

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710234

研究課題名(和文) 真菌類における二次代謝産物を多く産生するテンプレート培養条件の設計

研究課題名(英文) Design of nutrition conditions to increase productivity of fungal secondary metabolites from large-scale transcriptome data

研究代表者

梅村 舞子 (Myco, Umemura)

独立行政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

研究者番号：00552259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000円、(間接経費) 390,000円

研究成果の概要(和文)：微生物が産生する多様な生理活性(二次代謝)物質の種類に応じた産生培地をデザインするため、190培養条件下で取得したこうじ菌大規模遺伝子発現情報を代謝経路毎の変動から解析した。その結果、二次代謝経路は大きく3種類に分類され、それぞれについて誘導される栄養条件に特徴があることが明らかになった。結果に基づき3種類の二次代謝経路の活性化に適した培養条件をデザインし、その元で遺伝子発現情報をこうじ菌の近縁種 *Aspergillus flavus* について取得した結果、上記計算には含まれていないが該当する代謝経路の活性化と代謝物産生が観察された。以上より、本解析手法の有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To rationally design culture conditions suitable for the production of fungal secondary metabolites, we built the method to analyze large-scale transcriptome datasets obtained under 190 kinds of nutrition conditions. We sum up and normalize gene induction ratios per pathway in each condition. The scores are further normalized in each pathway. Clustering analysis of the scores revealed that secondary metabolic pathways can be classified into mainly three groups, and each group has corresponding type of inducible nutrition conditions. Based on this result, more accurate and wide information for nutrition conditions inducing secondary metabolite production will be able to be obtained by applying this method to larger transcriptome datasets in public database.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・システムゲノム科学

キーワード：大規模遺伝子発現情報 二次代謝経路 真菌類 培養条件

1. 研究開始当初の背景

真菌類が産生する二次代謝物質は構造的に多岐にわたり、多様な生理活性を持つことで知られる。ペニシリンやシクロスポリンを始めとして、薬剤として有効なものも多い。代表的な生合成経路として、大きくポリケチド、非リボソームペプチド、テルペノイドの系統に分かれるが、物質によって生産する培養条件が大きく異なり、生産性も安定しないことが多い。したがって、望む二次代謝物質の産生に適した培養系を合理的にデザインすることは研究上意義が高いが、これまでの多くの研究にもかかわらず、総合的な知見は現在のところほとんど存在せず、研究者の経験と勘に任せられている部分が多い。

近年、バイオ技術の革新により、生物情報の大規模化が著しい。特に、ゲノム情報と遺伝子機能情報、および遺伝子発現情報は蓄積を続けているが、その有効な利用方法の確立はこれからである。一方研究代表者所属の研究室では、真菌類である糸状菌 *Aspergillus oryzae* について、500 種類以上、培地に限っても 100 種類以上の条件下で取得された全遺伝子発現情報を保有している。本データ集合の解析に基づき、二次代謝物質産生条件に関する上記課題を解決する手がかりが得られれば、大規模生物情報の有効利用に向けて重要な知見である。

2. 研究の目的

本研究では、糸状菌 *A. oryzae* について 190 の培養条件下で取得した全遺伝子発現 (マイクロアレイ) 情報を用いて、二次代謝物質の種類に応じて産生培地をデザインすることを目的とする。二次代謝関連遺伝子の発現は比較的弱いものが多く、また個々の遺伝子の揺らぎも大きいので、1 遺伝子ずつ変動を追ったのでは有意な変化をとらえることが難しい。そこで本研究では、代謝経路ごとに遺伝子発現情報を統合して正規化し、経路および培養条件のそれぞれについて相関を取って、二次代謝経路の分類と、それぞれの誘導に特徴的な培養条件を抽出する。さらにその情報を元に、望みの二次代謝遺伝子を誘導する培養条件をデザインし、結果を検証する。

3. 研究の方法

A. oryzae の代謝経路分類情報は、Vongsangnak らによるものを用いる (BMC Genomics, 9, 245, 2008)。この分類では、大きく A.炭水化物、B.エネルギー、C.アミノ酸、D.核酸、E.脂質、F.補因子、G.二次代謝経路に分けられ、さらにそれぞれが全部で 74 のサブカテゴリーに分類される (表 1)。DNA マイクロアレイ情報は培地を変化させた 190 種類の条件下で取得された、2 色法のデータを用いた。これらは、C 源、N 源、固体培地、その他の成分を変化させてコントロール条件と比較して得られた発現誘導比情報で、それぞれ、166, 15, 10, 15 種類からなる。具体的

