

Penicillium purpurogenum の窒素代謝における PP-V の役割

日本大学大学院生物資源科学研究科生物資源利用科学専攻
博士後期課程

小嶋 涼

2016

目 次

序 論	1-5
本 論	
第1章 PP-V 生産と細胞内アンモニウムレベルの関連性	6-25
第1節 諸 言	7-8
第2節 実験材料及び実験方法	8-13
1 実験材料および試薬・機器	8
2 <i>Penicillium purpurogenum</i> IAM15392 株の培養条件	9
3 細胞外色素と細胞内色素の抽出および解析	9-10
4 <i>in vitro</i> による PP-O と L-glutamine の反応	11
5 細胞内アンモニウムの定量	11-12
6 HPLC による PP-V の定量	12
7 培地置換	13
第3節 実験結果	13-15
1 PP-V 生産に対する glutamine の影響	13-14
2 細胞内アンモニウム濃度の測定	14
3 細胞内アンモニウム濃度が PP-V 生産に与える影響	15
第4節 考 察	16-18
第2章 アンモニウムトランスポーターの同定と機能解析	26-64

第1節 諸 言	27-28
第2節 実験材料及び実験方法	28-48
1 実験材料および試薬・機器	28
2 <i>Penicillium purpurogenum</i> ドラフトゲノムシーケンスからの <i>amt</i> の完全長 cDNA の取得	29-35
3 バイオインフォマティクスによるトポロジー解析	35
4 分裂酵母を使ったアンモニウムトランスポーターの機能解析	36-47
5 半定量的 RT-PCR による発現解析	47-48
第3節 実験結果	48-50
1 <i>Penicillium purpurogenum</i> における <i>amt</i>	48
2 <i>Penicillium purpurogenum</i> のもつ <i>amt</i> の機能解析	49-50
3 <i>amt</i> の発現動態	50
第4節 考 察	50-52
第3章 <i>Penicillium purpurogenum</i> の形質転換法の確立	65-96
第1節 諸 言	66-67
第2節 実験材料及び実験方法	67-85
1 実験材料および試薬・機器	67
2 <i>gfp</i> 発現ベクターの構築	68-78
3 GFP 発現株の作出	78-85
第3節 実験結果	85-86
1 GFP 発現株のスクリーニング	85-86
2 形質方法とその結果	86
第4節 考 察	87-88

総合考察

97-99

引用文献

100-109

謝 辞

110

序 論

エネルギー代謝や、蛋白質や核酸の生合成など生物の生命活動に必須な物質を供給する代謝を一次代謝とよび、その代謝産物を一次代謝産物という。これに対して、広範囲の植物や微生物にみられ、特にその生物の生命維持、発育増殖に直接関与しない代謝を二次代謝といい、その代謝産物を二次代謝産物という。二次代謝産物の多くは、生体の発育の特定時期或いは特定の組織で生成され、細胞内外へ蓄積される 1,2)。各種植物や微生物の二次代謝産物は抗生物質や色素等、経済上の有用性と共に形質発現の調節の研究上でも重要視されている。

Monascus 色素は古来より利用されている微生物由来天然物色素であり、日本では、沖縄の豆腐よう、赤飯などの独特の食文化を形成することに役立ってきた 3-5)。*Monascus* 色素は、現在我が国で食品の着色料として認可されている唯一の微生物由来天然物色素である 6)。 *Monascus* 色素における主な化合物としては Azaphilone 系色素化合物とその *N* 誘導体、すなわち、黄色の monascin、ankaflavin、橙色の rubropunctatin、monascorubrin、赤色の rubropunctamine、monascorubramine の 6 化合物が知られている 7-12)。

Monascus spp.によって生産される赤色色素は、抗菌 13)、抗ガン 14)、抗酸化 15)などの生理活性を示すことが明らかにされ、改めて *Monascus* 色素が重用視されるようになってきている。しかしながら、1995 年に Blanc らにより、*Monascus* spp.が有害な mycotoxin である citrinin を生産することが明らかにされた 16)。citrinin は、一部の *Monascus*、*Aspergillus*、*Penicillium* 属菌により生産され 17,18,19)、穀物をはじめとする食品や飼料中にみられる。実際には、citrinin に生理活性があるとの報告もあるが 20)、経口摂取によるヒトへの近位尿細管における腎障害を示す他、肝臓、神経系、免疫抑制など様々な障害をもたらす 21)。したがって、citrinin の低減が望まれるが、熱処理の過程で、別の化合物との複合体であり、細胞毒性をもつ citrinin H₁ や citrinin H₂ を形成してしまう

22)。このため、欧米において食品への *Monascus* 色素の使用は認められておらず、国際的にも安全な微生物色素の供給が求められている 23)。

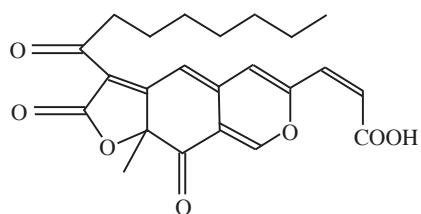
土壌より単離された糸状菌、*Penicillium purpurogenum* IAM15392 株は可溶性デンプン、酵母エキス、クエン酸緩衝液という極めて単純な培地にて Azaphilone 系 *Monascus* 色素同族体を生産する。一般に *Penicillium* 属糸状菌が生産する色素としては quinone 及び phenolic 化合物である赤色色素が見出されているが 24-33)、Ogihara らの研究により、本糸状菌の主生産色素である PP-O[(10Z)-12-carboxyl-monascorubrin] は monascorubin 同族体、PP-V[(10Z)-12-carboxyl-monascorubramine]は Azaphilone 系色素化合物 *N* 誘導体、すなわち monascorubramine 同族体であることが明らかにされている 34,35)(Fig. 1)。特に PP-V は、*Monascus* 以外の糸状菌から *Monascus* 色素同族体が生産されることが見出された最初の色素である 36)。また、現在までに *P. purpurogenum* が citrinin を生合成したという報告はなされておらず、本糸状菌による *Monascus* 色素同族体の安定生産が期待される 37)。よって、*Monascus* 色素市場への利用・応用を検討する上でも本糸状菌の色素同族体生合成機構の解明は意義深いものである。

P. purpurogenum IAM15392 が主として生産する色素は、橙色色素の PP-O と紫色色素の PP-V である。PP-O 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された構造をとる(Fig. 2)。また、PP-V は窒素含有ポリケタイドとしても知られる 38)。ポリケタイド化合物はアシル CoA を前駆体として微生物や植物によって生産され、数多くの医薬品が知られている 39)。糸状菌が生産するポリケタイド化合物の多くは炭化水素化合物であり、窒素原子を構造中に有するものは少ないが、この窒素原子は、医薬や農薬において活性発現に重要な役割を果たしていることが知られている 40,41)。しかし、窒素を構造中に有するポリケタイド化合物の生産において無機窒素源を利用した生産研究はほとんど行われておらず、無機態窒素を利用したポリケタイド化合物生合成系への窒素の取り込みに関する研究も未だ進んでいない。

窒素を構造中に有するポリケタイド化合物生合成系への窒素の取り込みに関して、微生物では糸状菌 *Aspergillus terreus* の生産する isoflavipucine と rubrobramide の研究において、窒素原子は母核形成時にアミノ酸の形で導入されると推測されている (42)。同様に放線菌 *Streptomyces halstedii* の生産する vicenistatin の研究においても窒素原子は母核形成時にアミノ酸の形で導入される (43)。また植物では、ミカン科の植物ヘンルーダ (*Ruta graveolens*) やヒカゲノカズラ科のトウゲシバ (*Huperzia serrata*) の生産するファイトアレキシンである acridone 類は母核形成時に *N*-methyl-anthraniloyl-CoA の形で窒素原子を取り込む (44,45)。このように、植物・微生物の生産する窒素含有ポリケタイド化合物の生合成系において、多くは母核形成時に構造中に窒素原子が取り込まれる。一方、*P. purpurogenum* IAM15392 株においては、PP-O の構造が形成された後に、窒素原子を取込むとされる。したがって、PP-V のアミノ基の導入機構の研究は、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ものであり、新規な薬理化合物の創製や有用色素の安定的な生産に資することが期待される。

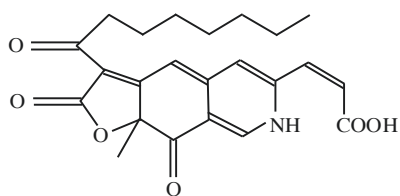
本研究では、*P. purpurogenum* の PP-V 生合成機構を明らかにするために、窒素代謝における PP-V の役割を調べることを目的とした。具体的には、異なる濃度のグルタミンを窒素源として用い、色素生産性と細胞内アンモニウムレベルを調べた。また、細胞内へのアンモニウムの取込みは主にアンモニウムトランスポーターによって行われることから、本糸状菌のアンモニウムトランスポーター遺伝子を同定し、それを分裂酵母内で異種発現させた。この形質転換をした酵母を用いて、低アンモニウム培地での相補テスト、アンモニウムの取込み活性の測定、メチルアンモニウムへの感受テストを行った。さらに、本糸状菌での発現解析を行った。PP-V 生産にアンモニウムトランスポーターが関与しているのか調べるためには、相同組換えや RNAi を行う必要があるため、*P. purpurogenum* の形質転換を試みた。

Penicillium purpurogenum pigments



[(10Z)-12-carboxyl-monascorubrin]

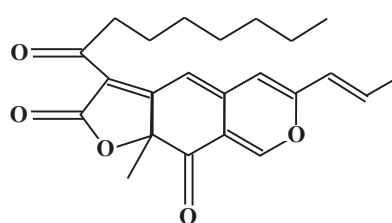
PP-O



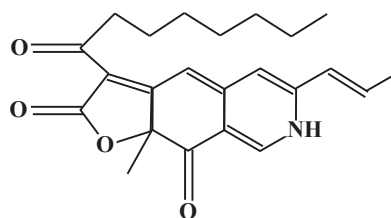
[(10Z)-12-carboxyl-monascorubramine]

PP-V

Monascus pigments



monascorubrin



monascorubramine

Fig. 1 Structure of PP-O, PP-V and *Monascus* pigments

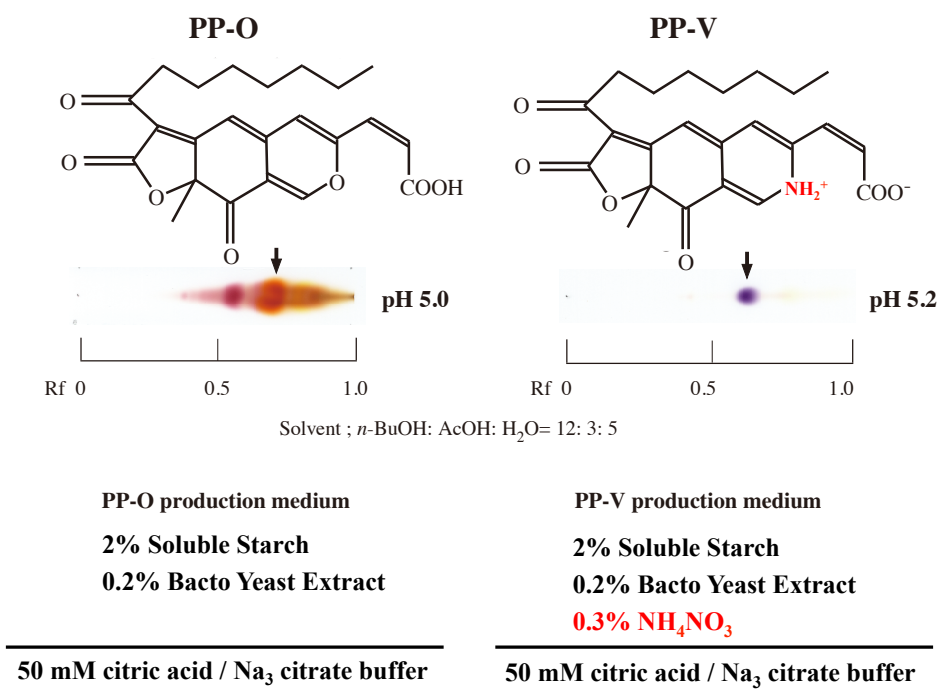


Fig. 2 Characterization of PP-O and PP-V

本 論

第 1 章

PP-V 生産と細胞内アンモニウムレベルの関連性

第 1 節 諸言

土壌より単離された糸状菌、*P. purpurogenum* IAM15392 株は特定培地条件下で、Azaphilone 系 *Monascus* 色素同族体である PP-Y、PP-O、PP-V、PP-R を産生する 34,35)。*Monascus* 色素は古来より東アジアで利用されてきたが、一部の *Monascus* が色素生産時に citrinin を副生することから、欧米諸国ではその利用が認められていない 23)。それに対して、本糸状菌においては、citrinin 生産は確認されていない。したがって、*P. purpurogenum* IAM15392 は今後の天然物色素生産者として、期待される 37)。

以前の研究により、本糸状菌の主生産色素である PP-V は monascorubramine 同族体であり、母核のピラン環にアミノ基を含むポリケタイドであることが明らかにされている 34)。ポリケタイド化合物はバクテリア、糸状菌、植物が生合成する二次代謝産物であり、その化合物は抗生物質 46)やコレステロール合成阻害剤 47)、食品着色料に利用されている色素 23)から mycotoxin 48)まで様々である。このようなポリケタイド化合物の多くは炭化水素鎖からなっている。そのため、窒素化合物に重要な生理活性を有することが分かっているにもかかわらず 41)、PP-V のような窒素含有ポリケタイドの研究はほとんど行われていない。

我々は、安定同位体標識酢酸を用いた実験を基に、PP-V の生合成経路に関して、母核の形成は *Monascus* の生産する赤色色素と同様に行われることを示した 38)。一方で、PP-O の 7-O と PP-V の 7-N との置換がどのように行われているかは明らかになっていない。

通常、クエン酸緩衝液、酵母エキス、可溶性デンプンを含む培地で PP-O が生産され、そこにアンモニウム塩もしくは硝酸塩を加えることで PP-V が生産されるようになる 49)。さらに近年の研究で、グルタミン、グルタミン酸を添加することでも紫色色素を生産することが明らかにされた 50)。また、これら二種類のアミノ酸に関して、グルタ

ミンのほうが紫色生産に対して効果が高かった 50)。また、グルタミナーゼ (GTA) を阻害したとき、PP-V の生産性が低下することが分かっている(新居 未発表)。これらのことから、本色素の生合成にはアンモニウム同化後に GTA 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(Fig. 3)。

以上のような背景を踏まえ、PP-V 生合成には細胞内アンモニウムレベルが重要だと考えた。グルタミンに関しては、NMR によってその構造が PP-V のものと一致することが既に示されているため 50)、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を比較した。

第 2 節 実験材料および実験方法

1 実験材料および試薬・機器

本研究において、IAM culture collection に保存されている *P. purpurogenum* IAM15392 株を用いた。PCR 反応及び 0.2 ml チューブのインキュベーションには T グラジエントサーモサイクラー (Biometra) もしくは T1 サーモサイクラー (Biometra) を用いた。1.5 ml チューブの遠心分離には卓上遠心機 Centrifuge 5424、ローター FA-45-24-11-Special (Eppendorf) および、Centrifuge 5415R、ローター F-45-24-11 (Eppendorf) 用いた。50 ml チューブ (CORNING®) の遠心分離には、冷却遠心機 RSL-05A、スイングローター 50 ml × 4 ユニット (佐久間製作所) を用いた。また特記しない限り、試薬は和光純薬工業の特級試薬を用いた。水は Milli-Q 超純水装置 (MILLIPORE) で得た超純水をオートクレーブ滅菌して用いた。また、培地、0.2 ml (WATSON) 及び 1.5 ml チューブ (Axygen, BIO-BIK) は ES-215 (株式会社・トミー精工) を、調製した試薬は ES-315 (株式会社・トミー精工) を用いてオートクレーブ滅菌した。三角フラスコは Drying Sterilizer SG810 (ヤマト科学株式会社) を用いて乾熱滅菌した。また、菌体の破碎に用いた乳鉢および乳棒は操作に液体窒素を用いることから、損壊を避けるために予め -80 °C で冷却した。

2 *P. purpurogenum* IAM15392 株の培養条件

P. purpurogenum IAM15392 は、YMA 培地 (5 g peptone (極東製薬工業株式会社), 3 g Bacto™ Malt Extract, 10 g D(+)-Glucose, 20 g INA -Agar (伊那食品工業株式会社) / L) に植菌後、菌体が十分に生育したものを使用した。液体培養するために、500 ml 容三角フラスコに基本培地 (20 g Soluble starch, 2 g Bacto™ Yeast Extract / L 50 mM citric acid / Na₃-citrate buffer , pH 5.0) もしくは基本培地に終濃度 1 もしくは 10 mM の L-glutamine を含む Gln 培地を 100 ml 調製し、オートクレーブ滅菌した。YMA 培地より、乾熱滅菌したエーゼを用いて菌糸及び、分生子を 1 白金耳とり、調製済みの培地にそれぞれ植菌した。この操作は、クリーンベンチ内で行った。植菌された菌体は振とう培養機 (タカギ冷機株式会社) を用いて 30 °C 下 200 rpm で 72 もしくは 96 時間、好氣的に培養された。

3 細胞外色素と細胞内色素の抽出および解析

3-1 細胞外色素の抽出と Thin layer chromatography (TLC) による解析

3-1-1 培養上清からの色素抽出

基本培地、Gln 培地の培養上清をエチレンオキサイドガス (千葉大同株式会社) により HP_{SP}滅菌バッグ (日油技研工業株式会社) を用いて滅菌した濾紙 (Advantec, No. 2)、ブフナー漏斗及び吸引瓶を用いて吸引濾過した。培養濾液を 15 ml チューブに 10 ml 分取し、4 °C、1600 × g、15 min の条件で遠心分離した。上清を 10 ml 容ガラス製遠沈管 (Iwaki) に 5 ml 分取し、等量の酢酸エチルを加え、激しく攪拌し、2 min 程度静置した。上層を遠沈管の目盛りで 1 ml ずつ 3 本のカルチャーチューブ (φ 12×75 mm, Iwaki)

に分注し、遠心エバポレーター (Eyela Centrifugal Vaporizer CVE-200D) を用いて減圧乾固した。

3-1-2 Silica gel TLC による色素の解析

減圧乾固した酢酸エチル抽出物に 0.1 ml の酢酸エチルを加え、5 μ l キャピラリーを用いて、培養液換算で 250 μ l を 1 cm 間隔で Silica gel TLC プレートにスポットした。次に、*n*-BuOH : MeOH : H₂O = 12 : 3 : 5 (BAW) を展開溶媒として用いて、色素を分離した。その後、リンモリブデン試薬 {Disodium Molybdate (VI) Dihydrate 2%を Phosphoric Acid-Sulfuric Acid-H₂O (3:10:200, V/V/V) 混液に溶解したもの} を噴霧し、ホットプレート上 120 °C で加熱反応させ TLC プレート上のスポットを確認した。

3-2 細胞内色素の抽出と TLC 解析

3-2-1 菌体からの色素抽出

基本培地、Gln 培地の培養上清を濾紙 (No. 2)、ブフナー漏斗及び吸引瓶を用いて吸引濾過した。菌体を 50 mM クエン酸 buffer (pH 5.0) を用いて洗浄後、濾紙上に湿菌体を得た。得られた菌体を 50 ml のメタノールに浸し、24 時間放置した。メタノール抽出物は、濾紙 (No. 2) と漏斗を用いて濾過することによって得られた。これを 15 ml チューブに 10 ml 分取し、チューブの目盛で 1 ml ずつ 3 本のカルチャーチューブ (ϕ 12×75 mm, Iwaki) に分注した。それを遠心エバポレーターによって減圧乾固した。

3-2-3 TLC による色素の解析

減圧乾固したメタノール抽出物に 0.1 ml のメタノールを加え、5 μ l キャピラリーを用いて培養液換算で 250 μ l を 1 cm 間隔で Silica gel TLC プレートにスポットした。次に *n*-BuOH : MeOH : H₂O = 12 : 3 : 5 (BAW) を展開溶媒として用いて色素を分離した。

4 *in vitro* による PP-O と L-glutamine の反応

4-1 PP-O と L-glutamine の反応物の抽出

基本培地で 72 時間培養した菌体の培養上清を滅菌した濾紙 (No. 2)、ブフナー漏斗及び吸引瓶を用いて吸引濾過した。培養濾液を 15 ml チューブに 9 ml 分取し、100 mM L-glutamine 溶液を 1 ml (終濃度 10 mM) 加えた。この溶液を転倒混和した後、30 °C 下暗所で 10 時間静置した。反応終了後、4 °C 下 3,000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清を 10 ml 容ガラス製遠沈管 (Iwaki) に 5 ml 分取し、等量の酢酸エチルを加え、激しく攪拌し、2 分程度静置した。上層を遠沈管の目盛りで 1 ml ずつ 3 本のカルチャーチューブ (ϕ 12×75 mm, Iwaki) に分注し、遠心エバポレーターを用いて、減圧乾固した。

5 細胞内アンモニウムの定量

5-1 菌体の培養

基本培地、1 mM Gln 培地、10 mM Gln 培地を 500 mL フラスコに 100 ml 調製し、クリーンベンチ内で *P. purpurogenum* IAM15392 を 1 白金耳植菌し、30 °C 下 200 rpm で 72 もしくは 96 時間培養した。濾紙 (No. 2)、ブフナー漏斗及び吸引瓶により、培養液を吸引濾過した。菌体を 50 mM citric acid / Na₃-citrate buffer (pH 5.0) にて洗浄後、濾紙上に湿菌体を得た。菌体は液体窒素で凍結させ、-80 °C で保存した。

5-2 細胞内アンモニウムの抽出

本節 5-1 で得られた菌体 0.5 g と α -アルミナ 1.0 g を乳鉢に加え、乳棒を用いて氷上で、菌体を破碎した。十分に破碎した後、10 mM Sodium Phosphate Buffer (pH 8.0) を 1 ml 加え乳棒を使って混和した。1.5 ml チューブ (BIO-BIK) に移し 4 °C 下 10,000 rpm で 20 分

間遠心分離を行った。得られた上清 300 μl を新しい 1.5 ml チューブ(BIO-BIK)に移し、等量の 0.5 M Trichloroacetic acid solution を加え、室温、10,000 rpm で 5 分遠心分離し、得られた上清を細胞内アンモニウム抽出液とした。

5-3 細胞内アンモニウムの測定

本節 5-2 で得られた細胞内アンモニウム抽出液 100 μl を ϕ 10 \times 90 試験管に分取した。そこに、水 1700 μl を加え、DU-730 (ベックマン・コールター)を使って反応前の吸光度(吸収波長 450 nm)を測定した。これを A_1 とする。吸光度を測定した溶液を再び ϕ 10 \times 90 試験管に戻し、ネスラー試薬(Sigma-Aldrich)を 200 μl 加えた。常温で 10 分静置し、先ほどと同様の機器を用いて、反応後の吸光度(吸収波長 450 nm)を測定した。これを A_2 とする。細胞内のアンモニウム濃度を算出には、 $A_2 - A_1$ から得られた値を使用した。なお、検量線の作製には、0 μM 、50 μM 、100 μM 、200 μM になるように調製した NH_4Cl 溶液 1,800 μl に、ネスラー試薬を 200 μl 加えたものを用いた。

6 HPLC による PP-V の定量

本節3-1-1で得られた抽出物を 50 μl の DMSO に溶解した。内径 150 \times 4.6 mm の X-Bridge C18 カラム (Waters) とフォトダイオードアレイ (G135B DAD, Agilent Inc.) を使用した逆相 HPLC システム (Agilent HP1100 シリーズ) によって PP-V を定量した。なお PP-V の分離は、0.1% HCOOH 溶解 40% MeCN (0–5 min), 0.1% HCOOH 溶解 40–80% MeCN (5–45 min), 0.1% HCOOH 溶解 80% MeCN (45–50 min) で流速 1.0 ml/min、カラム温度 40 $^\circ\text{C}$ の条件で行った。

7 培地置換

7-1 菌体の培養

500 ml 三角フラスコに基本培地、1 mM Gln 培地、および 10 mM Gln 培地を 100 ml 調製した。クリーンベンチ内で *P. purpurogenum* IAM15392 を 1 白金耳植菌し、30 °C、200 rpm で 48 もしくは 72 時間培養した。目的の時間（48 もしくは 72 時間）培養された菌体をクリーンベンチ内で本節 5-1 と同様の方法で集菌し、湿菌体を得た。得られた菌体を新しく調製した基本培地に移し、培地置換前と後での培養時間が合計 96 時間になるように、24 もしくは 48 時間培養した。

培養後、濾紙 (No. 2)、ブフナー漏斗及び吸引瓶により、培養液を吸引濾過し、濾液 10 ml を 15 ml チューブに分取した。本節 3-1-1 の方法で細胞外の色素を抽出し、本節 3-1-2 と同様の方法で解析した。

菌体はオートクレーブにより滅菌処理した 50 mM citric acid / Na₃-citrate buffer (pH 5.0)にて洗浄後、液体窒素で凍結させ、-80 °Cで保存した。この菌体に対し、本節 5-2、5-3 と同様の方法で細胞内のアンモニウムを定量した。

第 3 節 実験結果

1 PP-V 生産に対する glutamine の影響

1-1 細胞外色素の検出

L-glutamine を添加したときに生産される PP-V が細胞内で生合成されたものであるかどうか調べるために、*in vitro* で PP-O と L-glutamine を反応させた。Fig.4 に示すように、PP-O と L-glutamine の反応物から PP-V は検出されなかった。また、異なる濃度の L-glutamine を添加して 72、96 時間培養したところ、1 mM Gln 培地中から PP-V は検

出されなかった。それに対して、10 mM Gln 培地で 96 時間培養したとき、培地中から PP-V が検出された。

1-2 細胞内色素の検出

Fig.5A は実際に細胞内での PP-V 生合成の挙動を調べた結果である。10 mM Gln 培地において 72 時間から細胞内で PP-V が生合成され始め、96 時間でその生産性は高くなった。1 mM Gln 培地では、96 時間で細胞内での PP-V 生合成が見られたが、その量は培地中から検出されるほどではなかった。

1-3 HPLC による PP-V の検出

細胞外に PP-V として排出されたアンモニウム量と細胞内で発生する余剰のアンモニウム量が一致するかどうか調べるために、まず、HPLC によって培養 96 時間における 10 mM Gln 培地中の PP-V を定量した。細胞外に分泌された PP-V は $8.52 \mu\text{mol/g}$ (cell weight) であった。PP-V を定量した際のクロマトグラムは Fig. 5B に示す。

2 細胞内アンモニウム濃度の測定

Table1 には PP-O 生産時と PP-V 生産時の細胞内アンモニウムレベル ($p < 0.05$) を比較した結果を示す。測定には、PP-O 生産条件(基本培地、1 mM Gln 培地)および PP-V 生産条件(10 mM Gln 培地)で、72 もしくは 96 時間培養された菌体を用いた。10 mM Gln 培地で 72 時間培養された菌体の細胞内アンモニウムレベルは PP-O 生産条件で培養された菌体の約 1.5 倍高くなった。しかし、培養 96 時間で 10 mM Gln 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-O 生産条件で培養された菌体とほとんど同じ値まで下がった。さらに Table1 から、培養 96 時間について、細胞内で発生する余剰のアンモニウム量を算出した結果、 $4.36 \mu\text{mol/g}$ (cell weight) であった。

