaseは細胞壁キチンを脱アセチル化するが、その生理的意義は不明である。エノキタケ *F. velutipes* において、子実体特異的に発現する遺伝子群を differential display法により単離した結果、polysaccharide deacetylaseに相同な遺伝子 (*Fv-pda*) を見出した。子実体形成との関連に注目して、本遺伝子の解析を行った。【方法および結果】ゲノムライブラリーから *Fv-pda* 全長遺伝子を単離し、RT-PCRによりcDNAを増幅した。推定ORFは250アミノ酸をコードし、10個のイントロンで分断されていた。また、N末端側にシグナル配列の存在が推定された。既知のchitin deacetylaseのアミノ酸配列と比較した結果、触媒領域を中心に30-50%の相同性を示した。*Fv-pda* cDNAを酵母 *Pichia pastoris* 宿主系で発現させて得られた組換えFv-PDA (31 kDa) はN-acetylglucosamine (GlcNAc) の2-5量体、グリコールキチン、コロイダルキチンを脱アセチル化した。*Fv-pda* 発現量をRT-PCRで解析した結果、栄養菌糸体でも若干の発現が認められたが、子実体原基形成時に最も強く発現していた。現在、この組換えFv-PDAの諸性質について解析中である。

Cloning and characterization of a gene (*Fv-pda*) encoding chitin deacetylase from the basidiomycete *Flammulina velutipes*

○Michihisa KURANO¹, Masato YAMADA¹, Satoshi INATOMI²,
Mitsuo OKAZAKI¹, Makoto SHIMOSAKA¹
(¹Dept. Appl. Biol., Fac. Tex. Sci. Tech., Shinshu Univ., ²Mushroom Lab., Hokuto Co.)

Key words chitin, chitin deacetylase, *Flammulina velutipes*, fruiting body

2A14-5 選択的リグニン分解性担子菌の脂肪酸不飽和化酵素遺伝子のクローニング

○渡邊 崇人, 津田 冨子, 吉田 太郎, 川崎 優子, 扇 剛士,
西村 裕志, 本田 与一, 渡辺 隆司
(京大・生存研)

【目的】セルロースの分解を抑えつつリグニンを高選択的に分解する担子菌 (白色腐朽菌) *Ceriporiopsis subvermispora* は、脂質過酸化を介したリグニン分解機構を有する。また、本菌はイタコン酸骨格を有する3種類のジカルボン酸 (ceriporic acids A, B 及び C) を産生するが、ceriporic acid Cについては二重結合が1箇所存在する。今回は、これら代謝物の不飽和化に関与すると推定される酵素遺伝子のクローニングを目的とした。【方法・結果】*C. subvermispora* の培養菌体を一定時間ごとに回収し、有機溶媒抽出後、代謝物をGC-MS分析した。その結果、培養初期に不飽和脂肪酸 (linoleic acid: 18:2n-6) 及び飽和脂肪酸 (palmitic acid: 16:0) の著しい産生が見られた。また、3種類の ceriporic acids の産生も確認されたが、ceriporic acid Cの量が最も多かった。以上のことより、これら代謝物の産生に不飽和化酵素の関与が強く示唆された。次に、先にクローニングした白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の *Pc-FAD1* 及び *Pc-FAD2* (1) を始めとする既知の不飽和化酵素のアミノ酸配列から保存性の高い領域を基にプライマーを設計し、*C. subvermispora* の染色体DNAを鋳型としてPCRを行った。その結果、*C. subvermispora* から特異的な増幅断片が得られた。現在、完全長のcDNAの取得を試みている。

1) 渡邊ら: 第55回日本木材学会大会研究発表要旨集 (2005) p.124

Cloning of fatty acid desaturase genes from a selective lignin-degrading basidiomycete

○Takahito WATANABE, Saeko TSUDA, Taro YOSHIDA,
Yuko KAWASAKI, Takeshi OUGI, Hiroshi NISHIMURA,
Yoichi HONDA, Takashi WATANABE
(RISH, Kyoto Univ.)

Key words lignin, basidiomycete, fatty acid desaturase

2A15-2 カキ西条の果実軟化とエチレン受容体遺伝子の関係

○金光 尚哉, 藤江 誠, 宇佐美 昭二, 山田 隆
(広島大院・先端・生命機能)

【目的】カキ西条は、中国地方の特産であり特有の風味や優れた品質が認められた高品質な柿である。カキ西条の効率的な栽培と果実収穫を行なう上で、果実軟化に関係する遺伝子の特定とその制御法を開発することは極めて重要であると考えられる。これまでの栽培試験結果から、エチレン量と果実軟化との相関性が低いことが示され、エチレンによる果実軟化はむしろエチレン受容体遺伝子によって制御されていると考えられる。本研究では、軟化の遺伝学的制御の基礎研究として、カキ西条の果実軟化に関わるエチレン受容体遺伝子を特定し、解析することを目的とした。【方法及び結果】RT-PCR法により取得されたカキ西条のエチレン受容体遺伝子の断片について、塩基配列を決定した。これらの7つのクローンは約700bpのエチレン受容体遺伝子の断片であり、ETR1型、ERS1型の2つのグループに分かれた。またゲノムサザン法により、カキ西条にはETR1型、ERS1型がそれぞれ1~2コピー保存されていた。Northern blot法によってカキの果の発達段階におけるエチレン受容体遺伝子の発現変化を確認した。その結果、ERS1型で成熟後半に発現量の顕著な減少がみられた。現在、RACE法を用いてエチレン受容体遺伝子の全長のクローニング、また定量PCRによる成熟過程での発現量の変化の検討を予定している。

The relation between fruit ripening of Saijo kaki and expression of ethylene receptor genes

○Naoya KANAMITSU, Makoto FUJIE, Shoji USAMI,
Takashi YAMADA
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words ethylene receptor, ripening