

博士論文（要約）

麹菌 *Aspergillus oryzae* における
菌核形成に関与する因子の探索と機能解析

中村 英淳

目次

序章 …3

- ・ 麹菌 *Aspergillus oryzae*
- ・ 菌核
- ・ 糸状菌における菌核形成の分子機構
- ・ *Aspergillus* 属糸状菌を用いた菌核の最近の研究
- ・ 本研究の目的

第一章 *A. oryzae* の分化における AoRim15 の機能解析 …14

序

結果

- 1-1 *Aorim15* の破壊株と過剰発現株の作製
- 1-2 *Aorim15* の破壊株と過剰発現株の生育および分生子形成解析
- 1-3 *Aorim15* の破壊株と過剰発現株のストレス感受性の解析
- 1-4 *Aorim15* の破壊株と過剰発現株の菌核形成解析

考察

第二章 *A. oryzae* の菌核形成に関与する転写因子の探索 …32

序

結果

- 2-1 転写因子の遺伝子破壊株における菌核形成解析

考察

第三章 菌核形成に関与する因子の機能解析 …49

序

結果

- 3-1 *Aoace2* の破壊株と過剰発現株の作製
- 3-2 *Aoace2* の破壊株と過剰発現株の表現型解析
- 3-3 AO090010000784 遺伝子の破壊株と相補株の作製
- 3-4 AO090010000784 の破壊株と相補株の表現型解析

考察

第四章 *A. oryzae* の実用株における菌核形成の誘導 …76

序

結果

4-1 *A. oryzae* の実用株における *Aorim15* と *sclR* の過剰発現による菌核形成解析

4-2 *A. oryzae* の実用株における *ligD* 変異および *pyrG* 破壊株の作製

4-3 *A. oryzae* の実用株における *Aoace2* または *ecdR* の破壊による菌核形成解析

考察

総括及び展望 …105

実験材料および方法 …110

参考文献 …126

要旨 …144

謝辞 …148

序章

麹菌 *Aspergillus oryzae*

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、子囊菌門 *Aspergillus* 属に分類される微生物であり、古くから清酒、味噌、醤油などの製造に用いられている。我が国の醸造産業において欠かせない重要な微生物であり、日本醸造学会によって「国菌」として認定された。*A. oryzae* は、真核生物の中でもタンパク質分泌能力が高く、アミラーゼやプロテアーゼなどの有用酵素を菌体外に大量に分泌することが知られており、また、食品製造においてその安全性が保証されている。そのような性質によって *A. oryzae* は、異種タンパク質を組換えにより生産するための宿主として利用されている(Tsuchiya *et al.*, 1992, 1994; Nakajima *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010)。

しかし、*A. oryzae* は、菌糸のみならず無性生活環で形成される分生子も多核である(Maruyama *et al.*, 2001)ことから目的とする変異株の取得が困難である。また、有性世代が発見されていないことから、古典的な遺伝学的解析手法を適用することができなかった。

2005 年には、全ゲノム塩基配列の解読がなされ(Machida *et al.*, 2005)、ゲノム情報を利用した逆遺伝学による分子生物学的な研究が可能となった。遺伝子操作技術については、1987 年に形質転換系が確立され(Gomi *et al.*, 1987)、今日までに、栄養要求性、薬剤耐性を利用した様々な選択マーカーが開発されてきた(Gomi *et al.*, 1987; Mattern *et al.*, 1987; Unkles *et al.*, 1989; Yamada *et al.*, 1997; Kubodera *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2004a)。 *A. oryzae* の 4 重栄養要求性宿主・ベクター系も構築され、薬剤耐性マーカーを含め最大 5 種類の遺伝子を同時に導入もしくは破壊することが可能となった(Jin *et al.*, 2004a; b)。

さらに、非相同末端結合に関与する *ligD* 遺伝子や *ku70* 遺伝子の破壊により、高効率で相同組換えが可能な宿主株が作出され、遺伝子破壊株が容易に作製できるようになった(Takahashi *et al.*, 2006; Maruyama and Kitamoto, 2008; Mizutani *et al.*, 2008; Escañó *et al.*, 2009)。 *pryG* 選択マーカーを利用したリサイクリング技術による遺伝子の多重破壊も可能となった(Maruyama and Kitamoto, 2008; Jin *et al.*, 2010)。この技術により、プロテアーゼ遺伝子多重破壊株を作製し、異種タンパク質の生産量の向上に成功している(Yoon *et al.*, 2009, 2011; Zhu *et al.*, 2013)。しかし、このような *ku70* や *ligD* の欠失は野生株 RIB40 などの一部の株に限定されており、醸造に利用されている *A. oryzae* 株では同様の欠失操作が困難であることから、遺伝子操作による育種開発の障害となっていた。

A. oryzae の実用株の分生子では、RIB40 株と同様もしくはそれ以上に多核であることから(Maruyama *et al.*, 2001)、変異育種はより困難である。さらに、変異

処理によって目的の表現型を示す株を取得した際に、生育阻害や分生子形成効率低下などの二次的影響が現れることが経験的に知られている(Hara *et al.*, 1993)。 *A. oryzae* については、種麴屋をはじめとして日本各地に数千の保存株が存在しているのにも関わらず、それらの性質を改変することは非常に困難な状況である。

A. oryzae は有性世代が見つかっておらず、不完全菌として扱われてきた。そのため交配を行うことができず、複数の株由来の優良な表現型を備えた株の育種を効率的に行うことが困難である。しかし最近、*A. oryzae* の各菌株によって、ゲノム上の接合型決定領域(MAT 領域)に *MAT1-1* 遺伝子もしくは *MAT1-2* 遺伝子が存在することが明らかになった(Wada *et al.*, 2012)。このことから、*A. oryzae* がヘテロタリックな有性生殖を行う可能性が示された。

2009 年に有性世代が発見されたカビ毒アフラトキシン生産菌 *Aspergillus parasiticus* や *Aspergillus flavus* では、菌核内に子嚢果と呼ばれる有性生殖器官が形成されることが報告されている(Horn *et al.*, 2009a, b, c)。菌核は一部の糸状菌で観察される耐久性の休眠構造である。*A. oryzae* では、野生株 RIB40 を含む一部の株は少ないながらも菌核を形成するが、大部分の株は菌核を形成しない(Murakami, 1971)。このことは、*A. oryzae* において有性世代が発見されていない理由の 1 つとして考えられている。菌核形成の分子機構が解明されれば、*A. oryzae* で菌核形成能が低下もしくは失っている原因を特定することができ、菌核形成の促進による有性生殖の誘導ができる可能性がある。

菌核

菌核は、子囊菌門 *Ascomycota* および担子菌門 *Basidiomycota* に属する一部の糸状菌で観察され、無性的に形成される耐久性の休眠構造である。低温、乾燥や他の微生物による攻撃などに耐えられる頑丈な構造をとっている(Townsend and Willets, 1954; Coley-Smith and Cooke, 1971)。大きさは種によって異なり、*A. flavus* の菌核の直径は 1 mm 以下(Colly, 1989)で、枯れた木の根に寄生して育つライガン菌 *Polyporus mylittae* の菌核では 40 cm 以上を超えるものもある(Macfarlane *et al.*, 1978)。

子囊菌門は、*Monilinia*、*Sclerotinia*、*Claviceps*、*Botrytis*、*Verticillium*、*Aspergillus*、*Penicillium* 各属で、担子菌門は *Typhula*、*Sclerotium*、*Coprinus* と *Polyporus* 各属が菌核を形成することが報告されている(Willetts and Bullock, 1992)。子囊菌門である *Aspergillus* 属は、*A. oryzae*、*A. flavus* や *A. parasiticus*、*A. niger* などが報告されており、全ての *Aspergillus* 属が形成するとは限らない(Agnihotri *et al.*, 1968; Murakami, 1971; Bennett *et al.*, 1978)。*A. oryzae* では、野生株 RIB40 を含むごく一部しか菌核を形成しない(Murakami, 1971)。また、菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* などの植物病原菌が菌核を形成する(Morrall *et al.*, 1978)。

よく研究されている *S. sclerotirum* の菌核形成過程では、菌糸が分岐・融合・接着を繰り返して密集し、メラニン沈着とともに硬壁化して形成される(Fig. 0-1)(Erental *et al.*, 2008)。*A. oryzae* RIB40 株は白い菌核を形成することができ、成熟が可能な環境条件に置くと黒く褐変する(Fig. 0-2)。また、担子菌門の菌核も *S. sclerotirum* の菌核と同様に形成する(Kües, 2000)。菌核を形成する糸状菌は、菌核は栄養を貯蔵し、生存に必要な役割を担っていると考えられている。

また、*S. sclerotiorum* は有性生殖器官を菌核内に形成する(Bolton *et al.*, 2006)。*A. flavus* も同様に有性生殖器官を形成することができるが、菌核の内部に複数の子嚢果が形成され、内部に子嚢、子嚢胞子を含むことが観察されている(Fig. 0-3を参照; Horn *et al.*, 2009a)。形成された子嚢胞子には、環状の突起や内部に油滴をもつといった特徴が見られた (Horn *et al.*, 2009)。

一部の糸状菌における菌核は、栄養素の欠乏や乾燥、低温あるいは高温など菌糸体成長を阻害するような環境条件で形成される(Willetts and Bullock, 1992; Erental *et al.*, 2008)。植物病原菌である *Sclerotium rolsfii* では、温度、pH、酸化ストレス、光などに応答し菌核を形成する(Chet and Henis, 1971)。例えば、*S. rolsfii* において、室温で 2 日間培養の後、3-5°C の低温で 4 時間反応させると、菌核形成を促進することが報告されている(Carroll, 1991)。*A. flavus* においては、光照射条件下で菌核が形成されなくなる(Bennett *et al.*, 1978)。また、培地成分の炭素/窒素比が影響し、窒素源が少ないと形成は促進される(McAlpin and Wicklow, 2005; Agnihotri *et al.*, 1968, 1969)。また、植菌する分生子数が多すぎると菌核形

成数が減少することが *A. flavus* や *A. parasiticus* で報告されており、これにクオラムセンシング quorum sensing が関わっていることが考えられている(Brown *et al.*, 2008, 2009)。

糸状菌における菌核形成の分子機構

菌核形成における分子メカニズムについては、*A. flavus*、*A. parasiticus* と *S. sclerotiorum*、灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* でよく研究されている。植物病原性やカビ毒生産性に関連して、これらの糸状菌で菌核形成の解析が行われてきた。明らかになっている菌核形成に関与する因子を Table 0-1 に示す。このうちの主要なものについて以下に述べる。

A. flavus においては、光応答に関与している Velvet 複合体の構成因子 VelB が菌核形成を正に制御しており、分生子形成に必要な FluG が負に制御している(Chang *et al.*, 2013)。*A. parasiticus* において、Velvet 複合体の構成因子 VeA を欠損すると、菌核の形成が阻害される(Duran *et al.*, 2006)。また、*A. flavus* における二次代謝制御に関与するメチルトランスフェラーゼ LaeA (Chang *et al.*, 2013)の欠損すると菌核形成が抑制され、過剰発現すると菌核形成が促進されることが報告されている(Kale *et al.*, 2008; Amaike *et al.*, 2009)。

A. nidulans では、Oxylipin が分生子形成から有性生殖への切り替えに関与することが示唆された(Tsitsigiannis *et al.*, 2004)。Oxylipin 生成に関与するジオキシゲナーゼである PpoA、PpoB、PpoC は有性生殖にも関与している(Tsitsigiannis *et al.*, 2005)。*A. flavus* においては、*A. nidulans* のオーソログ PpoA、PpoB、PpoC とさらに PpoD が存在し、PpoA、PpoB、PpoD が菌核形成を正に、PpoC が負に制御している(Brown *et al.*, 2009)。リポオキシゲナーゼに関与する Lox の欠損では、PpoC の欠損と同様に菌核形成が促進された(Brown *et al.*, 2009)。

また、*A. nidulans* では、‘never in sexual development’ (NSD)関連転写因子である有性生殖初期に必要な NsdD がある(Han *et al.*, 2001)。*A. flavus* において NsdD オーソログを欠損すると、菌核が形成されなくなる(Cart *et al.*, 2012)。また、同じく有性生殖関連転写因子 NsdC を欠損すると、菌核形成が不全となる(Cart *et al.*, 2012)。

S. sclerotiorum において、菌核形成を正に制御している因子として Pac1、Ssp1、Ss-Caf1、Shk1、SsNox1、SsNox2 が報告されている(Rollins, 2003; Chen *et al.*, 2004; Li, 2009; Kim *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Duan *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2014)。Ssp1 は、菌核形成に関連因子として初期段階の形成に関与している(Li and Rollins, 2009)。*A. oryzae* においては、菌核形成時に *ssp1* オーソログである *sspA* 遺伝子の転写産物量が増加する(Jin *et al.*, 2011b)。

活性酸素種 ROS 生成に関与する NADPH oxidases (Nox)の SsNox1、SsNox2 が

菌核形成を正に制御しており、欠損させると菌核形成が認められなくなる(Kim *et al.*, 2011)。細胞透過性プローブである 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCHF-DA)を用いて、菌核形成時に ROS が生成されることが観察された(Kim *et al.*, 2011)。

B. cinerea では、*S. sclerotiorum* と同様に Nox 関連因子が正に制御している BcNoxA、BcNoxB、BcNoxD、BcNoxR が知られている(Siegmund *et al.*, 2012, 2015)。一方、酸化ストレスに応答する Mitogen-activated protein (MAP)キナーゼが菌核形成に関与しており、BcBmp1 や BcBmp3 欠損において、菌核形成が減少する(Dohlmann *et al.*, 2006; Rui and Hahn, 2007)。

A. oryzae では菌核を形成しないものが大部分であるが、ゲノム解読に用いられた野生株 RIB40 (Machida *et al.*, 2005)は菌核を形成する(Murakami, 1971)。*A. oryzae* では RIB40 株に由来した株で解析が行われ、菌核形成を正または負に促進する basic helix-loop-helix 型の転写因子 SclR と EcdR が見いだされた (Jin *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2011a; b)。また、オートファジー関連因子である AoAtg1 が菌核形成を正に制御していることが報告された(Yanagisawa *et al.*, 2012)。

本研究の目的

菌核は菌糸が分岐、融合、接着を繰り返して形成する耐久構造であり(Willetts and Bullock, 1992)、*A. parasiticus* や *A. flavus* では菌核内に有性生殖器官が形成される(Horn *et al.*, 2009a; b)。ヘテロタリックな有性生殖を行うと考えられている *A. oryzae* では、異なる接合型株どうしで菌糸融合を行い、融合体に由来する菌核を形成し、核の融合や減数分裂といった過程を経て有性胞子が形成されると予想される(Fig. 0-4)。したがって、*A. oryzae* の有性生殖を発見するためには、異なる接合型株間で菌糸融合を行った状態での菌核の形成が必須であると考えられる。

以前、当研究室の和田によって、栄養要求性と蛍光タンパク質をマーカーとして用いることで、*A. oryzae* において菌糸融合体によって形成される菌核を解析する実験系が確立された(Wada *et al.*, 2014)。また、当研究室の田中は、有性生殖関連遺伝子の過剰発現によって、菌核内部に形成された有性生殖器官様構造の観察に *A. oryzae* において初めて成功した(田中修士論文 2015)。これらは *sclR* を過剰発現(Wada *et al.*, 2014)もしくは *ecdR* を破壊する(田中修士論文 2015)ことで菌核形成を誘導したものだが、分生子形成が著しく悪化したことから産業での利用は困難だと考えられる。

そこで、分生子形成には影響せず、菌核形成に特異的に影響を及ぼす因子を利用することが望ましいと考えられる。しかし、*A. oryzae* をはじめとして糸状菌全体において、分生子形成や有性生殖に関与する遺伝子が数多く明らかにさ

れていることと比較して、菌核形成に関与する因子は多くがわかっていないと考えられる。菌核形成の分子メカニズムの全貌が解明されれば、*A. oryzae* で菌核形成能が低下もしくは失っている原因を特定することができ、その知見をもとに菌核形成を促進し、有性生殖が誘導できる可能性がある。菌核形成をしない大部分の *A. oryzae* 株において、有性生殖ができれば交配育種が可能となり、醸造や産業利用に大いに役立つと考えられる。

本研究では、*A. oryzae* において、菌核形成能を向上させることを目的として、菌核形成に関与する因子の探索およびその分子機構の解明を行い、それらの知見を利用して菌核形成の誘導を試みた。

Table 0-1. 報告されている菌核形成に関与する因子

Gene	Protein function	Effect	Species	Reference
<i>velB</i>	Light/dark response (Velvet complex)	Positive	<i>A. flavus</i>	Chang <i>et al.</i> , 2013
<i>fluG</i>	Conidiation-related protein	Negative	<i>A. flavus</i>	Chang <i>et al.</i> , 2013
<i>laeA</i>	Light/dark response (Velvet complex)	Positive	<i>A. flavus</i>	Chang <i>et al.</i> , 2013
<i>veA</i>	Light/dark response (Velvet complex)	Positive	<i>A. flavus</i> ; <i>A. parasiticus</i>	Duran <i>et al.</i> , 2006; Chang <i>et al.</i> , 2013
<i>ppoA</i>	Oxylipin-generating dioxygenases	Positive	<i>A. flavus</i>	Brown <i>et al.</i> , 2009
<i>ppoB</i>	Oxylipin-generating dioxygenases	Positive	<i>A. flavus</i>	Brown <i>et al.</i> , 2009
<i>ppoC</i>	Oxylipin-generating dioxygenases	Negative	<i>A. flavus</i>	Brown <i>et al.</i> , 2009
<i>ppoD</i>	Oxylipin-generating dioxygenases	Positive	<i>A. flavus</i>	Brown <i>et al.</i> , 2009
<i>lox</i>	Lipoxygenase	Negative	<i>A. flavus</i>	Brown <i>et al.</i> , 2009
<i>gprC</i>	G protein-coupled receptors	Negative	<i>A. flavus</i>	Affeldt <i>et al.</i> , 2012
<i>gprD</i>	G protein-coupled receptors	Negative	<i>A. flavus</i>	Affeldt <i>et al.</i> , 2012
<i>nsdC</i>	C2H2 zinc-finger transcription factor	Positive	<i>A. flavus</i>	Cary <i>et al.</i> , 2012
<i>nsdD</i>	GATA-type zinc-finger transcription factor	Positive	<i>A. flavus</i>	Cary <i>et al.</i> , 2012
<i>msnA</i>	C2H2 zinc-finger transcription factor	Positive	<i>A. flavus</i> ; <i>A. parasiticus</i>	Chang <i>et al.</i> , 2010
<i>crzA</i>	Calcineurin response zinc-finger protein	Positive	<i>A. parasiticus</i>	Chang, 2008
<i>afvB</i>	Polyketide synthases (PKS)	Positive	<i>A. flavus</i>	Cary <i>et al.</i> , 2015a
<i>lepE</i>	Zinc2-Cys6 transcription factor	Negative	<i>A. flavus</i>	Cary <i>et al.</i> , 2015b
<i>sclR</i>	bHLH transcription factor	Positive	<i>A. oryzae</i>	Jin <i>et al.</i> , 2009; 2011b
<i>ecdR</i>	bHLH transcription factor	Negative	<i>A. oryzae</i>	Jin <i>et al.</i> , 2011a
<i>Aoatg1</i>	Autophagy-related kinase	Positive	<i>A. oryzae</i>	Yanagisawa <i>et al.</i> , 2012
<i>pac1</i>	C2H2 zinc-finger transcription factor	Positive	<i>S. sclerotiorum</i>	Rollins, 2003
<i>ssp1</i>	Serine/ threonine-protein kinase	Positive	<i>S. sclerotiorum</i>	Li and Rollins, 2009
<i>Ss-caf1</i>	Secretory protein	Positive	<i>S. sclerotiorum</i>	Xiao <i>et al.</i> , 2014
<i>shk1</i>	Serine/threonine-protein kinase	Positive	<i>S. sclerotiorum</i>	Duan <i>et al.</i> , 2013
<i>smk1</i>	Mitogen-activated protein (MAP) kinase	Positive	<i>S. sclerotiorum</i>	Chen <i>et al.</i> , 2004
<i>Ss-ggt1</i>	γ -glutamyltranspeptidase	Positive	<i>S. sclerotiorum</i>	Li <i>et al.</i> , 2012
<i>Ssnox1</i>	NADPH oxidases (Nox)	Positive	<i>S. sclerotiorum</i>	Kim <i>et al.</i> , 2011
<i>Ssnox2</i>	NADPH oxidases (Nox)	Positive	<i>S. sclerotiorum</i>	Kim <i>et al.</i> , 2011
<i>BcnoxA</i>	NADPH oxidases (Nox)	Positive	<i>B. cinerea</i>	Siegmund <i>et al.</i> , 2012
<i>BcnoxB</i>	NADPH oxidases (Nox)	Positive	<i>B. cinerea</i>	Siegmund <i>et al.</i> , 2012
<i>BcnoxD</i>	NADPH oxidases (Nox)	Positive	<i>B. cinerea</i>	Siegmund <i>et al.</i> , 2015
<i>BcnoxR</i>	NADPH oxidases (Nox)	Positive	<i>B. cinerea</i>	Siegmund <i>et al.</i> , 2012
<i>Bclt1</i>	GATA-type zinc-finger transcription factor	Positive	<i>B. cinerea</i>	Schumacher <i>et al.</i> , 2014
<i>Bcg3</i>	Adenylate cyclase	Negative	<i>B. cinerea</i>	Dohlmann <i>et al.</i> , 2006
<i>Bcbmp1</i>	Mitogen-activated protein (MAP) kinase	Positive	<i>B. cinerea</i>	Dohlmann <i>et al.</i> , 2006
<i>Bcbmp3</i>	Mitogen-activated protein (MAP) kinase	Positive	<i>B. cinerea</i>	Rui and Hahn, 2007