3 細胞内アンモニウム濃度が PP-V 生産に与える影響

3-1 培地置換前後の細胞外色素の検出

余剰のアンモニウムだけで PP-V が生産されるかどうか調べるために、培地置換の実験を行った。Fig. 6A には、培養 48 時間の時点における色素生産性と、菌体を培地置換してさらに 48 時間培養したときの色素生産性を示す。Fig. 6B には、培養 72 時間の時点における色素生産性と、その菌体を培地置換してさらに 24 時間培養したときの色素生産性を示す。

培養 48 時間で菌体を新しい基本培地に移したとき、最初にどの glutamine 濃度で培養しても、橙色色素を生産した。対して、培養 72 時間で菌体を新しい基本培地に移したとき、10 mM Gln 培地で培養されものだけが、紫色色素を生産した。基本培地、1 mM Gln 培地で 72 時間培養された後、培地置換された菌体はどちらの色素も生産しなかった。

3-2 培地置換前後の細胞内アンモニウムの測定

Table2 は培地置換前後の細胞内アンモニウムレベルを比較した結果である ($p < 0.05$)。菌体を 48 時間培養し、それを培地置換してさらに 48 時間培養したとき、全ての条件において培地置換前後で細胞内アンモニウムレベルにほとんど差は見られなかった。

菌体を 72 時間培養し、それを培地置換してさらに 24 時間培養したものに関しては、最初の培養に基本培地、1 mM Gln 培地を用いたとき、培地置換前後で細胞内アンモニウムには差はなかった。対して、最初の培養に 10 mM Gln 培地を用いたとき、培地置換前の細胞内アンモニウムレベルは最初に基本培地、1 mM Gln 培地で培養された菌体の 1.5 倍高かった。しかし、培地置換後の細胞内アンモニウムレベルは、基本培地、1 mM Gln 培地で最初に培養された菌体と同じくらいまで減少した。

第 4 節 考察

PP-O と L-glutamine を *in vitro* 反応させたときに PP-V が検出されなかったこと、また、菌体メタノール抽出物から PP-V が検出されたことから、窒素源として L-glutamine を使ったときに培地中に分泌される PP-V が細胞内で生合成されたものであることが示された。

近年、二次代謝産物が糸状菌にとって重要な生理的役割を持つことが報告されている。例えば、citrinin は酸化ストレスから細胞を守る役割があり 51)、ochratoxin は細胞内の CI の恒常性を維持する役割がある 52)。このことから、*P. purpurogenum* の生産する色素にも、同菌にとって何らかの重要性があることが予測された。

PP-V はその構造中にアミノ基を含む Azaphilone 化合物 *N* 誘導体である。したがって、本色素の生合成にはアンモニウムが必要とされる。また、Arai の研究 50) と GTA の阻害実験から (新居 未発表)、glutamine 分解の過程で発生したアンモニウムが PP-V 生合成に使われることが予測される。

これらの見解を基に、本研究では *P. purpurogenum* は PP-V の母核に細胞内で不必要になったアンモニウムを取り込ませて、細胞外に排出しているとの仮説を提案した。実際、10 mM Gln 培地において培養 96 時間の時点で PP-V が生産されたとき、菌体の細胞内アンモニウムレベルは PP-O 生産条件 (基本培地、1 mM Gln 培地) で培養された菌体とほとんど同じくらいまで減少した。この結果は仮説を支持するが、より確かな証拠を得るために、PP-V として排出されたアンモニウム量と細胞内の余剰のアンモニウム量が一致するか調べた。10 mM Gln で培養した菌体が、PP-V として細胞外に分泌したアンモニウムは 8.52 $\mu\text{mol/g}$ (cell weight) であった。しかし、Table 1 から算出された細胞内の余剰のアンモニウム量は 4.36 $\mu\text{mol/g}$ (cell weight) であった。これは、培養 72 時間から PP-V 生合成が始まっていたため、既に細胞内で PP-O と反応しまい、測定し

きれなかったアンモニウムが増加分に値すると考えられる。このことから、細胞外に分泌されたアンモニウム量と細胞内のアンモニウム量の一致を見ることは困難であることが分かったので、別の方法で、*P. purpurogenum* IAM15392 株が細胞内の余剰のアンモニウム分だけでも PP-V を生産できるかどうか調べた。

我々の仮説を踏まえると、細胞内アンモニウム濃度が一定レベルを超えていた場合、それを除去する必要と考えられた。アンモニウムを除去する手段として、PP-V を生合成するのであれば、通常 PP-O が生産される基本培地でも PP-V が生産されるはずである。したがって、私たちは、growth phase にあつて、色素生産がない菌体(培養 48 時間)と、色素生産が活発化している菌体(培養 72 時間)を新しく調製した基本培地に移した。

P. purpurogenum IAM15392 が 10 mM Gln 培地で 72 時間培養後に、基本培地に移されたとき、通常、PP-O を生産するはずの条件でも、紫色色素が検出された。Ogihara らの研究により、TLC 解析での PP-V は Rf=0.75、PP-O は Rf=0.65 であることが示されている(35,36,38)。本実験において検出された紫色色素は PP-V の Rf 値と一致したため、この紫色色素を PP-V とした。基本培地もしくは 1 mM Gln 培地で同じ時間培養したときには、PP-O、PP-V のどちらも検出されなかった。これについては、72 時間から二次代謝のレベルが減少するためと考えられた。また、培地置換前と後の細胞内アンモニウムを測定すると PP-V を生産した条件では培地置換後で減少が見られた。一方、培養 48 時間後に、基本培地に移されたときには、全ての条件下で PP-O 生産が確認された。このとき、10 mM Gln 培地で培養された菌体に関して細胞内アンモニウムは、培地置換前と後で差はなかった。したがって、これらの結果から、PP-V は細胞内の余剰のアンモニウムを使って生合成されるという仮説(Fig. 7)が正しいことが示唆された。ただし、実際、細胞内では様々な経路からアンモニウムは発生しているため、実質的には、窒素化合物や添加された L-glutamine 以外のアミノ酸に由来するアンモニウムとも PP-O が反応していると考えられる。

過剰のアンモニウムは生物体に対して毒素になる(53-55)。そのため、ヒトは尿素サ

イクルによって、アンモニアを無毒な物質に変換し 53)、*Saccharomyces cerevisiae* 55) は SPS トランスポーターを介して、アミノ酸としてアンモニウムを細胞外に排出する。このようなメカニズムは糸状菌においては知られておらず、本菌が初めてである。

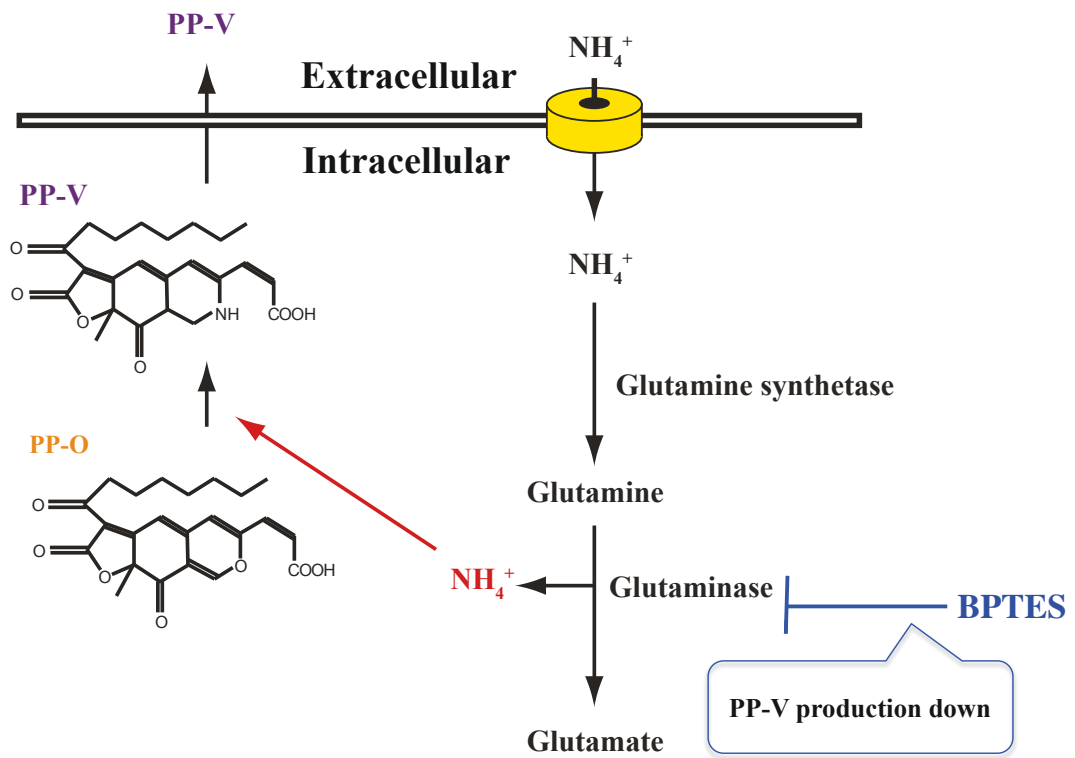


Fig. 3 Glutamine catabolism and PP-V production

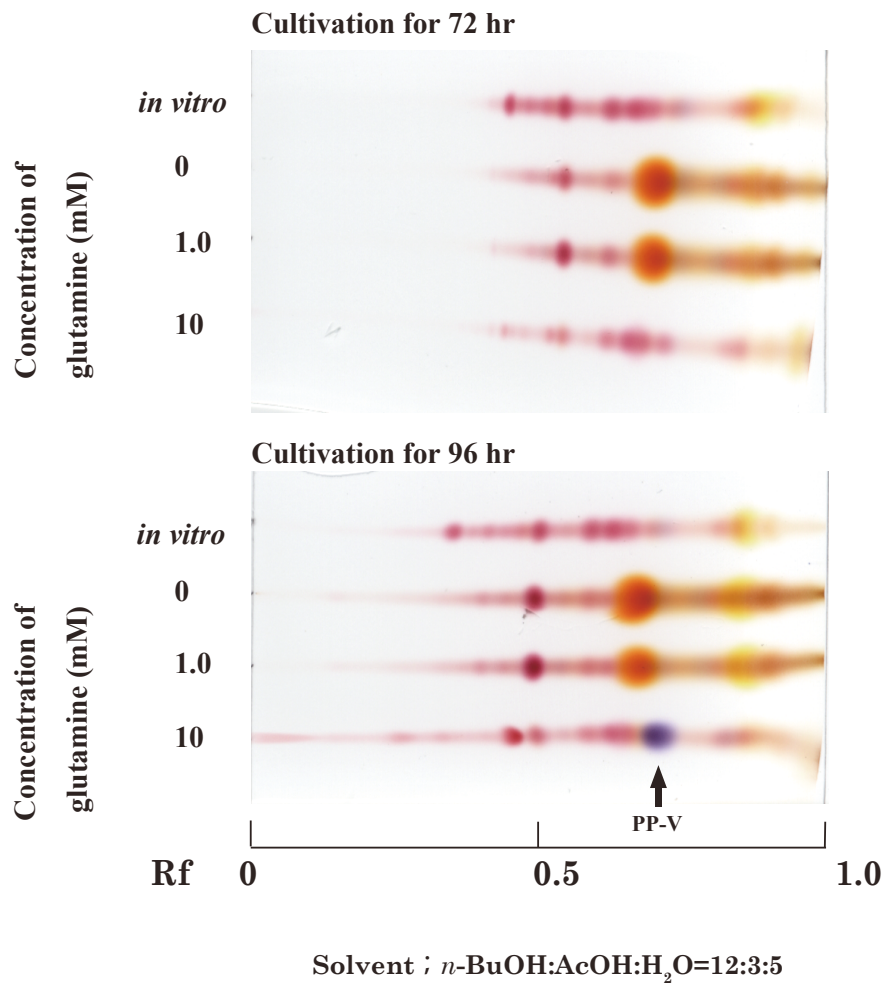


Fig. 4 Effect of L-glutamine on PP-V production

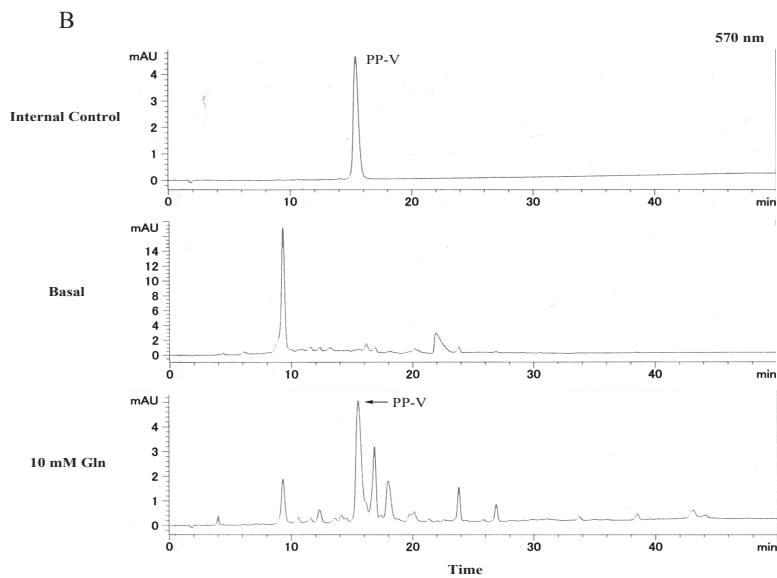
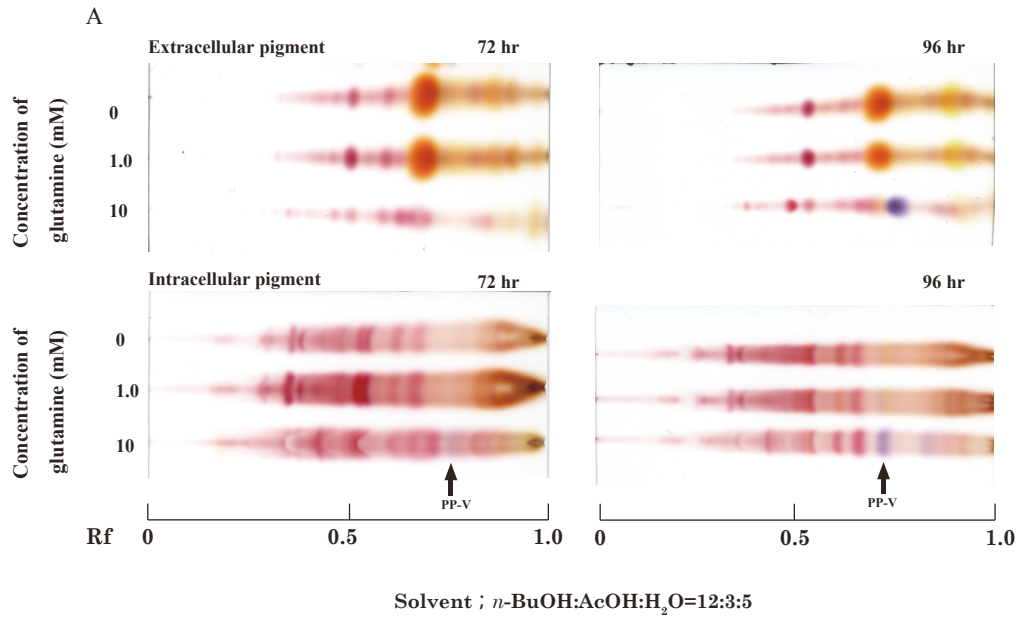


Fig. 5 Detection of PP-V in extracts of *P. purpurogenum*

A) TLC of the extracellular and intracellular pigment. (B) HPLC chromatogram in extracellular pigment from basal and 10 mM L-glutamine medium.

Table1 The intracellular ammonium level of *P. purpurogenum* cultured in L-glutamine containing medium

Culture condition	Culture time (hr)	Growth (g/100 mL)	Cell weight ¹ (g)	Ammonium level ² ($\mu\text{mol/g}$) ³
Basal	72	1.84	0.50	8.37 (± 0.36) ⁴
	96	3.02	0.50	7.17 (± 1.60)
1 mM Gln	72	1.94	0.51	8.21 (± 0.94)
	96	3.06	0.48	6.52 (± 0.17)
10 mM Gln	72	2.12	0.49	12.45 (± 0.93)
	96	3.53	0.50	8.09 (± 0.94)

¹ Mycelia weight for this experiment

² Ammonium level of extracts

³ Mole of ammonium /cell weight

⁴ Standard deviation (SD)

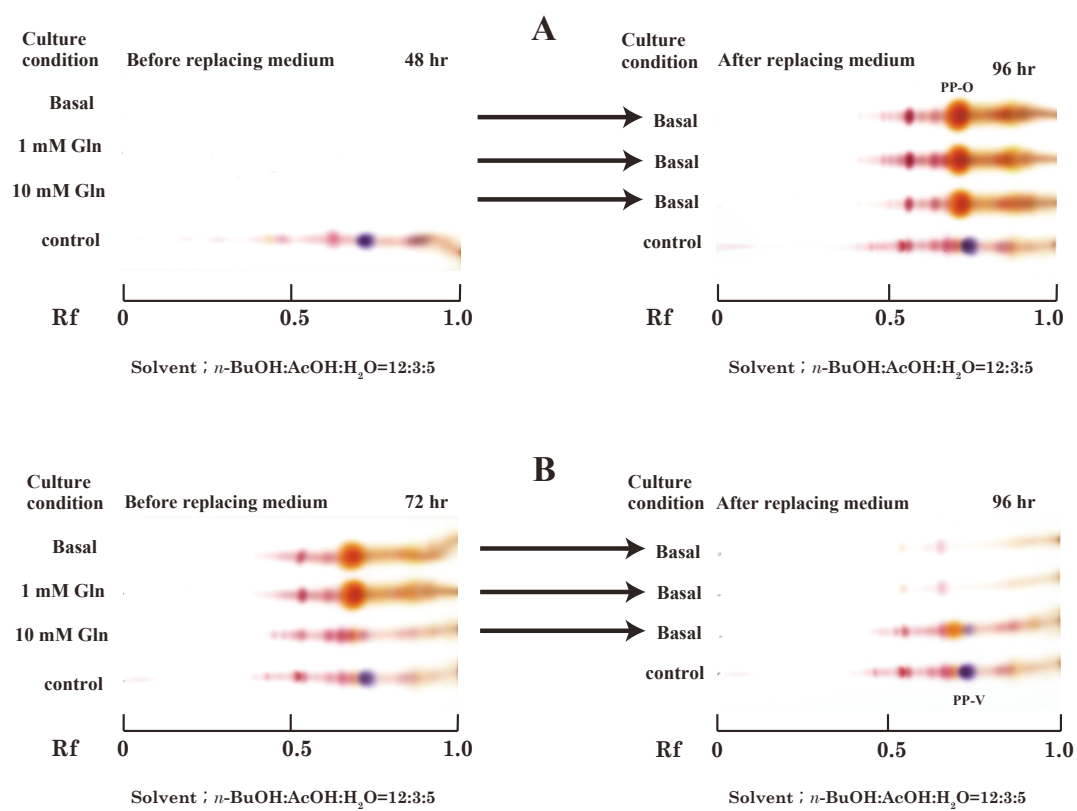


Fig. 6 PP-V productivity of *P. purpurogenum* before and after replacing medium (A) Pigment productivity after cultivation for 48 hr cultivation and after replacing medium. (B) Pigment productivity after cultivation for 72 hr cultivation and after replacing medium.

Table2 The intracellular ammonium level of *P. purpurogenum* in before and after replacing medium

Culture condition	Culture			Culture		
	time before replacing medium (hr)	Cell weight (g) ¹	Ammonium level ² ($\mu\text{mol/g}$) ³	time after replacing medium (hr)	Cell weight (g) ¹	Ammonium level ² ($\mu\text{mol/g}$) ³
Basal	48	0.48	8.36 (± 1.14) ⁴	48	0.53	7.76 (± 0.62) ⁴
1 mM Gln	48	0.51	7.65 (± 0.11)	48	0.53	7.38 (± 0.44)
10 mM Gln	48	0.50	8.31 (± 1.29)	48	0.54	6.66 (± 0.67)
Basal	72	0.51	8.58 (± 0.83)	24	0.50	9.28 (± 0.42)
1 mM Gln	72	0.50	7.51 (± 1.34)	24	0.53	9.08 (± 0.53)
10 mM Gln	72	0.51	12.81 (± 1.26)	24	0.53	7.55 (± 0.48)

¹ Mycelia weight

² Ammonium level of extracts

³ Mole of ammonium /cell weight

⁴ Standard deviation (SD)

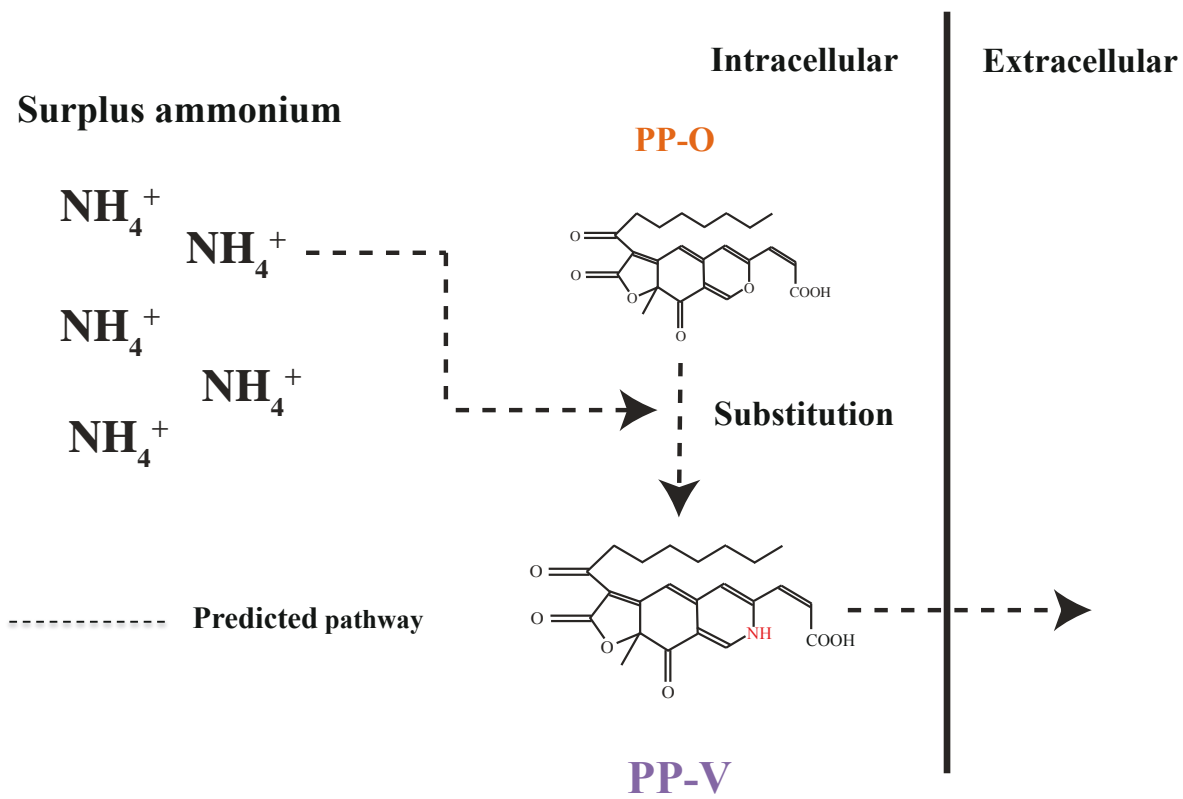


Fig. 7 The role of PP-V biosynthesis in *P. purpureogemum*

本 論

第 2 章

アンモニウムトランスポーター遺伝子の 同定と機能解析

第1節 諸言

本菌の生産色素である PP-V は PP-O の 7-O とアミノ基が置換されることで生合成されると考えられている。前章にて、*P. purpureogenum* は細胞内の余剰のアンモニウムの一部を PP-V として排出していると予測した。

本菌の通常の PP-V 生産培地には、硝酸アンモニウムが含まれている (35)。また、Glutaminase を阻害すると PP-V 生産性が低下する(新居 未発表)。これらのことから、本菌は、まず培地から細胞内に取込んだ無機窒素源を一度グルタミンまで変換し、それを別のアミノ酸合成などに利用しており、その過程で発生する細胞内のアンモニウムが PP-V 生合成に使われると予測された。また、取込まれたアンモニウム自身も PP-V 生合成のための細胞内アンモニウムの由来の一つと考えることができる。以上のことから、外来からのアンモニウムの取込み量も PP-V 生合成のためには重要であると思われる(Fig. 8)。

細胞内外のアンモニウムの輸送を仲介するのは、アンモニウムトランスポーターと呼ばれる膜タンパク質である。したがって、この遺伝子の発現レベルを調節することで細胞内のアンモニウムレベルが制御できれば、第 1 章で立てた考察がより確かになると考えた。よって、本章では細胞外からの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。

アンモニウムトランスポーターは Amt/Mep ファミリーに属し、原核および真核生物に広く保存されている。一般に、真菌は複数のアンモニウムトランスポーターを持っており、酵母においては *S. cerevisiae* から Mep1, Mep2, Mep3 (56,57)、*Shizosaccharomyces pombe* から Amt1, Amt2, Amt3 (58) が同定されている。また、糸状菌においては、*Fusarium fujikuroi* から AmtA, AmtB, AmtC (59)、*Aspergillus nidulans* から MeaA, MepA, MepB, MepC (60,61) が同定されている。しかしながら、*P. purpureogenum* からアンモニウムトランスポーターは同定されていない。そこでまず、本研究では *P. purpureogenum* のドラフ

トゲノムシーケンスから *amt* と推定される遺伝子(*amtA*、*amtB*、*amtC*、*amtD*)を4つ同定し、アミノ酸配列情報から特性を推定した。次に、アンモニウムの取込みに関して各 Amt の特性を調べた。ただし、*P. purpurogenum* の形質転換法が確立されていないため、本菌を使った機能解析は困難であったため、分裂酵母を宿主とした異種発現により機能解析を行った。

第2節 実験材料および実験方法

1 実験材料および試薬・機器

本研究において用いた菌株は、IAM Culture Collection に保存されている *P. purpurogenum* IAM15392 株である。PCR 反応及び 0.2 ml チューブのインキュベーションには T グラジエントサーモサイクラー (Biometra) もしくは T1 サーモサイクラー (Biometra) を用いた。1.5 ml チューブの遠心分離には卓上遠心機 Centrifuge 5424、ローター FA-45-24-11-Special (Eppendorf) および、Centrifuge 5415R、ローター F-45-24-11 (Eppendorf) を用いた。50 ml チューブ (CORNING®) の遠心分離には、冷却遠心機 RSL-05A、スイングローター 50 ml × 4 ユニット (佐久間製作所) を用いた。また特記しない限り、試薬は和光純薬工業の特級試薬を用いた。水は Milli-Q 超純水装置 (MILLIPORE) で得た超純水をオートクレーブ滅菌して用いた。また、培地、0.2 ml (WATSON) 及び 1.5 ml チューブ (Axygen, BIO-BIK) は ES-215 (株式会社・トミー精工) を、調製した試薬は ES-315 (株式会社・トミー精工) を用いてオートクレーブ滅菌した。三角フラスコは Drying Sterilizer SG810 (ヤマト科学株式会社) を用いて乾熱滅菌した。また、菌体の破碎に用いた乳鉢および乳棒は、操作に液体窒素を用いることから、損壊を避けるために予め -80 °C で冷却した。

