

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：33302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450506

研究課題名(和文) トランスポーター改変による二次代謝産物の大量生産

研究課題名(英文) Large-scale production of secondary metabolites by alteration of a transporter gene

研究代表者

佐野 元昭 (Motoaki, Sano)

金沢工業大学・バイオ・化学部・教授

研究者番号：80410299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：トランスポーター改変による有用物質生産の向上を目指して解析を行った。研究対象は、多くの有用物質を生産する麹菌(*Aspergillus oryzae*)を選択した。麹菌のトランスポーターと予測される640個の遺伝子のうち、約1割の遺伝子が膜上に存在しないことを特定した。次に、麹菌のアミノ酸トランスポーターの遺伝子破壊株を多数作製し、詳細な解析を行った。その結果、リジントランスポーター遺伝子を破壊すると、アンピシリン生産が抑制される条件下でもアンピシリン生合成遺伝子の発現量上昇が確認された。これらの解析で得られた情報は、糸状菌における有用物質の大量生産のための基盤情報となる。

研究成果の概要(英文)： We aimed to improve the production of fungal secondary metabolites by altering a transporter gene. We chose *Aspergillus oryzae*, which produces many useful compounds, as the subject of our research. We identified that approximately 10% of *A. oryzae* transporters were not expressed at the membrane. Next, we generated and analyzed in detail many gene disruption strains of amino acid transporters in *A. oryzae*. Disruptions of the lysine transporter upregulated the expression of penicillin biosynthesis genes, inhibit condition of penicillin biosynthesis. The data from these analyses will form the foundation for the mass production of a useful compound in filamentous bacteria.

研究分野：転写制御解析

キーワード： 麹菌 トランスポーター 二次代謝産物

1. 研究開始当初の背景

微生物による物質生産では、有用物質の生産遺伝子を人為的にいじり大量発現させている例が多い。しかしながら、遺伝子の発現制御は栄養源(炭素源・窒素源等)、温度やpH等により厳密な制御を受けており、遺伝子の発現制御を担うプロモーター改変や、転写制御因子の大量発現だけでは有用物質の大量生産に至らない場合が多数存在する。特に、微生物の生育に深く関与する炭素源・窒素源による遺伝子制御は複雑で厳密であり、菌の増殖のために用いる炭素源や窒素源が有用物質の生産遺伝子の発現を抑える働きをする場合などがある。そこで、有用物質生産遺伝子そのものを制御するのではなく、有用物質生産遺伝子の発現阻害となる特定の栄養源の取り込みの制御を行うことにより有用物質大量生産を目指す。

2. 研究の目的

栄養源の取り込みを行うトランスポーターの改変により、有用物質生産遺伝子の発現阻害となる栄養源の取り込みを制御し、有用物質生産の向上を目指して解析を進めていった。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株及び使用培地

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 株を遺伝子の取得などに使用した。遺伝子破壊株の作製には *A. oryzae* $\Delta ligD(pyrG)$ 株を使用し、その際のコントロール株は *pyrG* 遺伝子のみを復帰させた株を使用した。

培地は基本的には YPD 培地を使用し、トランスポーター改変株の確認の際には、N 源をぬいた最少培地に影響を確認するアミノ酸等を添加したものを使用した。

(2) 遺伝子破壊株の作製

遺伝子破壊断片は Fusion PCR 法により作製し、選択マーカーには *pyrG* 遺伝子を使用した。*A. oryzae* の形質転換は、プロトプラスト-PEG 法により行った。形質転換体の確認は、染色体 DNA を抽出し、PCR あるいはザンハイブリダイゼーションにより行った。

(3) リアルタイム PCR 解析

培養した麹菌の菌体を液体窒素存在で破碎し、RNAiso Plus(TaKaRa)を用いて total RNA の抽出し、その後 Oligotex® dT30 (super) mRNA Purification Kit (TaKaRa) を用いて mRNA 精製を行った。

リアルタイム PCR 反応は、SuperScript III Platinum Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR Green® (Invitrogen) で逆転写反応後、2^{-Ct} technique 法を用いてリアルタイム PCR 解析を行った。また、コントロール遺伝子にはヒストン H1 遺伝子を用いた。

4. 研究成果

(1) トランスポーターの機能予測

麹菌トランスポーター・パーミアーゼの膜貫通ドメイン数の確認

研究対象は、多くの二次代謝産物を生産する麹菌 (*A. oryzae*) を選択した。まず、麹菌ゲノムデータベース上でトランスポーター・パーミアーゼと予測されていた 640 個の遺伝子について、膜貫通領域を予測するソフト SOSUI 及び TMHMM を使用して膜貫通ドメイン数の解析を行った。その結果を図 1 に示す。可溶性タンパク質と予測された遺伝子が 16 個、膜貫通ドメイン数が 5 個以下と予測された遺伝子が 41 個あり、合計 57 個の遺伝子は生体膜上に存在しないと判断した。

