

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560960

研究課題名(和文) Cre-loxPシステムを用いた糸状菌二次代謝遺伝子利用技術の開発

研究課題名(英文) Application of biosynthetic genes for fungal secondary metabolites by using Cre-loxP system

研究代表者

木下 浩 (Kinoshita, Hiroshi)

大阪大学・生物学国際交流センター・助教

研究者番号：20294035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：二次代謝物質の主骨格合成酵素遺伝子を指標にLecanicilliumゲノムを探索し、麹菌に導入する生合成遺伝子クラスターを決定した。

標的クラスター末端の配列とloxPを含むベクターをクラスター外側へ導入した。形質転換体から得たゲノムDNAに対し、Creリコンビナーゼによる反応を行い、生成したフォスミドを大腸菌を用いて回収した。解析の結果、フォスミドは遺伝子クラスター全体を含んでいた。構築したフォスミドを麹菌へ導入し、クラスター導入株を培養したところ新規ピークが出現した。当該ピークを精製し、得られた化合物を解析したところ、導入した遺伝子クラスター由来であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Based on the homology, a biosynthetic gene cluster for a bioactive compound was select from the genome of Lecanicillium sp. to be introduced into Aspergillus oryzae.

Two vectors harboring a terminal region of the gene cluster and a loxP site were inserted at the outside of the target gene cluster. The target gene cluster between two loxP sites was rescued in a circular fosmid by Cre recombinase from the genomic DNA. The fosmid was introduced into A. oryzae. The resultant transformant was cultivated, and the metabolites were analyzed, displaying novel compounds which did not exist in the metabolites of the host strain. As a result of analysis on the compounds, the compounds were proven to be derived from the introduced gene cluster.

研究分野：応用微生物学

キーワード：生理活性物質 Cre-loxP 生合成遺伝子クラスター 異種生産系 糸状菌 Aspergillus oryzae

1. 研究開始当初の背景

糸状菌はその優れた物質生産能から主要な生物資源とみなされており、抗生物質、抗がん剤等の多様な物質が単離され、実用化されている。ゲノム研究の進捗により一菌株の糸状菌は最大50もの生理活性物質を作り出すことが明らかとなったが、実際に同定された生産化合物はその10分の1程度に留まっている。その理由としては次のことなどが上げられる。

(1) 糸状菌の物質生産は環境に強く依存するため、各化合物で生産至適条件が異なる。

(2) 主要化合物に生合成基質が優先的に利用されるため生産化合物が限定される。

(3) 生育が遅く、解析に時間がかかる。

申請者は糸状菌が持つ生理活性物質生合成遺伝子の活用には、異種生産系が有効と考えた。化合物の異種生産には、生合成全経路の再現が必要であるが、それには、数十 kb の領域に広がる複数の遺伝子(遺伝子クラスター)全ての発現が求められる。それに当たり、大腸菌、酵母等を宿主とするにはイントロンの除去、プロモーターの置換、化合物の基質供給能の改善等を行う必要がある。

一方、麹菌 *Aspergillus oryzae* を宿主とすれば上記作業は必要なく、さらに糸状菌の中でも生育が速い、培養における知見の蓄積がある、遺伝子工学的手法が多数開発されている等、糸状菌由来遺伝子の異種発現宿主として望ましい状況が整っている菌といえる。

これらの点から申請者は麹菌を宿主とし、コスミドを利用した生合成遺伝子の異種発現に成功している。(J.B.B. 2008, A.M.B. 2011)

しかし、目的断片を含んだクローンの選抜に時間・労力を要するため、迅速な生産系構築には至っていない。

2. 研究の目的

本研究は、一つの生理活性物質の生合成に必要な数十 kb に広がる遺伝子クラスターを Cre-loxP システムを用いて効率良く麹菌に導入する新規方法を開発し、有用化合物を得ることを目的とする。この成果により糸状菌が有する膨大な遺伝子資源を活用することができ、新規有用物質の迅速な発見だけでなく、既知有用化合物の高生産にもつながる。

