

## 論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 15 年度博士課程 入学

氏名 勢 康代

指導教員名 北本 勝ひこ

### 論文題目

麹菌 *Aspergillus oryzae* の二次代謝産物生合成遺伝子に関する研究

麹菌 *Aspergillus oryzae* は清酒、味噌、醤油など、我が国の伝統的な発酵食品に広く用いられ、アミラーゼやプロテアーゼなどの酵素剤生産にも利用される産業上重要な微生物である。麹菌の代謝産物の研究においては、有機酸やビタミン類などの有用代謝産物の生産に関する研究が古くからなされており、麹菌は酵素生産のみならず、多岐にわたる二次代謝産物を生産することが報告されている。しかし、*A. oryzae* の二次代謝産物生合成遺伝子に関する研究としては、清酒の着色原因物質であるシデロフォア（デフェリフェリクリシン）やマイコトキシンの生合成に関連する遺伝子についての報告など数少ない。最近、*A. oryzae* の全ゲノム配列が決定され、8本の染色体からなり、その全ゲノムサイズは 37 Mb、12,074 個の推定遺伝子を含むことが報告された。

本研究は、ゲノム情報を利用して *A. oryzae* が保有する二次代謝産物生合成遺伝子の全容を明らかにすることを目的とした。

## A. oryzaeにおける二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの探索

二次代謝産物生合成遺伝子は、特定の代謝に関連した酵素遺伝子が染色体上に連続して存在し、遺伝子クラスターを形成している場合が多い。

始めに、*A. oryzae* の全ゲノム配列情報からコンピュータ予測により二次代謝関連遺伝子群に分類されたおよそ 700 遺伝子の配列について、コーディング領域の予測、ホモロジー検索、およびタンパク質ドメイン構造の検索によりアノテーションを行った。これらを推定機能ごとに分類し、ORF 予測が大幅に外れていたポリケタイド合成酵素 (polyketide synthase ; PKS) 遺伝子、非リボソーム型ペプチド合成酵素遺伝子について推定 ORF の決定を行った。

次に、遺伝子クラスターを形成していると予想された領域の配列データを取り出し、同様のアノテーション作業を行った。その結果、テルペノイド系インドールアルカロイド *aflatrem* の遺伝子クラスター、 $\beta$ -ラクタム抗生物質のペニシリン、カロテノイド、トリコセセン類に特異的な前駆体を合成するトリコジェン合成酵素を含む遺伝子クラスターなどを見出した。これらの遺伝子クラスターについて、*Aspergillus* 属でゲノム情報が利用できる *Aspergillus nidulans*、*Aspergillus fumigatus* と比較したところ、*A. nidulans* においては、*A. oryzae* の保有する主要なクラスターのうち、カロテノイド遺伝子クラスターを保有しておらず、日和見感染菌である *A. fumigatus* では、これらのすべての遺伝子クラスターが認められなかった。

## A. oryzaeにおける I 型 PKS 遺伝子の分類と解析

I 型 PKS は、 $\beta$ -ketoacyl synthase、acyltransferase、acyl carrier protein を基本ドメインとし、dehydratase、 $\beta$ -keto reductase、enoyl reductase、methyltransferase、Claisen cyclase のドメインからなる多機能酵素である。よく知られている糸状菌のポリケタイドとして、発癌性を示すアフラトキシン、抗高脂血症作用を示すコンパクチンやロバスタチン、また、メラニンなどの色素化合物がある。しかしながら、*A. oryzae* ではこれまで、PKS 遺伝子として *pksL1* がクローニングされているのみである。

I 型 PKS 遺伝子についてアノテーション作業を行い、*A. oryzae* は 30 遺伝子を保有することを明らかにした。既知の PKS と高い相同性を示す遺伝子は、*Aspergillus flavus* のアフラトキシン合成酵素遺伝子 *pksL2*、及び *A. nidulans* の

分生子色素合成遺伝子 *wA* のオーソログ遺伝子であった。見出した I 型 PKS 遺伝子を分類するため、既知の糸状菌 PKS の  $\beta$ -ketoacyl synthase 配列を用いて系統解析を行った。その結果、12 遺伝子が WA と類似したドメイン構造をもつ PKS をコードしていると予想され、このうち、3 遺伝子が色素生合成に関与すると推定された。実際に、これらの PKS 遺伝子が色素化合物の生産に関与しているのか調べるため、各遺伝子について破壊株の作製を試みた。*A. nidulans* の *wA* 遺伝子とアミノ酸レベルで約 70% の相同性を示す *AowA* の破壊株は、白い分生子を形成し、分生子色素生合成性能を完全に失っていた。これにより *AowA* は *A. nidulans* と同様、分生子色素生産に関与する遺伝子であることが確認された。*A. oryzae* の分生子色素は白色、黄色、緑色と変化する。これまでの研究において、緑色色素は分生子中の銅含有量と密接な関係にあること、緑色色素の前駆体が黄色色素であることなどが示唆されている。*AowA* は銅酸化酵素遺伝子と隣接していることから、これら一連の色素の生成は、1 つの遺伝子クラスターによって制御されていることが推定された。

#### *A. oryzae* から III 型 PKS スーパーファミリー遺伝子の発見

III 型 PKS として、植物においてフラボノイドの骨格を形成するカルコン合成酵素 (chalcone synthase ; CHS) などが知られている。近年、放線菌などの一部原核微生物からも III 型 PKS が見出され、機能解析が進められている。

*A. oryzae* のゲノム情報より、CHS と相同性を示す III 型 PKS 遺伝子を 4 つ見出し、*csyA*, *csyB*, *csyC* および *csyD* と命名した。これまでに真核微生物において III 型 PKS 遺伝子に関する報告はなかった。興味深いことに、同じ *Aspergillus* 属である *A. nidulans*, *A. fumigatus* には存在していなかった。そこで利用可能な真核微生物のゲノムデータベースを調べたところ、*Neurospora crassa*, *Fusarium graminearum* に各 1 遺伝子、*Magnaporthe grisea*, *Podospora anserina* に各 2 遺伝子、*Phenarocheate chryso sporium* に 3 遺伝子を見出した。これにより、糸状菌の一部に新規 III 型 PKS スーパーファミリーが存在することを明らかにした。*A. oryzae* が III 型 PKS 遺伝子をもつことから、フラボノイドを生合成する可能性が示唆された。そこで、フラボノイドの前駆体合成に関与するフェニルプロパノイド経路の遺伝子をもつかどうか調べた。*A. oryzae* は、モデル植物である *Arabidopsis thaliana* の関連遺伝子と比較を行うことにより、III 型 PKS 遺伝子とその上流遺伝子がほぼ同数ずつ保存されていることを見出した。

#### A. oryzaeにおける III 型 PKS 遺伝子の機能解析

III 型 PKS 遺伝子と予想した *csyA*, *csyB*, *csyC* および *csyD* について、これらの遺伝子が実際に機能しているか解析を行った。RT-PCR 法により各遺伝子の発現を調べたところ、完全培地において *csyA*、*csyB* および *csyD* の発現が認められた。RACE 法により、*csyA* と *csyB* の ORF を決定し、cDNA を取得した。*csyC* はこの配列情報を基に開始コドン を推定し、*A. oryzae* で遺伝子を高発現させて cDNA を取得した。タンパク質の活性を調べるため、大腸菌を宿主としてリコンビナントタンパク質を発現し、<sup>14</sup>C ラベルした malonyl-CoA と acetyl-CoA、または 4-coumaroyl-CoA を用い、*in vitro* での酵素活性の検出を試みた。しかし、いずれの場合においても期待した活性は認められなかった。次に、*A. oryzae* で *csyA*、*csyB* および *csyC* 遺伝子をそれぞれ高発現させたところ、いずれも培地の褐色化が観察された。HPLC および LC-TOF/MS により、C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub> 化合物 ([M+H]<sup>+</sup> 143.0347) が蓄積しており、標品との比較から麩酸であると同定した。また、各遺伝子の破壊株作製を試み、*csyA* および *csyC* 遺伝子破壊株の取得に成功したが、両遺伝子の破壊株において褐色物質および麩酸の生成にコントロールとの差は認められなかった。麩酸は糖より生合成されることから、*csy* 遺伝子は、副次的に麩酸の生成に関与しているものと考えられる。

#### 参考文献

- 1) Seshime, Y., Juvvadi, P. R., Fujii, I., Kitamoto, K. Discovery of a novel superfamily of type III polyketide synthases in *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 253-260 (2005)
- 2) Seshime, Y., Juvvadi, P. R., Fujii, I., Kitamoto, K. Genomic evidences for the existence of a phenylpropanoid metabolic pathway in *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337**, 747-751 (2005)