2 *P. purpurogenum* ドラフトゲノムシーケンスからの *amt* の完全長 cDNA の取得

2-1 *P. purpurogenum* ドラフトゲノムシーケンスからの *amt* 相同遺伝子の探索

2-1-1 Local Blast による *amt* 相同配列の取得

amt 相同遺伝子は本研究室で既に保有している *P. purpurogenum* IAM15392 株 のゲノム配列から得られた。*P. purpurogenum* IAM15392 株のドラフトゲノムシーケンスは、北海道システム・サイエンス株式会社に委託し、Roche Genome Sequencer FLX を用いた解析により取得した。塩基配列情報の相同性検索には、NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を経由して BLAST 検索を行った。塩基配列のデータは、GENETYX-Mac NETWORK version 15.0.6 (GENETYX CORPORATION) により解析した。

NCBI.fasta のゲノムデータベースに対して、*Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Eupenicillium* など既知の糸状菌の属名を用いて、データベースの再構築を行った。このデータを用いて簡易的な *P. purpurogenum* IAM15392 株のドラフトゲノムシーケンスのアノテーションを行った。このデータをもとに既知の糸状菌由来 PKS 配列情報と相同性を持つ contig の検索を行った。得られた contig の ORF を GENETYX-Mac にて解析した。得られた ORF 配列情報を NCBI の BLASTX で検索し、タンパク質アミノ酸配列情報として *amt* の検索を行った。

2-2 *amt* 相同遺伝子の完全長 cDNA の取得

2-2-1 *P. purpurogenum* IAM15392 株からの RNA 抽出

基本培地(20 g Soluble starch, 2 g Bacto™ Yeast Extract / L 50 mM citric acid / Na₃-citrate buffer, pH 5.0)を 500 mL フラスコに 100 mL 調製し、クリーンベンチ内で *P.*

purpurogenum IAM15392 を 1 白金耳植菌し、30 °C 下 200 rpm で 72 時間培養した。濾紙 (Advantec、No. 2)、ブフナー漏斗及び吸引瓶により、培養液を吸引濾過した。菌体を 50 mM citric acid / Na₃-citrate buffer (pH 5.0)にて洗浄後、濾紙上に湿菌体を得た。菌体は液体窒素で凍結させ、-80 °C で保存した。

RNA 抽出には Plant Total RNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech)を用いた。-80 °C で冷凍保存した培養菌体 0.3 g を上皿天秤で秤取った。菌体を乳鉢に入れ、氷上で冷やしておいた乳鉢に液体窒素を加えながら、同じく氷上で冷やしておいた乳棒で粉砕した。破砕したサンプルを 2 つの 1.5 ml チューブ(BIO-BIK)に分け、β-メルカプトエタノールを含む FAPRB Buffer を 500 μl 加えた。ボルテックスミキサーによって混和した後、室温で 5 min 静置した。付属品の Collection Tube に Filter Column を取り付け、そこにサンプルを移した。14,000 rpm で 1 分間遠心した後、ろ液を新しい 1.5 ml チューブに移し、ろ液と等量の 70 %エタノールを加えた。ボルテックスによって混和した後、この溶液を Collection Tube に取り付けた FARB Mini Column に移し、14,000 rpm で 1 分間遠心した。ろ液を除去し、500 μl の Wash buffer1 を加え、14,000 rpm で 5 分間遠心した後、ろ液を除去した。100 %エタノールを含む Wash buffer2 を 750 μl 加え、14,000 rpm で 1 分間遠心し、ろ液を除去した後、この操作を再び行った。14,000 rpm で 3 分間遠心し、ろ液を除去した後、滅菌水を 30 μl 加えた。1 分間静置し、14,000 rpm で 2 分間遠心後、同じサンプルのろ液を 1 つのチューブにまとめ合計 60 μl とし、以降の操作に用いた。

2-2-2 DNase I によるゲノム除去と精製

本節 2-2-1 で得られた RNA 溶液に Recombinant DNase I (RNase-free) (Takara) 2 μl、10 × DNase I Buffer 10 μl (Takara)、RNase Inhibitor Recombinant type (TOYOBO) 0.5 μl、水 27.5 μl を加え、37 °C に設定したウォーターバスで 1 時間インキュベーションし、ゲノム DNA を分解した。反応終了後、100 μl の PCI (水飽和フェノール：クロロホルム：

イソアミルアルコール=25 : 24 : 1)を加え、ボルテックスで攪拌後、室温下 10,000 rpm で 15 分間遠心した。上清を新しい 1.5 ml チューブ (BIO-BIK) に回収し、それと等量のクロロホルムを加え、ボルテックスで攪拌後、室温下で 10,000 rpm で 15 分間遠心した。上清を回収し、新しい 1.5 ml チューブ (BIO-BIK) に移し、3 M 酢酸ナトリウムを 1/10 量と 100%エタノールを 3 倍量加え、-80 °C で 15 分間静置後、4 °C 下 13,200 rpm で 20 分間遠心し、上清を除去した。70%エタノールを 200 μ l 加え、4 °C 下 13,200 rpm で 10 分間遠心し、上清を捨て、風乾した。風乾後、ペレットを滅菌水 30 μ l で完全に溶解し、以降の操作に用いた。

2-2-3 cDNA 合成

Gene spec I (Naka Instruments)によって本節 2-2-2 で得られた RNA の濃度を測定した。マーカーとして λ DNA/*Hind* III を使用し、精製した RNA 溶液が 500 ng になるように 1% Agarose S (Takara) /1 \times TAE にアプライした。100 V で 30 分間電気泳動し、エチジウムブロマイド (EtBr 10 μ l/1 \times TAE 1 ml) で 20 分間染色した。染色したアガロースゲルをトランスイルミネーター—High Performance UV Transilluminator (フナコシ) の上に置き、紫外線照射 (302 nm) で 3.5 秒間、電気泳動ゲル撮影/解析システム Kodak Digital Science EDAS Version 3.6 (Kodak) により撮影した。RNA が分解されていないことを電気泳動によって確認した後、0.2 ml チューブに RNA が 2,000 ng になるように精製した RNA 溶液を加えた。そこに、dNTPs 2 μ l、oligo dT primer (50 pmo/ μ l) 2 μ l を加えた。さらに、各サンプルの反応溶液量が 10 μ l になるように滅菌水を加え、サーマルサイクラーを使って、60 °C で 5 分間インキュベーションした。サンプルを急冷し、PrimeScript™ Reverse Transcriptase (Takara) 1 μ l、RNase Inhibitor Recombinant type 0.5 μ l、5 \times PrimeScript Buffer 4 μ l、滅菌水 4.5 μ l を加え、サーマルサイクラー中で 42°C \cdot 1 hr、75 °C \cdot 15 min の条件で反応させた。反応終了後、サンプルを -80 °C で保存した。なお、1 つのサンプルにつき、PrimeScript™ Reverse Transcriptase を含む+と、それを含まない

-を調製した。

2-2-4 3'RACE 法による *amt* の 3'末端の取得

本節 2-1-1 で取得した塩基配列情報を基に、それぞれの完全長 cDNA を得るために 3'UTR と予測される領域にプライマーを設計し、PCR に用いた。また、付加配列特異的プライマーとして、GCA nest を用いた。KOD -Plus- Ver. 2 (TOYOBO) を用いた反応液 25 μ l (10 \times buffer for KOD-Plus- (TOYOBO) 2.5 μ l, 2mM dNTPs (TOYOBO) 2.5 μ l, 25 mM MgSO₄(TOYOBO) 1.5 μ l, 10 μ M プライマー 1.5 μ l, 10 μ M GCA nested 0.75 μ l, 10 倍希釈液 cDNA 溶液 1.0 μ l, KOD-Plus- (TOYOBO) 0.5 μ l、水 14.75 μ l) を加え、95 $^{\circ}$ C \cdot 2 min、95 $^{\circ}$ C \cdot 15 sec、50 $^{\circ}$ C \cdot 2 min を 1 サイクルとし、10 サイクル反応させた後、95 $^{\circ}$ C \cdot 15 sec、58 $^{\circ}$ C \cdot 30 sec、68 $^{\circ}$ C \cdot 2 min を 1 サイクルとし、30 サイクル反応させた。

amtA for-1 5'-ACGTTTCCTTCTTCAGCCAGA-3'

amtB for-1 5'- CAACACCAAACCTTGCCCTC-3'

amtC for-1 5'- AAACCCCAGCGAAATCATTG-3'

amtD for-1 5'- GCTTGGGTCATGGCTCT-3'

GCA nest 5'-GTCGAGCTCTACGTACAATT-3'

2-2-5 PCR 産物の精製

PCR 産物の精製には、Spin Column PCR Product Purification Kit (Bio Basic Inc.)を用いた。制限酵素消化した反応液に対して、液量の 3 倍の Binding Buffer I を加え、これを付属品の spin column に移し、2 分間室温でインキュベーションした。その後、5,000 rpm で 1 分間遠心分離した。濾液を捨て、カラムに Wash Solution 500 μ l を入れ、8,000 rpm で 1 分間遠心分離した。濾液を捨て、Wash Solution 500 μ l を入れ、8,000 rpm で 1 分間

遠心分離した。ろ液を捨て、10,000 rpm で1分間遠心分離してカラムを乾燥させた後、カラムを1.5 ml チューブにのせた。これに水 30 μ l を入れ、2分間室温でインキュベーションした後、10,000 rpm で1分間遠心分離した。

2-2-6 TA クローニング

本節 2-2-5 で得られた精製した PCR 断片を含む溶液 30 μ l に dNTPs 4 μ l、Go taq DNA polymerase 0.2 μ l、水 5.8 μ l を加え、72 $^{\circ}$ C に設定したサーモミキサーで 15 分間インキュベーションした。反応後、本節 2-2-5 と同様の方法で精製した。1.5 ml チューブに精製した DNA 溶液 3 μ l、pGEM-T easy vector (Promega) 1 μ l (10 ng / μ l)、T4 DNA Ligase 1 μ l、2 \times Ligation Buffer 5 μ l を加え、合計 10 μ l とした。これを 16 $^{\circ}$ C で 16 時間インキュベーションした。

2-1-7 大腸菌の形質転換

ライゲーション反応液に *E. coli* DH5 α コンピテントセル 200 μ l を加えた。その後、氷上で 30 分間インキュベーション後、42 $^{\circ}$ C で 60 秒インキュベーションし、再度氷上で 1 分間冷却した。SOC 培地 (2.0% w/v Bacto Tryptone、0.5 % w/v Bacto Yeast Extract、0.05 % w/v NaCl、0.001 N NaOH、10 mM MgCl₂、10 mM MgSO₄、20 mM Glucose) 800 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間振とう培養した。培養液を 1.5 ml チューブに移し、室温下で 10,000 rpm で 1 分間遠心した後、上清 900 μ l を除去した。ペレットを再懸濁し、クリーンベンチ内で 0.5 mM IPTG、20 μ g/ml X-gal を含む LB-アンピシリン固体培地 (1.0% w/v Bacto Trypton、0.5% w/v Bacto Yeast Extract、1.0 % w/v NaCl、50 μ g/ml アンピシリンナトリウム、1.5 % w/v INA- Agar) に、コンラージ棒を用いてプレーティングし、37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。

2-2-8 コロニーダイレクト PCR によるクローンの選別

反応液 20 μ l (5 \times Go Taq Reaction Buffer 4 μ l、10 mM dNTPs 0.4 μ l、10 μ M プライマー-for 1 μ l、10 μ M プライマー-rev 1 μ l、5 unit/ μ l Go Taq DNA Polymerase 0.1 μ l、水 12.5 μ l) を調製した。本節 2-2-7 で培養したコロニーのうち、白色のコロニーを無菌的な爪楊枝を用いてピックアップしたものをテンプレートとし、各 *amt* の ORF と予測される領域内に設計したプライマーを用いて、PCR を行った。

PCR 産物を、DNA マーカーとして 100 bp DNA ladder を用いて 2 %アガロースゲル電気泳動し、目的の増幅断片が確認されたクローンを選別し、そのプラスミドを保有する大腸菌を LB - アンピシリン液体培地 3 ml に無菌的に爪楊枝を用いて植菌し、16 時間培養した。

プラスミド回収には EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps Kit (Bio Basic Inc.) を用いた。培養液を 1 ml ずつ 1.5 ml チューブ (BIO-BIK) に入れ室温にて 10,000 rpm で 1 分間遠心分離後、デカンテーションにより上清を除去した。同操作を 3 回繰り返し、培養液中の菌体を回収した。Solution I を 100 μ l 加え、マイクロピペットで攪拌し完全に混合した。Solution II を 200 μ l 加え転倒混和した後、室温で 1 分間インキュベーションした。次に Solution III を 350 μ l 加え転倒混和した後、室温で 1 分間インキュベーションした。これにクロロホルムを 100 μ l 加え転倒混和した後、室温にて 12,000 rpm で 5 分間遠心分離した。得られた上清を付属のカラムに入れ室温で 2 min 放置後、室温にて 5,000 rpm で 1 分間遠心分離した。カラムに Wash Buffer 500 μ l を加え、室温で 8,000 rpm で 1 分間遠心分離した。この操作を再度繰り返し、濾液を捨て室温にて 10,000 rpm で 1 分間遠心分離を行いカラムにプラスミドを吸着させた。カラムを 1.5 ml チューブに移し水を 30 μ l 入れ 37 $^{\circ}$ C で 2 分間インキュベーション後、室温にて 10,000 rpm で 1 分間遠心分離を行い溶出し、Gene Spec I (Naka Instruments) で濃度測定を行った。

2-2-9 塩基配列の解析

0.2 ml チューブに、BigDye® Terminator v3.1 /1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) を用いた PCR 反応液 (Ready Reaction Premix 2 μ l、Sequencing Buffer 3 μ l、1 μ M primer 3.2 μ l) を調製し、テンプレート 200 ng 相当を加え、さらに水を加え計 20 μ l になるように調製した。PCR 条件は、最初の熱変性を 95 °C で 2 分間行い、95 °C \cdot 10 sec、50 °C \cdot 5 sec、60 °C \cdot 4 min を 1 サイクルとして 25 サイクル行い、4 °C で反応を止めた。

1.5 ml チューブに PCR 産物を移し、125 mM EDTA (pH 8.0) 2 μ l、3 M 酢酸ナトリウム 2 μ l、100%エタノール 50 μ l を加え、-80 °C で 15 分間インキュベーションした。4 °C 下 15,000 rpm で 30 分間遠心分離後、上清を除去した。これに 70%エタノール 100 μ l を加え、4 °C 下 13,200 rpm で 10 分間遠心分離後、上清を除去し、室温下で 10 分間風乾した。この PCR 産物の DNA 塩基配列は、ABI automatic Sequencer (Perkin Elmer Japan, Tokyo) を用いて解析した。塩基配列のデータは、GENETYX-Mac NETWORK version 15.0.6 (GENETYX CORPORATION) により解析した。

3 バイオインフォマティクスによるトポロジー解析

TMHMM によるトポロジー解析

本節 2-2-9 で得られた *P. purppurogenum* の *amt* の塩基配列を GENETYX-Mac NETWORK version 15.0.6 (GENETYX CORPORATION) を用いてアミノ酸配列に変換した。それを膜貫通領域予測ツールである TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)で解析した。

4 分裂酵母を使ったアンモニウムトランスポーターの機能解析

4-1 *P. purppurogenum* の *amt* 発現ベクターおよび *Shizaccharomyces pombe* の *amt* 発現ベクターの構築

4-1-1 PCR による *P. purppurogenum* の *amt* の増幅

本節 2-2-1、本節 2-2-2 と同様の方法で *P. purppurogenum* IAM15392 の RNA 抽出、精製し、本節 2-2-3 と同様の方法を用いて cDNA を合成した。この cDNA をテンプレートにし、PCR を行った。反応液 (50 μ M primer 1 μ l, 10 \times PfuUltra II Rxn Buffer 10 μ l, 5 U PfuUltra II Fusion HS DNA polymerase (Agilent) 2 μ l, 2 mM dNTPs (TOYOBO) 12.5 μ l, *P. purppurogenum* 由来 cDNA 2 μ l) を 100 μ l 調製し、初期変性 95 $^{\circ}$ C \cdot 2 分間の後、95 $^{\circ}$ C \cdot 30 sec、55 $^{\circ}$ C \cdot 30 sec、72 $^{\circ}$ C \cdot 2 min を 1 サイクルとし、30 サイクルの条件で PCR を行った。なお、使用したプライマーは本節 2-1 で取得した完全長 cDNA を基に、開始メチオニンの前に制限酵素サイトを付加したもの(それぞれ 1 のプライマー)と、終止コドンの後に制限酵素サイトを付加したもの(それぞれ 2 のプライマー)を設計した。これを本節 2-2-5 と同様の方法で精製した。使用したプライマーは以下に示す。

PpamtA-1 5'-CATATAAGCCCATATGTCGGACTCGGGAG-3'

PpamtA-2 5'-GTTTGGATCCTTACACCTTGGACTCTTC-3'

PpamtB-1 5'-TTGACAGCCCCATATGTCGTCTGCCGATAC-3'

PpamtB-2 5'-AAGCGGATCCCTATGCAATTTTTTCTTCTTCAATC-3'

PpamtC-1 5'-AAATCATTCCGTCGACATGGACTCGGTTCTGGAAG-3'

PpamtC-2 5'-TCTACCAGCCCGGGCTATTCCAGTCTCAC-3'

PpamtD-1 5'-AGCTATATGACATATGGCCGACGCACCTCAGTACA-3'

PpamtD-2 5'-ATACCCCGGGTCACGCTGTCTTCGACTCG-3'

4-1-2 PCR 産物の制限酵素消化

本節 4-1-1 で取得した DNA の増幅断片を制限酵素消化した。*amtA* と *amtB* に関しては、*NdeI* と *BamHI* を用いた。まず、反応液(*amtA* もしくは *amtB* PCR 産物 20 μ l、10 \times buffer 10 μ l、*NdeI* 3 μ l、*BamHI* 3 μ l、水 64 μ l)を 100 μ l 調製し、37 $^{\circ}$ C、3 時間インキュベーションした。反応後、70 $^{\circ}$ C に設定したサーモミキサーで 15 時間インキュベーションした。そこに、10 μ l の 3 M 酢酸ナトリウムと 220 μ l の 100%エタノールを加え、-20 $^{\circ}$ C で 16 時間インキュベーションした。

amtC の制限酵素消化には *SaII* と *SmaI*、*amtD* の制限酵素消化には *NdeI* と *SmaI* を用いた。反応液(*amtC* の PCR 産物 20 μ l、10 \times buffer 10 μ l、*SaII* 3 μ l、水 64 μ l)と反応液(*amtD* の PCR 産物 20 μ l、10 \times buffer 10 μ l、*NdeI* 3 μ l、水 64 μ l)を 100 μ l 調製し、37 $^{\circ}$ C、3 時間インキュベーションした。本節 2-2-5 と同様の方法で精製し、反応液(*amtC* もしくは *amtD* 精製物 50 μ l、10 \times buffer 10 μ l、*SmaI* 3 μ l、水 37 μ l)を 100 μ l 調製した。これを、30 $^{\circ}$ C、3 時間インキュベーションした。反応終了後、*amtA*、*amtB* 同様に 70 $^{\circ}$ C に設定したサーモミキサーで 15 時間インキュベーションし、そこに、10 μ l の 3 M 酢酸ナトリウムと 220 μ l の 100%エタノールを加え、-20 $^{\circ}$ C で 16 時間インキュベーションした。

4-1-3 ベクターの制限酵素消化

分裂酵母用発現ベクターである pREP2 と pREP42 62) (Fig. 9)を制限酵素消化した。*amtA* と *amtB* を挿入するためのベクターに関しては、*NdeI* と *BamHI* を用いた。pREP2 もしくは pREP42 1,000 ng、10 \times buffer 10 μ l、*NdeI* 3 μ l に total 100 μ l となるように水を加えた。37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベーションし、そこに *BamHI* 3 μ l を加え、さらに 2 時間インキュベーションした。70 $^{\circ}$ C に設定したサーモミキサーで 15 時間インキュベーションし、反応終了後、10 μ l の 3 M 酢酸ナトリウムと 220 μ l の 100%エタノールを

加え、-20 °Cで16時間インキュベーションした。

amtC を挿入するためのベクターに関しては *SaI* と *SmaI*、*amtD* を挿入するためのベクターに関しては *NdeI* と *SmaI* を用いた。反応液(pREP2 もしくは pREP42 1000 ng、10×buffer 10 µl、*SaI* 3 µl、水 64 µl)と反応液(pREP2 もしくは pREP42 1,000 ng、10×buffer 10 µl、*NdeI* 3 µl、水 64 µl)を 100 µl 調製し、37 °C で3時間インキュベーションした。本節 2-2-5 と同様の方法で精製し、反応液(*amtC* もしくは *amtD* 精製物 50 µl、10×buffer 10 µl、*SmaI* 3 µl、水 37 µl)を 100 µl 調製した。これを、30 °C、3時間インキュベーションした。反応終了後、*amtA*、*amtB* 同様に 70 °C に設定したサーモミキサーで15分間インキュベーションし、そこに、10 µl の3 M 酢酸ナトリウムと 220 µl の100%エタノールを加え、-20 °Cで16時間インキュベーションした。

4-1-4 エタノール沈殿

本節 4-1-2、4-1-3 で-20 °C でインキュベーションした制限酵素消化済み PCR 増幅断片とベクターをそれぞれ 4 °C下 13,200 rpm で20分間遠心した。上清を除去し、70% エタノールを 200 µl 加えて 4 °C下 13,200 rpm で10分間遠心し、上清を除去し、ペレットが透明になるまで風乾した。TE 20 µl に溶解した。

4-1-5 *amtA*, *amtB*, *amtC*, *amtD* のベクターへの挿入

1.5 ml チューブに、本節 4-1-4 でエタノール沈殿した *amt* を 8.0 µl、同じく本節 4-1-4 でエタノール沈殿した pREP2 もしくは pREP42 2.0 µl、DNA Ligation Kit Ver.2.1 に付属している Solution I (Takara) 10 µl、を加え、計 20 µl とした。これを 16 °C で2時間インキュベーションした。

4-1-6 大腸菌の形質転換

本節 4-1-5 の反応液 10 µl を別のチューブに分取し、-20 °C で保存した。残りの 10 µl

に *E. coli* DH5 α コンピテントセル 100 μ l を加え、その後、氷上で 30 分間インキュベーション後、42 $^{\circ}$ C で 60 秒間インキュベーションし、再度氷上で 1 分間冷却した。SOC 培地 (2.0% w/v Bacto Tryptone、0.5 % w/v Bacto Yeast Extract、0.05 % w/v NaCl、0.001 N NaOH、10 mM MgCl₂、10 mM MgSO₄、20 mM Glucose) 800 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間振とう培養した。培養液を 1.5 ml チューブに移し、室温下で 10,000 rpm で 1 分間遠心した後、上清 900 μ l を除去した。ペレットを再懸濁し、クリーンベンチ内で LB-アンピシリン固体培地 (1.0% w/v Bacto Trypton、0.5% w/v Bacto Yeast Extract、1.0 % w/v NaCl、50 μ g/ml アンピシリンナトリウム、1.5 % w/v INA- Agar) に、コンラージ棒を用いてプレーティングし、37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。

4-1-7 制限酵素によるプラスミドの選別および塩基配列の解析

本節 4-1-6 でプレーティングした中からランダムに数個のコロニーを選択し、爪楊枝を用いて、LB-アンピシリン液体培地 3 ml に爪楊枝を用いて無菌的に植菌し、37 $^{\circ}$ C で 16 時間培養した。EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps Kit(Bio Basic Inc.)を用いて、本節 2-2-8 と同様の方法でプラスミドを回収し、Gene Spec I (Naka Instruments) で濃度測定を行った。

1,000 ng のプラスミドをそれぞれ本節 4-1-3 と同様の方法で制限酵素消化した。2 % ゲルを作製し、100 V で 30 分間電気泳動し、それぞれ *amtA*、*amtB*、*amtC*、*amtD* と同じ大きさの断片が確認できたプラスミドをシーケンス解析に用いた。

4-1-8 PCR による *Shizosaccharomyces pombe* の *amt* の増幅

テンプレートには、*Shizosaccharomyces pombe* FY7507 株のゲノム DNA (光澤 未発表) を用いた。反応液 (FY7406 ゲノム DNA 2 μ l、50 μ M primer 1 μ l、10 \times PfuUltra II Rxn Buffer 10 μ l、5 U PfuUltra II Fusion HS DNA polymerase (Agilent)、2.5 mM dNTPs (Takara) 10 μ l) を 100 μ l 調製し、PCR(95 $^{\circ}$ C \cdot 2 min で変性し、その後、95 $^{\circ}$ C \cdot

30 sec, 55 °C · 30 sec, 72 °C · 2 min を 30 cycles, 72 °C · 3 min)を行った。サンプル 10 µl に 2 µl の 10 × Loading buffer を加えた。1% SeaKem GTG Agarose/1×TAE を用いて 12 µl のサンプルと 10 µl のマーカーをそれぞれウェルにアプライし、100 V で 30 分間電気泳動した。泳動後、10 µl のエチジウムブロマイドで 15 分間染色し、写真撮影した。なお、使用したプライマーは以下に示す。

Spamt1R1 5'-GACTTCTTGTCATATGTCTTCCTCTACCG-3'

Spamt1R2 5'-AACACCCGGGCTAAATAGCTGGAGCTTGAG-3'

Spamt2R1 5'-TAAAAAATTAGTCGACATGTCTTCAGTGAATT-3'

Spamt2R2 5'-GCAGGGATCCTTAGATCGTAAGTCCAAG-3'

4-1-9 DNA の精製

DNA の精製には QIAquick PCR Purification kit(QIAGEN)を用いた。本節 4-1-8 の増幅断片を 1.5 ml チューブに移し、5 倍量の Buffer PB を加え、混合した。2 ml コレクションチューブに QIAquick カラムをセットし、その上から 540 µl のサンプルを入れ、遠心 (14,000 rpm, 1 分, 25 °C)し、ろ液を除去した。カラムをチューブにセットし、その上から 750 µl の Buffer PE を入れ、常温下 14,000 rpm で 1 分間遠心し、ろ液を除去した。同様の条件で再び遠心した後、カラムを新たな 1.5 ml チューブにセットし、50 µl の Buffer EB を入れて 1 分間放置した。放置後、常温下 14,000 rpm, 1 分間遠心し、-20 °C で保存した。

4-1-10 PCR 産物の制限酵素消化

本節 4-1-9 で精製した 20 µl の *Shizosaccharomyces pombe* の *amt1* に、54 µl の滅菌水, 10 µl の 10 × T, 10 µl の 0.1% BSA, 3 µl の *NdeI*, 3 µl の *SmaI* を加えた。また、同じく本節 4-1-9 で精製した 20 µl の *Shizosaccharomyces pombe* の *amt2* に、64 µl の滅菌水, 10 µl

の 10×H, 3 µl の *SalI*, 3 µl の *BamHI* を加えた。これらを 37 °C で 3 時間インキュベーションした。反応終了後、70 °C に設定したサーモミキサーで 15 分間インキュベーションし、そこに、10 µl の 3 M 酢酸ナトリウムと 220 µl の 100%エタノールを加え、-20 °C で 16 時間インキュベーションした。

