

1P-019 合成生物学的手法を用いたミトコンドリア移行シグナル配列のモデル化

○鈴木 絢子¹, 中村 美紀子¹, 徳田 茜², 星田 尚司², 赤田 倫治²
 (¹山口大・産学公, ²山口大院・医系・応用分子生命)
 suzuki@yamaguchi-u.ac.jp

細胞内におけるタンパク質の局在は、移行シグナルと呼ばれる短いペプチド配列で決定されている。ミトコンドリア移行シグナルには明確な保存配列が見られず、決定的なコンセンサス配列はない。そこで本研究では、既知のミトコンドリア局在配列をモデル化するため、移行シグナル配列の様々なディレクションシリーズ及び特定のアミノ酸で構成した人工配列を付加した GFP 遺伝子コンストラクトを用いて解析を行った。その結果、真核生物のモデル細胞の酵母では、単純な“塩基性-疎水性-疎水性”の3つのアミノ酸残基の3回以上のリピートによりミトコンドリアに局在することがわかった。しかし、疎水性アミノ酸の組み合わせによっては局在しない場合もあり、また、さらにリピート数を増やすと膜に局在したことから、リピートの数によりミトコンドリアから細胞膜へと局在が変化することが分かった。これらの配列をヒト培養細胞で解析した結果、同様のリピートでミトコンドリアに局在した。従って、酵母とヒト細胞において“塩基性-疎水性-疎水性”の3つのアミノ酸残基の3回以上のリピートがミトコンドリア局在配列であるとモデル化することに成功した。しかしヒト細胞では、リピート数を増やしても膜への移行は観察されなかったことから、酵母とヒト細胞で移行シグナルの認識に異なる性質が存在することを明らかにした。

Modeling of mitochondrial targeting signal sequence by using synthetic biology approach

○Suzuki Ayako¹, Nakamura Mikiko¹, Tokuda Akane², Hoshida Hisashi², Akada Rinji²
 (¹Innov. Yamaguchi Univ., ²Dept. Appl. Mol. Biosci., Grad. Sch. Med., Yamaguchi Univ.)

Key words Mitochondrial targeting sequence, Localization signal, Linear DNA, Synthetic biology

1P-021 選択マーカーリサイクリングシステムにより得られた麹菌 alpha-グルカン合成に関わる多重遺伝子破壊株の特性

○張 斯来, 田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也
 (東北大院・農・生物産業創成)
 gomi@biochem.tohoku.ac.jp

我々は、2種類の変異型 lox 配列で選択マーカーと条件的 Cre 発現カセットを挟んだ自己切断型選択マーカーリサイクリング用プラスミドを開発し、このシステムを利用してコウジ酸生成に関与する *kojA*, *kojT* の2遺伝子の高発現株と3種類の alpha-1,3-グルカン合成酵素遺伝子 (*agsA*, *agsB*, *agsC*) の単独、2重及び3重破壊株を作製することに成功している¹⁾。今回は、このようにして得られた alpha-グルカン合成酵素遺伝子の破壊株について、液体培養条件下における菌体性状や酵素などの物質生産に関する特性を解析したので報告する。

選択マーカーリサイクリングシステムを用いることにより、麹菌染色体上に存在する3種類の alpha-グルカン合成酵素遺伝子をいろいろな組み合わせで容易に破壊することができた。得られた破壊株は寒天培地上では野生株とほとんど差のない生育状態を示したが、液体培養時に野生株がペレット状になるのに対して、*agsB* 遺伝子を破壊した株ではバルブ状または非常に小さなペレット状の形態を示した。そこで、液体培養における形態観察を行うとともに、細胞壁の alpha-グルカン量の測定を行った。また、麹菌自身の alpha-アミラーゼや導入高発現させたセルラーゼなどの生産量についても調べた結果を報告する。

