

北海道大学大学院	平成 5年	東京農工大学工学部卒業
農学研究院応用生	平成 6年	北海道大学農学部
命科学部門		応用菌学講座技官
応用菌学	平成 19年	現職
技術専門職員		
博士（農学）		
阿部 歩		

Rhizopus oryzae から発見された

新規レトロトランスポゾン *Rhizot* の解析

はじめに

Rhizopus 属菌は接合菌類に属し、現在、14 種に分類されている。本属には古くからアジアの発酵食品に関与する菌として、人類に用いられてきた *R. oryzae* や *R. microsporus* などの菌種や、日和見感染菌を含んでいる。その中であって、*Rhizopus oryzae* は、アミロ法によるアルコール発酵に用いるアミロ菌として、さらには近年では生分解性プラスチックの原料である乳酸を農産廃棄物から生産する乳酸生成糸状菌として、また、酵素生産菌としても産業上重要である。一方、接合菌類として最初にそのゲノム塩基配列が決定されている。

本菌や、そのゲノム情報をさらに有効に活用するには、遺伝子工学的手法により、異種タンパク生産や、生産効率の上昇などが望まれる。しかしながら、*Rhizopus oryzae* の分子遺伝学的解析はほとんど進んでいないのが現状である。その原因は、*Rhizopus oryzae* の形質転換が難しいことにある。

我々は、*Rhizopus* 属菌の分子系統解析を行い、現在の形態や生育温度に基づく分類との相違を明らかにしてきているが、その過程で、*Rhizopus oryzae* には乳酸生成する菌と非生成菌の生理学的特徴の異なる菌が同一の種として存在していることを発見した¹⁾。さらに、この2つの菌群の間の遺伝的な差異を rDNA、乳酸脱水素酵素(*ldhB*)、アクチン(*act1*)、転写伸長因子(*tef-1*)の各遺伝子の塩基配列と、AFLP 解析により調べたところ、両者の間には別種とも言うべき遺伝的な差異が存在していることが明らかになった^{2,3)}。

この研究の過程で、我々は、新規レトロトランスポゾン様配列、*Rhizot* を発見した。*Rhizot* は全長 5039 塩基対、2つの ORF をもつ LINE 様の因子であり、他の糸状菌からは類似の因

子が見つかっていない、新規の因子であると思われた。

レトロトランスポゾン、系統進化的な指標配列として、あるいはその転移能を利用した遺伝子タギングに用いられている。そこで、本研究では、新規レトロトランスポゾン様配列 *Rhizot* をさらに詳細に解析し、*Rhizopus oryzae* の系統進化的な解析と、新たな遺伝子工学的ツールとしての応用につなげるための基礎研究を行うことを目的とした。

Rhizot の発現の解析

Rhizot が実際に発現しているかどうかを、その転写を解析することによって調べた。*Rhizopus oryzae* CBS 112.07 株を PDA プレートに接種後、27 °C で培養し、胞子を形成させた。生理食塩水を加え懸濁し、ガーゼにて菌糸を除いて胞子懸濁液を作成した。10⁶ 個の胞子を Malt Extract 培地 100 ml に添加し 27 °C で振とう培養を行った。一晚培養後、それぞれのストレス処理を行った。熱ストレスとして 42 °C で 45 分間加温し、直ちに菌体をろ過した。変異源暴露ストレスとして、MMS (Methyl Methane Sulfonate) 0.2% を添加し、1 時間培養したもの、MV (Methyl Viologen) 1mM を添加し 18 時間培養したもの、UV (200 J/m²) 照射したのち 1 時間回復培養したものを、それぞれ菌体を採取した。栄養飢餓ストレスとして窒素源を培地成分から除去した培地に菌体を移し、18 時間培養し、菌体を回収した。それぞれの菌体は凍結し、ISOGEN で RNA を抽出した。その後、残存する DNA を除去するために DNase 処理をおこない、アクチン遺伝子増幅用のプライマーで PCR を行い、DNA の混入がないことを確認した。同じプライマーを用いて RT-PCR を行い、それぞれの処理 RNA の濃度を合わせた。結果を図 1 に示した。

