

2Da05 麹菌の転写因子PrtRのプロテアーゼ及び異種タンパク質生産への関与

○小野崎 保道, 松浦 知巳, 新谷 尚弘, 五味 勝也
(東北大院・農・生物産業創成)

【目的】麹菌は菌体外にプロテアーゼを分泌するため異種タンパク質の分解が問題とされてきた。プロテアーゼの遺伝子を破壊することが目的タンパク質生産に効果的であると考えられるが、約130種類あるプロテアーゼから破壊のターゲットを的確に選択することは難しい。そこで、複数のプロテアーゼ遺伝子を制御する共通の転写因子を破壊することが効率的と考えられ、すでに私たちは転写因子PrtRを見出し、*prtR*遺伝子破壊による異種タンパク質生産の増加を確認している¹⁾。しかし、*prtR*自身の自己制御も含めてプロテアーゼ遺伝子群の発現制御機構は不明である。本研究では、*prtR*破壊株のアレイ解析により*prtR*制御下の遺伝子を同定するとともに、固体培養における*prtR*破壊による異種タンパク質生産能への影響についても調べた。

【結果】*prtR*高発現株のアレイ解析の結果、複数の主要なプロテアーゼ遺伝子発現の上昇が見られ、PrtRがこれらプロテアーゼ遺伝子の転写因子であることが示唆された。そこで、プロテアーゼ高生産条件である固体培養における*prtR*破壊株の発現プロファイル解析を試みたが、破壊株は固体培養で顕著な生育不良を示した。カザミノ酸などの窒素源を加えることにより生育の改善が認められ、窒素源添加がプロテアーゼ生産に大きな影響がないことを確認した。この培養条件下における破壊株のアレイ解析とヒトリゾチーム生産量に対する影響について調べた結果について報告する。

1) 松浦ら、2006年度日本生物工学会大会要旨集p. 132

Production of proteases and recombinant protein in *prtR* disruptants of *Aspergillus oryzae*

○Yasumichi ONOZAKI, Tomomi MATSUURA, Takahiro SHINTANI, Katsuya GOMI
(Div. Biosci. Biotech. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

Key words protease, recombinant protein, solid-state fermentation, *Aspergillus oryzae*

2Da07 DNAのビーズディスプレイ法を用いたDNA-転写因子間相互作用検出法

○兒島 孝明, 橋本 陽子, 加藤 雅志, 小林 哲夫, 中野 秀雄
(名大院・生命農)

【背景・目的】当研究室では、W/O エマルジョン内でビーズ固定化プライマーを用いた一分子PCR (エマルジョンPCR) により、DNAライブラリーをビーズライブラリーに変換する技術を開発した。本研究では、糸状菌 *Aspergillus nidulans* 由来の転写因子であるAmyRを取り上げ、系の確立とともに、AmyRが認識するDNA配列を明らかにすることを目的としている。糸状菌 *A. nidulans* 由来の転写誘導因子AmyRは、*Aspergillus*属のアミラーゼ遺伝子群のプロモーター領域に結合し、転写を活性化する。

【方法・結果】AmyR結合配列をさらに詳細に解析する為、種々のランダムDNAライブラリーを作製した。このライブラリーを鋳型としたエマルジョンPCRにより、ライブラリー分子由来のDNAをマイクロビーズ上に増幅、固定化した。得られたビーズライブラリーに対し、MalEタグを付加したAmyR₁₋₄₁₁および蛍光標識した抗MalEタグ抗体を加えた。この時、転写因子の認識するDNAが固定化されたビーズ上では、ビーズ-DNA-転写因子-蛍光標識抗体の複合体が形成され、この蛍光を有するビーズ複合体はfluorescence activated-cell sorter (FACS)を用いて迅速に選択される。得られた配列を解析した結果、種々のランダムDNAライブラリーよりAmyR結合配列及びその類似配列が優先的に濃縮されることを確認した。

Detection of DNA-protein interactions using bead display system of DNA

○Takaaki KOJIMA, Yoko HASHIMOTO, Masashi KATO, Tetsuo KOBAYASHI, Hideo NAKANO
(Grad. Sch. Biol. Agric. Sci., Nagoya Univ.)

