

Trichoderma virens を用いたセスキテルペン生合成系強化とその改変を 目指した遺伝子変換系構築

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 生態化学生物学研究室 横田基

1. 目的

真菌 *Trichoderma virens* PS1-7 株は、0.5-2 mM カテコールに晒されるとカロタン型セスキテルペンジオールを誘導的に産生する。この株を用い、セスキテルペン生合成遺伝子群の改変や修飾、異種発現系導入によるセスキテルペン高生産システムの構築を目標とした。

2. 方法

1) ノラニンジン未熟種子の MeJA 誘導性セスキテルペンとその産生に関する遺伝子の検索

PS1-7 株での異種発現系構築を目指し、カロタン型セスキテルペンを生成することが知られていながらその生合成関連遺伝子が単離されていないノラニンジン (*Daucus carota*) のセスキテルペン生合成代謝関連遺伝子クラスターに着目した。ノラニンジン未熟種子がついた花序をジャスモン酸メチル (MeJA) 溶液で処理し、セスキテルペン誘導条件を検討、さらに主要な誘導生成二次代謝産物と mRNA を抽出・回収した。MeJA で誘導された化合物は NMR と質量分析、さらには化学誘導により構造決定を行い、加えて MeJA 処理した未熟種子から調製した cDNA ライブラリからのセスキテルペン生合成遺伝子のつり上げを試みた。

2) 真菌 *Trichoderma virens* PS1-7 株のセスキテルペン生合成系遺伝子改変の試み

mRNA-Seq 解析により、*T. virens* PS1-7 株の 0.5 mM カテコール曝露による遺伝子発現量の変動をカテコール処理区と非処理区とで比較し、カテコール処理区での発現量が相対的に上昇し、絶対値でも誘導発現量の大きい遺伝子を選抜した。また、*T. virens* PS1-7 株のセスキテルペンの生合成基質である farnesyl pyrophosphate (FPP) の供給を増加させるため、FPP を同じく生合成基質とし、真菌の生育に必須なエルゴステロール生合成の中間体であるスクアレン生合成遺伝子 squalene synthase gene (*SQS* gene) の破壊を試みた。それに伴い、*SQS* gene 破壊用 DNA コンストラクトを作成した。

3. 結果と考察

1) 200 μ M MeJA 処理によりノラニンジン未熟種子に誘導的に蓄積した主要なセスキテルペン誘導体は、7-位水酸基にイソバロレイル基がエステル結合したジャーマクレン型セスキテルペン 7,9-ジオール誘導体と同定した。セスキテルペン生合成遺伝子の検索では、PCR により注目すべき増幅産物が確認できたが、この遺伝子の機能は未だ明らかになっていない。

2) mRNA-Seq 解析では、カテコール処理区で ATP-binding cassette multidrug transport protein ATRC, 3-oxomonoacyl-[acylcarrier protein] reductase 遺伝子等の発現量が大きく亢進したことから、これらの開始コドンと適当な距離を持つ上流部に外来遺伝子を挿入することで、高効率な異種発現が期待できる。また、*T. virens* PS1-7 株からの *SQS* 破壊株作成実験では、1 mM エルゴステロール添加 MSM 培地でプロトプラストからの菌糸再生が妨げられることが分かり、これが Δ *SQS* 株の選抜に使えろと考えた。また、40 mer 程度のハイブリッドプライマーを用い、PCR のみで任意の塩基配列を効率よく結合させる方法を確立した。