

糸状菌遺伝子研究会 25周年記念講演会

第36回糸状菌遺伝子研究会例会

プログラム・講演要旨集

日時 平成27年6月19日(金)
場所 北とぴあ つつじホール
東京都北区王子1丁目11番地1号

糸状菌遺伝子研究会ホームページ <http://fungi.mysterious.jp/MAIN-J/Welcome.html>
e-mailアドレス info@fungi.mysterious.jp

糸状菌遺伝子研究会25周年記念講演会の開催について



糸状菌遺伝子研究会会長

塚越規弘

糸状菌遺伝子研究会は「糸状菌遺伝子に関する研究を志すものの情報交換及び研究の発展」を目的に掲げ、1990年6月20日田村學造先生を初代会長として醸造試験所で設立された。2002年田村先生のご逝去に伴い、2003年に一島英治先生が会長に就かれ、2008年から塚越が会長を務めている。本年は設立25周年を迎えることとなり、昨年からの記念行事について種々検討してきましたが、例会を記念講演会「我が国における糸状菌遺伝子研究の軌跡」と同日に開催することにいたしました。

これまで糸状菌遺伝子研究会の発展と推進のためにご尽力いただきました顧問および名誉会員、運営委員の先生方ならびに賛助会員の皆さま方に心より感謝申し上げます。また、本日は貴重な時間をさかれてご講演を頂きす先生方に厚くお礼申し上げます。

我が国は「麴の国」といわれ、カビの応用研究では様々な面で世界をリードしてきているが、麴菌のようなカビには古典遺伝学を適用しにくく、研究が一時期停滞気味になりました。まさに、この時期に田村先生を会長に糸状菌遺伝子研究会が設立され、糸状菌遺伝子研究に遺伝子操作技術を積極的に導入し、我が国における糸状菌の分子生物学的な遺伝子研究の発展に大きく貢献して今日に至っている。

糸状菌遺伝子研究会はこれまでに35回の例会を開催し、講演会は糸状菌に関する数多くの先導的な研究を網羅し、我が国の糸状菌研究の進むべき方向性を示唆してきた。また、2011年には糸状菌研究のインセンティブとして奨励賞、技術賞を設定し、若手研究者の育成と研究の推進に努めてきている。

アメリカでは Fungal Genetics Conference が、ヨーロッパでは European Conference on

Fungal Genetics が隔年開催されており、我が国でも糸状菌に特化した国際シンポジウムの開催機運が高まり、北本勝ひこ先生を委員長に、田村學造糸状菌遺伝子研究会会長と秋山裕一醸造協会会長を顧問にお願いし、欧米から Archer, Bennett, Felenbok, Hondel らを招待して 2000 年に「International Symposium on Molecular Biology of Filamentous Fungi, Aspergilli」を開催した。この国際会議に臨み、田村先生から「It is not exaggerating to position Japan as the key player on the aspects of basic and applied research of koji molds including *A. oryzae*」と力強いお言葉を頂き、大きな励みとなった。また、この国際会議を契機に糸状菌分子生物学研究会が 2001 年に発足し、毎年日本各地で糸状菌分子生物学コンファレンスを開催している。さらに特記すべきことは多くの本研究会関係者が協力し、2005 年に麴菌のゲノム配列を Nature に発表できたことである。

最後に、この 25 周年を一つの節目として、これから先 25 年後の 50 周年に向かって、糸状菌遺伝子研究会の発展に会員の皆さま方、特に若手の研究者の皆さま方、また、賛助会員の皆さま方にご協力・ご支援を賜りますことをお願い申し上げます。

プログラム

日時 平成27年6月19日(金) 10時00分～17時10分

会場 北とぴあ つつじホール
東京都北区王子1丁目11番地1号 Tel 03-5390-1100

スケジュール

第36回 糸状菌遺伝子研究会 例会/ 第26回 糸状菌遺伝子研究会 総会

10:00 受付開始/開場

10:30 第26回糸状菌遺伝子研究会 総会

10:40 第36回糸状菌遺伝子研究会 例会 開会

糸状菌遺伝子研究会賞授賞式 (奨励賞、技術賞授与)

10:50～11:15 奨励賞受賞講演

「糸状菌オミクス解析の知見を活用した糸状菌の新規生物機能の発見」

志水 元亨 氏 (名城大学農学部)

11:15～11:40 技術賞受賞講演

「ゲノム情報を利用した醤油麴の機能解析と応用」

代表 北本 則行 氏(あいち産業科学技術総合センター)

11:40 第36回糸状菌遺伝子研究会 例会 閉会

- 昼 食 -

糸状菌遺伝子研究会25周年記念講演会

—我が国における糸状菌遺伝子研究の軌跡—

- 12:30 受付開始/ 開場
- 13:00 開会の御挨拶 塚越 規弘 会長
- 13:05 来賓の御挨拶 独立行政法人酒類総合研究所 理事長 家村 芳次
- 13:15 功労者表彰
- 受賞者** 秋山 裕一 先生、飯村 穰 先生、一島 英治 先生、兒玉 徹 先生
高木 正道 先生、別府 輝彦 先生、村上 英也 先生(五十音順)
- 13:25 **基調講演（敬称略）**
「糸状菌遺伝子研究会の足跡」
東京大学大学院農学生命科学研究科 名誉教授 北本 勝ひこ
- 13:55 **記念講演（敬称略）**
13:55 「糸状菌のゲノム研究とその産業利用」
国立研究開発法人産業総合研究所 北海道センター
研究グループリーダー 町田 雅之
- 14:20 「麹菌のアミラーゼ遺伝子転写制御の分子メカニズム」
東北大学大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻 教授 五味 勝也
- 14:45 「黒麹菌の学名が *Aspergillus luchuensis* になりました」
独立行政法人酒類総合研究所 醸造技術応用研究部門 部門長 山田 修
- 15:10 休憩

- 15:25 「糸状菌 *Trichoderma reesei* とセルラーゼ生産」
長岡技術科学大学 名誉教授 森川 康
- 15:50 「麴菌の高発現プロモーターの探索とその応用 25 年間を振り返って」
月桂冠株式会社 総合研究所 総合研究所長 秦 洋二
- 16:15 「糸状菌が生産する毒と薬の生合成研究」
理化学研究所 環境資源科学研究センター
ケミカルバイオロジー研究グループ
グループディレクター 長田 裕之
- 16:40 特別講演（敬称略）
「我が国における糸状菌遺伝子研究の回顧と展望」
東京大学大学院農学生命科学研究科 名誉教授 別府 輝彦
- 17:10 閉会の辞 糸状菌遺伝子研究会 運営委員長 竹内 道雄

