

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 12 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658084

研究課題名(和文)フザリウム属菌を宿主としたセスキテルペンの代謝工学

研究課題名(英文)Metabolic engineering of sesquiterpenes in Fusarium species

研究代表者

木村 真(Makoto, Kimura)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：20261167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Fusarium graminearum のトリコテセン遺伝子クラスター内のトリコジエンシンターゼ遺伝子(Tri5)の位置にアモルファジエンシンターゼ遺伝子(ADS)を導入するため、ハイグロマイシンリン酸化酵素遺伝子(hph)とチミジンキナーゼ遺伝子(tk)を融合したベクターを用いてゲノムを加工する技術確立した。またトリコテセンの生産量の増大を指標に、セスキテルペンの生産量を飛躍的に高める化合物1を見出した。これらのツールを用いてADSをF. graminearumに導入し、その発現およびアルテミシニン中間体の生産の解析が可能となった。

研究成果の概要(英文)：To replace the trichodiene synthase gene (Tri5) in the trichothecene gene cluster of Fusarium graminearum with a codon-optimized synthetic amorphadiene synthase gene (ADS), we established a genome engineering technique of the fungus using the positive and negative selection system with hph::tk, a fusion gene of the hygromycin phosphotransferase gene (hph) and thymidine kinase gene (tk). At the same time, we have identified compound 1 that markedly enhances sesquiterpene production by screening of compounds that elevate the level of trichothecene production. By employing the use of these tools, a transgenic F. graminearum strain carrying ADS was established, and the expression level of Tri5 and production level of the precursor amorphadiene are under investigation.

研究分野：農学

キーワード：代謝改変

### 1. 研究開始当初の背景

自然からは微量にしか取れず、また有機化学合成ではコスト的に見合わない希少有用生理活性物質を組換え微生物に生産させて工業化する技術の開発は、今後のバイオサイエンスに期待される重要な課題である。これまで有用イソプレノイド生理活性物質の大量生産を微生物に行わせるための土台作りは、大腸菌、アカパンカビ、酵母などのモデル微生物を宿主に大規模な遺伝子操作を施し、律速基質を大量に供給することによって行われた。しかし、一次代謝と共通の律速中間体であるファルネシルピロリン酸 (Z,Z-FPP) を供給する新たな代謝経路を過度の遺伝子改変によって構築すると細胞の代謝バランスや生育に悪影響が出る等の問題点があり、安定かつ大量に人工的な二次代謝産物を生産する系を確立するためのハードルはまだ高いと言える。一方、コムギに感染する植物病原菌であるムギ類赤かび病菌 (*Fusarium graminearum*) はトリコテセン系毒素と総称されるセスキテルペンを大量に生産することができる。この原料となる Z,Z-FPP は、様々な微生物や植物のテルペノイド二次代謝での原料となる律速基質であるが、カビの細胞膜成分エルゴステロール合成のような一次代謝経路との分岐点に位置する共通の化合物でもある。他にゲノム解析が行われた微生物の中で、本菌のように FPP を枯渇させることなく大量に二次代謝に供給できる能力を示す菌は知られていない。そこで安定な希少セスキテルペンの大量生産系の構築にチャレンジする。

### 2. 研究の目的

微生物や植物の生産する二次代謝産物は、医薬品、農薬、香料等として、人類の豊かさや繁栄に大きく貢献してきた。しかし、このような二次代謝産物は限られた培養・生育条件下でしか生産されないことが多く、バイオテクノロジーによる効率的な生産技術の確立が望まれる。そこで本応募研究課題では、植物のゲノム情報を有効に活用して多様な希少有用化合物の宝庫であるセスキテルペンの大量生産系の構築を目指す。このために、トリコテセン系毒素というセスキテルペンを大量に生産するムギ類赤かび病菌の優れた物質生産能力を分子レベルで明らかにする。一次代謝と共通の律速基質であるファルネシルピロリン酸 Z,Z-FPP を二次代謝に供給するのに必要な要因や因子を解明しながら、汎用性のある異種セスキテルペン大量生産系確立のための基盤と資することを目的とする。

