

報 文

麹菌 *Aspergillus oryzae* の形態関連遺伝子の解析

服部 領太¹, 楠本 憲一¹, 柏木 豊², 鈴木 聡^{1*}

¹ 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

² 東京農業大学

〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

The analysis of morphogenetic gene of *Aspergillus oryzae*

Ryota Hattori¹, Ken-Ichi Kusumoto¹, Yutaka Kashiwagi², Satoshi Suzuki^{1*}

¹ Applied Microbiology Division, National Food Research Institute, NARO

2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642 Japan

² Tokyo University of Agriculture

1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-Ku, Tokyo 156-8502 Japan

Abstract

Filamentous fungus *Aspergillus oryzae* is used widely for the Japanese fermentation industry. Its ability of conidial production is important. However, mechanism of conidiation in *A. oryzae* remain to be elucidated. We constructed gene trap vector and carried out restriction enzyme mediated integration. We isolated 6 transformants that exhibit conidiation defect phenotype and recovered flanking genome region of plasmid integration site by plasmid rescue. One of them, strain 391, has the flanking genome region, which has high homology of glutaminase in *Neurospora crassa*. We supposed that the gene is involved in conidiation and tried to analysis the function.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, 分生子

* 連絡先 (Corresponding author), satosuzu@affrc.go.jp

緒 言

Aspergillus oryzae は日本醸造学会により我が国の国菌と認定された有用糸状菌である。糖質やタンパク質等を加水分解する酵素群の生産能が高いという特性を持つため、古来より味噌、醤油などの伝統的発酵食品の製造に麹菌として利用されている。麹菌培養のスターターとしては無性胞子である分生子が利用されており、初発接種分生子量を十分に確保することは麹づくりにおいて重要である。接種する分生子量が不足した場合、十分な菌体量を得ることが出来ない、いわゆる「はぜ落ち」の状態となり、その後の醸造工程に必要な酵素力価を得ることが出来ない。分生子を多量に得るための様々な技術的な知見が蓄積されているが¹⁾、その裏づけとなる麹菌分生子形成のメカニズムの解明はなされていない。

近縁のモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の研究で、分生子形成の制御に関わる分子機構が詳細に明らかにされている²⁾³⁾。分生子形成の主な制御因子 BrlA は、下流の転写因子 AbaA の転写を調節し、AbaA はさらに下流の転写因子 WetA の転写を調節する。これらの一連の転写因子の部位・時期特異的制御により順次分生子関連遺伝子の発現を制御していく分生子形成主制御経路が提唱されている⁴⁾。これら、BrlA を中心とする主制御経路とその上流の FluG 及び複数の Flbs 制御タンパク質による BrlA の制御系^{2)~4)}、また、それとは別に三量体 G タンパク質 FadA (G α)、SfaD (G β)、GpgA (G γ) による栄養成長と生殖との切り替え機構^{2)~4)} のように *A. nidulans* において解明された領域は、*A. oryzae* においても大枠で同様の制御機構が保存されており、個々の制御タンパク質の機能については、*A. nidulans* と *A. oryzae* の間に若干の差異がある場合があることが小川らによって明らかにされた⁵⁾。一方で、光、乾燥（水分あるいは浸透圧ストレス）、酸素分圧等の環境因子により *A. nidulans* の分生子形成が誘導されることが知られているが、それらの環境因子から BrlA に至る信号伝達経路は完全に解明されていない²⁾。長い遺伝学の歴史の中で多くの分生子形成異常変異株とその原因遺伝子座の知見の蓄積がある *A. nidulans* に対し、有性生殖環が未発見の *A. oryzae* では変異形質と原因遺伝子を結びつける研究はほぼ不可能であった。ゲノム情報や網羅的遺伝子発現情報を利用できるようになった現在でも、*A. oryzae* 独自の知見を得ることは依然として困難である。