糸状菌遺伝子研究会 25 周年記念祝賀会

- 17:30～19:00 会場:北とぴあ 天覧の間(16 階)
会費:10,000 円(一般) 3,000 円(学生)

**第36回 糸状菌遺伝子研究会例会
要 旨 集**

糸状菌オミクス解析の知見を活用した糸状菌の新規生物機能の発見

名城大学 農学部 応用生物化学科 応用微生物学研究室

志水 元亨

我が国の糸状菌を用いた産業技術は、古くからの発酵・醸造技術に加え、有用物質・酵素生産など多岐に渡る。しかし、糸状菌を用いた発酵・醸造および有用物質・酵素生産を行う際、糸状菌を高密度で培養するために糸状菌が酸素不足に陥り、発酵・醸造および有用物質・酵素生産の効率に問題を与える可能性が考えられる。そこで、オミクス解析を利用して、糸状菌 *Aspergillus nidulans* において培養の通気条件に応答して発現するタンパク質および遺伝子を多数見いだした。これらは、GABA shunt、ペントースリン酸経路、チアミン、ヌクレオチド、グルタミン酸、分岐鎖アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）および硫黄代謝などに関与するタンパク質であった。その中で、分岐鎖アミノ酸およびグルタミン酸の生合成が低酸素条件下にて活性化したことに着目し、培地中の代謝物を分析した。その結果、好気条件下ではそれらは検出されなかったのに対して、低酸素条件下において、エタノール、乳酸および分岐鎖アミノ酸、グルタミン酸を含む種々のアミノ酸が培地中に蓄積していた。さらに、生化学および分子生物学的に検討した結果、分岐鎖アミノ酸の生合成はグルタミン酸をアミノ供与体として用いるため、分岐鎖アミノ酸の生合成とグルタミン酸の供給が協調して機能し、2つの反応（経路）を効率よく行なうことで、低酸素条件下にて蓄積したNAD(P)HをNAD(P)⁺へと再酸化（分岐鎖アミノ酸発酵）することで細胞内レドックス恒常性を制御していることを明らかにした（図1）。これらは、糸状菌の低酸素条件への適応戦略として生理学的に重要な発見となった。

糸状菌において、多様な生物機能に関連する発酵ならびに代謝を行う上で、レドックス

制御は極めて重要である。オミクス解析から、低酸素条件下および好気条件下の定常期に発現が誘導された Nudix hydrolase (NdxA) を見出した。生化学および分子生物学的に検討した結果、真核生物に広く保存されており NAD(H) を加水分解する Nudix hydrolase である NdxA が、定常期における NAD^+/NADH のバランスを調節することによって、 NAD^+ を用いてヒストンのアセチル化状態をコントロールするヒストン脱アセチル化酵素 (SirA) の働きを制御することを明らかにした(図 2)。この機構は、糸状菌のみならず真核生物の生理としても重要な意義を持つと考えられた。さらに、低酸素状態(細胞内の NAD^+/NADH の比率が低下する環境)において、蓄積した NADH を NdxA が加水分解することで解糖系の代謝効率を調節していることも明らかにした。

現在、日本酒の香気成分の 1 つであるロイシン酸エチルの前駆物質であるロイシン酸の生合成機構および一部の糸状菌のみが持つ新規 β -1,4-マンナーゼについて研究を推進している。

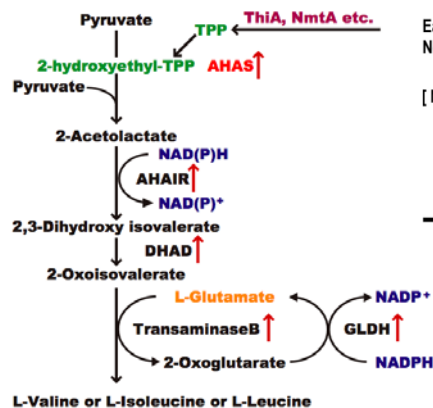


図1 分岐鎖アミノ酸の生合成経路

↑ は、低酸素で発現量・活性が増大した酵素

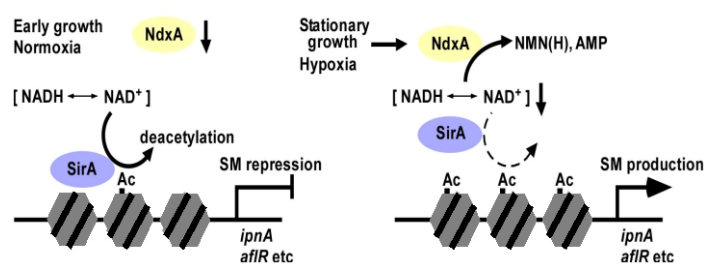


図2 新規エピジェネティック制御因子NdxAによる二次代謝物生合成の制御

ゲノム情報を利用した醤油麴の機能解析と応用

あいち産業科学技術総合センター、* (株)ビオック

北本 則行(代表)、安田(吉野) 庄子、和久 豊*

わが国の伝統的な発酵調味料である醤油及び味噌の醸造では、麴菌、耐塩性酵母及び耐塩性乳酸菌が使用されている。麴菌は「酵素の宝庫」と言われているように非常に多くの酵素を生産し、原料(大豆、小麦など)の分解、醤油諸味・味噌の熟成及びそれらの香味形成において重要な役割を果たしている。醸造工程の改良や品質向上を目指して、醤油及び味噌の醸造において麴菌酵素が担っている役割を明らかにするために、特定の麴菌酵素遺伝子の特異的に高生産する麴菌、あるいは、ほとんど生産しない麴菌を作出し、醤油及び味噌の醸造における麴菌酵素の果たす役割について解析を行った。