1) 張ら、2014年度日本農芸化学会大会要旨集 3A13p08

Morphology and enzyme production of multiple gene deletion mutants for alpha-glucan biosynthesis obtained by means of self-excising marker recycling system in *Aspergillus oryzae*

○Silai Zhang, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi
 (Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric., Tohoku Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, alpha-glucan, self-excising marker recycling system

1P-020 麹菌の固体培養特異的発現を示すグルコアミラーゼ遺伝子 (*glab*) の発現制御に関与する転写因子

○吉村 緑, 田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也
 (東北大院・農・生物産業創成)
 gomi@biochem.tohoku.ac.jp

麹菌の固体培養特異的に生産されるグルコアミラーゼ *GlaB* は、菌系成長阻害条件、低水分活性条件、高温培養条件という3条件によりプレート培養でも誘導生産が可能である。この条件を満たす培養条件として、50% マルトースを含む寒天培地 (低水分活性) に載せたナイロン膜上 (菌系成長阻害) で麹菌を培養し、ナイロン膜に分泌吸着された *GlaB* を抗体反応で再現性高く検出することに成功した。この方法を用いて転写因子破壊株ライブラリー 434 株のスクリーニングを行い、選抜した 19 株について小麦ふすまを用いた固体培養を行い、グルコアミラーゼ活性と α -アミラーゼ活性を測定した。その結果、 α -アミラーゼ活性に対するグルコアミラーゼ活性が *glab* 破壊株と同程度まで低下した株が 1 株得られた。この株は分生子形成に関わることが報告されている C_2H_2 型転写因子である *FibC* の遺伝子破壊株であったことから、*FibC* と同様の経路で機能する他の転写因子破壊株について *GlaB* 生産を調べたが、顕著な生産低下は認められなかった。一方、*GlaB* と同じように固体培養で特異的に生産されるプロテアーゼとチロシナーゼについては、*flbC* 破壊株では大幅な活性の低下はみられず、*FibC* は *GlaB* の発現生産に特異的に機能している可能性が示唆された。

(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。)

An *Aspergillus oryzae* transcription factor involved in the expression of the gene, *glab*, specifically expressed in solid-state culture

○Midori Yoshimura, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi
 (Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric., Tohoku Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, gene expression, solid state fermentation, transcriptional regulator gene

1P-022 炭素源およびユビキチン/脱ユビキチン化因子の麹菌 CreA タンパク質安定性への関与

○田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也
 (東北大院・農・生物産業創成)
 mizu-t@biochem.tohoku.ac.jp

糸状菌は多様な多糖類分解酵素を生産するものの、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。糸状菌におけるカーボンカタボライト抑制は、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。さらに、脱ユビキチン化に関与する CreB, CreC およびユビキチン化に関与するアレシチン様タンパク質 CreD がカーボンカタボライト抑制制御因子として同定されている。本研究では、チアミン添加により発現抑制可能な *thiA* プロモーターを用い、麹菌 CreA タンパク質の各種炭素源存在下での安定性および CreD 破壊がその安定性に与える影響について解析を行った。

チアミン添加により発現を抑制した後、各種炭素源を添加して経時的に CreA タンパク質量をウェスタン解析で調べた。その結果、グルコースおよびマンノースを添加した場合において CreA が安定化することが示された。デンプンと各種炭素源を混合してデンプン分解により生じるハロー形成能を調べた結果、グルコースおよびマンノースを混合することでハロー形成能が著しく阻害されたことから、CreA はカーボンカタボライト抑制条件下で安定化することが示唆された。また、CreD 破壊株において同様に CreA の安定性を調べた結果、野生株と比較して安定性に大きな違いは見られなかった。今後は CreB 破壊株および CreB/CreD 二重破壊株における CreA の安定性について解析する予定である。

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。

Involvement of carbon sources and ubiquitinating/deubiquitinating factors in stability of *Aspergillus oryzae* CreA protein

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

Key words *Aspergillus oryzae*, transcriptional regulator gene, gene expression, gene disruption