

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05420

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9システムを用いた糸状菌休眠二次代謝遺伝子群の活性化方法確立

研究課題名(英文) Activation of fungal silent secondary metabolite gene clusters using the CRISPR/Cas9 system.

研究代表者

尹 忠銖 (YUN, CHOONGSOO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：40432801

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)：菌類は抗生物質のような有用な化合物を始めとする、多様な二次代謝産物の生産者で、ゲノム中に膨大な数の二次代謝関連遺伝子群を保持しているがこの遺伝子群の大部分は一般的培養条件下では休眠状態であり、これら休眠遺伝子群の活性化が活発に行われてきた。本研究では強力なゲノム編集ツールであるCRISPR/Cas9システムを応用して糸状菌の休眠二次代謝遺伝子群を活性化する方法を確立を目指して研究を行い、イネいもち病菌をモデルカビとして一つの生合成酵素で作られることが知られているカビ毒、テヌアゾン酸の生合成遺伝子であるTAS1をCRISPR/dCas9システムを応用して活性化してテヌアゾン酸の生産に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昨今、世界的に抗生物質が効かない多剤耐性菌の増加や新しい感染症の拡散が問題視されているなか、新規抗生物質や治療剤のリード化合物になり得る糸状菌二次代謝産物発掘は大いに注目されている。この観点から休眠二次代謝遺伝子群の活性化及び代謝産物の獲得は社会に大きく貢献できると考えられる。本研究で提案したCRISPR/dCas9システムを応用した休眠二次代謝遺伝子群の活性化方法は新規有用代謝産物獲得に適用できる可能性を示した。まだ細部的なシステムの改良などが必要であるが今後の研究で解決できると考えている。

研究成果の概要(英文)：The recent large-scale sequencing of fungal genomes has shown that fungi are richer in secondary metabolism-related genes than once believed. However, the majority of these genes are silent under laboratory culture conditions. Silent gene clusters represent a promising resource for the development of new therapeutic agents. Unfortunately, the characterization of secondary metabolites produced by these clusters is frequently hampered owing to our inability to express these gene clusters. To overcome this bottleneck, here I conducted the research project for activation of fungal silent secondary metabolite biosynthesis gene clusters using the powerful genome editing technology, CRISPR/dCas9-transcriptional activation factor system and I succeed that activating the tenuazonic acid production in *P. oryzae* using this system.

研究分野：微生物二次代謝

キーワード：菌類 二次代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糸状菌は古くから薬品や農薬等の有用天然化合物の単離源の一つとして注目されてきたが、糸状菌由来、新規天然物の発見は年々難しくなっているのが現状であり、糸状菌が生産する天然物資源が底を突いてきたとも思われた。しかし、近年のゲノム解析技術の進歩によりゲノム解析が急速に進み、糸状菌のゲノム上には今までの予想を遥かに超える数の天然物を作る遺伝子がコードされていることが明らかになり、未利用遺伝子資源として注目を集めている。しかし、天然物を作るはずの二次代謝関連遺伝子群の大部分は一般的実験室培養条件下では休眠状態であることも明らかになっている。申請者はモデル糸状菌であるイネいもち病菌を用いて、環境応答シグナル伝達系の攪乱により休眠二次代謝関連遺伝子を人為的に活性化させ、天然化合物の獲得に成功している(Yun et al. 2015 *Nat. Commun.* 6:8758)。今まで世界の研究者らにより休眠二次代謝関連遺伝子群を活性化するため、様々な方法が試されてきたにも拘わらず大部分の糸状菌休眠二次代謝関連遺伝子群は活性化されずに休眠のままであるのが現状であり、新しい活性化方法が望まれている。

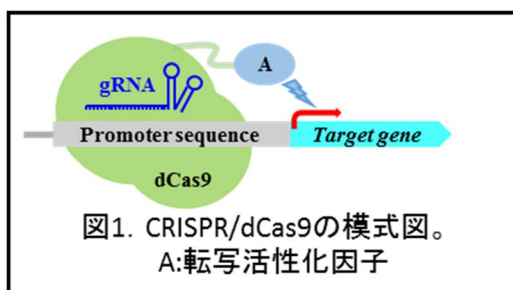
### 2. 研究の目的

本研究では糸状菌における新たな休眠二次代謝関連遺伝子群の活性化方法を模索し、新規天然化合物の単離を目的としている。今回、提案した CRISPR/dCas9 システムを用いた転写調節に関する研究は最初に哺乳類細胞で病気に関わる特定遺伝子の発現を制御するために考案され、現在は植物や微生物の遺伝子発現調節にも応用されているが二次代謝産物を獲得するため休眠二次代謝関連遺伝子群の転写活性化に応用する試みは、世界的にもまだ挑戦されていない新しい分野であり、世界的に農薬や抗生物質が効かない耐性菌の増加が問題視されているなか、新規薬剤のリード化合物になり得る糸状菌二次代謝産物発掘の観点から休眠二次代謝遺伝子群の活性化及び二次代謝産物の獲得は社会に大きく貢献できると考えられる。