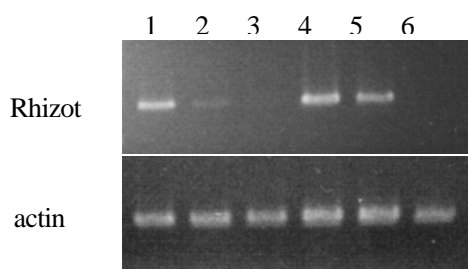


図 1 RT-PCR による遺伝子発現の確認

それぞれのストレス処理を行った菌体から抽出した RNA を用いて、遺伝子の発現の有無を確認した。Lane 1; 無処理, lane 2; 熱ストレス処理, lane 3; MMS 処理, lane 4; MV 処理, lane 5; UV 処理, lane 6; 窒素欠乏培養。

Rhizot の内部を増幅するプライマーを用いてそれぞれの処理で発現に違いがあるか調べた。その結果、図 1 のようになった。無処理の場合でも *Rhizot* の発現を確認できた。また、無処理の場合と比較して、MV 処理で発現上昇が見られた。また UV 処理で同程度の発現、

熱ストレス処理で発現の減少が見られた。MMS 処理や窒素欠乏培養では発現を確認できなかった。しかしながら、熱処理の場合、アクチン遺伝子の発現上昇が見られるという報告があるため、18S 及び 28S rRNA の量を調べてみた。アクチン遺伝子増幅の際に揃えた RNA 濃度で泳動を行った結果を図 2 に示した。この結果からわかるように、無処理に比べて熱処理や UV 処理では RNA 量が少ない事がわかった。逆に MMS 処理では RNA 量が多かった。また、窒素欠乏では 28S rRNA のバンドを確認できなかった。

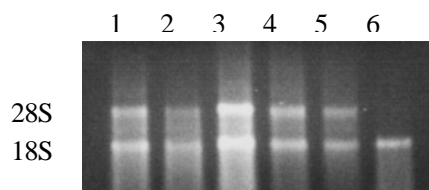


図 2 actin の発現量を一定にしたときの rRNA の量。

Lane 1; 無処理, lane 2; 熱ストレス処理, lane 3; MMS 処理, lane 4; MV 処理, lane 5; UV 処理, lane 6; 窒素欠乏培養。

このことから、熱処理ではアクチン遺伝子の発現が上昇していたために、見かけ上 Rhizot の発現が減少したと考えられる。また、窒素欠乏状態の培養では遺伝子に何らかの問題が発生したために、発現が確認できなかったと考えられる。MMS 処理でも発現が確認できなかったが、これは MMS による DNA のメチル化が起こり遺伝子発現が抑制されたものと考えられる。DNA のメチル化によって遺伝子発現が抑制される事は植物などで確認されている。以上の事から、Rhizot は MV 処理及び UV 処理によって発現上昇することがわかった。このようにレトロトランスポゾンがストレス処理によって発現上昇することは、*Magnaporthe oryzae* 等の研究で報告されている⁴⁾が、今回接合菌類である *Rhizopus oryzae* でも同様に発現上昇することが示された。

Rhizot による *Rhizopus oryzae* の分子系統の解析

Rhizot の挿入パターンから *Rhizopus oryzae* の分子系統解析を行い、これまで得られているものと比較した。

Rhizopus oryzae の再分類に使用した菌株 29 株の DNA を用いて、サザンハイブリダイゼーションを行い、バンドパターンを比較した。これらの株は ITS 塩基配列から A, B, C, D の 4 つにグループ分けされることがわかっている。各 DNA 2 μ g を制限酵素 *Bgl II* と *Pst I* で消化した後、電気泳動を行った。Hybond-N⁺ に転写し、AlkPhos Direct Labelling and Detection System を用いて検出を行った。プローブは Rhizot 遺伝子の後半部分を使用した。その結果、図 3 のようになった。

