

1P-027 *Penicillium purpurogenum*における形質転換法の確立

○小嶋 涼¹, 新居 鉄平¹, 春見 隆文¹, 加藤 順², 荻原 淳¹
 (¹日大院生資研究科・生資利用, ²日大・生資科・生命化)
 j-ogihara@brs.nihon-u.ac.jp

【目的】*Monascus*色素は古来より食品、醸造製品着色のために東アジアにて広く利用されてきた、日本で唯一使用が認められている微生物由来天然着色料である。近年これら色素の抗菌、抗ガン、抗酸化生理活性が見出され、注目されている。一方、一部の *Monascus* spp. において色素生産と同時に、mycotoxin である citrinin を副生することが確認されたため、本色素の欧米諸国での利用は認められていない。我々は、*Penicillium purpurogenum* IAM15392 株が、特定培地条件下において、*Monascus*色素同族体を生産することを見出し、現在までに citrinin の副生を確認していない。したがって、*P. purpurogenum*は商業的な微生物由来天然着色料生産において、*Monascus*と比肩する生産者となると考えた。また、本糸状菌は xylanase や β -glucosidase を生産することも知られており、バイオマス分解においても着目されている。よって、*P. purpurogenum*の遺伝子改変は今後、重要な技術となる。しかしながら、*P. purpurogenum*の形質転換法は未だ確立されていない。そこで我々は、GFP 発現ベクターを用いて、*P. purpurogenum*の形質転換を試みた。

【方法・結果】pBlue ScriptII SK⁺を母核に GFP 発現ベクターとなる pBPE-GFP を構築した。それをプロトプラスト PEG 法により *P. purpurogenum* IAM15392 株に導入し、薬剤耐性株を得た。Typhoon9410 および蛍光顕微鏡により GFP の発現を確認したところ、最終的に 3 菌株の形質転換体を得た。

Construction of transformation system in *Penicillium purpurogenum*

○Ryo Kojima¹, Teppei Arai¹, Takafumi Kasumi¹, Jun Kato², Jun Ogihara¹
 (¹Dept. Biore. Util. Sci., Grad. Sch. Biore. Sci., Nihon Univ, ²Dept. Chem. Life. Sci., Coll. Bioreour. Sci., Nihon Univ.)

Key words *Penicillium purpurogenum*, GFP, transformation

1P-029 ラッカーゼ発現に変異の生じたシイタケ組換え株の解析

○山形 明史, 伊藤 優希, 坂上 真奈, 沢目 洋史, 鈴木 直之,
 佐藤 利次
 (北見工大)
 tosisato@mail.kitami-it.ac.jp

【研究背景】シイタケ (*Lentinula edodes*) は産業上有用な酵素であるラッカーゼ (Lcc) を生産し、分泌型 Lcc は 3 種類が明らかとなっている。液体培養時には Lcc1 のみが分泌され、おがくず培地培養時には、新たに Lcc5 と Lcc6 が分泌されることが示唆されているが、その発現メカニズムに関しては不明である。これまでに、シイタケ用の薬剤耐性遺伝子発現ベクターである pLC-hph を導入したシイタケ組換え株の中から、Lcc 活性発現パターンが宿主株と異なる #590 株が得られた。#590 株は宿主株に比べて早期に Lcc 活性が上昇した。本研究では、シイタケ Lcc 発現メカニズムの解明を目的に、#590 株が分泌する Lcc に関して解析を行った。

【方法・結果】シイタケ宿主株 SR-1、組換え株 #590、及びその胞子株について、MYPG 寒天培地培養物を MYPG 液体培地に接種し、振とう培養した培養液の Lcc 活性を経時的に測定した結果、#590 株及び胞子株は宿主株よりも早期に活性が上昇した。次に、#590 株及び胞子株の Lcc 活性ピーク時の培養液について、Lcc1 と Lcc5 に対するペプチド抗体を用いてウエスタン解析を行った。宿主株では Lcc1 抗体でのみ分子量 77kDa のシグナルが検出されたのに対して、#590 株では Lcc1 抗体で 77kDa、及び Lcc5 抗体では 83kDa のシグナルが検出された。一方、胞子株では Lcc5 抗体でのみ 83kDa のシグナルが検出された。以上の結果から #590 株及びその胞子株では、宿主株と異なる Lcc が分泌され、その活性は宿主株よりも早期に上昇することが明らかとなった。

Analysis of a *Lentinula edodes* mutant transformed by pLC-hph expressing a novel laccase

○Akifumi Yamagata, Yuki Ito, Mana Sakagami, Hirofumi Sawame, Naoyuki Suzuki, Toshitsugu Sato
 (Kitami Inst. Technol.)

