

次世代シーケンサによる 紅麴菌 *Monascus pilosus* の *de novo* 解析

鼠尾 まい子^{1,2}、塚原 正俊^{1,2,*}、照屋 盛実^{3,2}、城間 安紀乃^{4,2}、
喜久里 育也^{4,2}、佐藤 友紀^{4,2}、照屋 邦子^{4,2}、下地 真紀子^{1,2}、藤森 一浩^{5,2}、今田 有美^{1,2}、
新里 尚也^{6,2}、松井 徹^{6,2}、町田 雅之^{6,2}、平野 隆^{6,2}

(¹TTC、²沖縄先端ゲノム、³沖縄工技セ、⁴OSTC、⁵産総研、⁶琉大)

*株式会社トピカルテクノセンター 研究開発部

〒904-2234 沖縄県うるま市宇州崎 5-1 電話: 098-982-1100

Fax: 098-982-1101 E-mail: tsuka@ttc.co.jp

紅麴菌(*Monascus sp*)は、国内では沖縄県の「豆腐よう」でのみ伝統的に用いられてきた沖縄県特有の糸状菌である。一方、紅麴菌を用いて作られる紅麴は、これまでにモノコリンK(ロバスタチン)など様々な生理活性が報告され、科学的にも機能性が注目されている。本研究では、紅麴から各種生理活性物質生産に関係する遺伝子などの解析に応用可能な有用情報を得ることを目的として、異なる2機種種の次世代シーケンサのデータを組み合わせ、より精度の高い紅麴ゲノム配列の決定を試みた。

Monascus pilosus NBRC4520 株からゲノム DNA を抽出・精製し、次世代シーケンサ SOLiD を用いて多量のフラグメントデータを得るとともに、Genome Sequencer FLX System を用いたシーケンシングを行った。FLX System でのアセンブル結果から、本菌株のゲノムサイズは約 25Mb であると推定された。さらに SOLiD での解析データによるマッチング、及びペアエンド、メイトペアデータなどを応用することで、より精度の高いゲノム配列を構築できることが示唆された。

1. はじめに

沖縄は日本国内で唯一、亜熱帯気候に属する県であり特徴的な文化、歴史的背景を持つ。食文化についても日本最古の蒸留酒泡盛の製造に利用される「黒麴菌」や地域特産食品・豆腐よう(図1)製造に利用される「紅麴菌」など、古くから食品に用いられてきた地域特有な微生物が多く存在する。これらのうち紅麴菌は、その色素が注目され液体培養により、現在、赤及び黄色などの天然色素として広く一般的な食品に「モナスカス色素」「紅麴色素」などの名称で用いられている。

一方、沖縄県では蒸した米に紅麴菌を生育させた紅麴(図1)として豆腐ように用いられてきた。近年、この紅麴がコレステロール合成阻害活性を有するモノコリンK(ロバスタチン)、血圧上昇抑制や血糖値上昇抑制、抗酸化活性などを有することが科学的に解明され、健康食品素材としての注目度が高まっている。

我々は、これまでに RAPD 法による紅麴菌株の分類法の確立[1]や培養条件の違いによる有用物質生産性[2]

について検討を行った。

本研究では、有用物質生産に関連するゲノムや遺伝子発現解析に利用可能な基盤情報を得ることを目的とし、紅麴菌の全ゲノム解析を行った。特に、精度の高いゲノム配列の取得を目指し、異なる2機種種の次世代シーケンサのデータを組み合わせる条件を検証するとともに、その技術確立を試みた。



図1 紅麴と豆腐よう

2. 解析データおよび方法

Monascus pilosus NBRC4520 株からゲノム DNA を抽出・精製し、SOLiD(図2)を用いてシーケンシングを行ったところ、十分な質と量を有する一次解析データが得られた。

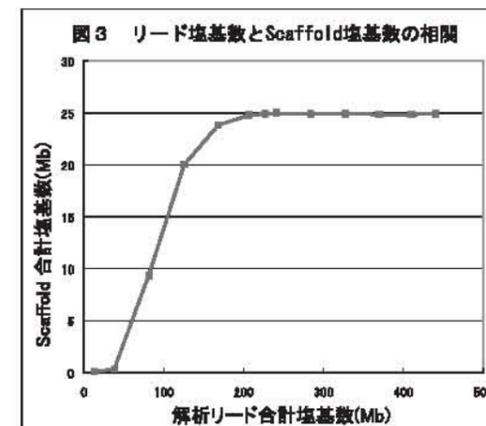
一方、Genome Sequencer FLX System(図2)を用いた解析を行った結果、総塩基数は約 441Mb のデータが得られ、リード長のヒストグラムは約 500bp ピークで、シーケンシング精度は十分に保たれていることを確認した。



図2 次世代シーケンサ

3. 結果と考察

これまで、紅麴菌のゲノム解析に関する知見は少なく、ゲノムサイズについても不明であった。今回、GS De Novo Assembler version 2.3 を用いてアセンブルを行った結果、ゲノムサイズは約 25Mb であることが明らかとなった(図3)。



Genome Sequencer FLX System は、今回のような *de novo* 解析に汎用されつつある次世代シーケンサの一つである。今回 FLX により得られたデータは、冗長度約 17 と十分量であった。このデータを用いてアセンブルを行った結果、最長 Scaffold は約 1 Mb 得られたものの、500b 以上の Contig 数は約 1,100 (Contig 長合計 24Mb) であった。

これらの結果から、Genome Sequencer FLX System は、比較的長鎖配列のデータが得られる一方、アセンブル結果は十分とは言えず、ホモポリマーの問題などを考慮するとさらに精度を高める試みが必要であると考えられた。

今回、我々は SOLiD によるゲノムシーケンスを同時に行い、既に冗長度 500 以上のフラグメント及びメイトペアのタグデータを得た。

また、これまでに我々は、別途実施したコントロール試料での解析結果において、SOLiD での *de novo* アセンブルが可能であることと、メイトペアデータにより飛躍的にアセンブル結果を高精度化できることを示している。

以上の結果から、今回の *Monascus pilosus* ゲノムについても、FLX および SOLiD のデータを併用することで、高精度ゲノム配列を取得することを試みている。

4. 今後の展望

今回の結果から、紅麴菌の高精度ゲノム配列が明らかになることで、紅麴の高付加価値化が期待できる。すなわち有用物質の高生産や菌株の育種に応用できる。また、紅麴菌をはじめとする糸状菌は、多くの有用な二次代謝産物を生産することから、これらに関わる遺伝子の基盤情報を取得することで、有用遺伝子そのものの工業的応用も期待できる。さらに、我々は紅麴菌の菌株ライブラリーを保持しており、これらの精度の高い分類、選抜にも活用できると考えられる。

一方、技術的には、異なる機種種の次世代シーケンサのデータを用いて高精度なデータを得るという試みにより、特に SOLiD を用いた *de novo* 解析の有用性とその新たな形跡技術を示すことが可能である。

参考文献

- [1] Shinzato N, et al.: Appl Microbiol Biotechnol, 82, 82:1187-1193 (2009)
- [2] Tsukahara M, et al.: Appl Biochem Biotechnol, 158, 476-482 (2009)