

財團法人食品工業發展研究所

生物資源保存及研究簡訊

第18卷第1期

中華民國94年5月發行

補助單位：經濟部技術處 / 執行單位：財團法人食品工業發展研究所

本期內容

中心新聞 1

◎ 歐盟MOSAICS工作會議暨「微生物資源之取得與利益分享」國際研討會

研發專欄 3

◎ 科技專案計畫成果—紅麴菌功能基因體研究

知識專欄 6

◎ *Aspergillus oryzae* 基因體的進展
◎ 專利寄存小常識

科技報導 10

◎ 生物晶片技術於絲狀真菌領域的應用
◎ *Natrinema* 菌中發現 *bop* 基因

專利微生物 12

◎ 審定公告之專利寄存生物材料



▲ MOSAICS年度工作會議於今年2月在新竹市舉行，由來自13個國家MOSAICS計畫相關合作單位之計畫成員代表，共計25人與會。當天會議由計畫總主持人比利時BCCM菌種中心 Mr. Philippe Desmeth與世界菌種保存聯盟主席Dr. David Smith 共同主持(右圖)會中Mr. Philippe Desmeth並針對微生物資源整合傳遞系統之議題進行簡報(左圖)。(圖：生資中心呂文鈞提供)

歐盟MOSAICS工作會議暨「微生物資源之取得與利益分享」國際研討會

美、日、歐與我國等十三國專家齊聚新竹 探討微生物資源之取得與利益分享之議題

聯合國機制下之生物多樣性公約(Convention on Biological Diversity, CBD)簽訂後，世界各國對於多樣性生物資源之保護、持久使用與利益共享之問題日益重視，其中歐盟針對落實微生物資源利益共享機制之議題，由其所屬科學研發委員會經費支持，比利時BCCM菌種中心主辦，發起一跨國性之研究計畫。該計畫集結經濟合作發展組織(OECD)、世界菌種聯盟，以及來自世界各洲之12個機構參與，並於1999年產出一「微生物永續使用與取得之國際規範」(Micro-Organisms Sustainable use and Access Regulation International Code of Conduct, 簡稱 MOSAICC)。之後為延續MOSAICC計畫之工作，比利時BCCM菌種中心接續邀請各國與微生物資源保存相關之單位，共同再向歐盟提出「微生物永續利用及取得之管理整合傳遞系統」(Micro-organisms Sustainable use and Access management Integrated Conveyance System, 簡稱MOSAICS)計畫，其主要內容可分為三大部分：(一)微生物資源經濟價值評估，利用建立一具有公信力之微生物經濟價值評估系統，可作為微生物利益分享交換之基礎；(二)利用及取得之管理，藉由建立一微生物利用、移轉與追蹤之標準化文件及流程，以助於國際間微生物資源訊息之交換；以及(三)整合傳遞系統，即進一步落實MOSAICC之規定，並促進各生物資源保存單位對於微生物資源之利用與取得。

MOSAICS計畫共計有16個單位參與，其中3個單位為Microbial Resources Centres Network、United National University以及World Federation for Culture Collections，其他單位則分別來自13個不同國家，包括：比利時(Belgium)、法國(France)、英國(United Kingdom)、荷蘭(Netherlands)、摩洛哥(Morocco)、秘魯(Peru)、德國(Germany)、瑞士(Swiss)、日本(Japan)、韓國(Korea)、泰國(Thailand)、斯洛維尼亞(Slovenia)及我國，由比利時BCCM菌種中心Mr. Philippe Desmeth擔任計畫總主持人。



▲ 「微生物資源之取得與利益分享」國際研討會由本所劉廷英所長致詞(左上圖)揭開序幕。本研討會邀請之演講者包括世界菌種保存聯盟主席Dr. David Smith(左下圖)；MOSAICS計畫總主持人比利時菌種中心Mr. Philippe Desmeth(右上圖)；以及美國標準菌種保存中心鍾順昌博士(右下圖)。(圖：生資中心謝松源及許文浩提供)

▲ 國際研討會邀請之演講者：左上圖為日本Tamagawa University之Dr. Toru Okuda；左下圖為日本Japan Bioindustry Association之Dr. Seizo Sumida；右上圖為我國中央研究院生物多樣性研究中心主任邵廣昭博士；以及右下圖為本所廖啓成副所長。(圖：生資中心謝松源及許文浩提供)

本所生資中心獲MOSAICS計畫總主持人比利時BCCM菌種中心Mr. Philippe Desmeth之邀請，並獲得行政院國家科學委員會經費支持，參與歐盟MOSAICS計畫。希望藉由此國際合作計畫，與國外合作單位建立實質合作關係，提昇我國在生物資源領域於國際間之能见度；並協助建立具國際共識之微生物永續利用與取得之管理整合傳遞系統，以落實微生物資源利益分享機制。

本所生資中心自2004年參與MOSAICS計畫開始，除定期參與計畫相關之工作會議外，並希望爭取2005年工作會議及國際研討會於我國舉辦。經本所積極爭取，MOSAICS年度工作會議已於2005年2月21日在我國新竹國賓大飯店會議廳舉行，並於次日舉辦對外公開之國際研討會。工作會議當天有來自13個國家MOSAICS計畫相關合作單位之計畫成員代表，共計25人與會，包括：MOSAICS計畫總主持人比利時BCCM菌種中心Mr. Philippe Desmeth(比利時)、世界菌種保存聯盟(World Federation for Culture Collections, WFCC)主席Dr. David Smith(英國)、世界菌種保存聯盟前任主席Dr. Jean Swings(比利時)等人。

另外，本所生資中心與比利時BCCM菌種中心於MOSAICS工作

會議結束之次日，假本所場地共同舉辦「微生物資源之取得與利益分享」國際研討會。本研討會係由行政院國家科學委員會與歐盟科技計畫經費補助，會中邀請Dr. David Smith(英國)、美國標準菌種保存中心(American Type Culture Collection, ATCC)鍾順昌博士(美國)、Mr. Philippe Desmeth(比利時)、Universite Catbolique de Louvain之Dr. Tom Dedeurwaerdere(比利時)、The Japan Research Institute之Dr. Mikihiko Watanabe(日本)及Japan Bioindustry Association之Dr. Seizo Sumida(日本)、以及我國中央研究院生物多樣性研究中心主任邵廣昭博士、本所廖啓成副所長專題演講，其分別從經濟、法制等層面，由產業、學術等角度探討微生物資源之取得與利益分享機制，並討論生物資源中心在此機制所扮演之角色。研討會當天除有來自12個不同國家之21位國外學者專家與會外，國內相關政府機關，包括行政院農業委員會、經濟部智慧財產局等代表，與產學界專家也共襄盛舉，共計約180人參與此次研討會。

