

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19324

研究課題名（和文）大規模ゲノム再編成を基盤とする革新的天然物創製法の開発

研究課題名（英文）Development of innovative natural product producing methods based on large-scale genome editing system

研究代表者

浅井 禎吾（Asai, Teigo）

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：60572310

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：糸状菌のゲノム上には、未利用な休眠生合成遺伝子クラスターが膨大に存在する。本研究では、新たな新規化合物探索法の開発を目的として、制限酵素によるDNA切断に誘発される大規模ゲノム再編成技術を応用した糸状菌休眠生合成遺伝子クラスターの活性化法の開発を試みた。制限酵素を *Aspergillus niger* に発現させ、さまざまな条件を検討した結果、30度程度の環境で継代培養することで、形質変化株が得られることを見出した。また、二次代謝物生産のプロファイルの変化や、ゲノム再編成が生じていることを確認した。現状、萌芽的な結果ではあるが、ゲノム再編成が、多様な休眠遺伝子の活性化に利用できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然物は様々な医薬品開発に貢献してきた重要な医薬資源である。感染症治療薬の分野では顕著な貢献をしており、新規天然物の発見が、新規医薬品の開発を支えてきた。本研究は、糸状菌のゲノム上に存在する未知天然物の生産を誘導することを可能にする技術の開発であり、本研究に端を発する、新規休眠遺伝子活性化法が確立できれば、様々な糸状菌、さらには他の微生物に応用することで、これまでにはない天然物を含むスクリーニングソースの構築が可能になり、新しい作用を示す医薬品の探索を加速させることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Fungi have a huge number of untapped silent biosynthetic gene clusters. In this study, we attempted to develop a method to activate untapped silent biosynthetic gene clusters in fungi by applying a large-scale genome editing technique induced by DNA cleavage with restriction enzymes, with the aim of developing a new method to search for new compounds. After expressing restriction enzymes in *Aspergillus niger* and cultivated under various conditions. Finally, we found that some mutant strains that shows different morphologies could be obtained by continuing cultivation under around 30 degrees Celsius. We observed that some mutants showed the different secondary metabolite profiles from that of the parental strain. Genome analysis of those mutants suggested the presence of genome editing by restriction enzyme. Although the results are currently preliminal, they show that genome reorganization can be used to activate a wide variety of dormant genes.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物化学 糸状菌 生合成 ゲノム再編成

### 1. 研究開始当初の背景

ゲノム解読技術の飛躍的な進展は、未利用生合成遺伝子資源というポストゲノム時代の新たな天然物探索資源を我々に提示した。これらは新規天然物の宝庫として期待され、これまで様々な休眠遺伝子の覚醒法や強制発現法が試みられ、未利用生合成遺伝子資源から新しい天然物が発見されてきた。申請者も、これまでに、エピジェネティック制御を改変する休眠遺伝子覚醒法やゲノムマイニングと異種発現を基盤とする合成生物学的手法を用いて、未利用生合成遺伝子由来の新規天然物探索を展開してきた。しかし、これまでの研究では、ゲノム解読で明らかにされた未利用生合成遺伝子資源のごくわずかしかが利用できておらず、より多くの未利用遺伝子資源にコードされる天然物の生産を可能にする方法の開発が望まれている状況にあった。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究協力者の太田らが開発した、高度好熱細菌由来の制限酵素である TaqI を用いる大規模ゲノム再編成技術「TAQing システム」(Muramoto, N. et al., Nature Commun. 9:1995. doi: 10.1038/s41467-018-04256-y. (2018)) を糸状菌に応用し、さまざまな休眠遺伝子にコードされる天然物の生産を可能にする、これまでにない革新的な未利用生合成遺伝子由来新規天然物の創製法を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

