

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05390

研究課題名（和文）フラビンタンパク質機能から紐解く *Ashbya gossypii* リボフラビン生産研究課題名（英文）Investigation of the riboflavin production in *Ashbya gossypii* in view of flavoproteins

研究代表者

加藤 竜也 (Kato, Tatsuya)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：00397366

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、糸状菌 *A. gossypii* のリボフラビン生産をフラビンタンパク質に注目して解析をした。フラビンタンパク質はフラビンモノヌクレオチド（FMN）やフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）を補酵素とするタンパク質であり、リボフラビンはそのFMNやFADの前駆体となる。本研究では、アセト乳酸合成酵素や酸化ストレスがリボフラビン生産に関係することが明らかとなった。本研究でリボフラビン生産とフラビンタンパク質の関係を新たに解明した。今後本研究の結果をもとに、*A. gossypii* のリボフラビン生産機構の全容解明と過剰生産株の構築を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は現在までに報告がない新しい知見である。本研究では糸状菌 *A. gossypii* の研究であり、今後この新しい知見をもとに *A. gossypii* で研究を進めていく。今回解明した“フラビンタンパク質、酸化ストレスとリボフラビン生産の関係”について、*A. gossypii* だけではなく他の生物でも証明していくことで、リボフラビンとフラビンタンパク質、酸化ストレス、特に酸化ストレスとの関係を明らかにし、リボフラビンの新たな機能を解明できると期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed the investigation of the riboflavin production in *Ashbya gossypii* in view of flavoproteins. Flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD), which are made from riboflavin, are cofactors of flavoproteins. It has been revealed that acetoxyacid synthase, which is a flavoprotein, and oxidative stresses may be involved in the riboflavin production in *A. gossypii* riboflavin-overproducing mutants. This study leads to the elucidation of the riboflavin production in *A. gossypii* and the construction of new riboflavin-hyperproducing mutants.

研究分野：Biotechnology

キーワード： *A. gossypii* リボフラビン フラビンタンパク質 酸化ストレス ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Ashbya gossypii はリボフラビン (ビタミン B₂) 生産菌として知られており、工業的なリボフラビン生産にも利用されている。この糸状菌のリボフラビン生産向上のため、リボフラビン生合成遺伝子群の過剰発現など様々な研究が行われてきた。しかし、この糸状菌が他の生物と異なりなぜリボフラビンを過剰に生産するのか、その理由が明らかになっていない。この理由を解明することができれば、より効率的に大量にリボフラビンを生産する *A. gossypii* 株の構築が可能となる。したがって、*A. gossypii* のリボフラビン生産理由を解析する研究を進めてきた背景がある。

2. 研究の目的

リボフラビンは、フラビンモノヌクレオチド (FMN) やフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) の前駆体であり、FMN や FAD はフラビントタンパク質の補酵素となる。フラビントタンパク質はミトコンドリアに局在しているものが多く、エネルギー代謝や酸化還元反応に参与している。*A. gossypii* はリボフラビン生産糸状菌であり、リボフラビン生産とフラビントタンパク質の機能が関係することが推測される。本研究では、*A. gossypii* 野生株 (WT 株)、リボフラビン過剰生産変異株 (MT 株)、サーチユイン遺伝子破壊株 (*AgHST1* 株、*AgHST3* 株) を用いて、フラビントタンパク質の機能から *A. gossypii* のリボフラビン生産機構の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) MT 株のフラビントタンパク質の解析とリボフラビン生産解析

MT 株のフラビントタンパク質とリボフラビン生産の関係を明らかにするために、フラビントタンパク質の普遍的な阻害剤である diphenyleneiodonium (DPI) を添加して培養した。また特定のフラビントタンパク質の阻害剤 (コハク酸脱水素酵素やアセト乳酸脱水素酵素阻害剤など) を添加して、その影響を確認した。またミトコンドリアに存在するフラビントタンパク質の酵素活性を WT 株と比較した。また MT 株のゲノム DNA には多数の変異が入っているため、フラビントタンパク質の遺伝子発現を定量逆転写 PCR で定量した。

(2) *AgHST1* 株、*AgHST3* 株の酸化ストレスから見たリボフラビン生産解析

AgHST1 株、*AgHST3* 株はサーチユイン遺伝子破壊株であり、野生株に比べてリボフラビンを過剰に生産する。そのリボフラビン過剰生産について、酸化ストレスの観点から解析を行った。活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) 染色試薬である ROS Brite 570 で ROS 産生を解析した。またフラビントタンパク質であるグルタチオンレダクターゼ遺伝子 (*AgGLR1* 遺伝子) を含む抗酸化に関係する遺伝子やリボフラビン生合成遺伝子の発現量を、定量逆転写 PCR で解析を行った。抗酸化剤である N-アセチル-L-システインを添加して培養することで、それら株のリボフラビン生産量を解析した。

