

学 位 論 文 要 旨

氏 名

シッチヨーク ケッタケオ

題 目

紅麴菌 *Monascus purpureus* KUPM5 株の二次代謝物質シトリニン
及びモノコリン K 生産能の改変による育種

紅麴菌 *Monascus purpureus* は、穀類に菌を生育させた紅麴や、その他の発酵食品やサプリメントの製造に使用されている。 *M. purpureus* は、黄色、オレンジ、および赤色の色素、モノコリン K (MK)、およびシトリニンを含むさまざまな二次代謝物質を生成する。赤色色素は、食品着色原料として使用されている。 MK は 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルル補酵素 A レダクターゼの強力な阻害剤であり、血中のコレステロール値を下げる薬剤として機能利用される。一方、シトリニンは有害な化合物であるマイコトキシンである。本研究では、タイで分離された *M. purpureus* KUPM5 株における二次代謝物質 MK とシトリニンの生産能力を改変することを目的とした。KUPM5 株は、紫外線 (UV) 照射とアルキル化剤 NTG 処理を使用して突然変異を誘発し、シトリニン生産レベルが親株よりも低い変異株を取得した。最終的に UV 照射処理とその後のスクリーニングにより得られた 2 つの変異株 KS301U と KS302U が選抜された。両変異株は親株 KUPM5 と比較して、紅麴中で野生株よりもシトリニンの生産量が 80%低下しており、食品産業に有利な特性である赤色色素を生成する能力を保持していた。ついで、親株 KUPM5 株の MK 生産能を改善するために、シンクロトロン光照射によって、同菌株を変異誘発した。KUPM5 株よりも高い MK 生産を示す 3 つの変異株 SC01、SC02、および SC03 が、936 コロニーからスクリーニング後に分離された。特に、変異株 SC02 は KUPM5 より 3 倍高い MK を生産し、KUPM5 株と同等の赤色色素、菌糸体含有量、および α -アミラーゼ活性を含む生産能力を維持していた。 *M. purpureus* KUPM5 株とその変異株 SC の比較ゲノム解析により、KUPM5 株にはシンクロトロン光照射により、SNV(single nucleotide variants)、MNV (multiple nucleotides variants)、およびインデル変異を含む全遺伝子の約 90%に変異が導入されたことが明らかになった。全ゲノムにおける SNV 置換の頻度は、すべての突然変異の 68.96% を占め、そのうち 92.38% が塩基のトランスバージョン変異であり、7.62% がトランジション変異であった。したがって、本研究ではシンクロトロン光照射が糸状菌 *M. purpureus* の菌株改良に非常に有効であることを明らかにして、この変異原による糸状菌の突然変異の特性に関する情報を、初めて提供することができた。また、 *M. purpureus* KUPM5 株のゲノム解析により、KUPM5 株の総ゲノムサイズが 24.47 Mb、GC 含量が 48.92%、遺伝子数が 9,270 であると推定された。MK、赤色色素、シトリニンの生合成に関与する遺伝子クラスターの存在が確認できた。なかでも、 *M. pilosus* BCRC38072 株の MK 生合成に関与する *mok* 遺伝子群は 1 つの染色体上でクラスターとして存在するが、KUPM5 株の *mok* オーソログ遺伝子は、3 つの別々のスキュファールドに存在することが見いだされ、 *mok* 遺伝子群の構造に *Monascus* 属の種レベルでの相違があることを明らかにした。ゲノム解析結果を利用して、KUPM5 株の SM の生合成のためのさまざまな二次代謝物質合成遺伝子クラスターの同定により、 *M. purpureus* から新しい SM を発見することが可能になる。MK 高生産株 SC02 において、CRISPR/Cas9 を使用したゲノム編集によりシトリニン低生産株の開発を試みた。CRISPR/Cas9 システムはシトリニン生合成遺伝子クラスターの主要遺伝子である *citS* を特異的に不活性化するように設計した。1 塩基欠失した変異体 CR2 のみがシトリニン生産の 48%を維持し、アザフィロン色素及び MK は親株 KUPM5 と同等であった。本研究において、CRISPR/Cas9 は *M. purpureus* の遺伝子破壊ツールとして利用できることを実証した。