



Title	Construction of fungal-secondary-metabolite production system in <i>Aspergillus oryzae</i>
Author(s)	酒井, 香奈江
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58368
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	酒井香奈江
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 24119 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 工学研究科生命先端工学専攻
学位論文名	Construction of fungal-secondary metabolite production system in <i>Aspergillus oryzae</i> (麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> を宿主に用いた糸状菌生理活性物質生産系の構築)
論文審査委員	(主査) 教授 仁平 卓也 (副査) 教授 原島 俊 教授 渡邊 肇 教授 大竹 久夫 教授 福崎英一郎 教授 福井 希一 教授 紀ノ岡正博 教授 藤山 和仁

論文内容の要旨

本論文は糸状菌由来の二次代謝物質合成遺伝子クラスターを麹菌 *Aspergillus oryzae* を宿主として異種発現させることにより、生理活性物質を生産させる系の構築について報告したものであり全 6 章から構成されている。

第 1 章は諸論であり、糸状菌とその二次代謝として生産される物質の有用性についての知見を紹介し、これまでの研究とその問題に触れることで本研究を行うに至った経緯と意義を述べた。

第 2 章では、比較的サイズの小さなクラスターであるシトリニククラスター (20 kb) を用いることで *A. oryzae* を宿主に用いた異種発現系の構築が可能かどうかの検証を行った。シトリニククラスター導入後の *A. oryzae* 形質転換体において微量ではあるがシトリニンと思われる物質の生産が確認された。さらにシトリニククラスターの転写を正に制御する転写制御因子を導入することで最大で 400 倍ほどのシトリニン生産量を確認することに成功した。

第 3 章では、第 4 章でモデルクラスターとして用いるモノコリン K (MK) クラスター (45 kb) について *Monascus pilosus* においては配列情報が報告されているのみであったため、クラスター内の遺伝子を破壊することでその機能解析を行った。ポリケタイド合成酵素 (PKS) をコードしている *mokB* の破壊株においてはモノコリンの生産は観察されず、前駆体であるモノコリン J の生産のみが検出された。一方、転写制御因子をコードしている *mokH* 破壊株ではいずれの生産も確認されなかった。これらの結果から、配列の報告があった領域がモノコリン K 生合成に必須であり、生合成遺伝子クラスターであることが示された。

第 4 章では、糸状菌の二次代謝を広く制御することが報告されている *LaeA* を用いることで

汎用宿主の構築を目指した。第 3 章で明らかとなった MK クラスター全長を二つの断片に分断することで汎用宿主に導入した。得られた形質転換体において MK の生産が確認され、クラスターの導入のみでの物質生産が可能になった。

第 5 章では、ポリケタイドであるシトリニンや MK とは主骨格の異なるテレキノン A クラスター (11 kb) を導入し、その生産が確認できたことから様々な構造をもつ化合物生産が *A. oryzae* 宿主において可能であることが示唆された。

第 6 章は総括であり、本論文のまとめとその成果について述べた。また今後の展望として、構築された発現系が糸状菌の潜在的な二次代謝産物の利用を可能にしたことから、新たな糸状菌新規生理活性物質の発見・生産の可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

本論文は麹菌 *Aspergillus oryzae* 宿主に異種糸状菌由来の生理活性物質合成遺伝子クラスター発現系の構築を行い、3 種類の遺伝子クラスターを用いることで発現系の検証を行っている。多剤耐性菌、新たな疾病の出現により新規生理活性物質への要求が高まる中、糸状菌の有する豊富な二次代謝関連遺伝子は新規生理活性物質発見のために有効活用が急務である。糸状菌の生理活性物質合成遺伝子を異種宿主において発現させ、最終産物生産まで可能にする本系の構築は糸状菌の遺伝子資源の有効利用へと繋がるものであり大変意義深いと考えられる。

本論文を要約すると以下のとおりである。

1. 麹菌 *Aspergillus oryzae* において *Monascus purpureus* 由来のシトリニククラスターを導入し、導入遺伝子の転写とシトリニン様物質の生産を確認している。また、シトリニククラスター内に存在する転写制御因子である *ctnA* の発現を増強することで、シトリニンの生産量をクラスターのみを含んだ形質転換体に比べ 400 倍近くに向上させることに成功している。
2. 糸状菌において二次代謝を広く正に制御することが報告されている *LaeA* の発現を強化させることで発現系の汎用性向上を試みている。本法により改良した *A. oryzae* を宿主とすることにより、クラスター特異的な転写制御因子を強化することなく異種遺伝子クラスター由来物質の生産が確認可能となっている。
- 改良宿主にサイズの大きい *M. pilosus* 由来のモノコリン K クラスターを 2 つの断片に分断することにより全長を導入し、最終産物であるモノコリン K を生産させることに成功している。また、*A. nidulans* 由来のテレキノン A クラスターを改良宿主に導入することで、ポリケタイド化合物であるシトリニンやモノコリン K とは骨格の異なるテレキノン A の生産させることにも成功している。
3. 本論文で異種発現に用いているモノコリン K クラスターについてはその機能について事前に遺伝子破壊を行うことによってモノコリン K 生合成における機能解析を行っている。その結果、ポリケタイド合成酵素をコードしているとされる *mokB* の破壊により、*mokB* がモノコリン K のジケタイド側鎖の合成に関与することを明らかにしている。また、転写制御因子をコードしているとされる *mokH* が *mokC* のスプライシングに関わっていることが示され、これまでに糸状菌の報告がある転写因子とは異なる制御様式の可能性を示唆している。

以上のように、本論文は糸状菌のこれまで手つかずであったこの未開拓の遺伝子資源の有効利用の第一歩となるものであり、新規生理活性物質発見法の新たなアプローチとなると考えられる。また、麹菌を宿主としているため各種の発酵食品生産への応用が容易であり、遺伝子組換え体への心理的抵抗がなくなれば、これまでの発酵食品を様々な生理活性物質を含んだより付加価値のあるものにするのが出来、既存の産業の活性化に繋がると考えられる。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。