

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850063

研究課題名(和文) 合成生物学的手法による植物ホルモンの糸状菌生産系の構築

研究課題名(英文) Construction of fungal platform for plant terpenoid production by synthetic biological approach

研究代表者

加藤 直樹 (KATO, Naoki)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：90442946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：バイオマス等の再生可能な資源を有用な化学物質に変換する微生物プラットフォームの開発を目指し、大腸菌や酵母といった汎用微生物宿主に代わりうる糸状菌宿主開発に取り組んだ。特に植物テルペノイド化合物の生産系構築に焦点を絞り、その一環として、微細藻類由来のテルペノイド化合物であるボツリオコッセンの生合成経路を組み込んだ糸状菌を作製した。コドン宿主に最適化した生合成遺伝子を導入することで、ボツリオコッセン生産の検出に成功した。前駆体供給経路の改変も進めており、両者を組み合わせることで、さらなる生産性向上が期待できる。

研究成果の概要(英文)：There is an increasing need for microbial platforms to convert from renewable resources such as biomass to valuable chemicals. To this end, we undertook the construction of an alternative platform using filamentous fungi, particularly for the plant terpenoid production. As a part of the study, we generated a fungal transformant carrying a biosynthetic pathway for botryococcene, which is a triterpenoid produced by a green alga, *Botryococcus braunii*. Introduction of the codon-optimized genes enabled us to detect the production of botryococcene in the fungal host. We also engineered precursor supply for the improved terpenoid production.

研究分野：農学、農芸化学、応用微生物学

キーワード：糸状菌 物質生産 生合成経路 テルペノイド

1. 研究開始当初の背景

遺伝子工学的手法の充実と微生物ゲノム情報の蓄積により、複雑かつ多様な構造を有する天然物の生合成機構に対する理解がこの20年で急速に深まった。得られた知見に基づいた論理的な手法により、微生物の作り出す多様な二次代謝産物へのアクセスが可能となった。主に大腸菌や酵母といった汎用微生物宿主において、内在の代謝経路を改変し、様々な外来遺伝子を組み合わせた人工の生合成経路を構築し、有用化合物を安定的かつ高生産させる「合成生物学」の手法に近年、非常に注目が集まっている。

申請者はこれまで糸状菌二次代謝産物の生合成機構の解析を行ってきた。遺伝学的および生化学的解析を行うことで、フミトレモルジン生合成経路の確立に成功した(Kato *et al.* 2011 *Chembiochem*; Kato *et al.* 2009 *Chembiochem*)。その中で、生合成遺伝子クラスターに含まれるシトクロム P450 遺伝子が、特徴的な構造形成とそれに付随する生物活性の賦与に深く関わっていることを実証している。しかしながら、膜タンパク質であるシトクロム P450 の中には酵母における発現量が低く、十分な生化学的解析のできないケースがあった。植物由来シトクロム P450 遺伝子の酵母における発現でも同様の現象が知られており、多様な天然物生合成遺伝子の発現・機能解析には、利用できる宿主のレパートリーを増やすことが不可欠であり、酵母に代わりうる真核細胞宿主としての糸状菌プラットフォーム開発という着想に至った。

プラットフォームの有用性の実証には、シトクロム P450 が生合成に関与している有用物質という観点から天然物を検索し、植物ホルモンを含む植物テルペノイド化合物を対象とすることにした。植物原料の安定供給が困難な場合があり、そこからの精製は手間と時間がかかる。よって、その製造法は(合成が容易で同等の生物活性を有する類縁体の)化学合成に頼るところが大きい。

2. 研究の目的

糸状菌は、放線菌と並んで多様な天然物の生産者として知られている。また、タンパク質や低分子化合物等の工業生産に広く利用されており、物質生産系としての潜在能力は十分にある。糸状菌代謝産物の解析を指向した糸状菌宿主としては、麹菌 *Aspergillus oryzae* の利用が進んでいる(Fujii *et al.* 2011 *Biosci Biotechnol Biochem*, Ito *et al.* 2010 *Nat Chem*)。本研究では、近縁種であるモデル糸状菌 *A. nidulans* を開発の対象に、ゲノム情報に基づく論理的、合目的な分子育種を行う。特に、テルペノイド化合物生産に特