1. *AoxInR*遺伝子破壊麴菌及び*amyR*遺伝子破壊麴菌による醤油の着色抑制^{1, 2, 3)}

醤油の色度及び色調は味や香りとともにその品質を決定する重要な因子であり、白醤油や淡口醤油の製造では特に重要視されている。醤油の着色・褐変化の主要因は醤油諸味中の糖類とアミノ酸類との間のアミノカルボニル反応によって生成されるメラノイジン色素であり、糖類の中でもキシロースが最も褐変化しやすい。醤油諸味中のキシロース濃度の低下を目的として、*AoxInR*(キシラン分解酵素遺伝子群の誘導発現因子)遺伝子破壊麴菌及び*amyR*(デンプン分解酵素遺伝子群の誘導発現因子)遺伝子破壊麴菌を取得し、醤油の小仕込み試験により評価を行った。*AoxInR*遺伝子破壊麴菌を使用すれば色の淡い醤油の醸造が可能となり、*amyR*遺伝子破壊麴菌を使用すれば甘味及び旨味が増強され、火入れ滓が少ない色の淡い醤油の醸造が可能となることが明らかとなった。また、濾布を用いた自然垂れ試験を行った結果、*amyR*遺伝子破壊麴菌は品質向上ばかりでなく压榨工程の改善にも有用であることも示された。

2. セルラーゼ遺伝子高発現麹菌による醤油粕の低減化^{4, 5)}

醤油製造に伴って排出される醤油粕は年間約10万トンにも達し、その大部分は産業廃棄物として焼却処理されている。醤油粕の処理コストが年々増加するばかりでなく、環境への負荷も問題となっているため、醤油粕を低減化させることが望まれている。大豆や小麦の細胞壁に由来するセルロースは醤油粕の主要成分となっており、セルロース分解率を向上させることを目的として、強力な *TEF* 遺伝子プロモーター等を活用してセルラーゼ遺伝子を高発現する麹菌を作出し、醤油の小仕込み試験により評価を行った。セルラーゼ活性を高めることにより粕量の減少が認められ、エキソ型セルラーゼ高生産麹菌及びエンド型セルラーゼ高生産麹菌を組み合わせることにより、粕量がさらに減少することが示された。また、*amyR* 遺伝子破壊麹菌と同様に、セルラーゼ遺伝子高発現麹菌においても諸味の濾過速度が上昇し、圧搾性の向上が認められた。これらの結果から、セルラーゼ高生産麹菌の使用は、醤油粕の低減に加えて、圧搾作業時間の短縮、諸味充填量の増加、液汁歩合の向上など圧搾工程の改善にも有用である可能性が示唆された。

3. ホスファターゼ遺伝子破壊麹菌による核酸系旨味成分の分解抑制^{6, 7, 8)}

消費者の嗜好変化や利便性追求に合わせて、核酸系調味料を添加した調味味噌(だし入り味噌加工品)の市場が拡大している。調味味噌には主として核酸系調味料が添加されているが、核酸系調味料の旨味成分の分解防止のため、調味味噌の製造においては、80℃、15分間以上の高温加熱処理による原料味噌中の麹菌ホスファターゼの失活が不可欠である。しかし、加熱臭による風味低下及び歩留まりの低下が問題となっている。核酸系調味料の分解に関与するホスファターゼの特定を目的として、麹菌ゲノム情報を利用して8個の酸性ホスファターゼ遺伝子を推定し、高頻度相同組換え系を用いて各遺伝子がそれぞれ破壊された味噌用麹菌を取得した。豆麹培養中の酸性ホスファターゼ生産への影

響を調べた結果、AphCが主たるホスファターゼ活性及びイノシン酸分解活性を担う酵素であることを明らかにした。またAphCを高発現・精製し、旨味成分のイノシン酸及びグアニル酸の分解活性を有することを解明した。

4. まとめ

本研究によって麹菌酵素の醤油及び味噌醸造における役割の一部を解明することができた。今後、麹菌ゲノム情報を活用し、醤油及び味噌の醸造工程の改良や品質向上を目指して、麹菌酵素の役割を解明していきたい。

参考文献

- 1) 北本則行ら 醤研 32:23-26 (2006)
- 2) 北本則行ら 醤研 32:83-87 (2006)
- 3) 北本則行ら 醤研 32:151-154 (2006)
- 4) 北本則行ら 醤研 25:55-60 (1999)
- 5) 北本則行ら 醤研 33:35-39 (2007)
- 6) Yoshino-Yasuda S. *et al.* Food Sci. Technol. Res., **17**, 161-166 (2011)
- 7) Yoshino-Yasuda S. *et al.* Food Sci. Technol. Res., **18**, 59-65 (2012)
- 8) Yoshino-Yasuda S. *et al.* Food Sci. Technol. Res., **20**, 367-374 (2014)

**糸状菌遺伝子研究会 25周年記念講演会
要 旨 集**

糸状菌遺伝子研究会の足跡

東京大学大学院農学生命科学研究科

北本 勝ひこ

糸状菌遺伝子研究会の第1回研究会は、平成2(1990)年6月20日、東京都北区滝野川の国税庁醸造試験所四階会議室で開催された。その時の演題は、別府輝彦先生(東京大学教授)による「糸状菌分子育種の将来の展望」、五味勝也先生(醸造試験所)による「黄麹菌(*Aspergillus oryzae*)の分子育種の現状」、堀内裕之先生(東京大学農学部)による「くものすかび(*Rhizopus*)の分子育種の現状」であった。まさに、糸状菌遺伝子研究会の発足にふさわしい先生方であった。

糸状菌遺伝子研究会の産みの親であり、育ての親は、東京大学名誉教授の田村學造先生である。当時、田村先生は、1988年に発足した醸造資源研究所の所長をされていた。演者は、同年、仙台国税局鑑定官室から醸造試験所第4研究室に主任研究員として着任し、麹菌の分子生物学研究を開始した。醸造資源研究所の活動は基本的に醸造試験所との共同研究という形で行われたので、醸造試験所は全国から若い研究者、技術者の出会いの場となり、この時期になされた麹菌の分子生物学的研究の爆発的な発展は、「発酵、醸造サイエンスのルネッサンス」とも呼べるものであった。このような熱気のなか、田村先生の発案で糸状菌遺伝子研究会が発足した。醸造試験所は、古くから清酒酵母研究会、麹研究会、酒米研究会など、全国的な研究会を組織し主宰するという伝統があったのも順調な発展に大きく貢献したことは間違いない。本研究会により、麹菌ESTプロジェクトがなされ、それをもとにしたコンソーシアムにより麹菌ゲノムプロジェクトが完了した。2000年には「麹菌国際シンポジウム」が東京大学で開催され、翌2001年からは糸状菌分子生物学コンファレンスが開催されるようになった。本コンファレンスは、毎年、開催され、活発に