4. 研究成果

(1) MT 株のフラビントタンパク質の解析とリボフラビン生産解析

WT 株と MT 株を 50 μ M DPI を添加して固体 YD 培地 (1% グルコース、1% 酵母エキス、pH 6.8 で培養したところ、MT 株の菌糸の黄色が薄くなっていった。この結果から、MT 株においてフラビントタンパク質とリボフラビン生産に関係があることが示唆された。MT 株のゲノム DNA において、NADH 脱水素酵素、コハク酸脱水素酵素、グルタチオン還元酵素、アセト乳酸合成酵素をコードする遺伝子 (*AgNDI1*, *AgSDH1*, *AgSDH2*, *AgSDH3*, *AgGLR1*, *AgILV2*, *AgILV6*) に変異があることが明らかになっている。したがって、WT 株と MT 株の NADH 脱水素酵素、コハク酸脱水素酵素、グルタチオン還元酵素、アセト乳酸合成酵素の比活性を測定した (図 1A)。その結果、MT 株のグルタチオン還元酵素とアセト乳酸合成酵素の比活性が約 4.9 倍と約 25 倍上昇していた。次にそれぞれのフラビントタンパク質遺伝子の発現を定量逆転写 PCR

で定量したところ、MT 株のグルタチオン還元酵素遺伝子 *AgGLR1* の発現量は約 32 倍に上昇していたのに対し、アセト乳酸合成酵素の活性サブユニットをコードする遺伝子 *AgILV2* は約 2.1 倍しか上昇していなかった (図 1B)。このことから、アセト乳酸合成酵素の活性変化が MT 株のリボフラビン過剰生産に関係していると推測された。

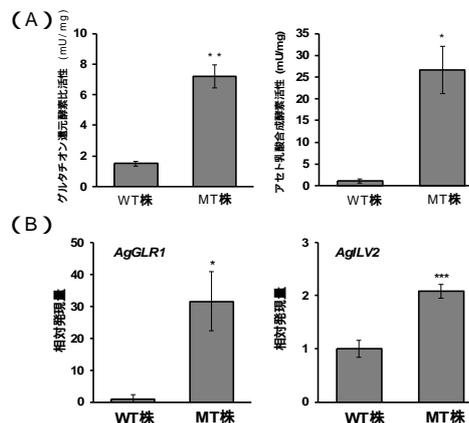


図1 WT 株と MT 株の解析。(A) 酵素比活性 (B) 遺伝子発現量。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

アセト乳酸合成酵素は、分岐鎖アミノ酸生合成経路の律速となる初発反応を触媒し、その最終生成物であるパリンでフィードバック阻害を受けることが知られている。したがって次に、WT 株と MT 株を最少培地で分岐鎖アミノ酸を終濃度 1 mM になるよう最少培地に添加して培養を行った。MT 株のリボフラビン生産量が約 50%に減少していた(図 2A)。3 種類の分岐鎖アミノ酸 (Val, Leu, Ile) をそれぞれ 1 mM 添加して最少培地で培養すると、菌体当たりのリボフラビン生産量が約 2.5 倍に上昇した(図 2B)。これらの結果から、MT 株においてリボフラビン生産とアセト乳酸合成酵素、分岐鎖アミノ酸生合成の関係が示唆された。

(2) AgHST1 株、AgHST3 株の酸化ストレスから見たリボフラビン生産解析

研究を進めていく中で、研究代表者らは、*A. gossypii* においてサーチェイン遺伝子をノックアウトするとリボフラビンを過剰に生産することを見出している。さらにこのサーチェイン遺伝子破壊株 *AgHST1* 株および *AgHST3* 株は WT 株に比べて ROS 産生が増大しており、MT 株と似た特徴を示した。*AgHST1* 株、*AgHST3* 株および WT 株は、同様に酸化ストレスが増加していることから、*AgHST1* 株と *AgHST3* 株の酸化ストレスに焦点を当てて研究を行った。

まずフラビンタンパク質が多く存在していると推測されるミトコンドリアの膜電位を Mitobright LT Red (Dojin) で測定したところ、両破壊株とも膜電位が減少していた。また酸化ストレスに対する遺伝子発現を定量逆転写 PCR で測定した。ミトコンドリアスーパーオキシドディスムターゼ、チオレドキシネルオキシダーゼ、カタラーゼ A をそれぞれコードする *AgSOD2*, *AgTSA1*, *AgCTA1* 遺伝子の発現量が WT 株に比べ両破壊株で上昇していたのに対し、フラビンタンパク質であるグルタチオン還元酵素をコードする *AgGLR1* 遺伝子については、遺伝子発現が減少していた。またリボフラビン生合成遺伝子群の発現が、MT 株と同様、両破壊株で WT 株よりも上昇していた。最後に抗酸化剤である N-アセチル L-システインを培地に添加し培養することで、両破壊株のリボフラビン生産を定量した(図 3)。

N-アセチル L-システインを添加することで、両破壊株のリボフラビン生産が大幅に抑制されたが、WT 株では減少は認められたが顕著な変化は認められなかった。WT 株では ROS 産生が認められず両破壊株では ROS 産生が認められることから、N-アセチル L-システインの影響は両破壊株で顕著に認められたと推測された。これらの結果から、ROS 産生を含めた酸化ストレスがリボフラビン生産に関与していることが確認された。