TAQing システムは、高度好熱菌由来の制限酵素 TaqI (高温で活性化) を細胞に導入し、一過的に温度シフトすることで、ゲノム DNA 中で同時多発的に DNA 二本鎖を切断し、その後、組換え修復により、末端連結、相同組換え、転座、コピー数変動などの多様なゲノム再編成を生じさせる手法である。糸状菌では多くの二次代謝物生合成遺伝子クラスター (BGC) が染色体末端のテロメア近傍に存在するなど、BGC の位置がその発現に大きく関与していることから、大規模ゲノム再編成により、一種の糸状菌から多様な二次代謝プロファイルを示す株の作製が期待される (図 1)。これまで、糸状菌に対して TAQing システムが適用された例はない。そのため、まず、モデル糸状菌である *Aspergillus nidulans* および *A. niger* を用いて TaqI の発現条件と形質変化の関係性を精査し、表現型変化が効率良く生じる最適条件を設定することとした。また、TaqI 発現後に得られた形質変化株については、二次代謝プロファイルの変化の調査とゲノム再編成状況の調査を実施することとした。

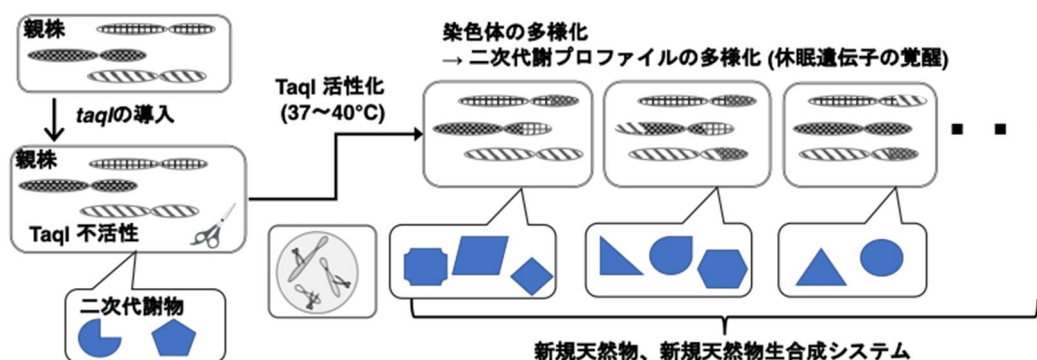


図 1. 本研究の概略および研究前の予備

#### 4. 研究成果

まず、遺伝子組み換え技術が確立されている *A. nidulans* をモデルに、TAQing システムが応用できるか検証することとした。また、親株と形態が異なる株の作製を目標に研究を進めることとした。*A. nidulans* で過剰発現可能な *amyB* プロモーターを選択し、それぞれの下流に *taqI* を導入したプラスミドベクターを作製した。作製した、ベクターを *A. nidulans* にプロトプラスト-PEG 法で導入し、*taqI* 発現株を取得した。酵母に対する TAQing システムでは、好熱細菌由来で



図 2. *A. nidulans* の形態変化

ある制限酵素 TaqI が高温で活性化することから、*taqI* 導入後、加温することで制限酵素活性を誘導し、その後、速やかに形態変化が生じることが報告されていた。そのため、糸状菌においても、プロトプラストに *taqI* 導入後、様々な加温条件を検討し、形態が変化する株の取得を試みた。しかしながら、形態変化が認められる株を得ることができなかった。一方で、*taqI* を導入した形質転換株を *A. nidulans* に適した温度条件で継代していた時に、偶発的に親株と顕著に形態が変化した部分の出現を確認した (図 2)。得られた白色部について、