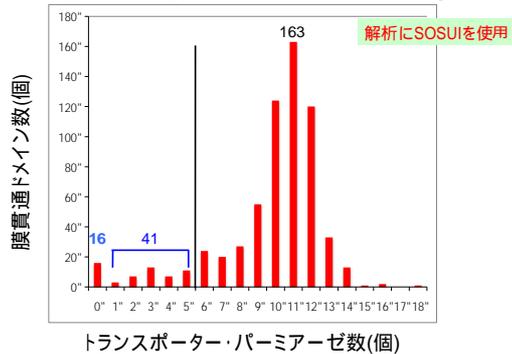


図 1 麹菌トランスポーター・パーミアーゼの膜貫通ドメイン数

また、これ以外のトランスポーター・パーミアーゼ遺伝子中にも、アミノ酸レベルの相同性検索結果より、イントロンの位置に誤りがあると推測された遺伝子や、遺伝子予測を誤っていると思われる遺伝子が見つかり、これら麹菌データベース上での遺伝子情報の修正を進めた。このような情報は、本研究のみならず他の研究者にとっても有益な情報になりえる。

麹菌アミノ酸トランスポーターの相同性検索

麹菌ゲノムデータベースでアミノ酸トランスポーターと予測されている 76 遺伝子について、アミノ酸レベルでの相同性でクラス分けを行った。その後、他の生物種との相同性と比較し、ホモロジー解析・系統樹解析等により機能予測を行った。図 2 に示すようにプロリンとアルギニントランスポーターはアミノ酸レベルで相同性が高いことが認められた。

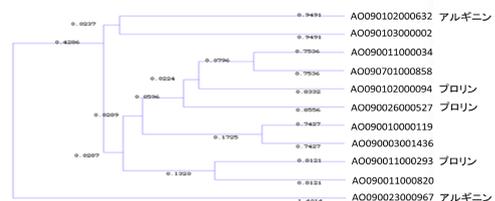


図 2 麹菌アミノ酸トランスポーター(プロリン)の系統樹

この解析により、データベース上でアミノ酸トランスポーターと推測された遺伝子がどのアミノ酸の取り込みに関わっているか推定を行ったが、最終的には遺伝子破壊株作製して解析を行う必要性が改めて確認された。

(2) トランスポーター改変株の作製

アミノ酸トランスポーター遺伝子破壊株の作製

メチオニン・アルギニン・リジン・プロリンの取り込みにかかわると推測されるアミノ酸トランスポーターについて遺伝子破壊株作製し、詳細な解析を行った。表1にプロリントランスポーターと推定されるA0090010000119 ($\Delta 119$) 遺伝子破壊株での、単一窒素源をプロリンのみでのプレートでの生育結果を示す。 $\Delta 119$ 破壊株では生育が悪くなったが、N 源をプロリンのみでも生育できる点から見て、A0090010000119 遺伝子はプロリントランスポーターであるが、これ以外にもプロリントランスポーターが存在することが明らかとなった。また、他のアミノ酸の取り込みにはあまり影響はなかった。

表1 $\Delta 119$ 破壊株の生育状況

	ΔLigD			$\Delta \text{A0090010000119}$		
	mm	Mm	%	mm	mm	%
1 mM	70.6	± 5.49	100	48.3	± 4.99	68.4
5 mM	63.6	± 2.90	100	44.0	± 3.89	69.2
10 mM	60.4	± 3.29	100	42.3	± 2.73	70.0

窒素化合物の取り込みに働く遺伝子破壊株の作製

窒素化合物の取り込みに働くトランスポーター遺伝子の破壊株作製に関しては、硝酸ナトリウム・GABA・アンモニアの取り込みに関わると予測される遺伝子の破壊株を作製し解析を進めた。図3に硝酸ナトリウムトランスポーター ($\Delta nrtA$) 遺伝子破壊株での、硝酸ナトリウムを単一窒素源での生育試験結果を示す。 $\Delta nrtA$ 株では生育が確認できず、 $nrtA$ 遺伝子は硝酸ナトリウムの取り込みに関わる重要な遺伝子である事が判明した。また、亜硝酸ナトリウムの取り込みには関与しないことも明らかとなった。

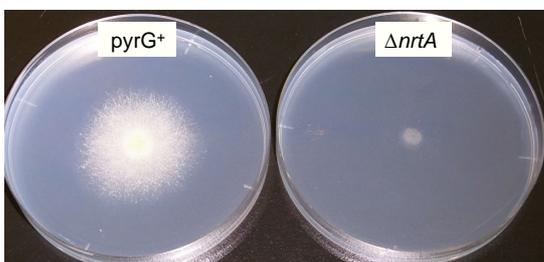


図3 $nrtA$ 遺伝子破壊株の硝酸ナトリウム存在下での生育

図4にGABA トランスポーター ($\Delta gabA$) 遺伝子

破壊株での、GABA を単一窒素源での生育試験結果を示す。この結果から、 $\Delta gabA$ 株では顕著な生育不良が確認された。 $\Delta gabA$ 遺伝子はGABA の取り込みに関わる重要な遺伝子である事が判明した。

