

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	Sittichoke Ketkaeo
審査委員	主査 佐賀大学 教授 後藤 正利
	副査 佐賀大学 准教授 木村 圭
	副査 鹿児島大学 准教授 二神 泰基
	副査 佐賀大学 教授 小林 元太
	副査 鹿児島大学 教授 玉置 尚徳
審査協力者	
題目	Breeding of <i>Monascus purpureus</i> strain KUPM5 exhibiting altered production ability of secondary metabolites, citrinin and monacolin K (紅麴菌 <i>Monascus purpureus</i> 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)
<p>紅麴菌 <i>Monascus purpureus</i> は、米に糸状菌を生育させた紅麴として、沖縄、東南アジア、中国での発酵食品の製造や、サプリメントとして使用されている。紅麴菌は、紅麴色素、モノコリン K (MK)、およびシトリニン (CT) を含む多様な二次代謝物質を生産する。紅麴色素は、食品着色原料として使用されている。MK は、スタチン類縁化合物であり、血中のコレステロール値を下げる薬剤として利用される。一方、CT はマイコトキシンである。本研究では、タイで分離された紅麴色素を高生産する特徴を有した <i>M. purpureus</i> KUPM5 株を親株として、本菌の二次代謝物質 MK とシトリニンの生産能力を改変育種することを目的とした。まず、KUPM5 株に紫外線 (UV) 照射あるいはアルキル化剤を使用して突然変異を誘発し、CT 生産レベルが親株よりも低下した変異株の取得を目指した。その結果、UV 照射処理により得られた 2 つの変異株 KS301U と KS302U を選抜した。両変異株は、親株 KUPM5 と比較して、紅麴中で野生株よりも CT の生産量が 80% 低下しており、実用上に有利な特性である赤色素を生成する能力を保持していた。ついで、シンクロトコン光照射による KUPM5 株の変異誘発による MK 生産能の改良を目指した。スクリーニング後に、1,000 余りのコロニー</p>	

から KUPM5 株よりも高い MK 生産性を示す 3 変異株 SC01、SC02、および SC03 を分離した。特に、変異株 SC02 株は、KUPM5 親株より 3 倍以上多く MK を生産し、KUPM5 株と同等の紅麴色素、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。続いて、*M. purpureus* KUPM5 株とその SC 変異株の比較ゲノム解析を行った。シンクロトロン光照射により、KUPM5 株には SNV (single nucleotide variants)、MNV (multiple NV)、および Insertion/Deletion 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、すべての変異の 68.96% を占め、そのうち塩基のトランスページョン変異が 92.38%、トランジション変異が 7.62% であり、清酒酵母での報告とは大きく異なっていた。本研究では、シンクロトロン光照射が糸状菌 *M. purpureus* の菌株改良に有効であることを示すとともに、この変異原による糸状菌の突然変異の特性に関する塩基レベルでの情報を提供することができた。一方、*M. purpureus* KUPM5 株のゲノム解析により、KUPM5 株の総ゲノムサイズが 24.5 Mbp、GC 含量が 48.92%、そして総遺伝子数が 9,270 であると推定された。MK、CT、紅麴色素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。これまでに報告のある *Monascus* 属菌の 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* オートログ遺伝子は、3 つの別々の遺伝子座に離れて存在することを見いだした。さらに、ゲノム解析結果を利用して、MK 高生産変異株 SC02 のゲノム編集による CT 生産能力の欠損を目指した。黄麴菌で使用されている CRISPR/Cas9 システム用ベクターを紅麴菌で機能するように改変した。ついで、CT 合成の初発反応に関与するポリケチド合成酵素 (PKS) をコードする *citS* 遺伝子の不活性化を行うようにデザインしたベクターを構築して、紅麴菌を形質転換した。得られた形質転換体のうち 1 菌株において、*citS* 遺伝子内の標的部近傍で 1 塩基欠損によるフレームシフト変異が見られ、ゲノム編集された CR2 株とした。ゲノム編集 CR2 株は、親株 SC02 の MK 高生産性を保持していたが、CT 生産性は、HPLC 分析の結果、SC02 株の 48% であった。CR2 株の CT 生産能が完全に欠損していない要因について、CT の分離検出に問題がある可能性や CR2 株が異核共有したヘテロカリオンである可能性が示唆された。

以上のように、本研究では、従来法である UV 照射、アルキル化薬剤処理、そして報告例の少ないシンクロトロン光、そしてゲノム編集を駆使して、紅麴菌の実利用株の特性を維持したまま、より安全性が高く、機能性物質 MK の生産性が向上した株の育種に成功し、糸状菌の二次代謝を標的とした育種の新知見を得たものである。従って、本論文は博士（農学）の学位論文として十分に価値あるものと判断した。