4-1-11 ベクターの制限酵素消化

pREP2 と pREP42 の制限酵素消化を行った。2 µl の各ベクターにそれぞれ 75 µl の滅菌水, 10 µl の 10 × buffer, 10 µl の 0.1% BSA, 3 µl の *NdeI* を加え、37 °C で 1 時間インキュベーションした。そこに 3 µl の *SmaI* を混和し、37 °C で 2 時間インキュベーションした。また、一方で 2 µl の各ベクターに 85 µl の滅菌水, 10 µl の 10 × buffer, 3 µl の *SalI* を加え、37 °C で 1 時間インキュベーションした。そこに 3 µl の *BamHI* を混和し、37 °C で 2 hr インキュベーションした。反応終了後、70 °C に設定したサーモミキサーで 15 分間インキュベーションし、そこに、10 µl の 3 M 酢酸ナトリウムと 220 µl の 100%エタノールを加え、-20 °C で 16 時間インキュベーションした。

4-1-12 エタノール沈殿

本節 4-1-10、4-1-11 で-20 °C でインキュベーションした制限酵素消化済み PCR 増幅断片とベクターをそれぞれ 4 °C 下 13,200 rpm で 20 分間遠心した。上清を除去し、70% エタノールを 200 µl 加えて 4 °C 下 13,200 rpm で 10 分間遠心し、上清を除去し、ペレットが透明になるまで風乾した。その後、TE 20 µl に溶解した。

4-1-13 ベクターへの *amt1*, *amt2* の挿入

1.5 ml チューブに、本節 4-1-12 でエタノール沈殿した *amt* を 8.0 µl、本節 4-1-11 でエタノール沈殿した pREP2 もしくは pREP42 2.0 µl、DNA Ligation Kit Ver.2.1 に付属している Solution I (Takara) 10 µl を加え、計 20 µl とした。これを 16 °C で 2 時間インキュ

ベーションした。

反応液 10 μ l を別のチューブに分取し、 -20°C で保存した。残りの 10 μ l に *E. coli* DH5 α コンピテントセル 100 μ l を加え、その後、氷上で 30 分間インキュベーション後、 42°C で 60 秒間インキュベーションし、再度氷上で 1 分間冷却した。SOC 培地 (2.0% w/v Bacto Tryptone、0.5 % w/v Bacto Yeast Extract、0.05 % w/v NaCl、0.001 N NaOH、10 mM MgCl_2 、10 mM MgSO_4 、20 mM Glucose) 800 μ l を加え、 37°C で 1 時間振とう培養した。培養液を 1.5 ml チューブに移し、室温下で 10,000 rpm で 1 分間遠心した後、上清 900 μ l を除去した。ペレットを再懸濁し、クリーンベンチ内で 0.5 mM IPTG、20 $\mu\text{g/ml}$ X-gal を含む LB-アンピシリン固体培地 (1.0% w/v Bacto Trypton、0.5% w/v Bacto Yeast Extract、1.0 % w/v NaCl、50 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリンナトリウム、1.5 % w/v INA- Agar) に、コンラージ棒を用いてプレーティングし、 37°C で一晩培養した。

4-1-14 制限酵素によるプラスミドの選別および塩基配列の解析

本節 4-1-13 でプレーティングした中からランダムに数個のコロニーを選択し、爪楊枝を用いて、LB-アンピシリン液体培地 3 ml に爪楊枝を用いて無菌的に植菌し、 37°C で 16 時間培養した。培養した大腸菌を氷冷し、室温下 3,000 rpm で 5 分間遠心し、デカンテーションで上清を除去した。残った上清とペレットを懸濁し、1.5 ml チューブに移した。これを 4°C 下 10,000 rpm で 1 分間遠心し、上清を除去した。ペレットに 250 μ l の Buffer P1 を加え、ボルテックスで攪拌し、完全に懸濁させた。懸濁液に 250 μ l の Buffer P2 を加え、液が透明になるまで反転混和した後、350 μ l の Buffer N3 を加え、白濁するまで反転混和した。常温下 14,000 rpm で 10 分間遠心し、2 ml コレクションチューブに QIAprep スピncラムをセットし、上清をカラムに入れ、常温下 14,000 rpm で 1 分間遠心し、ろ液を除去した。カラムをチューブにセットし、750 μ l の Buffer PE を加え、常温下 14,000 rpm で 1 分間遠心した後、ろ液を除去した。同様の条件で再び

遠心し、カラムを新たな 1.5 ml チューブにセットし、100 μ l の Buffer EB を加え、1 分間静置してから常温下 14,000 rpm で 1 分間遠心した後、-20 $^{\circ}$ C で保存した。

1.5 ml チューブに、1 μ l のミニプレップ DNA に対し、*amt1* 用には 6 μ l の滅菌水、1 μ l の 10 \times buffer、1 μ l の 0.1% BSA、0.5 μ l の *Nde*I、0.5 μ l の *Sma*I を、*amt2* 用には 7 μ l の滅菌水、1 μ l の 10 \times buffer、0.5 μ l の *Sal*I、0.5 μ l の *Bam*HI の組成となるように混合した master mix を調製した。新たな 1.5 ml チューブに、9 μ l の master mix、1 μ l のミニプレップ DNA を加えて 37 $^{\circ}$ C、1 hr インキュベーションした。インキュベーションしたサンプルの全量に、2 μ l の 10 \times Loading Buffer を加え、1% SeaKem GTG Agarose/1 \times TAE で、電気泳動を行った。*amt1*、*amt2* と同じ大きさの断片が確認できたプラスミドをシーケンス解析に用いた。

4-2 *amtA*, *amtB*, *amtC*, *amtD* 発現 *S. pombe* の作出

4-2-1 *S. pombe* の形質転換

YE + Uracil プレート(50 mg Uracil、30 g Glucose、5 g BactoTM Yeast Extract、20 g INA-Agar / L)を調製し、*S. pombe* の野生株である FY7406 株および日本大学生物資源科学部くらしの生物学科、光澤浩教授作製の HMP103(*amt1,2,3* Δ) 58)をそれぞれ 10 μ l スポットし、プレートを傾けて菌液を延ばし、30 $^{\circ}$ C で 3 日間培養した。INA-Agar を含まない YE + Uracil 液体培地を調製し、50 ml チューブに 5 ml ずつ分取した。無菌的に爪楊枝を用いて、培地が濁るくらいの量の菌体を植菌し、30 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。

翌日、形質転換前に前準備として、本節 4-1 で構築した *P. purourogenum* の *amt* 発現ベクターと *S. pombe* の *amt* 発現ベクターが 1 ng になるように 1.5 ml チューブ (BIO-BIK)に分取した。95 $^{\circ}$ C に設定したサーモミキサーを使って、10 mg / ml carrier DNA (1 % (w/v) Deoxyribonucleic acid sodium salt from salmon testes(Sigma-Aldrich) /10 mM TE)をインキュベーションした後、ベクターを分取した 1.5 ml チューブに 5 μ l 分

取した。

前準備終了後、300 ml フラスコに YE+Uracil 液体培地 50 ml 調製し、前日 50 ml チューブで培養した菌体を 2 ml 植菌した。3~4 時間培養後、それぞれの培養液全量を 50 ml チューブに移し、室温下 3,000 rpm で 5 min 遠心した。上清を除去し、5 ml の 0.1 M LiAc (pH5.0)を加え、菌体を懸濁後に室温下 3,000 rpm で 5 分間遠心した。上清を除去し、1.0 mL の 0.1 M LiAc を加えて懸濁した。この懸濁液を、前段落でベクターと carrier DNA を分取したチューブに 100 μ l ずつ分取し、3 回ピペティングをした。290 μ l の 50 % polyethyleneglycol / 0.1 M LiAc , pH5.0 を加え、10 回ピペティングをした。この溶液を 30 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベーションしたあと、43 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベーションした。常温下 5,000 rpm で 5 秒間遠心し、ペレットを崩すように 500 μ l の水を強めに加えた。5~10 分間静置後、ボルテックスを使って、ペレットを懸濁し、Edinburgh Minimal Medium (EMM)+Thiamine プレート (27.4 g EMM broth without nitrogen (FORMEDIUM)、5.0 g NH₄Cl、20 g INA-Agar /L)にプレーティングした。

形質転換体が生育してから 4 日目に、平均的な大きさのコロニーを選択し、ディスポールプを使って新しい EMM+Thiamine プレートに移した。その後、30 $^{\circ}$ C で 2-3 日間培養し、20%グリセロールストックを作製した。

4-3 低アンモニウム条件下での相補試験

本節 4-2-1 で作製したグリセロールストック(pREP2 で *P. purourogenum* の *amt* もしくは *S. pombe* の *amt* を発現させたもの)を水中溶解した。10 μ l を EMM+Thiamine プレートにスポットしてから、プレートを傾けて菌液を延ばし、30 $^{\circ}$ C で 3 日間培養した。菌体が生育していることを確認し、500 μ l の滅菌水を分取した 1.5 ml チューブに菌体を移した。このとき、ディスポールプを使って、菌体を部分的に移した。菌体を懸濁し、20 μ l を新しい 1.5 ml チューブに分取した。ここに、950 μ l の滅菌水を加え、カバーガラスを乗せた血球計算版 (Erma) の隙間に液を 5 μ l 注入し、透過型ノルマルスキ

一微分干渉装置のついた倒立型顕微鏡 IMT2-NIC (Olympus) を用いて細胞数を測定した。残りの液は、DU-730 (ベックマン・コールター)による吸光度(吸収波長 600 nm)測定に用いた。

測定した細胞数と吸光度をもとに、各株に関する原液中の細胞数を求めた。細胞数が 1.0×10^7 cell/ml になるように希釈し、そのうち 5 μ l を、Thiamine を含まない EMM プレート、EMM+Thiamine プレート、0.5 mM NH_4 プレート(27.4 g EMM broth without nitrogen (FORMEDIUM), 26 mg NH_4Cl , 20 g INA-Agar /L)と Thiamine を加えた 0.5 mM NH_4 +Thiamine プレートにスポットした。全ての菌株のスポット終了後、培地に菌液が浸透するまで放置した。それぞれのプレートにスポットした菌体を 30 °C で 2 日間培養した。

4-4 Ammonium removal assay

培地中のアンモニウム濃度の測定は、既に表示されている方法を用いた (56)。本節 4-2-1 で作製したグリセロールストック(pREP42 で *P. purourogenum* の *amt* もしくは *S. pombe* の *amt* を発現させたもの)を氷中溶解した。10 μ l を EMM+Thiamine プレートにスポットしてから、プレートを傾けて菌液を延ばし、30 °C で 3 日間培養した。50 mL チューブに 10 ml の最小プロリン培地(27.4 g EMM Broth without Nitrogen (FORMEDIUM), 1.0 g proline/L pH5.9)を分取し、爪楊枝を使って生育した菌体を移した。30 °C で 24 hr 培養し、DU-730 (ベックマン・コールター)により吸光度(吸収波長 600 nm)を測定した。吸光度が 2.0 になるよう、新しい 50 ml チューブに培養液と最小プロリン培地を加え、30 °C で 90 分間培養した。培養後、ここに 100 mM NH_4Cl を 100 μ l 加えた。転倒混和後、反応 0 時間として 300 μ l を Ultra free[®]-MC-Centrifugal Filter Devices (Merck Millipore)に分取した。4 °C 下 1,000 rpm で 1 分間遠心し、菌体を取り除かれた培地を 4°C で保存した。培養は 2 時間まで行い、培地の回収は 30 分間ごとに行った。

培地中のアンモニウムの測定は、F-キット アンモニア(Roche)を用いた。回収した培

地(0、30、60、90、120分)100 µl をφ10×90 試験管に分取した。そこに、付属品である NADH / TEA バッファー、pH8.0 2-オキシグルタル酸溶液(調製法はキットの説明書に準ずる)1,000 µl、水 1900 µl を加え、転倒混和した。25 °C に設定したウォーターバスで5分間インキュベーションした。新しいφ10×90 試験管に溶液を 1,500 µl 分取し、DU-730 (ベックマン・コールター)を使って反応前の吸光度(吸収波長 340 nm)を測定した。これを A₁ とする。付属品である GIDH を 10 µl 加え、25 °C に設定したウォーターバスで 20 分間インキュベーションした。先ほどと同様の機器を用いて、反応後の吸光度 (吸収波長 340 nm) を測定した。これを A₂ とする。培地中のアンモニウム濃度は、A₂- A₁ から得られた値を使用し、キットの説明書に準じて算出された。

4-5 メチルアンモニウムの感受試験

本節 4-2-1 で作製したグリセロールストック(pREP42 で *P. purourogenum* の *amt* もしくは *S. pombe* の *amt* を発現させたもの)を氷中溶解した。10 µl を EMM+Thiamine プレートにスポットしてから、プレートを傾けて菌液を延ばし、30 °C で3日間培養した。菌体が生育していることを確認し、500 µl の滅菌水を分取した 1.5 ml チューブに菌体を移した。このとき、ディスポールプを使って、菌体を部分的に移した。菌体を懸濁し、20 µl を新しい 1.5 ml チューブに分取した。ここに、950 µl の滅菌水を加え、カバーガラスを乗せた血球計算版 (Erma) の隙間に液を 5 µl 注入し、透過型ノルマルスキー微分干渉装置のついた倒立型顕微鏡 IMT2-NIC (Olympus) を用いて細胞数を測定した。残りの液は、DU-730 (ベックマン・コールター)による吸光度(吸収波長 600 nm)測定に用いた。

測定した細胞数と吸光度をもとに、各株に関する原液中の細胞数を求めた。細胞数が 1.0×10^7 cell/ml になるように希釈し、そのうち 5 µl を、2.0 % INA-Agar を含む最小プロリン培地 100 mM メチルアンモニウム培地(27.4 g EMM Broth without Nitrogen (FORMEDIUM)、1.0 g proline、6.75 g Metylammonium /L pH5.9)にスポットした。全ての

菌株のスポット終了後、培地に菌液が浸透するまで放置した。それぞれのプレートにスポットした菌体を 30 °C で 4 日間培養した。

5 半定量的 RT-PCR による発現解析

基本培地を 500 mL フラスコに 100 ml 調製し、オートクレーブ滅菌した。YMA 培地より、乾熱滅菌したエーゼを用いて菌糸及び、分生子を 1 白金耳とり、調製済みの培地にそれぞれ植菌した。この操作は、クリーンベンチ内で行った。植菌された培地は振とう培養機 (タカギ冷機株式会社)を用いて 30°C 下 200 rpm で 48 時間、好氣的に培養した。クリーンベンチ内で、濾紙 (No. 2)、ブフナーロート及び吸引瓶を用いて培養上清を吸引濾過した。菌体を 50 mM クエン酸 buffer (pH 5.0) を用いて洗浄後、濾紙上に湿菌体を得た。この菌体を Basal-N 培地(20 g Soluble starch, 2 g Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids and ammonium Sulfate / 50 mM citric acid / Na₃-citrate buffer , pH 5.0 L)、Basal-N 培地に 1 mM NH₄Cl を含む 1 mM NH₄ 培地、Basal-N 培地に 100 mM NH₄Cl を含む 100 mM NH₄ 培地に移し、振とう培養機で 30 °C 下 200 rpm で 2 時間培養した。先ほど同様に、培養上清を吸引濾過し、50 mM クエン酸 buffer (pH 5.0) を用いて洗浄後、濾紙上に湿菌体を得た。得られた菌体を液体窒素で凍結させ、-80 °C で保存した。

本節 2-2-1 と同様の方法で RNA を抽出し、本節 2-2-2 と同様の方法で精製した。本節 2-2-3 と同様の方法で 1,000 ng の cDNA を合成した。合成した cDNA をテンプレートに半定量的 RT-PCR を行った。PCR 反応は、95 °C で 5 分間熱変性を行った後、95 °C・30 sec で熱変性、57 °C・30 sec アニーリング、72 °C・40 sec 伸長反応の条件で行った。反応終了後、2% アガロースゲルにより電気泳動した。また、半定量的 RT-PCR で用いたプライマーは以下に示す。

amtA-RT-for 5'-AAATCAGCCCTCCTCCCTCAT-3'
amtA-RT-rev 5'-CAGAGCGACACTAGAAAGGGG-3'
amtB-RT-for 5'-ATTTGATCAACATCACGCCA-3'
amtB-RT-rev 5'-GGGGGCAATGATATCCTCTT-3'
amtC-RT-for 5'-GGTGTGGTCAGAAAATGGCT-3'
amtC-RT-rev 5'-AGCCATCACGCTCTTGAAGT-3'
amtD-RT-for 5'-CGACGACGGAATGGAAGTAT-3'
amtD-RT-for 5'-CAATCCAATCAACTCGGCTT-3'

第3節 実験結果

1 *P. purpurogenum* における *amt*

P. purpurogenum IAM 15392 株のドラフトゲノムシーケンスからアンモニウムトランスポーターをコードする遺伝子を検索したところ、本系状菌においては、*amt* と推定される遺伝子が4つ(*amtA*, *amtB*, *amtC*, *amtD*)染色体上に存在することがわかった(Table3)。それぞれの完全長 cDNA を取得し、アミノ酸配列情報を解析したところ(Fig. 10)、AmtA と AmtB は46%、AmtA と AmtC は32%、AmtA と AmtD は45%、AmtB と AmtC は25%、AmtB と AmtD は37%、AmtC と *amtD* は29%の相同性を示した(Fig. 11A)。また、アンモニウムの取込みに関する特性を決定するアミノ酸残基は、AmtA、AmtC、AmtD は His、AmtB は Glu であることが分かった(Fig. 11B)。

TMHMM によるトポロジー解析を行ったところ、AmtA、AmtB、AmtD は11回、AmtC は9回膜貫通ドメインを有していた(Fig. 12)。

2 *P. purpurogenum* のもつ *amt* の機能解析

2-1 低アンモニウム条件下における分裂酵母の生育相補とアンモニウムの取込み活性

0.5 mM アンモニウム培地で *P. purpurogenum* の Amt が *amt*Δ 株の生育欠損を相補するかどうか調べた(Fig. 13)。これは、3 つの *amt* 全てが欠損した分裂酵母 *amt*Δ 株は低アンモニウム条件下で生育できないため 58)、低アンモニウム条件下において本菌の *amt* が *amt*Δ 株の生育欠損を相補できれば、Amt としての機能をもつと考えることができるからである。pREP2 を用いて *P. purpurogenum* のもつ 4 つの *amt* を分裂酵母 *amt*Δ で発現させたところ、分裂酵母の生育欠損を相補していたのは AmtA と AmtB で、AmtC と AmtD は相補しなかった。また、チアミンを含まない EMM 培地で形質転換体の生育は全て阻害され、その中でも *amtB* を発現させた株は最も生育が阻害された。対して、チアミンを含む EMM 培地では全ての株の生育欠損は阻害されなかった。

実際にこれら Amt のアンモニウム取込み能を測定した(Fig. 14)。アイソトープを使って直接的にアンモニウムトランスポーターのアンモニウム取込み能を調べる場合もあるが 59-61)、本研究では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。その結果、先の実験で生育欠損を相補していた AmtA と AmtB にはアンモニウムの取込みが見られた。このとき、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。しかし、AmtC と AmtD にアンモニウムの取込みは認められなかった。

2-2 メチルアンモニウムに対する *amt* 発現株の感受性テスト

メチルアンモニウムはアンモニウムのアナログで、アンモニウムトランスポーターによって取込まれる。細胞内に取込まれたメチルアンモニウムは代謝されないため 63)、結果的に分裂酵母の生育は阻害される。感度が良いということもあり、前記したメチルアンモニウムの特徴を利用した測定法が、アンモニウムトランスポーターの特性評

価として使われることが多い。そこで、本研究においても、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た(Fig. 15)。

pREP42 を用いて *P. purpurogenum* のもつ 4 つの *amt* を分裂酵母 *amt*Δ で発現させたところ、100 mM メチルアンモニウムを含む培地で、*amtA* と *amtB* を発現させた菌株の生育が最も阻害された。*amtD* を発現する菌株はわずかに生育が阻害された。*amtC* を発現する菌株は、100 mM メチルアンモニウムを含む培地で生育が阻害されなかった。

3 *amt* の発現動態

P. purpurogenum の cDNA を用いて各 *amt* の発現動態を調べたところ(Fig. 16)、*amtA* と *amtC* は 1 mM NH₄ 培地でよく発現し、100 mM NH₄ 培地でほとんど発現は見られなかった。このとき、*amtA* のほうが *amtC* より発現していた。対して、*amtB* と *amtD* はどちらの培地条件下でも高発現が見られたが、*amtB* のほうがより発現していた。

第4節 考察

本章ではまず、*P. purpurogenum* IAM15392 株のドラフトゲノムシーケンスからアンモニウムトランスポーターと推定される 4 つの *amt* (*amtA*, *amtB*, *amtC*, *amtD*) を同定し、アミノ酸配列情報から Amt の特性を予測した。各 Amt の相同性を調べたところ、AmtC だけが他のどの Amt とも相同性が低いことが明らかとなった。また、アンモニウムの取込みに関与するといわれるアミノ酸残基に関して、AmtA、AmtC、AmtD が His、AmtB が Glu であることが分かった。多菌種では、His をもつ Amt は high affinity 型、Glu をもつ Amt は high capacity 型である場合が多い (57, 58, 61)。TMHMM によるトポロジー解析からは、AmtA、AmtB、AmtD が 11 回膜貫通ドメインからなり、AmtC は 9 回膜貫通ドメインからなると予測された。一般的に、アンモニウムトランスポーターは 11 回膜貫通ドメインを持っているため (58-60, 64)、今回 TMHMM の設定からは、

AmtC は構造的にも他の Amt と異なっていることが分かった。

以上のデータから、アミノ酸配列情報から本菌のもつ推定上の Amt の特性が予測された。よって、次にこれらの Amt が実際に有する機能を解析する必要があるが、*P. purpurogenum* の形質転換方法は確立されていないため、機能解析が困難であった。そこで、その手法が確立されている分裂酵母 *amt* Δ 株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(Table4)。分裂酵母を宿主としたとき、*P. purpurogenum* の Amt が分裂酵母でも機能できることが明らかになった。また、機能解析のために行われた 4 つの実験から、それぞれの Amt の特性には明確な相違が見られた。主に機能しているアンモニウムトランスポーターは、AmtA と AmtB であることが示唆されたが、このとき、EMM 培地の生育の阻害や Ammonium removal assay の結果から、AmtB のほうがより高いアンモニウム取込み能を有していると考えられた。一方で、AmtC と AmtD は低アンモニウム条件下における相補試験で分裂酵母の生育欠損を相補せず、Ammonium removal assay からアンモニウムの取込み能はないと考えられた。しかし、より感度の良いメチルアンモニウムであれば取込みが検出できる場合がある (58)。そこで、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たところ、*amtA* と *amtB* 発現株に加え、アンモニウムの取込み能がないとされた *amtD* 発現株にもわずかに生育阻害がみられた。このことから、AmtD にはほんのわずかにアンモニウムを取込む活性があることが示唆された。一方で、*amtC* 発現株にはメチルアンモニウムに対する感受性も認められず、今回行われた実験からは、AmtC にアンモニウムの取込み能がないと判断された。しかし、*P. purpurogenum* で発現が見られていた。Amt の機能は培地中のアンモニウム濃度や窒素源の種類に依存することから (58,61)、実験条件を変えることで分裂酵母でも AmtC や AmtD が機能する可能性は十分にあるといえる。また、異種発現ではなく、本菌で機能解析をすれば機能を見られる可能性はある。

したがって、今後は、より詳細な特性を調べるための測定を行う。その一つとして、高親和性トランスポーターを特定できる侵入成長の相補実験を進める予定である。そ

れと同時に *amtA* と *amtB* を中心に、本菌で *amt* の発現制御を行い、色素生産に対するアンモニウムの取込みの影響を調べていく (Fig. 17)。

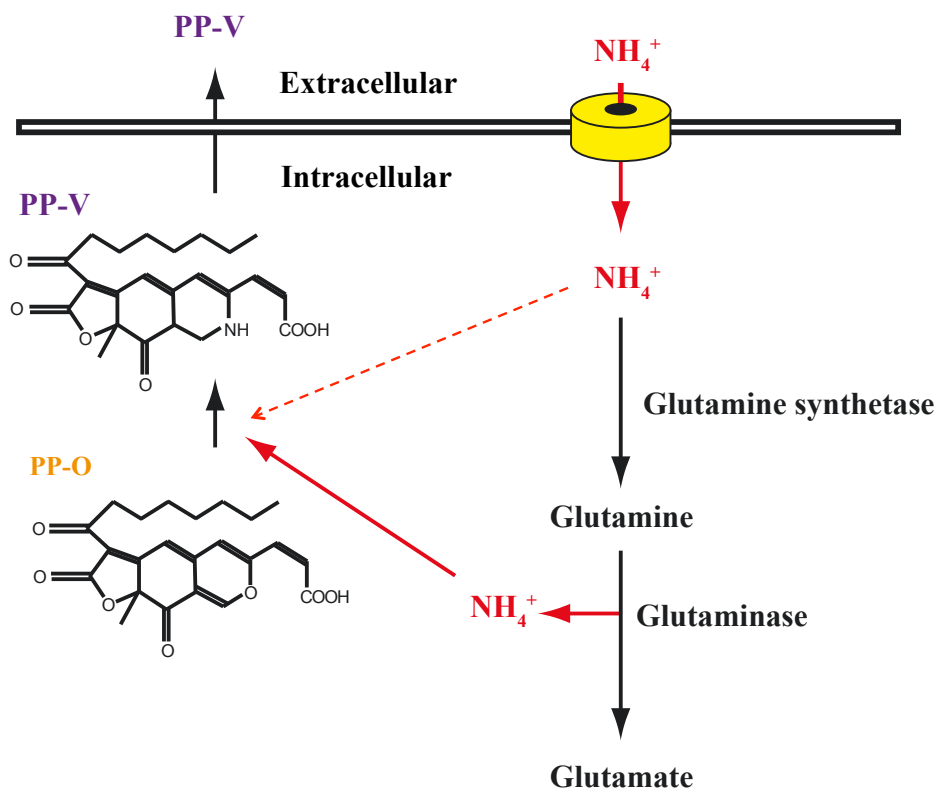


Fig. 8 Ammonium metabolism and PP-V biosynthesis in *P. purpureogenum*

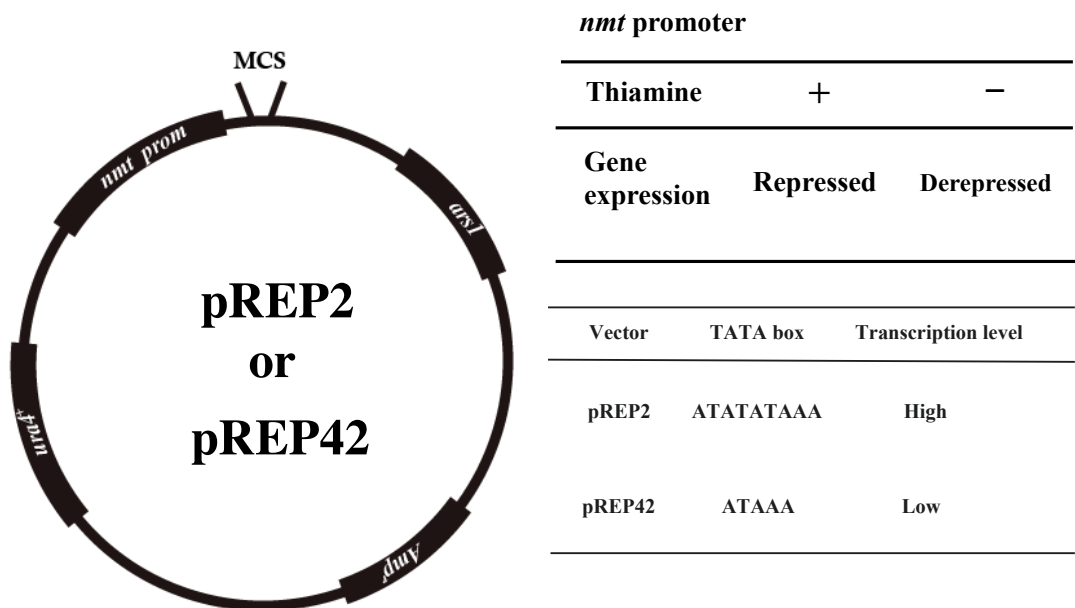


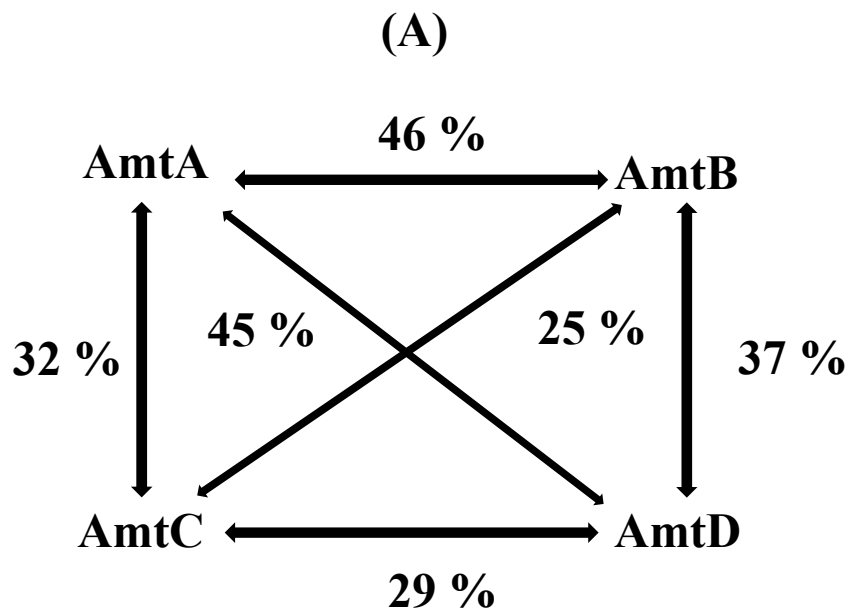
Fig. 9 Yeast expression vectors used for heterologous expression

