

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 勢 康代

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、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が、二次代謝産物生合成遺伝子に関する研究報告は少ない。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明らかになった。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ものである。

第 1 章では、*A. oryzae* の全ゲノム配列情報から、遺伝子クラスターを形成していると予想される領域の配列データを取り出し、アノテーション作業の結果について述べている。テルペノイド系インドールアルカロイドであるアフマトレム、 β -ラクタム抗生物質のペニシリン、カロテノイドの生合成に関与すると予測される遺伝子クラスターを見出した。また、シクロピアゾン酸の生合成に関与するジメチルアリルトリプトファン合成酵素をコードすると予想される遺伝子など多数の関連遺伝子を見出し、*A. oryzae* が近縁の *A. nidulans* などに比較して非常に多くの二次代謝産物生合成遺伝子を保有することを明らかにした。

第 2 章では、*A. oryzae* の二次代謝産物生合成遺伝子のうち、I 型 PKS (ポリケタイド合成酵素) をコードすると予想される遺伝子に注目し、解析を進めた結果がまとめられている。アノテーションを行った結果、*A. oryzae* は I 型 PKS をコードしていると予想される遺伝子を 30 保有することを明らかにした。見出した推定 I 型 PKS 遺伝子を分類するため、 β -ケトアシル合成酵素配列を用いて系統解析を行ったところ、12 遺伝子が *A. nidulans* の 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。相同性の高い遺伝子からそれぞれ、*AowA*、*AowA2*、*AowA3* と命名し、各遺伝子破壊株の作製を試みた。*AowA* 遺伝子の破壊株である NWAD-1 株は、白い分生子を形成することから、黄色色素の前駆体ナフトピロンを合成することが予想された。

第 3 章では、*A. oryzae* の二次代謝産物生合成遺伝子のうち、III 型 PKS をコードすると予想される遺伝子について解析している。*A. oryzae* のゲノム配列情報から、カルコン合成酵素と相同性を示す遺伝子を 4 つ見出し、*csyA*、*csyB*、*csyC*、*csyD* と命名した。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結果、*Neurospora crassa*、*Fusarium graminearum* に各 1 遺伝子、*Magnaporthe grisea*、*Podospora anserina* に各 2 遺伝子、*Phenarocheate chrysosporium* に 3 遺伝子を見出し、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。

次に、*csyA*、*csyB*、*csyC*、*csyD* 遺伝子が実際に発現しているか RT-PCR を行った結果、*csyA*、*csyB*、*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。また、*csyC* は *A. oryzae* で遺伝子を高発現させて cDNA を取得した。大腸菌を宿主としてリコンビナントタンパク質を生産し、¹⁴C 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が、予想した活性は認められなかった。*A. oryzae* で *csyA*、*csyB*、*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、C₆H₆O₄ 化合物が蓄積しており、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* と *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親株との顕著な差は認められなかった。

以上、本論文は、ゲノム情報をもとに、*A. oryzae* の二次代謝産物生合成遺伝子の全貌を明らかにし、また、新規に見いだした PKS 遺伝子に関して機能解析をおこなったものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。