

セスキテルペン代謝工学に向けた基盤研究

木村 真

名古屋大学大学院 生命農学研究科

研究の目的

イソプレン単位が3つ重合してできるセスキテルペンには様々な有用化合物がある。様々なセスキテルペンの基本骨格を大量安価に有機合成することは難しいが、目的の反応を触媒するファルネシルピロリン酸 (FPP) 環化酵素を導入した微生物を用いて大量に基本骨格を供給することができれば、希少有用セスキテルペン半合成による大量供給への道が拓ける。この際、一次代謝と二次代謝の双方に用いられる原料 FPP を、菌がタイムリーに二次代謝へ供給できるかが大量生産の成功の可否につながる。本研究ではセスキテルペンであるトリコテセン (TCN) を大量に生産する能力を有する *Fusarium graminearum* の TCN 産生制御機構を転写因子 *FgTri6* の転写制御の観点から理解し、セスキテルペンの代謝工学へ向けた基盤研究を行う。

方法

以下の2つの知見を手がかりに、*Tri6* 転写制御機構を解析する。

(1) 近縁の *Fusarium sporotrichioides* の TCN 生合成では、*FsTri6* 活性化にトリコテセン産生誘導物質であるスクロース¹⁾を必要としない

Tri6 プロモーター上の未同定シス配列の存在や TRI6p タンパク機能の相違が両 *Fusarium* 種間でスクロース応答性が異なる原因となっているのかどうかを明らかにするため、*F. graminearum* の *FgTri6* 遺伝子領域の該当する DNA 断片を *F. sporotrichioides* 由来の DNA 断片に置き換えた。また、*Tri6* を構成的に大量発現させた *F. graminearum* 株も構築した。これらの株を用いて、スクロース非存在下および存在下での TCN 産生を解析した。

(2) *Tri6* プロモーター領域には TRI6p 転写因子および窒素飢餓応答の転写因子 AreAp の結合コンセンサスサイト²⁾が存在する

Tri6 プロモーターに存在する2箇所の TRI6p 結合サイト (5'-AGGCCT-3') を部位特異的変異導入によって (5'-AGGgCT-3') へ変換した株、および *Tri6* プロモーターの AreAp 結合サイト 15 箇所を全て変異させた合成 DNA へ置換した株を作出した。さらに前者の株を宿主に、*Tri6* と逆方向の共通プロモーターを有する *Tri4* を TEF プロモーター制御下に配し遺伝子クラスター外から構成的に大量発現させた株も作出した。これらの株を用いて、スクロースを炭素源とした TCN 産生誘導培地中における *Tri* 遺伝子の発現および TCN 量を解析した。

なお、TCN 生合成 (*Tri*) 遺伝子クラスターコア領域を伸張させたり³⁾、コア領域の

Tri 遺伝子プロモーターをクラスター外へ移動させたりする⁴⁾と、遺伝子発現制御が正常ではなくなる。このため、ポジティブ選択とネガティブ選択の2回の形質転換での相同組換えによってマーカー遺伝子を残さずに必要な変異導入やゲノム改変を行い、遺伝子クラスターの構造を保ったまま *FgTri6* 領域の遺伝子操作を施した⁵⁾。

結果

F. graminearum の *FgTri6* プロモーターを丸ごと *FsTri6* プロモーターに置き換えた株、*FgTri6* コード領域を丸ごと *FsTri6* コード領域に置き換えた株のいずれもスクロース非存在下では *Tri6* および初発の環化酵素遺伝子 *Tri5* の発現が見られず、TCN も蓄積しなかった (図 1 AB)。また、*Tri6* を *F. graminearum* で大量発現させてもスクロースが存在しないと *Tri* 遺伝子発現の誘導や TCN の蓄積はほとんど見られないが、100 μ M の少量のスクロースを培地に添加することによって *Tri5* 遺伝子発現の誘導や TCN の蓄積が劇的に見られるようになった (図 1 C 右)。なお、同様に野生株に 100 μ M スクロースを添加しても *Tri* 遺伝子発現や TCN 産生は誘導されない (図 1 C 左)。

Tri6 プロモーターの転写因子結合サイトを変異させた株のうち、TRI6p 結合サイトを変異させたものでは、極めて弱い *Tri6* の転写が見られたが、*Tri5* の発現や TCN 蓄積は見られなかった (図 2)。一方、この組換え株で *Tri4* を大量発現させると少量ながら TCN を生産した。このことから、スクロースが存在すれば TRI6p 非依存的に発現したごく少量の TRI6p タンパクの存在で TRI6p 結合サイトを有する他の *Tri* 遺伝子プロモーターの転写活性化、ひいては TCN 産生が起こることが示された。データには示していないが、AreAp 結合サイトを変異させた株の TCN 産生は野生株と比べてほぼ同程度の TCN を生産した。

結論

セスキテルペンを大量生産することのできる *F. graminearum* のスクロースによる TCN 産生誘導は、スクロースからのシグナルを介した TRI6p タンパクの機能化を介して起こることが明らかとなった。機能化されていない TRI6p タンパクが *F. graminearum* 細胞内にいくら豊富に存在しても他の *Tri* 遺伝子の発現を活性化させることはできず、逆にスクロースによって機能化された少量の TRI6p タンパクしか存在しなくても他の経路酵素 *Tri* 遺伝子の発現をある程度は活性化し、TCN 産生につながることを示唆された。今後、菌の生育とセスキテルペン生合成へ導くタイミングを上手く調整することで、効率的異種セスキテルペンの生産への応用が期待される。

文献

- 1) Nakajima, Y. et al. (2016) Oligosaccharides containing an α -(1 \rightarrow 2) (glucosyl/xylosyl)-fructosyl linkage as inducer molecules of trichothecene biosynthesis for *Fusarium graminearum*. *Int. J. Food Microbiol.* **238**:215-221.

