

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17019001

研究課題名（和文）ゲノム情報から探るコウジカビの有用物質生産機構の分子基盤

研究課題名（英文）Molecular mechanisms for production of useful proteins in *Aspergillus* fungi based on genomic information

研究代表者 五味 勝也(GOMI KATSUYA)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：60302197

研究成果の概要（和文）：

麹菌のゲノム情報から転写因子遺伝子を約 400 種類探索し、その条件高発現株ライブラリーを作製し、プロテアーゼやセルラーゼ、リパーゼなどの有用酵素の生産に関与する転写因子を見出した。ヒスチジンキナーゼから MAP キナーゼに至るシグナル伝達経路に関わる遺伝子の網羅的解析を行い、嫌気応答に関与する新たなヒスチジンキナーゼを見出すとともにカビでは初めてとなるリン酸転移反応を生化学的に証明した。さらに、プロテアーゼ低生産性宿主を構築し、異種タンパク質生産量の向上を図ることができた。

研究成果の概要（英文）：

Based on genome database of koji-mold (*Aspergillus oryzae*), approximately 400 genes encoding transcription factor have been found, and a library for strains that express those factor genes at high level has been constructed. By using this library, several transcription factors involved in production of industrially important enzymes such as protease, cellulase, lipase, and so on, have been found. Comprehensive analyses of genes/proteins in signal transduction pathway have revealed the novel histidine kinase involved in anaerobic response and the first direct biochemical evidence for the existence of His-Asp phosphotransfer systems in filamentous fungi. In addition, yield of heterologous protein production has been improved by using protease-low-producer strains.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	21,500,000	0	21,500,000
2006 年度	20,300,000	0	20,300,000
2007 年度	20,100,000	0	20,100,000
2008 年度	20,100,000	0	20,100,000
2009 年度	19,300,000	0	19,300,000
総計	101,300,000	0	101,300,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：糸状菌、コウジカビ、転写制御因子、シグナル伝達、タンパク質分泌、マイクロアレイ、相同組換え

1. 研究開始当初の背景

コウジカビは約 30～36 Mb という微生物の中ではもっとも大型のゲノムサイズを有し、

その遺伝子数はゲノム解析の結果、約 10,000～12,000 個と予想される。全ゲノム情報をもとに、カビの遺伝子情報と機能を網羅的かつ

系統的に解明することによりカビの細胞機能をシステムとして理解するとともに、カビが保有している物質生産の分子基盤を構成している遺伝子ネットワークを解明することで、新たな有用物質生産のための技術基盤を構築することが期待できる。コウジカビの複雑な遺伝子発現制御ネットワーク解析手法として最も基盤的かつ重要であるトランスクリプトーム解析について、申請者らはゲノム情報をもとに 5,000 個の cDNA を搭載したマイクロアレイを試作し、麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の特徴的培養形態である固相培養における発現プロファイル解析と新たな発現有用遺伝子の探索に有効に利用できることを示した。

2. 研究の目的

コウジカビに属する産業菌である麹菌とその近縁種 *Aspergillus nidulans* の全ゲノム情報をもとに、ポストゲノム科学的手法によって、カビの有用物質、特に自身が分泌するバイオマス分解酵素から異種生物由来タンパク質までにわたる有用タンパク質生産に関わる多様な遺伝子機能を解明し、それらの遺伝子の人為的コントロールによるタンパク質生産性の向上を図ることを目的とする。具体的には、ゲノム情報より見出されたすべての転写因子ならびに環境応答に関わる情報伝達系の遺伝子について変異株（遺伝子破壊または条件的発現制御株）を作製し、得られたライブラリーを利用して、バイオマス分解酵素や異種タンパク質生産やカビの生育に及ぼす影響を調べる。野生株および変異株についてマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイル解析することにより、コウジカビのバイオマス分解酵素生産やタンパク質分泌に関わる遺伝子発現制御ネットワークを明らかにする。情報伝達系、転写因子ならびにタンパク質分泌に関与する遺伝子および遺伝子産物の機能を分子生物学・細胞生物学的手法により解明する。タンパク質分泌生産に関与することが明らかとなった遺伝子について、高発現または発現抑制（遺伝子破壊）することによって有用タンパク質高生産システムの構築を図る。