研究発表がなされ情報交換の場となっている。これらは、まさに、本研究会の活動があつて初めて達成されたことであり、我が国の糸状菌研究の発展への貢献は計り知れないものがある。

ご略歴

1972年4月 東京大学農学部農芸化学化卒業

1972年5月 国税庁醸造試験所 研究員

1973年5月 福岡国税局鑑定官室 大蔵技官、鑑定官

1978年7月 国税庁醸造研究所 研究員

1982年4月～1983年3月 東京大学理学部植物学教室 客員研究員

1986年7月 仙台国税局鑑定官室 鑑定官

1988年7月 国税庁醸造試験所 主任研究員

1995年4月 東京大学農学部 助教授

1996年7月 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授

糸状菌のゲノム研究とその産業利用

～ 二次代謝系の高速解析を中心として ～

国立研究開発法人産業技術総合研究所 北海道センター

町田 雅之

急速なシーケンス技術の進歩によって、1990年代後半には糸状菌のゲノム解析が開始され、2000年代後半には次世代型シーケンサーによって、ゲノム解析スピードは圧倒的に加速された。*Aspergillus* 属には、経済的に大きな影響を持つ種が多く、ゲノム解析の開始当初は、学術研究に重要な *Aspergillus nidulans* とともに、医学的に重要な *Aspergillus fumigatus* が注目された。その後2、3年以内には、麴菌や *Aspergillus niger* のゲノム解析が開始され、比較ゲノム解析が精力的に行われてきた。

この過程において、麴菌のゲノム上には、シンテニー領域(SB)と非シンテニー領域(NSB)が存在し、NSBには二次代謝遺伝子や菌体外加水分解酵素など、生育には必ずしも必須でない遺伝子が集中していることが見いだされた¹。ゲノム解析によって、未知の多数の二次代謝系遺伝子が見つかったことで、糸状菌の二次代謝研究が大きく進んできたことは周知の事実である。

私たちのグループでは、新規な二次代謝系遺伝子をいかに効率的に発見し利用するかという命題に着目し、そのための技術開発を行ってきた。これまでの生合成機構とは異なる新規な二次代謝遺伝子クラスタを探索するために、MIDDAS-M²と、MIPS-GC³を開発した。これらの方法は、PKS や NRPS などの二次代謝に特有の遺伝子(Core Gene)に対する相同性検索を行うことなく、発現情報やゲノム塩基配列からクラスタを予測することが可能である。Ustiloxin B の生合成遺伝子は、MIDDAS-M 法を用いることによって、世界で初めて *Aspergillus flavus* のゲノムからの探索に成功した。Ustiloxin B は環状ペプチドであり、その

構造から NRPS によって生合成されると推定された。しかし、同定されたクラスタには NRPS は存在せず、環状ペプチドを構成するアミノ酸配列をコードする 16 回の繰り返し配列が見いだされた⁴。リボソームによって合成される低分子ペプチド化合物の生合成遺伝子の例はバクテリアでは知られていたが、糸状菌からは全く新規な発見であった。

MIPS-CG による二次代謝生合成遺伝子系の同定はまだであるが、既知の配列やモチーフを用いることなく、既知の二次代謝遺伝子クラスタを予測できることを確認している。今後、これらの方法を組み合わせることや新たな方法の開発によって、糸状菌が有する多数の二次代謝系の意味や生成メカニズムを理解したいと考えている。

参考文献

1. Machida, M. et al. Nature 438, 1157–1161 (2005).
2. Umemura, M. et al. PLoS One 8, e84028 (2013).
3. Takeda, I., et al. DNA Res 21, 447–457 (2014).
4. Umemura, M. et al. Fungal Genet Biol 68, 23–30 (2014).

ご略歴

昭和 56 年 3 月 東京大学農学部農芸化学科卒業

昭和 58 年 3 月 東京大学大学院農学系研究科農芸化学専攻修士課程終了、修士号取得

昭和 61 年 3 月 東京大学大学院農学系研究科農芸化学専攻博士課程終了、博士号取得
耐熱菌解糖系アロステリック酵素の活性発現制御機構

昭和 61 年 4 月 工業技術院化学技術研究所 研究員

平成 5 年～6 年 製品評価技術センター(現独立行政法人製品評価技術基盤機構)併任

平成 5 年 工業技術院生命工学工業技術研究所(機構改革で所名変更)

平成 13 年 独立行政法人産業技術総合研究所 分子細胞工学研究部門

主任研究員(独立行政法人化で所名変更)

平成 14 年 独立行政法人産業技術総合研究所
糖鎖工学研究センターチームリーダー

平成 16 年 独立行政法人産業技術総合研究所
生物機能工学研究部門グループリーダー

平成 18 年 独立行政法人産業技術総合研究所
セルエンジニアリング研究部門グループリーダー

平成 20 年 独立行政法人産業技術総合研究所
イノベーション推進室総括企画主幹

平成 22 年 独立行政法人産業技術総合研究所
生物プロセス研究部門主幹研究員
生物システム工学研究グループリーダー兼任

平成 24 年 独立行政法人産業技術総合研究所
生物プロセス研究部門総括研究主幹
応用分子微生物学研究グループ
生物システム工学特別研究チームリーダー兼任

平成 11 年～ 金沢工業大学客員教授

平成 21 年～ 東京農工大学客員教授

麴菌のアミラーゼ遺伝子転写制御の分子メカニズム

東北大学大学院農学研究科

五味 勝也

麴菌 (*Aspergillus oryzae*) は古くから清酒や醤油、味噌などの伝統的な発酵・醸造食品製造に利用されてきた微生物であり、わが国を代表する重要な産業微生物であるが、その最も大きな役割は原料に含まれるデンプンやタンパク質などを分解する酵素群の供給源として働くことである。特に、清酒製造では麴菌が生産するデンプンをグルコースにまで分解するアミラーゼ系酵素 (α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ) が必須である。アミラーゼは清酒や味噌用に使用される米麴製造中に麴菌が大量に分泌生産するが、その生産はデンプンやマルトースなどのマルトオリゴ糖で誘導され、グルコースの存在下では抑制されることが古くから知られていた。しかし、アミラーゼの誘導生産の分子機構については、麴菌が有性世代を持たず分生子も多核なため、古典遺伝学の適用が難しいこともあり、麴菌の遺伝子組換え系が開発され、 α -アミラーゼ遺伝子のクローニングがなされるまで解析することは困難であった。