### 3. 研究の方法

最近、簡便で強力なゲノム編集ツールとして CRISPR/Cas9 システムが注目されている(Jinek et al. 2012 *Science* 337:816-21)。CRISPR/Cas9 システムはゲノムの特定部位をターゲティングできる短いガイド RNA 鎖と DNA を切断する蛋白質である Cas9 により構成されるシンプルな構造であり、ガイド RNA 鎖を増やすことでゲノム上の複数の位置も編集可能である。CRISPR/Cas9 システムはゲノム編集以外にも応用研究が盛んに行われている。その応用例の一つが遺伝子の転写を調節することである。Cas9 の活性部位に点変異を導入し、DNA 切断能をなくした dead Cas9 (dCas9) とガイド RNA 鎖を組み合わせると DNA 切断が出来ない Cas9 をゲノム上の目的の位置まで運ぶことができるため、遺伝子の転写開始点をターゲティングするとターゲット遺伝子の転写を抑えることができる。また、dCas9 に転写活性化因子を付加したものをターゲット遺伝子のプロモーター領域に運べばターゲット遺伝子の転写を活性化することも可能である(Mali et al. 2013 *Nat. Biotechnol.* 31:833-38) (図 1)。

糸状菌の二次代謝産物は複数の遺伝子がクラスターを形成し、協調して一つの産物を作っている。休眠二次代謝遺伝子群を活性化して最終産物を得るためには複数の遺伝子を同時に活性化させる必要がある。この CRISPR/dCas9 システムはガイド RNA 鎖を増やすことで複数の遺伝子を



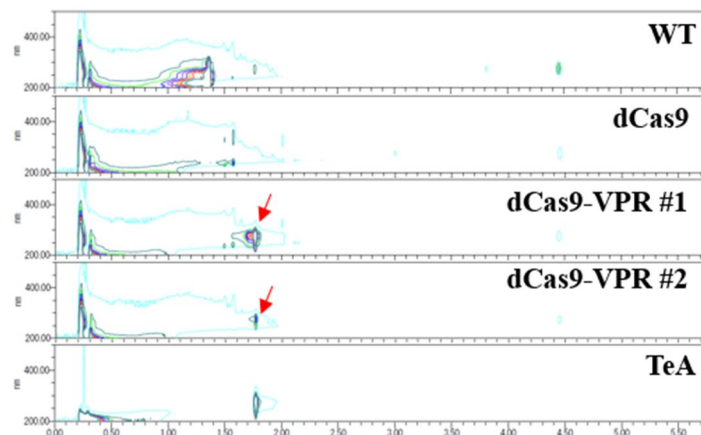
同時に活性化できることも証明されている (Cheng et al. 2013 *Cell Res.* 23:1163-71)。

以上のことから CRISPR/dCas9 システムを糸状菌の休眠二次代謝関連遺伝子群の活性化に適用することを試みた。

#### 4. 研究成果

##### 1) イネいもち用 CRISPR/dCas9 システム構築

糸状菌の二次代謝産物は複数の遺伝子がクラスターを形成し、協調して一つの産物を作っているのが一般的であるが、イネいもち病菌が生産するテヌアゾン酸 (TeA) は糸状菌では珍しくたった一つの遺伝子 (TAS1) により生合成される。また、TeA の生合成を特異的に制御する転写因子 (TAS2: MGG\_07800) も発見している。この転写因子を破壊し、テヌアゾン酸の生合成が出来なくなった株を用いて遺伝子活性化因子である VPR (VP64 (4 x virus protein 16), p65 and Rta(replication and transcription activator) fused gene) を dCas9 タンパク質に連結した fusion-gene を作製した。TAS1 上流 200 から 500bp をターゲッティングする guide-RNA を設定し dCas9-VPR をイネいもち病菌の中で発現させた結果、negative-control として私用した VPR なしの dCas9 単独発現株ではテヌアゾン酸の生産が認められなかったが dCas9-VPR を発現させた株では TAS1 によるテヌアゾン酸の生産が認められたことからイネいもち病菌でも CRISPR/dCas9 システムによる転写活性化が適用できることを確認した。



UPLC analysis of *P. oryzae* dCas9-VPR or dCas9, and *P. oryzae* with TeA standard.