高等植物のモデル生物であるシロイヌナズナでは、

T-DNA によるタグラインが分譲機関に寄託され、研究目的の利用を前提に共有されることで、多くの変異株の原因遺伝子やその機能が明らかにされてきた。タグリングによる変異株の作出は既に古典的手法となったが、*A. oryzae* のように遺伝学的解析の困難な生物の研究においては、現代でも有用な方法となりうる。筆者らはプラスミドタグリングによる変異株の作出と変異遺伝子の同定、当該遺伝子プロモーターの発現解析を同時に行うことができる実験手法として緑色蛍光タンパク質 GFP を用いたジーントラップベクター pPTREGFP1 を開発し、*Aspergillus* 属では新規の尿素トランスポータータンパク質を発見した⁶⁾。本研究では pPTREGFP1 を改良したジーントラップベクター pPTREGFP2 を用いたプラスミドタグリングにより、分生子形成に異常のある変異株を作出し、原因遺伝子候補の解析を行ったので報告する。

実験材料および方法

菌株、培地及び培養条件

供試菌株として *Aspergillus oryzae* RIB40 (NFR1599) 株を使用した。培地は、ツァベック・ドックス (CD) 寒天培地 (1% (w/v) D-glucose, 0.6% (w/v) NaNO₃, 0.1% (w/v) KH₂PO₄, 0.1% (v/v) trace element solution, 0.05% (w/v) KCl, 2% (w/v) Agar, 2 mM MgSO₄)、及びポテトデキストロースアガー (PDA) (Difco) を用いた。trace element solution の組成は 0.1% (w/v) FeSO₄ · 7H₂O, 0.88% (w/v) ZnSO₄ · 7H₂O, 0.04% (w/v) CuSO₄ · 5H₂O, 0.01% (w/v) Na₂B₄O₇ · 10H₂O, 0.005% (w/v) (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O である。また、固体培養として米麹での培養を次のような設定で行った。アルファ化米 (徳島製麹) を 10 g, 9 cm 硝子シャーレに一層に敷き詰め 10 ml 蒸留水を添加してオートクレーブしたものに、分生子液を滴下し、4-7 日間十分に分生子を着生させた。培養はすべて 30℃ 培養室で行った。プラスミド増幅には *Escherichia coli* DH5 α (TOYOBO), XL-10Gold (Stratagene) を用いた。非メチル化プラスミドの増幅には *E. coli* SUS110 を用いた。タンパク質発現には *E. coli* Rosetta-gami (Merck) および *Pichia pastoris* (Invitrogen) を用いた。

一般的核酸取り扱い

ゲノム DNA の抽出は DNeasy Plant キット (QIAGEN)、プラスミド DNA の抽出は QIAprep Spin Miniprep キット (QIAGEN) を用いて添付マニュアル

に従って行った。

サザンブロット, ノーザンブロット, DNA シーケンス, DNA 制限酵素処理, DNA ライゲーション反応, 大腸菌形質転換は一般的な定法に従って行った。サザンブロット及びノーザンブロット用プローブDNAの作成はPCR DIG ラベリングキット (Roche) にて添付マニュアルに従って行った。ポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) はKODポリメラーゼ (TOYOBO) を用いて添付マニュアルに従って行った。

ベクター構築

ジーントラップベクター pPTREGFP1 を *Pst*I で切断しアルカリフォスファターゼ処理をした。合成オリゴDNA, MCS5 (AACTGCAGGATCCGCGCAGATCTGCAGAA), MCS3 (TTCTGCAGATCTGCGCGGATCTGCAGTT) をアニーリングさせたDNA断片を *Pst*I 切断し, ゲル切り出し精製したものを上記ベクターにライゲーションし, pPTREGFP2とした。

Pichia 発現系に用いるベクターは pPIC3.5 (Invitrogen) の *Sna*BI-*Avr*II サイトにグルタミナーゼ相同遺伝子 cDNA を *Pst*I (切断後平滑化) -*Spe*I 断片をクローニングして作成した。

大腸菌発現系に用いるベクターは pET-32b (+) (Novagen) の *Bam*HI-*Xho*I (切断後平滑化) サイトにグルタミナーゼ相同遺伝子 cDNA の *Bcl*II-*Spe*I (切断後平滑化) 断片をクローニングして作成した。