3. 研究の方法

(1) 転写因子遺伝子破壊及び条件的高発現株ライブラリーの作製とトランスクリプトーム解析：*A. oryzae* の転写因子のうち、典型的な Zn(2)-Cys(6)型、C₂H₂型などの zinc finger motif を有する転写因子を主な対象として網羅的に遺伝子破壊・発現制御株を造成する。遺伝子破壊株の造成のため、非同末端結合 (NHEJ) に関わる遺伝子 (*ku70/ku80* ホモログ、*lig4* ホモログ) 破壊株を造成し、高いターゲティング効率を示す宿主・ベクター系の確立する。転写因子の破壊株・発現制御株について、生育及び有用分解酵素生産に及ぼす影響を調べるとともにマイクロアレイ解析を行い、転写因子の制御下にある遺伝子ネットワークを解明し、酵素分泌生産に関与する転写因子を同定する。最終的には、有用な分解酵素生産やタンパク質の分泌、一次および

二次代謝産物生産に関与する転写因子遺伝子を同定すると同時に未知転写因子の機能を解明する。

(2) 情報伝達系関連遺伝子破壊株ライブラリーの作製とトランスクリプトーム解析：コウジカビゲノム情報から推定される情報伝達系、特に二成分性制御因子である 15 種類のヒスチジン (His) キナーゼについて、*A. nidulans* を宿主に遺伝子破壊株・発現制御株を造成する。MAP キナーゼカスケードに含まれる遺伝子についても変異株を作製する。生育とタンパク質生産に及ぼす影響を調べるとともに、His キナーゼ遺伝子破壊株のマイクロアレイ解析により最終標的遺伝子の機能解析を行い、環境変化や外界刺激に対する応答-情報伝達-転写制御のパスウェイを明らかにする。また、二成分制御系ではクロストークが頻繁に見られるため、変異株同士をかけ合わせた多重変異株を作製し、シグナリングパスウェイを解明する。最終的には、(1) の結果と統合して、カビに特徴的な固相表面培養を含めた各種培養条件における、培養→転写制御→代謝→物質生産の基本骨格を明らかにし、転写因子の人為的制御によるタンパク質生産のための基盤技術を確立する。

(3) タンパク質分泌関連遺伝子群の機能解析とタンパク質生産への利用基盤の確立：タンパク質分泌・膜輸送に関わる遺伝子と GFP との融合タンパク質を網羅的に作製して細胞内局在ならびに生細胞を用いてこれらの動態解析を行う。一方、タンパク質高分泌株や異常分泌タンパク質発現株のマイクロアレイ解析により、分泌や品質管理に関与する特異的な遺伝子を探索し、それらの遺伝子破壊株を造成し、タンパク質分泌との関連を明らかにする。アレイ解析から見出されたタンパク質分泌に関与する遺伝子群の機能を解明するとともに、それらの遺伝子の高発現または発現抑制によって有用タンパク質高生産性宿主株を育種する。

4. 研究成果

(1) ① 相同組換え効率の高いコウジカビ宿主の造成：非同末端結合 (NHEJ) の初発段階で機能する *ku70* ホモログの破壊によって、*A. oryzae* と *A. nidulans* もともに、相同的組換え効率が 70~80% と著しく上昇し、遺伝子破壊株造成用として有望な宿主株を育種することができた。一方、*A. oryzae* では NHEJ の最終段階で機能する DNA リガーゼ IV のホモログ遺伝子 (*ligD*) 破壊株において、プロテアーゼ関連遺伝子を破壊用標的遺伝子として相同組換え効率を調べたところ、直鎖状・環状にかかわらず 100% の効率で相同部位にターゲティングされていた。さらに、この宿主株を用いて麹菌の MAP キナーゼ遺伝子全 5 種類の破壊を行った結果でも、4 種類の遺伝子で 100% の効率で相同部位にターゲティングされた。また、標的遺伝子の相同領域の長さは少なくとも 500 bp 程度であれば高頻度のターゲティングには十分であった。

