

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01930

研究課題名(和文)糸状菌二次代謝プロモーターの応用による有用物質生産系の構築と改良

研究課題名(英文)Construction of useful metabolite production system by applying of filamentous fungus secondary metabolism promoter

研究代表者

小池 英明 (KOIKE, Hideaki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ付

研究者番号：90344118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：発酵産業で使われる麹菌は、対数増殖後に余剰の糖を二次代謝産物としてコウジ酸(KA)に変換する。その変換効率は極めて高く、他化合物の高生産への応用が期待される。KA生産に関わる遺伝子の知見を基にコウジ酸合成酵素のプロモーターを応用して胞子色素ポリケタイドの合成酵素を高発現した。色素合成酵素の上流にKA合成酵素のプロモーターを接続し、KA生産条件で、色素を生産させた。その結果、胞子色素に特有の吸光をもつ化合物が分泌され、一方で、胞子は色を失い、白い胞子が着生した。二次代謝のプロモーターの利用により、ヘテロな化合物生産ができること、さらに時間、空間的に発現を変更することが可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物の二次代謝はペニシリン、エバームクチン等を筆頭に生理的に有用なものが多く、医薬に応用されている天然物が数多く知られている。放線菌や糸状菌に由来する多様な化合物および生合成遺伝子の知見が蓄積された。しかし、生命維持に必須の代謝と比べ、二次代謝は生産条件などが多様であり、二次代謝に特有の代謝制御がある。多くの代謝物の生産は微量で実用化が難しい。糸状菌である麹菌は生育が定常期に入った後、培地中に残る余剰グルコースをコウジ酸(Kojic Acid、以下KA)に変換する。極めて効率的なKA生産系を応用した二次代謝生産系は、有用な天然物の生産効率向上に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Aspergillus oryzae used in the fermentation industry converts excess sugar into kojic acid (KA) as a secondary metabolite after logarithmic growth. Its conversion efficiency is extremely high, and its application to high production of other compounds is expected. Based on the knowledge of genes involved in KA production, the promoter of kojic acid synthase was applied to highly express the spore pigment polyketide synthase. The promoter of KA synthase was connected upstream of the pigment synthase to produce the pigment under the KA production conditions. As a result, a compound with an absorption characteristic of the spore pigment was secreted, while the spores lost their color and white spores settled. It has been shown that the use of a secondary metabolism promoter enables the production of hetero compounds and the temporal and spatial expression changes.

研究分野：ゲノム情報科学

キーワード：遺伝子工学 有用物質生産 二次代謝 糸状菌 転写制御 微生物

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

糸状菌二次代謝プロモーターの応用による有用物質生産系の構築

1. 研究開始当初の背景

微生物の二次代謝はペニシリン、エバーメクチン等を筆頭に生理的に有用なものが多く、抗生物質などとして医薬に応用されている天然物が数多く知られている。約 100 年の研究により、放線菌や糸状菌に由来する多様な化合物および生合成遺伝子の知見が蓄積された。糖、アミノ酸、核酸など生命維持に必須の中核代謝に比べ、その周辺の二次代謝は多様であり、二次代謝に特有の代謝制御がある。さらにモデル生物以外でも分子生物学的な解析が進んだ結果、生合成マシーナリーに関する知見も充実した。二次代謝は有用ではあっても天然では微量にしか存在しないことも多く、実用化のためには生産性向上が重要である。

1990 年代に酵母のゲノムが解読された後、赤パンカビや植物病原性の糸状菌のゲノムも数多く解読された。またゲノム解析を基にして、DNA マイクロアレイや次世代シーケンサーを利用した RNA-seq 解析など、遺伝子発現の解析も進んだ。遺伝子やその制御の知見が蓄積した現在、これら知見を応用した生産性向上の一般則が期待される。

糸状菌である麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は生育が定常期に入った後、培地中に残る余剰グルコースをコウジ酸 (Kojic Acid、以下 KA) に変換する。増殖が終わった後の KA 二次代謝生産は、働く遺伝子も少なく、極めて効率的であり、その結果培地中に KA が大量に蓄積する。

もし一般的に、研究対象の化合物をこの KA と同程度に大量生産できれば、微生物を利用する発酵技術は飛躍的に発展するだろう。申請者はコウジ酸生産時の発現解析からコウジ酸 KA 生産に関わる遺伝子クラスターを明らかにした (Terabayashi Y, et al., *Fungal Genet Biol.* 47:953-961(2010))。この KA 遺伝子クラスターには、酸化還元酵素、膜輸送体、転写制御因子の遺伝子があったが、この転写因子を高発現することで、コウジ酸の生産性が向上することを示した (Marui J, et al., *J Biosci Bioeng.* 112:40-3 (2011))。この KA クラスター中の転写因子およびその遺伝子制御を応用することで、二次代謝の生産性を向上する可能性が見られた。