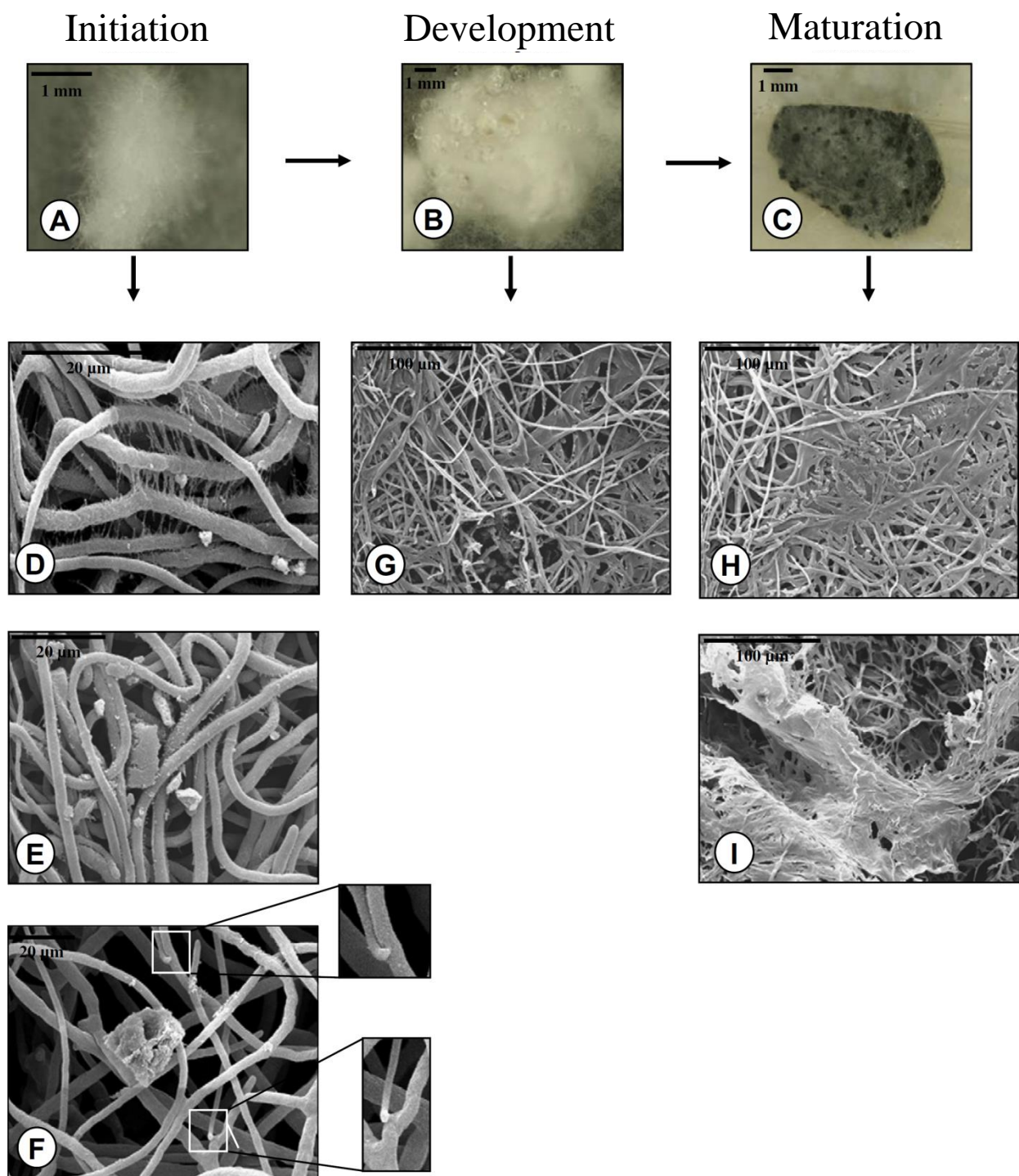


Fig. 0-1. *Sclerotium sclerotiorum*による菌核における形成過程

(A)初期形成 (B)分化 (C)成熟 (D-F) Aにおける形成段階の内部を走査型電子顕微鏡で観察した。(G) Bにおける形成段階の内部を走査型電子顕微鏡で観察した。(H-I) Cにおける形成段階の内部を走査型電子顕微鏡で観察した。

(Erental *et al.*, 2008)

(A)



(B)



(C)

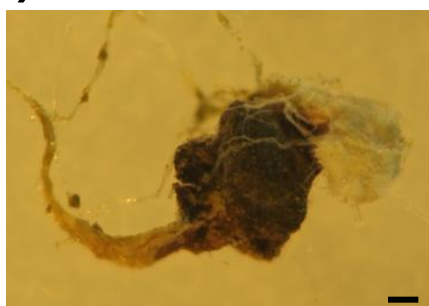


Fig. 0-2. *A. oryzae* RIB40に由来する株における菌核の形成過程

(A) 培地との接面に形成される菌核は頭部から徐々に黒く硬くなり形成される。(B) 菌糸先端に形成される白いふわふわした構造体。(C) 根のようなものでプレートにしっかり固定されている場合もある。Scale bars: 100 μm

(山本修士論文 2006)

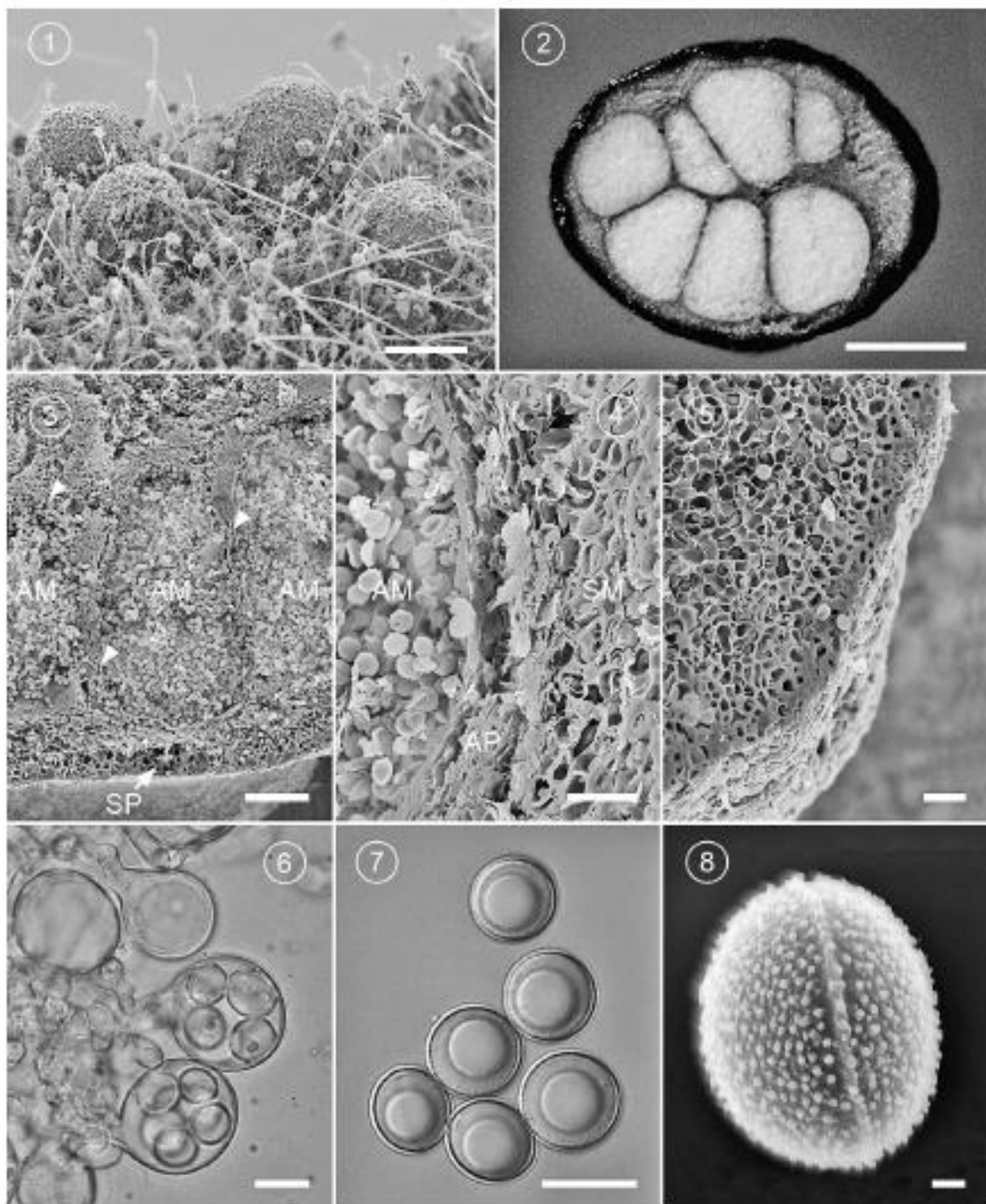


Fig. 0-3. *A. flavus* における有性生殖器官形成

(1) 培地上で形成される菌核(2) 子嚢果を7つ含む菌核の断面(3) 菌核内部構造の拡大図 子嚢果を3つ含むのが観察される。矢頭: 子嚢果壁; AM: 子嚢果内部; SM: 菌核内部(4) 子嚢果の殻壁 子嚢果内部には子嚢胞子が含まれている。AP: 子嚢果壁(5) 子嚢果外部の間質; (6) 子嚢胞子を含む子嚢(7) 油滴を含む子嚢胞子 (8) 子嚢胞子; 環状の隆線と突起状の構造に周囲を囲まれている Scale bars: 400 μ m (1, 2); 100 μ m (3); 20 μ m (4, 5); 10 μ m (6, 7); 1 μ m (8).

(Horn *et al.*, 2009)

無性生活環

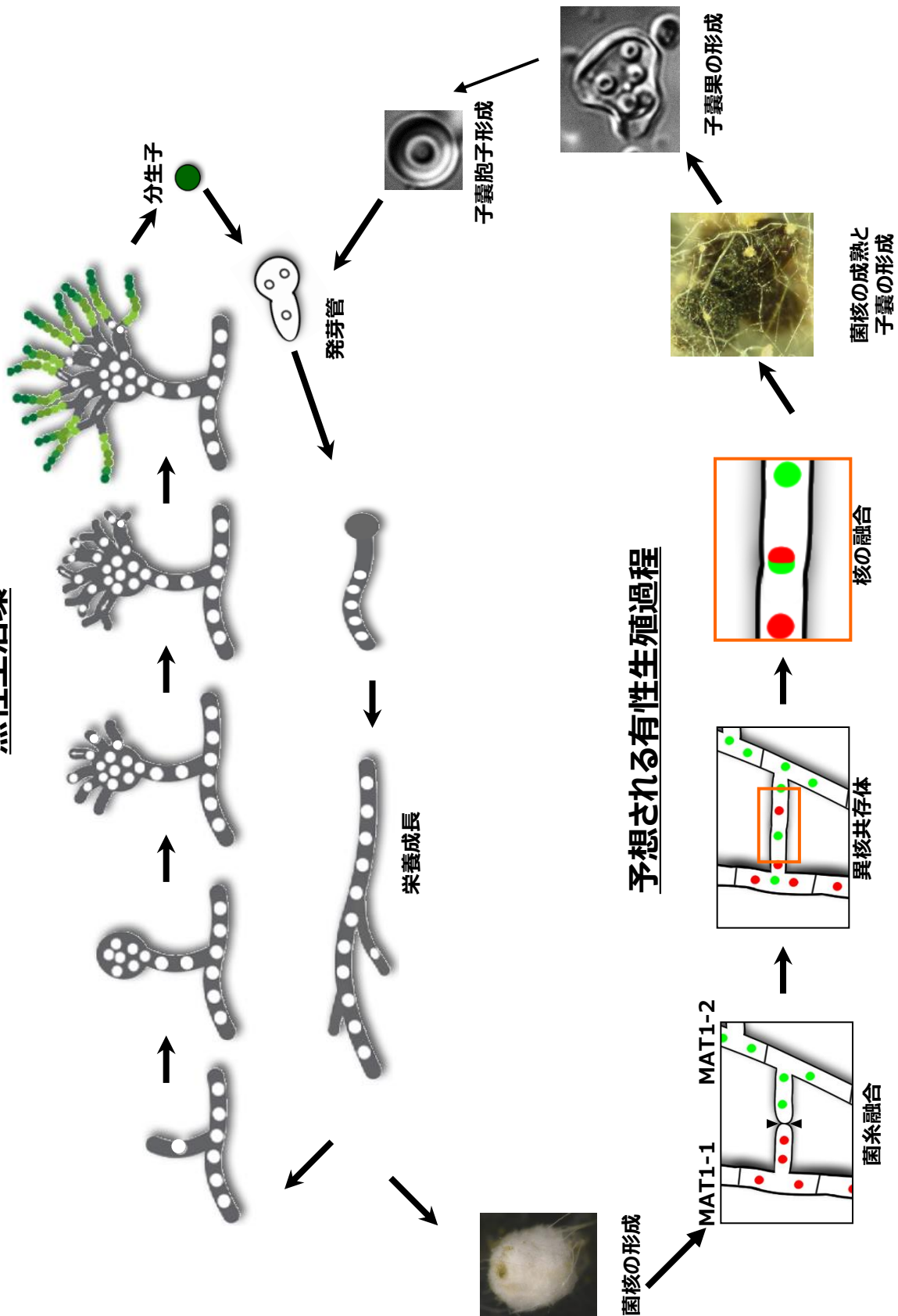


Fig. 0-4. *A. oryzae*の無性生活環と予想される有性生殖過程
(田中修士論文 改変 2015)

第一章

A. oryzae の分化における AoRim15 の機能解析

第一章の内容は学術雑誌に論文として出版する計画があるため公表できない。
5 年以内に出版予定。

以上よりインターネット公表できない。

第二章

A. oryzae の菌核形成に関与する転写因子の探索

第二章の内容は学術雑誌に論文として出版する計画があるため公表できない。
5 年以内に出版予定。

第二章の内容は野田産業科学研究所が所有している株の図や表を掲載していたが、インターネット公表に対する著作権者からの許諾が得られていないため公表できない。

第二章の内容は、共著論文として学術雑誌に掲載されており、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため公表できない。

以上よりインターネット公表できない。

第三章

菌核形成に関与する因子の機能解析

第三章の内容は学術雑誌に論文として出版する計画があるため公表できない。
5年以内に出版予定。

第三章の内容は野田産業科学研究所が所有している株の図や表を掲載していたが、インターネット公表に対する著作権者からの許諾が得られていないため公表できない。

第三章の内容は、共著論文として学術雑誌に掲載されており、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため公表できない。

以上よりインターネット公表できない。

第四章

A. oryzae の実用株における菌核形成の誘導

第四章の内容は学術雑誌に論文として出版する計画があるため公表できない。
5 年以内に出版予定。

第四章の内容は野田産業科学研究所が所有している株の図や表を掲載していたが、インターネット公表に対する著作権者からの許諾が得られていないため公表できない。

第四章の内容は、共著論文として学術雑誌に掲載されており、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため公表できない。

以上よりインターネット公表できない。

総括及び展望

総括及び展望の内容は学術雑誌に論文として出版する計画があるため公表できない。

5年以内に出版予定。

総括及び展望の内容は野田産業科学研究所が所有している株の図や表を掲載していたが、インターネット公表に対する著作権者からの許諾が得られていないため公表できない。

総括及び展望の内容は、共著論文として学術雑誌に掲載されており、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため公表できない。

以上よりインターネット公表できない。

実験材料と方法

使用菌株

大腸菌 *Escherichia coli*

大腸菌組換えプラスミドの取得には、*E. coli* DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (Φ 80 *lacZ* Δ *M15*) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) を用いた。

麹菌 *Aspergillus oryzae*

本研究で使用した *A. oryzae* 菌株一覧を Table A-1 から A-4 に示した。

使用培地

プレート用寒天培地には 1.5%、ME (Malt Extract) 培地は 2.0% Agar を加える。

[*E. coli* DH5 α 用]

LB 培地 : 1.0% Bacto tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1.0% NaCl (また、必要に応じて選択薬剤として、アンピシリンナトリウム(和光純薬) やカナマイシン硫酸塩(和光純薬) を終濃度 50 μ g/ml で用いる。)

SOC 培地 : 2.0% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose を混合後 0.20 μ m フィルターを用いて滅菌する。

[*A. oryzae* 用]

各株の栄養要求性にあわせて以下のものをそれぞれの培地に添加した。

ウリジン/ウラシル要求性; 0.5% Uridine + 0.2% Uracil

DPY 培地 : 2.0% Dextrin, 1.0% Polypeptone, 0.5% Yeast Extract, 0.5% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O

CD 培地: 0.3% NaNO₃, 0.2% KCl, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.002% FeSO₄ · 7H₂O, 2% Glucose, pH 5.5

CD + Met 培地 : CD 培地成分に 0.0015% Methionine を加える。

M 培地 : 0.2% NH₄Cl, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.05% KCl, 0.05% NaCl, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.002% FeSO₄ · 7H₂O, 2.0% Glucose, pH 5.5

M + Met 培地 : M 培地成分に 0.15% Methionine を加える。

PD 培地 : ポテトデキストロース寒天培地 (日水製薬) を使用法に従い作製する (39.0 g にポテト浸出液末 4.0 g, Glucose 20.0 g, Agar 15.0 g を含む)。

PD + UU 培地 : PD 培地成分に 0.5% Uridine + 0.2% Uracil を加える。

ME 培地 : 2.0% Malt Extract (BD Difco (株) Bacto™ Malt Extract), 2.0% Glucose, 0.1% Polypepton, pH 6.0

5-FOA+PDUU 培地

A 液 : 2 mg/ml 5-FOA (5-Fluoroorotic acid) 50 ml

B 液 : 2 × PD + 1.0% Uridine + 0.4% Uracil 培地 50 ml

B 液をオートクレーブする。55°C に加熱溶解した A 液を 0.45 μm の滅菌フィルターでろ過滅菌を行った後、B 液と混合する。プレートにまいて乾燥させて、パラフィルムで包む。保存および培養はアルミホイルで包んで遮光した状態で行った。