② 有用酵素生産に関与する転写因子の探索

と機能解析：麴菌 (*A. oryzae*) のゲノム情報をもとに、当初推定されたものに加えて再アノテーションにより新たに見出されたものも含めて、Zn(2)-Cys(6)型 (約 350 種類)、C₂H₂ 型 (約 70 種類)、GATA 型 (6 種類)、bZIP (8 種類)、bHLH (10 種類) について、コード領域を α -アミラーゼ遺伝子 (*amyB*) プロモーターに連結したベクターを構築し、麴菌に導入して条件的高発現株のライブラリー作製を行った。このライブラリーを用いて、酵素活性を容易に検出することが可能なプレートに高発現株を接種し、分解活性の有無を調べることで、有用分解酵素生産に関わる候補転写因子をスクリーニングし、以下のような結果を得た。a) タンパク質分解酵素群の発現を正に制御する転写因子

(PrtR) の遺伝子破壊株はカゼイン培地上での生育が低下すると同時にハロー形成能を示さず、液体培養においても菌体外のプロテアーゼ活性が野生株に比べて著しく低かった。高発現株と破壊株のアレイ解析により、PrtR は菌体外に分泌される主だったプロテアーゼとペプチダーゼ (酸性プロテアーゼ、中性プロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、カルボキシペプチダーゼ、ロイシンアミノペプチダーゼ) の遺伝子発現を共通に正に制御する転写因子であることがわかった。b) アラビナン分解酵素の発現に関与する転写因子候補は 2 種類見出され (*AraR*、*AraX*)、一方の *AraR* 高発現株ではアラビノース存在下で β -ガラクトシダーゼ生産性が非常に高くなっていたが、*AraX* 高発現株ではそれよりも生産性は低く、*AraR* がメインに働く転写因子と考えられた。さらに、*AraR* の遺伝子破壊株は、アラビノース資化能に欠損が見られ、資化に関わる遺伝子群のアラビノースによる誘導発現が顕著に低下していた。破壊株を用いたマイクロアレイ解析により、16 種の糖質分解酵素ならびにアラビノース代謝系酵素の候補遺伝子を制御下遺伝子として同定することができた。c) リパーゼ (クチナーゼ) の生産に関与すると考えられる転写因子 (*FarA*) の破壊株は、生分解性プラスチックの PBSA を含むプレート上でハローを形成しなかった。種子油を炭素源とする液体培養でも、リパーゼ活性や PBSA 分解活性が野生株に比べて著しく低く、培養上清のウェスタン解析によりクチナーゼ *CutL1* の生産性が減少していた。さらに *cutL1* だけでなくリパーゼ遺伝子 *mdlB* の発現も低下していた。d) セルラーゼやキシラナーゼ生産性を上昇させる転写因子を 2 種類見出した。これらに加えて、ソルビトール代謝を制御する転写因子や多様な多糖分解酵素遺伝子の発現や分化に関与する広域転写因子も見出した。さらに、分解酵素生産に関与する転写因子ではないが、薬剤排出に関わる ABC トランスポーター発現を制御する新規転写因子 (*AtrR*) も見出すことができた。

アミラーゼ生産に関わる転写因子 *AmyR* の解析過程で、誘導基質であるマルトースの細胞内取込みを制御する転写因子 *MalR* を見出した。MalR はマルトース資化 (*MAL*)

クラスター内に存在し、その破壊株はマルトースだけでなくデンプンの資化にも大きな影響が見られた。*malR* 破壊株ではマルトースによる誘導初期における α -アミラーゼ生産量が顕著に低下しており、クラスター中のマルトースパーミアーズ *MalP* によるマルトースの細胞内取込みがデンプン分解酵素生産に重要であることが示された。さらに興味深いことに、*malR* または *malP* 破壊株では通常は発現がほとんど見られない *MAL* クラスターのホモログクラスターの遺伝子の発現が顕著に増加していた。

