

チミジンキナーゼ遺伝子を利用したフザリウム属菌のゲノム加工技術とマイコトキシン産生制御機構研究への応用

誌名	Mycotoxins
ISSN	
著者名	中嶋, 佑一 市川, 雛代 前田, 一行 西内, 巧 小林, 哲夫 木村, 真
発行元	日本マイコトキシン学会
巻/号	63巻1号
巻号補足	
掲載ページ	p. 85-92
発行年月	2013年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



チミジンキナーゼ遺伝子を利用したフザリウム属菌のゲノム加工技術とマイコトキシン産生制御機構研究への応用

中嶋佑一¹, 市川雛代¹, 前田一行¹, 西内巧², 小林哲夫¹, 木村真^{1,*}

¹名古屋大学大学院生命農学研究科 (〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町)

²金沢大学学際科学実験センター (〒920-1192 石川県金沢市宝町13-1)

要旨

遺伝子組換えには目的とする組換え体を選抜するためのマーカー遺伝子が必要である。形質転換体の選抜法には、マーカー遺伝子が保持されたものを選抜するポジティブセクションと保持しないものを選抜するネガティブセクションの2種類がある。ここではポジティブセクションとネガティブセクションを組み合わせることによって、フザリウム属菌のゲノムDNAにマーカー遺伝子を残さずに任意の点変異を導入するゲノム加工技術について紹介し、遺伝子発現レベルでのマイコトキシン産生制御機構に関する研究への応用について考察する。

キーワード：遺伝子クラスター制御；エピジェネティックス；チミジンキナーゼ；ネガティブセクション；変異導入

(2013年1月29日受付, 2013年2月7日受理)

生物のゲノムに何らかのDNA配列を人為的に導入し、遺伝子組換え体を得るためには、目的のDNA配列が導入された形質転換体のみを選別するマーカー遺伝子が必要である。1972年に大腸菌を用いた最初の遺伝子組換え実験¹⁾が行われてから現在に至るまで、対象とする生物種に応じて薬剤耐性や栄養要求性様々なマーカー遺伝子が開発、利用されており、マーカー遺伝子は遺伝子導入を行なう上で欠かせない存在となっている。このようなマーカー遺伝子が導入された株のみを選択的に生存させることによる選抜を目的としたポジティブセクション (positive selection) とは逆に、導入された株をある条件下で死滅させるような遺伝子も存在する。このような遺伝子をネガティブセクション (negative selection) マーカーという。ネガティブセクションでは、マーカー遺伝子が導入されなかった株を特異的に選択することができるが、おもにダブルクロスオーバータイプの相同組換えによって遺伝子ターゲティングの効率化を図る目的で利用される。つまり、外来DNA断片の組み込みが起こった形質転換体のうち相同組換えが起こらずに組換えDNA断片がゲノム上のランダムな位置に導入された株はネガティブセクションマーカーを保有するために、相同組換えが起こらなかった株が選択的に除去されることになる (図1)。

ネガティブセクションマーカーとして用いられる遺伝子で最も有名なものは、栄養要求性マーカー

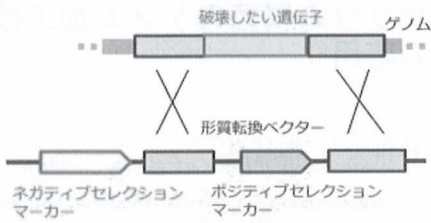
連絡先

*〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町名古屋大学大学院生命農学研究科

電話：052-789-5744. ファックス：052-789-4087. 電子メール：mkimura@agr.nagoya-u.ac.jp

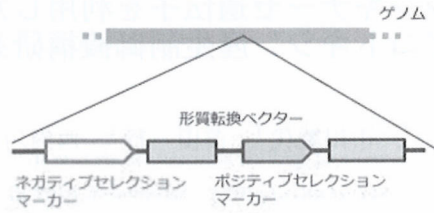
カラーリプリントが本誌WEBサイトよりダウンロードできます

ダブルクロスオーバータイプの相同組換え



ネガティブセクションマーカー：ゲノムに組み込まれない
宿主：生存できる

非相同組換え (DNA エンドジョイニング)



