

1P-033 Effect of deleting two putative cargo receptors on heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*

○Dung Huy Hoang, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)
akitamo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

Aspergillus oryzae is a filamentous fungus extensively used in traditional Japanese fermentation. Thanks to its robust secretory machinery, this fungus has a high potential for heterologous protein production into the culture medium. However, current understanding of *A. oryzae* secretory pathway is very primitive, limiting the strain optimization. In this study, we focus on cargo receptor, an important component of the ER-to-Golgi secretory part, which interacts with secreted proteins for facilitating their secretion. Here, two *A. oryzae* putative cargo receptors AoVip36 and AoEmp47 were investigated for their role in the secreted production of heterologous proteins.

We generated gene disruptants of the two cargo receptors in *A. oryzae*. Bovine chymosin fused with α -amylase was expressed as a model of heterologous protein. Disruption of each gene increased the production of chymosin in the culture medium by approximately 2 folds, suggesting a different function than the traditional cargo receptor function. Further experiments for evaluating the effect of deleting these cargo receptors on production level of other heterologous proteins as well as for elucidating the decreasing effect of their presence on the production are being conducted.

Effect of deleting two putative cargo receptors on heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*

○Dung Huy Hoang, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

Key words *Aspergillus oryzae*, heterologous protein production, cargo receptor

1P-035 麹菌におけるイントロン導入 Cre を用いた自己切断型選択マーカーリサイクリングシステムの構築

○張 斯来¹, 伴 曉彦¹, 江原 直樹¹, 水谷 治², 田中 瑞己¹,
新谷 尚弘¹, 五味 勝也¹
(¹東北大院・農・生物産業創成, ²酒総研)
gomi@biochem.tohoku.ac.jp

麹菌は二次代謝化合物生産のクリーンホストとしての利用が期待されているものの、利用出来る選択マーカーに限られているため、生合成マシナリー構成遺伝子を全て導入することが困難である。我々はこれまでに、変異型 *lox* を用いた Cre/*loxP* システムによる選択マーカーリサイクリングシステムの構築に成功しているが、望まない Cre 反応を完全に抑制するためには、選択マーカーと Cre 発現カセットを同時に脱落させるシステムが望ましい。そこで、本研究では自己切断型選択マーカーカセットを用いた多重遺伝子導入システムの構築を目指した。

形質転換マーカー *adeA* と *xynG2* プロモーターに連結した Cre 発現カセットの両者を変異型 *lox* 配列で挟んだ断片を搭載したプラスミドの構築を試みたものの、大腸菌内で Cre 反応が生じてしまい、目的のプラスミドが得られなかった。そこで、大腸菌内での Cre 発現を抑えるために Cre 遺伝子内に人為的にイントロンを挿入したところ、目的のプラスミドを取得することができた。作製したプラスミドを *adeA* 破壊株に導入し、得られた形質転換体を Cre 発現誘導条件であるキシロースを炭素源とした培地に植え継いだ結果、アデニン要求性を示し、ゲノム DNA を抽出して PCR を行ったところ、*adeA* と同時に Cre 発現カセットも脱落していることが確認された。このシステムを用いて多重遺伝子導入を試みた結果についても報告する。

Development of a self-excising marker recycling system with a modified intron-containing Cre recombinase in *Aspergillus oryzae*

○Silai Zhang¹, Akihiko Ban¹, Naoki Ebara¹, Osamu Mizutani², Mizuki Tanaka¹, Takahiro Shintani¹, Katsuya Gomi¹
(¹Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., ²NRIB)

Key words *Aspergillus oryzae*, Cre/LoxP system, intron-containing Cre, marker recycling

1P-034 麹菌のグルコース抑制関連因子遺伝子破壊株におけるアミラーゼ高生産

○一瀬 桜子, 田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也
(東北大院・農・生物産業創成)
cherry-co@live.jp

麹菌は多様な多糖類分解酵素群を生産するものの、その発現はグルコースによるカタボライト抑制を受ける。糸状菌におけるグルコース抑制は広域制御型転写因子 CreA によって制御されることが知られている。*Aspergillus nidulans* では、CreA のユビキチン化・脱ユビキチン化によりグルコース抑制が制御されることが示唆されており、グルコース存在下では、脱ユビキチン化酵素 CreB によって CreA が脱ユビキチン化されると考えられている。本研究では麹菌において *creA*, *creB* 及び *creA/creB* 二重破壊株を作製し、これらの遺伝子破壊のグルコース抑制への影響を解析した。

creA, *creB* 及び *creA/creB* 二重破壊株の生育を宿主株と比較した結果、*creA* 及び *creA/creB* 二重破壊株では生育の悪化が観察されたが、*creB* 破壊株では生育への影響は観察されなかった。次に、デンプンとグルコースを混合した培地におけるハロー形成能を比較した結果、野生株ではハロー形成が見られないのに対し、各破壊株ではハロー形成が観察された。以上の結果から、各破壊株ではグルコース抑制が解除されたことが示された。また、各破壊株の α -アミラーゼ活性を測定した結果、グルコース培地において *creA* 及び *creA/creB* 二重破壊株では野生株と比較して活性の上昇が認められた。さらに興味深いことに、マルトース培地では *creA/creB* 二重破壊株は *creA* 破壊株よりも高い α -アミラーゼ生産性を示した。

(本研究は生研センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」の支援を受けて行われた。)

Hyperproduction of amylases by disruption of genes involved in carbon catabolite repression in *Aspergillus oryzae*

○Sakurako Ichinose, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi
(Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words carbon catabolite repression, alpha-amylase, hyperproduction

1P-036 *Aspergillus oryzae* のハイドロフォービン群の機能および局在性の解析

○早川 美佑華, 石田 千絵, 山川 結, 水野 佑香, 中島 春紫
(明治大・農)
harushi@isc.meiji.ac.jp

ハイドロフォービン (hydrophobin) は、糸状菌・担子菌類にみられる細胞表層タンパク質である。低分子量 (70~150a.a.) の両親媒性タンパク質であり、菌体外に分泌された後、菌糸や分生子の表層に自己集合して単層を形成し、菌体に撥水性を付与する。一般に、1つの菌株は互いに相同性の低いハイドロフォービン遺伝子を複数有しているが、その使い分けについてはほとんど解明されていない。

本研究室では麹菌 *Aspergillus oryzae* のハイドロフォービン遺伝子 *hypA, B, C* の発現を確認している。これまで、HypA は主として分生子に、HypB は菌糸に局在し、HypC は通常の条件下では発現量が少ないことを観察している。さらに、*hypA* 遺伝子は分生子形成期に、*hypB* 遺伝子は菌糸の伸長期に転写量が増加することを見出している。そこで、HypA と HypB の局在性と発現の関連を明らかにする目的で、*hypB* 遺伝子を *hypA* プロモーター、*hypA* 遺伝子を *hypB* プロモーターにより発現させ、その下流に蛍光タンパク質を融合して、*hypA, hypB* 二重破壊株に同時形質導入した株を作製した。蛍光顕微鏡観察により、HypA, HypB の局在性はプロモーターが支配することを確認した。現在は、分生子局在性に関する *hypA* プロモーターの構造機能解析を行っている。

Characterization and localization of hydrophobins in *Aspergillus oryzae*

○Fuyuka Hayakawa, Chie Ishida, Yui Yamakawa, Yuka Mizuno, Harushi Nakajima
(Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, hydrophobin, localization analysis