セルラーゼ及びキシラナーゼ生産に関与する転写因子 *XlnR* についても、その高生産株と破壊株のアレイ解析により、制御下遺伝子 75 種を同定した。その内 32 種は多糖分解に関与するグリコシドヒドロラーゼをコードしており、基質により分類するとキシラン分解酵素 14 種、セルロース分解酵素 9 種、キシログルカン分解酵素 3 種、基質未知 6 種であった。キシランの修飾基であるアセチル基やフェルロイル基の遊離に関わる 3 種の酵素遺伝子、キシロース代謝に関与すると考えられる 2 種の酵素遺伝子も同定された。*XlnR* と *AraR* 破壊株のアレイ解析から選抜した候補遺伝子の産物を生産・精製し、基質特異性の決定を通してこれら遺伝子を同定し、ペントース代謝系の完全構築に至った。

(2) ① *A. nidulans* の二成分性情報伝達系の遺伝子破壊株の作製と機能解析: *A. nidulans* のゲノムに存在する二成分性情報伝達カスケードを構成する His キナーゼーリン酸基伸介 (HPt) 因子レスポンスレギュレーター (RR) のすべての遺伝子について定量的 RT-PCR により生活環の主要段階における発現プロファイルを解析し、全く発現が見られない 4 種の His キナーゼを除く全ての遺伝子の破壊株を作製した。His キナーゼのうち、*nikA* の破壊は生育の著しい遅れを引き起こし、イプロジオン、フルジオキシニルなどの抗カビ剤に対して耐性となったが、浸透圧感受性は観察されなかった。また、*nikA* 破壊株はキチンに特異的に結合する Calcofluor White で染色されにくいため、*NikA* は細胞壁キチンの合成に関与していると考えられた。*phkA*、*phkB* の破壊株はわずかに過酸化水素耐性となり、二重破壊により耐性が上昇したため、これらは酸化ストレス応答に関与すると考えられる。HOG 経路の上流浸透圧センサーと考えられた *tcsB*、赤色光応答に関与するとされる *fphA* と機能予測不能な HK2、HK9 に分類される His キナーゼの破壊では有意な影響は見られなかった。HK8 に分類される His キナーゼ (HK8-2; *HysA*) の破壊では嫌気条件下で誘発される有性生殖の抑制が、高発現では好気条件下で引き起こされる無性生殖の抑制が観察され、推定下流遺伝子群の発現解析結果と *HysA* の還元剤存在下での自己リン酸化から嫌気センサーとして嫌気応答に関与すると考えられる。*A. nidulans* には HPt 因子として *YpdA* の一種しか存在せず、この遺伝子破壊株は取得できず、必須遺伝子と考えられたため、条件的 *ypdA* 発現株を作

製した。*ypdA* 遺伝子転写量を 5%以下に抑制すると、遺伝子発現抑制時には著しい生育阻害、菌糸細胞の多分岐化、細胞隔壁数の増加、バルーン様細胞が観察され、本遺伝子が生育に必須であることが示された。二成分制御カスケードの最下流にある RR をコードする遺伝子は 4 種類存在し、そのうち *sskA* 破壊株は MAP キナーゼ HogA の破壊株と同程度の高浸透圧感受性を示し、*srrA* の破壊株では分化が完全に阻害されるとともに酸化ストレス感受性を示した。しかし、他の 2 種類の RR については、破壊株の有意な表現型は観察されなかった。

②ヒスチジンキナーゼの発現部位解析：15 種類の His キナーゼのプロモーターと GFP との融合遺伝子を構築して発現部位を解析した。TcsB, NikA, FphA, HysA, HK8-5 は、無性生殖器官である conidiophore で強い発現が見られた。TcsB, FphA, HK9 の発現は頂囊、フィアライド及び分生子で見られ、NikA は頂囊とフィアライドのみ、HysA は分生子のみで発現していた。有性生殖を引き起こす条件では、TcsB, PhkA, NikA は有性生殖器官の cleistothecia の内部で強い発現が見られ、PhkA, NikA, HK9 は cleistothecia の形成初期、また TcsB と HK8-5 は後期に強い発現が見られた。TcsB, PhkA, NikA, FphA, HysA, HK8-5 が分化過程で重要な機能を持つことが示唆された。

③二成分性情報伝達カスケード下流の遺伝子機能解析：HOG 経路の上流浸透圧センサーを構成する二成分性情報伝達経路下流の MAPKKK (SskB) と MAPKK (PbsB) 遺伝子破壊株は MAP キナーゼ (HogA) 破壊株と同程度の高浸透圧感受性を示し、いずれの破壊株でも HogA のリン酸化が認められなかった。以上の結果と、PbsB が酵母のもう一つの浸透圧センサー Sho1p のホモログである ShoA とは相互作用を示さなかったことから、*A. nidulans* の HOG 経路は酵母のそれとは異なり *SskA*→*SskB*→*PbsB*→*HogA* という単直線路であることが明らかとなった。これらの遺伝子破壊株が顕著な高浸透圧感受性を示さなかったことから、カビには他に未知の高浸透圧応答システムが存在する可能性が示唆された。

ypdA 遺伝子の発現抑制条件下では浸透圧刺激なしに HogA が構成的にリン酸化されて活性化しており、グリセロール合成系遺伝子 *gfdB*、2 種類のキチン合成酵素遺伝子 (*csmA*, *csmB*)、分生子特異的なカタラーゼ遺伝子 (*catA*) の転写が、HogA の活性化状態を反映して上昇していた。*ypdA* 条件的破壊株に HogA 経路の上流に位置する MAPKK である PbsB 欠損を導入した株では、*ypdA* 発現抑制時に HogA は活性化されなかったが、依然として生育阻害を示した。この結果から、YpdA は RR の SskA および SrrA に対してリン酸転移能を有することから、SskA (→HogA) ではなく、SrrA が YpdA 欠損時の致死性に関与することが示唆された。

A. nidulans の MAP キナーゼ MpkA、酵母の CWI 経路に関与する MADS タンパク質

Rlm1p のオーソログ RlmA、および SBF

(Swi4/6p) ホモログ AnSwi4/6 の遺伝子破壊株を造成し、 α -1,3-グルカン合成酵素阻害剤 micafungin 処理時の *mpkA* 遺伝子の転写解析から、*A. nidulans* では出芽酵母と異なり、*mpkA* 遺伝子の主要転写因子は RlmA でも SBF でもなく、MpkA 下流の未知の転写因子が行っていることを明らかにした。また、*mpkA*, *rlmA* 遺伝子破壊株における細胞壁関連遺伝子の転写解析により、*A. nidulans* では α -1,3-グルカン合成酵素遺伝子の転写制御は CWI 経路を介して RlmA が行っていること、さらに CWI 経路以外に細胞壁関連遺伝子の転写制御を行う未知のシグナル伝達経路が存在し、その経路は主に α -1,3-グルカンとキチンの合成関連遺伝子の転写制御を行っていることを明らかにした。さらに、麹菌より希少多糖である α -1,3-グルカンの大量分離法も確立した。

A. nidulans の *sskA*, *hogA*, *atfA* (bZIP 型転写因子) 破壊株の浸透圧感受性・農薬感受性の比較とアレイ解析から、浸透圧応答は *NikA*→*YpdA*→*SskA*→*PbsB*→*HogA*→*AtfA* と直線的応答であることが明らかとなった。麹菌で *AtfA* とそのホモログ *AtfB* のそれぞれの破壊株を作製したところ、ともに分生子が酸化ストレス及び熱ストレスに対して高感受性を示した。特に *atfA* 破壊株では分生子の発芽率の顕著な低下が認められた。発芽過程における貯蔵糖を分析した結果、*atfA* 破壊株でグリセロールの蓄積が起こらず、これが発芽率の低下につながった一因と考えられた。また両破壊株のマイクロアレイ解析により、*AtfB* の制御下にある遺伝子はほとんど *AtfA* の制御下遺伝子に含まれる一方、*AtfA* はそれ以外にも多くの遺伝子の発現を制御していた。

