OUKA
Osaka University Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Isolation and functional analysis of GGPP synthase gene involved in isoprenoid biosynthesis from entomopathogenic fungi |
| Author(s) | Suthitar, Singkaravanit |
| Citation | 大阪大学, 2010, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/58355 |
| 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

【3】

| | |
|---|---|
| 氏名 | Suthitar Singkaravanit（スティター シングカラバニット） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（工学） |
| 学位記番号 | 第 24120 号 |
| 学位授与年月日 | 平成22年6月15日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当<br>工学研究科生命先端工学専攻 |
| 学位論文名 | Isolation and functional analysis of GGPP synthase gene involved in isoprenoid biosynthesis from entomopathogenic fungi<br>（昆虫病原性糸状菌由来ゲラニルゲラニルニリン酸シンターゼ遺伝子の単離および機能解析） |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教授 仁平 卓也<br>（副査）<br>教授 原島 俊　教授 渡邉 肇　教授 大竹 久夫<br>教授 福崎英一郎　教授 福井 希一　教授 紀ノ岡正博<br>教授 藤山 和仁 |

## 論文内容の要旨

Entomopathogenic fungi have been known as parasitic fungi against insects and also as producers of various secondary metabolites during their infection and proliferation. However, very few knowledge is available from entomopathogenic fungi on secondary metabolism biosynthesis genes especially in isoprenoid compounds. Thus, I started to search and investigate the genes related to isoprenoid biosynthesis in entomopathogenic fungi. The aim of this work is to obtain genetic information on isoprenoid biosynthesis in secondary metabolism of entomopathogenic fungi. The result is expected to lead to the application by improving the productivity of isoprenoids by genetic engineering, and facilitate search for new bioactive compounds from entomopathogenic fungi.

Geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPP synthase) gene was used as a clue for the analysis of genes in the isoprenoid biosynthesis in this study because it was supposed to be present in the middle of the biosynthetic gene cluster for a specific diterpene compound. Degeneracy primers designed from the conserved region of prenyltransferase were used to amplify GGPP synthase genes from entomopathogenic fungi. Amino acid sequence comparison of amplified fragments revealed that two kinds of GGPP synthase gene were present in two entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*, while only one seems present in majority of the entomopathogenic fungi. The first type of GGPP synthase gene which was highly conserved among entomopathogenic fungi was named as *ggs1* and another type was named as *ggs2*. The *ggs1* from *M. anisopliae* was functionally characterized by transcriptional analysis and heterologous expression in *E. coli*, revealing that *ggs1* encodes a GGPP synthase related to primary metabolism. The novel specific serine-rich region in *ggs1* would be useful to distinguish entomopathogenic fungi from other classes of fungi on the genetic basis. Moreover, this study provided the first clue for the understanding of isoprenoid pathway in entomopathogenic fungi.

Consecutively, the *ggs2* cloned from *M. anisopliae* was characterized. Gene disruption analysis disclosed that *ggs2* disruptant displayed significantly lowered GGPP synthase activity, delayed sporulation and almost completes loss of helvolic acid production. Since the biosynthetic genes as well as the pathway itself for helvolic acid still remain unclear, the knowledge obtained in this study can be useful for further study to elucidate the mechanism of helvolic acid biosynthesis in more detail. In addition, the *ggs2* mutants exhibited weaker pathogenicity against both the larva of chestnut weevil and of peach fruit moth than wild-type strain. This finding suggested that helvolic acid may play a role, at least in part, in the virulence of entomopathogenic fungi. In future, when genetic modified organism and their products is accepted to be used in the agriculture field in the normal safe range, higher virulent strain by *ggs2* over-expression may be utilized as useful biological insecticide.

## 論文審査の結果の要旨

本論文は昆虫病原性糸状菌 *Metarhizium anisopliae* より二種類のゲラニルゲラニル二リン酸（GGPP）シンターゼ遺伝子を単離し、異種発現、遺伝子破壊等による機能解析を行っており、それぞれの生体内における役割を推定している。昆虫病原性糸状菌は昆虫に寄生する糸状菌であり、昆虫への感染、増殖の過程で様々な生理活性を持った二次代謝産物を生産することが知られている。しかしながら昆虫病原性糸状菌が生産する二次代謝物質、特にイソプレノイド化合物の生合成遺伝子についてはほとんど分かっていない。そこで、本研究では昆虫病原性糸状菌の二次代謝によるイソプレノイド生合成についての遺伝学的情報を得ることを目的としている。得られた知見により遺伝子工学的手法を用いたイソプレノイド化合物の生産性向上へと繋がること、また昆虫病原性糸状菌からの新規イソプレノイド化合物発見の可能性を高めることが期待される。

本論文を要約すると以下のとおりである。

1. 昆虫病原性糸状菌に存在しているGGPPシンターゼ遺伝子を探索し、*M. anisopliae* and *Beauveria bassiana* は二種類のGGPPシンターゼ遺伝子を有していることを示している。また、一次代謝に関連していることが推定される *ggs1* 遺伝子を大腸菌内で異種発現し、遺伝子産物がGGPPシンターゼ活性を有することも明らかにしている。さらに調べた昆虫病原性糸状菌全てにおいて存在が確認されている *ggs1* 遺伝子産物は新規に見出されたセリンリッチモチーフを保有していることを示している。

2. 続いて *M. anisopliae* から *ggs2* 遺伝子を単離し、解析を行っている。その中では遺伝子破壊実験により *ggs2* 破壊株においてGGPPシンターゼ活性は大きく低下すること、胞子形成が遅れること、ヘルボル酸合成がほぼなくなることを明らかにしている。さらに *ggs2* 破壊株においてモモシンクイガ、クリシギゾウムシ幼虫への病原性が低下していることを示し、ヘルボル酸は昆虫病原性糸状菌の病原性に部分的に寄与していることを強く示唆している。今後遺伝子組換え生物、またその生産化合物が農産業において受け入れられる環境が整えば、*ggs2* の過剰発現により病原性を高めた菌体は有用な生物農薬として用いられることが期待される。

以上のように、本論文は昆虫病原性糸状菌においてこれまで手つかずであったイソプレノイド化合物の生合成機構解明の第一歩となるものであり、本論文により得られた知見は遺伝子工学的手法を用いたイソプレノイド化合物の生産性向上へと繋がること、また昆虫病原性糸状菌からの新規イソプレノイド化合物発見の可能性を高めることが期待される。今後遺伝子組換え生物、またその生産化合物が農産業において受け入れられる環境が整えば、*ggs2* の過剰発現により病原性を高めた菌体は有用な生物農薬として用いられることが期待され、安全性の高い食糧供給に寄与すると考えられる。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。