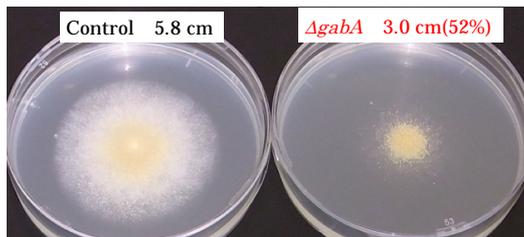


図4 $gabA$ 遺伝子破壊株のGABA 存在下での生育

これらの解析で得られた遺伝子破壊株は、今後の種々の解析に利用することができる利用価値の高い物である。

(3) 二次代謝産物の窒素化合物による影響 コウジ酸生産の窒素化合物による影響

コウジ酸は硝酸ナトリウムを少量でも添加すると生産されず、硝酸ナトリウムがコウジ酸生産遺伝子の発現阻害物質であると推定されている。そこで、硝酸ナトリウム取り込みに関わる $nrtA$ 遺伝子を破壊した場合の硝酸ナトリウム存在下でのコウジ酸生産を確認した(図5)。

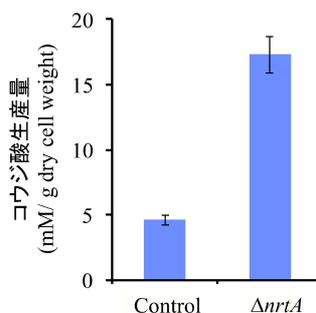


図5 $nrtA$ 遺伝子破壊株のコウジ酸非生産条件下(硝酸ナトリウム存在下)でのコウジ酸生産量

図5のようにコントロール株と比較して大幅なコウジ酸生産上昇が確認されていた。また、通常のコウジ酸生産条件下でもコウジ酸生産速度の上昇が確認された。このようにコウジ酸生産遺伝子を直接改良せず、コウジ酸生産遺伝子の発現阻害となる物質の菌体内への取り込み機構を破壊することで、コウジ酸の大量生産が可能となった。

前培養を行った後、硝酸ナトリウムを単一窒素源として本培養を行った硝酸ナトリウムトランスポーター遺伝子破壊株と通常の株とを、DNA マイクロアレイにより比較解析を行った。その結果、硝酸ナトリウムトランスポーター破壊株で、遺伝子発現量が2倍以上になっている遺伝子が1,302個確認された。二次代謝生合成に関連する遺伝子がないか

確認作業を進めている。また、二次代謝生合成に関連が疑われる遺伝子については、定量PCRにより詳細な解析を行った。

ペニシリン生産の窒素化合物による影響

抗生物質ペニシリンは、リアルタイム PCR 解析よりリジン存在下でペニシリン生産遺伝子 (*acvA*, *ipnA*) の遺伝子発現量が低下することが確認された(図6)。

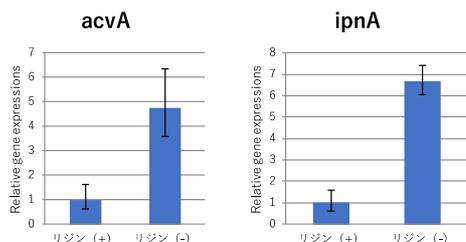


図6 リジン添加時のペニシリン生産遺伝子発現量(*acvA*, *ipnA*)

そこでリジンの取り込みにかかわるトランスポーター($\Delta gap1$)遺伝子を破壊したところ、通常、ペニシリン合成に使用しないリジンを含む培地中でも、コントロール(*pyrG*)株と比較して $\Delta gap1$ 遺伝子破壊株ではペニシリン生産遺伝子(*acvA*, *ipnA*)の発現量が低下しないことが確認された(図7)。

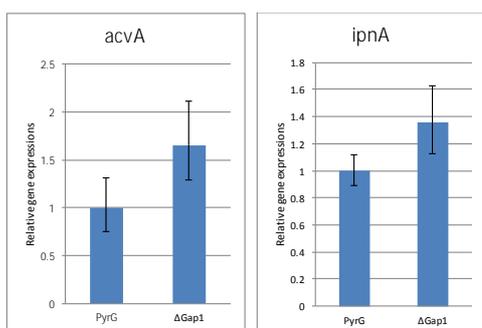


図7 *gap1* 遺伝子破壊株でのリジン存在下でのペニシリン生産遺伝子発現量(*acvA*, *ipnA*)