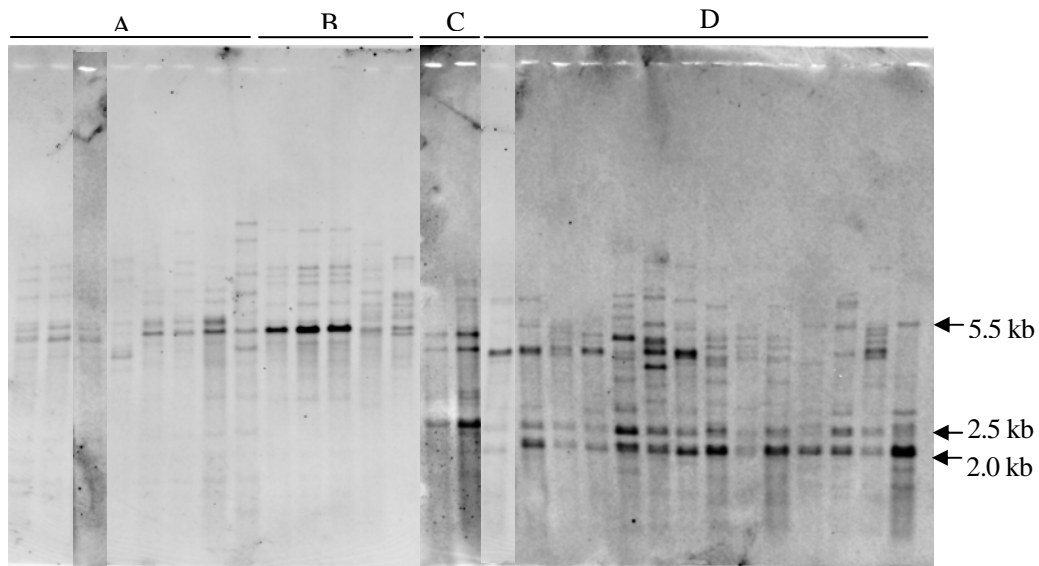


図3 Rhizot をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション

A, B, C, D はそれぞれ ITS 塩基配列をもとにグループ分けした菌株 (株番号は省略)

この結果から、乳酸生成タイプの *Rhizopus oryzae* A,B では約 5.5kb の位置にバンドが見られ、乳酸非生成タイプの *Rhizopus oryzae* C,D では 2.5kb と 2kb の所にバンドが見られた。このことから A 及び B のグループと C 及び D のグループには明確な違いがあり、我々が提案している *Rhizopus oryzae* が再分類されることの妥当性を示しているものである。

本研究を進めるにあたり、ご支援頂きましたサッポロ生物科学振興財団に厚く御礼申し上げます。

参考論文

- 1) A. Abe, T. Sone, I-N. Sujaya, K. Saito, Y. Oda, K. Asano and F. Tomita, rDNA ITS Sequence of *Rhizopus oryzae*: Its Application to Classification and Identification of Lactic Acid producers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**(8), 1725-1731, 2003
- 2) A. Abe, Y. Oda, K. Asano and T. Sone, The Molecular Phylogeny of the Genus *Rhizopus* Based on rDNA Sequences. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**(10), 2387-2393, 2006
- 3) A. Abe, Y. Oda, K. Asano and T. Sone, *Rhizopus delemar* is the Proper Name for *Rhizopus oryzae* Fumaric-Malic Acid Producers. *Mycologia*, **99**(5), 714-722, 2007
- 4) K. Ikeda, H. Nakayashiki, M. Takagi, Y. Tosa and S. Mayama, Heat shock, copper sulfate and oxidative stress activate the retrotransposon MAGGY resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Genet. Genomics*, **266**(2), 318-325, 2001