2005年工作會議出席人員如下：

比利時BCCM菌種中心Mr. Philippe Desmeth(比利時)、世界菌種保存聯盟主席Dr. David Smith(英國)、世界菌種保存聯盟前任主席Dr. Jean Swings(比利時)、美國標準菌種保存中心鍾順昌博士(美國)、Universite

Catbolique de Louvain之Dr. Tom Dedeurwaerdere(比利時)、比利時BCCM菌種中心Ms. Marleen Bosschaerts(比利時)、日本National Institute of Technology and Evaluation之Dr. Masahiro Miyazaki、Dr. Katsuhiko Ando及Dr. Manabu Suto(日本)、Japan Bioindustry Association之Dr. Seizo Sumida(日本)、Tamagawa University Research Institute之Dr. Toru Okuda(日本)、The Japan Research Institute之Dr. Mikihiko Watanabe(日本)、Ochanomizu University之Dr. I-Jung Lee(日本)、University of Ljubljana之Dr. Bojana Boh(斯洛維尼亞)、Thailand Institute of Scientific and Technological Research之Dr. Vullapa Arunpairojana(泰國)、Centraalbureau voor Schimmelcultures(CBS)之Dr. Joost Stalpers(荷蘭)、Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique(CNRST)之Dr. Mohamed Amar(摩洛哥)、Australian Government Department of Agriculture之Dr. David Cunningham(澳洲)、Korea Institute of International Economic Policy(KIEP)之Dr. Mikyung Yun(韓國)、Catholic University of Peru Attorney-at Law之Dr. Ana Mar a Pacon(秘魯)、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur GmbH之Dr. Brian J. Tindall(德國)，以及我國食品研究所廖啓成副所長、袁國芳主任、朱文深副主任，以及陳玉芬管理師。

(文：生資中心呂文鈴提供)



生資中心執行經濟部科技研究發展專案計畫「基因庫及遺傳資源的收集保存與研發四年計畫」，今年邁入第四年，在過去三年(91-93年)的執行成效上，重要指標是台灣獨立完成且在國際上第一株同時具醫藥與保健食品開發之真核生物紅麴菌全基因體定序草圖，該菌株同時是台灣本土分離株。紅麴菌全基因體定序草圖的完成及功能的研究註解未來可提供在新產品開發、發酵製程及菌株改良的研發效益。

I. 紅麴菌功能基因體研究

1. 完成紅麴菌全基因體序列組裝草圖

生資中心結合陽明大學基因體醫學國家型計畫核心設施以及賽亞基因科技公司在DNA定序上之能量，以全基因體shotgun定序的策略，建立三種範圍插入片段大小之shotgun基因庫，完成大於10倍的定序工作。生資中心並篩選定序品質良好之紅麴菌序列進行全基因體序列之組裝，建立709個

contig，基因體大小為26.8 Mb之紅麴菌全基因體序列組裝草圖，涵蓋率為99.1%。生資中心同時建立與分析紅麴菌EST序列表現標幟組裝，挖掘六仟多筆具功能性之基因，其中約一仟筆為未知功能基因，可能為紅麴菌獨有之基因。

2. 紅麴菌二次代謝相關蛋白質體資料庫之建立

生資中心利用蛋白質二維電泳技術與串聯式質譜分析，完成紅麴菌生產Monacolin及色素生成相關蛋白質體之解析。並建立紅麴菌二維電泳實驗資料管理系統，完成紅麴菌蛋白質體二維電泳式樣圖譜與蛋白質質譜分析資訊之整合，建立紅麴菌二次代謝相關蛋白質體資料庫。由紅麴菌蛋白質體整合資訊，進一步分析及探討特殊蛋白質差異表現與紅麴菌二次代謝之相關性，並作為基因體功能註解及紅麴菌開發改良之參考。

3. 紅麴菌的轉型技術之建立及基因表現之研究

在紅麴菌功能基因體的研究方面，著重在紅麴菌轉型技術

的開發及polyketide (PK)生合成相關基因及其產物的探討。在紅麴菌基因轉型方法的研究上，除了使用電穿孔轉型(electroporation)以及PEG轉型等較傳統方式外，也成功的開發了以農桿菌轉染紅麴菌無性孢子之轉型技術，轉型效率較高，以解決傳統方式效率低落的問題。

4. 紅麴菌代謝圖譜之研究

利用HPLC及LC-Mass分析紅麴菌二次代謝產物。分別收集不同培養天數之培養菌液並建立二次代謝物指紋圖譜，其中包括：monacolin K生產菌株、色素生產菌株、GABA生產菌株及不產色素菌株。由指紋圖譜結果中顯示一些未知二次代謝產物，將陸續完成其結構鑑定工作。

II. 推動紅麴菌基因體商業化應用研發聯盟

國際上目前積極進行真菌功能性基因體研究，目的就是希望可以發掘具潛力候選藥物，尤其是目前發現許多具生理活性的物質是天然資源裡才有，無法以化學合成或合成步驟繁複等之瓶頸。若說以前是化學驅動新藥開發，那現在就是生物技術驅動，且真菌的天然二次代謝物就是蘊藏此豐富資源的優勢，但是這些天然的二次代謝物又必須結合基因體訊息的分析、基因功能及表現等，才能知道某代謝化合物與其在生物體內被合成的途徑，與所具有的生理活性之間有著什麼樣的關聯性，也因此才能進一

步去開發潛力的候選藥物，或建立組合生物合成開發衍生物分子庫(chemical library)等。因此本所積極籌組紅麴菌基因體研發聯盟，以擴大產業效應，並冀以商業化為導向進行基因體研發，已完成「紅麴菌基因體商業化應用」研發聯盟先期研究推動計畫的申請及

