

3Fa01 麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー欠損株を用いた異種タンパク質の生産性向上

尹 載宇, ○菊間 隆志, 柳沢 晋, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ
(東大院・農生科・応生工)
akitamo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

【目的】*A. oryzae* は大量のタンパク質を培地中に分泌する能力を有することから、異種タンパク質生産の宿主として用いられている。我々は以前、*A. oryzae* において発現させた変異型分泌タンパク質が液胞に取り込まれることを見出し、これが細胞内自食作用であるオートファジーに依存することを明らかにした¹⁾。この結果から、オートファジーが異種タンパク質を分解するボトルネックのひとつである可能性が考えられた。本研究では、*A. oryzae* におけるオートファジー関連遺伝子の破壊株を用いることで、異種タンパク質の生産性向上を試みた。

【結果】オートファジーの誘導に関与する *Aoatg1* および *Aoatg13*、オートファゴソームの形成に必須な *Aoatg4* および *Aoatg8*、オートファジックボディ崩壊に必須な *Aoatg15*、以上5つのオートファジー関連遺伝子^{2,3)}について破壊株を作製した。それぞれの遺伝子破壊株で異種タンパク質のモデルとしてウシ・キモシンを発現し、培地中の生産量を測定した。その結果、*Aoatg15*以外の4つの遺伝子の破壊株でキモシン生産量が増加し、*Aoatg4*、*Aoatg8* 遺伝子破壊株では、コントロール株と比較してそれぞれ3.0倍、2.4倍の生産量増加が認められた。本研究により、*A. oryzae* オートファジー欠損株を用いることで異種タンパク質生産量を増加させることに成功した。

- 1) Kimura *et al.* (2011) Biochem. Biophys. Res. Commun. 406:464-70.
2) Kikuma *et al.* (2006) Eukaryot. Cell 5:1328-36.
3) Kikuma *et al.* (2011) FEMS Microbiol. Lett. 316:61-9.

Disruption of autophagy-related genes increases the production level of a heterologous protein in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

Jaewoo Yoon, ○Takashi Kikuma, Shin Yanagisawa, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto
(Dept. Biotech., Univ. Tokyo)

Key words *Aspergillus oryzae*, autophagy, heterologous protein production

3Fa03 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) 分生子におけるストレス応答によるトランスポゾン遺伝子転写産物の動的変動

○小笠原 博信¹, 高橋 砂織¹, 五味 勝也²
(¹ 秋田県総合食研セ,² 東北大院農・生物産業創成)
hironobu@arif.pref.akita.jp

【目的】高濃度のCu²⁺や高温などのストレスを受けると麹菌の活性型DNAトランスポゾン *Crawler* はmRNAのcryptic splicingやORF内poly(A)付加が減少し、全長mRNA比率が増加することで転移活性(機能化)を示す。ストレス応答cDNAブラウザーによる探索から機能化が推定される新たなトランスポゾン配列も見出てきている¹⁾。本研究ではそれら新規および既にアノテーションされているトランスポゾン遺伝子を対象にストレス条件下でのmRNA分子種変動について解析を行った。

【方法】Cu²⁺処理および高温処理を行った分生子より全RNAを抽出し、RT-PCRや3'-RACEおよび転写産物のcDNA配列決定により、splicingの変化とpoly(A)付加位置の変動について解析を行った。

【結果】未アノテーション領域より見出されていた幾つかのtransposaseやレトロトランスポゾンの *gag* 様配列、および既知の *implala* 様配列 (AO090023000251) ではストレスによりsplicing阻害が認められた。一方、新規DNAトランスポゾン *AoTan1* ではcryptic splicingは検出されなかったが、ORF内のpoly(A)付加の減少と3'-UTR領域への付加が認められるようになった。以上のことから、麹菌内のトランスポゾン様遺伝子は *Crawler* と同様の制御により転移抑制がなされていることが示唆された。

- 1) 小笠原・他, 農化大会要旨, p99(2010)

Dynamic changes of the transcripts from potential transposable elements in *Aspergillus oryzae* under stress conditions.

