

1P-013 麦角菌におけるコウジ酸生産量の相違の解析

○佐野 元昭, 大森 慎也, 金谷 茜里, 町井 あかね, 大箸 信一
(金工大・ゲノム研)
msano@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【目的】

コウジ酸は麦角菌 (*Aspergillus oryzae*) 等の特定の糸状菌により生産され、メラニン合成酵素であるチロシナーゼの作用を阻害する美白剤の一種である。各種研究が進められているが、コウジ酸生産経路の特定には至っていない。そこで今回、酒類総合研究所が保管している各種由来の麦角菌を選択し、コウジ酸生産量の測定を行い、コウジ酸を生産しない株や大量にコウジ酸を生産する株について解析を行ったので報告する。

【結果】

解析に使用した菌株は、穀物・醤油・酒・味噌由来の麦角菌 13 株を選択した。まず、コウジ酸生産・非生産条件下でのコウジ酸生産量を確認し、コウジ酸生産成関連遺伝子 kojA,R,T の遺伝子発現量について RIB40 株と比較することで解析を行った。その結果、コウジ酸生産が見られない菌株 RIB23, RIB124 ではコウジ酸生産条件下でも kojA,T の遺伝子発現量が低いが、kojR の遺伝子発現量はほとんど差が認められなかった。コウジ酸非生産条件下でもコウジ酸を生産する RIB645 では、コウジ酸非生産条件下でも kojA,R,T の遺伝子発現量が高いことが確認された。また、コウジ酸生産を抑制することが知られている硝酸ナトリウム取り込みに関わる nrtA について解析も行ったが、RIB645 株では nrtA 遺伝子発現量に変化は確認できなかった。現在、コウジ酸生産成関連遺伝子のプロモーター領域などについて詳細な解析を進めている。

Analysis of Koji acid production in *Aspergillus oryzae*

○Motoaki Sano, Shinya Omori, Akari Kanaya, Akane Machii, Shinichi Ohashi
(Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

Key words *Aspergillus oryzae*, Kojic acid, biosynthesis

1P-014 麦角菌の alpha-1,3-グルカン生合成酵素遺伝子の高発現による形態及びタカアミラーゼ細胞壁吸着への影響

○張 斯来, 田中 瑞巳, 新谷 尚弘, 五味 勝也
(東北大院・農)
gomi@biochem.tohoku.ac.jp

麦角菌が分泌生産する Taka-amylase(TAA)は培養後期において培養液中から消失し、細胞壁に吸着することが知られている。我々は細胞壁構成成分 alpha-1,3-グルカン (AG) と TAA の細胞壁吸着性の関係について研究を進めている。AG 生合成酵素遺伝子(agsA,B,C)を様々な組み合わせで破壊した結果、液体培養時に野生株がペレット状になるのに対して、agsB を破壊した株ではパルプ状の形態を示し、さらに TAA 活性を調べた結果、agsB 破壊株では培養前期にも TAA が細胞壁に吸着していることが明らかになった。このことから、AG の生合成が主に agsB 遺伝子に依存し、AG が TAA の細胞壁への吸着を阻害する因子であることが示唆された(張ら、2014)。

agsB 破壊株に AG 生合成酵素遺伝子を TAA をコードする amyB 遺伝子プロモーターで高発現した株を作製した。得られた株の形態変化と TAA 活性を調べた結果、agsA 高発現株では野生株と同様のペレット状を示し、TAA も培地中に分泌されたことから、agsA 遺伝子は agsB 遺伝子の機能を相補することが示唆された。一方、agsB 高発現条件下では培地中の菌体が著しく減少し、フラスコ壁面に吸着し易くなっていることが観察され、さらに agsC 高発現株でも agsB 高発現株と同様の結果を示した。現在、amyB プロモーターより転写活性の低いアクリチン遺伝子プロモーターで ags 遺伝子を発現させた株を作製し、菌体形態及び TAA 活性を調べている。

(張ら、2014 年度日本生物工学会大会講演要旨集、1P-021)

Effect of overexpression of alpha-1,3-glucan synthase genes on the mycelial morphology and Taka-amylase adsorption on the cell wall in *Aspergillus oryzae*

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

Key words *Aspergillus oryzae*, alpha-1,3-glucan, Mycelial morphology, Taka-amylase adsorption