審查，未來將朝向精緻化保健產品、檢測工具、生物轉換及新藥物開發為短中長期之目標。

III. 基因資源對外服務內容

執行本計畫建立基因體研發

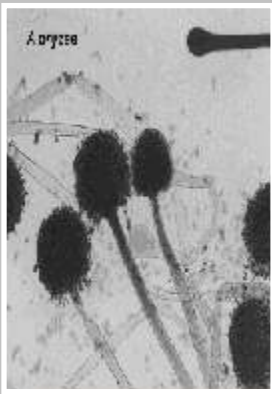
相關的技術，包含基因庫構築及保存技術，高通量(high throughput)定序技術，蛋白質體二維電泳分析技術，紅麴菌表現系統及轉型技術，代謝物分離純化與結構鑑定技術，生物資訊環境建構與序列組裝分析技術等，並提供產技術及資源，下表為提供之服務內容及說明：

服務類別	服務說明
基因資源之提供	
Human Full-length cDNA library	Sequence verified MGC Human full-length cDNA library (IRAT, IRAU)
水稻BAC基因庫	中研院植物所建構之 <i>Oryza sativa</i> 水稻(蓬萊稻)臺農67號水稻BAC基因庫(OSJTBa, OSJTBb)
草蝦fosmid基因庫	BCRC/FIRDI 建構之草蝦fosmid基因庫(shf01)，平均insert size為31.8 kb，基因體覆蓋率超過10倍
SARS clones	臺大醫學院建構之SARS TW1 clones共29株
菌株核酸萃取	
Genomic DNA抽取	一般菌株 (10 μ g DNA)
Genomic DNA抽取	厭氣菌株 (10 μ g DNA)
其他生物資源及特殊濃度需求	依客戶需求提供服務
基因庫質體抽取及定序	
cDNA基因庫單向定序	以96孔盤為單位，包括菌體培養、DNA抽取、定序與序列品質分析
cDNA基因庫雙向定序	以96孔盤為單位，包括菌體培養、DNA抽取、定序與序列品質分析
Shotgun基因庫雙向定序	以96孔盤為單位，包括菌體培養、DNA抽取、定序與序列品質分析
Copy control fosmid基因庫雙向定序	以96孔盤為單位，包括菌體培養、DNA抽取、定序與序列品質分析
Copy control BAC基因庫雙向定序	以96孔盤為單位，包括菌體培養、DNA抽取、定序與序列品質分析
基因庫保存服務	
快速菌落點選及複製	基因庫大量菌落點選及複製，提供2個copies，以384微孔盤保存
複製	同規格微孔盤之菌落複製
96微孔盤與384微孔盤互轉	96微孔盤與384微孔盤互轉，以384微孔盤數量為計價基礎
基因庫建構服務	
BAC基因庫建構	依客戶需求，提供BAC基因庫建構服務，目前已有建構真菌、細菌、豬及雞等BAC基因庫之經驗

服務類別	服務說明
Full-length cDNA基因庫建構	依客戶需求，提供full-length cDNA基因庫建構服務，目前已有建構紅麴菌full-length cDNA基因庫之經驗
Fosmid基因庫建構	依客戶需求，提供fosmid基因庫建構服務，平均insert size為35-40kb
Cosmid基因庫建構	依客戶需求，提供cosmid基因庫建構服務，平均insert size為35-40kb
cDNA基因庫建構	依客戶需求，提供cDNA基因庫建構服務
Shotgun基因庫建構	依客戶需求，提供shotgun基因庫建構服務，DNA來源可為genomic DNA、BAC clone或fosmid clone等
Macroarray及其它相關服務	
菌落雜交試驗	提供22x22 cm ² 濾紙之菌落雜交試驗
高密度菌落濾紙之製備	提供22x22 cm ² 之菌落濾紙，每張最高點菌數為384x6x6 (13,824個菌落)
其它	基因選殖、轉形等基因工程相關服務
蛋白質體二維電泳分析	
蛋白質體電泳分析系統	由委託者提供蛋白質樣品以進行蛋白質體電泳分析，包括使用IPGphor進行一維電泳(IEF)及Ettan system進行SDS-PAGE之二維電泳(2-DE)；可選擇不同大小之膠片(7, 13, 24 cm), 以colloidal Coomassie Blue染色，並以白光掃描
二維電泳系統及螢光染色	蛋白質體二維電泳及使用SyproRuby進行螢光染色
螢光蛋白質影像掃描系統	使用Typhoon 9200螢光掃描儀進行蛋白質電泳膠片之螢光影像掃描，可調整不同倍增管(PMT)之voltage值
二維電泳圖譜影像分析	以軟體進行蛋白質電泳膠片之影像分析比對，有兩種軟體可供選擇，以每片膠片計價
二維電泳蛋白質點點選切割	以Ettan spot picker進行自動化點選切割，以每一個96-well plate計價
蛋白質點膠體內酵素水解	以Ettan digester進行自動化膠體內trypsin水解，以每個蛋白質點計價
生物資訊服務	
生物資訊環境建構服務	基因體序列分析之工具整合及平台環境建置，包含高效能定序品管、EST序列組裝歸群、全基因體序列組裝、序列功能分析
分散式Blast比對分析及其通報服務	利用NCBI的Blast工具進行序列(包含核酸序列、胺基酸序列)之比對，可執行1000筆以上且多資料庫的比對，並可及時通報比對資料更新的結果
生物資料整合解決方案	生物資料庫的建置整合(包含公有領域及in house資料庫)

註：生資中心其他服務項目與相關費用，請見本中心網站中之對外服務訊息。

(<http://www.bcrc.firdi.org.tw>)。生資中心對外服務聯絡窗口總機：03-5223191菌種諮詢服務一分機511；寄存代購服務一分機513；菌種銷售服務一分機248；試驗鑑定服務一分機512；傳真：03-5224172