##### 2) dCas9-VPR を用いた複数遺伝子同時活性化 (Nectriapyrone 生合成遺伝子群)

Nectriapyrone はイネいもち病菌が生産する二次代謝産物であり、NEC1 (MGG\_806, PKS) と NEC2 (MGG\_14657, O-methyl transferase) 二つの酵素から作られることが明らかにされている。Nectriapyrone はイネいもち病菌の一般的培養条件下では生産されないことも示されている。NEC1 のみを過剰発現させると nectriapyrone の前駆体のみが溜まることと NEC1、NEC2 両方を過剰発現させると nectriapyrone 及び前駆体を含めたその類縁体が検出できる点から nectriapyrone 生合成遺伝子群を用いて dCas9-VPR による一遺伝子及び二遺伝子同時発現系の構築をした結果、構築した変異株で dCas9 と VPR が発現されていることは qRT-PCR で確認できたが NEC1 と NEC2 遺伝子の活性化は見られなかった。その原因として NEC1 と NEC2 遺伝子の転写開始点が正確に決まっていないことから転写開始が dCas9 により阻害されている可能性と転写活性化因子をイネいもち病菌のコドンに最適化したことにより、転写活性化能力が落ちている可能性が予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 1.Choong-Soo Yun, Kazuki Nishimoto, Takayuki Motoyama, Takeshi Shimizu, Tomoya Hino, Naoshi Dohmae, Shingo Nagano, Hiroyuki Osada.	4. 巻 295
2. 論文標題 Unique features of the ketosynthase domain in a non-ribosomal peptide synthetase-polyketide synthase hybrid enzyme, tenuazonic acid synthetase 1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 11602-11612
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.013105	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 本山高幸、野川俊彦、清水猛、川谷誠、二村友史、尹忠銖、長田裕之
2. 発表標題 新しいタイプの二次代謝酵素TAS1のホモログを活用した新規生理活性天然化合物の発掘
3. 学会等名 令和元年度日本農芸学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尹忠銖、西本一希、本山高幸、日野智也、永野真吾、長田裕之
2. 発表標題 ケトシンターゼドメインによるかび毒素アゾンの環状骨格形成メカニズム
3. 学会等名 糸状菌分子生物学研究会19回コンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本山高幸、野川俊彦、石井友彬、尹忠銖、長田裕之
2. 発表標題 イネいもち病菌における二次代謝活性化
3. 学会等名 第61回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尹 忠銖、西本 一希、本山 高幸、日野 智也、永野 真吾、長田 裕之
2. 発表標題 環化反応を触媒する新規ケトシンターゼドメインのX線結晶構造解析
3. 学会等名 平成31年度日本農芸学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Choong-Soo YUN, Takeshi Kashiwa, Takayuki Motoyama, Hiroyuki Osada
2. 発表標題 Timing of tenuazonic acid production at the infection plant pathogenic fungi.
3. 学会等名 1st Japanese-German Symposium: Biosynthesis and Function of Natural Products (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Choong-Soo YUN, Takayuki Motoyama, Hiroyuki Osada
2. 発表標題 Regulatory mechanism of mycotoxin tenuazonic acid biosynthesis in <i>Pyricularia oryzae</i>
3. 学会等名 3rd European Conference on Natural Products (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西本 一希、尹 忠銖、本山 高幸、長田 裕之、日野 智也、永野 真吾
2. 発表標題 カビ毒素アゾン酸の環状骨格を形成するTAS1 KSドメインのX線結晶構造解析
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Choong-Soo Yun, Kazuki Nishimoto, Takayuki Motoyama, Tomoya Hino, Shingo Nagano, Hiroyuki Osada
2. 発表標題 Crystallization analysis of ketosynthase domain that responsible for cyclic skeleton formation of tenuazonic acid
3. 学会等名 The 9th Japan-Korea Chemical Biology Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	本山 高幸  (Motoyama Takayuki)  (70291094)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・専任研究員    (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------