ネガティブセクションマーカー：ゲノムに組み込まれる
宿主：死滅する

図1 ネガティブセクションマーカーを用いた効率的なジーンターゲティング

ダブルクロスオーバータイプの相同組換えによるベクター導入株（作出したい株）ではネガティブセクションマーカーはゲノム DNA に導入されない（左）。非相同的にネガティブセクションマーカーがゲノム DNA に導入された株（エクトピックな形質転換体）では、宿主に毒性を示す（右）。

としてポジティブセクションにも用いられる出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の orotidine-5'-phosphate (OMP) decarboxylase をコードする *URA3* 遺伝子である²⁾。 *URA3* 遺伝子を導入する際に宿主とする *S. cerevisiae* の *ura3* 変異株は 5-fluoroorotic acid (5-FOA) に耐性を示すことを利用して取得でき、 *URA3* が導入された株のネガティブセクションは 5-FOA 処理によって行なわれる。 *URA3* オルソログとして、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* では *ura4* 遺伝子、 *Aspergillus* 属糸状菌では *pyrG* 遺伝子が単離され、これらの微生物種におけるネガティブセクションに広く用いられている^{3,4)}。このように酵母や *Aspergillus* 属菌では、OMP decarboxylase 遺伝子の変異株がすでに 1 つの基準株として確立され、一般に入手可能な研究材料として広く利用されている。しかし、他の微生物種でネガティブセクションを行うには、野生株を宿主にできるネガティブセクションマーカーを用いる手法の方がより便利で優れているといえる。

チミジンキナーゼ遺伝子を用いた糸状菌のネガティブセクション

動物培養細胞の遺伝子導入ではジフテリア毒素 A サブユニット (*DT-A*; diphtheria toxin subunit A) 遺伝子や単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (*HSVtk*; herpes simplex virus thymidine kinase) 遺伝子のように他生物に由来する遺伝子を用いたネガティブセクションが行われている^{5,6)}。 *DT-A* はペプチド鎖伸長因子 EF-2 を ADP-リボシル化することでタンパク質合成を阻害する。 *DT-A* は遺伝子産物そのものが毒性を示すため、発現すれば宿主細胞に毒性を示す。一方 *HSVtk* は発現しただけでは強い毒性を示さないが、毒性の低い ganciclovir のようなヌクレシドアナログの存在下では *HSVtk* の働きによって ganciclovir がリン酸化をうけ、最終的に細胞内で毒性を示す物質へと変換されて毒性を示す（図2）。このように *HSVtk* は条件付きネガティブセクションマーカー (conditional negative selection marker) として有用なマーカーである。

糸状菌においても他生物に由来するネガティブセクションマーカーを利用した形質転換が行われているが⁷⁻⁹⁾、そのほとんどが *HSVtk* を用いた事例である。 *DT-A* は一部の糸状菌で試されたが、うまく機能しないことが報告されている⁸⁾。 *HSVtk* は子のう菌類に属する多くの糸状菌だけでなく卵菌類においても利用できうることが示され⁸⁾、広く利用されうる可能性を秘めている。糸状菌で

