

1P-009 Trichoderma reeseiにおけるセルラーゼ生産制御因子の網羅的探索

○平沢 大樹, 会田 宏樹, 志田 洋介, 小笠原 渉
(長岡技術科大)
owataru@vos.nagaoka.ac.jp

[背景と目的]糸状菌 *Trichoderma reesei* は多様なセルラーゼを分泌する。その生産機構は様々な転写調節因子により複雑に制御され、全容は明らかとなっていない。近年、*Aspergillus* 属、*Neurospora* 属などにおいて、多くの炭素源応答性、環境因子応答性転写調節因子がセルラーゼ生産に関与することが報告された。しかし、糸状菌にこれらのホモログがあるにも関わらず、属によって異なる機能を持つことが明らかとなってきた。*T. reesei* においても、これら転写調節因子のホモログが存在するが、多くの機能は不明である。*T. reesei* はセルラーゼ生産に突出した能力を保持することから、他の糸状菌よりもセルラーゼ生産への関与が期待される。本研究では、*T. reesei* に存在する推定転写調節因子の機能解析を目的とし、転写調節因子破壊株を構築し、セルラーゼ生産性への影響を評価した。

[方法]推定転写調節因子のコード領域を選択マーカー(*pyr4*)に置換した破壊用カセットを構築した。その後、世界的標準株 QM9414 株をプロトプラスト-PEG法により形質転換し、相同組換えによる遺伝子破壊を行った。1% Avicel 培地にて5日間培養し、セルラーゼ生産性を評価した。

[結果と考察]幾つかの転写調節因子において、セルラーゼ生産性への関与が示唆された。また、ManR は *Aspergillus oryzae* において活性化因子として機能するが、*T. reesei* では抑制的に機能していることが明らかとなった。このことから、他の転写調節因子においても、*T. reesei* 特有の機能を持つ転写調節因子が存在することが推測された。現在、構築した遺伝子破壊株について、より詳細な解析を進めている。

Global analysis of cellulase producing regulator in *Trichoderma reesei*

○Hiroki Hirasawa, Hiroki Aita, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara
(Nagaoka Univ. Technol.)

Key words *Trichoderma reesei*, transcriptional regulation, cellulase, mechanism

1P-010 炭素源が麹菌のカーボンカタボライト抑制制御因子 CreA の細胞内局在と安定性に与える影響

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

麹菌はマルトース存在条件下で大量のアミラーゼを生産するが、グルコースが存在するとカーボンカタボライトリプレッション (CCR) によってその生産が強く抑制される。昨年度の本大会では、麹菌において CCR を制御する転写因子 CreA が、グルコースやマンノースなどの CCR を誘導する炭素源存在条件下で著しく安定化されることを報告した。本発表では、各種炭素源が CreA の細胞内局在に与える影響について報告する。

GFP 融合 CreA を麹菌で発現させ、フルクトースを炭素源とした培地で培養した菌糸を観察した結果、蛍光は主に核内において観察された。この菌糸をグルコースやマンノースを炭素源とした培地に移した場合は核内において強い蛍光が観察されたのに対し、マルトースやキシロースを炭素源とした培地に移した場合は弱い蛍光が細胞質においてのみ観察された。CreA のアミノ酸配列中に nuclear export signal (NES) と推定される配列が存在したことから、アミノ酸変異を導入して細胞内局在や安定性に与える影響を調べた。その結果、NES に変異を導入した CreA は、マルトースやキシロースを炭素源とした培地に移した後も核内に局在し、野生型 CreA と比較して高い安定性を示した。以上の結果から、CreA は CCR 非誘導条件下では核内から細胞質に移行して分解されることが示唆された。

(本研究は「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。)

Effect of carbon sources on the subcellular localization and stability of carbon catabolite repression regulating factor CreA in *Aspergillus oryzae*.

○Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi
(Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, gene expression, GFP, proteolysis

1P-011 Platinum-Fungal TALENs を用いた麹菌におけるゲノム編集

○水谷 治¹, 荒添 貴之², 利田 賢次¹, 林 梨咲¹, 大里 修一², 佐久間 哲史³, 山本 卓³, 桑田 茂², 山田 修¹
(¹酒総研, ²明治大院・農, ³広島大院・理)
mizutani@nrib.go.jp

麹菌は古くから醸造・発酵現場で用いられている産業微生物であり、我々は、麹菌の有用菌株育種を目指して、様々なアプローチで研究を進めている。TALENs は、Transcription Activator-Like Effector Nucleases の略で、植物病原菌キサントモナス属が有する任意の塩基配列を認識する DNA 結合ドメインに、2 量体時に DNA 切断活性を示す酵素 FokI のヌクレアーゼドメインを融合させた人工キメラタンパク質であり、人工ヌクレアーゼとも呼ばれている。TALENs によりゲノム上の任意の位置に 2 本鎖切断を引き起こすと、切断された DNA は、非相同末端又は、相同末端結合により修復されるが、この時に修復エラー等により目的の遺伝子を改変すること、即ちゲノム編集が可能となる。そこで本研究では、TALEN を用いた麹菌育種の可能性を探るために検証を行った。TALENs のターゲットには、ATP sulfurylase (*sC*) 遺伝子を選択し、非相同末端結合による修復エラーを引き起こすコンストラクトで、糸状菌コドン使用頻度に最適化された高活性型 Platinum-Fungal TALENs⁽¹⁾ を用いて行った。*sC* 遺伝子が破壊されると、セレン酸耐性になることを利用して選抜を行い、TALENs による切断活性調べた所、得られた株の 95% 以上でその活性があることが明らかとなった。また、ゲノム編集の結果、糸状菌特有と思われる DNA 修復機構がいくつかの株で観察されたので、これについても併せて報告したい。

(1) Arazoe T et al., Biotechnol. bioeng., (2015)

Genome editing via double-strand break repair using the Platinum-Fungal TALENs in *Aspergillus oryzae*

○Osamu Mizutani¹, Takayuki Arazoe², Kenji Toshida¹, Risa Hayashi¹, Shuichi Ohsato², Tetsushi Sakuma³, Yamamoto Takashi³, Kuwata Shigeru², Osamu Yamada¹
(¹NRIB, ²Grad. Sch. Agric., Meiji Univ., ³Grad. Sch. Sci., Hiroshima Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, TALENs

1P-012 ゲノム情報を利用した抗真菌剤 FR901469 生産性向上株の作製

○松井 真¹, 横山 達也¹, 熊谷 俊高², 寺井 悟朗³, 根本 薫⁴, 町田 雅之⁵, 柴田 孝¹
(¹アステラス製薬, ²ファームラボ, ³インテック, ⁴TRAHED, ⁵産総研・生物プロセス)
makoto.matsui@astellas.com

微生物を工業的に利用する際には、工業製造時に有利な形質をもつ菌株を得ることを目的として育種が行われる。育種の方法として突然変異法がよく用いられているが、次世代シーケンサーの登場により簡便にゲノム解析を行うことが出来るようになったことから、今後は遺伝子工学的手法を用いた分子育種が主流になっていくことが予想される。

No.11243 株は抗真菌剤 FR901469 を生産する糸状菌である。本研究では遺伝子工学的手法を用いた No.11243 株の FR901469 生産性向上株の作製を試みた。まずアノテーションされた遺伝子から NRPS 遺伝子を抽出し、ドメインと FR901469 の構造を比較することで FR901469 の生合成に関わる NRPS 遺伝子を推定した。さらに推定 FR901469 生合成遺伝子クラスター内にある転写因子の高発現株の作製を行った。その結果クラスター内の多くの遺伝子の発現量が向上し、FR901469 の生産量が 3.4 倍に向上した株を得ることに成功した。次に原料となるアミノ酸の生合成を強化するために、アミノ酸の生合成を制御する転写因子である *cpcA* 遺伝子の高発現株の作製を行った。その結果、FR901469 の生産量がさらに 1.4 倍に向上する株を得ることが出来た。また発現解析によって、アミノ酸の生合成に関わる遺伝子の発現量が全体的に上昇していることを確認した。

本研究は、経済産業省委託事業『革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発』の一部として実施された。

Producing antifungal antibiotic FR901469 high-yield strains by using genome information

○Makoto Matsui¹, Tatsuya Yokoyama¹, Toshitaka Kumagai², Goro Terai³, Kaoru Nemoto⁴, Masayuki Machida⁵, Takashi Shibata¹
(¹Astellas Pharma. Inc., ²Fermlab Inc., ³INTEC Inc., ⁴TRAHED, ⁵BRI. AIST)

Key words filamentous fungi, genome engineering, transcriptome, secondary metabolite