RNA抽出

液体培養からの RNA 抽出は RNeasy (QIAGEN) を用いて添付マニュアルに従って行った。米麹からの RNA 抽出は, 鈴木らの方法⁷⁾にて行った。

cDNA合成

total RNA からの mRNA 精製は PolyA pure (Ambion) を用いて添付マニュアルに従って行った。全長 cDNA 合成は FirstChoice® RLM-RACE キット (Ambion) を用いて添付マニュアルに従って行った。全長 cDNA は PCR の後 TOPOTA クローニングベクター (Invitrogen) にクローニングした。cDNA 配列は DDBJ に登録した。(dbj|AB164052.1)

過剰発現及びアンチセンスベクター

アルカリフォスファターゼ処理済 pGEMTEFP の *Nco*I-*Eco*RV サイト (切断後平滑化) にグルタミナーゼ相同遺伝子 cDNA の PCR 断片をポリヌクレオチドカイ

ネースにてリン酸化したものをライゲーションした。シーケンスを確認後, これを正方向, 逆方向に cDNA が挿入されたものを 1 クローンずつ選び, *Pst*I と *Not*I の二重消化により切り出した後, pPTRScTm の *Pst*I-*Not*I サイトにクローニングした。

制限酵素仲介型挿入変異株作成法 (restriction enzyme mediated integration, REMI 法)

REMI 法の際には *Bgl*II で直鎖化した pPTREGFP2 プラスミドと *Mbo*I 5U をプロトプラスト PEG 法により *A. oryzae* 細胞内に導入した。プロトプラスト PEG 法は五味らの方法⁹⁾に従って実施した。また, 選抜はピリチアミン耐性にてピリチアミン (TAKARA BIO) の製品添付マニュアルに従って行った。

プラスミドレスキュー

各株から定法に従ってゲノム DNA を抽出し, strain1 は制限酵素 *Avr*II 及び *Bst*BI, strain28 は *Bst*BI 及び *Hpa*I, strain56 は *Bst*BI 及び *Xho*I, strain391 は *Bst*BI 及び *Mlu*I, strain473 は *Bst*BI 及び *Xho*I, strain513 は *Aat*II 及び *Bst*BI にてゲノム DNA を切断し, 制限酵素を熱失活後エタノール沈殿にて精製した。各株 4 µg の切断済み DNA を 200 µl の反応系でセルフライゲーションの後, 大腸菌の形質転換を行った。得られた大腸菌クローンからプラスミドを回収し, ゲノム DNA 切断に用いた制限酵素で切断し, アガロースゲル電気泳動にて確認した。

その他の測定および解析

SDS ポリアクリルアミド電気泳動は Laemmli の方法により行った⁹⁾。グルタミナーゼ活性測定は, L-グルタミン酸測定キット (ヤマサ) を用いて添付マニュアルに従って行った。マイクロアレイ解析は株式会社ファームラボ (東京都江東区) に委託した。

実験結果及び考察

プラスミドタギング実験に用いるジーントラップベクター pPTREGFP2 を先に構築した pPTREGFP1 の改良により作出した。(図 1 A) pPTREGFP1 を用いた REMI 法においては制限酵素 *Pst*I を用いる必要があったが, 6 塩基認識の *Pst*I では理論上⁶⁾塩基対 (およそ 4 kb) につき 1 回の切断機会しかない。そのような頻度では平均 2 kb 程度の *A. oryzae* の ORF にあたる確率が低いため, 制限酵素によるゲノム DNA の切断プラスミ