④二成分性情報伝達系におけるリン酸基転移の生化学的解析：His キナーゼから HPT 因子、そして RR へのリン酸基転移を *in vitro* で検証するため、15 種類の His キナーゼ、HPT 因子 (YpdA)、2 種類の RR (SrrA, SskA) を大腸菌で発現・精製した。大腸菌の His キナーゼである ArcB を自己リン酸化させて用いることで、ArcB から YpdA、YpdA から SrrA、SskA へのリン酸基転移が確認された。また、YpdA から His キナーゼの FphA への逆方向のリン酸基転移を確認した。これは、カビにおける His-Asp リン酸リレーを生化学的に証明した初めての例である。また、HysA の自己リン酸化条件も決定することができた。

(3) ①タンパク質分泌に関与するオルガネラ関連遺伝子の細胞生物学的解析：小胞輸送過程で働く SNARE タンパク質全 21 個の遺伝子の N 末に GFP を融合したタンパク質を作製し、蛍光顕微鏡により観察した。AoUfe1, AoSec20, AoUse1, AoSec22 は ER に局在し、AoSed5, AoBos1, AoGos1, AoBet1, AoSft1, AoVti1 は菌糸先端にドット状に観察された。AoSso1, AoSso2, AoSnc1 と AoVam3, AoVam7, AoNyy1, AoVti1 は、それぞれ細胞膜と液胞膜に観察された。AoTlg1, AoTlg2, AoSyn8, AoVti1, AoSnc1 についてはエンドソームと思われる部位に観察された。N 末が脂質修飾されることが知ら

れているAosec9とAoykt6については細胞質全体に蛍光が観察され正しい局在の観察ができなかった。次に、10個のRab GTPaseとGFP融合タンパク質の局在観察により、AoRab1, AoRab2, AoRab6はGolgi体と思われる菌糸先端領域に多く見られるドット状構造体に局在し、AoRab4, AoRab11, AoSec4は菌糸先端のSpitzenkörperに局在することが示唆された。AoRab53はearly endosomeに存在することが示唆されたが、AoRab7, 51, 52については局在するオルガネラの特定には至らなかった。

②異常分泌タンパク質過剰発現による細胞応答：黒麹菌由来の α -1,2-mannosidase (MsdS)の1アミノ酸置換による立体構造変異体の発現レベルが低い場合は分泌されずに細胞内で分解されており、ERADに関与するユビキチンリガーゼHrdAを破壊すると分解が抑制されたことから、ERAD系で分解を受けることが示唆された。一方、高発現させると過剰に糖鎖付加された酵素タンパク質が分泌された。アレキ解析により変異型MsdSの過剰発現は、unfolded protein responseに関与する転写因子HacAのmRNAのスプライシングを引き起こし、その制御下にあるBipA、disulfide isomerase (PdiA) やHsp30の遺伝子やCOPII complex形成に関わる酵母SEC31やERV29のホモログの発現が亢進していることが明らかとなった。

③プロテアーゼ低生産性麹菌株の育種と異種タンパク質生産への利用：すでに破壊株のヒトリゾチーム生産向上が認められている *pepA*, *tpaA*, *alpA* に加えて、中性プロテアーゼ遺伝子 *nptB* の破壊によりリゾチーム生産量の向上が認められた。*ligD* 破壊株を宿主に、*pyrG* マーカーをリサイクルすることにより、5種類のプロテアーゼ遺伝子 (*tpaA*, *pepE*, *nptB*, *dppIV*, *dppV*) を破壊した株を造成し、キモシンを生産させたところ、*tpaA/pepE* の2重破壊株に比べて生産性が34%改善された。

(1) で見出された転写因子遺伝子 *priR* の破壊により、分泌生産されるプロテアーゼ活性の顕著な減少が認められ、異種タンパク質 (ヒトリゾチーム) の分泌生産量が向上した。*priR/pepE* 二重破壊株では、リゾチーム生産量の増加が認められ、さらに固体培養で *Cryptococcus* のクチナーゼを生産したところ、野生株では分解による生産量の顕著な低下が認められたのに対して、二重破壊株では分解が抑制されて生産量が著しく向上した。