A. oryzae ゲノム DNA 抽出

1. *A. oryzae* の分生子または菌体を 20 ml の DPY 液体培地に植菌し、30°C で 18–24 時間振とう培養。
2. 菌体をミラクロス (CALBIOCHEM) を用いて回収し、蒸留水で洗う。
3. 湿菌体約 250 mg とメタルコーンを 3 ml 破砕チューブに入れ、液体窒素で凍結させ、Multi Beads Shocker (安井器械) を用いて 2000 rpm, 10 秒で 2 回破砕する。
4. 破砕した菌体を 600 μl の Sol I に懸濁後 60°C で 30–60 分インキュベートする。
5. 等量の PCI を加えよく混合した後、4°C、15,000 rpm で 5 分遠心。上層を回収後再び PCI 処理を行う。
6. 上層を回収後、等量の CI を加えよく混合した後、4°C、15,000 rpm で 5 分遠心。
7. 上層を回収後、エタノール沈殿 Sol を 1 ml 加えて 4°C、15,000 rpm で 10 分遠心。
8. アスピレーターでペレットを残し、5 分風乾後、400 μl の TE + RNase (20 mg/ml RNase A (Sigma)) を加え、37°C で 30 分インキュベート。
9. PCI, CI 処理、エタノール沈殿を行い、50 μl TE に溶解後、4°C で保存する。

Sol I : 50 mM EDTA (pH 8.0)、0.5 % SDS、0.1 mg/ml Proteinase K (Roche)

PCI : フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール (25 : 24 : 1)

CI : クロロホルム／イソアミルアルコール (24 : 1)

エタノール沈殿 Sol : 100 %エタノール／3 M 酢酸ナトリウム (25 : 1) , pH 5.2

TE : 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, pH 8.0 をオートクレーブ滅菌した後使用。

Total RNA の抽出

RNA 回収法

以下の RNA に関する実験は全て RNase Free の試薬や器具を用いて行った。

1. 20 ml DPY 培地に分生子または菌体を植菌し、30°C で 18 時間振盪培養した菌体を、ミラクロスで覆った漏斗で回収し、蒸留水で適度に洗浄する。
2. 菌体をろ紙等で挟み水分を取った後、湿重量約 150 mg の菌体とメタルコーンを 3 ml 破砕チューブに入れる。
3. 破砕チューブをアダプターに入れ、液体窒素で冷やす。
4. アダプターをサンプルホルダーにセットし、2000 rpm、10 秒で菌体を破砕する。

5. 菌体が破砕されたことを確認したらメタルコーンを取り出す。
6. 1.5 ml の ISOGEN (ニッポンジーン) を加え、ボルテックス。均質化し、室温で 5 分静置。
7. 上清を 1.2 ml 回収し、1.5 ml エッペンドルフチューブに移し、遠心($12000 \times g$, 4°C , 10 分)。
8. 上清を 1.0 ml 回収し、新しいエッペンチューブに移す。
9. 200 μl のクロロホルムを加え、ボルテックス(15 秒) して、室温で 2–3 分静置。
10. 遠心($12000 \times g$, 4°C , 15 分)。
11. 水層 (500 μl) を回収し、500 μl のイソプロパノールを加え、室温で 10 分静置。
12. 遠心($12000 \times g$, 4°C , 10 分)。
13. 上清を除き、1 ml の 70 %エタノールを加え、Vortex。
14. 遠心 ($7500 \times g$, 4°C , 5 分)。
15. 乾燥させ、50 μl の DEPC treated H_2O に溶かす。

RACE 解析

GeneRacerTM キット(Invitrogen) を用い、添付の説明書に沿って行う。RACE-PCR の鋳型には、RIB40 株を DPY 液体培地で 24 時間培養した菌体から抽出した RNA より作製したオリゴ付加 cDNA を用いる。RACE-PCR 後、Nested-PCR を行った産物をジーンクリーンして精製後へ TOPO[®] TA(Invitrogen)クローニングし、シーケンス解析を行う。

プラスミドの作製

本研究で使用したプラスミドは MultiSite GatewayTM Cloning system(Invitrogen)および In-Fusion[®] HD Cloning system(Clontech Laboratories)を用いて作製した(Table B)。プラスミド作製に用いたプライマーは Table C に示した。

本研究で使用したプラスミドのうち、pgAr15pG、pgAce2pG、pgCompr15、pgPaBr15、pgPaBa2、pgCompa2、pgPaBr15^{R128} は MultiSite GatewayTM Cloning system を用いて作製した。

1. pgAr15pG

Aorim15 遺伝子破壊用プラスミドの作製には *A. oryzae* RIB40 株のゲノム DNA を鋳型とし、*Aorim15* 遺伝子の ORF 領域上流 1.5 kb と 0.4 kb、下流 1.5 kb をそれぞれプライマー aB4-5r15_F と aB1r-5r15_R の組み合わせ、aB2-r15up_F と fr15up-r15down_R の組み合わせ、および fr15down-r15up_F と aB3-r15down_R の組み合わせの PCR により増幅させた。ここで増幅させた *Aorim15* 遺伝子の ORF 領域上流 1.5 kb の DNA 断片の増幅産物を 5' entry vector (pDONR P4-P1R) に BP 反応により挿入することで 5' entry clone

(pg5'upr15) を、*Aorim15* 遺伝子の ORF 領域上流 0.4 kb の DNA 断片の増幅産物と下流 1.5 kb の DNA 断片の増幅産物を fusion PCR によって結合させたものを 3' entry vector (pDONR P2R-P3) に BP 反応により挿入することで 3' entry clone (pg3'downr15) を作製した。さらに、5' entry clone (pg5'upr15)、3' entry clone (pg3'downr15)、center entry clone (pgEpG) と destination vector (pDEST R4-R3) を混合して LR 反応を行った。以上によって *Aorim15* 遺伝子破壊用プラスミド pgΔr15pG を作製した。

2. pgCompr15、pgPaBr15

RIB40 株のゲノム DNA を鋳型として、プライマー E' *Aorim15*ORF_F と E' *Aorim15*ORF_R を用いて、*Aorim15* ORF を PCR により増幅した。BP 反応を行い、pDONR 221 に *Aorim15* ORF を導入した pgE'Ar15 を作製した。pg5'upr15、pgE'Ar15、pg3'TaN と destination vector (pDEST R4-R3) を混合して LR 反応を行い、pgCompr15 を作製した。同様に pg5'PaB、pgE'Ar15、pg3'TaN と destination vector (pDEST R4-R3) を混合して LR 反応を行い、pgPaBr15 を作製した。

3. pgPaBr15^{RIB128}

RIB128 株のゲノム DNA を鋳型として、プライマー E' *Aorim15*ORF_F と E' *Aorim15*ORF_R を用いて、*Aorim15* ORF を PCR により増幅した。BP 反応を行い、pDONR 221 に *Aorim15* ORF を導入した pgE'Ar15^{RIB128} を作製した。pg5'PaB、pgE'Ar15^{RIB128}、pg3'TaN と destination vector (pDEST R4-R3) を混合して LR 反応を行い、pgPaBr15^{RIB128} を作製した。

4. pgΔace2pG

Aoace2 遺伝子破壊用プラスミドの作製には *A. oryzae* RIB40 株のゲノム DNA を鋳型とし、*Aoace2* 遺伝子の ORF 領域上流 1.5 kb と 0.3 kb、下流 1.5 kb をそれぞれプライマー aB4-5a2_F と aB1r-5a2_R の組み合わせ、aB2-a2up_F と fa2up-a2down_R の組み合わせ、および fa2down-a2up_F と aB3-a2down_R の組み合わせの PCR により DNA 断片を増幅させた。ここで増幅させた *Aoace2* 遺伝子の ORF 領域上流 1.5 kb の DNA 断片の増幅産物を 5' entry vector (pDONR P4-P1R) に BP 反応により挿入することで 5' entry clone (pg5'upace2) を、*Aoace2* 遺伝子の ORF 領域上流 0.3 kb の DNA 断片の増幅産物と下流 1.5 kb の DNA 断片の増幅産物を fusion PCR によって結合させたものを 3' entry vector (pDONR P2R-P3) に BP 反応により挿入することで 3' entry clone (pg3'downace2) を作製した。さらに、5' entry clone (pg5'upace2)、3' entry clone (pg3'downace2)、center entry clone (pgEpG) と destination vector (pDEST R4-R3) を混合して LR 反応を行った。以上によって、*Aoace2* 遺伝子破壊用プラスミド pgΔace2pG を作製した。

5. pgCompace2、pgPaBa2

RIB40 株のゲノム DNA を鋳型として、プライマー E' *Aoace2*ORF_F と E' *Aoace2*ORF_R を用いて、*Aoace2* ORF を PCR により増幅した。BP 反応を行い、pDONR 221 に *Aoace2* ORF を導入した pgE'Aa2 を作製した。pg5'upace2、pgE'Aoace2、pg3'TaN と destination

vector (pDEST R4-R3)をを混合して LR 反応を行い、pgCompace2 を作製した。同様に、pg5'PaB、pgE' Aoace2、pg3'TaN と destination vector (pDEST R4-R3)を混合して LR 反応を行い、pgPaBa2 を作製した。

本研究で使用したプラスミドのうち、pUtNAN、pUtNAa2N、pUNA-sR、pUNAFNcas9ID、pUC119Δpg、pUC119eRupdown、pUC119ΔeRpG、pUC19-784updown、pUC19-Δ784pG、pNRCp784 は In-Fusion® HD Cloning system を用いて作製した。

1. pUNA-sR

sclR 遺伝子のフォワードプライマー配列に pUNA の *SmaI* 切断部位の上流 15 bp を結合させたプライマーpUNA'sclRORF_F と、*sclR* 遺伝子のリバーズ側プライマーに pUNA *SmaI* 切断部位下流 15 bp を結合させたプライマーpUNA'sclRORF+TAA_R を設計し、*sclR* 遺伝子領域を増幅した。さらに、*amyB* プロモーターと *amyB* ターミネーター、*niaD* 形質転換マーカーを含んだプラスミド pUNA を *SmaI* で処理し、直鎖化した。In-Fusion® HD Cloning Kits (Clontech Laboratories)を用いて *sclR* 遺伝子領域を pUNA の *SmaI* 切断部位に挿入し、*sclR* 高発現プラスミド pUNA-sR を作製した。

2. pUtNAN

過剰発現用プラスミドの作製には *A. oryzae* RIB40 株のゲノム DNA を鋳型とし、*niaD* 遺伝子 1.8 kb をプライマーpUC19-*niaD3_F* と *niaD3-PaB_R* の組み合わせの PCR により増幅させた。また、プラスミド pUNA を鋳型とし、*amyB* プロモーター0.6 kb をプライマーPaB-*niaD3_F* と PaB-TaB_Rの組み合わせの PCR により増幅させた。さらに、*A. oryzae* RIB40 株のゲノム DNA を鋳型とし、*amyB* ターミネーター0.3 kb をプライマーTaB-PaB_F と TaB-*niaDd_R* の組み合わせの PCR により増幅させた。最後に、*A. oryzae* RIB40 株のゲノム DNA を鋳型とし、*niaD* 遺伝子の下流 1.6 kb をプライマー*niaDd-TaB_F* と pUC19nDAAnD_R の組み合わせの PCR により増幅させた。*niaD* 遺伝子 1.8 kb、*amyB* プロモーター0.6 kb、*amyB* ターミネーター0.3 kb と *niaD* 遺伝子の下流 1.6 kb をそれぞれプライマーpUC19-*niaD3_F* と pUC19nDAAnD_R の組み合わせの fusion PCR によって結合させた。In-Fusion® HD Cloning Kits (Clontech Laboratories) を用いて増幅した 4 断片を pUC19 Partial *Bam*HI 切断部位に挿入し、プラスミド pUtNAN を作製した。

3. pUtNAa2N

Aoace2 遺伝子のフォワードプライマー配列に pUtNAN の *SmaI* 切断部位の上流 15 bp を結合させたプライマーpUNA'Aoace2ORF_F と、*Aoace2* 遺伝子のリバーズ側プライマーに pUtNAN の *SmaI* 切断部位下流 15 bp を結合させたプライマー pUNA'Aoace2ORF+TGA_R を設計し、*Aoace2* 遺伝子領域を増幅した。さらに、*amyB* プロモーターと *amyB* ターミネーター、*niaD* 形質転換マーカーを含んだプラスミド pUtNAN を *SmaI* で処理し、直鎖化した。In-Fusion® HD Cloning Kits (Clontech Laboratories)を用いて *Aoace2* 遺伝子領域を pUtNAN の *SmaI* 切断部位に挿入し、pUtNAa2N

を作製した。

4. pUNAFNcas9ID

pUNA+U6p-F と U6p-ligD-R1 の組み合わせで、U6 プロモーター583 bp に *ligD* 標的配列 21 bp をまた、ligD-U6t-F1 と pUNA+U6p+gRNA+U6t-R3 の組み合わせで *ligD* 標的配列 21 bp と U6 ターミネーター229 bp を PCR にて DNA 断片を増幅させた。DNA 断片を pUNA+U6p-F と pUNA+U6p+gRNA+U6t-R3 の組み合わせで U6 プロモーター583 bp、*ligD* 標的配列 21 bp、U6 ターミネーター229 bp を fusion PCR によって結合させた。In-Fusion® HD Cloning Kits (Clontech Laboratories) を用いてプラスミド pUNAFNcas9 (Katayama *et al.*, 2015)の *XbaI* 切断部位に挿入し、*ligD* 標的配列用 *cas9* 発現プラスミド pUNAFNcas9ID を作製した。

5. pUC119Δpg

pyrG 遺伝子破壊用プラスミドの作製には *A. oryzae* RIB40 株のゲノム DNA を鋳型とし、*pyrG* 遺伝子の ORF 領域上流 1.5 kb、下流 1.5 kb をそれぞれプライマー pUC119pGup1530_F と pGdown1up20_R の組み合わせ、pGdup20own1_F と pUC119pGdown1457_R の組み合わせの PCR により増幅させた。ここで増幅させた *pyrG* 遺伝子の ORF 領域上流 1.5 kb の DNA 断片の増幅産物と下流 1.5 kb の DNA 断片をそれぞれプライマーpUC119pGup1530_F と pUC119pGdown1457_R の組み合わせで fusion PCR によって結合させた。pUC119 を *SmaI* で処理し、直鎖化した。In-Fusion® HD Cloning Kits (Clontech Laboratories) を用いて *pyrG* 遺伝子の ORF 領域上流 1.5 kb と下流 1.5 kb を pUC119 の *SmaI* 切断配列に挿入し、プラスミド pUC119ΔpG を作製した。

6. pUC119eRupdown、pUC119ΔeRpG

ecdR 遺伝子破壊用プラスミドの作製には *A. oryzae* RIB40 株の染色体 DNA を鋳型とし、*ecdR* 遺伝子の ORF 領域上流 0.4 kb と下流 1.5 kb をそれぞれプライマー pUC119-eRup354_F と feRup1-eRdown6_R の組み合わせ、feRdown6-eRup1_F と pUC119-eRdown1464_R の組み合わせの PCR により増幅させた。ここで増幅させた *ecdR* 遺伝子の ORF 領域上流 0.4 kb と下流 1.5 kb をそれぞれプライマーpUC119-eRup354_F と pUC119-eRdown1464_R の組み合わせで fusion PCR によって結合させた。また、pUC119 を *SmaI* で処理し、直鎖化した。In-Fusion® HD Cloning Kits (Clontech Laboratories)を用いて *ecdR* 遺伝子の ORF 領域上流 0.4 kb と下流 1.5 kb を pUC119 の *SmaI* 切断部位に挿入し、プラスミド pUC119eRupdown を作製した。

さらに、*ecdR* 遺伝子破壊用プラスミドの作製には *A. oryzae* RIB40 株のゲノム DNA を鋳型とし、*ecdR* 遺伝子の ORF 領域上流 1.5 kb をプライマーpUC119-eRup1467_F と feRup1-pG_Rv の組み合わせの PCR により DNA 断片を増幅させた。次に、エントリークローン pgEpG を鋳型とし、*pyrG* 遺伝子 2.0 kb をプライマーfpG-eRup1_Fw と feRdown6-pG_Rv の組み合わせの PCR により DNA 断片を増幅させた。また、プラスミド pUC119eRupdown を鋳型とし、*ecdR* 遺伝子 ORF 領域上流 0.4 kb と下流 1.5 kb をそれ

それぞれプライマーfeRud-pG_Fw と pUC119-eRdown1464_R の組み合わせで DNA 断片を増幅させた。増幅させたこれら 3 断片である *ecdR* 遺伝子の ORF 領域上流 1.5 kb、*pyrG* 遺伝子 2.0 kb、*ecdR* 遺伝子の ORF 領域上流 0.4 kb と下流 1.5 kb をそれぞれプライマー pUC119-eRup1467_F と pUC119-eRdown1464_R の組み合わせで fusion PCR によって結合させた。In-Fusion® HD Cloning Kits を用いて *ecdR* 遺伝子の ORF 領域上流 1.5 kb、*pyrG*、上流 0.4 kb と下流 1.5 kb を pUC119 の *Sma*I 切断部位に挿入し、プラスミド pUC119ΔeRpG を作製した。

7. pUC19-784updown、pUC19-Δ784pG

AO090010000784 遺伝子破壊用プラスミドの作製には *A. oryzae* RIB40 株の染色体 DNA を鋳型とし、同遺伝子の ORF 領域上流 0.4 kb と下流 1.5 kb をそれぞれプライマー pUC19-784up363_F と f784up1-784down1_R の組み合わせ、f784down1-784up1_F と pUC19-784down1538_R の組み合わせの PCR により増幅させた。ここで増幅させた同遺伝子の ORF 領域上流 0.4 kb と下流 1.5 kb をそれぞれプライマー pUC19-784up363_F と pUC19-784down1538_R の組み合わせで fusion PCR によって結合させた。また、pUC119 を *Sma*I で処理し、直鎖化した。In-Fusion® HD Cloning Kits を用いて AO090010000784 遺伝子の ORF 領域上流 0.4 kb と下流 1.5 kb を pUC19 Partial *Bam*HI 切断部位に挿入し、プラスミド pUC19-784updown を作製した。

さらに、AO090010000784 遺伝子破壊用プラスミドの作製には *A. oryzae* RIB40 株のゲノム DNA を鋳型とし、同遺伝子の ORF 領域上流 1.5 kb をプライマー pUC19-784up1490_F と fpG-784up1_Rv の組み合わせの PCR により DNA 断片を増幅させた。次に、エントリークローン pgEpG を鋳型とし、*pyrG* 遺伝子 2.0 kb をプライマー f784up1-pG_Fw と f784ud-pG_Rv の組み合わせの PCR により DNA 断片を増幅させた。また、プラスミド pUC19-784updown を鋳型とし、同遺伝子 ORF 領域上流 0.4 kb と下流 1.5 kb をそれぞれプライマー fpG-784ud_Fw と pUC19-784down1538_R の組み合わせで DNA 断片を増幅させた。増幅させたこれら 3 断片である同遺伝子の ORF 領域上流 1.5 kb、*pyrG* 遺伝子 2.0 kb、AO090010000784 遺伝子の ORF 領域上流 0.4 kb と下流 1.5 kb をそれぞれプライマー pUC19-784up1490_F と pUC19-784down1538_R の組み合わせで fusion PCR によって結合させた。In-Fusion® HD Cloning Kits を用いて AO090010000784 遺伝子の ORF 領域上流 1.5 kb、*pyrG*、上流 0.4 kb と下流 1.5 kb を pUC19 Partial *Bam*HI 切断部位に挿入し、プラスミド pUC19-Δ784pG を作製した。

8. pNRCp784

AO090010000784 遺伝子相補プラスミドの作製には *A. oryzae* RIB40 株のゲノム DNA を鋳型とし、同遺伝子の ORF 領域上流 0.4 kb と ORF 2.1 kb と下流 0.2 kb をプライマー p10-sIAO784up363_F と p10-sIAO784down198_R の組み合わせで PCR により増幅させた。pNR10 を *Sma*I で処理し、直鎖化した。In-Fusion® HD Cloning Kits を用いて AO090010000784 遺伝子の ORF 領域上流 0.4 kb と ORF 2.1 kb と下流 0.2 kb を pNR10 の