私たちは遺伝子組換え系を開発した当初からアミラーゼ酵素生産の分子レベルにおける制御メカニズムの解明を目的として研究を進めてきた。その結果、アミラーゼ遺伝子のプロモーター解析から発現制御に必要なシスエレメントを明らかにするとともに、そのシスエレメントに結合し、デンプン存在下における誘導高発現に必要な転写因子 AmyR を見出すことができた。アミラーゼ生産に必須な転写因子 AmyR を同定することができた一方で、*amyR* 遺伝子の破壊株はデンプン培地での生育がきわめて悪いものの、マルトース培地では野生株と同様の生育を示すことから、デンプン分解産物のマルトースを資化するためのシステムが別に存在していると考えられた。この予想のもとに、Expressed sequence

tag (EST) 解析及びゲノム解析データを検索した結果、麴菌染色体中に酵母のマルトース資化に関与する *MAL* クラスターに類似した遺伝子クラスターを見出した。このクラスターに含まれる遺伝子 (*malR*, *malP*, *malT*) の機能解析から、*malP* はマルトース・トランスポーター、*malT* はマルターゼ、また *malR* はこれらの遺伝子の発現を正に制御する転写因子をコードしており、麴菌のマルトース資化に関与していることが明らかとなった。さらに興味深いことに、この遺伝子クラスターは単に麴菌のマルトース資化に関わっているだけでなく、デンプン分解酵素の誘導生産の初期ステップにも重要な役割をしていることが分かった。すなわち、細胞内へのマルトースの取り込みに関与する MalP 及びその発現を制御する転写因子 MalR の欠損株では、マルトース培地だけでなく、デンプン培地での生育が *amyR* 破壊株と同様に悪くなっており、マルトースを含む液体培地で α -アミラーゼの誘導生産を行わせたところ、誘導初期におけるアミラーゼ生産に大きな遅れが認められた。このアミラーゼ誘導生産の遅れは *malR* 破壊株よりも *malP* 破壊株の方が顕著であり、これは *malR* 破壊株では基底レベルの MalP の存在によってマルトースが細胞内にわずかに取り込まれるが、*malP* 破壊株では MalP が完全に失われているためマルトースの細胞内取り込みがほとんど起こらないことによると考えられる。この結果は MalP によるマルトースの細胞内への取り込みがアミラーゼの遺伝子の発現誘導に必須の過程であることを示唆している。

一方、*amyR* 及び *malR* 遺伝子は構成的に発現しており、いずれの転写因子も誘導基質の存在により転写活性化能を獲得すると考えられ、*Aspergillus nidulans* による解析から AmyR の活性化を誘導する直接の基質はマルトースではなく分泌型 α -グルコシダーゼの AgdB などにより糖転移反応で生成したイソマルトースであると言われている。最近、私たちは麴菌においても同様に AmyR 活性化の直接の基質はイソマルトースであろうという結果を得ているが、興味深いことに麴菌の *MAL* クラスター中の *malT* 遺伝子を破壊することにより麴菌はマルトースを資化できなくなると同時に、アミラーゼ生産もほとんど認められなくなることを明らかにした。このことは、麴菌では MalP によって取り込まれたマルトース

が MalT によってグルコースに分解され資化・利用されるだけでなく、MalT がマルトースからイソマルトースへの変換の役割を担っており、AmyR の活性化には細胞内 α -グルコシダーゼである MalT が必須であることを示している。*A. nidulans* の AmyR と麹菌の AmyR の機能自体には大きく異なることはないものの、AmyR の転写活性化に至る過程には両者で特徴的な違いが認められ、同じ *Aspergillus* に属している糸状菌であっても種によってデンプン分解・資化に関わる遺伝子発現の制御機構が異なることは分子進化的にも興味深い。

ご略歴

1978 年 東京大学大学院農学系研究科修士課程修了

1978 年 国税庁醸造試験所(現 独立行政法人 酒類総合研究所)研究員、生物産業特定技術研究推進機構融資課長、国税庁醸造研究所主任研究員を経て 1998 年より東北大学大学院農学研究科教授、現在に至る。

この間、1992 年に英国シェフィールド大学に科学技術庁中期在外研究員として派遣滞在。

1991 年東京大学より博士(農学)授与。

学会活動等: 糸状菌遺伝子研究会運営委員(継続中)、糸状菌分子生物学研究会会長(2007 年~2013 年)、バイオインダストリー協会「バイオサイエンスとインダストリー」編集委員長(2010 年~2014 年)、日本農芸化学会東北支部長・理事(2009 年~2011 年)、日本学術振興会学術システム研究センター専門研究員(2010 年~2013 年)、2015 年 6 月より日本生物工学会会長。

黒麹菌の学名が *Aspergillus luchuensis* になりました

独立行政法人 酒類総合研究所

山田 修

黒麹菌とは、沖縄(琉球諸島)において泡盛醸造に用いられている分生子が黒色を呈する *Aspergillus* 属糸状菌であり、製麹中に大量のクエン酸を生産することでろみを酸性にし暖地での醸造に適するとされている。また、平成 18 年 10 月 12 日、日本醸造学会において、黄麹菌などとともに我が国を代表する微生物として「国菌」に認定されている¹⁾。しかし、黒麹菌として報告された菌株は、*A. luchuensis* を始めとして 10 数株にのぼり、欧州でクエン酸生産に用いられている *A. niger* の異名同種とする報告もあるなど、その分類には当初より混乱が見られていた。