④異種遺伝子発現におけるコドン最適化の効果：コドン最適化したダニアレルゲン Der f7 を麹菌で発現させたところ、分泌生産量が増加し、mRNA レベルもネイティブな Der f7 と比較して顕著に高くなっていった。mRNA の転写終結点を調べた結果、ネイティブな Der f7 ではコード領域内で転写が終了した不完全型の mRNA が生成していることが示された。不完全型 mRNA はストップコドンを持たず、nonstop mRNA 分解機構によって分解を受けることが示唆された。nonstop mRNA が生成する原因として、異種遺伝子に存在する AT リッチな配列が poly(A) シグナルとして機能するものと考え、これまで不明であったカビの poly(A) シグナルを明らかにするため、麹

菌の EST とゲノム配列を利用して、poly(A) 付加領域の *in silico* 解析を行うことにより、mRNA の転写終結に関わるシグナル配列が推定できた。麹菌の poly(A) シグナル配列は酵母よりも植物に類似しており、ゲノムから探索された転写終結マシナリーを構成する因子群も植物に近いものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 31 件) 全て査読有

- 1) S. Hasegawa, M. Takizawa, H. Suyama, T. Shintani, K. Gomi: Characterization and expression analysis of a maltose-utilizing (MAL) cluster in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, **47**, 1-9 (2010)
- 2) Y. Noguchi, M. Sano, K. Kanamaru, T. Ko, M. Takeuchi, M. Kato, T. Kobayashi: Genes regulated by AoXlnR, the xylanolytic and cellulolytic transcriptional regulator, in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**, 141-154 (2009)
- 3) K. Sakamoto, K. Iwashita, O. Yamada, K. Kobayashi, A. Mizuno, O. Akita, S. Mikami, K. Gomi: *Aspergillus oryzae atfA* controls conidial germination and stress tolerance. *Fungal Genet. Biol.*, **46**, 887-897 (2009)
- 4) D. Hagiwara, Y. Asano, J. Marui, A. Yoshimi, T. Mizuno, K. Abe: Transcriptome analyses revealing AtfA transcription factor functioning downstream of the HogA MAPK cascade in response to fludioxonil and osmotic stress in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.*, **46**, 868-878 (2009)
- 5) J. Yoon, S. Kimura, J. Maruyama, K. Kitamoto: Construction of quintuple protease gene disruptant for heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 691-701 (2009)
- 6) T. Nemoto, T. Watanabe, Y. Mizogami, J. Maruyama, K. Kitamoto: Isolation of *Aspergillus oryzae* mutants for heterologous protein production from a double proteinase gene disruptant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 1105-1114 (2009)
- 7) M. Tokuoka, M. Tanaka, K. Ono, S. Takagi, T. Shintani, K. Gomi: Codon optimization increases steady-state mRNA levels in *Aspergillus oryzae* heterologous gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 6538-6546 (2008)
- 8) M. Machida, O. Yamada, K. Gomi: Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. *DNA Res.*, **15**, 173-183 (2008)
- 9) A. Suzuki, N. Azuma, K. Kanamaru, M. Kato, T. Kobayashi: GFP-tagged expression analysis revealed that some histidine kinases of *Aspergillus nidulans* show temporally and spatially different expression during the life cycle. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 428-434 (2008)
- 10) S. Kimura, J. Maruyama, M. Takeuchi, K.

