

テルペン類高度合成系構築のための *Trichoderma virens* PS1-7 株の遺伝子改変

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 生態化学生物学 三又 一泰

1. はじめに

先行研究において北海道恵庭市の水田で栽培された水稻根圏から, 20 mM カテコールに耐性を示す糸状菌 *Trichoderma virens* PS1-7 株を分離した。*Trichoderma* は豊富な代謝産物生産菌として多数の報告がなされており, 本研究では高いテルペン産生能に注目し, 1) セスキテルペンおよび 2) トリテルペンの高度合成系構築を目指した。1) セスキテルペンは, イネ苗立枯病菌 *Burkholderia plantarii* のファイトトキシンであるトロポロンの生合成を抑制する carot-4-en-9,10-diol をターゲットとした。このセスキテルペン生合成系の増強を行うために, carot-4-en-9,10-diol 生合成鍵遺伝子 *vir4* の過剰発現を目的とした。2) トリテルペンでは, 化粧品原料などに利用されるスクアレンをターゲットとした。スクアレンの供給源は深海鮫に依存しており, 供給が不安定である。安定的な供給源を獲得するためにスクアレンを高蓄積する株の作成を目指した。CRISPR/Cas9 によりスクアレンを酸化するスクアレンエポキシダーゼ遺伝子 *erg1* を破壊することで, スクアレンの高蓄積株を得ることを目的とした。

2. 方法

1) カテコールが遺伝子スイッチになるプロモーターを用い, *vir4* 発現用, 蛍光タンパク質 *mCherry* 発現用コンストラクトを overlapping-extension PCR (OE-PCR) で調製した。これらを相同組換え法およびアグロバクテリウム法により, *T. virens* PS1-7 株へ導入した。アグロバクテリウム法によって得られた形質転換体を用いて蛍光顕微鏡観察で *mCherry* 蛍光の確認を行った。2) *erg1* 遺伝子の sgRNA 発現用として *Trichoderma* 由来のプロモーター P_{cbh1} , *erg1* sgRNA およびターミネーター T_{atrC} 配列を有したコンストラクトを OE-PCR で調製した。また, sgRNA を作成するだけで CRISPR/Cas9 に応用できるベクター構築を行った。sgRNA 発現用コンストラクトがクローニングされたベクターと空ベクターの, アグロバクテリウム法による *T. virens* PS1-7 株への導入を試みた。

3. 結果と考察

1) *vir4* 発現用および *mCherry* 発現用コンストラクト導入株を得ることができた。*mCherry* 発現用コンストラクト導入株の蛍光顕微鏡観察で, カテコールでは誘導されたが, カテコールと同様に鉄キレート能を持つトロポロンはインデューサーとして機能していないことが分かった。これは用いたプロモーターが鉄欠乏に応答するわけではなく, カテコール分子に応答するということが示唆される。2) プロモーターとターミネーターを有しており, 任意の sgRNA をクローニングするだけで *Trichoderma* において CRISPR/Cas9 システムを使用できる新規プラスミドベクターを構築することができた。また, 空ベクターの導入には成功した一方で, *erg1* の sgRNA 発現用コンストラクトをクローニングしたベクターの導入後には回復培養で *T. virens* の生育が見られなかった。これは *erg1* の破壊により宿主の生育が制限された可能性を示唆している。

4. 今後の課題

今回作成したベクターでアグロバクテリウムを介して *T. virens* PS1-7 株に遺伝子が導入できることがわかった。ただ, この形質転換系では外来遺伝子が宿主のゲノムに残ってしまう。今後は Cre/loxP などを利用して外来遺伝子を持たない形質転換体取得法の確立も可能だと考える。