Key words *Lentinula edodes*, laccase, transformant

1P-028 新規 RNAi ベクターによるシイタケ (*Lentinula edodes*) *lcc1* 遺伝子の発現抑制

○但野 健太, 大住 夏美, 森 篤生, 沢目 洋史, 鈴木 直之,
 佐藤 利次
 (北見工大)
 tosisato@mail.kitami-it.ac.jp

研究背景) 遺伝子機能を解析する手法の一つに RNAi(RNA interference) がある。これまでシイタケ (*Lentinula edodes*) では、シイタケ解糖系酵素遺伝子のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*gpd*) プロモータとそのターミネータを利用した外来遺伝子発現ベクターである pChG(Sato et al. 2011) が開発された。また、このベクターに inverted repeat 配列を挿入した RNAi ベクターによる目的遺伝子の発現抑制が報告された (Nakade et al. 2011)。しかし、この方法では、すべての遺伝子への適用が難しいことが示唆されている。そこで本研究では、RNAi ベクターの構築を簡便化するために、相互に逆方向のプロモータの間に発現抑制させる遺伝子を挿入する新規 RNAi ベクターを開発することを目的とした。

方法・結果) pChG ベクターにおける *gpd* ターミネータ部位をシイタケ電子伝達系遺伝子のコハク酸脱水素酵素遺伝子 (*sdh-1*) (Irie et al. 2003) プロモータと入れ替え、その間に目的遺伝子として *lcc1* 遺伝子を挿入した pChG⁺-S-cL1 を構築した。次に、本ベクターを REMI 法によりシイタケに導入し、10 株のシイタケ組換え体を得た。これらの株に関して、ラッカーゼの基質としてカテコールを含む寒天培地に接種して、基質の着色を比較した。その結果、宿主株は培養 24 時間以降に褐変化が観察されたのに対して、組換え体では接種後 1 時間以内に強い褐変化が観察された。この結果は、今回得られた組換え体が、明らかに宿主株の表現型と異なることを示している。現在、これらの組換え体のウエスタン解析を行い、*lcc1* 遺伝子の発現抑制に関して検討を行っている。

***Lentinula edodes lcc1* gene silencing by a novel RNAi vector**

○Kenta Tadano, Natsumi Osumi, Atsuo Mori, Hirofumi Sawame, Naoyuki Suzuki, Toshitsugu Sato
 (Kitami Inst. Technol.)

Key words RNA interference, novel vector, *lcc1*, *Lentinula edodes*

1P-030 麹菌におけるグルコース抑制関連因子遺伝子破壊株を宿主とした異種遺伝子高発現

○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)
 b3am1308@s.tohoku.ac.jp

麹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。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* では、広域制御型転写因子 CreA のユビキチン・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、グルコース存在条件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。これまでに、*creA*, *creB* 及び *creA/creB* 二重破壊株を作製し、マルトースを炭素源とした液体培地では *creA/creB* 二重破壊株が顕著に高い α -アミラーゼ活性を示すことを明らかにした。そこで本研究では、*creA/creB* 二重破壊株において α -アミラーゼをコードする *amyB* 遺伝子プロモーターを用いて異種遺伝子を高発現させることで、異種タンパク質の高生産の可能性を検討した。*amyB* 遺伝子プロモーターの下流に異種遺伝子のモデルとして β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を連結して発現させた。その結果、野生株を宿主とした場合と比較して、二重破壊株では GUS 活性及び GUS 遺伝子の転写量が増加したことから、*creA/creB* 二重破壊株を宿主株とした異種タンパク質の高生産が可能であることを見出した。さらに、分泌型酵素のセルラーゼなどの高発現・分泌生産を試みた結果についても報告する。(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。)

Overexpression of heterologous genes in deletion strains 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. Agric., Tohoku Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, carbon catabolite repression, recombinant protein