○Hironobu Ogasawara¹, Saori Takahashi¹, Katsuya Gomi²
(¹Akita Res. Inst. Food and Brewing,²Div. Biosci. Biotech. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, transposable element, transcripts, stress

3Fa02 黄麹菌が産生するDPP-IV阻害化合物の生合成メカニズムに関する検討

○今村 和彦^{1,3}, 津山 善仁¹, 山田 修², 下飯 仁^{2,3}
(¹湧永製薬,²酒総研,³広島大院・先端・生命機能)
imamura_kz@wakunaga.co.jp

【背景】これまでに我々は、醸造用黄麹菌が産生するDPP-IV阻害化合物(WYK-1)の生合成にNon-Ribosomal Peptide Synthetase (NRPS) : *wykN*が関与していることを明らかにした*1。また、*wykN*を含む遺伝子クラスターと転写制御遺伝子(*wykR*)の存在が示唆され、*wykR*を高発現させることで非産生株でもWYK-1を産生することを報告した*2。今回 *wykR* の発現制御メカニズムを明らかにすることを目的に検討を行った。

【結果】WYK-1産生株と非産生株の *wykR* のアミノ酸配列を比較したところ、4アミノ酸(全551アミノ酸)に差が見られた。また *wykR* 遺伝子プロモータ領域に、産生株において23bpの付加が見つかった。そこで、GUSを用いた *wykR* プロモータアッセイを行ったところ、産生株非産生株間で発現に差は認められなかった。さらに、プロモータを含む *wykR* 遺伝子を *niaD* locus に導入したところ、非産生株においても、WYK-1の産生が確認された。これらの結果から、黄麹菌においてWYK-1の産生に関わる制御は、染色体上での *wykR* 遺伝子の位置が影響していると推察された。

- *1; 日本農芸化学会 2008 年大会 3A22p07

- *2; 第62回 日本生物工学会大会 3P-1014

Biosynthesis mechanism of DPP-IV Inhibitor produced by *Aspergillus oryzae*.

○Kazuhiko Imamura^{1,3}, Yoshihito Tsuyama¹, Osamu Yamada², Hitoshi Shimoi^{2,3}
(¹Wakunaga Pharm. Co., Ltd.,²Natl. Res. Inst. Brewing,³Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, Non-ribosomal Peptide Synthetase (NRPS), DPP-IV Inhibitor, transcriptional regulation

3Fa04 麹菌のマルトースパーミアーゼのエンドサイトーシスに及ぼす各種炭素源の影響

○平本 哲也, 大道口 涼子, 田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也
(東北大院・農・生物産業創成)
hiramoto_27@yahoo.co.jp

我々は、麹菌のデンプン分解酵素の生産において、誘導基質であるマルトースの細胞内取込み系が重要であり、その取込みを担うマルトースパーミアーゼ(MalP) 遺伝子がグルコースにより転写レベルで抑制を受けていることをすでに明らかにしている¹⁾。一方、出芽酵母では、マルトースパーミアーゼの発現が転写レベルで抑制を受けるとともに、タンパク質レベルでエンドサイトーシス依存的に液胞へ輸送され分解を受けることが報告されている。麹菌においても同様の分解機構の存在が予想されるが、その有無は未だ不明である。そこで、本研究では、MalPの環境シグナル応答におけるタンパク質レベルでの分解機構を解明するために、グルコースをはじめとする各種炭素源存在下におけるMalPの細胞内局在について解析を行った。

GFP-MalP融合タンパク質を麹菌で発現させ、蛍光顕微鏡観察を行ったところ、マルトース誘導条件下では主として細胞膜にGFP-MalPの局在が観察されたが、液胞と考えられるオルガネラにも構成的な局在が見られた。これにグルコースを添加すると速やかに細胞膜からのGFP蛍光の消失と液胞への移行が認められた。また、フルクトースやマンノース、2-デオキシグルコースの存在下においても細胞膜からのGFP蛍光の消失が認められた。このことからMalPも酵母のマルトースパーミアーゼと同様にエンドサイトーシスによる分解制御を受けるものの、糖に対する応答に違いがある可能性が示唆された。

- 1) Hasegawa *et al. Fungal Genet. Biol.* 47, 1-9 (2010).

Effect of carbon source species on the endocytosis of *Aspergillus maltose permease*

○Tetsuya Hiramoto, Ryoko Daidoguchi, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi
(Div. Biosci. Biotech. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, maltose permease, carbon source, endocytosis