*Sma*I 切断配列に挿入し、プラスミド pNRCp784 を作製した。

大腸菌プラスミド DNA の調製は、アルカリ SDS 法もしくは Promega 社のキット (Cat. No. A1222) を用い、形質転換は Hanahan, 1983 の方法を改変して行った。

組換えタンパク質生産のための DH5 α 株のコンピテントセルの作製は以下のようにして行った。

1. シングルコロニーを LB 液体培地 10 ml に植菌し、37°C、振とう速度 250 rpm で OD₆₀₀ = 0.4–0.5 になるまで 3–6 時間培養。
2. 細胞を 4 °C、2,500 \times g で 15 分遠心して集め、1/10 量 (1 ml) の冷 TSS バッファーに再溶解。調製したコンピテントセルは 2–3 時間以内に形質転換に用いた。

TSS (Transformation and storage solution) バッファー :

1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 0.5% NaCl, 10% Polyethylene Glycol (MW 3350) , 5% DMSO, 50 mM MgCl₂, pH 6.5, 0.45 μ m フィルター滅菌。

DNA シークエンスは、ファスマック社による受託シークエンスを利用した。

PCR 法

本研究で用いたクローニング用のプライマーは Table C に示した。反応液の組成は polymerase に添付の説明書に従った。

Prime STAR (TaKaRa) を用いた PCR (クローニング用) :

98°C 2 分、{98°C 10 秒、(アニーリング温度: 55°C) 5 秒、72°C 1 kb /分; 30 サイクル}

Ex-Taq (TaKaRa) を用いた PCR (*E. coli* コロニーPCR 用) :

94°C 5 分、{94°C 30 秒、(アニーリング温度: 54°C) 30 秒、72°C 1 kb /分; 30 サイクル}

KOD FX NEO (TOYOBO) を用いた PCR (*A. oryzae* コロニーPCR 用) :

94°C 2 分、{98°C 10 秒、(アニーリング温度: 60°C) 30 秒、68°C 1 kb /分; 35 サイクル}

鋳型には、100 μ l TE に菌体を 1 白金耳懸濁した溶液 2 μ l (20 μ l スケール) を用いた。

A. oryzae の分生子回収

1. 分生子を形成したプレートに、10 ml の 0.01% Tween 80 を添加し滅菌スポイト (Transfer-pipette 3.5 ml, SARSTEDT) の先で分生子を懸濁し 15 ml 遠心チューブに回収する。
2. 30 秒間ボルテックスし分生子を分散させた後、ミラクロスで菌体残渣を濾過する。
3. 3,500 rpm で 5 分間遠心し上清を捨て、5 ml の 0.01% Tween 80 を加えボルテックスし分生子を懸濁させた後 3,500 rpm で 5 分間遠心する。
4. 上清を捨て、1 ml の滅菌水を加え懸濁させ、それを 4°C にて保存する。

A. *oryzae* の形質転換法

PEG 法

プロトプラストに負荷を与えないよう、全遠心操作をブレーキオフの設定で行う。

1. 100 ml DPY 液体培地に親株の分生子または菌体を適量植菌し、30°C で 18-24 時間振とう培養する。
2. ミラクロスを用いて菌体を回収し、滅菌水で菌体を洗浄後、あらかじめ 0.45 µm フィルターで滅菌した 10 ml TF Sol I に菌体を加え、30°C で 3 時間、50 rpm で振とう培養する。
3. ミラクロスを用いて菌体残渣を除いたプロトプラスト溶液に 10 ml の TF Sol II を加え、室温で 2,000 rpm、8 分間遠心する。
4. 上清を除き、5 ml の TF Sol II に再懸濁し、室温で 2,000 rpm、8 分間遠心する。
5. 上清を除き、5 ml の TF Sol II に再懸濁した後、トーマの血球計数版を用いてプロトプラストの数をカウントし、室温で 2,000 rpm、8 分間遠心する。
6. 上清を除き、プロトプラスト数が $1.0\text{--}5.0 \times 10^7$ になるように TF Sol II に再懸濁した溶液 200 µl に形質転換用 DNA を 10 µl (1-5 µg/10 µl となるようにあらかじめ準備しておく) 加え、氷上で 30 分静置する。
7. この間に 5 ml Top Agar を 15 ml チューブに分注し 47 °C で溶解させておく。
8. 250, 250, 850 µl と 3 回に分けて TF Sol III を加える。加えるたびに滅菌スポイトを用いてよくピペッティングする。20 分静置する。
9. 5 ml の TF Sol II を加え転倒混和し、室温で 2,000 rpm、8 分間遠心する。
10. 上清を除き、500 µl の TF Sol II に懸濁したものをあらかじめ準備しておいた Top Agar に加え穏やかに混合後、下層培地に重層する。
11. 30°C で培養し、生えてきたコロニーを選択培地に 2-3 回植え継ぎ、形質転換体を取得する。

TF Sol I : 0.1% Yatalase, 0.6 M (NH₄)₂SO₄, 50 mM Maleate buffer (pH 5.5)

TF Sol II : 1.2 M Sorbitol, 50 mM CaCl₂, 35 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

TF Sol III : 60 % PEG (Polyethylene glycol) 4000, 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

Top Agar : 1.2 M Sorbitol, 0.8% Agar を含む各種選択培地

下層培地 : 1.2 M Sorbitol, 2.0% Agar を含む各種選択培地

サザンブロッティング (原則として GE Healthcare 社の試薬を用いた)

1. ゲノムを 1 晩制限酵素処理する。
2. コントロールと目的の株のゲノム DNA 制限酵素処理液の一部 10 µl ほど電気泳動し、制限酵素で切れているか及び濃度をチェックする。
3. コントロールと濃度をあわせ、電気泳動を行う。

4. MQ 水で洗った後、泳動後のゲルを変性溶液 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) 中で 25 分振とうする。
5. 変性溶液を捨て、ゲルを MQ 水で洗った後、中和溶液 (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5)) 中で 30 分振とうする。
6. ゲルを Hybond-N⁺メンブレンに転写する。転写用器具中で白色多孔質板を 20 × SSC に浸す。そこに下から順に、ろ紙、裏返しにしたゲル、メンブレン、ろ紙 3 枚、ペーパータオル、アクリル板、重りを重ねる。この状態で 4 時間静置する。
7. メンブレンを 6 × SSC で洗い、80°C で 1 時間メンブレンを乾燥する。
8. ハイブリバッグにメンブレンとハイブリバッファーを入れて封じ、55°C で 15 分振とうする。
9. DNA プローブを作製する。Cross-linker (黒) 溶液 2 μl を MQ で 10 μl に希釈。Gene clean を行った 10 ng/μl の DNA 断片の溶液 10 μl を 5 分煮沸、その後氷上で 5 分間静置。DNA 溶液に 10 μl の Reaction buffer を加え緩やかにピペッティング。その後 Labelling reagent 2 μl を加え、ピペッティング。その後 10 μl の Cross-linker 希釈溶液を加え、再度ピペッティングし、37°C で 30 分インキュベート。
10. DNA プローブにハイブリバッファーを 1 ml 混合し、ハイブリバッグに注入し 55°C で 8 時間以上インキュベートする。
11. ハイブリバッグからメンブレンを取り出し、新しいハイブリバッグにメンブレンを入れ、Primary wash buffer を注ぎ 55°C で 20 分インキュベートする。
12. メンブレンを取り出し、Secondary wash buffer (20 × stock 5 ml に 2 μl 1.0 M MgCl₂ を加え 100 ml に希釈) を用いて wash (50 ml で 5 分振とう) を 2 回行う。
13. メンブレンをキムタオルに乗せ、余分な水分を落とす。メンブレンに CDP Star Reagent をかけ、2–5 分放置
14. Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System (GE Healthcare) を用いて、ルミノイメージアナライザーLAS-4000miniEPUV (FUJIFILM) で検出する。

20 × SSC : NaCl 175.3 g, クエン酸ナトリウム二水和物 88.2 g/L

ハイブリバッファー : Blocking reagent 0.6 g, NaCl 0.43 g, Gold hybridization buffer 15 ml

Primary wash buffer : Urea 6 g, SDS 0.05 g, 0.5 M Na phosphate pH 7.0 5 ml, NaCl 0.435 g, 1.0 M MgCl₂ 50 μL, Blocking reagent 0.1 g, /50 ml

Secondary wash buffer (20 × stock) : Tris base 121 g, NaCl 112 g, /1 L pH 10.0

顕微鏡使用機器

共焦点レーザー顕微鏡観察には、倒立型顕微鏡 IX71 (Olympus)、対物レンズ UplanApo 100× (Olympus)、CSU22 (confocal scanner unit) (YOKOGAWA)、冷却 CCD カメラ (Andor) を用いた。解析ソフトウェアには Andor IQ (Andor) を用いた。

顕微鏡観察法

共焦点レーザー顕微鏡観察：

ガラスベースディッシュ(IWAKI)に 100 μl の液体培地をのせ、そこに分生子を 10^4 個植菌し、 30°C で培養後観察する。

分生子ストレス耐性試験

酸化ストレス

使用菌株を PD 培地で 4-7 日間培養し、分生子を回収する。分生子数を 10^3 個/ $100 \mu\text{l}$ になるよう滅菌水で調整した。最終濃度 0-400 mM の過酸化水素で分生子を 30°C で 30 分反応させ、2 回滅菌水で洗浄後、100 μl の滅菌水で懸濁させた。分生子懸濁液 10^2 個/ $10 \mu\text{l}$ を 0.25% Triton X-100 を含む CD + Met 寒天培地に塗布した。 30°C で 3 日間培養後、コロニー数を計数する。

熱ストレス

使用菌株を PD 培地で 4-7 日間培養し、分生子を回収する。分生子数を 10^3 個/ $100 \mu\text{l}$ になるよう滅菌水で調整した。分生子を 50°C で 0-60 分反応させ、すぐに分生子懸濁液 10^2 個/ $10 \mu\text{l}$ を 0.25% Triton X-100 を含む CD + Met 寒天培地に塗布した。 30°C で 3 日間培養後、コロニー数を計数する。

菌核数の定量化

5×10^4 個/ $5 \mu\text{l}$ の分生子懸濁液を ME 寒天培地にスポットし、暗所条件で 30°C 、5 日間培養する。寒天培地の裏側から見える白い菌核を計数する。

Table A-1. Strains used in Chapter 1

Strain	Host strain	Genotype	References
NSPID1	NSR-ΔID2	<i>niaD⁻ sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA</i>	Maruyama <i>et al.</i> , 2008
NSID1	NSPID1	<i>niaD⁻ sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA pgEpG[pyrG]</i>	Yoon <i>et al.</i> , 2010
NSIDΔr15-1	NSPID1	<i>niaD⁻ sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA ΔAorim15::pyrG</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 2015
NSIDΔr15-4	NSPID1	<i>niaD⁻ sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA ΔAorim15::pyrG</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 2015
SID1	NSID1	<i>niaD⁻ sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA pgEpG[pyrG] pNR10[niaD]</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 2015
ΔAorim15	NSIDΔr15-1	<i>niaD⁻ sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA ΔAorim15::pyrG pNR10[niaD]</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 2015
OE-Aorim15	NSID1	<i>niaD⁻ ::pgPaBr15[P-amyB::Aorim15::T-amyB::niaD] sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA pgEpG[pyrG]</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 2015
Comp-Aorim15	NSIDΔr15-1	<i>niaD⁻ ::pgCompr15[P-Aorim15::Aorim15::T-amyB::niaD] sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA ΔAorim15::pyrG</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 2015

Table A-2. Strains used in Chapter 2

Strain	Host strain	Genotype	References
RkuN16ptrA/P	RKuN16ptr1	<i>Δku70::xptrA pyrG⁺</i>	Ogawa <i>et al.</i> , 2012
RkuptrP2-1ΔAF/P	RkuptrP2-1ΔAF	<i>Δku70::xptrA ΔcypX-pksA pyrG⁺</i>	Ogawa <i>et al.</i> , 2012
BR-TF001~BR-TFDH902	RkuptrP2-1ΔAF	Transcription factor gene deletion library (Total 352 strains)	

Table A-3. Strains used in Chapter 3

Strain	Host strain	Genotype	References
NSPID1	NSR-ΔID2	<i>niaD⁻ sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA</i>	Maruyama <i>et al.</i> , 2008
NSID1	NSPID1	<i>niaD⁻ sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA pgEpG[pyrG]</i>	Yoon <i>et al.</i> , 2010
SID1	NSID1	<i>niaD⁻ sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA pgEpG[pyrG] pNR10[niaD]</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 2015
NSIDΔace2-1	NSPID1	<i>niaD⁻ sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA ΔAoace2::pyrG</i>	This study
SID-ΔAoace2	NSIDΔace2-1	<i>niaD⁻ sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA ΔAoace2::pyrG pNR10[niaD]</i>	This study
SID-OEAoace2	NSID1	<i>niaD⁻ sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA pgEpG[pyrG] pgPaBace2[P-amyB::Aoace2::T-amyB::niaD]</i>	This study
SIDa2-OEAoace2	NSIDΔace2-1	<i>niaD⁻ sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA ΔAoace2::pyrG pgPaBace2[P-amyB::Aoace2::T-amyB::niaD]</i>	This study
Comp-Aoace2	NSIDΔace2-1	<i>niaD⁻ ::pgCompace2[P-Aoace2::Aoace2::T-amyB::niaD] sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA ΔAoace2::pyrG</i>	This study
SID-UTAoace2	NSID1	<i>sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA pgEpG[pyrG] P-amyB::Aoace2::T-amyB::niaD</i>	This study
NSID-Δ784-1	NSPID1	<i>niaD⁻ sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA ΔAO090010000784::pyrG</i>	This study
SID-Δ784	NSID-Δ784-1	<i>niaD⁻ sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA ΔAO090010000784::pyrG pNR10[niaD]</i>	This study
Comp-Ao784	NSID-Δ784-1	<i>niaD⁻ sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA ΔligD::argB ΔpyrG::adeA ΔAO090010000784::pyrG pNRCp784[P-AO090010000784-T::niaD]</i>	This study

Table A-4. Strains used in Chapter 4

Strain	Host strain	Genotype	References
niaD300		<i>niaD</i> ⁻	Minetoki <i>et al.</i> , 1996
RIB40		Wild strain (=ATCC42149)	Machida <i>et al.</i> , 2005
RIB128		Wild strain	NRIB
RIB915		Wild strain	NRIB
RIBOIS01		Wild strain	NRIB
RIB40Δn	RIB40	<i>niaD</i> ⁻	岡部, 修士論文2016
RIB128Δn	RIB128	<i>niaD</i> ⁻	岡部, 修士論文2016
RIB915Δn	RIB915	<i>niaD</i> ⁻	岡部, 修士論文2016
RIBOIS01-n	RIBOIS01	<i>niaD</i> ⁻	岡部, 修士論文2016
Δ <i>Aorim15</i>	NSIDΔr15-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>argB</i> :: <i>adeA</i> Δ <i>ligD</i> :: <i>argB</i> Δ <i>pyrG</i> :: <i>adeA</i> Δ <i>Aorim15</i> :: <i>pyrG</i> pNR10[<i>niaD</i>]	This study
SID1	NSID1	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>argB</i> :: <i>adeA</i> Δ <i>ligD</i> :: <i>argB</i> Δ <i>pyrG</i> :: <i>adeA</i> pgEpG[<i>pyrG</i>] pNR10[<i>niaD</i>]	This study
SIDr15-PaBr15	NSIDΔr15-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>argB</i> :: <i>adeA</i> Δ <i>ligD</i> :: <i>argB</i> Δ <i>pyrG</i> :: <i>adeA</i> pgEpG[<i>pyrG</i>] pgPaBr15[P- <i>amyB</i> :: <i>Aorim15</i> ::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>]	This study
SIDr15-PaBr15 ^{R128}	NSIDΔr15-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>argB</i> :: <i>adeA</i> Δ <i>ligD</i> :: <i>argB</i> Δ <i>pyrG</i> :: <i>adeA</i> pgEpG[<i>pyrG</i>] pgPaBr15 ^{RIB128} [P- <i>amyB</i> :: <i>Aorim15</i> ^{RIB128} ::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>]	This study
RIB128-r15-1	RIB128Δn	<i>niaD</i> ⁻ pgPaBr15[P- <i>amyB</i> :: <i>Aorim15</i> ::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>]	This study
RIB128sR-1	RIB128Δn	<i>niaD</i> ⁻ pUNAsR[P- <i>amyB</i> :: <i>sclR</i> ::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>]	This study
niaD300gC9ID-1	niaD300	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>]	This study
RIB40gC9ID-1	RIB40Δn	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>]	This study
RIB128gC9ID-1	RIB128Δn	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>]	This study
RIB915gC9ID-1	RIB915Δn	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>]	This study
RIBOIS01gC9ID-1	RIBOIS01-n	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>]	This study
RIB40gC9PID-1	RIB40gC9ID-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>] Δ <i>pyrG</i>	This study
RIB128gC9PID-1	RIB128gC9ID-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>] Δ <i>pyrG</i>	This study
RIB915gC9PID-1	RIB915gC9ID-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>] Δ <i>pyrG</i>	This study
RIBOIS01gC9PID-1	RIBOIS01gC9ID-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>] Δ <i>pyrG</i>	This study
RIB40gC9ID-P	RIB40gC9PID-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>] Δ <i>pyrG</i> pgEpG[<i>pyrG</i>]	This study
RIB128gC9ID-P	RIB128gC9PID-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>] Δ <i>pyrG</i> pgEpG[<i>pyrG</i>]	This study
RIB915gC9ID-P	RIB915gC9PID-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>] Δ <i>pyrG</i> pgEpG[<i>pyrG</i>]	This study
RIBOIS01gC9ID-P	RIBOIS01gC9PID-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>] Δ <i>pyrG</i> pgEpG[<i>pyrG</i>]	This study
RIB40gC9IDa2	RIB40gC9PID-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>] Δ <i>pyrG</i> Δ <i>Aoace2</i> :: <i>pyrG</i>	This study
RIB128gC9IDa2	RIB128gC9PID-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>] Δ <i>pyrG</i> Δ <i>Aoace2</i> :: <i>pyrG</i>	This study
RIB915gC9IDa2	RIB915gC9PID-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>] Δ <i>pyrG</i> Δ <i>Aoace2</i> :: <i>pyrG</i>	This study
RIBOIS01gC9IDa2	RIBOIS01gC9PID-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>] Δ <i>pyrG</i> Δ <i>Aoace2</i> :: <i>pyrG</i>	This study
RIB40gC9IDeR	RIB40gC9PID-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>] Δ <i>pyrG</i> Δ <i>ecdR</i> :: <i>pyrG</i>	This study
RIB128gC9IDeR	RIB128gC9PID-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>] Δ <i>pyrG</i> Δ <i>ecdR</i> :: <i>pyrG</i>	This study
RIB915gC9IDeR	RIB915gC9PID-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>] Δ <i>pyrG</i> Δ <i>ecdR</i> :: <i>pyrG</i>	This study
RIBOIS01gC9IDeR	RIBOIS01gC9PID-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>ligD</i> ⁻ pUNAFNCas9ID[P- <i>amyB</i> ::gCas9ID::T- <i>amyB</i> :: <i>niaD</i>] Δ <i>pyrG</i> Δ <i>ecdR</i> :: <i>pyrG</i>	This study

Table B. Plasmid list

Plasmid name	Selection Marker	Description	Source or Reference
pNR10	<i>niaD</i>	<i>niaD</i>	Punt <i>et al.</i> , 1992; de Bekker <i>et al.</i> , 2009
pUNA	<i>niaD</i>	<i>P-amyB :: T-amyB :: niaD</i>	Yamada <i>et al.</i> , 1999
pgPaBr15	<i>niaD</i>	<i>P-amyB :: Aorim15 :: T-amyB :: niaD</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 2015
pgCompr15	<i>niaD</i>	<i>P-Aorim15 :: Aorim15 :: T-amyB :: niaD</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 2015
pgΔr15pG	<i>pyrG</i>	For <i>Aorim15</i> deletion	Nakamura <i>et al.</i> , 2015
pgΔace2pg	<i>pyrG</i>	For <i>Aoace2</i> deletion	This study
pgCompAce2	<i>niaD</i>	<i>P-Aoace2 :: Aoace2 :: T-amyB :: niaD</i>	This study
pgPaBAce2	<i>niaD</i>	<i>P-amyB :: Aoace2 :: T-amyB :: niaD</i>	This study
pUtNAN	<i>niaD</i>	3' end of <i>niaD</i> :: <i>P-amyB :: T-amyB :: Downstream of niaD</i>	This study
pUtNAa2N	<i>niaD</i>	3' end of <i>niaD</i> :: <i>P-amyB :: Aoace2 :: T-amyB :: Downstream of niaD</i>	This study
pUC19-Δ784pG	<i>pyrG</i>	For AO090010000784 deletion	This study
pNRCp-784	<i>niaD</i>	<i>P-AO090010000784-T :: niaD</i>	This study
pUNA-sR	<i>niaD</i>	<i>P-amyB :: sclR :: T-amyB :: niaD</i>	This study
pgPaBr15 ^{RIB128}	<i>niaD</i>	<i>P-amyB :: Aorim15^{RIB128} :: T-amyB :: niaD</i>	This study
pUC119Δpg	<i>ΔpyrG</i>	For <i>pyrG</i> deletion	This study
pUC119ΔeRpG	<i>pyrG</i>	For <i>ecdR</i> deletion	This study
pUNAFNcas9	<i>niaD</i>	CRISPR/Cas9	Katayama <i>et al.</i> , 2015
pUNAFNcas9ID	<i>niaD</i>	For <i>ligD</i> mutation	This study

Entry clone	Plasmid	Description	Source or Reference
pg5upr15	pgΔr15pG	5' entry clone; Upstream of <i>Aorim15</i> (1.5 kb)	Nakamura <i>et al.</i> , 2015
pg3downr15	pgΔr15pG	3' entry clone; Upstream of <i>Aorim15</i> (0.4 kb); Downstream of <i>Aorim15</i> (1.5 kb)	Nakamura <i>et al.</i> , 2015
pgEpG	pgΔr15pG, pgΔace2pg	Center entry clone; <i>pyrG</i>	Maruyama <i>et al.</i> , 2008
pg5PaB	pgPaBr15, pgPaBAce2, pgPaBr15 ^{R128}	5' entry clone; <i>P-amyB</i>	Mabashi <i>et al.</i> , 2006
pgE/Ar15	pgPaBr15	Center entry clone; <i>Aorim15</i> ORF (6.3 kb)	Nakamura <i>et al.</i> , 2015
pg3TaN	pgPaBr15, pgPaBAce2, pgPaBr15 ^{R128}	3' entry clone; <i>T-amyB</i> and <i>niaD</i>	Mabashi <i>et al.</i> , 2006
pg5upace2	pgΔace2pg	5' entry clone; Upstream of <i>Aoace2</i> (1.5 kb)	This study
pgE/Aoace2	pgPaBAce2	Center entry clone; <i>Aoace2</i> ORF (6.3 kb)	This study
pg3downa2	pgΔace2pg	3' entry clone; downstream of <i>Aoace2</i> (1.5 kb)	This study
pgE/Ar15 ^{RIB128}	pgPaBr15 ^{RIB128}	Center entry clone; <i>Aorim15^{RIB128}</i> ORF (6.3 kb)	This study

Table C. Primer list

Primer name	Sequence (5'-3')	Description
GeneRacer TM 5'Primer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	5'RACE
Aorim15_5'RACE-R	TACTGGGTTGGGAGCAGGATGCTTAG	5'RACE
GeneRacer TM 5' Nested Primer	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA	5'RACE Nested
Aorim15_5'RACE-R-n	CCGCTTCTGCCAAGGTCGTCAAATAA	5'RACE Nested
GeneRacer TM 3'Primer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG	3'RACE
Aorim15_3'RACE-F	TCAGACCCTGCGCCTCTACTG	3'RACE
GeneRacer TM 3' Nested Primer	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG	3'RACE Nested
Aorim15_3'RACE-F-n	GCTCTAGTGAAGCAATTCCGCGCC	3'RACE Nested
Aorim15-F(540)	AATTATGGCGTACGACCGGA	<i>Aorim15</i> DNA sequence
Aorim15-F(1085)	CGGGGTCCGTTTCTAATTCT	<i>Aorim15</i> DNA sequence
Aorim15-F(1620)	CATAGTTACTGGCCCTATCC	<i>Aorim15</i> DNA sequence
Aorim15-F(2165)	ATCATTTCCGCCACCATCTGT	<i>Aorim15</i> DNA sequence
Aorim15-F(2721)	TTTGGCTTGTCTCGGATGG	<i>Aorim15</i> DNA sequence
Aorim15-F(3725)	TTGTGGGCACTCCAGATTAC	<i>Aorim15</i> DNA sequence
Aorim15-F(3814)	AATGCAATCGAAGCGACCCCTT	<i>Aorim15</i> DNA sequence
Aorim15-F(4369)	GCTCGTATGGCAAGCCTAAA	<i>Aorim15</i> DNA sequence
Aorim15-F(4944)	TGCTAATCGACACACCCCAA	<i>Aorim15</i> DNA sequence
Aorim15-F(5478)	TTCTATGAATGCCTCCGGCA	<i>Aorim15</i> DNA sequence
aB4-5r15_F	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGAGAAACGAGCCGTTGTCTGA	Construction for pgΔr15pG
aB1r-5r15_F	GGGGACTGCTTTTGTACAAAACCTTGCTGACTGGCAAGGTTTCTGA	Construction for pgΔr15pG
aB2-r15up_F	GGGGACAGCTTTCTGTACAAAAGTGGCCGCATAGGCATTTCTGTTGT	Construction for pgΔr15pG
fr15up-r15down_R	ACCTGCGTCTCTCAGCAATTTCTGACTGGCAAGGTTTCTGA	Construction for pgΔr15pG
fr15down-r15up_F	TCAGAAACCTTGCCAGTCAGAAAATGCTGAGGACGCAGGT	Construction for pgΔr15pG
aB3-r15down_R	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTTGCGATCCCATCCAAACCA	Construction for pgΔr15pG
Aorim15up-1629bp_F	ACTGGGTGACCAAGTTTGG	Δ <i>Aorim15</i> Colony PCR
Aorim15up-1407bp_F	AAGTACGTACTGTAGGCTCG	Southern blotting probe for Δ <i>Aorim15</i>
Aorim15up-421bp_R	AGGGTGATCGACAAGATCA	Southern blotting probe for Δ <i>Aorim15</i>
E'Aorim15ORF_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAGCAGGCTATGGCGGCAATGGCAC	Construction for pgCompr15
E'Aorim15ORF+TAG_R	GGGGACCACCTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTGCTATGCTCCTCTGACGAG	Construction for pgCompr15
GeneRacer TM 5'Primer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	5'RACE
Aoace2_5'RACE-R	GGAGAAGGCTGTCGCCAGCCACT	5'RACE
GeneRacer TM 5' Nested Primer	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA	5'RACE nested
Aoace2_5'RACE-R-n	GGCTGAACCGGGAACAGACAATCTC	5'RACE nested
GeneRacer TM 3'Primer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG	3'RACE
Aoace2_3'RACE-F	GTATCTGTGCGCAAGACCACCAAAAC	3'RACE
GeneRacer TM 3' Nested Primer	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG	3'RACE nested
Aoace2_3'RACE-F-n	AGAAATCCTCCAGGACGCGCCA	3'RACE nested
aB4-5a2_F	GGGGacaactttgtatagaaaagttg TGCTAGGAGGAGACAGAGAG	Construction for pgΔace2pG
aB1r-5a2_R	GGGGGactgctttttgtacaaacttg GGTGGGCAAAAGTCTGTACG	Construction for pgΔace2pG
aB2-a2up_F	GGGGGacagctttctgtacaaagttgTCTCTCAGAACCCAGAGTCC	Construction for pgΔace2pG
fa2up-a2down_R	ATTTCGAGTGTCTGTGCTCG GGTGGGCAAAAGTCTGTACG	Construction for pgΔace2pG
fa2down-a2up_F	CGTACAGACTTTGGCCCAACC CGACGCAACGACACTCGAAT	Construction for pgΔace2pG
aB3-a2down_R	GGGGacaactttgtataataaagttgTGCAGTCCAGTAAGGGCAAG	Construction for pgΔace2pG
Aoace2up1421-F	GATGAAGGCTGTGTATCATG	Colony PCR for Δ <i>Aoace2</i>
Aoace2up350-R	AGAGGACCAAGGGCAATATGAAG	Southern blotting probe for Δ <i>Aoace2</i>
E'Aoace2ORF_F	GGGGacaagttgtacaaaaagcaggctATGTTATCGAACCCACATCGCA	Construction for pgPaBa2; pgCompa2
E'Aoace2ORF+TGA_R	GGGGacacactttgtacaaaaagctgggtTCACTCCAAGAAAGTAATTCCTTG	Construction for pgPaBa2; pgCompa2
Aoace2-F(444)	AGCAGAGCTCATGGAGAATG	For Sequence cDNA <i>Aoace2</i>
Aoace2-F(916)	CAGCAGGGTTCACGTTTGA	For Sequence cDNA <i>Aoace2</i>
Aoace2-F(1332)	CAAGTCCCATGTCCAAACAC	For Sequence cDNA <i>Aoace2</i>
pUNA'Aoace2ORF_F	TCGAGCTCGGTACCCATGTTATCGAACCCACATCGCAATCt	Construction for pUTnDAa2AnD
pUNA'Aoace2ORF+TGA_R	CTACTACAGATCCCCgTCACTCCAAGAAAGTAATTCCTTTGTCA	Construction for pUTnDAa2AnD
cP-PamyB_F	ATCCAACCAACACCCCTCCAGAGTGACTAGG	Colony PCR for OE- <i>Aoace2</i>
coP-TamyB_R	CATCAAACTCAAACTCACTGTCGAATGCCAG	Colony PCR for OE- <i>Aoace2</i>
pUT-niaD3_F	tcgagctcggtaccc CAAAGGCCAATGTACGCCACC	Construction for pUTnDAAnD
pUC119nDAAnD_F	cggtagcccggggactTAGAGCGGCGCCGCAAAAGGCCAATGTACGC	Construction for pUTnDAAnD
niaD3-PaB_R	catggtcatagctgtttcTG CACCAGCTCTTCTTGAGATT	Construction for pUTnDAAnD
PaB-niaD3_F	AACTCCAAGAAGAGCTGGTG CAgaaacagctatgacctg	Construction for pUTnDAAnD
PaB-TaB_R	CCATCATATACTCTCCACCCT ctactacagatcccgagg	Construction for pUTnDAAnD
TaB-PaB_F	cccgggagctctgtatag AGGGTGGAGAGTATATGATGG	Construction for pUTnDAAnD
TaB-niaDd_R	TCGAAAACAAGGCTCCACCG GTCAGGAGATTATCTGCAGG	Construction for pUTnDAAnD
niaDd-TaB_F	CCTGCAGATAATCTCCTGAC CGGTGGAGCTTGTITTCGA	Construction for pUTnDAAnD
pUTnDAAnD_R	aggtagctctagagCGCGCGCCCTACGCGCTCTTAAC	Construction for pUTnDAAnD
niaDsingprobe_F	GATATTCTCCGACGTGCGAA	Southern blotting probe for OE- <i>Aoace2</i>
niaDsingprobe_R	CTCCTCTCCTTCGTGTCTTT	Southern blotting probe for OE- <i>Aoace2</i>
Ao784_5'RACE-R	CCCGGGAACAGCATACGCTTCG	5'RACE
Ao784_5'RACE-R-n	GCATACGCCAGAATGGCATTGACC	5'RACE nested
Ao784_3'RACE-F	GCCGTACACACGACATGTCTG	3'RACE
Ao784_3'RACE-F-n	CGCAAAGAAGCACCTCGTTCCC	3'RACE nested
pUNA'784ORF_F	TCGAGCTCGGTACCCATGACAGACTCCAAACGACG	Construction for pUTnDA784AnD
pUNA'784ORF+TGA_R	CTACTACAGATCCCCgTCATACGTCGCCGCTTGC	Construction for pUTnDA784AnD
AO784orf661_F	CGATCGCGATCGGTTTGT	cDNA sequence
AO784orf1681_R	TTTCCGCTGACAACCTGTGA	cDNA sequence
pUC19-784up363_F	cggtagcccggggactGTCGCGATCGAGGAAAAGAA	Construction for pUC19ΔAo784pG
f784up1-784down1_R	ACATGAAGAAGCTGATCGTGAA GATGTTCTGCAGACATCAATCC	Construction for pUC19ΔAo784pG
f784down1-784up1_F	ATTGATGTCTGCAGAACATC TTCACGATCAGCTTTCATGTAT	Construction for pUC19ΔAo784pG
pUC19-784down1538_R	aggtagctctagagTGGATGCAACCCCTCAGTCTT	Construction for pUC19ΔAo784pG
pUC19-784up1490_F	cggtagcccggggact GGTATGTTATCACGTGTCGC	Construction for pUC19ΔAo784pG
fpG-784up1_Rv	caAGCCTGCTTTTGTACAAA GATGTTCTGCAGACATCAATCC	Construction for pUC19ΔAo784pG
f784up1-pG_Fw	ATTGATGTCTGCAGAACATC TTTGTACAAAAAGCAGGCTTggc	Construction for pUC19ΔAo784pG
f784ud-pG_Rv	TTCTTTTCTCTGATCGCGAC TTTGTACAAAGAGCTGGTggt	Construction for pUC19ΔAo784pG

pUNA'scIRORF_F	TCGAGCTCGGTACCCATGGCATACTAGAACTGATCC	Construction for pUNAsR
pUNA'scIRORF+TAA_R	CTACTACAGATCCCCgTTAAGCGGAAATGCTCTCAGC	Construction for pUNAsR
pUNA+U6p-F	ATAGGAAAggatecfTaatgcggctcattcaacggaatacagggac	Construction for pUNAFNcas9ID
U6p-ligD-R1	ACTTCCGTGCGCATTGGCCGCactgtttcttttacaatgatt	Construction for pUNAFNcas9ID
ligD-U6t-F1	GCGGCCAATGCGCACGGAAGTgttttagactagaataagcaag	Construction for pUNAFNcas9ID
pUNA+U6p+gRNA+U6t-R3	gcaggtcgaacttagAGCAGCTCTATATCACGTGACGTATTTAGA	Construction for pUNAFNcas9ID
ligDorf155_F	CAACCGCCACGAAATCATT	Sequence for ligD mutation
ligDorf1320_R	TCGAGTACGGGTTTCTCTGT	Sequence for ligD mutation
ligDorf246_F	ACGGCGAGATATTATCGACC	Sequence for ligD mutation
pUC119pGup1530_F	tcgagctcggtacccGTGCGGCTGACAACTATGAT	Construction for pUC119ΔpG
pGdown1up20_R	GAGTACGTATCCACCCTACCGGGGTTCTGCAAAATATT	Construction for pUC119ΔpG
pGdup20down1_F	AATATTTGAGAACCCCGCGGTAGTGGTGGATACGTACTC	Construction for pUC119ΔpG
pUC119pGdown1457_R	ctctagaggatcccccCGCCGAGCCACTTAGTATAT	Construction for pUC119ΔpG
pUC119eRup1467_F	tcgagctcggtaccccCTTCTATGGCCCGTGTAGA	Construction for pUC119ΔeRpG
pUC119eRdown1464_R	ctctagaggatcccccAAATGTAGGGTTCGCTGGCAC	Construction for pUC119ΔeRpG
pUC119-eRup354_F	tcgagctcggtaccccTTATCAACTGTCTTTCCCGCCC	Construction for pUC119ΔeRpG
feRup1-down6_Rv	AGAAGCAACATGCCCTGCCATTCTGTTCGTTAGGAGCGTTG	Construction for pUC119ΔeRpG
feRdown6-up1_Fw	CAACGCTCCTAACGCAACAGAAATGGCAGGGCATGTTGCTTCT	Construction for pUC119ΔeRpG
feRup1-pG_Rv	caAGCTGCTTTTTTTGTACAAATCTGTTCGTTAGGAGCGTTG	Construction for pUC119ΔeRpG
fpG-eRup1_Fw	ACGCTCCTAACGCAACAGAAATTTGTACAAAAAGCAGGCTggc	Construction for pUC119ΔeRpG
feRdown6-pG_Rv	GGCGGAAAGACAGTTGATAATTTGTACAAGAAAGCTGGGTggt	Construction for pUC119ΔeRpG
feRud-pG_Fw	ccACCCAGCTTTCTTTGTACAAA TTATCAACTGTCTTTCCCGCCC	Construction for pUC119ΔeRpG
pyrGdown1522_R	GGACGGTTACAAAATCCACG	Colony PCR for <i>pyrG</i> deletion
pGdn410_Fw	GGGTGGGCTTATTGCTATG	Colony PCR for <i>pyrG</i> deletion
b-tubulin-F0	GCGGACTATATGGAACCCAGAGTGAAG	Confirmation for RIB strain
b-tubulin-F1	GGCCGGAATTCTTCCATAAAAGTTATTACTCACG	Confirmation for RIB strain
b-tubulin-F2	TGTACCGGCCCTCTTCGCAC	Confirmation for RIB strain
b-tubulin-F3	GCAGTCAATTCCGATCTGC	Confirmation for RIB strain
b-tubulin-R	AGGTATAAGGATTGATATAGGCCCTTCGCCCGG	Confirmation for RIB strain

参考文献

- Adams TH, Boylan MT, and Timberlake WE (1988) *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, **54**: 353-362.
- Agnihotri VP (1969) Some nutritional and environmental factors affecting growth and production of sclerotia by a strain of *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.*, **15**: 835-840.
- Agnihotri VP (1968) Effects of nitrogenous compounds on sclerotium formation in *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.*, **14**: 1253-1258.
- Amaike S and Keller NP (2009) Distinct roles for VeA and LaeA in development and pathogenesis of *Aspergillus flavus*. *Eukaryot. Cell*, **8**: 1051-1060.
- Amare MG and Keller NP (2014) Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genet. Biol.*, **66**: 11-18.
- Amselem J, Cuomo CA, van Kan JA, Viaud M, Benito EP, Couloux A, Coutinho PM, de Vries RP, Dyer PS, Fillinger S, and other 82 authors (2011) Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet.*, **7**: e1002230.
- Arazoe T, Miyoshi K, Yamato T, Ogawa T, Ohsato S, Arie T and Kuwata S (2015) Tailor-made CRISPR/Cas system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus. *Biotechnol. Bioeng.*, **112**: 2543-2549.
- Atoui A, Bao D, Kaur N, Grayburn WS, and Calvo AM (2008) *Aspergillus nidulans* natural product biosynthesis is regulated by *mpkB*, a putative pheromone response mitogen-activated protein kinase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**: 3596-3600.
- Baidya S, Cary JW, Grayburn WS, and Calvo AM (2011) Role of nitric oxide and flavohemoglobin homolog genes in *Aspergillus nidulans* sexual development and mycotoxin production. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**: 5524-5528.
- Barbesgaard P, Heldt-Hansen HP, and Diderichsen B (1992) On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**: 569-572.
- Bayram O, Biesemann C, Krappmann S, Galland P, and Braus GH (2008a) More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Mol. Biol. Cell*. **8**: 3254-3256.
- Bayram O and Braus GH (2012) Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol. Rev.*, **36**: 1-24.
- Bayram O, Krappmann S, Ni M, Bok JW, Helmstaedt K, Valerius O, Braus-Stromeyer S, Kwon NJ, Keller NP, Yu JH, and Braus GH (2008b) VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science*, **320**: 1504-1506.