1P-015 メタノール資化酵母 *Hansenula polymorpha* における

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集

○沼本 穂, 前川 裕美, 金子 嘉信
(阪大院・工)
kaneko@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Hansenula polymorpha は、50°C 近い高温でも生育可能であり、メタノール誘導による異種タンパク質生産宿主としても利用されている産業酵母の 1 つである。本酵母で開発した YCP 型ベクターを使用して、高等動植物でゲノム編集技術として注目されている CRISPR/Cas9 システムの有効性を調べた。パン酵母用 CRISPR/Cas9 プラスミドから PCR 増幅した Cas9 遺伝子およびプロモーターを *H. polymorpha* SNR6 に置き換えた single guide RNA (sgRNA) カセットを 1 つのベクターに組み込んだプラスミドを作製した。sgRNA の標的配列部分を PCR プライマー配列に取り込み、編集したい遺伝子に応じた sgRNA を PCR 増幅して導入するシステムをしている。標的遺伝子としてアデニン生合成遺伝子を 2 つ選び、それぞれの CRISPR/Cas9 プラスミドを野生型株に形質転換して、期待されるアデニン要求性を調べた。10⁻³ の頻度でアデニン要求性変異体が得られ、標的配列付近の塩基配列を調べたところ、期待される塩基の置換、挿入や欠失の変異を確認できた。効率を高める工夫が必要であるが、本酵母でも CRISPR/Cas9 によるゲノム編集が可能であることがわかった。本研究は公益財団法人発酵研究所平成 23 年度寄付講座助成で実施された。

Genome editing by CRISPR/Cas9 in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*

○Minoru Numamoto, Hiromi Maekawa, Yoshinobu Kaneko
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words *Hansenula polymorpha*, genome editing, CRISPR/Cas9

1P-016 MEL-B 生産酵母 *Pseudozyma tsukubaensis* の育種・改良の基盤技術

○雜賀 あずさ¹, 小池 英明², 羽部 浩¹, 山本 周平³, 岸本 高英³,
森田 友岳¹
(¹産総研・機能化学, ²産総研・生物プロセス, ³東洋紡(株)・敦賀バイオ)
morita-tomotake@aist.go.jp

【背景】

担子菌酵母 *Pseudozyma tsukubaensis* が生産するマンノシリエリスリトールリピッド (MEL-B) は、植物油から量産可能であり、優れた保湿効果を示すことから化粧品素材として実用化されている。一方、MEL-B の生産効率の向上で製造コストを低減できれば、汎用的なバイオ化学品として用途の拡大が期待される。本研究では、遺伝子組換えによる *P. tsukubaensis* の育種・改良を目指し、宿主株の選択と薬剤耐性マーカーを用いた形質転換株の作製を行った。

【方法】

P. tsukubaensis の NBRC1940 (基準株) とスクリーニング株 (KM160 株及び 1E5 株) の細胞形態を観察し、薬剤耐性 (ハイグロマシン、G418) を確認した。GFP 発現ベクターを用いて *P. tsukubaensis* を形質転換し、蛍光顕微鏡で観察した。

【結果と考察】

P. tsukubaensis 基準株は、液体培養の初期から細胞が菌糸状になるのに対し、KM160 と 1E5 株は酵母状の形態を維持した。3 株とも薬剤を添加した寒天培地上で生育できないことから、薬剤耐性による形質転換体の選別が可能であることを確認した。直鎖状にした GFP 発現ベクターを *P. tsukubaensis* 1E5 株に導入した結果、G418 耐性の形質転換体が得られ、緑色の蛍光を発していることが確認できた。今後は、MEL-B の生合成遺伝子の情報を蓄積し、*P. tsukubaensis* 1E5 株の育種・改良を進めることで、MEL-B 生産量の大幅な向上が期待される。本研究は JST の研究成果展開事業 A-STEP により実施した。

Transformation of *Pseudozyma tsukubaensis*, a Producer of Mannosylerythritol Lipid-B

○Azusa Saika¹, Hideaki Koike², Hiroshi Habe¹, Shuhei Yamamoto³,
Takahide Kishimoto³, Tomotake Morita¹
(¹ISC, AIST, ²BRI, AIST, ³Tsuruga Inst. Technol., TOYOB CO., LTD.)

Key words *Pseudozyma tsukubaensis*, mannosylerythritol lipids, transformation, gene expression