2. 研究の目的

麹菌の KA プロモーターを使い、同じく麹菌の孢子黄色色素 (ポリケタイド、以下 YWA1) の生産系を構築した。生産によって培地が黄色になるため検出し易く、ヘテロの二次代謝生産の系として使いやすい。この研究をさらに進めて一般化し、多くの化合物に適用できる二次代謝生産性向上に資する汎用系を確立したい。

自ら成功した黄色色素生産を対象に、その生産時に機能する遺伝子・代謝の特徴を詳しく知ることにより、二次代謝生産と相関する代謝との関連を法則として抽出することを目指した。色素 YWA1 の生産性をさらに向上するための遺伝子改変方法を模索する。変異株の検証により、設計方法と変異株の構築方法を一般化したい。

この色素のさらなる生産性向上を目標として、色素およびコウジ酸生産時に機能する遺伝子と代謝を詳細に明らかにして、高生産と相関の高い代謝の知見獲得を目指す。その知見を基にして、色素の生産性をさらに向上する為の設計を試み、変異株を検証することを目指して研究した。

3. 研究の方法

▼菌株・培地

麹菌野生株 RIB40 由来の相同組換え用株 NS4 $\Delta ligD::ptrA$ 株より以前の研究で構築した $\Delta kojA_niaD$ -株を、本研究での菌株構築に使用した。麹菌は 30°C で Czapek-Dox (CD) 寒天培地上で維持した。*kojA* プロモーターによる YWA1 生産には、KA 生産培地 (0.25% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10% glucose, and 1.5% agar; pH 6.0) を使用した。 2.5×10^7 個の胞子を 50 mL の KA 生産培地に植菌し、30°C・200 rpm で最大 10 日間まで振とう培養した。

▼麹菌変異株の構築

YWA1 の生合成は、*wA* というポリケタイド合成酵素遺伝子が担っている。この *wA* 遺伝子のプロモーターを、KA 遺伝子クラスター内の *kojA* 遺伝子のプロモーターに置き換えた $\Delta kojA_PkojA::wA$ 株を、 $\Delta kojA_niaD$ -株より相同組換えにより構築した。構築に用いた DNA 断片は Fusion PCR により調製した。また *kojA* プロモーターに置き換えず *niaD* 栄養要求性だけ相補させたコントロール株も、完全長の *niaD* 遺伝子を $\Delta kojA_niaD$ -株に導入して構築した。各構築はサザンハイブリダイゼーションにより確認した。また *wA* の発現定量解析は定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) により行った。

▼YWA1 の抽出および分析

$\Delta kojA_PkojA::wA$ 株の培養液上澄み中の黄色呈色物質を酢酸エチルにより抽出した。濃縮遠心後、UV-Vis spectrometry と UPLC-MS の両方で、それが YWA1 であることの確認と定量を行った。

4. 研究成果

▼*kojA* プロモーターを用いた孢子色素前駆体生合成遺伝子 *wA* の発現の試み

本研究では、麹菌によるコウジ酸の長期間の液体培養による継続的な生産という特徴に注目して、その生合成遺伝子プロモーターの他の二次代謝産物の長期間の生産への応用可能性について検討を行った。生産させる二次代謝産物として、コウジ酸と同様に炭素・水素・酸素の 3 元素で構成されるポリケタイドを選択した。麹菌ゲノムには孢子色素の生合成に関わる遺伝子が本来存在している。その生合成経路において、*wA* という遺伝子でコードされたポリケタイド合成酵素が働いており、このポリケタイド合成酵素による生産は孢子黄色色素であることが知られている。そこで *wA* 遺伝子のプロモーターを *kojA* プロモーターに置き換えることで、*kojA* プロモーターにより *wA* 遺伝子を発現させて、YWA1 の生産を試みた。

この生産に当たり、宿主親株には、コウジ酸を作らない点で野生株よりもクリーンな二次代謝産物生産の宿主として期待される *kojA* 破壊株を使用することとした。以前の研究で構築された *kojA* 破壊株は硝酸還元酵素遺伝子 *niaD* を欠損した栄養要求性を有する株であったことから、*niaD* を選択マーカーとして *wA* プロモーターを *kojA* プロモーターに置き換えた $\Delta kojA_PkojA::wA$ 株を遺伝子組換えにより構築した (図 1)。