化した糸状菌宿主の作製を目的とする。

糸状菌宿主を用いて生産するテルペノイド化合物としては、まずその生産性を容易に評価することを目的に、テルペン由来の色素であるβ-カロテンを標的とした。次いで、微細藻類由来のテルペン化合物であり、代替ディーゼルのひとつとして期待されるボツリオコッセン、さらには近年、受容体が発見され、そのアゴニスト、アンタゴニスト探索(とその農薬としての応用研究)が盛んに行われているアブシジン酸の生合成経路構築を目指した。

3. 研究の方法

β-カロテン生合成遺伝子については、植物由来ではなく、高活性が期待できる、工業的に利用されているカロテノイド生産糸状菌由来の2つの生合成酵素遺伝子 *carRA*, *carB* (Arrach *et al.* 2001 *PNAS*) を利用した。アブシジン酸も同様に、植物由来ではなく、生合成経路を構成する遺伝子数が少ない糸状菌由来の生合成遺伝子 (Siewers *et al.* 2006 *AEM*) を用いた。ボツリオコッセン生合成には、微細藻類 *Botryococcus braunii* 由来の2つのテルペン環化酵素 *ssl-1*, *ssl-3* (Niehaus *et al.* 2011 *PNAS*) を用いた(図1)。

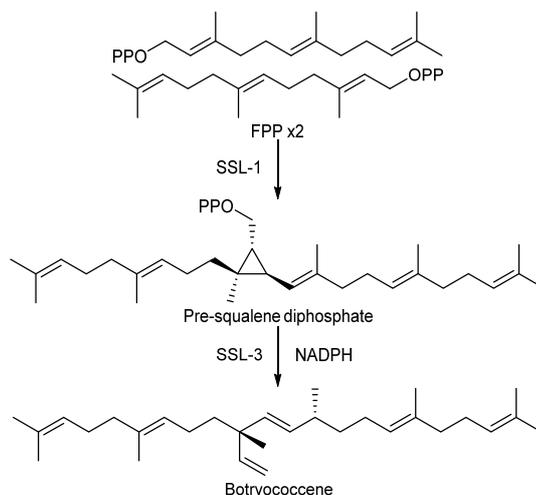


図1 ボツリオコッセン生合成経路

前駆体供給系の強化として、メバロン酸経路の強化を試みた。メバロン酸経路における律速段階は HMG-CoA レダクターゼ (HMGR) が担うステップである。N 末端側の制御ドメインの欠失させた N 末端切断型 HMGR の導入により、テルペノイド化合物生産が上昇することが報告されている (Donald *et al.* 1997 *AEM*)。そこで、セルフクロニングで N 末端切断型遺伝子 (AN3817) を導入することとした。また、高活性型の FPP 合成酵素遺伝子も併せて、

導入を検討した。

各生合成遺伝子の両端に糸状菌発現用プロモーターとターミネーターを連結した。それら DNA 断片の連結、および生合成遺伝子と制御領域を連結した発現カセット同士の連結には InFusion クローニングシステムを用いた。プロモーターには、安価なデンプンでの発現誘導が可能なアミラーゼ遺伝子 (*amyB*) プロモーターをまずは選択した。状況に応じ、他のプロモーター(誘導型 *alcA*、構成的発現型 *gpdA*、*tef1* 等)も利用できるよう、それらのプロモーターを含む発現ベクターの構築を行った。