D1D2 領域の配列解析から *A. nidulans* であることも確認した。また、二次代謝物の生産プロファイルの変化も確認した。

*A. nidulans* の実験と並行して、より二次代謝能が高い *A. niger* をモデルとした実験も行った。*A. niger* に対しては、*amyB* プロモーターに加え、恒常的な発現を誘導する *enoA* プロモーターも利用し、二種のプロモーターの下流に *taqI* 遺伝子を導入したベクターも作製し、それらを *A. niger* に導入した形質転換株を得た。こちらについても、*A. nidulans* 同様、様々な加温条件を検討したが、形態が顕著に変化する株は得られなかった。しかし、*A. niger* においては、形質転換株を 80 株程度取得し、それらを注意深く 30 で継代培養を続けた。その結果、半数程度の株から、形態が異なる部分が生じ、それらを分離したところ、親株とは形態が大きく異なる数十の形態変化株を得ることができた (図 3)。それらを培養し、二次代謝プロファイルが異なる複数の株を見出すことができた。形態変化株同士でも二次代謝プロファイルがことなっており、当初の目的通り、様々な休眠遺伝子を活性化できる可能性が示唆された。また、親株の前ゲノム配列を独自に決定し、それらを参照配列として、形態変化株のゲノム変化を解析した。その結果、TaqI の認識配列近傍で、大規模な遺伝子欠損が生じている株や転座が生じている株を見出すことができた。さらに、多数の一塩基変異が蓄積している株が複数見出された。

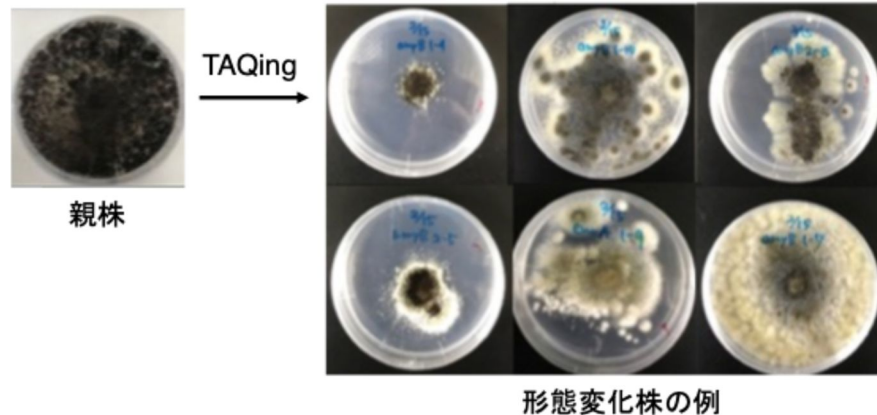


図 3. *A. niger* の形態変化株の例

本研究により、糸状菌で初めて TAQing システムを利用したゲノム再編成株を獲得することができ、また、多様な休眠遺伝子に由来する天然物の生産に利用できる可能性が示された。形質変化株の出現の再現性は見られた一方で、形態変化株を安定に保持することや、また、実験の効率面、また、汎用性に関して、大幅な改善が必要であることもわかった。このように、まだまだ萌芽研究の領域を出ていないが、本研究結果は、TAQing システムを利用した大規模ゲノム再編成を糸状菌に適応し、多様な休眠遺伝子由来天然物の生産を可能にする方法の開発の第一歩を踏み出せたと言える。今後、本研究を糸状菌や他の生物種に適応し、かつ、天然物探索に最適化することで、有用な天然物探索法の開発へと発展させていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 天井涼太, 森下陽平、河野宏光、尾崎太郎, 菅原章公, 太田邦史、浅井禎吾
2. 発表標題 ゲノム再編成による糸状菌Aspergillus nigerの二次代謝活性化法の検討
3. 学会等名 2023年度日本農芸化学会東北支部第158回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 天井涼太, 森下陽平、河野宏光、尾崎太郎, 菅原章公, 太田邦史、浅井禎吾
2. 発表標題 制限酵素により誘導されるゲノム再編成を利用した糸状菌休眠遺伝子活性化法の開発
3. 学会等名 第22回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 天井涼太, 森下陽平、河野宏光、尾崎太郎, 菅原章公, 太田邦史、浅井禎吾
2. 発表標題 大規模ゲノム再編成を利用した糸状菌休眠遺伝子活性化研究
3. 学会等名 第62回 日本薬学会 東北支部大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ゲノム再編を利用した糸状菌休眠遺伝子由来の二次代謝産物の生産	発明者 浅井禎吾、天井涼太、太田邦史、河野宏光	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-121930	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------