### 3. 研究の方法

ムギ類赤かび病菌の毒素産生に用いる培養にはグルタミン培地、アグマチン培地、YG\_60 培地、YS\_60 培地を用いた (Gardiner *et al.* Novel genes of *Fusarium graminearum*

that negatively regulate deoxynivalenol production and virulence. *Mol Plant Microbe Interact*, **22**, 1588-1600, 2009; Nakajima *et al.* A set of heterologous promoters useful for investigating gene functions in *Fusarium graminearum*. *JSM Mycotoxins*, **64**, 147-152, 2014)。遺伝子破壊は、ダブルクロスオーバー型の相同組み換えによって行なった。赤かび病菌形質転換体の取得には、ハイグロマイシン耐性を付与するハイグロマイシンリン酸化酵素遺伝子 *hph* および 2-フルオロオリジン感受性を付与するチミジンキナーゼ遺伝子 *HSV-tk* を選択マーカー遺伝子として用いた (中嶋ら「チミジンキナーゼ遺伝子を利用したフザリウム属菌のゲノム加工技術とマイコトキシン産生制御機構研究への応用」*マイコトキシン* **63**, 85-92, 2013)。相同組換えの確認は、ベクターのゲノムへ挿入された部位をはさんだ境界の前後にアニールするプライマーを設計し、PCR によって増幅産物が得られるかどうか調べることによって判定した。ノーザンブロットおよびサザンブロット解析のプロトコルの作成には Roche Diagnostic 製の DIG (digoxigenin) ラベリングキットを用い、シグナル検出には同社製の発光キットを用いた。トリコテセンの検出は TLC で分離した後に NBP で発色させる (Takahashi-Ando *et al.* An easy method to identify 8-keto-15-hydroxytrichothecenes by thin-layer chromatography. *Mycotoxins* **58**, 115-117, 2008) もしくは ODS カラムを用いた HPLC 解析で UV<sub>220</sub> を測定することにより行なった。

### 4. 研究成果

有用セスキテルペンを発現させるために *Tri5* を他のテルペンサイクラゼ遺伝子に置換するためのベクターを GeneArt® クローニングシステムを用いて構築を試みた。一度目のハイグロマイシンによるポジティブ選択用の破壊ベクターは問題なく構築でき形質転換体が取得できた。しかし、二度目のフルオロオリジンでのネガティブ選択で合成 *ADS* 遺伝子を挟み込む *Tri5* の 5' および 3' 側の領域との境界付近の DNA に点変異や短い欠損領域が生じ、swapping vector が構築できなかった。そこで直接 *ADS* 遺伝子および *CYP* 遺伝子を高発現プロモーターにつないで赤かび病菌に導入したが、代謝産物は検出できてない。現在、コドン最適化による発現の上昇を検討中であるが、同時にセスキテルペン生産量を増加させるためにはどのような処理、改変が効果的かについて検討したので、本報告書ではその結果について報告する。セスキテルペンとして赤かび病菌がもともと生産するトリコテセンの量を指標に、下記の (A) ~ (C) の点について検討した。(A) クラスタコア領域の遺伝子間距離の改変

トリコテセン遺伝子クラスターのコア領域には、トリコテセン基本骨格の形成に必要な全ての遺伝子が含まれている。すなわち生合成の初発のステップで FPP の環化反応を触媒するトリコジエンシターゼ遺伝子 *Tri5* を中心に、下流には機能未知の調節因子遺伝子 *Tri10*、上流には転写因子をコードする *Tri6* と異なる 4 つの位置に酸素を導入するシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (CYP) 遺伝子 *Tri4* が逆向きに存在し、これら 4 つの遺伝子だけでトリコテセン isotrichodermol を組み立てることができる。*Tri4-Tri6* 双方向プロモーターをクラスター外の位置に配してもプロモーターとしてほとんど機能しなかったこと (Tokai *et al.*; 主な発表論文) から、このコア領域の遺伝子発現にはクラスター構造が重要な役割を果たしていることが予想された。そこで次に、遺伝子間距離を伸ばすことによってクラスター構造を変えた場合、遺伝子発現制御が影響を受けるかどうかを調べた。

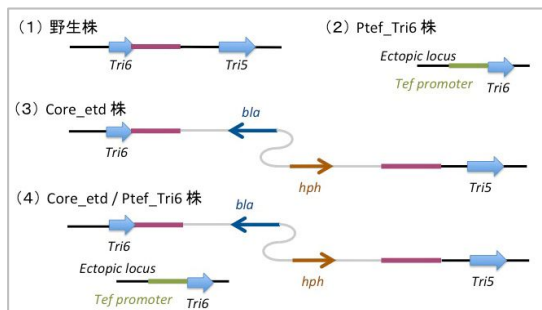


図 1 : *Tri6* 構成的大量発現株、遺伝子クラスターコア領域へのベクター挿入による伸長株、およびそれぞれの形質を組み合わせた株の構築

図 1 に示すように構成的で強力な TEF promoter から *Tri6* を発現させた (2) 株 (Ptef\_Tri6 株) に加え、*Tri6* の下流に一回相同組換えによってハイグロマイシン耐性ベクターを挿入しコア領域を伸長した (3) 株を作成した (Core\_etd 株)。また、さらに (2) 株のコア領域を伸長させた株 (Core\_etd/ Ptef\_Tri6 株) を作成し、24 穴プレートに入れた培地で培養し、(1) 野生株 (WT) と毒素産生性について比較した。その結果、Core\_etd 株は Ptef\_Tri6 株と同様、毒素誘導力の強いスクロースを糖源とする YS\_60 培地では WT より毒素生産量が若干増えた程度であったが、グルコースを糖源とする YG\_60 培地では、6 日間の培養で WT がほとんど毒素を生産しなかったにも拘らず毒素量が劇的に増加した (図 2)。この結果は、24 穴プレート培養においてコア領域を伸長させると、スクロースによる誘導力と同様の転写活性化につながることを意味する。以上の結果から、異種セスキテルペンを発現させる際、コア領域の伸長はある程度の生産量増大効果につながるものと期待される。

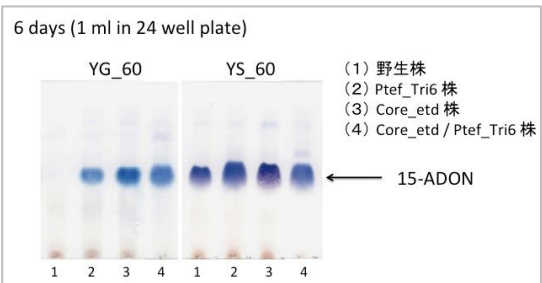


図 2 : 異なる炭素源 (YG\_60 はグルコース、YS\_60 はスクロース) で培養した各菌株によるトリコテセン生産。TLC 解析によって 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON) 生産量を調べた。

(B) アレイ解析の結果、TRI6 によって正に制御を受ける遺伝子の破壊

Gardiner ら (2009) は、トリコテセン生合成遺伝子の転写因子 TRI6 によって正の発現制御を受ける FGSG\_17598 (CYP をコード) と FGSG\_10397 (テルペンサイクラーゼをコード) を破壊すると、トリコテセン生産量が飛躍的に増加し、15,000  $\mu\text{g/ml}$  にも達することを報告している。トリコテセン生産量は培地の炭素源の変換効率で表わすと 23% に達するとされている。この報告は、異種セスキテルペンを大量発現させるのに適した宿主を構築するのに該遺伝子の破壊が有用であることを示唆し、またその分子機構にも興味を持たれた。そこで JCM 9873 株を用いてこれらの遺伝子を相同組換えによって破壊した (図 3)。

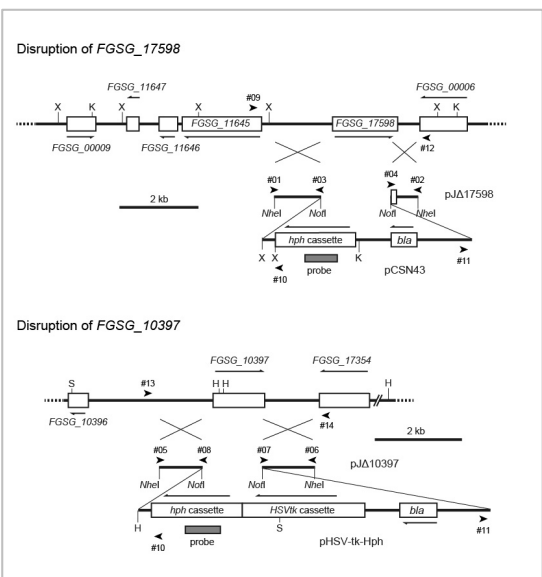


図 3 : FGSG\_17598 および FGSG\_10397 の破壊

これらの破壊株をそれぞれグルタミン培地、アグマチン培地で培養し、培地中に蓄積するトリコテセン 15-ADON の量を HPLC によって定量した。図 4 に示すように Gardiner らの報告とは異なり、野生株と二種類の遺伝

子破壊株の間には有意な差は認められなかった。また、15-ADON 生産量もアグマチンを使った場合で 160  $\mu\text{g}/\text{ml}$  程度であり、報告されている 15,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  には遠く及ばなかった。グルタミンを窒素源とする培地と比べても高々 3 倍程度である。Gardiner らの報告に誤りがあるか、あるいは Gardiner らの用いていた菌株が特殊であるかのいずれかであろう。いずれにせよ、FGSG\_17598 および FGSG\_10397 を破壊することによってセスキテルペン生産性を高めることは期待できず、実用化には適さないことが判明した。

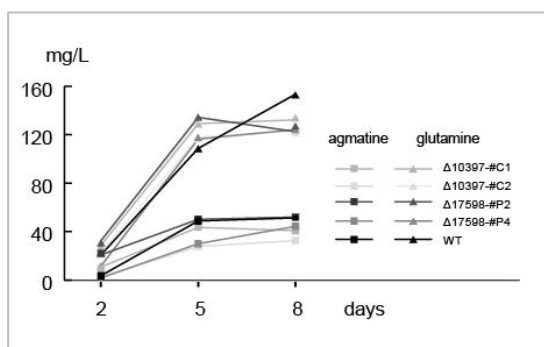


図 4 : FGSG\_17598 および FGSG\_10397 遺伝子の破壊と毒素生産量への影響。野生株 (WT)、FGSG\_17598 破壊株 2 株 (FGSG\_17598-#P2、FGSG\_17598-#P4)、FGSG\_10397 破壊株 2 株 (FGSG\_10397-#C1、FGSG\_10397-#C2) を用いて 15-ADON 蓄積量をモニターした。

(C) inducer としてのスクロースの機能の検証および新たな関連誘導物質の同定

*F. graminearum* のトリコテセン誘導には培地の炭素源がスクロースであることが報告されている (Jiao et al., Effects of different carbon sources on trichothecene production and *Tri* gene expression by *Fusarium graminearum* in liquid culture. *FEMS Microbiol Lett*, **285**, 212-219, 2008)。実際に図 2 の WT で、グルコースを糖源とする培地 YG\_60 で 15-ADON を生産しなくとも、YS\_60 では多量生産していることから示されている。しかし、スクロースが誘導物質であるならば、YS\_60 培地で炭素源として用いている 6% (w/v) 濃度ではなく、誘導物質として用いる濃度で YG\_60 培地に加えた際、誘導がかからなければならない。そこでスクロースが誘導物質として作用するのかどうかを確かめるため、分子生物学で良く用いられる試薬 IPTG と同じ濃度 100  $\mu\text{M}$  で 15-ADON を生産するようになる培養条件を探索した。24 well plate に 1 ml の培地を入れて震盪する従来の方法に加え、30 ml の培地を 100 ml 三角フラスコに入れて培養する方法、12 well plate に 1 ml の培地を入れて培養する方法を試した (いずれも 135 rpm の巡回培養)。その結果、30 ml の培地では 10 mM のスクロースを添加しても 15-ADON が誘導されないのに対し、24 well plate を用いた 1 ml の培地で

は 1 mM スクロースで、12 well plate を用いた 1 ml の培地では 100  $\mu\text{M}$  スクロースで 15-ADON が誘導されることがわかった (図 5)。以上のことから、培地の空気との接触面積と体積の比が大きい程、セスキテルペン生産の誘導能力が高くなることが判明すると同時にスクロースは炭素源としてではなく誘導物質として重要であることが明らかとなり、セスキテルペン大量生産に役立つ知見を得ることができた。

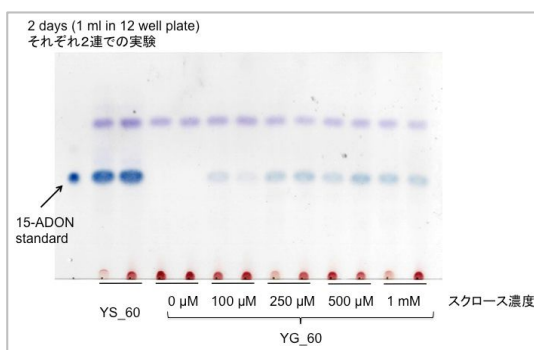


図 5 : スクロースによるセスキテルペン生産の誘導。12 well plate を用いることによって 100  $\mu\text{M}$  スクロースをグルコースを炭素源とする培地 (YG\_60) に添加することによってセスキテルペン生産が誘導されることが示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1) Tokai T, Nakajima Y, Ichikawa H, Maeda K, Nishiuchi T, Kobayashi T, Kimura M. A promoter of *Fusarium graminearum Tri4* dose not function when placed at the end of the trichothecene gene cluster. *Mycotoxins*, **63**, 17-25, 2013

<http://dx.doi.org/10.2520/myco.63.17>

2) Nakajima Y, Koseki N, Sugiura R, Tominaga N, Maeda K, Tokai T, Izawa M, Kanamaru K, Kobayashi T, Nishiuchi T, Yoshida M, Kimura M. Effect of disrupting the trichothecene efflux pump encoded by *FgTri12* in the nivalenol chemotype of *Fusarium graminearum*. *J Gen Appl Microbiol*, **61**, 93-96, 2015

3) Kitou Y, Nakajima Y, Maeda K, Jin Q, Nishiuchi T, Kanamaru K, Kobayashi T, and Kimura M. Re-examination of genetic and nutritional factors related to trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* DOI:10.1080/09168451.2015.1088374 (in press)

[学会発表](計 3 件)

- 1) 市川雛代,前田一行,中嶋祐一, 齊藤臣雄, 長田裕之, 小林哲夫, 木村真 *Fusarium graminearum* によるトリコテセン生合成制御物質の探索とその作用機構 日本マイコトキシン学会 2012年07月06日  
年07月06日 沖縄県自治会館ホール(那覇市)
- 2) 市川雛代,前田一行,中嶋祐一, 齊藤臣雄, 長田裕之, 小林哲夫, 木村真 分子生物学的手法を用いたトリコテセン産生制御物質の作用機構 日本マイコトキシン学会 2013年01月11日 東京家政大学
- 3) 鬼頭良幸、中嶋祐一、前田一行、市川雛代、小林哲夫、木村真 トリコテセン産生性フザリウム属菌の代謝工学 日本マイコトキシン学会 2013年09月13日 大阪府立大学学術交流会館

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

木村 真 (KIMURA Makoto) 名古屋大学大学院生命農学研究科・准教授  
研究者番号：20261167

### (2)研究分担者

該当なし