- Bayram O, Sari F, Braus GH, and Irniger S (2009) The protein kinase ImeB is required for light-mediated inhibition of sexual development and for mycotoxin production in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.*, **71**: 1278-1295.
- Bayram SO, Bayram O, Feussner K, Kim JH, Kim HS, Kaeffer A, Feussner I, Chae KS, Han DM, Han KH, and Braus GH (2014) Membrane-Bound Methyltransferase Complex VapA-VipC-VapB Guides Epigenetic Control of Fungal Development. *Dev. Cell*, **29**: 406-420.
- Bayram SO, Bayram O, Valerius O, Park HS, Irniger S, Gerke J, Ni M, Han KH, Yu JH, and Braus GH (2010) LaeA control of velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity. *PLoS Genet.*, **6**: e1001226.
- Bennett JW, Fernholz FA, and Lee LS (1978) Effect of light on aflatoxins, anthraquinones, and sclerotia in *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycologia*, **70**: 104-116.
- Bernhardt C, Zhao M, Gonzalez A, Lloyd A, and Schiefelbein J (2005) The bHLH genes GL3 and EGL3 participate in an intercellular regulatory circuit that controls cell patterning in the Arabidopsis root epidermis. *Development*, **132**: 291-298.
- Blackwell E, Halatek IM, Kim HJ, Ellicott AT, Obukhov AA, and Stone DE (2003) Effect of the pheromone-responsive G(alpha) and phosphatase proteins of *Saccharomyces cerevisiae* on the subcellular localization of the Fus3 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell Biol.*, **23**: 1135-1150.
- Boeke JD, LaCroute F, and Fink GR (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.*, **197**: 345-346.
- Bok JW and Keller NP (2004) LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot. Cell*, **3**: 527-535.
- Bolton MD, Thomma BP, and Nelson BD (2006) *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol. Plant. Pathol.*, **7**: 1-16.
- Bontron S, Jaquenoud M, Vaga S, Talarek N, Bodenmiller B, Aebersold R, and De Virgilio C (2013) Yeast endosulfines control entry into quiescence and chronological life span by inhibiting protein phosphatase 2A. *Cell Rep.*, **3**: 16-22.
- Boylan MT, Mirabito PM, Willett CE, Zimmerman CR, and Timberlake WE (1987) Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell Biol.*, **7**: 3113-3118.
- Braumann I, van den Berg M, and Kempken F (2008) Repeat induced point mutation in two asexual fungi, *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.*, **53**: 287-297.
- Brown SH, Scott JB, Bhaheetharan J, Sharpee WC, Milde L, Wilson RA, and Keller NP (2009) Oxygenase coordination is required for morphological transition and the host-fungus interaction of *Aspergillus flavus*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **22**: 882-894.
- Brown SH, Zarnowski R, Sharpee WC, and Keller NP (2008) Morphological transitions governed by density dependence and lipoygenase activity in *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**: 5674-5685.

- Burger G, Strauss J, Scazzocchio C, and Lang BF (1991) *nirA*, the pathway-specific regulatory gene of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*, encodes a putative GAL4-type zinc finger protein and contains four introns in highly conserved regions. *Mol. Cell Biol.*, **11**: 5746-5755.
- Busby TM, Miller KY, and Miller BL (1996) Suppression and enhancement of the *Aspergillus nidulans* medusa mutation by altered dosage of the bristle and stunted genes. *Genetics*, **143**: 1555-1563.
- Calvo AM, Bok J, Brooks W, and Keller NP (2004) *veA* is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**: 4733-4739.
- Cambareri EB, Jensen BC, Schabtach E, and Selker EU (1989) Repeat-induced G-C to A-T mutations in *Neurospora*. *Science*, **244**: 1571-1575.
- Cameroni E, Hulo N, Roosen J, Winderickx J, and De Virgilio C (2004) The novel yeast PAS kinase Rim15 orchestrates G0-associated antioxidant defense mechanisms. *Cell Cycle*, **3**: 462-468.
- Carroll DR (1991) Induction of sclerotia in *Sclerotium rolfsii* by short low temperature treatment. *J. Gen. Microbiol.*, **137**: 1063-1066.
- Cary JW, Harris-Coward PY, Ehrlich KC, Di Mavungu JD, Malysheva SV, De Saeger S, Dowd PF, Shantappa S, Martens SL, and Calvo AM (2014) Functional characterization of a *veA*-dependent polyketide synthase gene in *Aspergillus flavus* necessary for the synthesis of asparasone, a sclerotium-specific pigment. *Fungal Genet. Biol.*, **64**: 25-35.
- Cary JW, Harris-Coward PY, Ehrlich KC, Mack BM, Kale SP, Larey C, and Calvo AM (2012) NsdC and NsdD affect *Aspergillus flavus* morphogenesis and aflatoxin production. *Eukaryot Cell*, **11**: 1104-1111.
- Cary JW, Han Z, Yin Y, Lohmar JM, Shantappa S, Harris-Coward PY, Mack B, Ehrlich KC, Wei Q, Arroyo-Manzanares N, Uka V, Vanhaecke L, Bhatnagar D, Yu J, Nierman WC, Johns MA, Sorensen D, Shen H, De Saeger S, Diana Di Mavungu J, and Calvo AM (2015a) Transcriptome analysis of *Aspergillus flavus* reveals *veA*-dependent regulation of secondary metabolite gene clusters, including the novel aflavarin cluster. *Eukaryot. Cell*, **14**: 983-997.
- Cary JW, Uka V, Han Z, Buyst D, Harris-Coward PY, Ehrlich KC, Wei Q, Bhatnagar D, Dowd PF, Martens SL, Calvo AM, Martins JC, Vanhaecke L, Coenye T, De Saeger S, and Di Mavungu JD (2015b) An *Aspergillus flavus* secondary metabolic gene cluster containing a hybrid PKS-NRPS is necessary for synthesis of the 2-pyridones, leporins. *Fungal Genet. Biol.*, **81**: 88-97.
- Chabane S, Sarfati J, Ibrahim-Granet O, Du C, Schmidt C, Mouyna I, Prevost MC, Calderone R, and Latgé JP (2006) Glycosylphosphatidylinositol-anchored Ecm33p influences conidial cell wall biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**: 3259-3267.
- Chang PK (2008) *Aspergillus parasiticus crzA*, which encodes calcineurin response zinc-finger protein, is required for aflatoxin production under calcium stress. *Int. J. Mol. Sci.*, **9**: 2027-2043.

- Chang PK and Ehrlich KC (2010) What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*? *Int. J. Food Microbiol.*, **138**: 189-199.
- Chang PK, Ehrlich KC, and Hua SS (2006) Cladal relatedness among *Aspergillus oryzae* isolates and *Aspergillus flavus* S and L morphotype isolates. *Int. J. Food Microbiol.*, **108**: 172-177.
- Chang PK and Ehrlich KC (2013) Genome-wide analysis of the Zn(II)₂Cys₆ zinc cluster-encoding gene family in *Aspergillus flavus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**: 4289-4300.
- Chang PK, Scharfenstein LL, Li P, and Ehrlich KC (2013) *Aspergillus flavus* VelB acts distinctly from VeA in conidiation and may coordinate with FluG to modulate sclerotial production. *Fungal Genet. Biol.*, **58-59**: 71-79.
- Chang PK, Scharfenstein LL, Mack B, Yu J, and Ehrlich KC (2012) Deletion of the *Aspergillus flavus* orthologue of *A. nidulans fluG* reduces conidiation and promotes production of sclerotia but does not abolish aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**: 7557-7563.
- Chang PK, Scharfenstein LL, Mack B, Yu J, and Ehrlich KC (2014) Transcriptomic profiles of *Aspergillus flavus* CA42, a strain that produces small sclerotia, by decanal treatment and after recovery. *Fungal Genet. Biol.*, **68**: 39-47.
- Chang PK, Scharfenstein LL, Luo M, Mahoney N, Molyneux RJ, Yu J, Brown RL, and Campbell BC (2010) Loss of *msnA*, a putative stress regulatory gene, in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* increased production of conidia, aflatoxins and kojic acid. *Toxins*, **3**: 82-104.
- Chang PK, Scharfenstein LL, Solorzano CD, Abbas HK, Hua SS, Jones WA, and Zablotowicz RM (2015) High sequence variations in the region containing genes encoding a cellular morphogenesis protein and the repressor of sexual development help to reveal origins of *Aspergillus oryzae*. *Int. J. Food Microbiol.*, **200**: 66-71.
- Chen XA, Ishida N, Todaka N, Nakamura R, Maruyama J, Takahashi H, and Kitamoto K (2010) Promotion of efficient Saccharification of crystalline cellulose by *Aspergillus fumigatus* Swol. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**: 2556-2561.
- Chung DW, Greenwald C, Upadhyay S, Ding S, Wilkinson HH, Ebbale DJ, and Shaw BD (2011) *acon-3*, the *Neurospora crassa* ortholog of the developmental modifier, *medA*, complements the conidiation defect of the *Aspergillus nidulans* mutant. *Fungal Genet. Biol.*, **48**: 370-376.
- Coley-Smith JR and Cooke RC (1971) Survival and germination of fungal sclerotia, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **9**: 65-92.
- Colot HV, Park G, Turner GE, Ringelberg C, Crew CM, Litvinkova L, Weiss RL, Borkovich KA, and Dunlap JC (2006) A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**: 10352-10357.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, and Zhang F (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, **339**: 819-823.
- Coppin E, Debuchy R, Arnaise S, and Picard M (1997) Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**: 411-428.

- Cotty PJ (1989) Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology.*, **79**: 808-814.
- De Bekker C, Wiebenga A, Aguilar G., and Wösten, HA (2009) An enzyme cocktail for efficient protoplast formation in *Aspergillus niger*. *J. Microbiol. Methods*, **76**: 305–306.
- De Souza CP, Hashmi SB, Osmani AH, Andrews P, Ringelberg CS, Dunlap J C, and Osmani SA (2013) Functional analysis of the *Aspergillus nidulans* kinome, *PLoS One*, **8**: e58008.
- Di Carlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, and Church GM (2013) Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Rev.*, **41**: 4336-4343.
- Dowzer CE and Kelly JM (1991) Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell Biol.*, **11**: 5701-5709.
- Duan Y, Ge C, Liu S, Wang J, and Zhou M (2013) A two-component histidine kinase Shk1 controls stress response, sclerotial formation and fungicide resistance in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mol. Plant Pathol.*, **14**: 708-718.
- Dyer PS, Ingram DS, and Johnstone K (1992) The control of sexual morphogenesis in the Ascomycotina. *Biol. Rev.*, **67**: 421-458.
- Dyer PS and O'Gorman CM (2012) Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiol. Rev.*, **36**: 165-192.
- Dyer PS and O'Gorman CM (2011) A fungal sexual revolution: *Aspergillus* and *Penicillium* show the way. *Curr. Opin. Microbiol.*, **14**: 649-654.
- Dyer PS and Paoletti M (2005) Reproduction in *Aspergillus fumigatus*: sexuality in a supposedly asexual species? *Med. Mycol.*, **43 Suppl 1**: S7-14.
- Dyer PS, Paoletti M, and Archer DB (2003) Genomics reveals sexual secrets of *Aspergillus*. *Microbiology*, **149**: 2301-2303.
- Ejzykowicz DE, Cunha MM, Rozental S, Solis NV, Gravelat FN, Sheppard DC, and Filler SG (2009) The *Aspergillus fumigatus* Transcription Factor Ace2 Governs Pigment Production, Conidiation and Virulence. *Mol. Microbiol.*, **72**: 155-169.
- Erental A, Dickmanb MB, and Yarden O (2008) Sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum*: awakening molecular analysis of a “Dormant” structure *Fungal Biol. Rev.*, **22**: 6-16.
- Escano CS, Juvvadi PR, Jin FJ, Takahashi T, Koyama Y, Yamashita S, Maruyama J, and Kitamoto K (2009) Disruption of the *Aopex11-1* gene involved in peroxisome proliferation leads to impaired Woronin body formation in *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot. Cell*, **8**: 296-305.

- Etxebeste O, Garzia A, Espeso EA, and Ugalde U (2010) *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends Microbiol.*, **18**: 569-576.
- Etxebeste O, Ni M, Garzia A, Kwon NJ, Fischer R, Yu JH, Espeso EA, and Ugalde U (2008) Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell*, **7**: 38–48.
- Fuller K, Chen S, Loros JJ, and Dunlap JC (2015) Development of the CRISPR/Cas9 system for targeted gene disruption in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell*, in press.
- Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batzoglou S, Lee SI, Bastürkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J, and other 40 authors (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, **438**: 1105-1115.
- Garzia A, Etxebeste O, Herrero-García E, Ugalde U, and Espeso EA (2010) The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.*, **75**: 1314-1324.
- Gibbons JG, Salichos L, Slot JC, Rinker DC, McGary KL, King JG, Klich MA, Tabb DL, McDonald WH, and Rokas A (2012) The evolutionary imprint of domestication on genome variation and function of the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Curr. Biol.*, **22**: 1403-1409.
- Gomi K, Imura Y, and Hara S (1987) Integrative transformation of *Aspergillus oryzae* with a plasmid containing the *Aspergillus nidulans argB* gene. *Agricultural And Biological Chemistry*, **51**: 2549-2555.
- Grintzalis K, Vernardis SI, Klapa MI, and Georgiou CD (2014) Role of oxidative stress in sclerotial differentiation and aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**: 5561–5571.
- Grosse V and Krappmann S (2008) The asexual pathogen *Aspergillus fumigatus* expresses functional determinants of *Aspergillus nidulans* sexual development. *Eukaryot. Cell*, **7**: 1724-1732.
- Haas H, Zadra I, Stöffler G, and Angermayr K (1999) The *Aspergillus nidulans* GATA factor SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis and control of iron uptake. *J. Biol. Chem.*, **274**: 4613-4619.
- Hagiwara D, Asano Y, Marui J, Furukawa K, Kanamaru K, Kato M, Abe K, Kobayashi T, Yamashino T, and Mizuno T (2007) The SskA and SrrA response regulators are implicated in oxidative stress responses of hyphae and asexual spores in the phosphorelay signaling network of *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**: 1003–1014.
- Han KH, Han KY, Yu JH, Chae KS, Jahng KY, and Han DM (2001) The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.*, **41**: 299-309.
- Han KH, Seo JA, and Yu JH (2004) A putative G protein-coupled receptor negatively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **51**: 1333-1345.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**: 557-580.

- Hanks SK and Quinn AM (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.*, **200**: 38–62.
- Horn BW, Greene RL, Sobolev VS, Dorner JW, Powell JH, and Layton RC (1996) Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii*. *Mycologia*, **88**: 574–587.
- Horn BW, Moore GG, and Carbone I (2011) Sexual reproduction in aflatoxin-producing *Aspergillus nomius*. *Mycologia* **103**: 174-183.
- Horn BW, Moore GG, and Carbone I (2009a) Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, **101**: 423-429.
- Horn BW, Ramirez-Prado JH, and Carbone I (2009b) Sexual reproduction and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus parasiticus*. *Fungal. Genet. Biol.*, **46**: 169-175.
- Horn BW, Ramirez-Prado JH, and Carbone I (2009c) The sexual state of *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia*, **101**: 275-280.
- Hynes MJ, Szewczyk E, Murray SL, Suzuki Y, Davis MA, and Sealy-Lewis HM (2007) Transcriptional control of gluconeogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. **17**: 139-150.
- Irniger S (2011) The Ime2 protein kinase family in fungi: more duties than just meiosis. *Mol. Microbiol.*, **80**: 1-13.
- Ishi K, Watanabe T, Juvvadi PR, Maruyama J and, Kitamoto K. (2005) Development of a modified positive selection medium that allows to isolate *Aspergillus oryzae* strains cured of the integrated *niaD*-based plasmid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**: 2463-2465.
- Ishitani C and Sakaguchi K (1956) Hereditary variation and genetic recombination in Koji-molds (*Aspergillus oryzae* and *Asp. sojae*). V. HETEROCARYOSIS. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **2**: 345-400.
- Ito K, Asakura T, Morita Y, Nakajima K, Koizumi A, Shimizu-Ibuka A, Masuda K, Ishiguro M, Terada T, Maruyama J, Kitamoto K, Misaka T, and Abe K (2007) Microbial production of sensory-active miraculin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **360**: 407-411.
- Jin FJ, Maruyama J, Juvvadi PR, Arioka M, and Kitamoto K (2004a) Adenine auxotrophic mutants of *Aspergillus oryzae*: development of a novel transformation system with triple auxotrophic hosts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**: 656-662.
- Jin FJ, Maruyama J, Juvvadi PR, Arioka M, and Kitamoto K (2004b) Development of a novel quadruple auxotrophic host transformation system by *argB* gene disruption using *adeA* gene and exploiting adenine auxotrophy in *Aspergillus oryzae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **239**: 79-85.
- Jin FJ, Takahashi T, Machida M and Koyama Y (2009) Identification of a basic helix-loop-helix-type transcription regulator gene in *Aspergillus oryzae* by systematically deleting large chromosomal segments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**: 5943-5951.

- Jin FJ, Takahashi T, Utsushikawa M, Furukido T, Nishida M, Ogawa M, Tokuoka M, and Koyama Y (2010) A trial of minimization of chromosome 7 in *Aspergillus oryzae* by multiple chromosomal deletions. *Mol. Genet. Genomics*, 283: 1-12.
- Jin FJ, Nishida M, Hara S, and Koyama Y (2011a) Identification and characterization of a putative basic helix-loop-helix transcription factor involved in the early stage of conidiophore development in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, **48**: 1108-1115.
- Jin FJ, Takahashi T, Matsushima K, Hara S, Shinohara Y, Maruyama J, Kitamoto K, and Koyama Y (2011b) SclR, a basic helix-loop-helix transcription factor, regulates hyphal morphology and promotes sclerotial formation in *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot. Cell*, **10**: 945-955.
- Joung JK and Sander JD (2013) TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**: 49-55.
- Kale SP, Milde L, Trapp MK, Frisvad JC, Keller NP, and Bok JW (2008) Requirement of LaeA for secondary metabolism and sclerotial production in *Aspergillus flavus*. *Fungal Genet. Biol.*, **45**: 1422-1429.
- Katayama T, Tanaka Y, Okabe T, Nakamura H, Fujii W, Kitamoto K, and Maruyama J (2015) Development of a genome editing technique using the CRISPR/Cas9 system in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Lett.*, *in press*.
- Kawasaki L, Sánchez O, Shiozaki K, and Aguirre J (2002) SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.*, **45**: 1153–1163.
- Kawauchi M, Nishiura M, and Iwashita K (2013) Fungus-specific sirtuin HstD coordinates secondary metabolism and development through control of LaeA. *Eukaryot. Cell*, **12**: 1087-1096.
- Keller NP, Turner G, and Bennett JW (2005) Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**: 937–947.
- Kim H and Borkovich KA (2006) Pheromones are essential for male fertility and sufficient to direct chemotropic polarized growth of trichogynes during mating in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell*, **5**: 544-554.
- Kim H and Borkovich KA (2004) A pheromone receptor gene, *pre-1*, is essential for mating type-specific directional growth and fusion of trichogynes and female fertility in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.*, **52**: 1781-1798.
- Kim HJ, Chen C, Kabbage M, and Dickman MB (2011) Identification and characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* NADPH oxidases. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**: 7721-7729.
- Kim HR, Chae KS, Han KH and Han DM (2009) The *nsdC* gene encoding a putative C2H2-type transcription factor is a key activator of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, **182**: 771–783.
- Kitamoto K (2002) Molecular biology of the Koji molds. *Adv. Appl. Microbiol.*, **51**: 129-153.

