

Title	Cloning and functional analysis of genes involved in biosynthesis of mycotoxin citrinin from <i>Monascus purpureus</i>
Author(s)	清水, 健雄
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46844
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	清 水 健 雄
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学位記番号	第 20285 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	Cloning and functional analysis of genes involved in biosynthesis of mycotoxin citrinin from <i>Monascus purpureus</i> (紅麴カビ <i>Monascus purpureus</i> におけるカビ毒シトリニン生合成関連遺伝子の探索及び機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 仁平 卓也 (副査) 教授 原島 俊 教授 福井 希一 教授 大竹 久夫 教授 卜部 格 教授 小林 昭雄 教授 塩谷 捨明 教授 清水 浩 教授 関 達治 教授 金谷 茂典

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、紅麴カビ *Monascus purpureus* において、遺伝子工学的手法を用いた機能解析によるシトリニン生産機構の解明に関する研究結果をまとめたものであり、本論 4 章及び総括から構成されている。

第 1 章は序論であり、紅麴カビ *Monascus purpureus* の特徴と、カビの二次代謝生産に関する知見を紹介し、本研究を行うに至った経緯及び、その意義を詳細に述べた。

第 2 章では、ポリケタイド化合物であるシトリニンの生合成遺伝子取得のために、カビのポリケタイド生合成酵素 (PKS) において、高度に保存されている領域を基にプライマーを作成し、PCR を用いて PKS 遺伝子をスクリーニングした。その結果得られた 3 種類の PKS 遺伝子断片の中から、機能解析を通じて、*pksCT* がシトリニン生合成 PKS 遺伝子であることを明らかにした。この *pksCT* は、全長 7838 bp で、2593 a. a. からなり、その翻訳産物においては、PKS の必須ドメインである ketosynthase、acyltransferase、acylcarrier protein の存在が確認されただけでなく、カビの PKS では非常に希である methyltransferase ドメインの存在も強く示唆された。また、*pksCT* の遺伝子破壊実験によりシトリニン非生産株の構築に成功した。

第 3 章では、*Monascus purpureus* における研究の問題点の一つである遺伝子工学的ツールの少なさを改善するべく、新たなツールの開発を行った。オーレオバシジン耐性機構及び自立複製型ベクターを用いることで形質転換効率を上昇させることに成功しただけでなく、Gateway system と組み合わせることにより、10 kb 以上の非常に大きな DNA 断片を *Monascus purpureus* に導入することも可能にした。

第 4 章では、*pksCT* 周辺領域 21 kb においてシーケンス解析を行った結果、新たに 4 個の遺伝子を見いだした。相同性検索及び転写解析の結果、これらの遺伝子はシトリニン生合成への関与が示唆され、この 21 kb の領域がシトリニン生合成遺伝子クラスターであると結論づけた。特に、このクラスターに含まれる CtnR は、カビで特異的に見つかっている転写調節因子と高い相同性を示し、その N 末端側には転写調節に必須な領域である zinc finger motif を有していることを明らかにした。本 *ctnR* 遺伝子の機能解析により、シトリニン生産は、CtnR タンパク質によるク

ラスター遺伝子群の転写活性化を通じて正に調節されていることが明らかとなった。また、*ctnR*の遺伝子破壊実験により極めてシトリニン生産量が減少した株の構築に成功した。

第5章では、本研究を通じて得られた知見の有用性及び今後の展望について述べ、本研究を総括している。

論文審査の結果の要旨

本論文では、紅麹カビ *Monascus purpureus* の生産するカビ毒シトリニンの生産機構を、分子生物学的解析を通じて解明している。食品業界において、本菌は発酵食品の製造や天然着色料の生産に利用されており、そのような製品へのカビ毒混入が問題視されている中、その解決手段として、シトリニン非生産株を利用することが望まれている。よって、これまでは未同定であったシトリニン生合成遺伝子群を発見し、遺伝子工学的手法を用いてシトリニン非生産株を構築することは意義深いと考えられる。

本研究を要約すると次の通りである。

1. 紅麹カビ *Monascus purpureus* において、シトリニン生産菌において初めてシトリニン生合成遺伝子の取得に成功している。それはシトリニン生合成において最も重要な反応を行うポリケチド生合成酵素をコードしており、既知のものにはない特殊な構造を持つことが明らかとなっている。また、その遺伝子破壊実験を通じて、シトリニン非生産株の構築に成功している。
2. シトリニン生合成遺伝子群が、*Monascus purpureus* ゲノム中のある一定領域内において、クラスターを形成していることが明らかとなっている。特に、そのクラスターに含まれる *regulator* の機能解析により、クラスター遺伝子群の転写活性化を通じてシトリニン生産が調節されていることが判明している。この *regulator* をコードしている遺伝子の破壊実験では、シトリニン生産を6万4千分の1にまで減少させることに成功している。
3. これまで遺伝子工学的研究が全く行われていなかった *Monascus purpureus* において、ゲノム組み込み型ベクター、自立複製型ベクター、ハイグロマイシン耐性機構、及びオーレオパシジン耐性機構を利用可能な方法を確立している。これらの遺伝子工学的ツールは、本菌に対する解析手法の幅を広げ、今後の研究の発展に大きく貢献している。

以上のように、本研究によって得られた成果は、紅麹カビ *Monascus purpureus* も含めたシトリニン生産菌全体において、シトリニン生産機構を遺伝子レベルで理解する上で重要な知見となっているだけでなく、工業上重要であるシトリニン非生産株の構築にも応用可能である。また、本研究で構築された遺伝子工学的ツールは今後の *Monascus purpureus* の有効利用の可能性を広げるものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。