

Rhizopus 属菌の分子系統解析と 糸状菌遺伝子解析技術の開発

学位論文内容の要旨

本研究は、接合菌類 *Rhizopus oryzae* を有機酸生産能の違いから再分類することを目的として、有機酸生産の違いと ITS 塩基配列の違いの関連、*Rhizopus* 属全体における個々の種の違いと *R. oryzae* 内の違いの検証、様々な遺伝子を用いて系統解析を行い、*R. oryzae* が再分類されるか検証したものである。

まず、乳酸生成する糸状菌である *R. oryzae* を効率よくスクリーニングするために、多くの菌株から乳酸生成する株に特徴的な塩基配列の違いを ITS 領域において検証した。*R. oryzae* を 64 株収集し、rDNA の ITS 領域を解析した。その結果、乳酸生成タイプの菌株と乳酸非生成タイプの菌株において、酸生成のグループ分けと関連する 4 箇所 5 塩基の変異があった。この違いを利用して乳酸生成タイプの *R. oryzae* を見分けるための PCR 法を開発した。乳酸生成タイプ塩基配列の変異箇所をプライマーの 3' 末端に配置し、タッチダウン PCR 法を利用して特異性を高めた。この方法を利用して、実際にインドネシアの発酵食品及びそのスターター中に乳酸生成タイプの *R. oryzae* を確認し、単離することが出来た。

次に、*Rhizopus* 属の分子系統を確立する目的で rDNA の 18S 完全長、ITS 領域、28S D1/D2 領域の塩基配列を全ての種で解析した。系統樹を作成したところ、現行の形態学的分類法による 3 つのグループである、*microsporus-group*, *stolonifer-group*, *R. oryzae* に相当するクラスターを形成した。しかしながら、*R. stolonifer* var. *lyococcos* は独立したクラスターを形成した。また、*R. schipperae* も全ての系統樹で異なったクラスターを形成した。*R. sexualis* では、複数の ITS 塩基配列が確認された。別の属である *A. rouxii* は *R. oryzae* と同じクラスターを形成した。これらの結果は、rDNA 塩基配列を用いた種グループの分子生物学的な同定が可能であることを示している。また、属内の菌種について再分類が必要であることを示唆していた。

R. oryzae の有機酸生産を基にして再分類できるか検証するために、分子生物学的手法を用いて系統学的解析を行った。ITS 塩基配列、*ldhB*, *act-1*, *EF-1 α* の塩基配列を用いて系統解析を行ったところ、いずれにおいても LA (乳酸生成) グループと FMA (フマル酸・リンゴ酸生成) グループは明確に分けることが出来た。AFLP 解析を行った結果、LA グループと FMA グループは明確に分けることが出来た。しかしながら ITS 塩基配列で見出された 4 つのサブグループでは混在するクラスターが出来ることがあった。以上の

結果を GCPSR の考えに基づいてまとめると 4 つのサブグループではなく有機酸生産で分けられる LA グループと FMA グループの 2 種に再分類することが適当であると考えられた。再分類後の種名については、現在の *R. oryzae* の基準株が LA グループの CBS112.07 である。LA グループの種名を *R. oryzae* とし、FMA グループの菌について名前を付け直すことにした。その結果、FMA グループの菌で最も古く報告していたのは 1912 年に Wehmer と Hanzawa により発見された *R. delemar* であつたので、*R. delemar* を FMA グループの種名とし、CBS120.12 を基準株とすることを提案した。また、この再分類を受けて、Schipper と Stalpers のグループ分けも *stolonifer-group*, *oryzae-delemar-group*, *microsporus-group* の 3 グループにすることも併せて提案した。糸状菌の現行の分類はその多くが形態学的な特徴に主眼をおいた分類であるが、今後は分子生物学的データを用いて分類が行われていくと考えられる。その際に必要となるのが、現行の分類と分子生物学的データから考えられる分類との整合である。本研究では、形態学的な情報では区別の出来ないもの同士を、有機酸生産という生理学的データと様々な遺伝子の塩基配列情報という分子生物学的情報を関連づけて再分類することが出来た画期的な分類であるといえる。有機酸生産という生理学的データやそれに関する *ldhB* 遺伝子のみならず、ITS や *act-1*, *EF-1 α* , AFLP という多くの遺伝子情報を比較して種を分類することが出来ることを示したものである。

さらに、発酵中の真菌の菌そう解析のための DGGE 法を用いた方法を開発した。DGGE 法のために ITS 塩基配列のうち ITS1 部分を増幅するプライマーを作成した。このプライマーを用いてスターターに存在することが知られている他の接合菌類をサンプルとして条件検討を行い、それぞれのサンプルが明確に分離できる条件を決定した。また、実際に応用できるか確認するために、インドネシアの発酵食品スターターである、*ragi tapé* を使用して農産加工副産物であるポテトパルプの発酵を行い、発酵中の菌そうのモニタリングを行った。対照として米を使用した発酵試験も行った。その結果、両者はエタノールの生産量に違いがあった。これは原料中の澱粉含量が異なるためであると考えられた。今回開発した DGGE 法は、発酵サンプル中の糸状菌のモニタリングにも応用できる事が検証された。

次に、糸状菌用の遺伝子破壊のために Gateway システムを利用するベクター pDEST_R を構築した。このベクターは pGEM-T easy ベクターのマルチクローニングサイトを除去し、pCB1004 ベクターからハイグロマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子を挿入し、gateway ベクターコンバージョンカセットを導入したものである。遺伝子破壊のための DNA を作成するために、制限酵素消化した目的遺伝子のインバース PCR を利用することが特徴である。片方に 5'CACC 配列を付与したプライマーを用いて PCR を行った後、pENTR/D-TOPO ベクターに挿入した。そして LR 反応にて pDEST_R に入れ直した。その結果作成したベクターは、インバース PCR の際に使用した制限酵素のサイトを内部に持っている。作成したベクターの効果を確かめるために *Neurospora crassa* を使用して、*frost* 遺伝子の破壊を行った。その結果、遺伝子破壊に成功した。以上の結果から、*R. oryzae* に限らず糸状菌に関する研究を進める上で、重要なツールを開発できたと言える。