このようにペニシリン生合成遺伝子の発現阻害となるリジンの菌体内への取り込みを抑制することで、ペニシリン生合成遺伝子の発現抑制となるリジン存在下でも、遺伝子発現の維持が可能となった。

次に、*gap1* 遺伝子破壊株とコントロール株について前培養を行った後、リジンを単一窒素源とする培地で本培養を行って、DNA マイクロアレイによる解析を実施した。菌体内へのリジンの取り込み量が低下することにより、遺伝子発現量が上昇する遺伝子も見つかり、二次代謝生合成に関連する遺伝子であるか確認を行ったが、該当する遺伝子の機能が未知であるため確認が取れなかった。そこで、該当する遺伝子について遺伝子破壊株を作製し、機能について詳細な解析を進めている。

シクロピアゾン酸(CPA)生産の窒素化合物による影響

マイコトキシン的一种である CPA は、*A. oryzae* RIB40 では生産されない。それは、CPA の骨格形成を担う遺伝子 (*cpaA*) が欠損しているため、他の CPA 生合成関連遺伝子は RIB40 株でも有している。そこで、CPA 生産と窒素化合物との関係性について解析を行った。図8のように CPA 生合成関連遺伝子 (*cpaD*, *CpaT*) は硝酸ナトリウム存在下で強い発現上昇が確認され、CPA 生産と窒素化合物との関係性が明らかとなった。

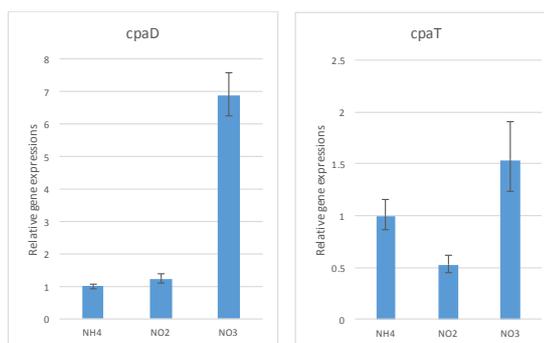


図8 窒素化合物による CPA 生合成関連遺伝子発現量(*cpaD*, *CpaT*) の変化

cpaT 遺伝子は MFS multidrug transporter であり、生産された CPA を菌体外に排出する機能を持つと考えられている。*cpaT* 遺伝子破壊株を取得した。この *cpaT* 遺伝子破壊株とコントロール株を DNA マイクロアレイ解析にかけ、新たな二次代謝生合成に関連する遺伝子の特定を進めた。今後、更なる詳細な解析が必要とされる。

今回の解析でトランスポーター遺伝子破壊の結果、致死性になる場合に備え、発現制御が可能なプロモーターを利用した解析の準備を進めたが、今回致死性になった遺伝子破壊株がなかったため使用しなかった。

これらの解析で得られた多くの遺伝子発現情報等は、今後の二次代謝産物の解析を行う際の有益な情報となる。

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2件)

Sano M., Dohmoto M. and Ohashi S. Characterization of the *gatA* gene from *Aspergillus oryzae*.

J. Biol. Macromol. 査読有り 2016;16:9-15

Sano M. *Aspergillus oryzae nrtA* affects kojic acid production.

Biosci. Biotechnol. Biochem. 査読有り

2016;80:1776-1780

〔学会発表〕(計6件)

佐野元昭、麹菌の GABA 存在下での菌体内タンパク質のプロテオーム解析
第 71 回日本栄養・食糧学会大会 2017.5.21
沖縄コンベンションセンター
(沖縄県宜野湾市)

佐野元昭、内田麻瑚、中谷貴人、松岡晃史。
麹菌アルギニントランスポーターの解析
日本農芸化学会 2017 年度大会 2017.3.19
京都女子大学(京都府京都市)

佐野元昭、大森 慎也、金谷茜里、町井あかね、木田成栄、大箸信一。
麹菌におけるコウジ酸生産量の相違の解析
第 67 回日本生物工学大会 2015.10.26
城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

佐野元昭、北川治恵、中野竜弥、松本侑也、木田成栄、大箸信一。
麹菌トランスポーターに関する解析
日本生物高分子学会 2015 年度大会
2015.9.20 香川大学オリーブスクエア
(香川県高松市)

佐野元昭、北川治恵、大箸信一。麹菌における硝酸ナトリウムトランスポーターの解析
日本農芸化学会 2015 年度大会
2015.3.28 岡山大学津島キャンパス
(岡山県岡山市)

佐野元昭、北川治恵、大箸信一。トランスポーター改変によるコウジ酸の大量生産
第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス
2014.11.16 東北大学川内北キャンパス
(宮城県仙台市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野元昭 (SANO MOTOAKI)
金沢工業大学 バイオ・化学部 教授
研究者番号: 80410299