Aspergillus oryzae 基因體的進展

Progress of *Aspergillus oryzae* genomics

生資中心／副研究員
林佩怡

圖： <http://www.vscht.cz/kch/galerie/houby.htm>

一、前言

絲狀真菌像酵母菌一樣屬於真核微生物，也廣泛應用在工業上生產很多種的酵素，包含 lipase、laccase、-amylase 等。在這些絲狀真菌中，*Aspergillus oryzae* 是最有潛力來分泌生產蛋白的菌種，並且應用在日本傳統發酵工業已有數百年的歷史，產品例如 sake(米酒)、miso(味噌)與 soy sauce(醬油)等等。*Aspergillus oryzae* 屬於 *Aspergillus* 之 *flavi* 屬，此屬分為會產生黴菌毒素(mycotoxin)之 *A. flavus* 與 *A. parasiticus* 以及無毒性之工業用菌之 *A. oryzae* 與 *A. sojae* 兩類。於在日本發酵工業的另一個顯著的特徵就是使用固態培養(solid-state culture，俗名又稱為 koji)來提昇蛋白質的生產力，因此，*A. oryzae* 與 *A. sojae* 也稱為 koji molds。也因為其悠久的歷史應用在食品工業上，因此 *A. oryzae* 被美國 FDA 機構列在對人體安全(Generally Recognized As Safe)的名單之內(Machida M. 2002)。由於在過去，發酵工業只能藉由監控目

標蛋白質生產量之有限的判斷標準來衡量；因此，需要一個可以廣泛地監控整個發酵工業之基因表現的方法。就在最近的1998年，開始了 *Aspergillus oryzae* 基因體的定序，並藉由全基因體 shotgun sequencing 的方法，使其可以在短時間內完成基因體的定序。

大部分的絲狀真菌的基因體大小預計為30-40 Mb，基因數目預計有9000到13000個以及數個長度從2到10 Mb的染色體。以下簡單地介紹數個與 *A. oryzae* 基因體相關的絲狀真菌的基因體之重要背景與現況。*Aspergillus nidulans* 是所有 *Aspergillus* 基因體中最早被定序完成並做為基因體研究的 genetic model，Cereon 基因體

(Monsanto)在1998年以3倍覆蓋率完成定序，而這些序列於2001年4月已經公佈在Cereon的網址(<http://microbial.cereon.com>)上可供學術研究。*Aspergillus fumigatus* 是造成人類許多嚴重疾病的致病菌，其基因體定序是由 Wellcome Trust Sanger Institute 與 TIGR(The Institute of Genome Researads)進行並於2001年5月完成。*Aspergillus niger* 也是工業上用來生產酵素與代謝物的重要用菌並且其基因體定序是由 Gene alliance 與 Integrated Genomics 利用 BAC 定序方法所進行並也已經在2001年完成。上述物種之基因體序列資訊的摘要整理於下表表一。由表一可知其皆包含有八條染色體，*A. niger* 與 *A. oryzae* 的基因體大小皆比 *A. nidulans* 與 *A. fumigatus* 大些；其相對應地也擁有較多數目的基因(約14,000個)。另外，藉由比較不同 *Aspergillus* species 跟其它類的真菌可以發現它們個別之間獨特的特徵。如通常將 *Neurospora crassa* 的基因體加進來主要是應用在遺傳與演化的分析，其完整的基因體的草圖是在2001年9月所公開(Archer D and Dyer P. 2004)。

表一、*Aspergillus* species 之基因體序列資訊一覽表

Table 1 Summary of information derived from the genome sequences of <i>Aspergillus</i> species.				
	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. oryzae</i>
Genome size (Mb)	29.6	30.1	36.9	36.7
GC content (mole %)	50	50	50	48
Predicted genes	9746	9967	14097	14063
Coding (as % of total)	49.1	50.9	55.2	45.1
Mean gene length (bp)	1442	1536	1393	1178
Genes with introns (%)	76	89	87	81
Genes with Pfam hits	4403	4612	6306	6806

This table was compiled from the data in websites (Table 2) and from contributions from William Nierman (TIGR, USA), James Galagan (Broad Institute, USA), Masa Machida (Tsukuba, Japan), and Gert Groot and Noel van Peij (DSM, The Netherlands).

(Archer D. and Dyer P. 2004. Curr. Opin. in Microbiol. 7: 499-504.)

二、*Aspergillus oryzae* 基因體的發展與現況

大規模EST定序的努力開始於日本 Advanced Institute of Industrial Science and Technology (AIST) 機構的 M. Machida 博士以及其相關的機構所共同進行。他們挑選 *A. oryzae* RIB40 (ATCC-42149) 菌株做為定序菌株，該菌株為野生型 (wild-type) 菌株可以生產 proteinase。並將其培養在各式各樣不同培養的環境下，包括高溫、有無碳原等等。預期這樣將可以增加從有限數目的 EST 中找到新基因的機會。此外，還有三個基因庫 (libraries) 是分別使用麥糠 (wheat bran)、米糠 (rice bran) 與黃豆糠 (soybean-curd refuse) 三種不同固態培養所培養出來的菌絲建構而成，通常 amylase 與 protease 在固態培養時的產量會比液態培養的量多出許多。因此，預期這三個基因庫的資訊將對 *A. oryzae* 生產力的提昇有很大重要性 (Maeda H, et al. 2004)。

至目前為止所有定序的 EST 數目有 16,808 筆，而 clustering 完之後，所有 nonredundant 序列大約有 6,000 筆，其總長度為 4.5 Mb，等於 13-15% 的 *A. oryzae* 基因體的總長度。估計的總共基因數量為 14,063 個，*A. oryzae* EST 的 database 可以從日本 AIST 之 Research Information Database (RIO-DB) 機構的網址 (<http://www.aist.go.jp/RIODB/ffdb/index.html>) 所獲得。高度表現的

EST (如高度表現基因) 數量少於 500 筆，僅佔所有預計基因總數量的 5%；但 singletons 的數量在這 16,808 筆 EST 中仍佔有 66% 的比率。出現頻率高的 EST，一般也認為是當這些菌絲培養於某些特定情況時所高度表現的。由於強壯或可誘導性的啟動子在用於送入外來基因於細胞內表現時是很有用的，而高度表現的 EST 通常可以用來發現新的強壯啟動子。基於觀察前 20 名高度表現 EST 的一半幾乎都是糖解作用 (glycolytic) 的基因，即所謂的 house keeping genes。