Table3 Isolation of *amt* in *P. purpurogenum*

Gene	Protein homolog (accetion number)	Source of protein homolog	identities
<i>amtA</i>	ammonium transporter Mep2,putative (XP_002341539.1)	<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	81 %
	ammonium transporter Mep2 (XP_001210376.1)	<i>Aspergillus terreus</i> NIH 2624	82 %
	ammonium transporter Mep2, putative (XP_002151421.1)	<i>Penicillium marneffei</i> ATCC 18224	78 %
<i>amtB</i>	ammonium transporter MeaA (XP_002144588.1)	<i>Penicillium marneffei</i> ATCC 18224	91 %
	ammonium transporter MeaA (XP_002340946.1)	<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	90 %
	ammonium transporter MeaA (XP_001275244.1)	<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	83 %
<i>amtC</i>	ammonium transporter putative (XP_002147208.1)	<i>Penicillium marneffei</i> ATCC 18224	79 %
	ammonium transporter Mep2, putative (XP_002481337.1)	<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	78 %
	ammonium transporter MeaA (XP_001820962.1)	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB 40	71 %
<i>amtD</i>	ammonium transporter MepA (XP_002340346.1)	<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	84 %
	ammonium transporter MepA (XP_002145043.1)	<i>Penicillium marneffei</i> ATCC 18224	84 %
	ammonium transporter MepA (XP_001274395.1)	<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	70 %

AmtA.	1	-----MSDSGDYVPLVPYNGTAATGGDSLTVDLNVFYDAGD--IAWTTITATALVLLMTPG	53
AmtB.	1	MSSADTPAPYAPDYASYNWTGAPADYSLTTNTDLGGDSRVENLNKWYQSGD--QAYTIVASAMVMVMPG	68
AmtC.	1	-----MDSVLEAWEACSKIDTLFLLVCCVFCWPIIPA	32
AmtD.	1	-----MADAPQYNASTPNGNPLEIDVNAQYDGFYNYTYIVFCGFIWLIIPG	49
AmtA.	54	VGFFYSGLARRKSAISLIWLSIMATGVISFQWFFWGYSLAFSHSAGT-YIGDLANFGFMNVLGAPSVGSS	122
AmtB.	69	LGFLYSGLARRKSAISMIWACMGFSVITFQWYFWGYSLAFSPSATNGFTGDLSFGLMNLGAPSPGSP	138
AmtC.	33	VGLGYSGYSTRRSGLASFYPGLIAIIVCTVQWIIIGYSLAYGEGNSI--IGGFEKVFHRGVLAEPIGS-	98
AmtD.	50	IGLLYGGIARRKSAIALLFQSMVVAVTTFQWFWGYSLAFSRNAGP-FI GTLDAFGMMNVLAAPSPGSD	118
AmtA.	123	KVPDLLFAVYQGMFAAITVALAVGAVAEERGRMLPCVVFVFWSTIIYDPTIACWTNNSSGWVYKLGGLDFA	192
AmtB.	139	LVPGLLYAFYQMF CGVTAATVMGAVAERGRLLPAMVFTFIWATLVYCP LACWANNVNGWYAYGVMDYA	208
AmtC.	99	-IPEILFSEFQLIFCATVCAIAVGGACERGRLLPLFPFCFLWSTFYEP LAHMVWSENGFLGNIGVLDFA	167
AmtD.	119	VLPEIYVCLYQLLFCACVMIVVGGAFERGNIVPSLISFFWATLVYCP LACWTNNSGWLNLPSLDFEA	188
AmtA.	193	GGTPVHISSGAAA-----LAYSLMLGKRRG-HGTHELNY-RPHNVTHVIGTVFLVWGFNFNAGSALS	254
AmtB.	209	GGGPVEITGSLSA-----LAYSMLGRRQE-R--MMLNF-RPHNVSLILLGTVFLWFGWLFNGGSAFG	268
AmtC.	168	GGTPVHICSGASATALSIYLSYPLFRSRKSTVRTPQHLKLRPHNSICQLLALVLIWAWLAFDAGTTLS	237
AmtD.	189	GGGPVHISSGWAA-----LAYAFVLGKRKH-HGEHTHG--KPHNITLVFLGTVLIWFGWFGNGSALS	249
AmtA.	255	ANIRAVMAAVVTNLAAASVGGVTWCLLDY-RLEKKNSTVGFCSGVIIAGLVAITPASGFVPAWSAVIFGIVG	323
AmtB.	269	ANLRATMACWNSNIAASFAAIAWVLLDF-RLARKWSMVGWCSGTTISGLVAATPASGFITPWGSVVLGVVT	337
AmtC.	238	LNFKSVMAACVTNICAAAGALTWSCITY-YESGTWSLDSTFMGATISGLVLITPSAGFVDMTTAFFIGVLG	306
AmtD.	250	ASVRAMVAAFNTNTAACTGVLGWVLDYIRYKGFVSVVGACEGATAGLVGITPAAGYVSWLAAVIGLIT	319
AmtA.	324	ATACNYGTKLY-----LLQTDALDIFAVHIGIGLVGNLLTGLFAADYIARLDG-----STVID	378
AmtB.	338	GIVCNATKVKY-----WIKIDDSMDVFAEHGVAGIIGLLINALFASDDIIGLDGVTNGQTNPTTGTQAQ	401
AmtC.	307	AVVCRQALRIKFTKRAAMRWVDNG-DTFATHCIGGFLGTIVTGLFAQRDVAAYDG-----FTVIKG	367
AmtD.	320	SIVCALLQNVND-----WLHIDDGMEVFKLHGIGGIGAFMTGIFATSSISALDG-----SSLSP	374
AmtA.	379	GGWLNHNYIQLAYQLADSVSGLVYSFEGSCITL FVINFI PGLSLRSPEEDEIMGIDDAEIGEFAYDYVEI	448
AmtB.	402	GGWIHNYRQLYIQIAYIVATCAYAFVVSATIIAYLINITPGLHLRASEEAELLGMDDDQLGEFAYDYVEV	471
AmtC.	368	GVFFDGNWEQLGIQILEALIGFSWSFMGSYIIYALIDCVPGFEVLAKDSEVISGMDASQMDSELYEAQWE	437
AmtD.	375	GA-IDNGKQVYLQLAEIAAISAYSFTVSCITLLYILKFI PGMKLRVEEAELIGLDKAQFVDEIQIGDWSM	443
AmtA.	449	TRDVIGASDGDSVAISKHNSLENAPAEESKV-----	479
AmtB.	472	RRDYLAWTPQKAAQLEDGHEIPHAHRYGIEAHSTMMEGHTPEDKRSEEDIAPQSSIPVSSDYHHHTAQL	541
AmtC.	438	TEADYHPFEGSVRLE-----	452
AmtD.	444	FDTYTGETSRAESSGVLAMPLSKDEPAESKTA-----	475
AmtA.	479	-----	479
AmtB.	542	PPAPRQVAEQNPPGEGQAVIEEEKIA	567
AmtC.	452	-----	452
AmtD.	475	-----	475

Fig. 10 Alignment of four Amts in *P. purpurogenum*



(B)

AmtA	193	GGTPVHIS	SGAAA-
AmtB	209	GGGPVEIG	SGLSA-
AmtC	168	GGTPVHIC	SGASAT
AmtD	189	GGGPVHIS	SGWAA-

	His	Glu
<i>P. purpurogenum</i>	AmtA, AmtC, AmtD	AmtB
<i>A. nidulans</i>	MepA	MeaA
<i>S. pombe</i>	Amt1, Amt3	Amt2
<i>S. cerevisiae</i>	Mep2	Mep1, Mep3

Fig. 11 Results of sequence analysis (A) Homology of four Amts in *P. purpurogenum*. (B) Red circle represents amino acid residue involved in ammonium incorporation.

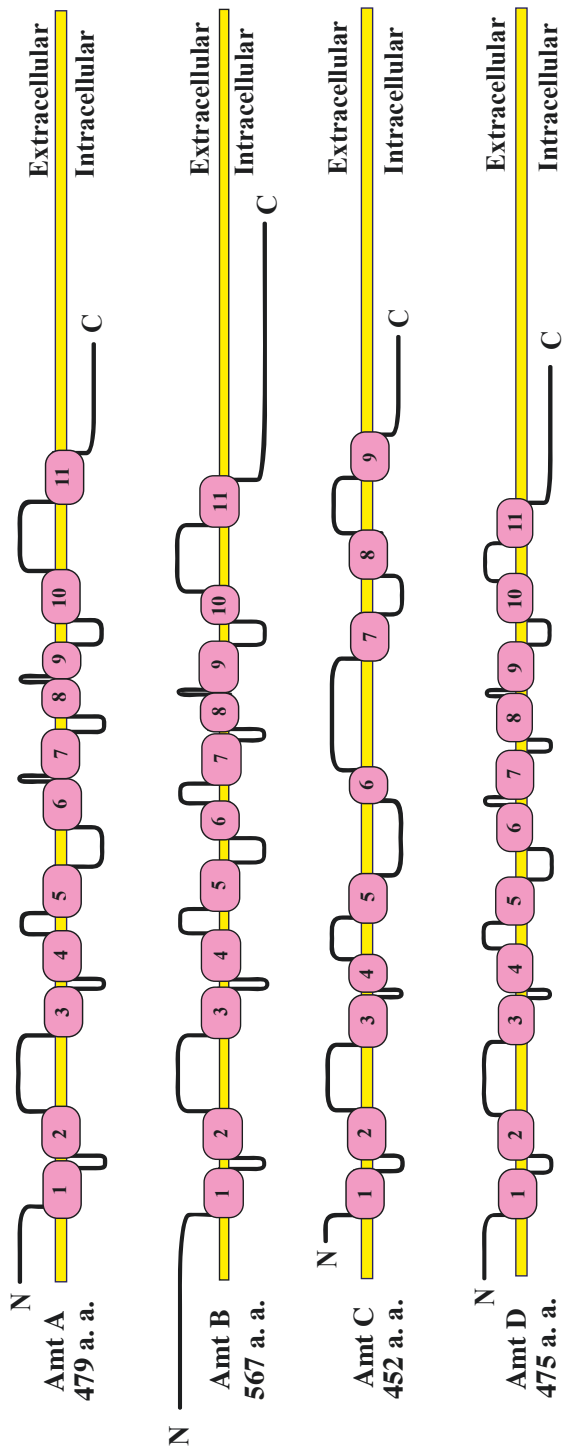
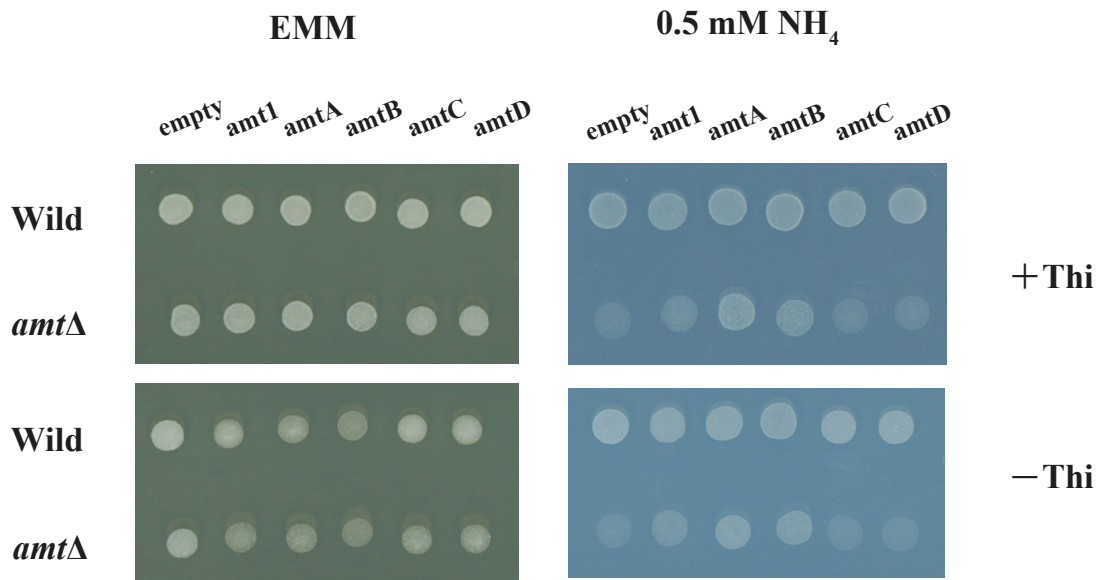


Fig.12 Analysis of transmembrane structure of four Amts by TMHMM



amtA, B, C, or D : the *Penicillium purpurogenum* *amtA, B, C, D* gene

amtΔ: an *S.pombe* *amt1Δamt2Δamt3Δ* strain

Vector: pREP2

Spotted cells : 5×10⁴ cells

Culture condition: 30 °C, 2 days

Fig.13 Complementation test of fission yeast *amt Δ* in low ammonium condition

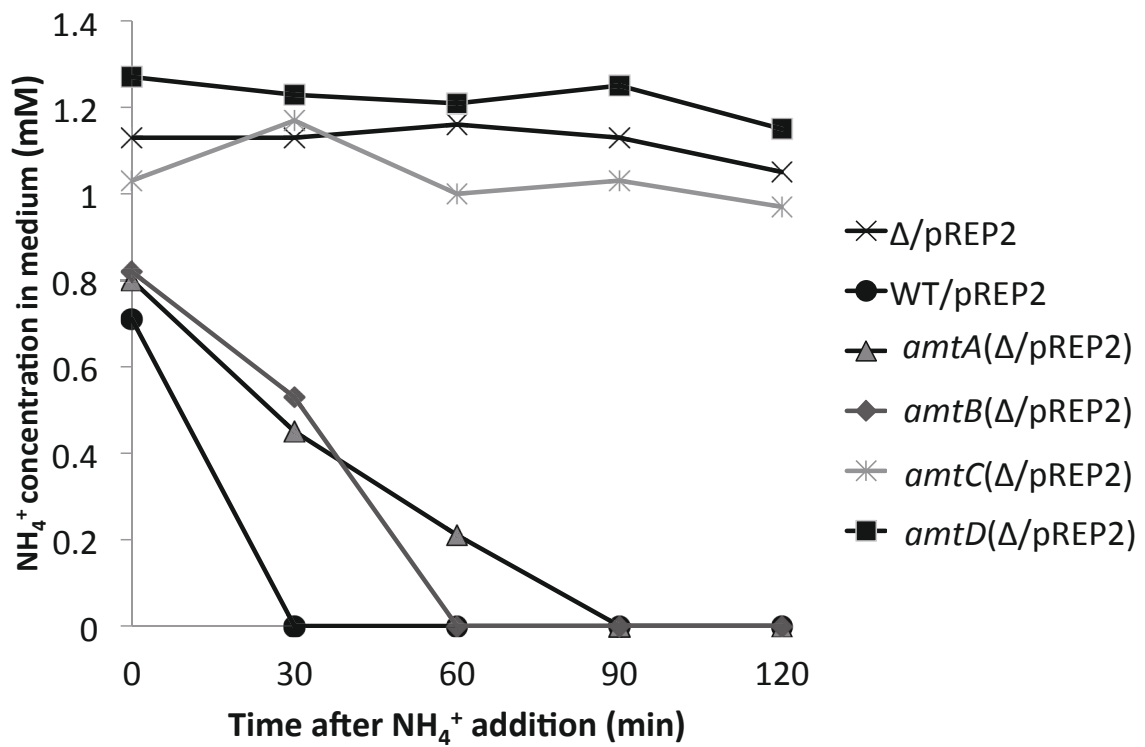


Fig. 14 Ammonium removal assay on Amts of *P. purpureogenum*

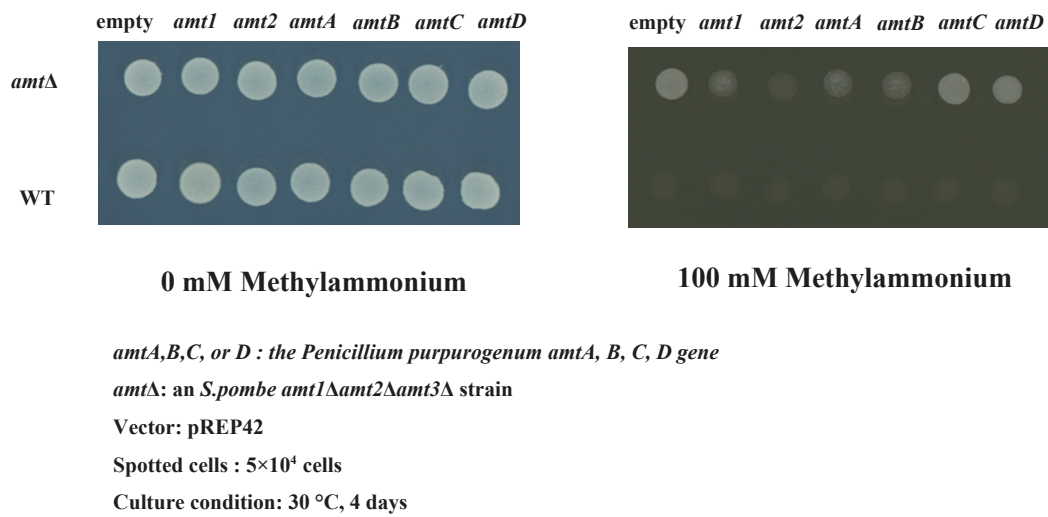


Fig. 15 Sensitivity to methylammonium of *amtA*, *amtB*, *amtC*, or *amtD* expressed transformants

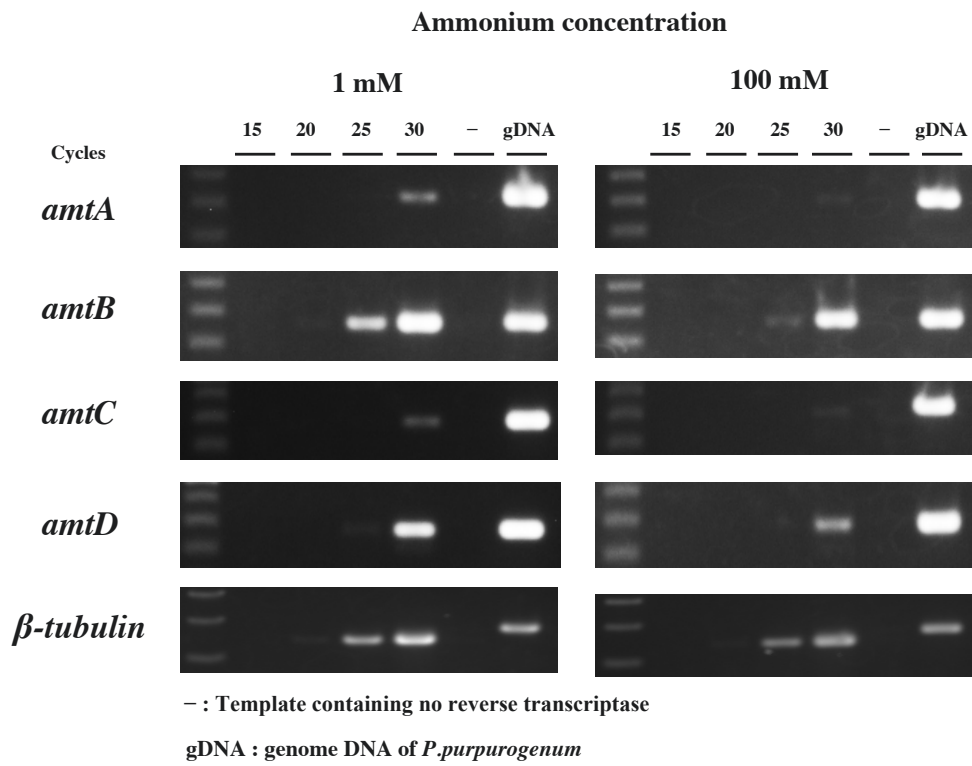


Fig. 16 Expression pattern of *P. purpureogenum* *amts* under low and high ammonium condition

Table4 Characterization of AmtA, AmtB, AmtC, AmtD of *P. purpurogenum*

	AmtA	AmtB	AmtC	AmtD
Growth inhibition (EMM medium)	±	+	-	-
Complementation (0.5 mM NH₄⁺)	+	+	-	-
Ammonium removal	±	+	-	-
MA sensitivity	+	+	-	±

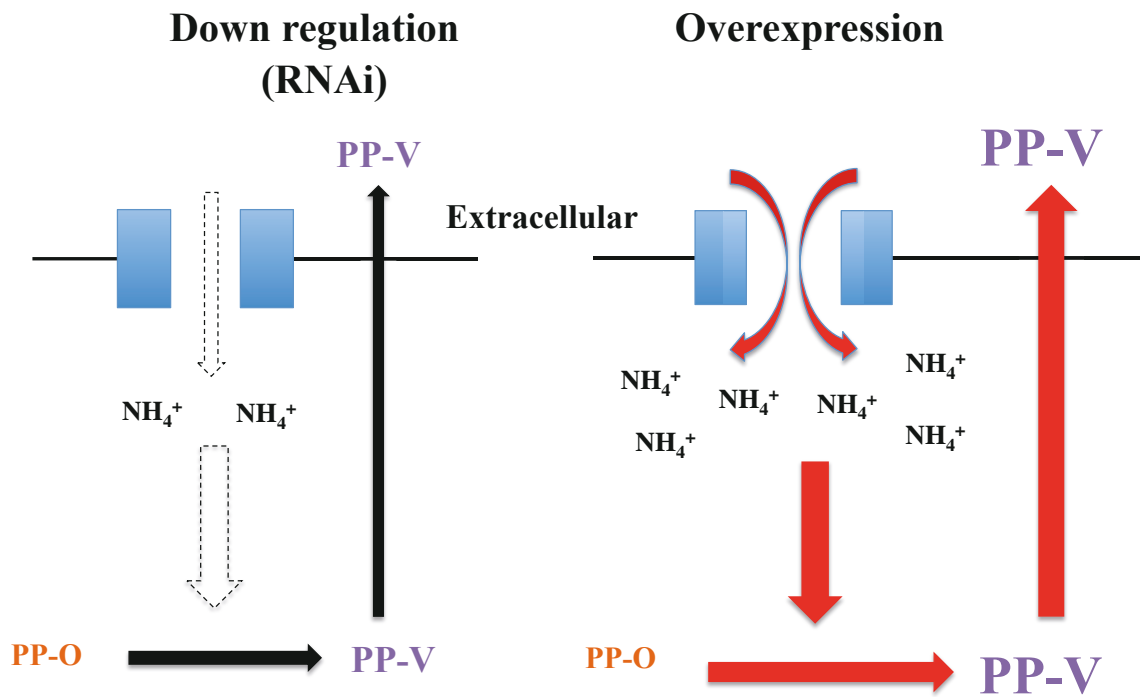


Fig. 17 Analysis of PP-V productivity by regulating incorporation of ammonium intracellularly with gene modification.