ド挿入箇所をより、なんらかの意味ある配列上に得る確率を上昇させるため4塩基認識のMboIを利用できるようにプラスミドを改良した。そこでpPTREGFP1のPstI切断部位近傍にMboI切断部位を内包するBgIII切断部位を追加しpPTREGFP2とした。(図1B)本ベクターを用いたREMI法による*A. oryzae*の形質転換では、あらかじめBgIIIにて直鎖状とした本ベクターと制限酵素MboIを同時に*A. oryzae*細胞内に導入する。MboIはdamメチラーゼによるメチル化DNAを切断できないため、DH5 α 等、damメチラーゼ+の一般的な大腸菌宿主を用いて増幅されたプラスミド内の認識配列を切断することは出来ない。一方で、*A. oryzae*核内に導入されたMboIはdamメチラーゼを持たない真核生物ゲノムDNAを認識配列で切断し、5'突出末端GATCを生じる。そこへBgIIIによる直鎖化により5'突出末端GATCをもつ本ベクターが接近し、*A. oryzae*のDNA修復系により二重鎖の修復が行われることにより、本ベクターのゲノム内の無作為な位置への挿入が行われる。

pPTREGFP2を用いたREMI法による形質転換により、540株のピリチアミン耐性株を取得した。CD寒天培地培養による形態観察により、そのうち6株の分生子形成異常株 (strain1, strain28, strain56, strain391, strain473, strain513) を選抜した。(図2) 540株のピリチアミン耐性株のうち、ジーントラップベクターの当初の目的である、プロモーターあるいはオープンリーディングフレームのトラップに成功し、緑色蛍光タンパク質を発現する株は皆無であった。また、CD寒天培地上にて、顕著な形態的な表現形を示す株は、上記6株の分生子形成異常株を除き見つからなかった。い

ずれも、野生株RIB40が分生子形成を行う培養4日目以降になってもコロニー色が白いままであった。実体顕微鏡観察によっても、分生子が見られないか、非常に少ないことが解った。そのため、これらの株が、タギングに成功した株であると判断し、各々のゲノムDNAをサザン解析に供した。サザン解析の結果、全株ともゲノム内一箇所に1コピーのプラスミドが挿入されていることが解った。(図3)そこで、これらの株のゲノムDNAに対してプラスミドを切断しない制限酵素での処理を行い、自己環状化によるプラスミドレスキューを試みた。

プラスミドレスキューにより、プラスミド挿入部位近傍のゲノムDNA断片を回収した。回収断片のシーケンスを調べたところ、strain28はコンティグSC111内の酵母のGCN2に相同性のある未知のプロテインキナーゼ様配列XM_001823030のORFに、strain56はコンティグSC011内の未知のモノオキシゲナーゼ様配列をコードするXM_001826222のORFに、strain391は前半がコンティグSC003内の未知のグルタミナーゼ様配列のORF、後半はSC009の非アノテーション領域に、strain473はSC003の非アノテーション領域に、strain513はSC113内の未知のモノカルボン酸トランスporter様配列をコードするXP_001824382.2のORFに、それぞれ合致した。strain1のプラスミドレスキューには失敗した。そこで、GCN2、モノオキシゲナーゼ、グルタミナーゼ、モノカルボン酸トランスporterの相同遺伝子の中から、醸造上重要な酵素であるグルタミナーゼに似た配列を持つ遺伝子を選び、以降の実験に供した。