には、C 源は 3% の Glc, Fru, Gal, Man, Mal, Lac, Chi, Dex, Raf, butandiol, Tre, Sor などを用いたもの、N 源は Met, Clu, Arg, Thr, Val, Lys, Gly, Pyr を加えたもの、固体培養は乾燥酵母、大豆、スターチ、松など、その他ブタンジオール、グリセロール、プロパノール、エタノールなどを加えたものである。これらの培養ではすべて株に RIB40 を用い、前培養は YPD 培地 (Difco) で 30°C, 120 rpm, 24 時間培養、本培養は、固体培養などの特殊なもの以外は、CD 培地 (3% Glc, 0.3% NaNO₃, 0.1% KH₂PO₄, 0.2% KCl, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.8 M NaCl) をベースに、C 源を変化させる場合はグルコースを他のものに変更して、同温度と振とう数で培養した。

4. 研究成果

4. 1. 解析手法の検討

はじめに、大規模アレイ情報を 74 の代謝経路毎にまとめて、独自の手法を交えながらクラスター分析および相関分析を行った (図 1)。すなわちまず、サンプル内で表 1 の経路毎に遺伝子発現量を足し合わせて正規化を行う (図 1a)、さらにサンプル間で経路毎に正規化を行い、距離を Spearman としてクラスター分析を行う (図 1b)。その結果、二次代謝経路の種類に応じた遺伝子発現パターンが存在することが明らかになった。すなわち二次代謝経路は大きく、炭化水素系 (group g)、アミノ酸系 (group e) およびアミノ酸系だがより一次代謝に近い系 (group h) に分かれる (表 2)。さらにそれぞれのグループには、連動して動く一次代謝のグループが各々存在する。これは、ある種類の二次代謝物質が産生される際に特徴的な遺伝子発現パターンが存在することを示唆するもので、生合成遺伝子の不明な二次代謝物質の産生を遺伝子発現情報から判断することにつながる、重要な知見である。さらに、二次代謝経路の各グループは、低窒素

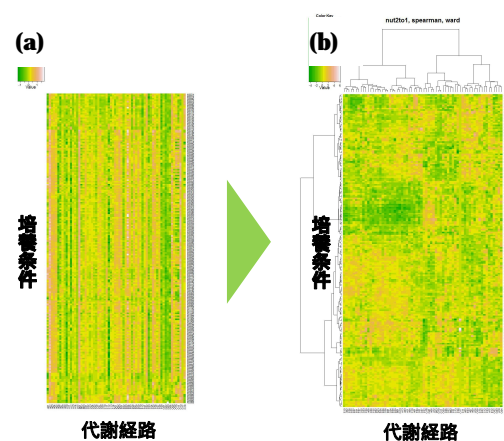


図 1. 大規模発現情報からの経路毎にまとめた遺伝子発現パターン

(a)経路毎にサンプル内で正規化された和、(b)さらにサンプル間で経路毎に正規化された値をクラスター解析した結果

表 1. *A. oryzae* 代謝経路分類

Vongsangnak et al., BMC Genomics, 9, 245, 2008
(カッコ内: 各カテゴリーに分類された遺伝子数)

A# Carbohydrate metabolism

A01# Glucose conversion (3)
A02# Glycolysis/Gluconeogenesis (39)
A03# Pentose-phosphate pathway (20)
A04# Tricarboxylic acid cycle and glyoxylate/Dicarboxylate metabolism (51)
A05# Pyruvate metabolism (33)
A06# Pentose and glucuronate interconversions (7)
A07# Propanoate and butanoate metabolism (10)
A08# Inositol phosphate metabolism (14)
A09# L-Arabinose/Arabitol and D-Xylose/D,L-Xylulose/Xylitol metabolism (24)
A10# Gluconic acid/Gluconate metabolism (4)
A11# Galactose/Galactitol metabolism (17)
A12# Galactonic acid/Galactonate metabolism (4)
A13# Mannose/Mannitol, Fructose and Sorbose/Sorbitol metabolism (16)
A14# Disaccharide metabolism (Trehalose, Maltose, Lactose) (23)
A15# Polysaccharide metabolism (Starch, Cellulose, Chitin, and Xylan) (114)

B# Energy metabolism

B01# Oxidative phosphorylation (65)
B02# Sulfur metabolism (7)
B03# Nitrogen metabolism (22)

C# Amino acid metabolism

C01# Alanine/aspartate and asparagine metabolism (26)
C02# Arginine and proline metabolism (43)
C03# Cysteine metabolism (16)
C04# Glutamate and glutamine metabolism (30)
C05# Glycine, serine and threonine metabolism (47)
C06# Histidine metabolism (15)
C07# Valine, leucine and isoleucine metabolism (Branched-chain amino acids) (43)
C08# Lysine metabolism (16)
C09# Methionine metabolism (19)
C10# Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis (Aromatic amino acids) (71)
C11# Beta-alanine metabolism (3)
C12# Cyanoamino acid metabolism (0)
C13# Taurine and hypotaurine metabolism (2)
C14# Glutathione biosynthesis (24)