為了廣泛分析 *A. oryzae* 基因的核苷酸序列以及其位於染色體上的位置，M. Machida 等人在 1998 年開始展開大規模的 EST 定序計畫。其 DNA 的基因庫是由 AIST 所製備，而大規模的定序是由 National Institute of Technology and Evaluation (NITE) 所進行。這個團隊的目標是專注在 *A. oryzae* 基因功能的分析以及統整從基因體來的數據並在 2002 年一月時完成 *A. oryzae* 基因體的大略草圖，其 contig 是由全部序列之 6 倍覆蓋率所組成。*A. oryzae* 基因體包含八條大小從 2.8 到 7 Mb 的染色體，且總共基因體大小預計為 36.8 Mb。

三、相關的技術與應用

基因的操作與破壞 (Gene Manipulation and Disruption)

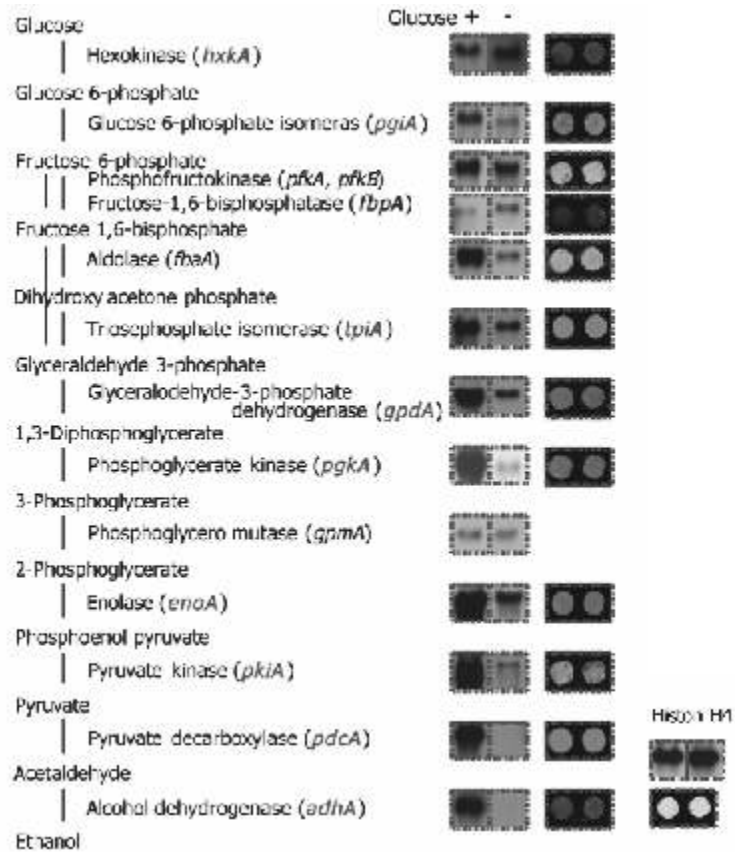
現今遺傳工程的技術已經可以將分子生物技術應用到工業真菌上，目前已經有藉由送入多套數的基因來製備具有提昇生產能力的轉型株。而轉錄調節的廣泛分析使科學家可以理解轉錄的網路系統並且可以在工業設定時預測 *A. oryzae* 對人工修改時的反應。另外，基因的破壞是研究基因功能最重要的方法，然而由於 *A. oryzae* 細胞與分生孢子柄 (conidiophores) 為多核，因此並無法保證基因有完全地被破壞。最近一個新的方法是由 Hatamoto 等人於 1999 年利用 positive 與 negative 兩種篩選的 marker 以及這個 polyphenol oxidase (laccase) 基因對 *A. oryzae* 進行轉型作用，而這個轉型株後續可以藉由數代的顏色篩選，來推測所有的細胞核皆含有這個 cassette。而另一個將基因不活化的機制是利用 anti sense 的技術，但是其目標基因的表現仍然無法完全地被抑制。

基因表現

用 DNA microarray 來做基因表現的廣泛分析是目前研究基因功能與發現有用新基因最強而有力的方法。*A. oryzae* 的 cDNA microarray 藉由 mRNA 的 expression profile 分析不僅可以用於基礎研究還可以用來監視與控制整個發酵過程。作者從 EST database 中挑選了大約 2000 個 clones 進行第一代 cDNA microarray 的製備。此 cDNA microarray 包含了大部分跟代謝能量產生相關之重要的糖解作用 (glycolytic pathway (EMP)) 與

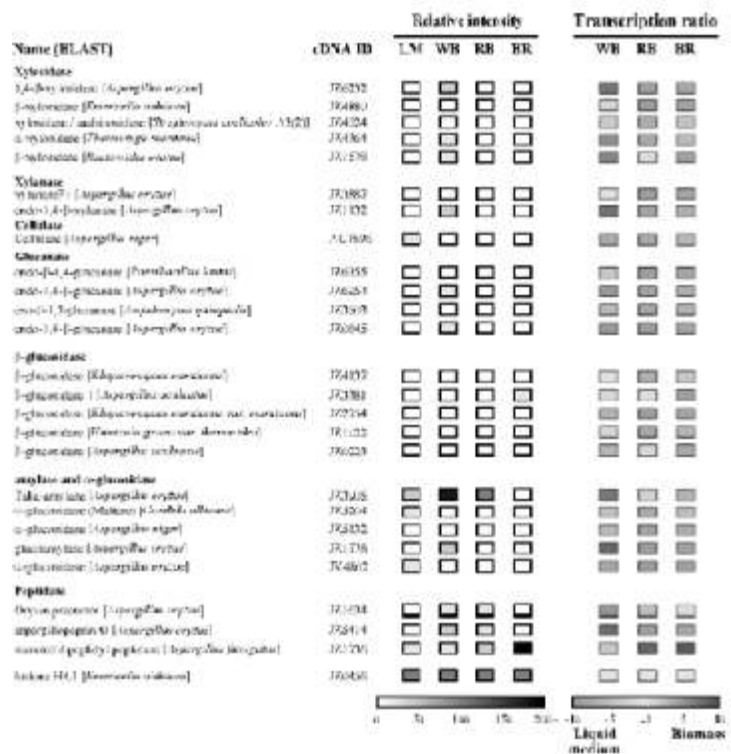
TCA cycle(tricarboxylic cycle)的基因。圖一顯示出用cDNA microarray與 northern hybridization方法來比較這些糖解作用酵素基因的表現，大部分的基因除了fbpA(合成fructosebispophatase之基因)以外確認是可以被glucoses所誘導表現。另外，大部分糖解作用與TCA cycle的代謝基因在富含glucose時表現量都比缺乏glucose情況下高；推測出當富含glucose時，*A. oryzae*會都使用EMP與TCA兩種代謝來做為glucose的代謝 (Machida M. 2002)。