グルタミナーゼ相同遺伝子を解析するため、まず発

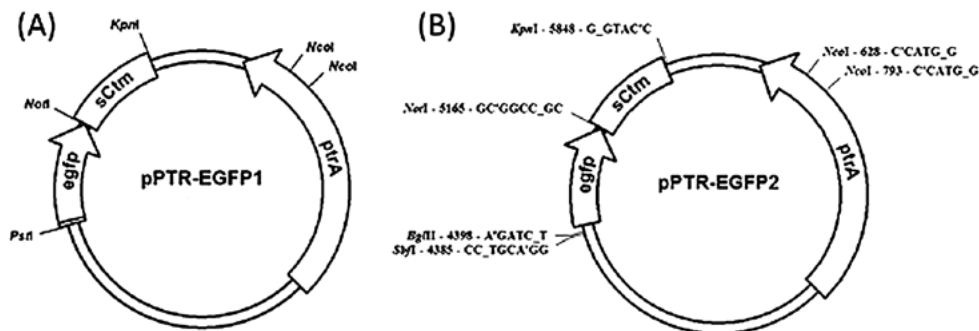


図1. ジーントラップベクター

(A): pPTREGFP1 (B): pPTREGFP2

ptrA: ピリチアミン耐性マーカー

egfp: 高感度緑色蛍光タンパク質コード領域

sCtm: sC遺伝子ターミネーター

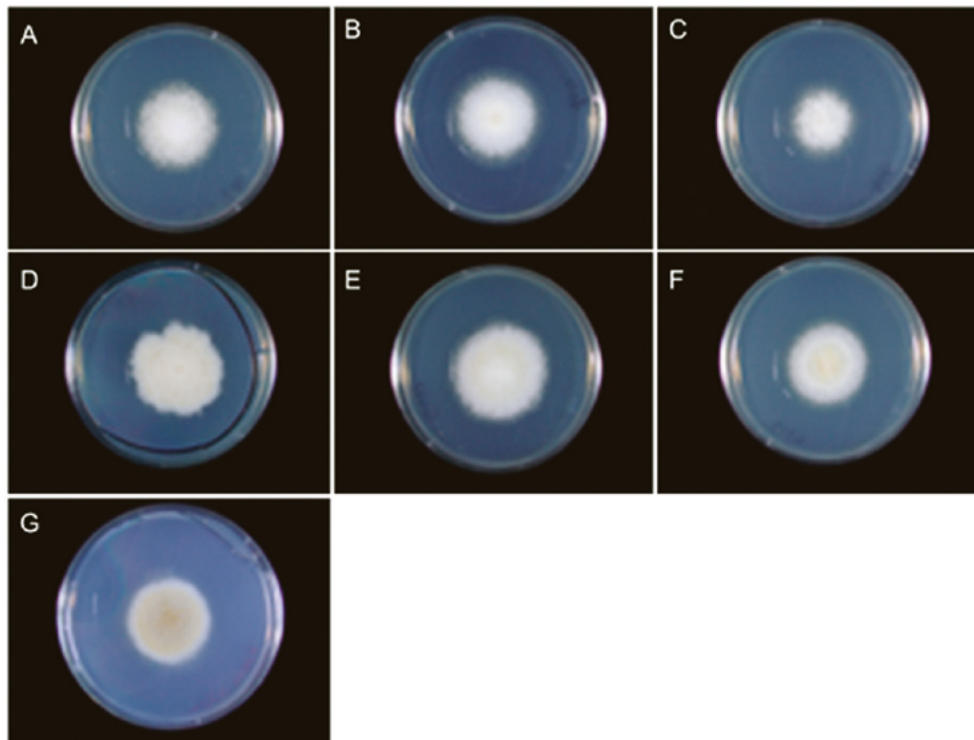


図 2. 形態変異株

A: strain 1, B: strain 28, C: strain 56, D: strain 391, E: strain 473, F: strain 513, G: RIB40 (Wild type)

現を調べた。液体培養，固体培養からそれぞれ抽出したtotal RNAに対して，strain391より回収したプラスミド近傍配列をプローブとしたノーザンブロット解析の結果，グルタミナーゼ相同遺伝子は液体培養ではほとんど発現せず，固体培養で発現が見られたが，発現量は対象とした*glaB*の発現と比べると非常にわずかであった。(図4)

mRNAを精製し，グルタミナーゼ相同遺伝子の全長cDNAを取得したところ，全長は2.7 kbであり，5つのイントロン配列に分断されたエキソンは6つ，予想アミノ酸配列835アミノ酸，予測分泌シグナル配列1から33番目アミノ酸であった。また，アミノ酸のアライメント解析では，*Neurospora crassa*のgi32404674と54%の相同性があった。既知の*A. nidulans*グルタミナーゼ，*A. oryzae*のglutaminaseA¹⁰⁾，タイで分離された麹菌のグルタミナーゼ¹¹⁾の保存領域に高い相同性が見られたが，それらには存在しないリンカー配列を持つ点で*N. crassa*のグルタミナーゼと最もよく似ていた。(図5)グルタミンは風味に影響しないピログルタミン酸へと酵素を介さない反応により変換されるために，グルタミナーゼの増加が醤油の風味改善に有効であるという報告がある¹²⁾。そのために麹菌のグルタミナーゼ