Kitamoto: Monitoring global gene expression of proteases and improvement of human lysozyme production in the *nptB* gene disruptant of *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 499-505 (2008)

11) O. Mizutani, Y. Kudo, A. Saito, T. Matsuura, H. Inoue, K. Abe, K. Gomi: A defect of LigD (human Lig4 homolog) for nonhomologous end joining significantly improves efficiency of gene targeting in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, **45**, 878-889 (2008)

12) K. Sakamoto, T. Arima, K. Iwashita, O. Yamada, K. Gomi, O. Akita: *Aspergillus oryzae atfB* encodes a transcription factor required for stress tolerance in conidia. *Fungal Genet. Biol.*, **45**, 922-932 (2008)

13) J. Shoji, M. Arioka, K. Kitamoto: Dissecting cellular components of the secretory pathway in filamentous fungi: insights into their application for protein production. *Biotechnol. Lett.*, **30**, 7-14 (2008)

14) T. Kobayashi, K. Abe, K. Asai, K. Gomi, P. R. Juvvadi, M. Kato, K. Kitamoto, M. Takeuchi, M. Machida: Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 646-670 (2007)

15) T. Fujioka, O. Mizutani, K. Furukawa, T. Nakajima, K. Abe: MpkA-dependent and -independent cell wall integrity signaling in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell*, **6**, 1497-1510 (2007)

16) N. Azuma, K. Kanamaru, A. Matsushika, T. Yamashino, T. Mizuno, M. Kato, T. Kobayashi: *In vitro* analysis of His-Asp phosphorelays in *Aspergillus nidulans*: The first direct biochemical evidence for the existence of His-Asp phosphotransfer systems in filamentous fungi. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2493-2502 (2007)

17) M. Kuratsu, A. Taura, J. Shoji, S. Kikuchi, M. Arioka, K. Kitamoto: Systematic analysis of SNARE localization in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, **44**, 1310-1323 (2007)

18) F.J. Jin, T. Watanabe, P. R. Juvvadi, J. Maruyama, M. Arioka, K. Kitamoto: Double disruption of the proteinase genes, *tpaA* and *pepE*, increases the production level of human lysozyme by *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76**, 1059-1068 (2007)

19) T. Nakamura, Y. Maeda, N. Tanoue, T. Makita, M. Kato, T. Kobayashi: Expression profile of amylolytic genes in *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2363-2370 (2006)

20) K. Furukawa, Y. Hoshi, T. Maeda, T. Nakajima, K. Abe: *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Mol. Microbiol.*, **56**, 1246-1261 (2005)

21) M. Machida *et al* (64名, K. Gomi (12th), K. Abe (11th), K. Kobayashi (15th), K. Kitamoto (14th)): Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, **438**, 1157-1161

(2005)

他10件

〔学会発表〕 (計 78 件)

1) M. Tanaka, T. Shintani, K. Gomi: Essentiality of RNA exosome subunit encoding genes in *Aspergillus oryzae*. ECFG10 (10th European Conference on Fungal Genetics), 2010年3月31日, NH Conference Center, Leeuwenhorst, The Netherlands.

2) 長谷川祥子、江幡禎子、新谷尚弘、五味勝也: 麹菌マルトースパーミアーズMalPのMAL cluster遺伝子発現に対する機能解析、日本農芸化学会大会、2010年3月30日、東京他76件

〔図書〕 (計 1 件)

1) M. Machida and K. Gomi (eds), *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*, Caister Academic Press, 2010, 1-238 pp

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

1)

名称: 新規グルカンおよびその製法

発明者: 阿部敬悦, 水谷治, 五味勝也, 長谷川史彦

権利者: 東北大学

種類: 公開特許

番号: 特開 2008-75075

出願年月日: 2007年8月17日

国内外の別: 国内

2)

名称: かびの胞子着生効率に影響するキナーゼ遺伝子の利用法

発明者: 小林哲夫、加藤雅士、金丸京子

権利者: 名古屋大学

種類: 公開特許

番号: 特開 2009-207373

出願年月日: 2008年2月29日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五味 勝也 (GOMI KATSUYA)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 60302197

(2) 研究分担者

阿部 敬悦 (ABE KEIETSU)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 50312624

小林 哲夫 (KOBAYASHI TETSUO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号: 20170334

北本 勝ひこ (KITAMOTO KATSUHIKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号: 20272437

(3) 連携研究者

新谷 尚弘 (SHINTANI TAKAHIRO)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 70374973