*A. oryzae*的固態發酵可以提昇水解酵素的產量，然而固態發酵工程較花人力且很難自動化。因此為了進一步提昇固態培養的生產力，必須要破解其高生產力的分子機制；現在已經可以利用DNA subtraction的技術找出專一性提昇固態培養的基因。如Ishida等人於1998年發現*glab*是產生固態培養專一性表現的酵素基因，並指出固態專一性的誘導機制主要是因為低水活性 (low water activity)與物理性隔閡(physical barrier)所致，而其誘導胞外蛋白質的分泌也因應者細胞代謝的全面性改變。而Maeda等人利用cDNA microarray來研究三種工業上常用的固態培養基其水解酵素與能量代謝(energy catacolim)基因的表現，其中以使用麥糠(wheat bran)的水解酵素表現量最高，但代謝基因(EMP與TCA)的表現量卻最低(圖二)；其代謝基因的低表現是



圖一、利用cDNA microarray與northern hybridization分析糖解作用基因的表現

(Machida M. 2002. Adv. Appl. Microbiol. 51: 81-106.)



圖二、分析三種固態培養之水解酵素的基因表現

(Maeda H. et al. 2004. Appl. Microbiol. 65: 74-83.)

因為產生代謝抑制(catabolic repression)作用，進而導致水解酵素的高度表現。因此，DNA microarray可以提供提昇固態發酵生產力機制的重要資訊(Maeda H. 2004)。

蛋白質體學(proteomics)

蛋白質體的分析一般是利用二維電泳來進行分析。當*A. oryzae*基因體完成時，可利用mass spectrometry來加速此分析，蛋白質體學也可以提供監控發酵過程時的資訊與直接應用。

生物科技

雖然 *Aspergillus species* 已經廣泛地應用在酵素與代謝物的發展，但不像酵母菌 *S. cerevisiae* 基因體的序列已經獲得很久，其基因體序列卻只在最近幾年才獲得。雖然 *A. terreus* 尚未有完整的基因體序列，但目前已有完善的方法可以研究 *Aspergillus terreus* 代謝物(如lovastatin)的生產並已經有array來分析其基因體片段。另外，*A. oryzae* 基因體的研究也可以提供開發 *A. oryzae* (與其非常相近的 *A. sojae*) 在食品工業上菌

種開發之分子遺傳基礎的根據，以及研究其他相近會產生高毒素且致癌之 polyketide (aflatoxins) 的 *A. flavus* 與 *A. parasiticus*。因此，藉由比較 *A. flavus* 與 *A. oryzae* 的基因體將可以提供這個解釋。確切地，*A. flavus* 的基因體定序目前正在進行中 (<http://www.cifr.ncsc.edu/aspergillusflavus/Genomics.html>)。

四、結論

整個發酵過程與微生物體的各项生物功能相關，包括代謝、生合成以及分泌酵素等反應。因此，廣泛的分析基因、蛋白質、基因表現與蛋白質的交互作用就如之前廣泛地以模式生物(model organism)來做研究一樣，將會建立研究 *A. oryzae* 時所不可或缺的知識，但 *A. oryzae* 當與模式生物相比時本身在基礎遺傳學與分子生物學上仍有重大的困難點的存在。*A. oryzae* 的基因體合併與發酵工業之研究發展所累積的資訊將使我們可以模擬與預測在某些特殊的環境條之下 *A. oryzae* 培養的反應。又基於 *A. oryzae* 對人

類消費的安全性，可以有效分解許多有機物質以及對細胞外的環境有耐受性等之優點，*A. oryzae* 基因體學計劃將引領者我們進入發酵工業的新世代，不僅可用來增加工業上能源的應用效率並可以保護我們的環境。

五、參考文獻

1. Machida M (2002). Progress of *Aspergillus oryzae* genomics. *Adv Appl Microbiol* 51:81-106.
2. Maeda H, et al. (2004). Transcriptional analysis of genes for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence tags. *Appl Microbiol Biotechnol* 65 :74-83.
3. Archer D and Dyer P (2004). From genomics to post-genomics in *Aspergillus*. *Curr Opin in Microbiol*, 7:499-504.
4. 亞太協會 & 食品研究所, BioTaiwan 2002. 真菌生命體之探索.

專利寄存小常識

問題：決定專利生物材料寄存前，應該考慮什麼呢？

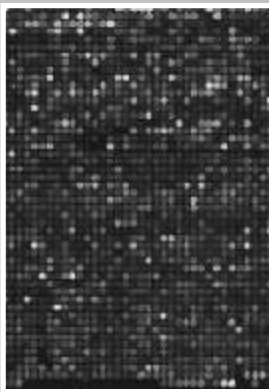
回答：決定是否寄存，除了必須考量寄存是否為獲得專利所必要，也須從分讓角度考量。分讓角度之考量很重要，寄存時應有所瞭解。

專利生物材料寄存的效果之一是，當對應專利核准公告後，所寄存的生物材料必須公開給一般大眾申請分讓；一旦專利公告後，寄存者無法改變生物材料公開分讓之狀態。但寄存者也不必過度憂慮，因為受分讓人對生物材料之利用，除了在專利核准範圍內受專利權限制外，也受到寄存辦法有關(1)僅可作為研究或實驗目的使用及(2)不得將生物材料再提供給他人之等限制；此外，食品所也會將受分讓人的名單即時提供給寄存者，使寄存者知道生物材料的流向。

有關分讓規定詳見「有關專利申請之生物材料寄存辦法」第十六及十七條。

諮詢窗口：專利寄存業務請洽生資中心03-5223191分機513劉小姐。

(文：生資中心管理師陳玉芬)