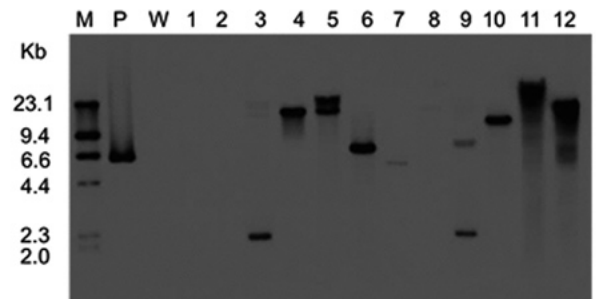


図 3. 変異株のサザンブロット解析

M: DNA サイズマーカー (λ /Hind III),
 P: pPTR-EGFP2 (1ng),
 W: RIB40 genome/ KpnI, 1: strain1 genome/ KpnI,
 2: strain1 genome/ XhoI, 3: strain28 genome/ KpnI,
 4: strain28 genome/ XhoI, 5: strain56 genome/ KpnI,
 6: strain56 genome/ XhoI, 7: strain391 genome/ KpnI,
 8: strain391 genome/ XhoI, 9: strain473 genome/ KpnI,
 10: strain473 genome/ XhoI, 11: strain513 genome/ KpnI,
 12: strain513 genome/ XhoI,

の研究はなされているが¹⁰⁾¹¹⁾，分生子形成に関する報告は特にない。グルタミン酸は分生子中に貯蔵される主要なアミノ酸としての報告があり，胞子発芽率が減

少した遺伝子改変株は含量が大きく低下したという報告はあるが¹³⁾, グルタミナーゼと分生子形成との関連は不明である。

市販メタノール資化性 *Pichia pastoris* タンパク質発

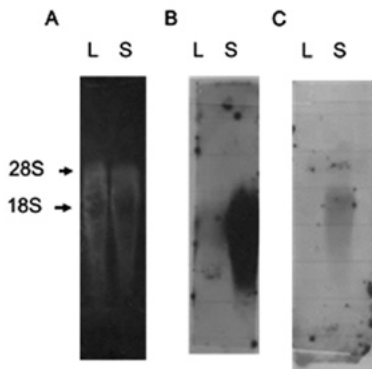


図4. グルタミナーゼ相同遺伝子発現

L 液体培養から抽出したRNA, S 米麹培養から抽出したRNA
 A: EtBr染色, B: *glaB* プローブ, C: strain391 rescue plasmid flanking region プローブ
 プローブはレスキュープラスミドの近傍配列部分をDIGラベルして用いた。

現系及び、大腸菌タンパク質発現系にてグルタミナーゼ相同遺伝子がコードするタンパク質を発現させたが、いずれもグルタミナーゼ活性は検出されなかった。そのため、当該タンパク質はグルタミナーゼではなく、別の活性を持つ酵素である可能性が考えられた。また、既知グルタミナーゼとのアミノ酸アライメントの解析により、既知グルタミナーゼには存在しないリンカー領域により、高度に保存された領域が分断されている事がわかったが、生育環境条件により、これらのリンカーが切り出されることによって酵素活性が生じるのかもしれない。また、C末側にEGFPを融合発現するGFP融合グルタミナーゼ様タンパク質発現株を作成したが、GFP蛍光は菌体内に観察された。*Pichia*による発現では当該タンパク質内在の分泌シグナルにより培養上清中への分泌発現が見られたため、*A.oryzae*でも、タンパク質本体は分泌発現されていると考えられるが、GFPを含むC末がプロセッシングを受けたことにより細胞内に残った可能性が考えられる。当該遺伝子過剰発現、アンチセンス発現、遺伝子破壊株の解析は、分生子形成異常に関わる形態変異の表現形を得ることができなかった。また、strain391と宿主株RIB40の遺伝子発現比較をマイクロアレイ解析により行ったが、分生子形成異常に関わる形態変異の

