

## 論文の内容の要旨

氏名：小嶋 涼

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：*Penicillium purpurogenum* の窒素代謝における PP-V の役割

### 序論

土壌より単離された糸状菌、*Penicillium purpurogenum* IAM15392 株は可溶性でんぷん、酵母エキス、クエン酸緩衝液からなる培地(Basal 培地)にて *Monascus* 色素同族体を生産する。*Monascus* 色素は古来より豆腐よう、漢方薬、食品着色料、保存料として利用されてきた。一方で、*Monascus* spp. が mycotoxin である citrinin を生産することから、欧米では食品への *Monascus* 色素の使用は認められていない。*P. purpurogenum* IAM15392 が生産する色素は *Monascus* 色素と非常に類似した構造をとり、また、現在までに、本菌が citrinin を生産するという報告はされておらず、安全に色素生産ができる糸状菌として期待されている。

*P. purpurogenum* IAM15392 が主として生産する色素は、橙色色素の PP-0 と紫色色素の PP-V である。PP-0 は母核のピラン環の 7 位に酸素原子を含んでおり、PP-V はそれがアミノ基に置換した構造をとる。窒素を構造中に有する化合物は、薬理活性をもつ場合が多く、抗生物質や抗菌剤として使われている。PP-V は窒素含有ポリケタイドとして知られるが、一般的に多くの窒素含有ポリケタイドは母核形成時にアミノ酸の形で窒素を構造中に取込むため、母核形成後に無機態の窒素を取込むとされる PP-V の生合成機構の解明は新たな薬理化合物の創製に資すると同時に、ポリケタイド化合物の生合成研究に新たな知見をもたらすと考えられる。以上の背景を踏まえ、我々は、PP-V の生合成機構を明らかにするために、窒素代謝における PP-V の役割を調べることを目的とした。

### 1. PP-V 生産と細胞内アンモニウムレベルの関連性

以前の研究から、本色素の生合成にはアンモニウム同化後にグルタミナーゼによって産出されたアンモニウムが利用されると考えられた。したがって、PP-V 生合成には細胞内アンモニウムレベルが重要と考え、グルタミンを窒素源としたときの PP-V 生産性と細胞内アンモニウムレベルとの関連性を調べた。

まず初めに、グルタミンを添加したときに培地中に分泌される PP-V が細胞内で合成されたものであるかどうか調べた。培養 72 時間においてどの条件においても培養濾液から PP-V は検出されなかったが、培養 96 時間目になると 10 mM グルタミン培地から PP-V が検出された。一方、*in vitro* で PP-0 とグルタミンを反応させたものから PP-V は検出されなかった。細胞内においては、10 mM グルタミン培地で培養した菌体が、培養 72 時間から PP-V を生産し始め、96 時間でその生産量は増加した。以上の結果から、グルタミンを窒素源としてときに生産される PP-V は細胞内で合成されることが分かった。また、PP-V が細胞外に分泌される直前、10 mM グルタミン培地で培養された菌体の細胞内アンモニウムレベルは、PP-0 生産条件の約 1.5 倍高くなっていた。しかし、細胞外に PP-V が分泌されたとき、10 mM グルタミン培地で培養された菌体の細胞内アンモニウムレベルは、PP-0 生産条件で培養されたものと同じくらいまで減少していた。これらの結果から、本糸状菌は細胞内で発生した余剰のアンモニウムを PP-V として細胞外に排出しているとの仮説を立てた。そこでこの仮説を証明するために、Basal 培地とグルタミン培地で培養した菌体を、新しく調製した Basal 培地に移し、さらに培養した。

生育段階にある菌体で色素生産がみられないものを移したとき、全ての菌体が PP-0 を生産した。一方、二次代謝が活発化してきている菌体を移したとき、10 mM グルタミン培地で培養した菌体だけが PP-V を生産した。このとき、PP-0 を生産した全ての菌体において、細胞内アンモニウムレベルは、どの菌体に関しても培地置換前と後でほとんど変化はなかった。対して、PP-V を生産した菌体の細胞内アンモニウムレベルは、培地置換前に PP-0 生産条件の約 1.5 倍を示し、置換後の細胞内アンモニウムレベルは PP-0 生産条件とおなじくらいまで減少した。したがって、*P. purpurogenum* は、細胞内の余剰のアンモニウムを PP-V として細胞外に排出していると考えられ、それにより、細胞内アンモニウムの恒常性が保たれている可能性が示唆された。