- Kiyota T, Hamada R, Sakamoto K, Iwashita K, Yamada O, and Mikami S (2011) Aflatoxin non-productivity of *Aspergillus oryzae* caused by loss of function in the *aflJ* gene product. *J. Biosci. Bioeng.*, **111**: 512-517.
- Kubodera T, Yamashita N, and Nishimura A (2000) Pyrithiamine resistance gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae*: cloning, characterization and application as a dominant selectable marker for transformation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**: 1416-1421.
- Kuck U and Poggeler S (2009) Cryptic sex in fungi. *Fungal Biol. Rev.*, **23**: 86-90.
- Kües U (2000) Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**: 316-353.
- Kwon NJ, Garzia A, Espeso EA, Ugalde U and Yu JH (2010a) FlbC is a putative nuclear C2H2 transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.*, **77**: 1203–1219.
- Kwon NJ, Shin KS, and Yu JH (2010b) Characterization of the developmental regulator FlbE in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.*, **47**: 981–993.
- Laabs TL, Markwardt DD, Slattery MG, Newcomb LL, Stillman DJ, and Heideman W (2003) ACE2 is required for daughter cell-specific G1 delay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**: 10275-10280.
- Lara-Rojas F, Sánchez O, Kawasaki L, and Aguirre J (2011) *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions. *Mol. Microbiol.*, **80**: 436–454.
- Lee P, Kim MS, Paik S M, Choi SH, Cho BR, and Hahn JS (2013) Rim15-dependent activation of Hsf1 and Msn2/4 transcription factors by direct phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **587**: 3648–3655.
- Lee MK, Kwon NJ, Choi JM, Lee IS, Jung S, and Yu JH. (2014) NsdD is a key repressor of asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, **197**: 159-173.
- Leslie JF and Raju NB (1985) Recessive mutations from natural populations of *Neurospora crassa* that are expressed in the sexual diplophase. *Genetics*, **111**: 759-777.
- Li M, Liang X, and Rollins JA (2012) *Sclerotinia sclerotiorum* γ -glutamyl transpeptidase (Ss-Ggt1) is required for regulating glutathione accumulation and development of sclerotia and compound appressoria. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **25**: 412-420.
- Li M and Rollins JA (2009) The development-specific protein (Ssp1) from *Sclerotinia sclerotiorum* is encoded by a novel gene expressed exclusively in sclerotium tissues. *Mycologia*, **101**: 34-43.
- Li M and Rollins JA (2010) The development-specific *ssp1* and *ssp2* genes of *Sclerotinia sclerotiorum* encode lectins with distinct yet compensatory regulation. *Fungal Genet. Biol.*, **47**: 531-538.
- Liu R, Chen L, Jiang Y, Zhou Z, and Zou G (2015) Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. *Cell Discovery*, **1**: 15007.

- Mabashi Y, Kikuma T, Maruyama J, Arioka M, and Kitamoto K (2006) Development of a versatile expression plasmid construction system for *Aspergillus oryzae* and its application to visualization of mitochondria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**: 1882–1889.
- Machida M, Asai K, Sano M, Tanaka T, Kumagai T, Terai G, Kusumoto K, Arima T, Akita O, Kashiwagi Y, and other 54 authors (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, **438**: 1157-1161.
- MacPherson S, Larochelle M, and Turcotte B (2006) A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**: 583-604.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, and Church GM (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, **339**: 823-826.
- Marcos AT, Ramos MS, Marcos JF, Carmona L, Strauss J, and Cánovas D (2016) Nitric oxide synthesis by nitrate reductase is regulated during development in *Aspergillus*. *Mol. Microbiol.*, **99**: 15-33.
- Martin T, Lu SW, van Tilbeurgh H, Ripoll DR, Dixelius C, Turgeon BG, and Debuchy R (2010) Tracing the origin of the fungal alpha1 domain places its ancestor in the HMG-box superfamily: implication for fungal mating-type evolution. *PLoS One*, **5**: e15199.
- Marui J, Yamane N, Ohashi-Kunihiro S, Ando T, Terabayashi Y, Sano M, Ohashi S, Ohshima E, Tachibana K, Higa Y, Nishimura M, Koike H, and Machida M (2011) Kojic acid biosynthesis in *Aspergillus oryzae* is regulated by a Zn(II)(2)Cys(6) transcriptional activator and induced by kojic acid at the transcriptional level. *J. Biosci. Bioeng.*, **112**: 40-43.
- Maruyama J and Kitamoto K (2008) Multiple gene disruptions by marker recycling with highly efficient gene-targeting background ($\Delta ligD$) in *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Lett.*, **30**: 1811-1817.
- Maruyama J and Kitamoto K (2011) Targeted gene disruption in Koji mold *Aspergillus oryzae*. *Methods. Mol. Biol.*, **765**: 447–456.
- Maruyama J, Nakajima H, and Kitamoto K (2001) Visualization of nuclei in *Aspergillus oryzae* with EGFP and analysis of the number of nuclei in each conidium by FACS. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**: 1504-1510.
- Mattern IE, Unkles S, Kinghorn JR, Pouwels PH, and van den Hondel CA (1987) Transformation of *Aspergillus oryzae* using the *A. niger pyrG* gene. *Mol. Gen. Genet.*, **210**: 460-461.
- McAlpin CE and Wicklow DT (2005) Culture media and sources of nitrogen promoting the formation of stromata and ascocarps in *Petromyces alliaceus* (*Aspergillus* section Flavi). *Can. J. Microbiol.*, **51**: 765-771.
- McDonald CM, Wagner M, Dunham MJ, Shin ME, Ahmed NT, and Winter E (2009) The Ras/cAMP pathway and the CDK-like kinase Ime2 regulate the MAPK Smk1 and spore morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **181**: 511–523.

- Mizutani O, Kudo Y, Saito A, Matsuura T, Inoue H, Abe K, and Gomi K (2008) 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.
- Moore GG, Singh R, Horn BW, and Carbone I (2009) Recombination and lineage-specific gene loss in the aflatoxin gene cluster of *Aspergillus flavus*. *Mol. Ecol.*, **18**: 4870–4887.
- Montiel D, Dickinson MJ, Lee HA, Dyer PS, Jeenes DJ, Roberts IN, James S, Fuller LJ, Matsuchima K, and Archer DB (2003) Genetic differentiation of the *Aspergillus* section Flavi complex using AFLP fingerprints. *Mycol. Res.*, **107**: 1427-1434.
- Montiel MD, Lee HA, and Archer DB (2006) Evidence of RIP (repeat-induced point mutation) in transposase sequences of *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, **43**: 439-445.
- Morrall RA, Loew FM, and Hayes MA (1978) Subacute toxicological evaluation of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in rats. *Can. J. Comp. Med.*, **42**: 473-477.
- Motoyama T, Ochiai N, Morita M, Iida Y, Usami R, and Kudo T (2008) Involvement of putative response regulator genes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in osmotic stress response, fungicide action, and pathogenicity. *Curr. Genet.*, **54**: 185-195.
- Murakami H (1971) Classification of the Koji Mold. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **17**: 281-309.
- Nakajima K, Asakura T, Maruyama J, Morita Y, Oike H, Shimizu-Ibuka A, Misaka T, Sorimachi H, Arai S, Kitamoto K, and Abe K (2006) Extracellular production of neoculin, a sweet-tasting heterodimeric protein with taste-modifying activity, by *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**: 3716-3723.
- Nakamura H, Kikuma T, Jin FJ, Maruyama J, and Kitamoto K (2015) AoRim15 is involved in conidial stress tolerance, conidiation and sclerotia formation in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *J. Biosci. Bioeng.*, in press.
- Nasmyth K, Stillman D, and Kipling D (1987) Both positive and negative regulators of HO transcription are required for mother-cell-specific mating-type switching in yeast. *Cell*, **48**: 579-587.
- Ni M and Yu JH (2007) A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One*, **2**: e970.
- Nødvig CS, Nielsen JB, Kogle ME, and Mortensen UH (2015) A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLOS one*, **10**: e0133085.
- Oda K, Kobayashi A, Ohashi S, and Sano M (2011) *Aspergillus oryzae* *laeA* regulates kojic acid synthesis genes. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **75**: 1832-1834.
- O'Gorman CM, Fuller HT, and Dyer PS (2009) Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, **457**: 471-474.

- Ogawa M, Kobayashi T, and Koyama Y (2012) ManR, a novel Zn(II)₂Cys₆ transcriptional activator, controls the β -mannan utilization system in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, **49**: 987-995.
- Ogawa M, Tokuoka M, Jin FJ, Takahashi T, and Koyama Y (2010) Genetic analysis of conidiation regulatory pathways in koji-mold *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, **47**: 10-18.
- Paoletti M, Seymour FA, Alcocer MJ, Kaur N, Calvo AM, Archer DB, and Dyer PS (2007) Mating type and the genetic basis of self-fertility in the model fungus *Aspergillus nidulans*. *Curr. Biol.*, **17**: 1384-1389.
- Park HS and Yu JH (2012) Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.*, **15**: 669-677.
- Pateman, J. A., and D. J. Cove (1967) Regulation of nitrate reduction in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, **215**: 1234–1237.
- Aspergillus nidulans*. *Nature (London)* 215:1234–1237.
- Pedruzzi I, Bürckert N, Egger P, and De Virgilio C (2000) *Saccharomyces cerevisiae* Ras/cAMP pathway controls post-diauxic shift element-dependent transcription through the zinc finger protein Gis1. *EMBO J.*, **19**: 2569–2579.
- Pedruzzi I, Dubouloz F, Cameroni E, Wanke V, Roosen J, Winderickx J, and De Virgilio C (2003) TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G₀. *Mol. Cell*, **12**: 1607–1613.
- Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, de Vries RP, Albang R, Albermann K, and other 59 authors (2007) Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat. Biotechnol.*, **25**: 221-231.
- Perrin RM, Fedorova ND, Bok JW, Cramer RA, Wortman JR, Kim HS, Nierman WC, and Keller NP (2007) Transcriptional regulation of chemical diversity in *Aspergillus fumigatus* by LaeA. *PLoS Pathog.*, **3**: e50.
- Peterson SW (2008) Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*, **100**: 205-226.
- Poggeler S, Nowrousian M, and Kuck U (2006a) Fruiting-Body Development in Ascomycetes *The Mycota.*, **1**: 325-355.
- Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, Macdonald KD, and Bufton AW (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet.*, **5**: 141-238.
- Punt PJ, Strauss J, Smit R, Kinghorn JR, van den Hondel CA, and Scazzocchio C (1995) The intergenic region between the divergently transcribed *niiA* and *niaD* genes of *Aspergillus nidulans* contains multiple NirA binding sites which act bidirectionally. *Mol. Cell Biol.*, **10**: 5688-5699.
- Punt, PJ, and van den Hondel, CA (1992) Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance markers. *Methods Enzymol.*, **216**: 447–457.

- Ramirez-Prado JH, Moore GG, Horn BW, and Carbone I (2008) Characterization and population analysis of the mating-type genes in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genet. Biol.*, **45**: 1292-1299.
- Reinders A, Bürckert N, Boller T, Wiemken A, and De Virgilio C (1998) *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase. *Genes Dev.*, **12**: 2943-2955.
- Rui O and Hahn M (2007) The Slit2-type MAP kinase Bmp3 of *Botrytis cinerea* is required for normal saprotrophic growth, conidiation, plant surface sensing and host tissue colonization. *Mol. Plant Pathol.*, **8**: 173-184.
- Sakai K, Kinoshita H, and Nihira T (2012) Heterologous expression system in *Aspergillus oryzae* for fungal biosynthetic gene clusters of secondary metabolites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**: 2011-2022.
- Sakamoto K, Arima T, Iwashita K, Yamada O, Gomi K, and Akita O (2008) *Aspergillus oryzae atfB* encodes a transcription factor required for stress tolerance in conidia. *Fungal Genet. Biol.*, **45**: 922-932.
- Sakamoto K, Iwashita K, Yamada O, Kobayashi K, Mizuno A, Akita O, Mikami S, Shimoi H, and Gomi K (2009) *Aspergillus oryzae atfA* controls conidial germination and stress tolerance. *Fungal Genet. Biol.*, **46**: 887-897.
- Sander JD and Joung JK (2014) CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.*, **32**: 347-355.
- Saputo S, Chabrier-Rosello Y, Luca FC, Kumar A, and Krysan DJ (2012) The RAM network in pathogenic fungi. *Eukaryot. Cell*, **11**: 708-717.
- Schoustra S, Rundle HD, Dali R, and Kassen R (2010) Fitness-associated sexual reproduction in a filamentous fungus. *Curr. Biol.*, **20**: 1350-1355.
- Schumacher J, de Larrinoa IF, and Tudzynski B (2008) Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor Crz1 of *Botrytis cinerea* is required for growth, development, and full virulence on bean plants. *Eukaryot. Cell*, **7**: 584-601.
- Seo JA, Guan Y, and Yu JH (2003) Suppressor mutations bypass the requirement of *fluG* for asexual sporulation and sterigmatocystin production in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, **165**: 1083-1093.
- Seo JA, Han KH, and Yu JH (2005) Multiple roles of a heterotrimeric G-protein gamma-subunit in governing growth and development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, **171**: 81-89.
- Shelest E (2008) Transcription factors in fungi. *FEMS Microbiol. Lett.*, **286**: 145-151.
- Shinohara Y, Kawatani M, Futamura Y, Osada H, and Koyama Y (2015) An overproduction of astellolides induced by genetic disruption of chromatin-remodeling factors in *Aspergillus oryzae*. *J. Antibiot. (Tokyo)*, doi: 1-5.
- Sideri M and Georgiou DC (2000) Differentiation and hydrogen peroxide production in *Sclerotium rolfsii* are induced by the oxidizing growth factors, light and iron. *Mycologia*, **92**: 1033-1042.

- Siegmund U, Heller J, van Kan JA, and Tudzynski P (2013) The NADPH oxidase complexes in *Botrytis cinerea*: evidence for a close association with the ER and the tetraspanin Pls1. *PLoS One*, **8**: e55879.
- Siegmund U, Marschall R, and Tudzynski P (2015) BcNoxD, a putative ER protein, is a new component of the NADPH oxidase complex in *Botrytis cinerea*, *Mol. Microbiol.* **95**: 988-1005.
- Skromne I, Sánchez O, and Aguirre J (1995) Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory gene. *Microbiology*. **141**: 21–28.
- Smith, ME, Henkel TW, and Rollins JA (2015) How many fungi make sclerotia? *Fungal Ecol.*, **13**: 211–220.
- Sohn KT and Yoon KS (2002) Ultrastructural study on the cleistothecium development in *Aspergillus nidulans*. *Mycobiology*, **30**: 117-127.
- Su SS and Mitchell AP (1993) Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. *Genetics*, **133**: 67–77.
- Sugui JA, Losada L, Wang W, Varga J, Ngamskulrungroj P, Abu-Asab M, Chang YC, O'Gorman CM., Wickes BL, Nierman WC, Dyer PS, and Kwon-Chung KJ (2011) Identification and characterization of an *Aspergillus fumigatus* "supermater" pair, *MBio.*, **2**: e00234–11.
- Swinnen E, Wanke V, Roosen J, Smets B, Dubouloz F, Pedruzzi I, Cameroni E, De Virgilio C, and Winderickx J (2006) Rim15 and the crossroads of nutrient signalling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Div.*, **1**: 3.
- Szewczyk E and Krappmann S (2010) Conserved regulators of mating are essential for *Aspergillus fumigatus* cleistothecium formation. *Eukaryot. Cell*, **9**: 774-783.
- Tada S, Gomi K, Kitamoto K, Takahashi K, Tamura G, and Hara S (1991) Construction of a fusion gene comprising the Taka-amylase A promoter and the *Escherichia coli* beta-glucuronidase gene and analysis of its expression in *Aspergillus oryzae*. *Mol. Gen. Genet.*, **229**: 301-306.
- Takahashi T, Masuda T, and Koyama Y (2006) Enhanced gene targeting frequency in *ku70* and *ku80* disruption mutants of *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*. *Mol. Genet. Genomics*, **275**: 460-470.
- Tamano K, Sano M, Yamane N, Terabayashi Y, Toda T, Sunagawa M, Koike H, Hatamoto O, Umitsuki G, Takahashi T, Koyama Y, Asai R, Abe K, and Machida M (2008) Transcriptional regulation of genes on the non-syntenic blocks of *Aspergillus oryzae* and its functional relationship to solid-state cultivation. *Fungal. Genet. Biol.*, **45**: 139-151.
- Tani S, Katsuyama Y, Hayashi T, Suzuki H, Kato M, Gomi K, Kobayashi T, and Tsukagoshi N (2001) Characterization of the *amyR* gene encoding a transcriptional activator for the amylase genes in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.*, **39**: 10-15.
- Taylor BL and Zhulin IB (1999) PAS domains: Internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**: 479–506.

- Thön M, Al-Abdallah Q, Hortschansky P, and Brakhage AA (2007) The thioredoxin system of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: impact on development and oxidative stress response. *J. Biol. Chem.*, **282**: 27259–27269.
- Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, Peñalva MA, and Arst HN Jr (1987) Both positive and negative regulators of HO transcription are required for mother-cell-specific mating-type switching in yeast. *Cell*. **48**: 579-587.
- Tsitsigiannis DI, Kowieski TM, Zarnowski R and Keller NP (2005) Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, **151**: 1809–1821.
- Tsitsigiannis DI, Zarnowski R and Keller NP (2004) The lipid body protein, PpoA, coordinates sexual and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.*, **279**: 11344– 11353.
- Tsuchiya K, Nagashima T, Yamamoto Y, Gomi K, Kitamoto K, Kumagai C, and Tamura G (1994) High level secretion of calf chymosin using a glucoamylase-prochymosin fusion gene in *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**: 895-899.
- Tsuchiya K, Tada S, Gomi K, Kitamoto K, Kumagai C, Jigami Y, and Tamura G (1992) High level expression of the synthetic human lysozyme gene in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**: 109-114.
- Tsukasaki W, Maruyama J, and Kitamoto K (2014) Establishment of a new method to quantitatively evaluate hyphal fusion ability in *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**: 1254–1262.
- Tüncher A, Reinke H, Martic G, Caruso ML, and Brakhage AA (2004) A basic-region helix-loop-helix protein-encoding gene (*devR*) involved in the development of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.*, **52**: 227-241.
- Turgeon BG and Yoder OC (2000) Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. *Fungal Genet. Biol.*, **31**: 1-5.
- Unkles SE, Campbell EI, Carrez D, Grieve C, Contreras R, Fiers W, Van den Hondel CA, and Kinghorn JR (1989) Transformation of *Aspergillus niger* with the homologous nitrate reductase gene. *Gene*, **78**:157-166.
- Vienken K and Fischer R (2006) The Zn(II)2Cys6 putative transcription factor NosA controls fruiting body formation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.*, **61**: 544-554.
- Vienken K, Scherer M, and Fischer R (2005) The Zn(II)2Cys6 putative *Aspergillus nidulans* transcription factor repressor of sexual development inhibits sexual development under low carbon conditions and in submerged culture. *Genetics*, **169**: 619–630.
- Wada R, Jin FJ, Koyama Y, Maruyama J, and Kitamoto K (2014) Efficient formation of heterokaryotic sclerotia in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**: 325–334.
- Wada R, Maruyama J, Yamaguchi H, Yamamoto N, Wagu Y, Paoletti M, Archer DB, Dyer PS, and Kitamoto K (2012) Presence and functionality of mating type genes in the supposedly asexual filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**: 2819–2829.