glutaminasehomolog	351	LSEHYVDLANAGTASDYSEQLAQAVQSGAYDWDIVALSARQMGATTFASITPENPIL	410
<i>N.crassa</i>	326	VRYHYNDFKTASLARNYSDSLARAFESGSESQDIAASARQMLGATQFSITPDDPII	385
<i>A.nidulans</i>	311	LDFHHDYKKSNSLSDLDRIADSVARAGHDYLTITSLSIQAFATQLCFANDPFL	370
<i>A.o.ajinomoto</i>	313	LEFFHHDYAAAAKSKLDLDRISKSDIDRAGQDYLTITSITVQVFAFVQLTSTPEDPYI	372
<i>A.o.thailand</i>	313	LEFFHHDYAAAAKSKLDLDRISKSDIDRAGQDYLTITSITVQVFAFVQLTSTPEDPYI	372
glutaminasehomolog	411	FVKEISSNGNFQITDVIFFPFPFLYTNPAHLAVLLEPLIEHMLSSQMPNKVYAHQIGIH	470
<i>N.crassa</i>	386	FVKEISSNGNFQITDVIFFPFPFLYTNPKLGVLEPLIEHQLSSQMPNDVSYAHQIGAH	445
<i>A.nidulans</i>	371	FVKEISSNGNINTDVIFFPFPFLYTNPAHLKVLLEPLIEQESSVWPNVYAHQIGAH	430
<i>A.o.ajinomoto</i>	373	FVKEISSNGNINTDVIFFPFPFLYTNPELLKLIKEIYEQENGKVPNTVYAHQIGIH	432
<i>A.o.thailand</i>	373	FVKEISSNGNINTDVIFFPFPFLYTNPELLKLIKEIYEQENGKVPNTVYAHQIGIH	432
glutaminasehomolog	471	FVFNATGHFDGNDVYIPVEECGNILIMGLAVVNSLRYSDSTARSVMWTRGTI-AQTSDKN	529
<i>N.crassa</i>	446	FVFNATGHSDDVDEYIPVEECGNILIMGLALANAFRYDTEPAFVQAAAPHAVYNAISSAKD	505
<i>A.nidulans</i>	431	VFNATGHFDGNDVYIPVEECGNIVIMIALA-----Y-----AQ-KA-GD	466
<i>A.o.ajinomoto</i>	433	VFNATGHFKGDDEKIPVEECGNIVIMIALA-----Y-----AQ-KA-KD	468
<i>A.o.thailand</i>	433	VFNATGHFKGDDEKIPVEECGNIVIMIALA-----Y-----AQ-KA-KD	468
glutaminasehomolog	530	SGYFPLDNLQALGGIDKQDGRNGGGAQGEHLAEKIVQRSYKLITQITSVLVEFSLEFANQ	589
<i>N.crassa</i>	506	WS-RSVDRY-GFDLRGHRDRKTNLQTTGSKRAEKWLTASVSLIKQITGVLVRESLIPHNQ	563
<i>A.nidulans</i>	467	TAY--L-ESH-----VTLRRTDVLIEDSLYFANQ	494
<i>A.o.ajinomoto</i>	469	NDY--L-SQH-----VPLNKATITVLEDSIYFANQ	496
<i>A.o.thailand</i>	469	VQY--L-SQH-----VPLNKATITVLEDSIYFANQ	496
glutaminasehomolog	590	XNVVSTDOFAGSLAQTNLALKGIGIEMSKLAEVASHKANASYVKXDPLTQIQNIFDT	649
<i>N.crassa</i>	564	---LCTDOFAGSLAQTNLALKGIGIEMSEIADIYSHEDERAKHYR-----KIFAT	612
<i>A.nidulans</i>	495	---I-STDOFAGSLAQTNLALKGIGIEMSVIASLIG-----DSDD-KMILTNVYHD	543
<i>A.o.ajinomoto</i>	497	---I-STDOFAGSLAQTNLALKGIGIEMAVISNTIG-----HPDD-ASHHSSIFAKD	545
<i>A.o.thailand</i>	497	---I-STDOFAGSLAQTNLALKGIGIEMAVISNTIG-----HPDD-ASHHSSIFAKD	545