生物晶片技術於絲狀真菌領域的應用

生資中心/副研究員
涂景瑜

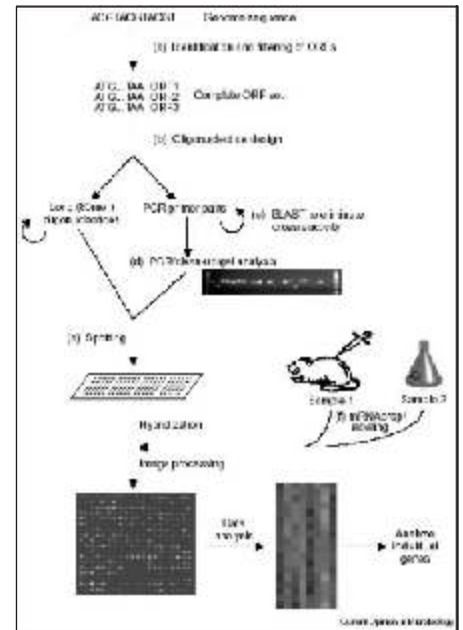
圖：生資中心 涂景瑜提供

生物晶片，簡言之，是利用機器手臂將成千上萬代表基因訊息的DNA片段點製在如玻璃載玻片等固態基質上，製備出類似郵票大小的產品，可加速傳統基因探勘流程。實驗流程主要是將欲探討的樣品mRNA轉變成具螢光標誌的DNA，與晶片進行雜交反應，促使標定的螢光DNA與晶片上同源的序列片段相結合，以雷射掃描儀擷取反應後晶片的螢光影像，隨後將影像轉成數據，利用叢集分析螢光數值高低進而歸納出基因表現的差異。

近年來已有36個不同真菌種的全基因體計畫正在進行，截至2005.05止僅完成9個全基因體(資料源自NCBI網站)。相較於人類、老鼠、酵母菌等成熟的模型系統，欲將生物晶片技術應用於絲狀真菌領域須先進行其基因庫建構與基因定序等繁雜程序，但生物晶片巨觀探勘的優勢仍吸引不少學者分別針對如 *Aspergillus nidulans*(Sims A.H. *et al.*, 2004)、*Aspergillus oryzae*(Maeda H *et al.*, 2004)與 *Neurospora crassa* (Aign V *et al.*, 2003)，以自行製備的cDNA晶

片探討因培養基成分改變所引起的基因轉錄差異；再者也有針對 *Fusarium verticillioides* 中會受到外在環境因素調控的黴毒素Fumonisin生合成途徑，以生物晶片策略探討宿主、培養基與酸鹼值等多重因子所影響的基因表現差異，獲得更多與黴毒素Fumonisin生合成調控機制相關聯的基因群(Pirttila A.M. *et al.*, 2004)；甚至利用以基因體片段建構的晶片探討 *Histoplasma capsulatum* 中與生活型態轉變相關的基因表現差異，同時發現其具依賴溫度的5'端未轉錄區域的轉譯調控機制(Hwang L *et al.*, 2003)；更有一稻熱病菌 *Magnaporthe oryzae* 的全基因體晶片(安傑倫)問世，以利其相關致病機制與病菌防治的研究。

雖絲狀真菌受限於貧瘠全基因體序列資源，需額外花心思建構其獨特的cDNA或genomic microarray以進行相關晶片實驗，但此不足處卻讓其創造出研究的獨特性。其目前研究方向可分為兩大類：產業相關菌種較專注於基礎醣類代謝與酵素合成方面；而致病菌種則偏向毒素生成與致病機制的探索。



生物晶片製作與實驗流程圖

(a)由基因體序列分析找出基因的開放讀碼區ORF(open reading frame)(b)設計寡核苷酸序列(c)利用序列相似性比對降低交叉重疊性(d)利用聚合酶連鎖反應分析確認(e)將DNA點在晶片上，再由實驗組與對照組產生的mRNA進行不同顏色標定後，雜交反應，圖形處理，資料分析後進行基因表現差異的歸群分析。(Curr. Opin. in Microbiol. 2002. 5:372378.)

參考文獻

1. Aign V, Hoheisel JD. Fungal Genet Biol. 2003 Dec;40(3):225-33.
2. Hwang L, Hocking-Murray D, Bahrami AK, Andersson M, Rine J, Sil A. Mol Biol Cell. 2003 Jun;14(6):2314-26.
3. Maeda H, Sano M, Maruyama Y, Tanno T, Akao T, Totsuka Y, Endo M, Sakurada R, Yamagata Y, Machida M, Akita O, Hasegawa F, Abe K, Gomi K, Nakajima T, Iguchi Y. Appl Microbiol Biotechnol. 2004 Jul;65(1):74-83.
4. Sims AH, Robson GD, Hoyle DC, Oliver SG, Turner G, Prade RA, Russell HH, Dunn-Coleman NS, Gent ME. Fungal Genet Biol. 2004 Feb;41(2):199-212.
5. Pirttila AM, McIntyre LM, Payne GA, Woloshuk CP. Fungal Genet Biol. 2004 Jun;41(6):647-56.



*bop*基因所合成的蛋白質為Bacteriorhodopsin(BR)。Bacteriorhodopsin(BR)為由249個胺基酸所組成的蛋白質，分子量約27 kDa，結構為7條 α -helix和2條 β -sheet並結合一retinal分子，因此又稱為retinal protein，普遍存在極端好鹽古生菌的細胞膜中。當光照射此蛋白質時，retinal分子的結構會由all-trans型式轉變成13-cis型式，並釋放一氫離子，由於此氫離子於BR胺基酸之間傳遞，造成BR具有BR、K、L、M、N和O等六種形態，且隨著形態的不同BR所吸收光的波長亦不相同，進而形成一光循環反應。BR主要功能為運送 H^+ ，為一light-driven proton pumps，且由於其可將光能轉變為化學能(ATP)，因此含有BR的微生物可生存於只有光源而無其它碳源或氮源的地方。一般而言，膜蛋白的穩定性不高，容易變性，不易結晶，難以進行結構分析，更別談了解其結構和活性區的特性。但雖然BR為膜蛋白，可是由於其於細胞膜上以三個BR分子為一單位，形成三