2011 年我々は、黒麹菌の分類学的位置を確認するため酒総研保存 37 株、(株)トロピカルテクノセンター(沖縄県うるま市)保存醸造現場由来黒麹菌 12 株(TTC 株)、白麹菌 *A. kawachii* NBRC 4308 株など合計 57 株についてベーターチューブリン遺伝子部分配列など約 2,500 塩基をシーケンス解析した。その結果、分類名とは関わりなく TTC 株 12 株及び白麹菌を含む黒麹菌株群、*A. niger* 群及び *A. tubingensis* 群の 3 群に大別されたことから、黒麹菌株群の学名として *A. luchuensis* を提唱した²⁾。その後、*A. luchuensis* には、1901 年に乾が黒麹菌として初めて報告した菌株、同年、宇佐見が泡盛麹中より単離した黒色糸状菌第一、1913 年中澤が *A. awamori* と命名した α 菌、「戦禍超えた黒こうじ菌」、現在泡盛の商業生産に最も広く用いられている ISH1 株及び ISH2 株などが含まれることが確認された。

2013 年 Dr. Hong らは、広範な黒色 *Aspergillus* 標準株の解析を行い、黒麹菌は日本を中心に東アジアの醸造に重要な糸状菌であり、*A. niger* などとは違う独立した種であることを確認し、プライオリティよりその学名を *A. luchuensis* としてメトレのある菌株として再記載し

た³⁾。なお、欧州で *A. awamori* の基準株とされていた NRRL 4948 株は、*A. niger* と極めて近縁な菌株であり、このため、*A. awamori* とされている株には *A. luchuensis* だけでなく *A. niger* も含まれてしまっていることから、分類学上の混乱を避けるためにもこの学名を廃止することが望ましいとした。

ということで、国際的に黒麹菌の学名が *A. luchuensis* となりました。

文献

1. <http://www.jozo.or.jp/koujikinnituite2.pdf>
2. Yamada, O. *et al.*: Molecular biological researches of Kuro-Koji molds, their classification and safety., *J Biosci. Bioeng.*, **112**, 233–237 (2011)
3. Hong, S. B. *et al.*: *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* in East Asia., *PLoS ONE*, **8**, e63769 (2013)

ご略歴

昭和 60 年 3 月 東京農工大学農学部農芸化学科卒業

昭和 61 年 4 月 国税庁入庁

その後、仙台国税局鑑定官室を皮切りに転々

平成 13 年 4 月より酒類総合研究所

記念講演

糸状菌 *Trichoderma reesei* とセルラーゼ生産

長岡技術科学大学 名誉教授

一般財団法人 バイオインダストリー協会 技術顧問

森川 康

Trichoderma reesei は、セルラーゼ生産菌として知られ、その生産するセルラーゼ(糖化酵素)がセルロース系バイオマスの糖化プロセスにおいて世界中で実用に供されつつある。ここでは、*T. reesei* の糸状菌としての研究の進展と、その糖化酵素生産に関する日本での研究開発状況を紹介する。

T. reesei は、通常の属種とは異なり、第2次世界大戦時激戦が行なわれた南太平洋ブーゲンビル島(墓島、ソロモン諸島、パプアニューギニア共和国)で米軍テントから単離された野生株 QM6a に由来する菌株のみを指す。この菌は不完全菌に属していたが、完全世代が見つかり、*Hypocrea jecorina* と命名されている。2度の石油危機以来、世界中でセルラーゼ高生産変異株が取得され、現在ではさらに変異株が作られるとともに、遺伝子組換え技術を用いた高機能・高生産変異株が構築されている。

野生株 QM6a の全ゲノム配列が2005年に公表されて以来、新規な遺伝子の発現を含めて、*T. reesei* の遺伝子発現制御機構、比較ゲノム、タンパク質の分泌、代謝など各分野にわたる研究が発展し、さらなる研究開発が期待されている。

セルロース系バイオマスの酵素糖化については、これまで世界で実用化されつつあるがまだまだ高効率糖化や高機能糖化酵素などの課題(酵素使用量や酵素コスト)が多い。先行する欧米酵素メーカーの方針もあり、日本独自の実用化が重要であり、我々は NEDO PJ での糖化酵素開発を7年間続けている。

セルロース系バイオマスの酵素糖化は、酵素反応としては珍しい固液反応であるとともに

に、バイオマスへの酵素の吸着が大きな問題となり、糖化における様々な課題を生んでいる。これらを解決することを目指して糖化反応の解析を行なった。また、1983年に造成された変異株PC-3-7を親株として高機能糖化酵素の構築に取り組み、弱点とされた β -グルコシダーゼ活性およびヘミセルロース分解能力の増強を遺伝子組換え技術で実施した。組換え株の生産する糖化酵素 JN24 は、アルカリ処理エリアンサスに対して、標準糖化反応(5%前処理バイオマス、72時間)の80%糖化に必要な酵素使用量が1.8 mg/g-バイオマス(2.8 mg/g-生成糖)の成績を示した。この能力は、親株の酵素と比較して約1/12の酵素使用量となり、欧米の最近の市販酵素の能力を凌駕した。現在、事業化を目指して、花王(株)が中心となり更なる高機能・高生産性株の構築を進めている。

ご略歴

1968年3月 京都大学大学院工学研究科工業化学専攻 修士課程 修了

1968年4月 協和発酵工業株式会社 入社

1968~1983年 東京研究所

1983年6月 工学博士(東京工業大学)

1983年~1991年 本社研究開発マネジメント部門

1991年4月 長岡技術科学大学生物系 教授

2007年9月-2009年3月 同 附属図書館長

2009年3月 同 定年退職

2009年4月 特任教授(1年間)・名誉教授

一般財団法人 バイオインダストリー協会 技術顧問

麴菌の高発現プロモーターの探索とその応用 25年間を振り返って

月桂冠株式会社 総合研究所

秦 洋二

麴菌は、清酒をはじめ醤油、味噌など我が国の伝統的発酵食品の製造に長年使用されてきた微生物であり、日本の National Microorganism(国菌)と認定されていることは、皆様もご存じのとおりである。また同時に麴菌(*Aspergillus oryzae*)は、異種タンパク質の組換え生産の宿主として、産業用酵素の工業生産から研究用タンパク質の生産など幅広い分野で利用されている。麴菌が持つ「高いタンパク質分泌能力」や「微生物としての安全性」などが評価され、その利用範囲が広がっていると考えられる。この麴菌の能力に注目し、異種タンパク質生産への利用の研究が始まったのが、1990年前後で、まさしく糸状菌遺伝子研究会が発足した時代である。当時はまだゲノム情報などは無い時代で、個別の遺伝子を一つずつクローニングし、その発現解析から、異種タンパク高発現システムの構築が進められてきた。ここでは、麴菌の高発現プロモーターの探索・構築の歴史をひも解きながら、この25年間の糸状菌遺伝子研究の発展について紹介していきたい。