図5. グルタミナーゼ相同遺伝子産物のアミノ酸アライメント解析 (上より、グルタミナーゼ相同遺伝子産物、*Neurospora crassa* グルタミナーゼ、*A. nidulans* グルタミナーゼ、*A. oryzae* グルタミナーゼA、タイで分離された *A. oryzae* グルタミナーゼ)

原因となる遺伝子の特定にはいたらなかった。

以上より, strain391の形態変異の原因及び, その候補遺伝子と仮定されたグルタミナーゼ相同遺伝子の機能は不明であった。

要 約

*Aspergillus oryzae*はわが国の醸造産業に広く使用されている糸状菌であり, その分生子生産能は重要である。しかし, *A. oryzae*において, 分生子形成のメカニズムの解明はなされていない。

私たちは構築したジーントラップベクターを用いて制限酵素が介在するプラスミドの組込みを行った。6株の分生子形成異常株を取得し, プラスミドレスキューを行ったところ, strain391において, 対応する領域にある新規遺伝子は*Neurospora crassa*の持つグルタミナーゼに高い相同性を示していた。このタンパク質が分生子形成にかかわる可能性が示唆されたので, 機能解明を試みた。

文 献

- 1) 楠本憲一, 古川育代, 鈴木聡, 柏木豊 麹菌の簡便かつ効率的な孢子形成能の強化法 食品総合研究所研究報告 **71**, 39-43 (2007)
- 2) Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., Veluw, G.J., Wang, F., Müller, W.H., Dijksterhuis, J. and Wösten. H.A.B., Development in *Aspergillus*, *Studies in Mycology* **74**, 1-29 (2013)
- 3) Park, H.S. and Yu, J.H., Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol.* **15**, 669-77 (2012).
- 4) Adams T.H., Wieser J.K. and Yu JH. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**, 35-54 (1998).
- 5) Ogawa, M., Tokuoka, M., Feng J. J., Takahashi, T., Koyama, Y., Genetic analysis of conidiation regulatory pathways in koji-mold *Aspergillus oryzae* *Fungal Genetics and Biology*, **47**, 10-18 (2010).
- 6) Suzuki, S., Kusunoto, K-I. and Kashiwagi, Y., Construction of a gene trap vector, pPTR-EGFP1, for the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae* 食品総合研究所研究報告 **67**, 33-38 (2003)
- 7) 鈴木聡, 竹谷博子, 石田博樹, 楠本憲一, 柏木豊 アウリントリカルボン酸アンモニウムを用いた米麹からの麹菌全RNA抽出法の検討 食品総合研究所研究報告 **68**, 33-38 (2004)
- 8) Laemmli, UK., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685. (1970)
- 9) Iimura, Y., Gomi. K., Uzu, H., Hara, S., Transformation of *Aspergillus oryzae* through Plasmid-mediated Complementation of the Methionine-auxotrophic Mutation. *Agricultural and Biological Chemistry.* **51** 323-328. (1987)
- 10) Koibuchi K., Nagasaki H., Yuasa A., Kataoka J., Kitamoto K., Molecular cloning and characterization of a gene encoding glutaminase from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **54**. 59-68. (2000)
- 11) Thammarongtham C., Turner G., Moir A.J., Tanticharoen M., Cheevadhanarak S. A new class of glutaminase from *Aspergillus oryzae*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **3**. 611-617. (2001)
- 12) Yano T., Ito M., Tomota K., Kumagai H. and Tochikura T. Purification and properties of glutaminase from *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol.* **66**. 137-143. (1988)
- 13) 坂本和俊, 麹菌孢子 of 耐久性にかかわる遺伝子の発現制御機構について, 醸協, **105**, 762-769 (2010) .