本 論

第3章

*Penicillium purpurogenum*の形質転換法の確立

第1節 諸言

第2章において、*P. purpurogenum* の *amt* (*amtA*, *amtB*, *amtC*, *amtD*) を同定し、分裂酵母を用いてそれぞれの特性を調べた。4つのうち、AmtAとAmtBにはアンモニウムの取込み活性は見られたが、AmtCとAmtDには見られなかった。したがって、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予測された。したがって、次のステップとして、遺伝子改変により、AmtAとAmtBを中心にアンモニウムトランスポーターからのアンモニウムの取込みを制御し、色素生産への影響を調べる必要がある。また、*P. purpurogenum* は *Monascus* 色素生産のほかにキシラン分解酵素や β -glucosidase の生産菌としても知られており (65,66)、色素生産とは違う分野でも有用性が高い糸状菌であるといえる。したがって、今後、有用物質高生産株の作出、生合成機構を解明するための形質転換体の作出を考えた上では、遺伝子改変は重要になる。

Penicillium chrysogenum、*Penicillium expansum*、*Penicillium nordicum* などいくつかの *Penicillium* spp. においては、形質転換法が報告されている (67-69)。しかし、本糸状菌については未だ確立されていない。したがって、本菌で遺伝子改変を行うことは現時点では不可能である。そこで本論では、本菌で利用できる発現ベクターを構築し、さらにそれを使って *gfp* を発現させることで *P. purpurogenum* の形質転換を試みた。

本論では、*P. purpurogenum* で使用できる遺伝子発現ベクター、pBPE を構築した。遺伝子発現用のベクターの場合、目的遺伝子の発現レベルに影響するという理由から、プロモーターの選択は特に重要視される。プロモーターには、条件特異的に機能するもの (70-74) と、定常的に機能するもの (70, 75, 76) がある。形質転換法が確立されていない菌では、定常的に機能する方が望ましいため、本研究ではトリプトファン合成遺伝子 (*trpC*) プロモーター (77) を用いた。また、形質転換体を作成する際に、スクリーニングが必要とされる。そのため、宿主として栄養要求性株を用いるか、形質転換の際に、

薬剤耐性遺伝子を組込んだベクターを用いるのが一般的である。しかし、栄養要求性株を作製する際にも、形質転換を行わなければならないため、本菌では薬剤耐性遺伝子をマーカーとした。

第2節 実験材料および実験方法

1 実験材料および試薬・機器

本研究において用いた菌株は、IAM Culture Collection に保存されている *P. purpurogenum* IAM15392株である。PCR反応及び0.2 mlチューブのインキュベーションにはTグラジエントサーモサイクラー (Biometra) もしくはT1サーモサイクラー (Biometra) を用いた。1.5 mlチューブの遠心分離には卓上遠心機 Centrifuge 5424、ローター FA-45-24-11-Special (Eppendorf)および、Centrifuge 5415R、ローター F-45-24-11 (Eppendorf)を用いた。50 mlチューブ (CORNING®) の遠心分離には、冷却遠心機 RSL-05A、スイングローター50 ml×4ユニット (佐久間製作所) を用いた。また特記しない限り、試薬は和光純薬工業の特級試薬を用いた。水はMilli-Q超純水装置 (MILLIPORE) で得た超純水をオートクレーブ滅菌して用いた。また、培地、0.2 ml (WATSON) 及び1.5 mlチューブ (Axygen, BIO-BIK) はES-215 (株式会社トミー精工) を、調製した試薬はES-315 (株式会社・トミー精工) を用いてオートクレーブ滅菌した。三角フラスコはDrying Sterilizer SG810 (ヤマト科学株式会社) を用いて乾熱滅菌した。また、菌体の破碎に用いた乳鉢および乳棒は、操作に液体窒素を用いることから、損壊を避けるために予め-80 °Cで冷却した。

2 *gfp*発現ベクターの構築

2-1 pBPEの構築

2-1-1 Hygromycin耐性遺伝子カセットの切り出し

神戸大学 中屋敷 均教授より譲渡していただいたpSilent1 78)のHygromycin耐性遺伝子カセットを*ApaI* (Takara) によって消化した。pSilent1 3,000 ngに対し、10× Buffer 20 μ l、15 unit/ μ l *ApaI*(Takara)2 μ lを加え、反応液量が300 μ lになるようにMilliQ waterを加えた。反応のため、37 °Cで12時間インキュベーションした。

2-1-2 遺伝子カセットの精製

Spin Column PCR Product Purification Kit (Bio Basic Inc.)を使って、制限酵素消化した遺伝子カセットを精製した。反応液に対して、液量の3倍のBinding Buffer Iを加え、これを付属品のspin columnに移し、2分間室温でインキュベーションした。その後、5,000 rpmで1分間遠心分離した。濾液を捨て、カラムにWash Solution 500 μ lを入れ、8,000 rpmで1分間遠心分離した。濾液を捨て、Wash Solution 500 μ lを入れ、8,000 rpmで1分間遠心分離した。濾液を捨て、10,000 rpmで1分間遠心分離してカラムを乾燥させた後、カラムを1.5 mlチューブにのせた。これに水30 μ lを入れ、室温で2分間インキュベーションした後、10,000 rpmで1分間遠心分離した。

2-1-3 KOD DNA polymeraseによる平滑末端化

反応液50 μ l (DNA fragments 30 μ l、2mM dNTPs 5.0 μ l 10×Buffer 5.0 μ l、25 mM MgSO₄ 2.0 μ l 1 unit/ μ l KOD (TOYOBO) 5 μ l、水 125 μ l) を調製し、60 °Cで1時間インキュベーションした。精製は、本節 2-1-2と同様の方法で行った。

2-1-4 pBlue script II SK⁺の制限酵素消化

pBlue script II SK⁺を*Apa* I (Takara) によって消化した。pBlue script II SK⁺ 3,000 ngに
対し、10 × Buffer 20 μl、15 unit / μl *Apa* I (Takara) 2 μlを加え、反応液量が300 μlになる
ようにMilliQ waterを加えた。反応のため、37 °Cで12 hrインキュベーションした。反応
終了後、本節 2-1-2と同様の方法で制限酵素消化したベクターの精製を30 μlの水で溶出
し、その溶液に2 mM dNTPs 5.0 μl、10 × Buffer 5.0 μl、25 mM MgSO₄ 2.0 μl、1 unit / μl
KOD (TOYOBO) 5 μl、水 125 μlを加え、平滑末端化を行った。その後、本節 2-1-2
と同様の方法で精製を行い、50 μlで溶出した。

2-1-5 pBlue script II SK⁺の脱リン酸化

平滑化したベクターを*E. coli* Alkaline Phosphatase (Toyobo) を用いて脱リン酸化した。
反応系200 μl (本節2-1-4で得た 30 μl、10 × BAP buffer 20 μl、0.4 unit/μl *E. coli* Alkaline
Phosphatase 5 μl、MilliQ water)を調製し、60 °Cで1 hr反応させた。反応後、本節2-1-2と
同様の方法で精製を行った。

2-1-6 pBlue script II SK⁺へのHygromycin耐性遺伝子カセットの挿入

1.5 mlチューブに、本節2-1-5で精製したDNA溶液3.0 μl、pBluescript II SK(+) 1.0 μl、
T4 DNA Ligase (Promega) 1.0 μl、2×Ligation Buffer (Promega) 5.0 μlを加え、合計 10.0 μl
とした。これを16 °Cで16 時間インキュベーションした。

2-1-7 大腸菌の形質転換

ライゲーション反応液に、*E. coli* DH5αコンピテントセル200 μlを加えた。その後、
氷上で30分間インキュベーション後、42 °Cで60秒間インキュベーションし、再度氷上
で1分間冷却した。SOC培地 (2.0% w/v Bacto Tryptone、0.5 % w/v Bacto Yeast Extract、
0.05 % w/v NaCl、0.001 N NaOH、10 mM MgCl₂、10 mM MgSO₄、20 mM Glucose) 800 μl

を加え、37 °Cで1時間振とう培養した。培養液を1.5 mlチューブに移し、室温下にて10,000 rpmで1分間遠心した後、上清900 µlを除去した。ペレットを再懸濁し、クリーンベンチ内で0.5 mM IPTG、20 µg/ml X-gal を含むLB-アンピシリン固体培地 (1.0% w/v Bacto Trypton、0.5% w/v Bacto Yeast Extract、1.0 % w/v NaCl、50 µg/ml アンピシリンナトリウム、1.5 % w/v INA- Agar)に、コンラージ棒を用いてプレーティングし、37 °Cで一晩培養した。

2-1-8 コロニーダイレクトPCRによるクローンの選別

反応液20 µl (5 × Go Taq Reaction Buffer 4 µl、10 mM dNTPs 0.4 µl、10 µM Hyg^r-for 1 µl、10 µM Hyg^r-rev 1 µl、5 unit/µl Go Taq DNA Polymerase 0.1 µl、水 12.5 µl) を調製し、本節 2-1-7で培養したコロニーのうち、白色のコロニーを無菌的な爪楊枝を用いてピックアップしたものをテンプレートとして、PCRを行った。

PCR産物を、DNAマーカーとして100 bp DNA ladderを用いて2 %アガロースゲル電気泳動し、目的の増幅断片が確認されたクローンを選別し、そのプラスミドを保有する大腸菌をLB-アンピシリン液体培地3 mlに無菌的に爪楊枝を用いて植菌し、16時間培養した。

プラスミド回収にはEZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps Kit (Bio Basic Inc.)を用いた。培養液を1 mlずつ1.5 mlチューブ (BIO-BIK) に入れ室温にて10,000 rpmで1分間遠心分離後、デカンテーションにより上清を除去した。同操作を3回繰り返し、培養液中の菌体を回収した。Solution Iを100 µl加え、マイクロピペットで攪拌し完全に混合した。Solution IIを200 µl加え転倒混和した後、室温下で1分間インキュベーションした。次にSolution IIIを350 µl加え転倒混和した後、室温下で1分間インキュベーションした。これにクロロホルムを100 µl加え転倒混和した後、室温下12,000 rpmで5分間遠心分離した。得られた上清を付属のカラムに入れ室温で2分間放置後、室温下5,000 rpmで1分間遠心分離した。カラムにWash Buffer 500 µlを加え、室温下8,000 rpmで1分間遠心分離し

た。この操作を再度繰り返し、濾液を捨て室温下10,000 rpmで1分間遠心分離を行いカラムにプラスミドを吸着させた。カラムを1.5 mlチューブに移し水を30 µl入れ37 °Cで2分間インキュベーション後、室温下10,000 rpmで1分間遠心分離を行い溶出し、Gene SpecI (Naka Instruments)で濃度測定を行った。

2-1-9 塩基配列の解析

0.2 mlチューブに、BigDye® Terminator v3.1 /1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) を用いたPCR反応液 (Ready Reaction Premix 2 µl、Sequencing Buffer 3 µl、1 µM primer 3.2 µl) を調製し、テンプレート200 ng相当を加え、さらに水を加え計20 µlになるように調製した。PCR条件は、初期変性を95 °Cで2分間行い、95 °C・10 sec、50 °C・5 sec、60 °C・4 minを1サイクルとして25サイクル行い、4 °Cで反応を止めた。

1.5 mlチューブにPCR産物を持ち、125 mM EDTA(pH 8.0) 2 µl、3 M酢酸ナトリウム2 µl、100%エタノール50 µlを加え、-80 °Cで15 分間インキュベーションした。4 °C下15,000 rpmで30分間遠心分離後、上清を除去した。これに70%エタノール100 µlを加え、4 °C下13,200 rpm、10分間遠心分離後、上清を除去し、室温下で10分間風乾した。このPCR産物のDNA塩基配列は、ABI automatic Sequencer (Perkin Elmer Japan, Tokyo) を用いて解析した。塩基配列のデータは、GENETYX-Mac NETWORK version 15.0.6 (GENETYX CORPORATION) により解析した。

2-1-10 *trpC*プロモーターおよびターミネーターの増幅

目的遺伝子を発現するための*trpC*プロモーターの両末端と、*trpC*ターミネーターの両末端にプライマーを設計した。このとき、プロモーター、ターミネーターの片方のプライマーに関して、それぞれ*XhoI*と*ApaI*の認識配列を付加した。反応系 50 µl (10 × Buffer for KOD-plus-Ver.2 5 µl、2 mM dNTPs 5 µl、25 mM MgSO₄ 4 µl、10 µM forward primer 1 µl、10 µM reverse primer 1 µl、1 unit/µl KOD-Plus-Ver.2 1 µl、1 ng/µl pSilent1 1

μl、Milli Q water 32 μl) を調製し、PCR (94 °Cで2 分間変性し、その後、94 °C・15 sec、53 °C・30 sec、68 °C・30 secを1サイクルとした) 30サイクル行った。1% Agarose S を用いて、電気泳動を行った。泳動後、エチジウムブロマイド染色を行い、増幅断片を確認し、PCR産物を本節 2-1-2と同様の方法で精製した。各プライマーセットは下記に示した。

P_{trpC}-for 5'-TGATATTGAAGGAGCACTTTTTGGGC-3'

P_{trpC}-rev 5'-TCGAGGTCGACGGTATCGATGCTTGGG-3'

T_{trpC}-for 5'-GGGCCCCGGATCCACTTAACGTTACTG-3'

T_{trpC}-rev 5'-AACCCAGGGGCTGGTGACGGAA-3'

2-1-11 PCR産物のリン酸化

本節 2-1-10で得られた精製物にDNA Denaturation buffer 75 μlを加え、90 °Cで2分間急冷した。この溶液に10×buffer 10 μl、ATP (10mM) 10 μl、T4 poly nucleotide kinase 2 μl MilliQ水3μlを加え、計100 μlになるように反応液を調製し、37 °Cで60分間、その後90 °Cで2分間インキュベートした。反応後、精製をおこなった。

2-1-12 pBlue script II SK⁺へのtrpCプロモーターおよびターミネーターの挿入

Hygromycin耐性遺伝子カセットを含むpBlue script II SK⁺を*NotI*で制限酵素消化した。ベクター3,000 ngに対し、10 × Buffer 20 μl、10 unit / μl *NotI* (Takara) 3 μlを加え、反応液量が300 μlになるようにMilliQ waterを加えた。反応のため、37 °Cで12時間インキュベーションした。反応終了後、本節 2-1-2と同様の方法で精製したものを平滑化した後、再び本節 2-1-2と同様の方法で精製し、脱リン酸化した。本節 2-1-2と同様の方法で精製後、そこに*trpC*プロモーターを挿入し、大腸菌の形質転換をした。コロニーダイレクトPCRを行い、*trpC*プロモーターが挿入されているプラスミドを保有するクローンを

選別した。*trpC*プロモーターが組込まれているプラスミドを保有する大腸菌をLB - アンピシリン液体培地3 mlで培養し、プラスミドを回収した。このプラスミドを*XhoI*によって消化し、精製したものを平滑化した後、脱リン酸化した。そこに*trpC*ターミネーターを挿入し、大腸菌の形質転換を行った。コロニーダイレクトPCRによって*trpC*プロモーターが挿入されているプラスミドを保有するクローンを選別した。*trpC*プロモーターが組込まれているプラスミドを保有する大腸菌をLB -アンピシリン液体培地3 mlで培養し、プラスミドを回収した。

2-1-13 塩基配列の解析

0.2 mlチューブに、BigDye® Terminator v3.1 /1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) を用いたPCR反応液 (Ready Reaction Premix 2 µl、Sequencing Buffer 3 µl、1 µM primer 3.2 µl) を調製し、テンプレート200 ng相当を加え、さらに水を加え計20 µlになるように調製した。PCR条件は、初期変性を95 °Cで2 min行い、その後、95 °C・10 sec、50 °C・5 sec、60 °C・4 minを1サイクルとして25サイクル行い、4 °Cで反応を止めた。

1.5 mlチューブにPCR産物を移し、125 mM EDTA(pH 8.0) 2 µl、3 M酢酸ナトリウム2 µl、100%エタノール50 µlを加え、-80 °Cで15分間インキュベーションした。4 °Cにて15,000 rpmで30分間遠心分離後、上清を除去した。これに70%エタノール100 µlを加え、4 °Cにて13,200 rpmで10分間遠心分離後、上清を除去し、室温下で10分間風乾した。このPCR産物のDNA塩基配列は、ABI automatic Sequencer (Perkin Elmer Japan, Tokyo) を用いて解析した。塩基配列のデータは、GENETYX-Mac NETWORK version 15.0.6 (GENETYX CORPORATION) により解析した。

2-1-14 マルチクローニングサイトの作製

XhoI、*NotI*、*EcoRV*、*HindIII*、*ApaI*の認識配列を含むよう、以下に示すアダプター配列を設計した。設計した50 μ M MCS1と50 μ M MCS2を 20 μ lずつとTris-HCl (pH7.5)-MgCl₂ 10 μ lチューブにいれ、95 °Cに設定したサーモミキサーで2分間インキュベートした。反応終了後、室温になるまで放置した。MCS1とMCS2のヌクレオチド配列を以下に示す。

MCS1 5'-CTCGAGGCGGCCGCGATATCAAGCTTGGGCCC-3'

MCS2 3'-GAGCTCCGCGCGCTATAGTTCGAACCCGGG-5'

2-1-15 pBlue script II SK⁺へのマルチクローニングサイトの挿入

本節 2-1-13で *trpC*プロモーターとターミネーターが挿入されていることが確認できたベクターをpBlue script II SK⁺を*ApaI*で消化し、本節 2-1-2と同様の方法で精製した。ベクター3,000 ngに対し、10 \times Buffer 20 μ l、10 unit / μ l *XhoI* (Takara) 3 μ lを加え、反応液量が300 μ lになるようにMilliQ waterを加えた。反応のため、37 °Cで12時間インキュベーションし、本節 2-1-2と同様の方法で精製した。2-1-6と同様の方法で、ここに本節 2-1-14で作製したマルチクローニングサイトを挿入した。本節2-1-7と同様に、大腸菌の形質転換を行い、翌日本節2-1-8と同様の方法で、コロニーダイレクトPCRによってマルチクローニングサイトが挿入されているプラスミドを保有するクローンを選別した。マルチクローニングサイトが組込まれているプラスミドを保有する大腸菌をLB - アンピシリン液体培地3 mlで培養し、プラスミドを回収した。

2-1-17 塩基配列の解析

0.2 mlチューブに、BigDye® Terminator v3.1 /1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) を用いたPCR反応液 (Ready Reaction Premix 2 μ l、Sequencing Buffer 3 μ l、1

μM primer 3.2 μl) を調製し、テンプレート200 ng相当を加え、さらに水を加え計20 μl になるように調製した。PCR条件は、初期変性を95 °Cで2分間行い、95 °C・10 sec、50 °C・5 sec、60 °C・4 minを1サイクルとして25サイクル行い、4 °Cで反応を止めた。

1.5 mlチューブにPCR産物を移し、125 mM EDTA(pH 8.0) 2 μl、3 M酢酸ナトリウム2 μl、100%エタノール50 μlを加え、-80 °Cで15分間インキュベーションした。4 °C下15,000 rpm、30 min遠心分離後、上清を除去した。これに70%エタノール100 μlを加え、4 °C下13,200 rpmで10分間遠心分離後、上清を除去し、室温下で10分間風乾した。このPCR産物のDNA塩基配列は、ABI automatic Sequencer (Perkin Elmer Japan, Tokyo) を用いて解析した。塩基配列のデータは、GENETYX-Mac NETWORK version 15.0.6 (GENETYX CORPORATION) により解析した。

2-1-18 Geneticin耐性遺伝子カセットの切り出し

神戸大学 中屋敷 均教授より譲渡していただいたpSilent-Dual1 79)のGeneticin耐性遺伝子カセットを*Sac*I (Takara) によって消化した。pSilent-Dual1 3,000 ngに対し、10 × Buffer 20 μl、10 unit / μl *Sac*I (Takara) 2 μlを加え、反応液量が300 μlになるようにMilliQ waterを加えた。反応のため、37 °Cで12時間インキュベーションした。反応終了後、本節 2-1-2と同様の方法で精製した。

2-1-19 pBlue script II SK⁺へのGeneticin耐性遺伝子カセットの挿入

*Sac*Iによって切り出したGeneticin耐性遺伝子カセットを平滑末端化した。*trpC*プロモーター、ターミネーターが挿入されたpBlue script II SK⁺を*Sac*Iで制限酵素消化し、精製したものを平滑化した後、再び本節 2-1-2と同様の方法で精製し、脱リン酸化した。本節 2-1-2と同様の方法で精製後、そこに本節2-1-6と同様の方法で、Geneticin耐性遺伝子カセットを挿入し、本節 2-1-7と同様の方法で大腸菌の形質転換を行った。本節 2-1-8

と同様に、コロニーダイレクトPCRによってGeneticin耐性遺伝子カセットが挿入されているプラスミドを保有するクローンを選別した。Geneticin耐性遺伝子カセットが組込まれているプラスミドを保有する大腸菌をLB - アンピシリン液体培地3 mlで培養し、プラスミドを回収した。

2-1-20 塩基配列の解析

0.2 mlチューブに、BigDye® Terminator v3.1 /1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) を用いたPCR反応液 (Ready Reaction Premix 2 µl、Sequencing Buffer 3 µl、1 µM primer 3.2 µl) を調製し、テンプレート200 ng相当を加え、さらに水を加え計20 µlになるように調製した。PCR条件は、初期変性を95 °Cで2分間行い、95 °C・10 sec、50 °C・5 sec、60 °C・4 minを1サイクルとして25サイクル行い、4 °Cで反応を止めた。

1.5 mlチューブにPCR産物を移し、125 mM EDTA(pH 8.0) 2 µl、3 M酢酸ナトリウム2 µl、100%エタノール50 µlを加え、-80 °Cで15分間インキュベーションした。4 °C下15,000 rpmで30分間遠心分離後、上清を除去した。これに70%エタノール100 µlを加え、4 °C下13,200 rpmで10分間遠心分離後、上清を除去し、室温下で10分間風乾した。このPCR産物のDNA塩基配列は、ABI automatic Sequencer (Perkin Elmer Japan, Tokyo) を用いて解析した。塩基配列のデータは、GENETYX-Mac NETWORK version 15.0.6 (GENETYX CORPORATION) により解析した。

2-2 pBPE-GFPの構築

2-2-1 インサートに用いる*gfp*の作製

インサートに用いた*gfp*は、過去に本研究室で、T-easy vectorにクローニングしたものをを用いた。*gfp*を切り出すために、*gfp*が組込まれたT-easy 3,000 ngに対し、10 × Buffer 30 µl、10 unit/µl *NotI* (Takara) 3 µlを加え、反応液量が300 µlになるようにMilliQ waterを

加えた。反応のため、37 °Cで12時間インキュベーションした。2 % Agarose S (Takara) /1 × TAE 作製し、溶液がなくなるまで各ウェルに10 µlずつアプライした。50 Vで60分間電気泳動後、目的断片をゲルから切り出し、Spin Column DNA Gel Extraction Kit(Bio Basic Inc.)を用いて、精製した。切り出したゲルに対して、3倍量のBinding Buffer IIを加え、室温で10分間静置し、転倒混和をし、ゲルを溶解した。これをSpin Columnに移し、2分間室温で静置した。その後、10,000 rpmで1分間遠心した。下のチューブの廃液を捨て、Wash Solutionを500 µl加え、10,000 rpmで1分間遠心した。この操作を2回繰り返し、チューブの廃液を捨て、10,000 rpmで2分間遠心し、1.5 mlチューブにカラムを移し、それにMilliQ Waterを30 µl入れ、10,000 rpmで2分間遠心し溶出した。ゲル回収した断片を平滑末端化し、本節 2-1-2と同様の方法で精製した。

2-2-2 pBPEへの*gfp*の挿入

本節 2-1で構築したpBPEを*EcoRV*消化した。反応終了後、本節 2-1-2と同様の方法で精製し、脱リン酸化した。これを本節 2-1-2と同様の方法で精製し、本節 2-2-1で作製した*gfp*を挿入するために、本節 2-1-6と同様の組成から成る反応液を調製し、16 °Cで16時間インキュベーションした。本節 2-1-7と同様の方法で、大腸菌の形質転換を行い、本節 2-1-8と同様に、コロニーダイレクトPCRによってクローンを選別した。*gfp*が組込まれているプラスミドを保有する大腸菌をLB-アンピシリン液体培地3 mlで培養し、プラスミドを回収した。

2-2-3 塩基配列の解析

0.2 mlチューブに、BigDye® Terminator v3.1 /1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) を用いたPCR反応液 (Ready Reaction Premix 2 µl、Sequencing Buffer 3 µl、1 µM primer 3.2 µl) を調製し、テンプレート200 ng相当を加え、さらに水を加え計20 µl

になるように調製した。PCR条件は、初期変性を95 °Cで2分間行い、95 °C・10 sec、50 °C・5 sec、60 °C・4 minを1サイクルとして25サイクル行い、4 °Cで反応を止めた。

1.5 mlチューブにPCR産物を移し、125 mM EDTA(pH 8.0) 2 µl、3 M酢酸ナトリウム2 µl、100%エタノール50 µlを加え、-80 °Cで15分間インキュベーションした。4 °C下15,000 rpmで30分間遠心分離後、上清を除去した。これに70%エタノール100 µlを加え、4 °C下13,200 rpmで10分間遠心分離後、上清を除去し、室温下で10分間風乾した。このPCR産物のDNA塩基配列は、ABI automatic Sequencer (Perkin Elmer Japan, Tokyo) を用いて解析した。塩基配列のデータは、GENETYX-Mac NETWORK version 15.0.6 (GENETYX CORPORATION) により解析した。

3 GFP発現株の作出

3-1 プロトプラスト化

3-1-1 孢子懸濁液の作製

クリーンベンチ内で、PDA斜面培地に本糸状菌の孢子及び分生子を接種し、30 °Cで3~5日間培養した。培養後、これらのPDA斜面培地に、0.05% Tween 80をそれぞれ、5 mlずつ加え、2 mlのディスペンサー (Tpp) の先で菌体を剥がし、懸濁させた。ロートの上に目開き160 µmの ナイロンメッシュ (品番 81/2xx-160、田中三次郎商店) を乗せ、これを15 mlチューブに乗せ、懸濁液5 mlを加え濾過した。この操作を2回行い、孢子懸濁液10 mlを作製した。また、血球計算盤 (Erma) にカバーガラスを乗せ、その隙間に孢子懸濁液を0.05% Tween 80により10倍希釈したものを10 µl注入し、透過型ノルマルスキー微分干渉装置のついた倒立型顕微鏡 IMT2-NIC (Olympus) を用いて孢子数を測

定した。孢子懸濁液は、4 °Cにて保存した。以降、本節 3-2-3までの操作は全てクリーンベンチ内で行われた。

3-1-2 *P. purpurogenum* IAM15392株の培養と回収および洗浄

500 ml容三角フラスコに基本培地(20 g Soluble starch, 2 g Bacto™ Yeast Extract / L 50 mM citric acid / Na₃-citrate buffer, pH 5.0)を100 ml調製したものを4本用意し、孢子懸濁液 (7.2×10^6 cell/ml) を植菌した。それを30 °Cにて130 rpm (Eyela Malti Shaker Mms) で24 hr培養した。

培養液を50 mlチューブに50 ml分取し、4 °C下3000 rpmで15分間遠心した。上清を捨て、培養液がなくなるまでこの操作を繰り返した。

回収された菌体が入った50 mlのチューブに、オートクレーブ滅菌された25 mlの0.8 M NaClを加えた。4 °C下3000 rpmで15分間遠心し、上清を捨てた。再度0.8 M NaClを加え同様の条件で遠心し、上清を捨てた。

3-1-3 酵素処理による細胞壁の除去

洗浄した菌体を新しい15 mlチューブに移し、5 mlのYatalase enzyme solution (1.5 % w/v Yatalase™ (Takara), 終濃度 0.8 M NaCl, 1 mM DTT, 0.01 M Na phosphate buffer, pH 6.0) を加えた。これを30 °Cで90分間インキュベーションして、細胞壁を除去した。

3-2 *Penicillium purpurogenum*の形質転換

3-2-1 プロトプラストの回収

ロートの上に濾布としてMilacloth (Calbiochem) を乗せ、これに酵素反応液を加え、濾過し、50 mlチューブにプロトプラストを回収した。濾液を4 °C下3,000 rpmで15分間遠心分離し、上清を除去した。ここにSolution I (終濃度 0.8 M NaCl, 0.05 M CaCl₂, 0.01

M Tris/HCl, pH7.5) を10 ml加え、ペレットを懸濁させた後、4 °C下3,000 rpmで15分間遠心分離した。上清を除去し、再びこの操作を繰り返した。

3-2-2 プロトプラストPEG法によるベクターの導入

回収したプロトプラストにSolution I 300 µl、1M DTT 0.45µl、Solution II (50 % w/v polyethylene glycol 4000, 終濃度 0.05 M CaCl₂, 0.01 M Tris/HCl, pH7.5) 500 µlを加え、懸濁した。新しく用意した3本の15 mlチューブのうち2本に5 µg、10 µgのpBPE-GFPをそれぞれ分取し、Solution I、1M DTT、Solution IIを含む100 µlのプロトプラスト溶液を加えた。なお、残り1本のチューブにはベクターを分取せず、100 µlのプロトプラスト溶液だけを加え、ネガティブコントロールとし、他の系と同様の操作を行った。反応液を30分間氷上でインキュベーション後、反応停止のために500 µlのSolution IIを加えて懸濁後、氷上でさらに20分間インキュベーションした。