體形式二維六角形晶格的穩定結構，故為非常穩定的蛋白質，在溫度範圍 $-30^{\circ}C \sim 140^{\circ}C$ ，pH值1~10的情況下依舊保有其活性，因此非常適合開發應用。且由於BR可受光趨動產生電子梯度的性質，目前多用於光學和電學的研究發展，並朝向生物記憶體元件、生物電腦、人工視網膜、全像術、生物能源上的開發應用。目前德國MIB公司以BR為材料，開發出底片、身分證等多項產品。

Xu等人於新疆的阿牙克庫木湖中分離出一嗜鹽古生菌，並命名為AJ2。由16S rDNA序列的比對結果中顯示AJ2和*Natrinema*菌屬較為相似，但其相似度小於97.7%，因此推測AJ2應為*Natrinema*菌屬中的一新成員。設計*bop*基因的專一性引子進行PCR反應，並將所得序列和*Hbt. Salinarium*及arg-4菌株的BR蛋白質之胺基酸序列進行比對，發現其和arg-4菌株的BR蛋白有94.7%的相似度，而和*Hbt. Salinarium*菌株的BR蛋白相似度則低於60%，顯似於AJ2中的

*bop*基因所合成的蛋白質不同於先前所被研究發表的BR蛋白質。進一步分析AJ2和*Hbt. Salinarium*菌株BR蛋白質的親疏水性胺基酸分布情形，發現所得的hydropathic profile相似，推測此二種蛋白質以相同的方式進行摺疊，應具有相同的功能。由此證明於AJ2中所發現的*bop*基因所合成的蛋白質為新型的BR蛋白質。目前已被發現含有*bop*基因的好鹽古生菌菌屬為*Halobacterium*、*Haloarcula*、*Halomicrobium*、*Halorubrum*和*Haloterrigena*等五種菌屬，而於先前的研究中並未在*Natrinema*菌屬中發現有*bop*基因的存在，因此AJ2菌株為第一個被發現於*Natrinema*菌屬中含有*bop*基因的菌株，此一發現也為BR的研究發展上提供了新菌種和蛋白質來源的選擇。

參考資料

1. Xu, X. W., Wu M., Huang W. D., 2005. Isolation and characterization of a novel strain of *Natrinema* containing a *bop* gene. J Zhejiang Univ SCI. 6B(2):142-146
2. <http://mswebs.naist.jp/LABs/kataoka/work/bR.html>
3. http://www.ks.uiuc.edu/Research/newbr/heptamer_fig.html
4. http://members.at.infoseek.co.jp/y_furutani/bacteria.html
5. <http://www.biophysics.uwa.edu.au/mcb2000/masterclass/v22.htm>

審定公告之專利寄存生物材料

資料範圍自93年12月至94年3月

專利名稱關鍵字/公告號	寄存生物材料名稱	BCRC編號	專利申請人
產製重組人類紅血球生成素之表現與純化分泌之方法及利用/570977	pcDNA3.1-HC(於大腸桿菌NovaBlue中) BHK21-pcDNA3.1-HC細胞株	940175 960068	徐立偉、張素真
纖維素酶酵素/ I225891	pGEX-eglA	940317	中央研究院
α -瓊脂糖酶及製造方法/ I224621	質體pAA1(存於大腸桿菌JM109中) 質體pAH101(存於大腸桿菌JM109中)	940281 940282	寶生物股份有限公司(日本)
酮類之立體選擇式還原胺化反應/ I226372	<i>Pichia pastoris</i> GS115 (pGAPk-PDH/pGAPZ-FDH) <i>Pichia pastoris</i> SMD1168 (pPDH 9K/10) pPDH 155K (in <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3))	920017 920018 940252	必治妥施貴寶公司(美國)
藉繼代培養至 vero 細胞減毒日本腦炎病毒與疫苗/ I228147	日本腦炎病毒(attenuated Japanese encephalitis virus) CJ5003	970023	契爾捷登美國公司、瓦特瑞德亞美研究院(美國)
新孢子虫疫苗/ I228419	Neospora Caninum NC-1	980001	輝瑞股份有限公司(美國)
樟芝分離株製造之培養物方法及產物/ I226370	<i>Antrodia camphorata</i>	930032	食品工業發展研究所
對人類4-1BB具專一性之擬人化抗體及藥學組成物/ I230163	<i>E. coli</i> DH5 α /pCI-Hz4B4-MOH <i>E. coli</i> DH5 α /pRC-Hz4B4-MOK-gs 中國倉鼠卵巢(CHO)細胞MH200-3 CHO cell SB500-23	940277 940278 960109 960110	L G化學股份有限公司(韓國)
成長因子產生誘導用醫藥·食品·飲料·飼料或化妝料/ I228991	<i>Flavobacterium</i> sp. SA-0082 <i>Alteromonas</i> sp. SN-1009	910069 910070	寶生物股份有限公司(日本)
小鼠胚幹細胞株/ I229131	小鼠胚幹細胞株(murine embryonic stem cell line) ESC 26	960168	財團法人台灣動物科技研究所
水稻 α -澱粉水解酶轉錄促進子/ 200302279	pAct-3SRS-LN pAct-8SRS/GARS-LN	940403 940404	中央研究院
植物保護用鏈黴菌組成物製劑及製法/ I224142	<i>Streptomyces padanus</i> PMS-702	910179	國立中興大學

- 說明：1.上述生物材料為申請專利而依有關專利申請之生物材料寄存辦法寄存於食品所，相關專利已審定公告，其專利名稱之關鍵字、專利公告號及專利申請人資料如上表。
2.任何人可依有關專利申請之生物材料寄存辦法第十七條向食品所申請提供上述微生物，作為研究及實驗用。
3.洽詢專線：(03)5223191轉233或513。

生物資源保存及研究簡訊 第61期

發行者：財團法人食品工業發展研究所
發行人：劉廷英所長
主編輯：陳倩琪
編輯：鄭銘仁、傅惠美、邱雪惠
陳智偉、許名宜、廖麗娟

地址：新竹市食品路331號
電話：(03)522-3191-6
傳真：(03)5224171-2
承印：彥光打字印刷商行
電話：(03)530-1116
ISSN:1021-7932
GPN:2009001214



本著作權依補助契約歸屬財團法人食品工業發展研究所