(1) 有用遺伝子の単離と発現解析

1985年頃から飯村先生、五味先生らの努力によって構築された麴菌の遺伝子単離/導入技術により、麴菌の有用遺伝子の単離が可能となり、 α -アミラーゼやグルコアミラーゼなど麴菌で高生産されるタンパク質の遺伝子が相次いでクローニングされた。ただしグルコアミラーゼについては、最初は液体培養でしか発現しない遺伝子が単離され、後に米麴培養のような固体培養で発現する新たな遺伝子が見つかったわけだが、これについての

秘話は当日紹介する。このような麴菌で高発現する遺伝子が見つかったことにより、これらのプロモーターを利用した異種タンパク生産が可能となった。

(2) 高発現プロモーターの構築

麴菌からも様々な遺伝子が単離されるようになり、さらに強力に発現するプロモーターの探索やより強力に発現するように改変された組換えプロモーターの構築も進められた。前者例として、演者らは *sodM*、*melO*、*glaB* など培養条件を選択することによって、他の共雑タンパク質の生産を抑えて、目的のタンパク質のみを高生産するプロモーターを単離した。また後者例として、峰時氏らは、3 種類のアミラーゼ遺伝子のプロモーターの比較から、高発現因子を決定し、これらを増幅した改良プロモーターにより、異種タンパク発現量を飛躍的に増大するシステムを構築した。

(3) 麴菌によるタンパク質生産の応用

弊社では麴菌の高タンパク質生産システムを、バイオマスの有効利用への応用を検討している。バイオマス分解酵素(各種セルラーゼやキシラナーゼ)の遺伝子を麴菌に導入し、これら組換え体を固体バイオマス上に直接生育させることにより、バイオマスを固体のまま分解することができる。同時に酵母を添加しておくことにより、バイオマスから直接エタノール発酵を行うことも可能である。本方法は、バイオマスを加水・可溶化することなく固体状態で反応することができるため、反応装置が非常にコンパクトになることが期待されている。

異種タンパク質生産の向上においては、高発現プロモーターの構築以外にも、転写・翻訳効率の向上やプロテアーゼ欠損株の育種など様々な観点から研究が進められている。これらの研究がさらに発展し、産業面だけでなく研究面でも麴菌が「国菌」となることを望んでいる。

最後に醸造資源研究所在籍当時に、本研究のご指導をいただいた田村學造先生と北本勝ひこ先生に改めて感謝申し上げます。

以上

ご略歴

- 1983年 京都大学農学部農芸化学科卒業
- 1983年 大倉酒造(現:月桂冠)株式会社入社
- 1989年～1991年 醸造資源研究所出向(東京)
- 1993年 農学博士(京都大学)
- 1997年 総合研究所 主任研究員 兼 製品開発課長
- 2005年 総合研究所長
- 2006年 奈良女子大学客員教授 (兼務)
- 2009年 総合研究所長 兼 技術部長
- 2011年 取締役総合研究所長 兼 醸造部長
- 2015年 取締役製造副本部長 兼 総合研究所長

客員教授: 奈良女子大学 非常勤講師: 京都大学、大阪府立大学、関西大学

糸状菌が生産する毒と薬の生合成研究

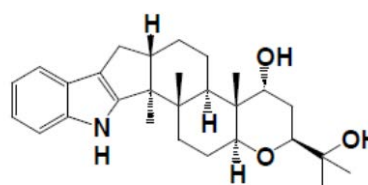
理化学研究所 環境資源科学研究センター

本山 高幸、加藤 直樹、○長田 裕之

糸状菌が生産する二次代謝産物には、ペニシリンやシクロスポリンのように医薬として利用されている化合物と、アフラトキシンやトリコテセンのようなカビ毒(マイコトキシン)として知られている化合物がある。糸状菌が、なぜ、様々な生物活性物質を生産するのか？また、継代培養中に生物活性物質の生産性が不安定で消失しやすいのはなぜか？など未解明な問題が多い。

我々は、糸状菌生合成遺伝子の研究を通じて、有用物質を選択的かつ安定的に生産することに挑んでいるので、その研究成果を紹介する。

増殖が速いがん細胞では、細胞周期の制御が異常になっているので、分裂期キネシン(Eg5/kinesin-5)は抗がん剤標的として注目されている。埼玉県秩父市の土壌から単離した糸状菌(*Chaunopycnis alba* RK99-F33)から、Eg5 阻害剤としてテルペンドール E を見出したが¹⁾、生産性が不安定であり、かつ化学的全合成も容易ではないため、生物活性評価を行うのに必要な量を確保することが困難であった。そこで、生合成遺伝子クラスターをクローニングして、その遺伝子操作により安定生産を可能にした²⁾。



terpendole E

テルペンドール E 生産菌は、カビ毒であるテルペンドール C を安定的に生産したが、テルペンドール E は一過的にしか生産しなかった。テルペンドール E 生合成遺伝子クラスター中には、P450(TerP、TerQ、TerK)、FAD 依存性モノオキシゲナーゼ(TerM)、テルペン環化酵素(TerB)、プレニル転移酵素(TerC、TerF)をコードすると推定される遺伝子が存在し

た。TerP は C11 水酸基を持つテルペンドール E をテルペンドール類生合成に特異的な C11-C12 エポキシ構造を持つ中間体に変換するとともに、パスパリンを側路化合物に変換する酵素であることが明らかになった。*terP* 遺伝子破壊により、二つの反応をブロックし、テルペンドール E を安定的に大量生産することに成功した。

terP 遺伝子破壊株等から新規化合物 16 種を含む 29 種の類縁化合物を取得し、動物細胞に対する生物活性を測定したところ、3 化合物がテルペンドール E よりも強力な細胞周期阻害活性を示した³⁾。構造活性相関の結果から、TerP が除去する C12 メチル基がキネシン Eg5 阻害活性に重要であることが示唆された。

参考文献

- 1) Nakazawa J. *et al.*, *Chem. Biol.*, **10**: 131-7, 2003
- 2) Motoyama T. *et al.*, *Chem. Biol.*, **19**: 1611-9, 2012
- 3) Tarui Y. *et al.*, *Chembiochem*, **15**: 934-8, 2014