- 2) Merhej, J., Richard-Forget, F., Barreau, C. (2011) Regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium*: recent advances and new insights. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**: 519-528.
- 3) Chen, L., McCormick, S.P., Hohn, T.M. (2000) Altered regulation of 15-acetyldeoxynivalenol production in *Fusarium graminearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2062-2065.
- 4) Tokai, T. et al. (2013) A promoter of *Fusarium graminearum* *Tri4* does not function when placed at the end of the trichothecene gene cluster. *Mycotoxins* **63**:17-25.
- 5) Nakajima, Y., Ichikawa, H., Maeda, K., Nishiuchi, T., Kobayashi, T., Kimura, M. (2013) Genome engineering of *Fusarium* species by using positive and negative selection approaches for studying regulation of mycotoxin production. (Review in Japanese) *Mycotoxins* **63**:85-92.

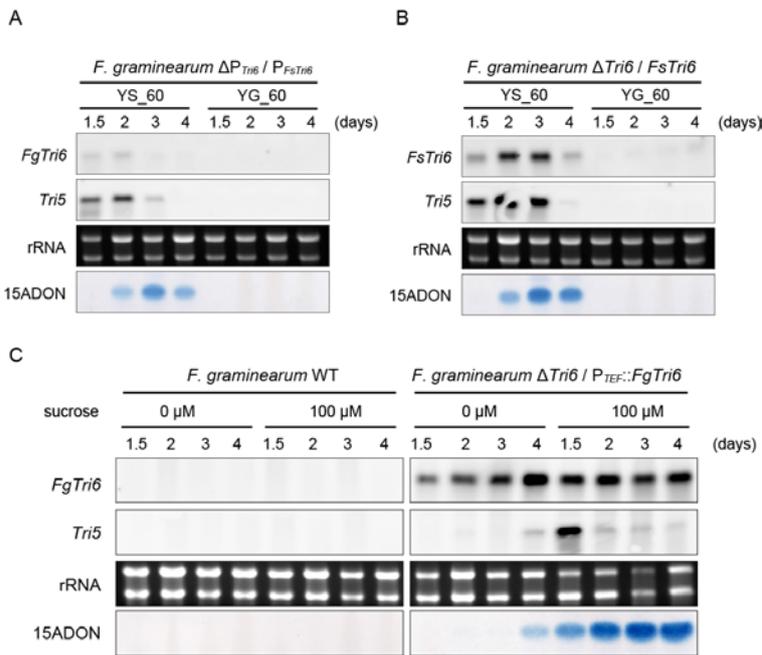


図1 スクロースに依存した *F. graminearum* の *Tri* 遺伝子発現および TCN 産生。ノーザンおよび TLC 解析の結果を示す。YS_60 および YG_60 培地はそれぞれスクロース、グルコースを炭素源とする培地である。A *FsTri6* プロモーターに置き換えた株。B *FsTri6* コード領域に置き換えた株。C *Tri6* を構成的に大量発現させた株。100 μ M スクロースの有無 (YG_60 培地) が *Tri* 遺伝子および TCN 産生に与える影響を解析した。

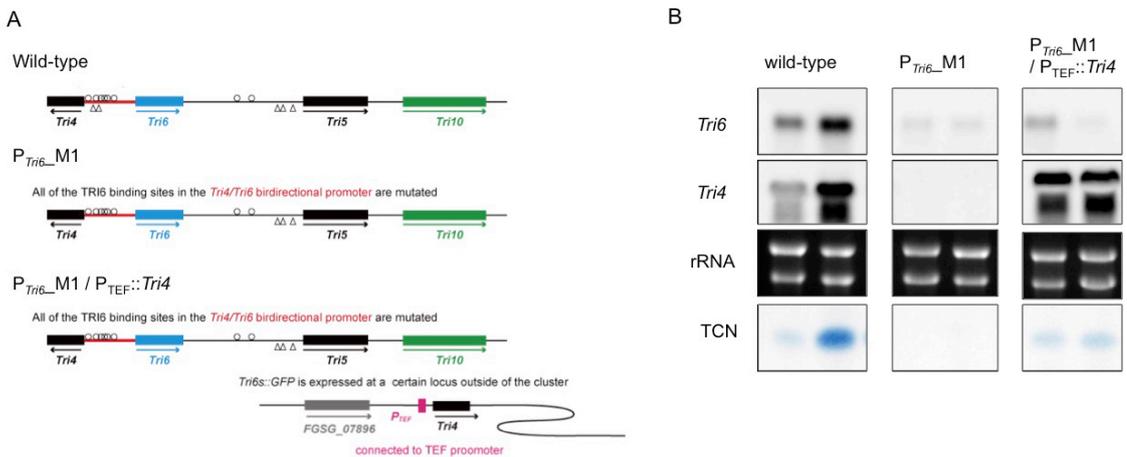


図2 *Tri6* プロモーター領域に変異を導入した株の作出と解析。△は TRI6p 結合サイト、○は AreAp 結合サイト (一部のみ表示) を示す。A 作成した株。Wild-type は野生株、 P_{Tri6_M1} は *Tri6* プロモーター上の 2 つの TRI6p 結合サイトを変異させた株、 $P_{Tri6_M1} / P_{TEF::Tri4}$ はさらに *Tri4* をクラスター外から過剰発現させた株である。B 作出した株の *Tri* 遺伝子発現および TCN 産生。ノーザンおよび TLC 解析の結果を示す。