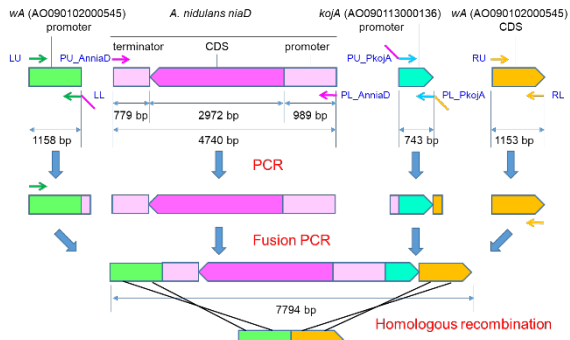


図1 $\Delta kojA_PkojA::wA$ 株の構築に用いたDNA断片の模式図

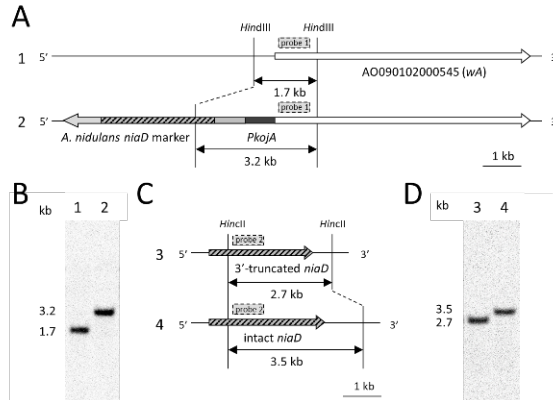


図2 $\Delta kojA_PkojA::wA$ 株(A, B)と $\Delta kojA$ 株(C, D)のサザンハイブリダイゼーション

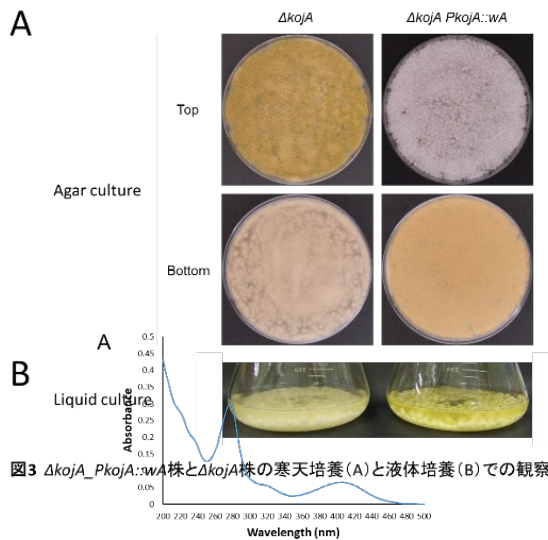


図3 $\Delta kojA_PkojA::wA$ 株と $\Delta kojA$ 株の寒天培養(A)と液体培養(B)での観察

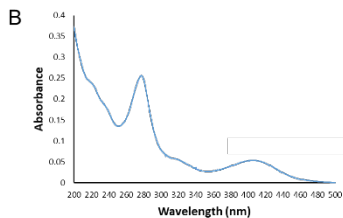


図4 YWA1標準物質(A)と $\Delta kojA_PkojA::wA$ 株抽出物(B)のUV-Vis吸収スペクトル

構築株で相同的遺伝子組換えが正しく行われたことを、サザンハイブリダイゼーションにより確認した(図2A, B)。同様に、当 *kojA* 破壊株に *niaD* を相補した株もコントロール用に構築した(図2C, D)。両株をKA生産寒天培地で培養した。その結果、*kojA* プロモーターで *wA* 遺伝子を発現させた株は胞子が白色に変化した(図3A Top)。一方、その寒天培地部分は、*kojA* プロモーターで *wA* 遺伝子を発現させた株で黄色に呈色した(図3A Bottom)。KA生産液体培地で培養したところ、*kojA* プロモーターで *wA* 遺伝子を発現させた株の培養液上澄みは、コントロール株のものに比べてより黄色くなった(図3B)。この黄色の物質は *wA* 生産物である YWA1 であると考え、培養液上澄みに酢酸エチルを加えて混合し、黄色の物質を酢酸エチルに抽出した。それを UV-Vis 吸収スペクトルを測定したところ、YWA1 の標準物質とスペクトル波形が一致した(図4)。さらに UPLC-MS においても、この黄色の物質は *kojA* プロモーターにより発現された *wA* 遺伝子の生産物である胞子色素前駆体 YWA1 であることが確認された(図5)。

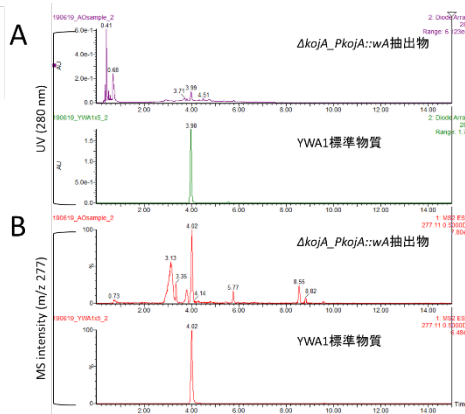


図5 YWA1標準物質と $\Delta kojA_PkojA::wA$ 株抽出物のUPLC(A)とMS(B)による分析

以上より、*wA* プロモーターを *kojA* プロモーターに置き換えた $\Delta kojA_PkojA::wA$ 株の胞子は白色になったことから、*wA* は胞子で発現しなかったものと考えられ、したがって *kojA* プロモーターは胞子では活動しないことが推察された。一方で当株による YWA1 生産は、胞子が形成されない液体培養で実施されたことから、*kojA* プロモーターは液体培養では物質生産に利用可能なことが認められた。そのため固体寒天培養で生産されない様式は利用