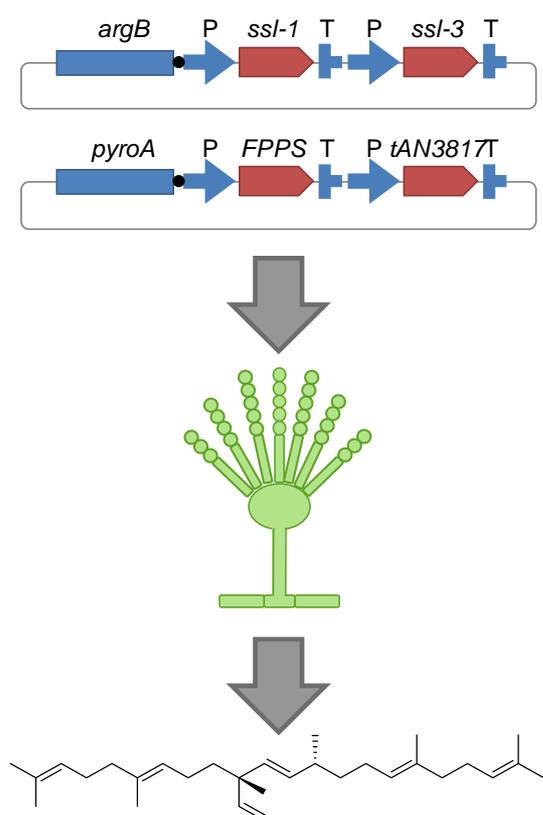


図2 糸状菌宿主によるボツリオコッセンの生産

4. 研究成果

ボツリオコッセン生産系構築では、生合成を担う2つのテルペン環化酵素 *ssl-1* と *ssl-3* を、導入する宿主糸状菌にコドン最適化した。アミラーゼ遺伝子プロモーターと連結した両遺伝子をタンデムに連結し、栄養要求性マーカー遺伝子を含むプラスミドに挿入し、形質転換用プラスミドとした(図2)。得られた生合成経路構築株を、デンプン(誘導条件)またはグルコース(非誘導条件)を単一炭素源とした最少培地で培養し、培養液をアセトン、ヘキサンで溶媒抽出した。その培養抽出液を GC/MS で分析することで、ボツリ

オコッセン生産の有無を検討した。

その結果、導入した遺伝子に依存したボツリオコッセンの生産を検出することが出来た。しかしながら、生合成遺伝子のみを導入しただけの株での生産量は、極めて低かった (<10 µg/L)。代謝改変された酵母の系で報告されている生産量 (Zhuang & Chappell 2015 *Biotechnol Bioeng*) はその1,000倍以上なので、本糸状菌宿主でも同様の改変を行うことで、生産性の飛躍的な向上が期待できる。前駆体供給系の強化を目的に、N末端切断型 HMGR および FPP 合成酵素をクローニングし、形質転換系用プラスミドを同様に構築したので、それをボツリオコッセン生合成経路構築株に導入することで、生産性向上を今後検討する予定である。

実験系の検証を目的に構築を行ったβ-カロテン生合成経路については、遺伝子を導入した形質転換株を、デンプン(誘導条件)またはグルコース(非誘導条件)を単一炭素源とした最少培地プレートで培養したが、内在の色素生産のため、その生産を検出することが出来なかった。培養条件の検討、さらには色素生産を担う生合成遺伝子の除去が今後必要である。

本課題で構築した糸状菌プラットフォームを用いることで、多様な遺伝子資源からの有用な化学物質への変換研究がさらに促進されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

加藤 直樹、徳岡 昌文、篠原 靖智、小山 泰二、長田 裕之、麴菌においてマイコトキシン生産を防ぐセーフガードとシクロピアゾン酸生合成機構、JSM Mycotoxins、査読無、64巻、2014、197-206
DOI:10.2520/myco.64.197

〔学会発表〕(計2件)

加藤 直樹、高橋 俊二、長田 裕之、遺伝子ターゲティングによる糸状菌二次代謝産物生合成経路の全容解明、日本農芸化学会2015年度大会(招待講演)、2015年3月29日、岡山大学

Naoki Kato, Hideo Okumura, Shunji Takahashi, Hiroyuki Osada, Characterization of α-ketoglutarate-dependent dioxygenase FtmF catalyzing endoperoxide bond formation in fumitremorgin pathway, Natural product discovery & development in the post genome era, 2015年1月11日、サンディエゴ

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 直樹 (KATO, Naoki)

理化学研究所 環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：90442946

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし