

**1P-023 比較ゲノム解析による麹菌の異種タンパク質高生産に関与する変異遺伝子の同定**

○金鋒杰,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

【背景と目的】 麹菌 *Aspergillus oryzae* は、日本酒、醤油、味噌などの醸造食品産業においてきわめて重要であるとともに、異種タンパク質生産の宿主としても利用されている。我々は以前、*A. oryzae* のプロテアーゼ遺伝子 2 重破壊株 ( $\Delta tppA \Delta pepE$ ) を変異処理し、異種タンパク質のモデルとしてヒト由来リゾチームを高生産する変異株 (AUT [*A. oryzae* hyper-producing strain developed in The University of Tokyo] 株) を取得した<sup>1)</sup>。しかし、*A. oryzae* では、酵母のように変異遺伝子を同定することは非常に困難であった。本研究では、リゾチーム高生産変異株の全ゲノム配列の解析を行い、比較ゲノム解析によって異種タンパク質高生産に関与する変異遺伝子の同定を目的とした。

【方法と結果】 リゾチーム高生産変異株 AUT1~5 とその親株であるプロテアーゼ遺伝子 2 重破壊株 NS-tApE について、次世代シーケンサーにより全ゲノム配列を解析し、比較ゲノム解析を行った。そのなかから、コーディング領域においてアミノ酸置換や欠失をともなう変異を抽出した。異種タンパク質の高生産が再現するかどうかを確認するため、抽出した変異をそれぞれ導入した株を作製した。これらの変異導入株を用いてリゾチーム生産実験を行ったところ、生産量が增加する株が存在することを見いだした。現在、この変異遺伝子について破壊を行い、異種タンパク質生産に及ぼす影響を調べている。

1) Nemoto *et al.* (2009) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82:1105-14.

**Comparative genomic analysis identified a mutation involved in enhanced production of heterologous protein in *Aspergillus oryzae***

○Feng Jie Jin, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto  
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, next generation sequencer, comparative genomic analysis, heterologous protein production

**1P-025 Analysis of molecular mechanism regulating light-dependent repression of conidiation in *Aspergillus oryzae***

○Helge M. Dietrich, Yuki Tanaka, Feng Jie Jin, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto  
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)  
akitamo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

The domesticated filamentous fungus *Aspergillus oryzae* is very important for Japanese fermentation industry. *A. oryzae* conidia are of high interest for multiple branches of industry, such as *tane-koji* (*koji* starter) producing companies and fermentation companies making sake, *miso* and so on. Although other *Aspergillus* species predominantly undergo conidiation under light illumination, we previously demonstrated that *A. oryzae* RIB40 strain forms conidia in dark, but conidiation efficiency is reduced in light<sup>1)</sup>. How the fungus reacts to light in this irrational way has not yet been understood. To investigate this question, we attempted to molecularly uncover the light response mechanism in *A. oryzae*.

We re-predicted the ORF of a putative blue light receptor gene *AolreA* from *A. oryzae* genome database, resulting in a polypeptide of 857 amino acids with identities of 43% and 53% to *A. nidulans* and *A. fumigatus* LreA, respectively. Amino acid and domain structure analyses were performed, revealing highly conserved structures including the light regulation domain LOV (light, oxygen, voltage), the signal sensor domain PAS (Per-Arnt-Sim) and the DNA binding zinc finger domain. To further examine the impact of *AolreA* in light regulation, gene disruption and phenotypic analysis upon light illumination are being performed.

1) Hatakeyama *et al.* (2007) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1844-1849.

**Analysis of molecular mechanism regulating light-dependent repression of conidiation in *Aspergillus oryzae***

○Helge M. Dietrich, Yuki Tanaka, Feng Jie Jin, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto  
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, light response, blue light receptor, conidiation

**1P-024 麹菌 *A. oryzae* におけるストレス応答調節因子様遺伝子 *Aorim15* の解析**

○中村 英淳, 菊間隆志, 金鋒杰, 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】 酵母 Rim15p は栄養飢餓、熱、酸化などのストレス応答に関わる調節因子であり、これらのストレス耐性に重要な役割を果たしている。一方、麹菌 *Aspergillus oryzae* をはじめとする糸状菌のストレス応答調節因子に関する研究は酵母に比べ研究が進んでいない。そこで本研究は *A. oryzae* における酵母 *Rim15* のホモログ遺伝子 *Aorim15* の機能解析を目的とした。

【方法・結果】 種麹から分離された RIB128 株、RIB430 株、RIB609 株の *Aorim15* をクローニングし、塩基配列を決定した。これらの配列をゲノム解析に用いられた麹菌 RIB40 株と比較したところ、3 株は同一の塩基変異による、共通した 3ヶ所 (648, 697, 1754 番目) のアミノ酸変異をもっていた。また、CAoGD データベースに記載されている麹菌 9 株の *Aorim15* を RIB40 株と比較すると、このうち 5 株が上記と同一の 3ヶ所の変異を有していた。*A. oryzae* は我が国で家畜化された微生物と考えられるが、その祖先型である *A. flavus* の *Aorim15* と比較した結果では、全体で 97% の相同性を示した。RIB40 株において *Aorim15* 破壊株を取得し解析を行ったところ、酵母と同様にラバマイシン、熱処理、 $H_2O_2$  に感受性を示した。一方で *Aorim15* 破壊株では分生子形成および菌核形成が顕著に低下することを見出した。RIB40 株は多数の菌核を形成するのに対して、RIB128、430 株、609 株は菌核を形成しないことが知られている。現在、日本酒製造に使用されている麹菌は菌核形成をしないものがほとんどであり、*Aorim15* の変異がこの主要な原因である可能性が考えられる。

**Analysis of a stress response regulator-like gene *Aorim15* in *A. oryzae***

○Hidetoshi Nakamura, Takashi Kikuma, Feng Jie Jin, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto  
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, stress, sclerotia

**1P-026 初期エンドソーム動態の意義 — ポリソームの細胞内分布への関与**

○樋口 裕次郎<sup>1</sup>, Steinberg Gero<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>九大院・生資環・生命機能, <sup>2</sup>エクセター大・生命科学)  
y.higuchi@agr.kyushu-u.ac.jp

初期エンドソームは、細胞膜から取り込まれたカーゴを選別し、細胞膜へと再びリサイクリングするもしくはリソソーム/液胞への分解へ導くためのエンドサイトーシス経路におけるオルガネラである。本研究で用いた植物病原モデル糸状菌 *Ustilago maydis* では、初期エンドソームの動態の分子メカニズムは比較的良く研究されてきたが、動態の意義に関してはほぼ未知であった。本発表では、初期エンドソームの動態の意義に対する一つの答えを提案する<sup>1)</sup>。まず、40S および 60S のそれぞれのリボソームタンパク質である Rps3 と Rpl25 を選び、ORF の下流に蛍光タンパク質の遺伝子を融合させた。Rps3-mCherry および Rpl25-GFP は細胞質に観察されるものの、細胞内の一部を FRAP (光退色後蛍光回復) 解析すると、両タンパク質の共動態が確認され、リボソームは 80S として動態を示すことがわかった。この動態は微小管、キネシン・ダイニンモータータンパク質に依存し、初期エンドソームと共動態を示した。また、ストレス条件やタンパク質翻訳阻害剤を用いた解析から、動態を示すリボソームはタンパク質翻訳を行っており、ポリソームを形成していると示唆された。さらに、温度感受性変異株を用いて初期エンドソームの動態を欠損させると、リボソーム/ポリソームの細胞内分布に異常が見られた。このことから、初期エンドソームの動態はリボソーム/ポリソームを細胞内に均一に分布させるのに重要であることが示唆された。

1) Higuchi *et al.* (2014) *J Cell Biol* 204, 343-357.

**The role of early endosome motility: involvement in polysome distribution**

○Yujiro Higuchi<sup>1</sup>, Gero Steinberg<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Biosci. Biotechnol., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Biosci., Univ. of Exeter)

**Key words** early endosome, filamentous fungi, motor protein, polysome