3. 研究の方法

本課題では、Cre リコンビナーゼが同方向の loxP 配列を認識し、挟まれた領域を環状に切り出す性質を利用して実験系を構築する。研究方法は以下のとおりである。(1) 糸状菌での選択マーカを含む二種類のベクターを用い、標的生合成遺伝子クラスター両外側に loxP 配列を導入する。(2) Cre リコンビナーゼにより標的生合成遺伝子クラスターを含む環状フォスミドを得る。(3) 得られたクローンを *A. oryzae* に導入する。(4) 形質転換株で生産された化合物の構造、生理活性を解析する。

4. 研究成果

麹菌に導入する生合成遺伝子クラスターを決定するためにデータベースに登録されている二次代謝物質の主要骨格合成酵素遺伝

子と相同性を示す遺伝子を元に *Lecanicillium* ゲノムについて探索した。高い相同性を示した遺伝子の周辺領域の配列解析および転写解析により、生合成遺伝子クラスター候補を決定した。

形質転換系についてはマーカー遺伝子として麹菌と *Lecanicillium* 双方で機能しうる遺伝子が必要であったため、麹菌および *Lecanicillium* 由来のウラシル生合成遺伝子 (*pyrG*)、アルギニン生合成遺伝子、トリプトファン生合成遺伝子 (*trp1*) について解析を行った。その結果、*pyrG* については麹菌、*Lecanicillium* 双方について使用可能であり、破壊株の作成も可能であったことから、マーカー遺伝子として用いることにした。また、*Lecanicillium* についてはトリプトファン栄養要求株を作成できたことから *trp1* を片側への *loxP* 導入に用いることにした。次にクラスター末端部 2000bp の相同配列と *loxP* を含む組換えベクターを両端部について構築した。得られた両ベクターについて標的遺伝子クラスター外側への導入を試みた。得られた形質転換体候補株について予想通り、組換えが起こっていることを PCR、Southern blot により確認した。次に得られた形質転換体からゲノム DNA を抽出し、*in vitro* での Cre リコンビナーゼによる反応を試みた。反応生成物を大腸菌に形質転換し、得られた形質転換体からフォスミドを回収し、標的遺伝子クラスターが挿入されているかどうかを PCR により確認した。その結果遺伝子クラスター全領域を含んでいることが明らかとなったことから、本研究で開発した手法により、目的生合成遺伝子クラスターのクローニングが可能であることが示された。さらに構築したフォ

スミドを麹菌へ導入した。得られた形質転換体について遺伝子型を PCR、Southern blot により解析したところ、クラスター全長が挿入された麹菌が得られたことが明らかとなった。クラスター導入株を各種条件で培養したところ親株では見られないピークが出現していることが示された。当該ピークを精製し、得られた化合物の性質を解析したところ、導入した生合成遺伝子クラスター由来であると考えられた。

以上の結果より、本手法は糸状菌が有する未利用の遺伝子資源の有効な利用法であることが示された。

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 1 件)

(1) Curr Genet. 2014 May;60(2):99-108.
doi: 10.1007/s00294-013-0399-5.

Efficient and versatile transformation systems in entomopathogenic fungus *Lecanicillium* species.

Ishidoh K, Kinoshita H, Ihara F, Nihira T.

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 石堂 圭一, 木下 浩, 井原 史雄, 仁平 卓也

「昆虫病原性糸状菌 *Lecanicillium* sp. における自律複製型ベクターを用いた形質転換系の構築」

第 12 回糸状菌分子生物学コンファレンス
平成 24 年 11 月 12 日「ウインクあいち (愛知県・名古屋市)」

(2) Nguyen Nhu Ha Vy, Keiichi Ishido, Hiroshi Kinoshita, Takuya Nihira
Characterization of *argB* gene from *Lecanicillium* sp. HF627

第 64 回 日本生物工学会大会平成 24 年 10 月 25 日「神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nihiralab.sakura.ne.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

木下 浩（大阪大学生物工学国際交流センター）

研究者番号： 20294035

(2)研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3)連携研究者

五十嵐 康弘（富山県立大学工学部）

研究者番号： 20285159