

3P-1141 エタノールストレス応答における酵母 stress granule の形成とその生理的意義

○加藤 健太¹, 山本 陽佑¹, 三木 健夫², 若井 芳則³,
井沢 真吾¹
(¹京工織大・応生,²山梨大工・ワイン研,³黄桜)

真核生物の細胞質における翻訳とmRNAの分解は密接に連携しており、その制御はストレス条件下において特に重要である。ストレス条件下で非翻訳状態のmRNAはポリソームから隔離され、翻訳制御因子やRNA分解装置などとともにストレス顆粒(stress granule, SG) やプロセッシングボディ(P-body)といった構造体を細胞質に形成する。一方、エタノールストレスに対する酵母の応答機構はまだ不明な点が多い。そこで今回、エタノールストレス条件下におけるSGとP-bodyの形成について検討を行い、その生理的意義を考察した。解析の結果、SGはP-bodyよりも厳しいエタノールストレス条件下で形成され、さらにその形成はP-body形成後に誘導された。加えて、シクロヘキシミドによってSGの形成は阻害されることや、eIF2 α のリン酸化に非依存的事であることが明らかとなった。また、熱ショック(46°C)によってもSGの形成は誘導されるが、エタノールによって誘導されるSGと熱ショックによるSGとは構成因子に違いが存在することを見出した。さらに、SGの形成が抑制される遺伝子破壊株を用いて生理的意義を検討したところ、野生株に比べて遺伝子破壊株はエタノールストレス処理後の生育回復が不十分であった。そのため、SGはエタノールストレスからの回復時に重要な役割を担っていると考えられる。実際の醸造過程におけるSG形成については、清酒小仕込試験および白ワインの醸造試験を行って検討している。

Formation of yeast stress granules caused by ethanol stress and its physiological importance

○Kenta KATO¹, Yosuke YAMAMOTO¹, Takeo MIKI²,
Yoshinori WAKAI³, Shingo IZAWA¹
(¹Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech.,²Inst. Enol. Vit., Univ. Yamanashi,³Kizakura)

Key words ethanol stress, stress granule, mRNA, *Saccharomyces cerevisiae*

3P-1143 味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 のホスファターゼ遺伝子 *aphA* 破壊株の取得

○安田 庄子, 森 昭博, 蟹江 那美, 長谷川 摂, 北本 則行
(愛知産技研・食工技セ)

【目的】核酸系調味料を添加した調味味噌は、味噌中の麹菌ホスファターゼ(Aph)による旨味成分の分解防止のため、高温の加熱失活処理が不可欠である。しかし、高温加熱により味噌の品質が低下するため、Aph低生産麹菌を利用した新規な省エネルギー型味噌製造技術の開発が求められている。本研究では、味噌用麹菌における高頻度相同組換え系の開発と aph 遺伝子破壊株の作出を行い、味噌製造における aph 遺伝子群の機能解明とAph低生産麹菌の育種を目指す。

【方法・結果】味噌用麹菌 $A. oryzae$ KBN630を $pyrG$ 遺伝子破壊用ベクターで形質転換し、 $pyrG$ 遺伝子破壊株 $A. oryzae$ KBN630-17を取得した。さらに $A. oryzae$ KBN630-17を $ku70$ 遺伝子削除用ベクターpDelku70-2で形質転換し、 $ku70 \cdot pyrG$ 遺伝子二重破壊株 $A. oryzae$ KBN630-17K3を取得した。 $A. oryzae$ KBN630-17K3における遺伝子ターゲティング効率を $amyR$ 遺伝子破壊ベクターで測定した結果、90%以上の高頻度相同組換え系であることが確認された。次に $A. niger phyA$ 遺伝子と最も相同性が高い $aphA$ 遺伝子の破壊用ベクターpDisaphAを構築した。pDisaphAで $A. oryzae$ KBN630-17K3を形質転換し、 $aphA$ 遺伝子破壊株を取得した。現在、 $aphA$ 遺伝子破壊株のホスファターゼ活性の測定および味噌用麹菌としての実用性の評価を行っている。なお本研究は「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」の一環として実施した。

Disruption of the phosphatase gene, *aphA*, in the miso koji mold, *A. oryzae* KBN630

○Shoko YASUDA, Akihiro MORI, Nami KANIE, Osamu HASEGAWA,
Noriyuki KITAMOTO
(Food Res. Center, Aichi Ind. Tech. Inst.)

Key words *Aspergillus oryzae*, gene disruption, phosphatase, transformation

3P-1142 麹菌 pal 経路の解析

○佐野 元昭, 北川 治恵, 伊野 江利子, 堂本 光子,
大箸 信一
(金沢工大)

【背景・目的】麹菌 $Aspergillus oryzae$ の生産するアルカリプロテアーゼ(ALP)は、醤油醸造において重要な酵素の1つである。我々は、ALPの制御機構の解明を行うため、ALPの発現制御に関わるpalシグナル経路と、pal経路により活性化される転写因子pacCに注目し研究を進めてきた。しかしながら、pal経路に関与する全ての因子の特定に至っていない。そこで、今までに作製した $palF$ ¹, $palI$ ², $palH$ ³破壊株の影響を詳細に解析した結果、今まで知られていなかったpal経路に関与する遺伝子の特定に成功し、解析を行ったので報告する。

【実験方法・結果】pal経路に関与する候補遺伝子を、 $palF$, $palI$, $palH$ 破壊株のDNAマイクロアレイ解析結果などより抽出を行い、候補にあがった遺伝子について $A. oryzae \Delta ligD \Delta pyrG$ 株を宿主に用いて遺伝子破壊株を作製した。作製した破壊株について、定量PCRにより $pacC$ 遺伝子の発現量の解析を行ったところ、 $pacC$ 遺伝子の発現量が減少する破壊株があることが確認でき、今回見出した候補遺伝子のうちpalシグナル経路に関与する遺伝子があると判断した。現在、その候補遺伝子について詳細な解析中である。

1) 佐野ら

Analysis of pal pathway from *Aspergillus oryzae*

○Motoaki SANO, Harue KITAGAWA, Eriko INO, Mitsuko DOHMOTO,
Shin-ich OHASHI
(KIT)

Key words :2008 年日本生物工学会大会講演要旨集 P.150
2) 佐野ら

3P-1144 清酒醸造 ACP 活性に寄与する麹菌の酸性カルボキシペプチターゼ遺伝子

○山下 伸雄¹, 岩下 和裕², 山田 修², 西村 顕¹
(¹白鶴酒造研究開発,²酒総研,³酒総研,⁴白鶴酒造研究開発)

清酒醸造において、 $Aspergillus oryzae$ の製麹培養における3つの遺伝子の発現が大きく、実用株における各遺伝子の発現に起因する活性を遺伝子破壊法のより、寄与率を調べることにした。3種の遺伝子破壊カセットは $pirA$ (約2kb)をマーカーとして約2kbの相同領域(5'、3')をプライマーレスPCRを基にして作成した。この3種の遺伝子破壊株のうち、1種は全体の6~7割の活性をもち、所定分析法で測定する優勢な活性をもつことが明らかとなった。

Acid carboxy-peptidase gene involved in sake brewing

○Nobuo yamashita¹, Kazuhiro Iwashita², Osamu yamada²,
Akira nishimura¹
(¹Hakutsuru Sake Brewing Co. Ltd.,²Natl. Res. Inst. Brewing,³Natl. Res. Inst. Brewing,⁴Hakutsuru Sake Brewing Co. Ltd.)

Key words *Aspergillus oryzae*, Koji making, Acid carboxy-peptidase