- Wang CL, Shim WB, and Shaw BD (2010) *Aspergillus nidulans* striatin (StrA) mediates sexual development and localizes to the endoplasmic reticulum. *Fungal Genet. Biol.*, **47**: 789–799.
- Wang C, Zhang S, Hou R, Zhao Z, Zheng Q, Xu Q, Zheng D, Wang G, Liu H, Gao X, and other 4 authors (2011) Functional analysis of the kinome of the wheat scab fungus *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathog.*, **7**: e1002460.
- Watanabe D, Araki Y, Zhou Y, Maeya N, Akao T, and Shimoi H (2012) A loss-of-function mutation in the PAS kinase Rim15p is related to defective quiescence entry and high fermentation rates of *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**: 4008–4016.
- Wei M, Fabrizio P, Hu J, Ge H, Cheng C, Li L, and Longo VD (2008) Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genet.*, **4**: e13.
- Xiao X, Xie J, Cheng J, Li G, Yi X, Jiang D, and Fu Y (2014) Novel secretory protein Ss-Caf1 of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* is required for host penetration and normal sclerotial development. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **27**: 40-55.
- Wieser J and Adams TH (1995) *flbD* encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes Dev.*, **9**: 491-502.
- Wieser J, Lee BN, Fondon Jw 3rd, and Adams TH (1994) Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.*, **27**: 62-69.
- Willetts HJ and Bullock S (1992) Developmental biology of sclerotia. *Mycol. Res.*, **96**: 801-816.
- Wicklow DT, Wilson DM, and Nelsen TC (1993) Survival of *Aspergillus flavus* sclerotia and conidia buried in soil in Illinois or Georgia. *Phytopathology*, **83**: 1141–1147.
- Wilson BJ and Wilson CH (1964) Tokins from *Aspergillus flavus*: production on food materials of a substance causing tremors in mice. *Science*, **144**: 177-178.
- Wolanin PM, Thomason PA, and Stock JB (2002) Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.*, **3**: reviews3013.1–3013.8.
- Woo PC, Chong KT, Tse H, Cai JJ, Lau CC, Zhou AC, Lau SK, and Yuen KY (2006) Genomic and experimental evidence for a potential sexual cycle in the pathogenic thermal dimorphic fungus *Penicillium marneffei*. *FEBS Lett.*, **580**: 3409-3416.
- Wu J and Miller BL (1997) *Aspergillus* asexual reproduction and sexual reproduction are differentially affected by transcriptional and translational mechanisms regulating stunted gene expression. *Mol. Cell Biol.*, **10**: 6191-6201.
- Wu X, Zhou B, Yin C, Guo Y, Lin Y, Pan L, and Wang B (2014) Characterization of natural antisense transcript, sclerotia development and secondary metabolism by strand-specific RNA sequencing of *Aspergillus flavus*. *PLoS One*, **9**: e97814.

Wuichet K, Cantwell BJ, and Zhulin IB (2010) Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Curr. Opin. Microbiol.*, **13**: 219–225.

Yager LN (1992) Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnology*. **23**: 19-41.

Yamada O, Lee BR, and Gomi K (1997) Transformation system for *Aspergillus oryzae* with double auxotrophic mutations, *niaD* and *sC*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**: 1367-1368.

Yamada O, Lee BR, Gomi K, and Iimura Y (1999) Cloning and functional analysis of the *Aspergillus oryzae* conidiation regulator gene *brlA* by its disruption and misscheduled expression. *J. Biosci. Bioeng.*, **87**: 424-429.

Yanagisawa S, Kikuma T, and Kitamoto K (2013) Functional analysis of Aogat1 and detection of the Cvt pathway in *Aspergillus oryzae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **338**: 168-176.

Yoon J, Aishan T, Maruyama J, and Kitamoto K (2010) Enhanced production and secretion of heterologous proteins by the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* via disruption of vacuolar protein sorting receptor gene *Aovps10*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**: 5718–5727.

Yoon J, Kimura S, Maruyama J, and Kitamoto K (2009) Construction of quintuple protease gene disruptant for heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**: 691-701.

Yoon J, Maruyama J, and Kitamoto K (2011) Disruption of ten protease genes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* highly improves production of heterologous proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**: 747-759.

Yoshikawa K, Tanaka T, Ida Y, Furusawa C, Hirasawa T, and Shimizu H (2011) Comprehensive phenotypic analysis of single-gene deletion and overexpression strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **28**: 349-361.

Yun SH, Arie T, Kaneko I, Yoder OC, and Turgeon BG (2000) Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genet. Biol.*, **31**: 7-20.

Zhu L, Maruyama J, and Kitamoto K (2013) Further enhanced production of heterologous proteins by double-gene disruption ($\Delta AosedD \Delta Aovps10$) in a hyper-producing mutant of *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**: 6347-6357.

岡部知弥 (2016) 修士論文

柿寫眞, 徳増征二 (2014) 菌類の生物学 日本菌学会

北本勝ひこ (2012) 改訂版 分子麹菌学

笹栗志保 (2007) 修士論文

田中勇氣 (2015) 修士論文

村上英也 (1986) 「麹学」 日本醸造協会

山本七瀬 (2006) 修士論文

山口悠 (2009) 修士論文

和田龍太 (2012) 修士論文

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 24 年度博士課程入学
氏 名 中村 英淳
指導教員名 有岡 学

論文題目

麹菌 *Aspergillus oryzae* における菌核形成に関与する因子の探索と機能解析

序論

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、我が国の伝統的な醸造産業において日本酒・醤油・味噌などの製造に 1000 年以上にわたって利用されてきた糸状菌である。*A. oryzae* は有性世代が見つかっておらず、不完全菌として分類される。そのため交配を行うことができず、複数の株由来の優良な表現型を備えた株の育種を行うことが困難である。近年、*A. oryzae* において 2 つの接合型株（MAT1-1 型、MAT1-2 型）が存在することが明らかになったことから、ヘテロタリックな有性生殖を行う可能性が示された。

菌核は、子囊菌門および担子菌門に属する一部の糸状菌で観察される耐久性の休眠構造である。また、最近、有性世代が発見された *Aspergillus parasiticus* や *Aspergillus flavus* では、菌核内に子嚢果と呼ばれる有性生殖器官が形成されることが報告されている。*A. oryzae* では、野生株 RIB40 を含む一部の株は少ないながらも菌核を形成するが、大部分の株は菌核を形成しない。このことは、*A. oryzae* において有性世代が発見されていない理由の一つとして考えられる。

以前、*A. oryzae* において、basic helix-loop-helix 型の転写因子 SclR と EcdR が菌核形成をそれぞれ正と負に制御することが報告された。しかし、*A. oryzae* を含め他の糸状菌においても、菌核形成に関与する因子はいまだに多くが明らかになっていないと考えられる。菌

菌核形成の分子メカニズムの全貌が解明されれば、*A. oryzae* で菌核形成能が低下もしくは失っている原因を特定することができ、菌核形成の促進による有性生殖の誘導ができる可能性がある。

本研究では、*A. oryzae* の菌核形成能を向上させることを目的として、菌核形成に関与する因子の探索およびその分子機構の解明を行い、それらの知見を利用して菌核形成の誘導を試みた。

第一章 *A. oryzae* の分化における AoRim15 の機能解析

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のセリン/スレオニンプロテインキナーゼである Rim15p は栄養飢餓・熱・酸化などのストレス応答に関わる調節因子であり、有性生殖にも関与することが知られている。対して、糸状菌では分生子形成（無性生殖）、有性生殖、菌核形成などの分化が知られているが、これらにおける Rim15p に相同なタンパク質の役割はほとんどわかっていない。そこで、*A. oryzae* のゲノムデータベースから、*S. cerevisiae* の RIM15 に相同性を有する遺伝子 AO090012000420 を見だし、*Aorim15* と命名して機能解析を行った。*A. oryzae* RIB40 株に由来する NSPID1 株を用いて、*Aorim15* の破壊株と過剰発現株を作製した。分生子の熱や酸化ストレスに対する感受性試験を行ったところ、*Aorim15* 破壊株では感受性を示し、*Aorim15* 過剰発現株では耐性を示した。これにより、AoRim15 は *S. cerevisiae* の Rim15p と同様にストレス耐性に関与することが示された。また、寒天培地における生育を観察したところ、*Aorim15* 破壊株では分生子形成が 2.5% まで低下し、過剰発現株では 29% まで減少した。したがって、AoRim15 は基本的に分生子形成を正に制御しているが、発現量が高い場合は分生子形成が抑制されると考えられた。一方で、菌核形成は *Aorim15* の破壊により減少したが、過剰発現によって増加したことから、AoRim15 が菌核形成を正に制御していることが示された。これらの結果より、AoRim15 の機能が *A. oryzae* における分化誘導に重要な役割を持ち、発現量が高い場合には分生子形成を抑制し、菌核形成を促進させることが明らかにした。

第二章 *A. oryzae* の菌核形成に関与する転写因子の探索

糸状菌において、分生子形成や有性生殖のような分化に関与する転写因子は数多く報告されているが、菌核形成に関わる転写因子はあまり多くは知られていない。そこで、菌核形成に関与する因子の探索を目的として、野田産業科学研究所が所有する *A. oryzae* の転写因子遺伝子破壊株ライブラリーより、菌核形成能に影響が見られた株をスクリーニングした。菌核形成が誘導される麦芽エキスを寒天培地において、暗所条件で 10 日間 30°C にて培養した。転写因子遺伝子破壊株 352 株をスクリーニングした結果、菌核の数が減少した株が 64 株、反対に菌核の数が増加した株が 45 株見いだされた。さらに、これら 109 株で再度スクリーニングを行った結果、*sclR* 破壊株を含む 47 株において、コントロール株と比較して半分以下に菌核の数が減少していた。これらの転写因子をコードする遺伝子は、菌核形成

を正に制御する因子であると考えられた。また、反対に菌核の数が増加した株は *ecdR* 破壊株を含む 26 株見いだされ、これらがコードする転写因子は菌核形成を負に制御する因子であると示唆された。

以上の結果より、*A. oryzae* における菌核形成に関与する転写因子を見いだすことに成功した。

第三章 菌核形成に関与する因子の機能解析

第二章で見いだした菌核形成に関与する転写因子について、再現性の確認とさらなる機能解析を行った。

まず、菌核形成が最も増加した株で破壊されていた遺伝子 AO090003000678 について、機能解析を行った。同遺伝子は、*S. cerevisiae* の細胞質分裂に関与する *ACE2*、*Aspergillus fumigatus* の分生子形成を正に制御する *ace2* と相同性を有していたことから、*Aoace2* と命名した。遺伝子破壊による表現型の再現性を検討するために、NSPID1 株を用いて *Aoace2* の破壊株を作製した。*A. oryzae* の *Aoace2* 破壊株では分生子形成能が低下し、*A. fumigatus* の *ace2* 破壊株と同様の結果であった。一方、*Aoace2* 破壊株では菌核形成が顕著に増加し、この表現型は *Aoace2* を自身のプロモーターにより発現することで相補された。このことから、*AoAce2* が菌核形成を制御する転写因子であることが示された。また、*amyB* プロモーターを用いて *Aoace2* を過剰発現したところ、生育が低下するとともに、溶菌している菌糸が観察された。*AoAce2* は菌核形成を負に制御しているが、発現量が高い場合は生育の低下を招くことを明らかにした。

さらに、第二章のスクリーニングにおいて、Zn(II)2Cys6 型転写因子をコードする機能未知遺伝子 AO090010000784 の破壊株では菌核を全く形成しないことを見いだした。酒類総合研究所で公開されている *A. oryzae* 比較ゲノムデータベースにおいて、菌核を全く形成しない日本酒製造用の RIB128 株では、同遺伝子の下流側に変異が多数見られた。よって、この変異が RIB128 株において、菌核形成が見られない原因である可能性が考えられた。NSPID1 株において AO090010000784 遺伝子を破壊し、表現型の再現性を検討した。その結果、同遺伝子の破壊株では、菌核が形成されなかった。したがって、AO090010000784 は菌核形成を正に制御していることが示唆された。

第四章 *A. oryzae* の実用株における菌核形成の誘導

A. oryzae の実用株では、菌核形成が全く認められない株が大部分である。そこで、菌核形成を制御する因子の過剰発現あるいは破壊により、菌核形成の誘導を試みた。菌核を形成しない株のモデルとして、RIB128 株を使用した。菌核形成を正に制御する *scIR* および *Aorim15* の過剰発現株をそれぞれ作製したが、菌核形成の促進は見られなかった。現在、AO090010000784 を RIB128 株において過剰発現させることで菌核形成が促進されるかどうかを検討している。

次に、菌核形成を負に制御する *ecdR* または *Aoace2* を破壊して、菌核形成の誘導を試みた。*A. oryzae* の実用株では遺伝子破壊が技術的に困難であるため、非相同組換えに関与する *ligD* 遺伝子の機能欠損が必要であると考えた。そこで、ゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9 システムを用いて、いずれも菌核を全く形成しない RIB128 株、醤油製造用の RIB915 株、吟醸酒製造用 RIBOIS01 株の *ligD* 遺伝子に変異を導入した。さらに、それらの株の *pyrG* 遺伝子を破壊し、ウリジン/ウラシル要求性株を取得した。*pyrG* を選択マーカーとして *ecdR* の破壊を行った結果、RIB128 株と RIB915 株では気中菌糸が絡まった菌核形成の初期段階とみられる構造が観察されるようになった。一方で、*Aoace2* 破壊においては菌核形成の誘導は観察されなかった。以上より、RIB128 株と RIB915 株において、*ecdR* 遺伝子の破壊によって菌核様構造の形成を誘導することに成功した。

総括と展望

A. oryzae で有性生殖を誘導するためには菌核形成を促進することが重要だが、菌核形成の分子機構に関する知見は乏しかった。本研究では、転写因子遺伝子破壊株ライブラリーからスクリーニングすることにより、菌核形成に関与する転写因子を数多く見いだすことに成功した。

一方で、*A. oryzae* の実用株ではこれまで遺伝子破壊が困難であったことから、遺伝子操作による育種開発の障害となっていた。しかしながら、本研究でゲノム編集等を利用することで、*A. oryzae* の実用株において効率的な遺伝子操作が可能となった。そのうえで、これまで全く菌核形成が認められなかった実用株において、初めて菌核様構造が観察されるようになった。

本研究により、数多くの転写因子が菌核形成に関与することが明らかになり、実用株における効率的な遺伝子操作技術を開発して菌核形成が誘導できる可能性を示した。今後、菌核形成の分子機構のさらなる解明、ならびに実用株で菌核形成ができない原因を明らかにすることで、*A. oryzae* における有性生殖の誘導による産業的な交配育種の開発に貢献することが期待される。

Nakamura, H., Kikuma, T., Jin, F. J., Maruyama, J., and Kitamoto, K (2015) AoRim15 is involved in conidial stress tolerance, conidiation and sclerotia formation in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *J. Biosci. Bioen.*, 印刷中

Katayama, T., Tanaka, Y., Okabe, T., Nakamura, H., Fujii, W., Kitamoto, K., and Maruyama, J (2015) Development of a genome editing technique using the CRISPR/Cas9 system in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Lett.*, 印刷中

謝辞

本研究をおこなうにあたりまして、4年間ご指導を賜りました東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 微生物学研究室 名誉教授 北本勝ひこ先生に篤く御礼申し上げます。麹菌における菌核形成という重要な研究課題に取り組む機会と、数々の的確なご助言をいただき、深く感謝しております。いつも丁寧に、時には厳しくご指導頂きましたおかげで、この4年間で成長することができました。研究室に入室する前の、北本先生の日本酒、醤油、味噌でどれが好きかという問いに、私は味噌と答えました。博士論文の追い上げ時に、味噌汁のみで過ごした日々が続きましたが、身体を崩すことなく、無事仕上げることができたことから、麹菌の凄さを改めて実感しました。

有益なご指導ご助言を頂きました、指導教官の東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 微生物学研究室 准教授 有岡学先生に御礼申し上げます。いつも鋭い視点からの的確な指示を頂き、研究者としての姿勢と高い理念から見習うことも数多くあり、本当に勉強になりました。また、些細なことですが、博士課程の口頭試験時に励ましてくださり、勇気づけられたことを感謝しております。本当に有難うございます。

丁寧に指導して頂きました東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 微生物学研究室 助教 丸山潤一先生に御礼申し上げます。この4年間、そして最後の1年間は、研究テーマに関して様々な面で多くのディスカッションをしていただき、色々なことを学ぶことができました。私の些細な質問や要望にもいつも真剣に耳を傾け、優しく時に厳しくご指導して頂きましたことを含め、大変感謝しております。この研究室に入室する前に、博士課程の入試対策として、参考書などを教えて頂いたことを深く感謝しております。また、博士論文審査会の前日に、私の不安を取り除いて頂き大変深く感謝しております。ご迷惑をお掛けしてばかりでしたが、いつも暖かく手を差し伸べて戴きまして、本当に有難うございます。

実験手法から研究のディスカッションに至るまで大変有意義なご助言をいただきました東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 微生物学研究室 特任助教 菊間隆志先生に深く御礼申し上げます。研究者として、博士の先輩として、博士課程の過ごし方や困難に立ち向かう姿勢や熱意などを学ばせていただきました。私は微生物学研究室による師匠はいませんでした。が、菊間先生が私の師匠だと思いました。その他多くのことを尊敬の念を抱きつつ、その背中から色々と学ぶことができました。

博士論文審査をしていただきました、東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 発酵学研究室 教授 大西先生、同 細胞遺伝学研究室 教授 堀内裕之先生、応用生命化学専攻 生物有機化学研究室 准教授 作田 庄平先生、同 生物化学研究室 准教授 舘川 宏之先生に御礼申し上げます。審査会では、非常に有意義な示唆を多く与えていただき、それを基に博士論文をより良い物へとすることができました。

A. oryzae の菌核形成に関する研究について、実験手法からディスカッションまで、幅広くサポートをしてくださった南京林業大学 金鋒杰博士に深く御礼申し上げます。菌核形成の研究を行う上で、深い知見や経験からくる的確なご指摘は、研究を進める上で私を導いてくださいました。

公益財団法人野田産業科学研究所 小山泰二博士に深く御礼申し上げます。この研究における転写因子遺伝子破壊株ライブラリーの提供など、この研究の基礎を支えてくださいました。

公益財団法人野田産業科学研究所 小川真弘博士に深く御礼申し上げます。転写因子遺伝子破壊株ライブラリーの基盤を支えてくださったおかげで、有益な結果を取得することができました。また、野田産業科学研究所に伺い、丁寧に指導をして頂き、研究を進める上で私を導いてくださいました。

独立行政法人酒類総合研究所 岩下和裕博士に御礼申し上げます。**RIB** 株の分譲かつ統合的な株における分類の助言をして頂き、有益な結果を取得することができました。

東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用動物科学専攻 応用遺伝学研究室 助教 藤井渉先生に御礼申し上げます。**CRISPR/Cas9** システムのコンストラクトとプラスミドを提供してくださったおかげで、実験を行うことができました。

東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 微生物学研究室 特任研究員 片山琢也博士に御礼申し上げます。**CRISPR/Cas9** システムのコンストラクトとプラスミドを提供や他の実験についてのアドバイスなどで、実験を有意義に行うことができました。

東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 微生物学研究室に在籍していた 田中勇氣君に御礼申し上げます。**CRISPR/Cas9** システムのコンストラク

トとプラスミドを提供などで、実験を有意義に行うことができました。

東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 微生物学研究室 修士
岡部知弥君に御礼申し上げます。RIB 株の変異株の提供や他の実験についてのアド
バイスなどで、実験を有意義に行うことができました。

東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 微生物学研究室 博士
李宜海様に御礼申し上げます。私と同時期の平成 23 年 10 月に微生物学研究室に入
室した当初を今でも覚えています。共に研究生として入り、私が中部屋・大部屋で、
李様が 3 号館と別々の部屋でしたが、互いに愚痴を言い合い、励ましあい、支えあ
い、とても有意義でかけがえのない 4 年半でした。李様の今後の研究の進展とご活
躍を心からお祈りいたします。

お世話になりました全ての皆様に重ねて御礼を申し上げると共に、皆様の益々
のご活躍、そして微生物学研究室の今後の更なるご発展をお祈りします。特に、自分
が最後の追い上げ時に、皆様には色々と自分の気づかないところでも気を配っても
らったと思い、本当に感謝しています。

自分が日々気持ちよく研究室で研究・実験に打ち込めたのは皆様のおかげです。
本当に有難うございました。

最後に、自分の博士課程入学を快諾し、これまでの学生生活をすべての面で支え
てくれた父 中村彰宏、母 中村裕子に心から感謝いたします。

平成 28 年 3 月
中村 英淳