Key words AmyR, flow cytometry, *Aspergillus nidulans*, emulsion PCR

2Da06 バイオエタノール固体発酵に最適な新規麹菌高発現プロモーターの探索

○坂東 弘樹¹, 久田 博元¹, 石田 博樹¹, 秦 洋二¹, 片倉 啓雄², 近藤 昭彦³
(¹月桂冠・総研, ²阪大院・工・生命先端, ³神戸大・工・応化)

【目的】植物系バイオマスの糖化とエタノール発酵・回収を固体状のままで行うことで、発酵槽の小型化や蒸留操作の省略が可能となり、生産コストの大幅な削減につながる。本研究では、固体反応を利用したバイオエタノール生産システム構築のために、その第一段階である固体状バイオマスの糖化を目的として、麹菌 (*Aspergillus oryzae*) を宿主とした固体培養でのバイオマス分解酵素の大量生産に最適なプロモーターの探索を行った。

【方法及び結果】既知のプロモーター5種類、及び麹菌小麦フスマ固体培養時のDNAマイクロアレイ解析から選抜した新規プロモーター3種類について、麹菌OSII1013株を宿主として、それぞれのプロモーター制御下で麹菌エンドグルカナーゼ遺伝子*celA*を発現させた。その結果、マイクロアレイ解析で選抜した機能未知遺伝子の新規プロモーターが、小麦フスマ固体培養において最も高い*celA*発現能を示した。また、その生産量は、麹菌の物質生産で多用される*amyA*プロモーターよりも優れていることが確認できた。さらに、本プロモーターの高発現に最適な小麦フスマ培養条件や、発現誘導に関与する推定シス因子領域を決定した。また、本プロモーターを用いた固体培養での種々のバイオマス分解酵素の生産性についても報告する。

【謝辞】本研究はNEDOバイオマスエネルギー高効率転換技術開発の一環として実施した。

Isolation of a novel promoter used for efficient protein expression by *Aspergillus oryzae* for solid-state bioethanol fermentation.

○Hiroki BANDO¹, Hiromoto HISADA¹, Hiroki ISHIDA¹, Yoji HATA¹, Yoshio KATAKURA², Akihiko KONDO³
(¹Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., ²Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ³Dept. Chem. Sci. Eng., Kobe Univ.)

Key words promoter, solid state culture, *Aspergillus oryzae*, bioethanol

2Da08 出芽酵母のアセトアルデヒド応答機構制御因子の探索

○松藤 淑美¹, 藤村 朱喜¹, 宮地 竜郎¹, 中川 智行², 中川 純一¹
(¹東農大・生物産業・食科, ²東農大・生物産業・食科, ³東農大・生物産業・食科, ⁴岐阜大・応用生物, ⁵東農大・生物産業・食科)

【目的】アセトアルデヒド(AA)は有毒な揮発性化学物質である。しかし、AAはアミノ酸代謝など様々な生体内反応において生産され、特に出芽酵母においてはアルコール発酵の際に大量に生産される重要な中間代謝物質である。よって、生物はAAの毒性を回避するために何らかの機構を有していると考えられる。我々は、生物の持つAA毒性回避機構の解明を目的に研究を行い、現在までにペントースリン酸経路の活性化がAA耐性に重要な役割を持つことを明らかにしている。そこで、今回、AA応答に関与する転写因子の探索を行ったので報告する。

【結果・考察】スポット試験により、いくつかの転写因子の欠損株がAA添加培地では生育出来ないことを見出した。一方、我々はこれまでにペントースリン酸経路系遺伝子はAAストレスにより発現誘導されることを明らかにしている¹⁾。そこで、ノザン解析により、これら転写因子欠損株におけるペントースリン酸経路系遺伝子の発現を野生株と比較したところ、*STB5*欠損株において*GND1*、*TKL1*はAAストレスによる誘導が見られなくなった。これより、AA耐性に不可欠なペントースリン酸経路の活性化には、転写因子*STB5*が重要な役割を持っていることが示唆された。

¹⁾松藤ら 2006年度 日本農芸化学会 大会要旨集

Study on the regulatory system for acetaldehyde stress response in *Saccharomyces cerevisiae*

○Yoshimi MATSUFUJI¹, FUJIMURA Shuki¹, MIYAJI Tatsuro¹, NAKAGAWA Tomoyuki², NAKAGAWA Junichi¹

(¹Dept. Food Sci. Technol., Tokyo Univ. Agric., ²Dept. Food Sci. Technol., Tokyo Univ. Agric., ³Dept. Food Sci. Technol., Tokyo Univ. Agric., ⁴Dept. Appl. Biol., Gifu Univ., ⁵Dept. Food Sci. Technol., Tokyo Univ. Agric.)

Key words acetaldehyde, stress response, *Saccharomyces cerevisiae*, transcription factor