本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業による支援を受けた。

ご略歴

学歴 昭和 53 年 3 月 東京大学 農学部 農芸化学科 卒業
昭和 58 年 3 月 東京大学大学院 農学系研究科 博士課程 修了(農学博士)

職歴 昭和 58 年 4 月 理化学研究所入所 抗生物質研究室
平成 4 年 4 月～ 理化学研究所 主任研究員(抗生物質研究室)
平成 20 年 4 月～ 理化学研究所 基幹研究所
ケミカルバイオロジー研究領域長
平成 25 年 4 月～ 理研 環境資源科学研究センター 副センター長

学会等 日本放線菌学会 会長

日本がん分子標的治療学会 理事

日本感染症医薬品協会 理事

日本生化学会 理事

日本農芸化学会 参与

日本癌学会 評議員

記念講演

我が国における糸状菌遺伝子研究の回顧と展望

東京大学大学院農学生命科学研究科

名誉教授 別府 輝彦

講演に先立ち、糸状菌遺伝子研究会を創立された故・田村学造先生に、心からの尊敬と感謝を捧げさせて頂きたい。わが国の伝統的なコウジカビ研究の上に立って火落酸を発見され、さらにイソプレノイドの関与する複合糖質の生合成などに大きな業績を上げられた先生は、東大退官後の 1988 年以降、醸造資源研究所所長として強い情熱をもって若手研究者の育成に努められると同時に、1990 年に本会を創立されて、わが国のコウジカビを中心にする糸状菌分子生物学の発展に渾身の力を注がれた。本日のこの記念講演会自体も、先生の尊いご努力の賜物と考えるものである。

かつて糸状菌の遺伝子研究は、ペニシリン生産菌など一部の産業的に重要だが有性世代を持たない糸状菌の人工変異による育種以外は、*Neurospora crassa*、*Aspergillus nidulans* に代表されるモデル微生物の遺伝学的解析にほとんど限られていた。しかし 1973 年の遺伝子組換え技術の登場は、糸状菌においてもその遺伝子のクローン化と構造解析を可能にし、さらに 1980 年代後半には、産業的に重要な異種タンパク質の分泌生産を目的とする、コウジカビを始めとするいくつかの糸状菌の宿主としての利用が可能になった。そして 2003 年の *N. crassa*、2005 年の *A. nidulans*、*A. fumigatus*、*A. oryzae* の全ゲノム解析を皮切りとするゲノム情報の積み重ねは、基礎・応用にまたがる糸状菌の遺伝子研究に質量ともに大きな変革をもたらし、さらには進化、生態などの巾広い生物学的課題への挑戦を可能にしつつある。

このような流れの中で、本講演では演者が関わった限られた個人的な体験にもとづいて、以下のような局所的課題についての回顧と多少の見解を申し述べたいと思う。

1. 第二次大戦後のわが国の産業的糸状菌の遺伝子研究の始まり
2. 糸状菌の三つの機能についての個人的な考察
 - i) タンパク質分泌生産における糖鎖付加について
 - ii) 一次代謝としての有機酸発酵の若干の問題について
 - iii) 二次代謝としての毒素産生とその生態学的意義について

ご略歴

学 歴

昭和31年3月 東京大学農学部農芸化学科卒業

昭和36年3月 東京大学大学院化学系研究科農芸化学専門課程博士課程修了

職 歴

昭和36年4月 東京大学農学部 助手

昭和44年8月 東京大学農学部 助教授

昭和52年8月 東京大学農学部 教授

平成5年4月 東京大学生物生産工学研究センター センター長(兼任)

平成6年5月～現在 東京大学名誉教授

平成6年4月～同 16年3月 日本大学生物資源科学部 教授

平成11年4月～同 16年3月 日本大学生命科学研究所 所長(兼任)

平成16年4月～同 17年3月 日本大学総合科学研究所 教授

平成17年1月～現在 日本学士院会員

平成17年4月～同 21年3月 日本大学大学院総合科学研究科 教授

平成21年4月～同 24年3月

文部科学省ターゲットタンパク研究プログラム・プログラムディレクター

平成26-27年度役員名簿

会 長 塚越 規弘(名古屋大学名誉教授)

運営委員長 竹内 道雄(東京農工大学)

運営委員(五十音順)

天野 仁(天野エンザイム(株)) 岩下 和裕((独)酒類総合研究所)
柏木 豊(東京農業大学) 北本 勝ひこ(東京大学)
後藤 正利(九州大学) 小林 哲夫(名古屋大学)
五味 勝也(東北大学) 小山 泰二((公財)野田産業科学研究所)
秦 洋二(月桂冠(株)) 堀内 裕之(東京大学)
和久 豊((株)ビオック)

監 事 山形 洋平(東京農工大学)
西村 麻里江((独)農業生物資源研究所)

運営幹事(事務局): 独立行政法人酒類総合研究所 醸造技術基盤研究部門
岩下 和裕(副部門長)、織田 健(研究員)
〒739-0046 東広島市鏡山3丁目7番1号
TEL:082-420-0824、FAX:082-420-0808
E-mail: info@fungi.mysterious.jp

平成27年度賛助会員名簿 (平成27年5月1日現在)

- | | |
|----------------|------------------------|
| 1 株式会社 秋田今野商店 | 14 公益財団法人 日本醸造協会 |
| 2 アサヒビール株式会社 | 15 公益財団法人 野田産業科学研究所 |
| 3 天野エンザイム株式会社 | 16 ノボザイムズ・ジャパン株式会社 |
| 4 イチビキ株式会社 | 17 白鶴酒造株式会社 |
| 5 大関株式会社 | 18 株式会社ビオック |
| 6 菊正宗酒造株式会社 | 19 ヒガシマル醤油株式会社 |
| 7 キッコーマン株式会社 | 20 株式会社 樋口松之助商店 |
| 8 月桂冠株式会社 | 21 ヒゲタ醤油株式会社 |
| 9 合同酒精株式会社 | 22 株式会社フジワラテクノアート |
| 10 三和酒類株式会社 | 23 Meiji Seikaファルマ株式会社 |
| 11 新日本化学工業株式会社 | 24 名糖産業株式会社 |
| 12 スパイバー株式会社 | 25 盛田株式会社 |
| 13 寶酒造株式会社 | 26 ヤマサ醤油株式会社 |

