

大規模ゲノム再編成技術を利用する糸状菌休眠型天然物の探索研究

浅井 禎吾
東北大学大学院 薬学研究科

研究の目的

糸状菌は、ペニシリンやロバスタチンをはじめ、数多くの医薬品開発に貢献してきた重要な微生物資源である。そのゲノム上には、膨大な未利用生合成遺伝子が存在し、それらの多くは通常の培養条件下では物質生産に結びつくほど十分には発現が誘導されないいわゆる休眠遺伝子であることが知られている。これら休眠遺伝子は、新薬開発のシーズとなり得る新規天然物の宝庫として期待されており、休眠遺伝子を覚醒させる方法の開発が盛んに行われてきた。これまでに我々も、エピジェネティック制御を、低分子化合物を用いて人為的に改変させることで休眠遺伝子の発現を誘導する手法を確立し、新規天然物の探索を実施してきた。一方で、これまでに開発されてきた手法では、一つか二つの休眠生合成遺伝子クラスターに由来する天然物の生産を誘導することしかできず、これら遺伝子資源を十分活用することができていない。そこで本研究では、大規模ゲノム再編成技術である **TAQing** システムを糸状菌に適用することで、一種の菌において多様な休眠遺伝子の活性化を可能にする方法の開発を目的とした。

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¹。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)。本研究では、まず、二次代謝研究におけるモデル糸状菌である *Aspergillus niger* を用いて最適プロトコルを確立することとした。まず、*taqI* を *amyB* プロモーターおよび *enoA* プロモーターの下流に導入したプラスミドベクターを作製した。遺伝子導入株の選抜にはピリチアミン耐性を用いた。作製したプラスミドベクターを *A. niger* にプロトプラスト-PEG 法により導入し、*taqI* 発現株を取得した。導入した **TaqI** は高温で高活性であるため、得られた形質転換体に対して、さまざまなヒートショック条件を検討したが、結果的には、30°C から 37°C の **TaqI** の制限酵素活性が緩やかに認められる温度域において、継代培養を繰り返すことで、形態変化した株の出現が観察され、それらを分離することで、形態変化株を取得した。取得した形質

本研究で得られた形態変化株について、それぞれ培養後、HPLCにより二次代謝物の生産プロファイル进行调查した結果、親株とは異なる二次代謝プロファイルを示す株が得られた。また、形態変化株ごとにも、代謝プロファイルが異なっていたことから、目的通り、多様な休眠遺伝子の活性化に成功したことが示された(図3)。また、形態変化株についてゲノム解読を行った結果、TaqIの認識配列の近傍での大規模遺伝子欠損や転座などが確認されたことから、TaqIによる遺伝子切断に誘発されるゲノム再編成が起きていることが示唆された。

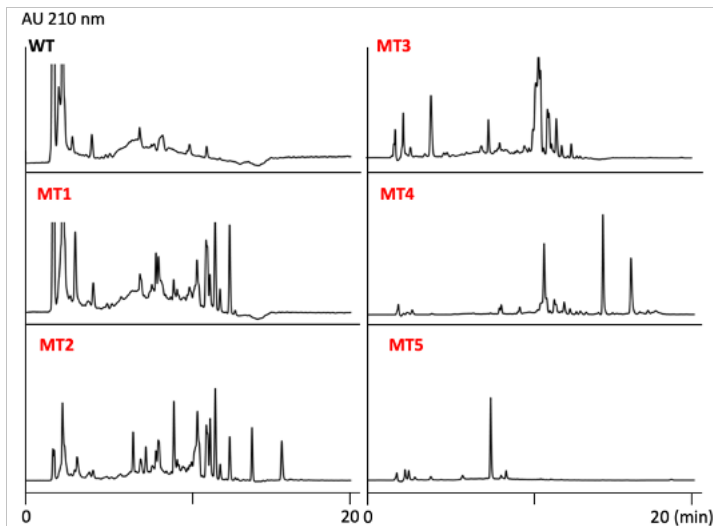


図3. 本研究で得られた形質変化株の二次代謝プロファイルの例

結論

以上、本研究では、TaqIを糸状菌で異種発現させ、30°Cから37°Cで継代培養することで多様な形態変化株を獲得することができることを示した。一方で、形質の維持の困難さやより多様な形質の発見のための選抜法の改善が課題として挙げられる。現在、これらの課題を解決し、かつ他の様々な糸状菌に展開し、実際に新規天然物の獲得に繋げていくことを目指して研究を継続している。

文献

1. Muramoto, N., Oda, A., Tanaka, H., Nakamura, T., Kugou, K., Suda, K., Kobayashi, A., Yoneda, S., Ikeuchi, A., Sugimoto, H., Kondo, S., Ohto, C., Shibata, T., Mitsukawa, N., Ohta, K. Phenotypic diversification by enhanced genome restructuring after induction of multiple DNA double strand breaks. *Nature Commun.* 9:1995. doi: 10.1038/s41467-018-04256-y. (2018).