上の問題とならないと考えられる。

▼ *kojA* プロモーターによる *wA* 発現レベルと生産物の経時的変化

次に $\Delta kojA_PkojA::wA$ 株において、*kojA* プロモーターが稼働する期間を評価することとした。そのために、液体培養時の *wA* の発現レベルと YWA1 の生産量を、培養開始時から 10 日目まで経時的に測定した。qRT-PCR により発現レベルを培養開始時 2 日目から 10 日目まで 24 時間ごとに測定した結果、5 日目にピークに達し、9 日目と 10 日目はそれ以外の

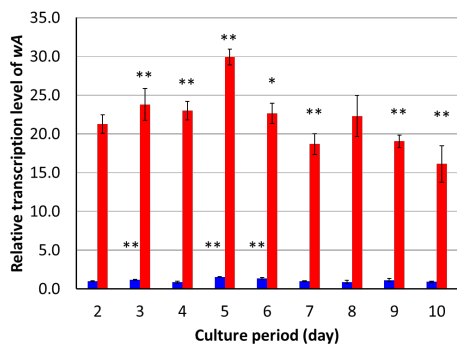


図6 $\Delta kojA_PkojA::wA$ (赤)と $\Delta kojA$ 株(青)における*wA*遺伝子の発現量の変化

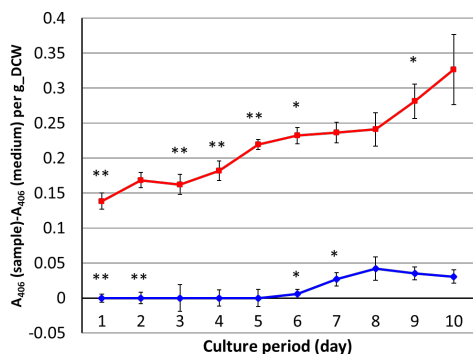


図7 $\Delta kojA_PkojA::wA$ (赤)と $\Delta kojA$ 株(青)におけるYWA1生産の経時的観察

日よりも少し減少したが、培養期間を通じて発現レベルはほぼ一定に保たれていた (図6)。したがって、培養10日目まで長期間継続して *kojA* プロモーターは稼働することが観察された。次に、生産物の孢子色素前駆体を同様に培養開始時1日目から10日目まで24時間ごとに測定した。測定は、孢子色素前駆体の吸収ピークが見られた 406 nm の波長での吸光度で行った (図7)。その結果、培養開始時1日目から10日目まで YWA1 生産量が増加しており、したがって長期間でも継続して生産され続けていることが確認された。これは図6で *kojA* プロモーターは培養開始から10日目まで安定して発現を維持している結果とも一致していた。以上より、*kojA* プロモーターは長期間のポリケチド系物質生産への利用に有効なことが示唆された。

今回実証した生産系は、窒素を含まないコウジ酸の生産制御に準じた系であることから、YWA1 だけでなく他のポリケチド化合物や炭素非含有代謝物質の生産にも適用できると期待される。また、意外なことに培養開始後1日目から *wA* の発現による孢子色素前駆体の生産が観察された。窒素源が枯渇する3日目からの生産を見込んでいたが、そうならなかった。考えられる理由としては、*kojA* プロモーターが本来の染色体上の遺伝子座では無い *wA* の遺伝子座に置かれたことから、たとえばエピジェネティックな制御といった窒素源以外の制御を受けたのかもしれない。現時点では理由は不明である。ただ、物質生産への利用の観点では、培養開始の早い時期から生産されたことは有利であり、問題では無いと考えられる。また、もしかすれば窒素含有代謝物の生産にも利用できる可能性も想像される。これについては今後の研究で検証が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tamano Koichi, Kuninaga Mahoko, Kojima Naoshi, Umemura Myco, Machida Masayuki, Koike Hideaki	4. 巻 19
2. 論文標題 Use of the kojA promoter, involved in kojic acid biosynthesis, for polyketide production in <i>Aspergillus oryzae</i> : implications for long-term production	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI: 10.1186/s12896-019-0567-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 玉野孝一、國永万保子、小島直、梅村舞子、町田雅之、小池英明
2. 発表標題 黄麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> におけるポリケチド生産へのkojAプロモーターの使用：長期間生産への応用の見通し
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	玉野 孝一 (TAMANO koichi) (80392629)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員 (82626)	