3-2-3 NaCl含有 YMA/Geneticin 培地への植菌

反応終了後、それぞれのチューブに、10 mlのSolution Iを加え、数回転倒混和した。4 °C下3,000 rpmで5分間遠心分離した後、500~1000 µl程度の溶液が残るようにデカンテーションで上清を捨てた。残った上清でペレットを懸濁し、50 µlを150 µg/ml G418 二硫酸塩水溶液 (nacalai tesque) と3.8 % (w/v) NaCl を含むYMA(5 g peptone, 3 g Bacto™ Malt Extract, 10 g D(+)-Glucose, 20 g INA -Agar /L)/ Geneticin培地にスポットした。その上から、150 µg/ml G418 二硫酸塩水溶液 (Nacalai Tesque) と3.8 % (w/v) NaCl 、0.5 % agar (ゲル化温度30~31 °C; nakalai tesque)を含むYM培地5 mlを加え、プロトプラスト溶液が均等になるよう、培地全体に撒き広げた。その後、30分間程度放置し、培地を乾燥させた。乾燥後、シャーレの外側をサジカルテープ (スリーエムヘルスケア) で巻き、水道水で湿らせたキムワイプを敷いた発砲スチロール製の箱の中で30 °Cで4~7日間静置培養を行った。

3-3 GFP発現株のスクリーニング

3-3-1 薬剤耐性株のセレクション

クリーンベンチ内で、本章 3-2-3で植菌したプロトプラストから、早期に培地上に生えてきたものを3.8% (w/v) NaCl を含まないYMA/Geneticin 培地に移し、胞子形成を確認できたら、再び同様の組成からなる培地に植継いだ。これを計7回行った。

YMA/Geneticin 培地での生育が良好だった株を選別し、以降の実験に用いた。

3-3-2 Typhoon9410によるGFP発現株のスクリーニング

滅菌 2 号角シャーレ(栄研化学)にYMA培地を100 ml調製した。そこに野生株と選別された薬剤耐性株をクリーンベンチ内で植菌し、30 °Cで7日間静置培養した。菌体が生育していることを確認し、バリアブルイメージアナライザーのTyphoon 9410 (GE Healthcare UK Ltd)を用いて、GFPの蛍光シグナルを可視化した。このとき、GFPを励起させるために488 nmのレーザーを選択し、526 nmの波長を検出できるように設定した。

3-4 *gfp*の検出

3-4-1 形質転換体の培養

YM培地を100 ml調製し、30 °C下200 rpmで4日間培養した。エチレンオキシドガスによりHP_{SP}滅菌バッグを用いて滅菌した濾紙 (No. 2) 、ブフナー漏斗及び吸引瓶により、野生株と形質転換体の培養液を吸引濾過した。菌体をオートクレーブにより滅菌

処理した50 mM citric acid / Na₃-citrate buffer (pH 5.0)にて洗浄後、濾紙上に湿菌体を得た。菌体は液体窒素で凍結させ、-80 °Cで保存した。

3-4-2尿素/フェノール法をもとに改良したDNA抽出法によるゲノムDNA

抽出

-80 °Cで冷凍保存した培養菌体1.0 gを上皿天秤で秤取った。菌体を乳鉢に入れ、氷上で冷やしておいた乳鉢に液体窒素を加えながら、同じく氷上で冷やしておいた乳棒で粉砕した。粉砕した菌体を15 ml チューブに入れ、1×DNA抽出Buffer（終濃度1.0 % SDS, 40 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 600 mM NaCl, 5M 尿素, 5% フェノール, 10 mM βメルカプトエタノール）を4 ml加え、Vortex-Genic 2 (Scientific Industries) を用い5 秒間激しく攪拌した。液体窒素によって、抽出液を凍結させ、その後、50 °Cのウォーターバス内で溶解した。この操作を2回繰り返した。抽出液と同量（4 ml）のPCI（0.5 M Tris-フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール=25：24：1）を加え、Vortex-Genic 2で激しく攪拌し、室温下3,000 rpmで30 分間遠心した。上層をマイクロピペット（Gilson）で別の15 ml チューブに移した。この操作を2回繰り返した。新しい15 ml チューブに移した上清に対し、等量のクロロホルムを加え、Vortex-Genic 2で激しく攪拌し、室温下3,000 rpm, 30分間遠心した。上清を新しい15 mlチューブに移し、-80 °Cで冷却した100% エタノールを2.5倍量（10 ml）加え転倒混和し、4 °C下3,000 rpmで30分間遠心した。上清を取り除き、-20 °Cで冷却した70%エタノールを5 ml加え、4 °C下3,000 rpmで10分間遠心した。上清を取り除き、ペレットが透明になるまで風乾した。TE（10 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA pH 8.0）2 mlでペレットを溶解し、4 °Cで静置した。

翌日、RNase G.S（Wako, Nippon Gene）を2 μl加え、37 °C、1 hrインキュベーションし、RNAを分解した。反応後、2 mlのPCIを加え、ボルテックスで攪拌、室温下3,000 rpm、

30分間遠心した。上清を回収し、それと等量のクロロホルムを加え、ボルテックスで攪拌後、3,000 rpmで30分間遠心した。上清を回収し、新しい1.5 mlチューブ (BIO-BIK) に移し、3 M 酢酸ナトリウムを1/10量と100%エタノールを3倍量加え、-80 °Cで30分間静置後、4 °C下13200 rpmで20分間遠心し、デカンテーションで上清を捨てた。70%エタノールを200 µl加え、4 °C下13,200 rpmで10分間遠心し、上清を捨て、風乾した。風乾後、ペレットをTE 200 µlで完全に溶解し、-20 °Cで保存した。

3-4-3 Agarose S/EtBr 電気泳動によるゲノムDNAの定量

マーカーとしてλDNA/*Hind* IIIを使用し、既知濃度のλDNA (Takara) を標準として50, 100, 150, 200 ng/µl、及び本節3-4-2で抽出したゲノムDNA溶液を原液、10倍希釈、50倍希釈した5 µlを1% Agarose S (Takara)/1 × TAE を用いて100 Vで30分間電気泳動し、エチジウムブロマイド (EtBr 10 µl/1 × TAE 1 ml) で20 min染色した。染色したアガロースゲルをトランスイルミネーターHigh Performance UV Transilluminator (フナコシ) の上に置き、紫外線照射 (302 nm) で、3.5秒間、電気泳動ゲル撮影/解析システム Kodak Digital Science EDAS Version 3.6 (Kodak) により撮影した。

3-4-5 PCRによる*gfp*の検出

10 ng/µlゲノムDNAを1 µl加えた、0.2 mlチューブにGo Taq DNA Polymerase (Promega) を用いた反応液19 µl (5 × Go Taq Reaction Buffer 4 µl、10 mM dNTPs 0.4 µl、10 µM GFP-for 1 µl、10 µM GFP-rev 1 µl、5 unit/µl Go Taq DNA Polymerase 0.1 µl、Milli Q水 12.5 µl) を加え、PCR (初期変性を95 °Cで10 分間行い、その後95 °C · 30 sec, 50 °C · 30 sec, 72 °C · 40 secを1サイクルとした) を30サイクル行った。PCR産物を、DNAマーカーとして100 bp DNA ladderを用いて2%アガロースゲル電気泳動した。使用したプライマーは、以下に示す。

GFP-for 5'-TATATCATGGCCGACAAGCA-3'

GFP-rev 5'-GAACTCCAGCAGGACCATGT-3'

3-4-6 TAクローニング

本節2-1-2と同様の方法でPCR産物を精製し、本章2-1-6と同様の方法でpGEM-T easy vector (Promega)にPCR産物を挿入した。本節2-1-7と同様の方法で大腸菌の形質転換を行い、本節2-1-8と同様に、コロニーダイレクトPCRによってクローンを選別した。

3-4-7 塩基配列の解析

0.2 mlチューブに、BigDye® Terminator v3.1 /1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) を用いたPCR反応液 (Ready Reaction Premix 2 µl、Sequencing Buffer 3 µl、1 µM primer 3.2 µl) を調製し、テンプレート200 ng相当を加え、さらに水を加え計20 µlになるように調製した。PCR条件は、初期変性を95 °Cで2分間行い、95 °C・10 sec、50 °C・5 sec、60 °C・4 minを1サイクルとして25サイクル行い、4 °Cで反応を止めた。

1.5 mlチューブにPCR産物を移し、125 mM EDTA(pH 8.0) 2 µl、3 M酢酸ナトリウム2 µl、100%エタノール50 µlを加え、-80 °Cで15分間インキュベーションした。4 °C下15,000 rpmで30分間遠心分離後、上清を除去した。これに70%エタノール100 µlを加え、4 °C下13,200 rpmで10分間遠心分離後、上清を除去し、室温下で10分間風乾した。このPCR産物のDNA塩基配列は、ABI automatic Sequencer (Perkin Elmer Japan, Tokyo) を用いて解析した。塩基配列のデータは、GENETYX-Mac NETWORK version 15.0.6 (GENETYX CORPORATION) により解析した。

3-5 蛍光顕微鏡観察によるGFP発現の確認

15 mL チューブにPD培地3 mLを加え、野生株と形質転換体をそれぞれ30 °Cで4日間培養した。菌体が生育していることを確認し、転倒混和した培養液をスラドグラスに5 μ lスポットし、その上からカバーグラスをかぶせた。HSオールインワン蛍光顕微鏡 (Keyence, BZ-9000)をもちいて、明視野観察と蛍光観察をし、GFPの発現を確認した。この時、野生株は $\times 400$ 倍、形質転換体は $\times 200$ 倍で観察した。なお、スケールバーは50 μ mに設定した。

第3節 実験結果

1 GFP発現株のスクリーニング

1-1 YMA/ Geneticin培地を使ったスクリーニング

YMA/Geneticin培地にベクターを組み込んだプロトプラスト化溶液を塗布したところ、5 μ gのベクターを導入したのものから21個、10 μ gを導入したのものから24個のコロニーが得られた。7回の継代の中でYMA/Geneticin培地で安定した生育を示した6菌株の薬剤耐性株(TP1、TP2、TP6、TP7、TP8、TP13)をさらにスクリーニングした(Fig. 18)。

1-2 Typhoon9410によるスクリーニング

本節 1-1で得られた薬剤耐性株でGFPが発現しているか調べるために、Typhoon9410を使って、GFPの発現シグナルを検出した。その結果、TP6、TP7、TP8からシグナルが検出された。一方、TP1、TP2、TP13からはシグナルが検出されなかった (Fig. 19)。

1-3 PCRによる*gfp*の検出

本節 1-2で発現シグナルが検出された3菌株の染色体上に*gfp*が挿入されているか調べるために、これら菌株のゲノムDNAを鋳型にPCRを行った。その結果、全ての菌株から*gfp*の増幅断片が検出された。中でも、TP6については、最も強いバンド強度を示した(Fig. 20)。

1-4 蛍光顕微鏡によるGFP発現株の検出

本節 1-3で最も強いバンド強度を示したTP6中におけるGFPの局在を蛍光顕微鏡によって観察した。GFPは菌糸全体に局在していることが分かった(Fig. 21)。

2 形質転換方法とその結果

pBlue script II SK⁺を基に、*P. purpurogenum*で使用できる発現ベクター(pBPE)を構築した。(Fig. 22) 薬剤マーカーとして、Hygromycin耐性遺伝子とGeneticin耐性遺伝子を用いた。GeneticinはHygromycin以外に*P. purpurogenum*で使用できる薬剤であることが明らかになった。薬剤耐性遺伝子および、目的遺伝子の発現のために、*Aspergillus nidulans*に由来するP. purpurogenumでも使用可能であることが分かった。

本章では、*Aspergillus oryzae*の形質転換法 (80) を基に、Fig. 23に示す方法で、*P. purpurogenum*のプロトプラスト化を行い、Fig.24に示す方法で形質転換を行った。この方法を使って、形質転換をした結果、最終的に3菌株の形質転換体を得られた。また、5 µgのベクターを導入したとき、全体コロニー数に対して得られた形質転換体の比率が0%だったのに対し、10 µgを導入したときは、12.5%だった。しかし、2つの条件下における全体コロニー数に違いはない(Table5)。

第4節 考察

我々は*P. purpurogenum*用の新規発現ベクターを構築することができた。それを使って*gfp*を*P. purpurogenum*で発現させたところ、3菌株の薬剤耐性株から発現が確認できた。

今回我々が構築したベクターには、*Aspergillus nidulans*に由来する*trpC*プロモーターを使用している。*A. nidulans*の*trpC*プロモーターは、糸状菌の遺伝子発現によく用いられるプロモーターの一つであるが(81,82,83)、現在までに*P. purpurogenum*での使用例はない。本研究の結果から、*P. purpurogenum*の遺伝子発現に関しても利用できることが明らかになった。しかし、そのGFPの蛍光は高くなかったため、エンハンサーを付加するか、*P. chrysogenum*由来のエンドグルカナーゼ遺伝子(*xyIP*)のプロモーター(84)のように、より強力なプロモーターの使用が望まれる。

多くの抗生物質の中で、HygromycinやGeneticinは糸状菌の形質転換時によく用いられる。そのため、本菌の形質転換にもこれら二種類の薬剤耐性遺伝子を選択し、ベクターに組み込んだ。今回は、得られた全体コロニー数がそれほど多くなく、Geneticinによるスクリーニングだけを行った。しかし、今後、形質転換効率が向上した場合は、Geneticinに加えて、Hygromycinでのスクリーニングを行うことで形質転換体のスクリーニングにより高い選択圧をかけられることが期待できる。

形質転換は、糸状菌に使う中でも一般的な方法であるプロトプラストPEG法を選択した。既に確立されている*Aspergillus oryzae*の形質転換法(80)に少しの改変を加え、*P. purpurogenum*でも適応できるようにした。*A. oryzae*の細胞をプロトプラスト化する際、3~4 hrを要するが(80)、*P. purpurogenum*では、その半分の時間でほとんどの細胞がプロトプラストになることが分かった。このとき、*A. oryzae*ではYatalaseとCellulaseを用いて細胞壁を分解するが(80)、本菌ではYatalaseだけでもプロトプラストを得られることが明らかになった。

より多くの形質転換体を得るためには、それぞれの糸状菌に適した条件が存在する。その一つが、プラスミド量である。例えば、*A. nidulans*において、得られるコロニーの数はプラスミドの量に依存し (85)、*Penicillium griseoroseum*においては形質転換に用いる2つのプラスミドの比率によって、形質転換効率が変わる (86)。

*P. purpurogenum*の形質転換には、5 μg もしくは10 μg のベクターを用いた。本糸状菌においては、5 μg 、10 μg 共に、得られるコロニー数にほとんど差はなかった。しかし、全体コロニー数に対する形質転換体の比率は、5 μg が0%に対し、10 μg が12.5%だった。したがって、*P. purpurogenum*を形質転換する際に用いるベクター量は少なくとも10 μg を要することが分かった。

本章では *P. purpurogenum* の形質転換を行った。YMA/Geneticin 培地でのスクリーニングの結果、6 菌株の薬剤耐性株が本実験に用いられたが、最終的に、そのうち3 菌株が形質転換体として得られた。このことから、我々の構築した方法では形質転換効率は低いことが示された。したがって、今後は方法の改善が必要とされる。また、顕微鏡観察の結果、GFP の発現が低いことが分かったので、目的遺伝子をより高発現できるベクターを構築することが重要である。

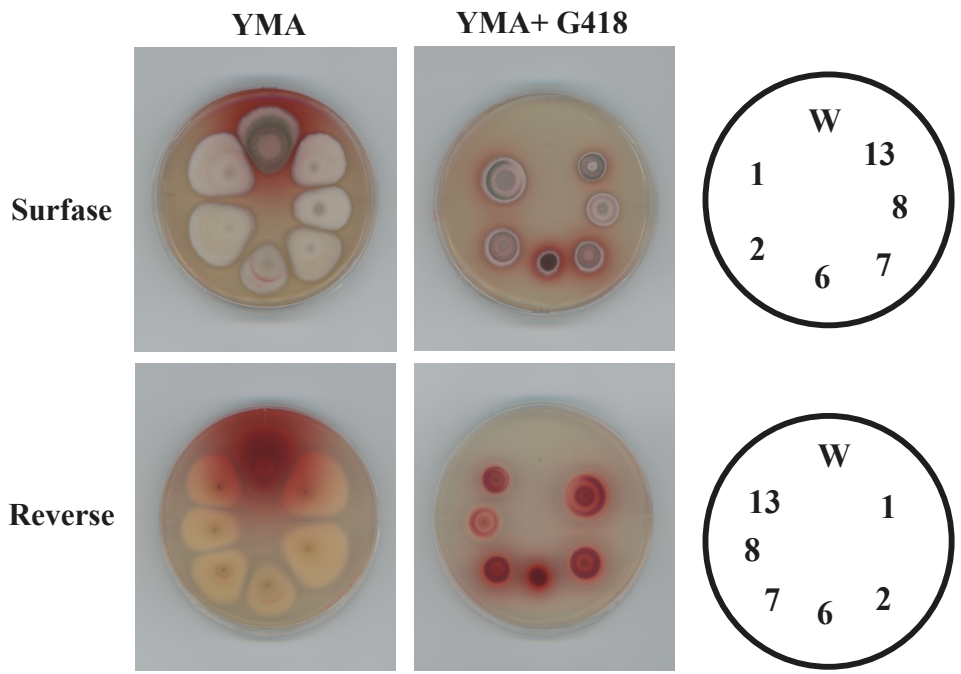


Fig. 18 Growth test of drug resistance strain



Surface

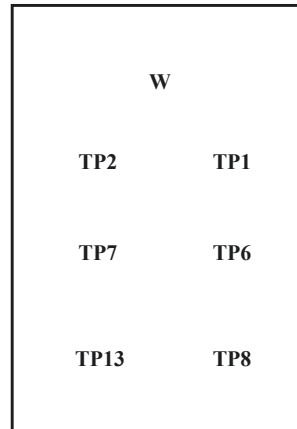


Reverse



Surface

**The signal of
GFP fluorescence**



**Wild type and No.
of transformants**

Fig. 19 The detection of GFP signal by Typhoon9410

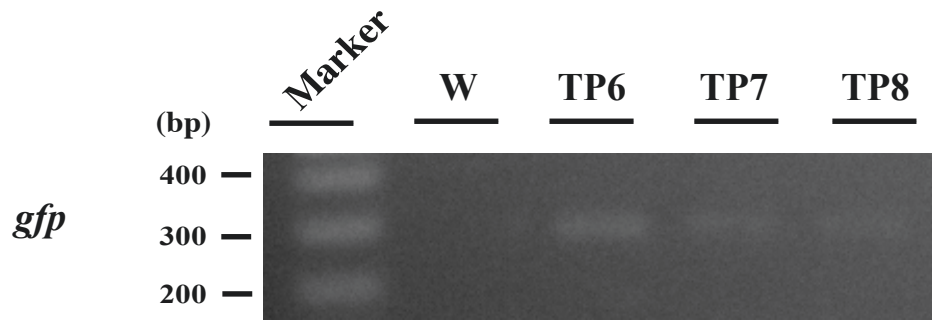


Fig. 20 The detection of *gfp* from transformant genomes

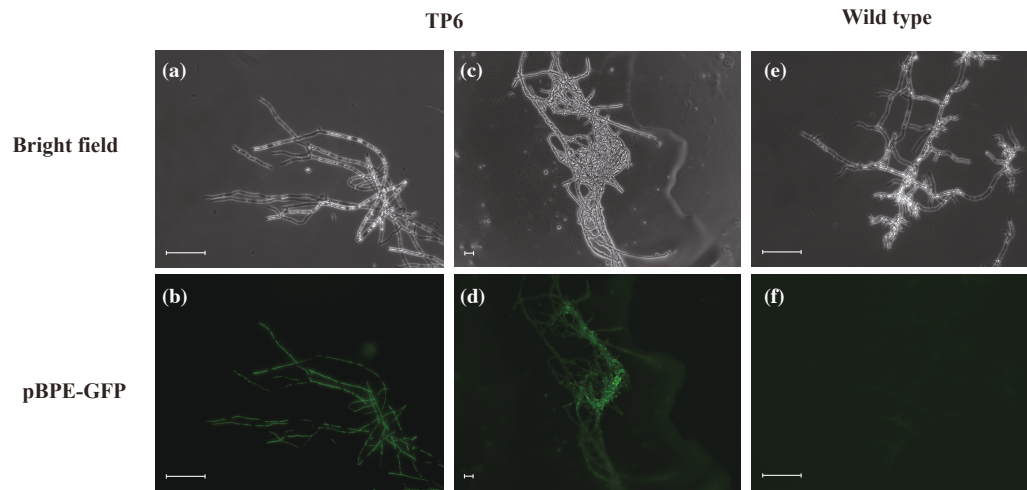


Fig. 21 Localization of GFP with fluorescence microscopy

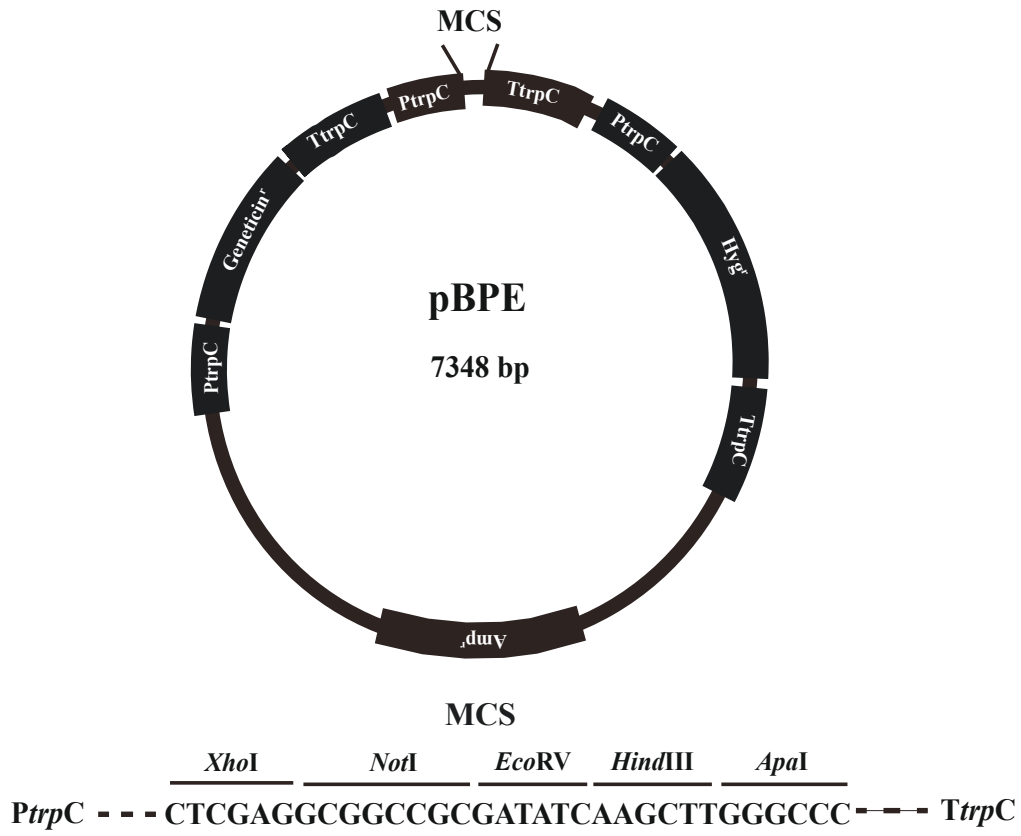


Fig. 22 The plasmid map of pBPE and original restriction site

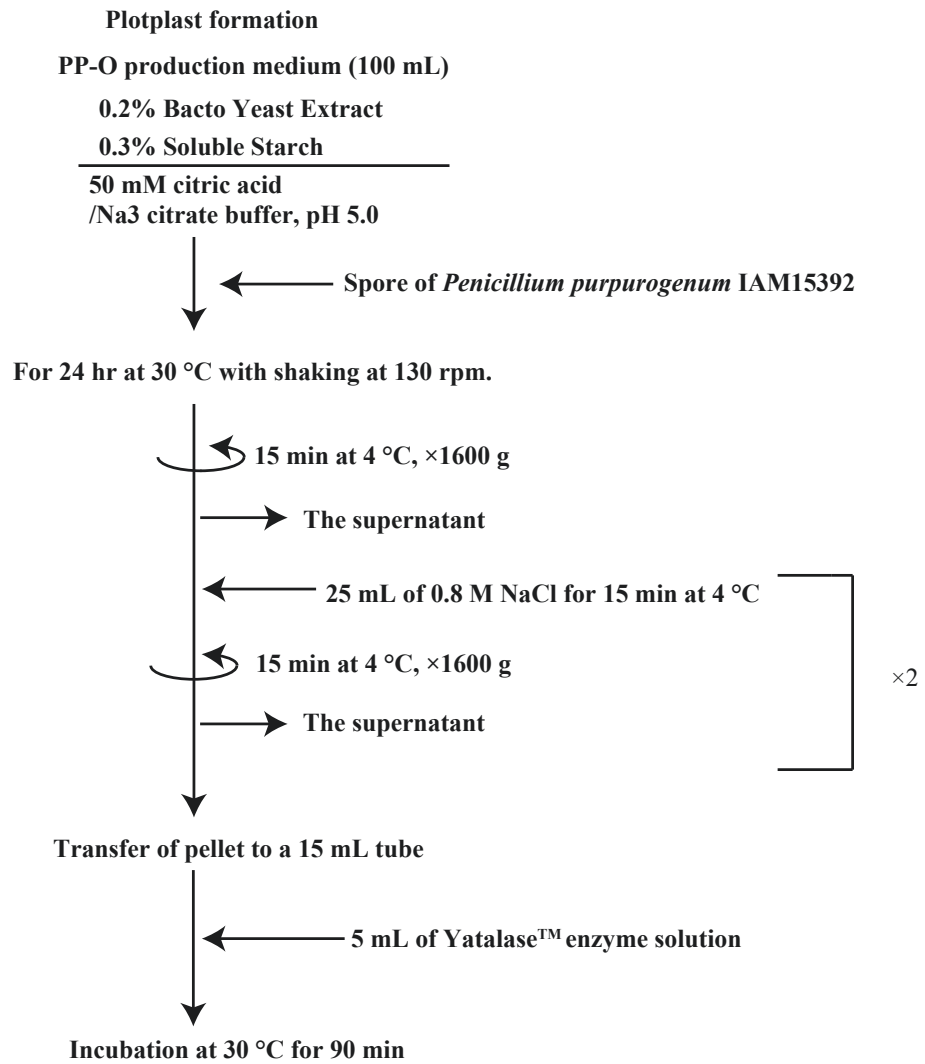


Fig. 23 Manipulation of protoplast preparation

Transformation of *Penicillium purpurogenum*

5 mL of Plotplast solution (50 mL tube)