D# Nucleotide metabolism

D01# Purine Metabolism (32)
D02# Pyrimidine metabolism (25)
D03# Nucleotide salvage pathway (16)

E# Lipid metabolism

E01# Fatty acid biosynthesis (23)
E02# Fatty acid metabolism (14)
E03# Glycerol metabolism (14)
E04# Sterol metabolism (2)
E05# Ergosterol esters metabolism (21)
E06# Mevalonate pathway (22)
E07# Cholesterol Metabolism (7)
E08# Phospholipid metabolism (41)
E09# Ethanolamine, choline, phosphocholine metabolism (5)
E10# Sphingoglycolipid metabolism (18)
E11# Complex lipid metabolism (0)
E12# Glycerolipid Metabolism (15)

F# Cofactor Pathway

F01# Folate biosynthesis (25)
F02# Coenzyme A and pantothenate biosynthesis (10)
F03# Thiamine Metabolism (4)
F04# NAD AND NADP Conversion (14)
F05# Vitamin B6 Metabolism (4)
F06# Porphyrin and Chrophyll metabolism (18)
F07# Ubiquinone biosynthesis (6)
F08# Riboflavin, FMN and FAD metabolism (13)
F09# Biotin Metabolism (6)

G# Secondary metabolism

G01# Penicillin biosynthesis (13)
G02# Sterigmatocystin/Aflatoxin biosynthesis (21)
G03# Flavonoid Biosynthesis (5)
G04# Melanin biosynthesis (9)
G05# Pentaketide melanin biosynthesis (0)
G06# Transport reaction (0)
G07# Plasma membrane transport (0)
G08# Carbohydrates (12)
G09# Amino acids NONE (16)
G10# Nucleotides (3)
G11# Other compounds (9)
G12# Alcohols and acids (0)
G13# Mitochondria membrane transport (8)
G14# Shuttle (0)
G15# Glycerol phosphate shuttle (0)
G16# Malate-Aspartate shuttle (0)
G17# Carnitine shuttle (1)
G18# Peroxisomal membrane transport (5)

表 2. 連動して動く代謝経路のグループ

G (紫) が二次代謝経路。色は表 1 のものに相当。

group a: A01 A04 C01 C07 C10 F04
group b: A02 E01 E05 E07 E10 F06 F07
group c: A03 A11 A13 B01 C04 E08 E09 G13
group d: A05 A07 A09 A14 C11 C14 E02 E03 G08
group e: A06 A12 F02 G01 G18
group f: A08 C03 C05 C08 C09 D01 D02 D03 E04 E06 F05 F09
group g: A10 A15 C12 E12 F03 G02 G03 G04
group h: B02 B03 C02 C06 C13 F01 F08 G09 G10 G11 G17

(group g:炭化水素系) 飢餓状態(group e: アミノ酸系) 固体培地 (group h:一次代謝寄りアミノ酸系) といった、それぞれ特徴的な培養条件の下で発現することも明らかになった(表 3)。これにより、二次代謝物質を高生産させる培養条件を、種類に応じてデザインできる可能性を裏付けることができた。

表 3. 各二次代謝グループを誘導する培地条件の傾向

group g: N 源の少ない最小培地
group e: C 源の少ない培地、グリセロールや酢酸ナトリウム添加
group h: 固体培地

4. 2. 培地デザインと検証

以上の結果に基づき、二次代謝経路のそれぞれのグループを誘導する培地条件をデザインした。すなわち、group g (炭化水素系) に対して B3 培地 (3% Glc, 0.25% Yeast extract, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄-7H₂O) group e (アミノ酸系) には CDX 培地 (2% Glycerol, 2% Sodium acetate, 1% Polypeptone, 0.3% NaNO₃, 0.1% KH₂PO₄, 0.2% KCl, 0.05% MgSO₄-7H₂O) group h (一次代謝寄りアミノ酸系) には固体培地を模倣した繊維質を多く含む V8 (20% V8 ジュース, 0.3% CaCO₃) 培地である。そして、各培養条件下で、*A. oryzae* と非常に近縁種だが二次代謝物質を多く産生することが知られる *Aspergillus flavus* を培養し、DNA マイクロアレイ実験を行った。各二次代謝グループをそれぞれ group g:ポリケチド (PKS) group e:非リボソームペプチド (NRPS) group h:リボソームペプチド (RiPS) 生合成系と位置づけ、指標となる遺伝子群をそれぞれ、既知の PKS である aflatoxin 生合成遺伝子群 (AFLA_139100-AFLA_139440)、二次代謝遺伝子群予測ツール Smurf (Khaldi et al., Fungal Genet. Biol., 47:736-41, 2010) で NRPS と予測された遺伝子群 cluster 8 (AFLA_010550-AFLA_010640) および我々が最近見出した RiPS である ustiloxin 生合成遺伝子 (AFLA_094940-AFLA_095110) として、3 種類の培地下での発現量を比較した(図 2)。結果、図にあるように、aflatoxin, cluster 8, ustiloxin 遺伝子群はそれぞれ、B3, CDX, V8 培地で誘導される傾向にあった。これらの遺伝子は、aflatoxin 遺伝子の 18 個のオーソログについては表 1 の代謝経路分類に使用されているが、その他 2 つについては計算に用いた代謝経路にはアサインされていないこと