このように本研究は、*R. oryzae* の再分類を提唱するだけでなく、今後の糸状菌の分類において、分子生物学的データを用いた解析への移行をスムーズにするための布石として位置づけられると評価できる。また、この分類研究の過程で得られたデータを基にし

て応用面での発展性を示したこと、*R. oryzae*に限らず糸状菌全体の研究の活性化のために有用なツールの開発を行った点でも評価できるものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 野 行 蔵

副 査 教 授 鎌 形 洋 一

副 査 准教授 曾 根 輝 雄

副 査 名誉教授 富 田 房 男

(放送大学 北海道学習センター)

副 査 開発部門長 安 藤 勝 彦

(独立行政法人 製品評価技術基盤機構)

学 位 論 文 題 名

Rhizopus 属菌の分子系統解析と 糸状菌遺伝子解析技術の開発

本論文は、10章からなり、図38、表42、文献51を含む総頁数133の日本語論文である。別に参考論文6編が付されている。

本研究は、接合菌類 *Rhizopus oryzae* を有機酸生産能の違いから再分類することを目的として、有機酸生産の違いと ITS 塩基配列の違いの関連、*Rhizopus* 属全体における個々の種の違いと *R. oryzae* 内の違いの検証、様々な遺伝子を用いて系統解析を行い、*R. oryzae* が再分類されるか検証したものである。

1. まず、乳酸生成する糸状菌である *R. oryzae* を効率よくスクリーニングするために、*R. oryzae* を64株収集し、rDNA の ITS 領域を解析した。その結果、乳酸生成タイプの菌株と乳酸非生成タイプの菌株間において、4箇所5塩基の変異があった。この違いを利用して乳酸生成タイプの *R. oryzae* を見分けるための PCR 法を開発し、実際にインドネシアの発酵食品及びそのスターターから乳酸生成タイプの *R. oryzae* を単離することが出来た。

2. 次に、*Rhizopus* 属の分子系統を確立する目的で rDNA の 18S 完全長、ITS 領域、28S D1/D2 領域の塩基配列を全ての種で解析した。系統樹を作成したところ、現行の形態学的分類法による3つのグループである、*microsporus-group*、*stolonifer-group*、*R. oryzae* に相当するクラスターを形成した。これらの結果は、rDNA 塩基配列を用いた種グループの分子生物学的な同定が可能であることを示した。

3. *R. oryzae* を分子生物学的手法を用いて系統学的解析を行った。ITS 塩基配列、*ldhB*、*act-1*、*EF-1 α* 、AFLP を用いて系統解析を行ったところ、いずれにおいても LA (乳酸生成)グループと FMA (フマル酸・リンゴ酸生成)グループは明確に分けることが出来た。以上の結果から、

R. oryzae は有機酸生産の異なる LA グループと FMA グループの 2 種に再分類することが適当であると考えられた。再分類後の種名については、LA グループの種名を *R. oryzae* とし、FMA グループの菌については、*R. delemar* を種名とし、CBS120.12 を基準株とすることを提案した。また、この再分類を受けて、Schipper と Stalpers のグループ分けも *stolonifer-group*, *oryzae-delemar-group*, *microsporus-group* の 3 グループにすることも併せて提案した。

4. さらに、発酵中の真菌の菌そう解析のための DGGE 法を用いた方法を開発した。DGGE 法のために ITS 塩基配列のうち ITS1 部分を増幅するプライマーを作成した。このプライマーを用いてスターターに存在することが知られている他の接合菌類をサンプルとして条件検討を行い、それぞれのサンプルが明確に分離できる条件を決定した。また、実際に応用できるか確認するために、インドネシアの発酵食品スターターである、*ragi tapé* を使用して農産加工副産物であるポテトパルプの発酵を行い、発酵中の菌そうのモニタリングを行った。その結果、今回開発した DGGE 法は、発酵サンプル中の糸状菌のモニタリングにも応用できる事が検証された。

5. 糸状菌用の遺伝子破壊のために Gateway システムを利用するベクター pDESTR を構築した。このベクターは pGEM-T easy ベクターのマルチクローニングサイトを除去し、pCB1004 ベクターからハイグロマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子を挿入し、gateway ベクターコンバージョンカセットを導入したものである。遺伝子破壊のための DNA を作成するために、制限酵素消化した目的遺伝子のインバース PCR を利用することが特徴である。片方に 5'CACC 配列を付与したプライマーを用いて PCR を行った後、pENTR/D-TOPO ベクターに挿入した。そして LR 反応にて pDESTR に入れ直した。その結果作成したベクターは、インバース PCR の際に使用した制限酵素のサイトを内部に持っている。作成したベクターの効果を確認するために *Neurospora crassa* を使用して、*frost* 遺伝子の破壊を行った。その結果、遺伝子破壊に成功した。以上の結果から、*R. oryzae* に限らず糸状菌に関する研究を進める上で、重要なツールを開発できたと言える。

このように本研究は、*R. oryzae* の再分類を提唱するだけでなく、今後の糸状菌の分類において、分子生物学的データを用いた解析への移行をスムーズにするための布石として位置づけられると評価できる。また、この分類研究の過程で得られたデータを基にして応用面での発展性を示したこと、*R. oryzae* に限らず糸状菌全体の研究の活性化のために有用なツールの開発を行った点でも評価できるものである。

よって審査員一同は、阿部 歩が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。