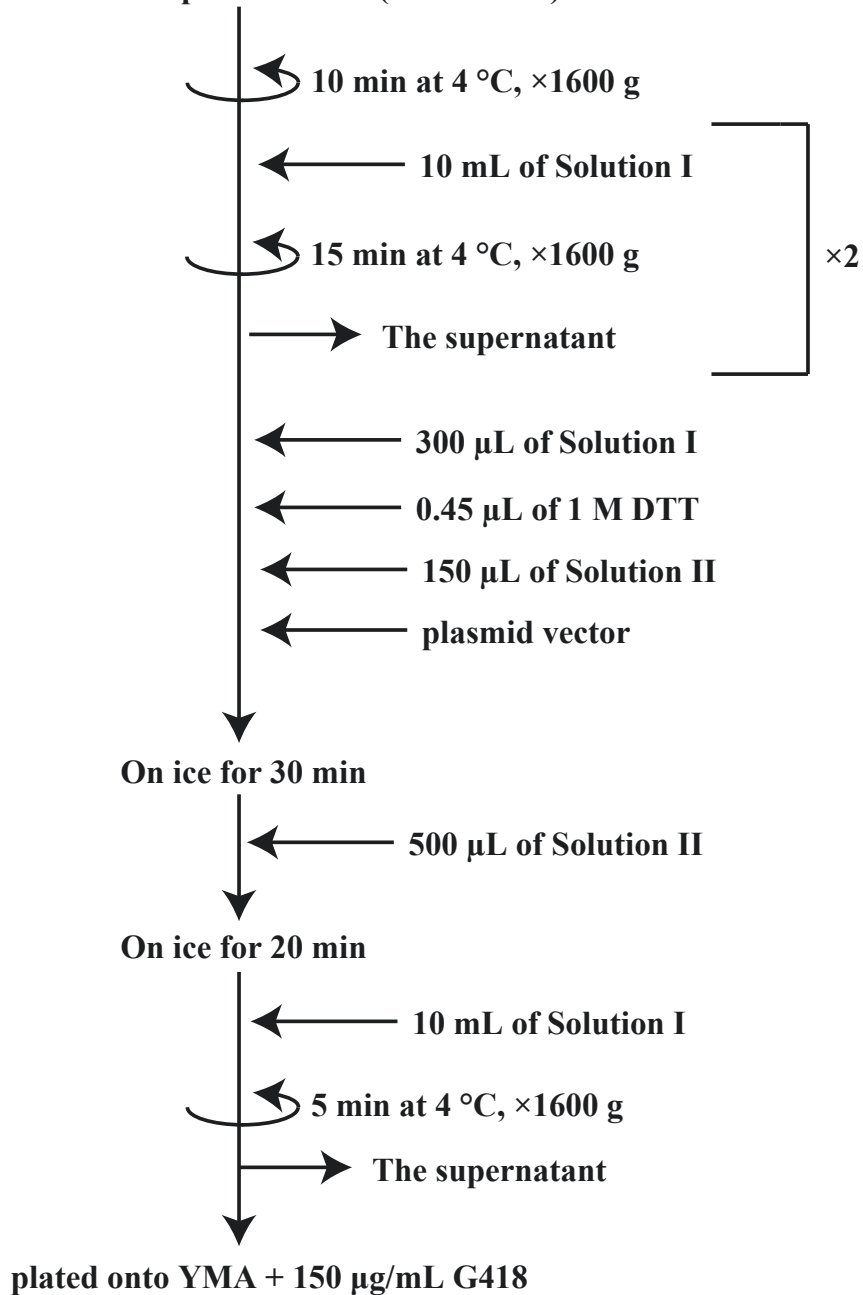


Fig. 24 Manipulation of transformation of *P. purpurogenum*

Table5 The results of transformation in *P. purpurogenum* IAM15392

The amount of pBPE-GFP	Total colonies	Number of transformants	Percentage of transformants (%)*
5 µg	21	0	0
10 µg	24	3	12.5

* Percentage of transformants was regard as number of GFP fluorescence strains/total colonies

総合考察

本研究では、*Penicillium purpurogenum* の窒素代謝と色素生産との関連性を調べることで、PP-V 生合成機構を解明するために、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。第 1 章にて、細胞内の余剰のアンモニウムを使って PP-V を生合成していることが明らかになった。これまで二次代謝は、環境適応には必要とされるが、生命維持には必須の代謝ではないとされてきた。しかし、近年 citrinin や ochratoxinA といった mycotoxin が、そのような化合物を生産する菌にとっては生理的に重要な役割を担っていることが明らかになってきている。

ochratoxin A の生産菌として知られる *P. nordicum* や *P. vercussum* は高塩濃度条件でも生育することが可能である。これらの菌は、細胞内の Cl⁻ の恒常性を維持するために ochratoxin A の構造中に Cl⁻ を取込ませ細胞外に排出していると考えられている (52)。このことから、本菌もこれと同様、アミノ基置換反応を利用して、PP-V として細胞内の余剰のアンモニウムを細胞外に排出することで、細胞内のアンモニウムの恒常性を維持していると考えられる。実際、*S. cerevisiae* において、過多のアンモニウムが細胞内に取込まれた場合、細胞内でそれをアミノ酸に変換し、SPS トランスポーターを介して細胞外に排出するというメカニズムが知られている (55)。しかし、糸状菌においてそのようなメカニズムは報告されていない。したがって、本研究で提案した PP-V の役割は、糸状菌における過多のアンモニウムを排出するメカニズムとしては初めての知見である。

第 1 章で提案した考察に加え、PP-V 生産に関して明らかなことは、通常の PP-V 培地に NH₄NO₃ が用いられること、また glutaminase を阻害すると PP-V 生産性が低下することである。したがって、本菌は、まず培地から細胞内に取込んだ無機窒素源を一度グルタミンまで変換し、それを別のアミノ酸合成などに利用しており、その過程で発生する細胞内のアンモニウムが PP-V 生合成に使われると予測される。もちろんのこ

と、取込まれたアンモニウム自身も PP-V 生合成に利用されると考えられるため、外来からのアンモニウムの取込み量も PP-V 生合成のためには重要であると結論付けた。そこで、第 2 章では細胞内外のアンモニウムの輸送を仲介する、アンモニウムトランスポーターに着目し、アンモニウムの取込みに関する機能解析を行った。

まず、本菌は *amt* と推定される遺伝子を 4 つ (*amtA*, *amtB*, *amtC*, *amtD*) 持つことが分かった。分裂酵母を宿主とした異種発現によってそれらの 4 つの機能解析を行ったところ、*S. pombe* で本菌の Amt の特性を調べることができ、各 Amt 間でアンモニウムの取込みに関しての差を見ることができた。異種発現によるアンモニウムトランスポーターの機能解析には、大抵 *S. cerevisiae* が用いられるため、*S. pombe* でも糸状菌の Amt の機能解析ができたという点に関しては、本研究が初めての報告であり、新たな宿主の発見という意味で重要なことである。また、4 つの測定の結果から、アンモニウムの取込みには AmtA と AmtB が主に機能していることが示唆された。したがって、以降はこの 2 つの Amt を中心に、色素生産に対するアンモニウムの取込みの影響を調べていくことが必要となる。方法としては、*amt* に対して、RNAi や過剰発現を行い、細胞内へのアンモニウムの取込み制御することで、PP-V 生産の増減を調べるといったものになるが、本糸状菌の形質転換法は確立されていない。故に、現時点で、遺伝子改変を行うことは不可能とされた。そこで第 3 章では、*amt* 遺伝子の発現制御を行う前段階として、*P. purpurogenum* の形質転換を試みた。

既に確立されている *A. oryzae* の形質転換法 (80) を参考に、我々が構築した *P. purpurogenum* で使用できる遺伝子発現ベクターを用いて、本菌で *gfp* を発現させた。蛍光顕微鏡観察により、野生株で見られなかった GFP の蛍光が形質転換体で認められた。したがって、本研究において、ほとんど *A. oryzae* で示されているものと同じ方法で、*P. purpurogenum* の形質転換法ができることを示した。このことは、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という意味でも重要なことである。また、形質転換法を確立する過程で、*A. oryzae* のプロトプラスト化に要する時間に対す

る半分の時間でも、本菌ではプロトプラスト化できることが明らかとなった。さらに、*A. oryzae* においては、セルラーゼと *Yatalase* により、細胞壁を分解するが、本菌では *Yatalase* だけでも形質転換ができる状態のプロトプラストが得られることが分かった。今後は、構築した方法を使って色素生産における *Amt* の機能を解析していく。

P. purpurogenum は安全な色素生産ができる糸状菌として注目されているにも関わらず、その色素生合成機構は未解明な部分が多い。本研究では、*PP-V* の役割を考察した上で、それを立証するための準備を整え、今後の *PP-V* 生合成機構の解明に繋げることができた。今後は、実質的な *P. purpurogenum* の利用を目指し、私たちの見出した知見を基に、本菌の色素生合成機構の詳細を明らかにしていく。

引用文献

1. 今堀和友, 山川民夫 : 生化学事典. 第3版, p1013, 東京化学同人, (1998).
2. 八杉龍一, 小関治男, 古谷雅樹, 日高敏隆 : 生物学事典. 第4版, p1036—1037, 岩波書店, (2000).
3. 遠藤 章 : 紅麴と紅麴菌をめぐる歴史と最近の動向. 発酵と工業, 43, 554—551 (1985).
4. 辻 啓介 : 紅麴の血圧調節作用. 醸協誌, 89, 207—211 (1994).
5. 安田正昭 : バイオサイエンスとインダストリー. 59, 514 (2001).
6. 荻原 淳 : *Penicillium* 属糸状菌の生産する新規 azaphilone 化合物及びその N 誘導体の構造と生合成に関する研究, P 3—7 (2001).
7. Kumasaki S, Nakanishi K, Nishikawa E, and Ohashi M : Structure of monascorubrin. *Tetrahedron*, 18, 1171—1184 (1962).
8. Fielding BC, Haws EJ, Holker JSE, Powell ADG, Robertson A, Stanway DN, and Whalley WB : Monascorubrin. *Tetrahedron Lett.*, 5, 24—27 (1960).
9. Inouye Y, Nakanishi K, Nishikawa H, Ohashi M, Terahara A, and Yamamura S : Structure of monascoflavin. *Tetrahedron*, 18, 1195—1203 (1962).
10. Juzlova P, Martinkova L, and Kren V : Secondary metabolites of the fungus *Monascus* : A review. *J. Ind. Microbiol.*, 16, 163—170 (1996).
11. Haws EJ, Holker JSE, Kelly AD, Powell ADG, and Robertson A : The chemistry of fungi. Part XXXVII. The structure of rubropunctatin. *J. Chem. Soc.*, 70, 3598—3610 (1959).
12. Chen FC, Manchard PS, and Whalley WB : The chemistry of fungi. Part LXVI. The structure of monascin, the relative stereochemistry of azaphilones. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I.*, 21, 3577—3579 (1971).

13. Kim C, Jung H, Kim YO, and Shin CS: Antimicrobial activities of amino acid derivatives of monascus pigments. *FEMS Microbiology Lett.*, 264, 117—124 (2006).
14. Akihisa T, Tokuda H, Ukiya M, Kiyota A, Yasukawa K, Sakamoto N, Kimura Y, Suzuki T, Takayasu J, and Nishino H: Anti-tumor-initiating effects of monascin, an azaphilone pigment from the extract of *Monascus pilosus* fermented rice (red-mold rice). *Chem. Biodivers.*, 2, 1305—1309 (2005).
15. Akihisa T, Tokuda H, Yasukawa K, Ukiya M, Kiyota A, Sakamoto N, Suzuki T, Tanabe and N, Nishino H: Azaphilones, furanoisophthalides, and amino acids from the extracts of *Monascus pilosus*-fermented rice (Red-mold rice) and their chemopreventive effects. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 562—565 (2005).
16. Blanc PJ, Laussac JP, Le Bars J, Le Bars P, Loret MO, Pareilleux A, Prome D, Prome JC, Santerre AL, and Goma G : Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. *Int. J. Food Microbiol.*, 27, 201—213 (1995).
17. Wang Y, Ju X, and Zhou Y : The variability of citrinin production in *Monascus* type cultures. *Food Microbiol.*, 22, 145—148 (2005).
18. Deruiter J, Jacyno JM, Davis RA, and Cutler HG: Studies on aldose reductase inhibitors from fungi. I. Citrinin and related benzopyran derivatives. *J. Enzyme Inhib.*, 6, 201—10 (1992).
19. Bragulat MR, Martínez E, Castellá G, Cabañes FJ: Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs. *Int. J. Food Microbiol.*, 15, 43—48 (2008).
20. Mazumder PM, Mazumder R, Mazumder A, Sasmal DS: Antimicrobial activity of the mycotoxin citrinin obtained from the fungus *Penicillium citrinum*. *Anc. Sci. Life*, 21,191—7 (2002).
21. Xu BJ, Jia XQ, Gu LJ, and Sung CK: Review on the qualitative and quantitative

- analysis of the mycotoxin citrinin. *Food Control*, 17, 271—285 (2006).
22. Jan Alexander *et al*: Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. *EFSA J.*, 10, 2605 (2012).
 23. Mapari SA, Thrane U, and Meyer AS: Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants?. *Trends Biotechnol.*, 28, 300—307 (2010).
 24. Shibata S, Tanaka O, and Kitagawa I : Metabolic products of fungi. V. The structure of skyrin. (1). *Pharm. Bull.*, 3, 278—283 (1955).
 25. Takeda N, Seo S, Ogihara Y, Sankawa U, Iitaka I, Kitagawa I, and Shibata S : Studies on fungal metabolites-XXXI: Anthraquinonoid coloring matters of *Penicillium islandicum* Sopp and some other fungi (-) luteoskyrin, (-) rubroskyrin, (+) rugulosin and their related compounds. *Tetrahedron*, 29, 3703—3719 (1973).
 26. Gatenbeck S : Studies of mono-C-methylquinalizarins in relation to a phenolic metabokite of *Penicillium islandicum*. *Acta Chem. Scand.*, 13, 705—710 (1959).
 27. Bu'Lock JD, and Smith JR : Modified anthraquinones from *Penicillium islandicum*. *J. Chem. Soc. (C)*, 1941—1943 (1968).
 28. Cason J, Correia JS, Hutchison RB, and Porter RF : The structure of trimethylherqueinone B¹. *Tetrahedron*, 18, 839—851 (1962).
 29. Simonart P and Verachttert H : Coposes phenoliques produits par *Aspergillus fumigatus* Fresenius and by *Penicillium spinulosum* Thom. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48, 943—950 (1966).
 30. Fuska J, Proska B, and Uhrin D : The antibiotic PSX-1 produced by *Penicillium stipitatum* is identical with Botryodiplodin. *Folia Microbiol. (Progue)*, 33, 238—240 (1988).
 31. Peterson RE and Grove MD : Isolation of xanthomegnin from *Penicillium viridicatum* by preparative high-pressure liquid chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45,

- 1937—1938 (1983).
32. Singh PD, Johnson JH, Aklonis CA, Bush K, Fisher SM, and O'sullivan J : Two new inhibitors of phospholipase A₂ produced by *Penicillium chermesinum*. Taxonomy, fermentation, isolation, structure determination and biological properties. *J. Antibiot.*, 38, 706—712 (1985).
33. Kobayashi A, Yata S, Hino T, and Kawazu K : A new fungal naphthoquinone which stimulates the production of antifungal compounds in alfalfa callus. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2857—2860 (1987).
34. Ogihara J, Kato J, Oishi K, and Fujimoto, Y: PP-R, 7-(2-Hydroxyethyl)-monascorubramine, a red Pigment Prouced in the Mycelia of *Penicillium* sp. *AZ. J. Biosci. Bioen.*, 91, 44—47 (2001).
35. Ogihara J, Oishi K: Effect of ammonium nitrate on the production of PP-V and monascorubrin homologues by *Penicillium* sp. *AZ. J. Biosci. Bioeng.*, 93, 54—59 (2002).
36. Ogihara J, Kato, J, Oishi, K, Fujimoto Y, and Eguchi T : Production and structural analysis of PP-V, a homologue of monascorubramine, produced by anew isolate of *Penicillium* sp. *J. Biosci. Bioeng.*, 90, 549—554 (2000).
37. Dufossé L, Fouillaud M, Caro Y, Mapari SA, and Sutthiwong N: Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 26, 56—61 (2014).
38. Ogihara J, Kato J, Oishi K, and Fujimoto, Y: Biosynthesis of PP-V, a monascorubramine homologue, by *Penicillium* sp. *AZ. J. Biosci. Bioen.*, 90, 678—680 (2000).
39. Shen.B: Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7, 285—295 (2003).
40. Hashino M, Kozone I, Kawaide H, Abe H, and Natsume M: Nitrogen incorporation in

- the biosynthetic pathway of the nitrogen-containing polyketide, Pamamycin in *Streptomyces alboniger*. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 58, 722—730 (2005).
41. Winkler R and Hertweck C: Biosynthesis of nitro compounds. *ChemBioChem*, minireview, 8, 973—977 (2007).
 42. Gressler M, Zaehle C, Scherlach K, Hertweck C, and Brock M: Multifactorial induction of Orphan PKS-NRPS gene cluster in *Aspergillus terreus*. *Chem. Biol.*, 18, 198—209 (2011).
 43. Shinohara Y, Kudo F, and Eguchi T: A natural protecting group strategy to carry an amino acid starter unit in the biosynthesis of macrolactam polyketide antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 18134—18137 (2011).
 44. Junghanns KT, Kneusel RE, Gröger D, and Matern U: Differential regulation and distribution of acridone synthase in *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, 49, 403—411 (1998).
 45. Wanibuchi K, Zhang P, Abe T, Morita H, Kohno T, Chen G, Noguchi H, and Abe I: An acridone-producing novel multifunctional type III polyketide synthase from *Huperzia serrata*. *FEBS J.*, 274, 1073—1082 (2007).
 46. Park SR, Han AR, Ban YH, Yoo YJ, Kim EJ, and Yoon YJ: Genetic engineering of macrolide biosynthesis: past advances, current state, and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85, 1227—1239 (2010).
 47. Manzoni M, and Rollini M: Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 555—564 (2002).
 48. Tam EW, Tsang CC, Lau SK, and Woo PC: Polyketides, toxins and pigments in *Penicillium marneffei*. *Toxins (Basel)*, 7, 4421—4436 (2015).
 49. Arai T, Umemura S, Ota T, Ogihara J, Kato J, Kasumi T: Effects of inorganic nitrogen

- sources on the production of PP-V [(10Z)-12-carboxyl-monascorubramine] and the Expression of the nitrate assimilation gene cluster by *Penicillium* sp. *AZ. Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, 120—124 (2012).
50. Arai T, Koganei K, Umemura S, Kojima R, Kato J, Kasumi T, and Ogihara J: Importance of the ammonia assimilation by *Penicillium purpurogenum* in amino derivative *Monascus* pigment, PP-V, production. *AMB Express*, doi: 10.1186/2191-0855-3-19 (2013).
51. Schmidt-Heydt M, Stoll D, Schütz P, and Geisen R: Oxidative stress induces the biosynthesis of citrinin by *Penicillium verrucosum* at the expense of ochratoxin. *Int. J. Food Microbiol.*, 192, 1—6 (2015).
52. Schmidt-Heydt M, Graf E, Stoll D, and Geisen R: The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. *Food Microbiol.*, 29, 233—241 (2012).
53. William V, and McDermott Jr: Metabolism and Toxicity of Ammonia. *N. Engl. J. Med.*, 257, 1076—1081 (1957).
54. Britto DT, and Kronzucker HJ: NH_4^+ toxicity in higher plants: A critical review. *J. Plant. Physiol.*, 159, 567—584 (2002).
55. Hess DC, Lu W, Rabinowitz JD, and Botstein D: Ammonium toxicity and potassium limitation in yeast. *PLoS Biol.*, doi: 10.1371/journal.pbio.0040351 (2006).
56. Marini AM, Vissers S, Urrestarazu A, and Andre B: Cloning and expression of the *MEP1* gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO*, 13, 3456—3463 (1994).
57. Marini AM, Soussi-Boudekou S, Vissers S, and Andre B: A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 4282—4293 (1997).

58. Mitsuzawa H: Ammonium transporter genes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: role in ammonium uptake and a morphological transition. *Genes Cells*, 11, 1183—1195 (2006).
59. Teichert S, Rutherford JC, Wottawa M, Heitman J, and Tudzynski B; Impact of Ammonium Permeases MepA, MepB, and MepC on Nitrogen-Regulated Secondary Metabolism in *Fusarium Fujikuroi*. *Eukaryot. Cell*, 7, 187—201 (2008).
60. Monahan BJ, Fraser JA, Hynes MJ, and Daves MA; Isolation and characterization of two ammonium permease genes, meaA, and mepA, from *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell*, 1, 85—94 (2002).
61. Monahan BJ, Askin MC, Hynes MJ, and Davis MA: Differential expression of *Aspergillus nidulans* ammonium permease genes is regulated by GATA transcription factor AreA. *Eukaryot. Cell*, 5, 226—237 (2006).
62. Maundrell K: Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene*, 123, 127—130 (1993).
63. Soupene E, Ramirez RM, and Kustu S: Evidence that fungal MEP proteins mediate diffusion of the uncharged species NH₃ across the cytoplasmic membrane. *Mol. Cell Biol.*, 21, 5733—5741 (2001).
64. Marini AM, Springael JY, Frommer WB, André B: Cross-talk between ammonium transporters in yeast and interference by the soybean SAT1 protein. *Mol. Microbiol.*, 35, 378—385 (2000).
65. Belancic A, Scarpa J, Peirano A, Díaz R, Steiner J, and Eyzaguirre J: *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes. *J. Biotechnol.*, 41, 71—79 (1995).

66. Hidalgo M, Steiner J, and Eyzaguirre J: Beta-glucosidase from *Penicillium purpurogenum*: purification and properties, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 15, 185—191 (1992).
67. Stahl U, Leitner E, and Esser K: Transformation of *Penicillium chrysogenum* by a vector containing a mitochondrial origin of replication. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 237—241 (1987).
68. Buron-Moles G, López-Pérez M, González-Candelas L, Viñas I, Teixidó N, Usall J, and Torres R: Use of GFP-tagged strains of *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum* to study host-pathogen interactions in oranges and apples. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 162—170 (2012).
69. Schmidt-Heydt M, Schunck T, and Geisen R: Expression of a *gfp* gene in *Penicillium nordicum* under control of the promoter of the ochratoxin A polyketide synthase gene. *Int. J. Food Microbiol.*, 133, 161—166 (2009).
70. Hort W, Doelle J, Stefan R, and Marin B: BIOTECHNOLOGY Methods in Gene Engineering. Volume III, *EOLSS Publications*, 37—40 (2009).
71. Ganzlin M, and Rinas U: In-depth analysis of the *Aspergillus niger* glucoamylase (*glaA*) promoter performance using high-throughput screening and controlled bioreactor cultivation techniques. *J. Biotechnol.*, 135, 266—271 (2008).
72. Waring RB, May GS, and Morris NR: Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-coding genes. *Gene*, 79, 119—130 (1989).
73. Kanemori Y, Gomi K, Kitamoto K, Kumagai C, and Tamura G: Insertion analysis of putative functional elements in the promoter region of the *Aspergillus oryzae* Taka-amylase A gene (*amyB*) using a heterologous *Aspergillus nidulans amdS-lacZ* fusion gene system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 180—183 (1999).

74. Shoji JY, Maruyama J, Arioka M, Kitamoto K: Development of *Aspergillus oryzae thiA* promoter as a tool for molecular biological studies. *FEMS Microbiol Lett.*, 244, 41—46 (2005).
75. Limón MC, Pintor-Toro JA, and Benítez T: Increased Antifungal Activity of *Trichoderma harzianum* Transformants That Overexpress a 33-kDa Chitinase. *Phytopathology.*, 89, 254—261 (1999).
76. Hunter GD, Bailey CR, and Arst HN Jr: Expression of a bacterial aspartase gene in *Aspergillus nidulans*: an efficient system for selecting multicopy transformants. *Curr. Genet.*, 22, 377—383 (1992).
77. Hamer JE, and Timberlake WE: Functional organization of the *Aspergillus nidulans trpC* promoter. *Mol. Cell Biol.*, 7, 2352—2359 (1987).
78. Nakayashiki H, Hanada S, Nguyen BQ, Kadotani N, Tosa Y, and Mayama S : RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. *Fungal Genet. Biol.*, 42, 275—283 (2005).
79. Nguyen QB, Kadotani N, Kasahara S, Tosa Y, Mayama S, and Nakayashiki H: Systematic functional analysis of calcium-signalling proteins in the genome of the rice-blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a high-throughput RNA-silencing system. *Mol. Microbiol.*, 68, 1348—1365 (2008).
80. Shima Y, Ito Y, Kaneko S, Hatabayashi H, Watanabe Y, Adachi Y, and Yabe K: Identification of three mutant loci conferring carboxin-resistance and development of a novel transformation system in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, 46, 67—76 (2009).
81. Yörük E1, and Albayrak G2: Geneticin (G418) resistance and electroporation-mediated transformation of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum*. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 4, 29, 268—273 (2015).

82. Shimizu T, Kinoshita H, and Nihira T: Identification and *in vivo* functional analysis by gene disruption of *ctnA*, an activator gene involved in citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus* *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 5097—5103 (2007).
83. Kiuchi N, Naruse A, Yamamoto H, and Sekiguchi J: Transformation of *Penicillium urticae* with plasmids containing the hygromycin B resistance gene. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 3053—3057 (1991).
84. Zadra I, Abt B, Parson W, and Haas H: *xylP* promoter-based expression system and its use for antisense downregulation of the *Penicillium chrysogenum* nitrogen regulator NRE. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4810—4816 (2000).
85. Yelton, MM., Hamer, JE., and Timberlake, WE: Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 81, 1470—1474 (1984)
86. Lopes, FJ., de Araújo, EF., and de Queiroz, MV: Easy detection of green fluorescent protein multicopy transformants in *Penicillium griseoroseum*. *Genet. Mol. Res.*, 3, 449—455 (2004).

謝辞

はじめに、本研究の遂行及び学位論文の作製にあたり、終始並々ならぬお力添え、ご指導を賜りました、日本大学生物資源科学部 生命化学科 発酵化学研究室 春見 隆文教授に深く感謝致します。

本研究テーマを与えて下さり、研究に対する考え方についてご指導くださった発酵化学研究室 荻原 淳准教授には厚く御礼申し上げます。また、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた 渡邊 泰祐専任講師には厚く御礼申し上げます。

本学位論文の作製にあたり適切な助言をいただき、学位審査に尽力下さいました、日本大学生物資源科学部 西尾 俊幸教授に謹んで御礼申し上げます。同大学 光澤 浩教授には、本学位論文の作製への適切な助言のみならず、本論 第2章につきまして、アンモニウムトランスポーターの実験に関するご指導ならびに、菌株（分裂酵母 野生株、*amt123* Δ株）・分裂酵母用発現ベクターの分与、プライマーの設計をして頂きましたこと感謝申し上げます。また、同じく本論 第2章 *S. pombe* の *amt1* および、*amt2* 発現ベクターの作製における全ての操作は平成 27 年度 発酵化学研究室卒業生である大西 侑希さんが行ってくれました。心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、試料の定量解析にご協力して下さいました、松藤 寛准教授、ならびに、*A. oryzae* の形質転換法を享受して下さいました、食品総合研究所 伊藤 康博様、矢部 希見子様、pSilent1 および、pSilent-Dual1 を譲渡して下さった神戸大学 中屋敷 均教授には厚く御礼申し上げます。

私の研究生生活を実りのあるものとしてくださった、日本大学生物資源科学部および日本大学大学院生物資源研究科の先生方に厚く御礼申し上げます。さらに、同大学院ならびに大学 酵素化学研究室・発酵化学研究室の大学院生、学部生の皆様に心より感謝します。最後に、長い間経済的にも精神的にも惜しむことなく援助してくれた両親に深く感謝いたします。

小嶋 涼