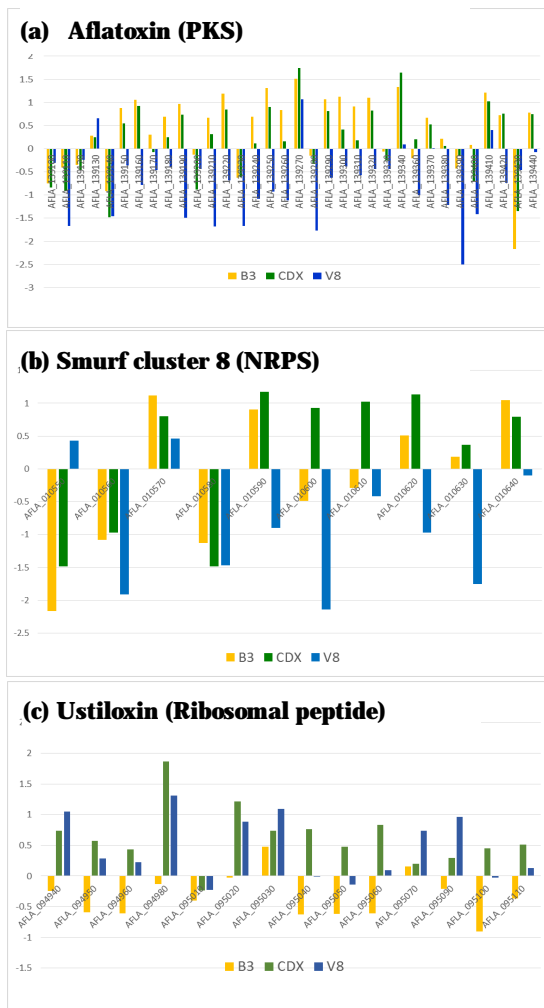


図 2. デザインされた培養条件下での 3 種類の二次代謝遺伝子の発現量

(a)Aflatoxin, (b)NRPS cluster 8, (c)ustiloxin. 黄色：B3 培地、緑：CDX 培地、青：V8 培地。

から、デザインした培地系が狙い通り、炭化水素系、アミノ酸系、一次代謝寄りアミノ酸系二次代謝経路のそれぞれを誘導するものであることが確認された。ただし V8 培地については、group h に特異的とはいいがたく、group e も誘導される傾向にあることから、より経路特異的な培地デザインには、より大規模で多様な発現情報が必要であると考えられる。なお aflatoxin, ustiloxin については、B3 および V8 培地のそれぞれで多く産生し、それ以外の培地では産生されないことを確認している。

以上より、大規模遺伝子発現情報を用いた本解析手法を用いることで、二次代謝物質産生に適した培地を種類に応じてデザインできることが示唆された。本結果をより大規模な公共データベース上の情報に適応し、物質産生の情報と合わせて解析することで、より正確できめ細かな二次代謝物質産生培地のデザインが可能になると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 3 件)

Myco Umemura, Hideaki Koike, Motoaki Sano, Noriko Yamane, Tomomi Toda, Koichi Tamano, Shinichi Ohashi, and Masayuki Machida, “Design of culture condition for secondary metabolite production of fungi from expression pattern of primary metabolic genes”, The 13th International Conference on Systems Biology, 2012/08/19-23, Toronto, Canada

Myco Umemura, Hideaki Koike, Motoaki Sano, Noriko Yamane, Tomomi Toda, Koichi Tamano, Shinichi Ohashi, and Masayuki Machida, “Design of culture conditions for secondary metabolite production of fungi based on large-scale transcriptome data”, The 27th Fungal Genetics Conference, 2013/03/12-17, Asilomar, US

(招待) Myco Umemura, Hideaki Koike, Jin Kawano, Tomoko Ishii, Yuki Miyamura, Tsutomu Ikegami, Goro Terai, Toshitaka Kumagai, Itaru Takeda, Koichi Tamano, Katsuhiko Horimoto, Jiujiang Yu, Kiyoshi Asai, and Masayuki Machida, “Genomic platform for efficient identification of fungal secondary metabolism genes”, Asian Mycological Congress 2013, 2013/08/19-23, Beijing, China

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等：

6. 研究組織

(1)研究代表者

梅村 舞子 (Myco Umemura)

研究者番号：00552259

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：