(1)と(2)の研究結果から、フラビンタンパク質と酸化ストレスが *A. gossypii* のリボフラビン生産と関係していることが明らかとなった。フラビンタンパク質やフラビンタンパク質を多く含むミトコンドリアは細胞内の酸化還元反応に関係しており、*A. gossypii* においてそれらがリボフラビン生産に関係しているおり、酸化ストレスから自信を守るためにリボフラビンを生産することが推測される。今後この推測を証明して、*A. gossypii* のリボフラビン生産機能の全容解明に繋げていく。また、現在までに *A. gossypii* のリボフラビン生合成経路を強化することによりリボフラビン過剰生産株が構築されているが、本研究結果は今までに報告であり、この研究結果をもとに更なるリボフラビン過剰生産株の構築を目指す。

引用文献

- You J, Pan X, Yang C, Du Y, Osire T, Yang T, Zhang X, Xu M, Xu G, Rao Z., Microbial production of riboflavin: Biotechnological advances and perspectives. *Metab Eng.*, 68, 2021, 46-58.
- Lonhienne T, Garcia MD, Guddat LW., The Role of a FAD cofactor in the regulation of acetohydroxyacid synthase by redox signaling molecules. *J. Biol. Chem.* 292(12), 2017, 5101-5109.
- Kato T, Azegami J, Kano M, El Enshasy HA, Park EY., Effects of sirtuins on the riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105(20), 2021, 7813-7823.

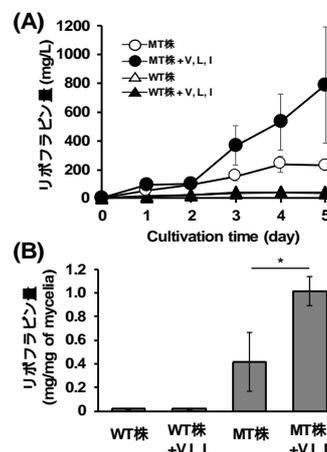


図 2 分岐鎖アミノ酸添加の影響 (A) リボフラビン生産量 (B) 菌体当たりのリボフラビン量。* $p < 0.05$

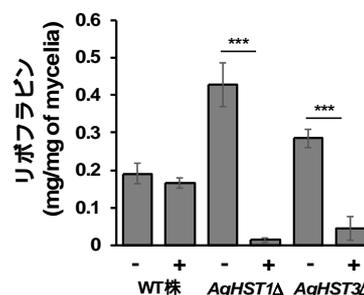


図 3 N-アセチル-L-システインの影響。*** $p < 0.001$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato Tatsuya, Azegami Junya, Kano Mai, El Enshasy Hesham A., Park Enoch Y.	4. 巻 105
2. 論文標題 Effects of sirtuins on the riboflavin production in <i>Ashbya gossypii</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 7813 ~ 7823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-021-11595-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kato Tatsuya, Yokomori Ami, Suzuki Riho, Azegami Junya, El Enshasy Hesham A., Park Enoch Y.	4. 巻 132
2. 論文標題 Effects of a proteasome inhibitor on the riboflavin production in <i>Ashbya gossypii</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 1176 ~ 1184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jam.15296	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kato Tatsuya, Kano Mai, Yokomori Ami, Azegami Junya, El Enshasy Hesham A., Park Enoch Y.	4. 巻 22
2. 論文標題 Involvement of a flavoprotein, acetohydroxyacid synthase, in growth and riboflavin production in riboflavin-overproducing <i>Ashbya gossypii</i> mutant	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbial Cell Factories	6. 最初と最後の頁 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12934-023-02114-1	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 該当する
1. 著者名 Kato Tatsuya, Azegami Junya, Kano Mai, El Enshasy Hesham A., Park Enoch Y.	4. 巻 66
2. 論文標題 Induction of Oxidative Stress in Sirtuin Gene-Disrupted <i>Ashbya gossypii</i> Mutants Overproducing Riboflavin	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Molecular Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1144 ~ 1153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12033-023-01012-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 狩野麻衣、横森愛美、畔上純也、朴龍洙、加藤竜也
2. 発表標題 Ashbya gossypii リボフラビン過剰生産株のフラビントパク質解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 畔上純也、狩野麻衣、朴龍洙、加藤竜也
2. 発表標題 サーチュインが制御するAshbya gossypii のリボフラビン生産
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 狩野 麻衣、畔上 純也、朴 龍洙、加藤 竜也
2. 発表標題 Ashbya gossypii サーチュイン遺伝子破壊株の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤 竜也、横森 愛美、朴 龍洙
2. 発表標題 Ashbya gossypii のリボフラビン生産とミトコンドリア フラビントパク質の関係
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 加藤竜也	4. 発行年 2023年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 8
3. 書名 アグリバイオ7巻8号	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
マレーシア	Universiti Teknologi Malaysia		