## 2. アンモニウムの取込みに関与するアンモニウムトランスポーターの同定と機能解析

前章で、*P. purpurogenum* は細胞内の余剰のアンモニウムを使って PP-V を合成することが明らかになった。細胞内のアンモニウムがグルタミンに由来することは既に明らかとなっている。一方、それとは別にアンモニウムトランスポーターを介して取込まれた外来のアンモニウムも細胞内アンモニウムの由来の一つとして挙げられる。アンモニウムトランスポーターは細胞内外のアンモニウムの輸送を仲介する膜タンパク質であるため、この遺伝子の発現レベルを調節することにより、第 1 章で立てた仮説がより確かになると考えた。よって、本章ではアンモニウムの取込みに関与するアンモニウムトランスポーターに着目した。一般に、真菌では複数のアンモニウムトランスポーター遺伝子 (*amt*) を持っていることが知られているが、本菌においては同定されていない。そこで、*P. purpurogenum* の *amt* と推定される遺伝子を 4 つ (*amtA*, *amtB*, *amtC*, *amtD*) 同定し、得られたアミノ酸配列情報からそれらの特性を予測した。次に、これらの Amt がアンモニウムの取込みに関して機能しているか調べた。しかし、*P. purpurogenum* の形質転換方法は確立されていないことから、分裂酵母を宿主として異種発現を行うことで各 Amt の機能解析をおこなった。

初めに、0.5 mM アンモニウム条件で *P. purpurogenum* の Amt が *amtΔ* 株の生育を相補するかどうか調べた。その結果、酵母の生育を相補していたのは AmtA と AmtB で、AmtC と AmtD は相補しなかった。培地中のアンモニウムの減少量を測定することで、間接的にアンモニウムの取込み能を調べたところ、AmtB は AmtA よりアンモニウムを取込む能力が高いというデータが得られた。一方、AmtC と AmtD にアンモニウムの取込みは認められなかった。そこで、より感度が良い assay として、メチルアンモニウムに対する各 *amt* 発現株の感受性を調べることにした。その結果、先の実験で *amtΔ* 株の生育を相補していた *amtA* と *amtB* を発現させた株にはっきりと生育阻害が見られた。対して、*amtC* を発現させた株は *amtΔ* 株同様に生育し、この assay からアンモニウムの取込み能はないと判断された。しかし、同じくアンモニウムの取込みが見られなかった *amtD* 発現株にも生育阻害がみられたことから、実際はわずかにアンモニウムを取込んでいることが明らかになった。以上 4 つの assay から、分裂酵母で本菌の Amt の特性を調べたところ、各 Amt 間でのアンモニウムの取込みを見ることができた。中でも、AmtA と AmtB がアンモニウムの取込みに対して、主に機能する Amt であることが示唆された。今後は、より詳細な特性を調べるための assay と、本菌での遺伝子改変を行うことを考えている。

## 3. *Penicillium purpurogenum* の形質転換法の確立

*P. purpurogenum* の持つ 4 つの *amt* の特性を調べたところ、細胞内へのアンモニウムの取込みには、AmtA と AmtB が主に機能することが示唆された。細胞内のアンモニウムレベルを制御し、色素生産への影響を調べるためには、本菌で RNAi や過剰発現を行い、*amt* の発現レベルを調節する必要があ

る。しかし、本糸状菌の形質転換法は確立されていない。そこで、新規の発現ベクター、pBPE を構築し、このベクターを用いて、実際に *gfp* を発現させることで、*P. purpurogenum* の形質転換法の確立を試みた。蛍光顕微鏡によって、GFP の発現を確認したところ、野生株でその発現が認められなかったのに対し、形質転換体では GFP の蛍光が観察された。このことから、我々が構築した方法で *P. purpurogenum* の形質転換ができることが分かった。今後は、この方法を用いて遺伝子改変を進めていく。

## 総括

第 1 章では PP-V 生合成は細胞内の余剰のアンモニウムを使って合成されることを明らかにした。第 2 章では細胞内外のアンモニウムの輸送に関わるアンモニウムトランスポーターをコードする 4 つの *amt* を同定し、アンモニウムの取込みに関して機能しているか調べた。第 1 章の仮説をより確かなものにするため、RNAi や過剰発現による遺伝子の発現制御を行うことが必要とされたが、本菌の形質転換法の確立はされておらず、遺伝子改変は不可能とされた。よって、第 3 章で本菌の形質転換法の確立を試みたところ、*gfp* の発現に成功した。今後は、この方法を用いて、機能解析を行う。また、形質転換法が確立できたことは、色素生合成機構の解明のみならず、色素高生産株を含む有用株の作出に大きく寄与したといえる。以上のことから、本論では PP-V 生合成機構の解明に繋がる要素を明らかにし、今後私たちが立てた仮説を確かにするための前段階を完了させることができた。なお、形質転換法の確立に関しては、色素生合成機構の解明のみならず、有用株の作出への応用が期待できる。