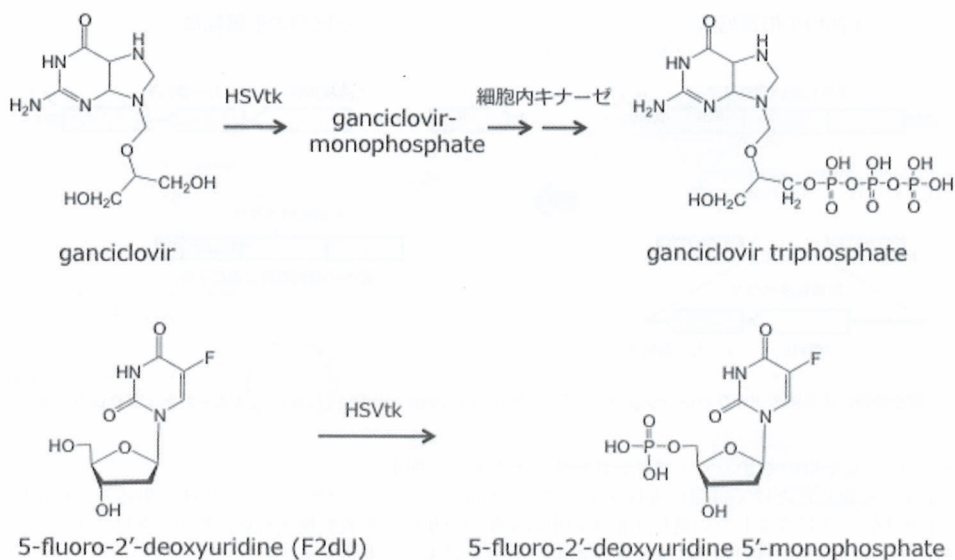


図2 HSVtk 発現株を選択的に除去するための薬剤

HSVtk は ganciclovir や 5-fluoro-2'-deoxyuridine (F2dU) をリン酸化し、毒性を示す物質に変換する。ヌクレオチドアナログである ganciclovir triphosphate はポリメラーゼ阻害や核酸への取り込みによって細胞毒性を示し、5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate はチミジル酸合成酵素を阻害する。

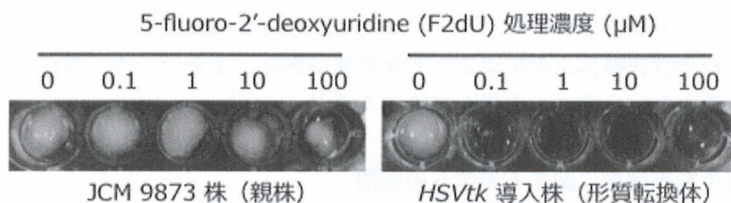


図3 HSVtk を発現させた *F. graminearum* 形質転換体の 5-fluoro-2'-deoxyuridine (F2dU) に対する感受性
HSVtk は F2dU をリン酸化し毒性を示す物質へと変換するため、F2dU 存在下で HSVtk 発現株は生育阻害を受ける。一方、野生株 (WT) では F2dU のリン酸化が起こらないため、ほとんど毒性を示さない。

は、HSVtk 発現株を選択的に除去するネガティブセレクションの薬剤として 5-fluoro-2'-deoxyuridine (F2dU) がよく使われている (図2, 図3)。F2dU は ganciclovir と同様に HSVtk の基質となり、リン酸化を受けることで毒性物質へと変換される (図2)。ダブルクロスオーバータイプの相同組換え頻度が低い糸状菌では、ネガティブセレクションは相同組換えによるジーンターゲティングの効率を向上させる目的で用いられることが多い⁷⁻⁹⁾。

ポジティブおよびネガティブセレクションを利用した糸状菌ゲノム加工技術

条件付きネガティブセレクションマーカーとしての HSVtk の性質を利用すれば、理論的にゲノムの特定の領域を自由に改変することができる。最近 *Fusarium graminearum* においても HSVtk を用いて目的遺伝子に点変異のみを導入した事例が報告された¹⁰⁾。この報告では、遺伝子ターゲティ

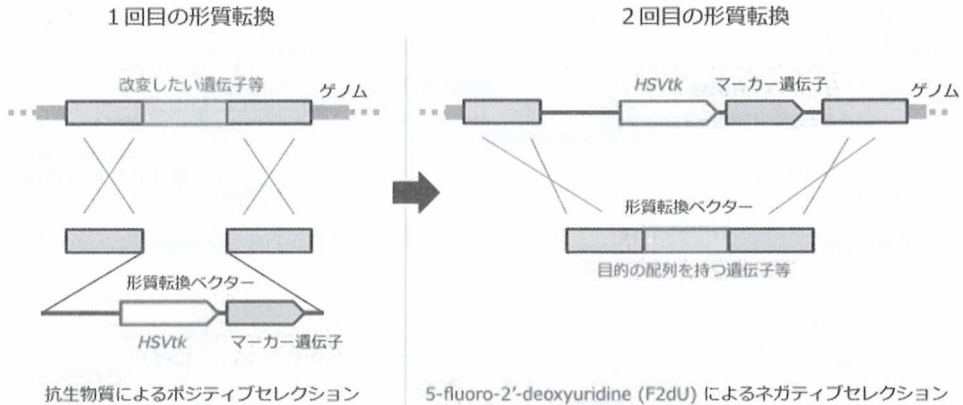


図4 HSVtkを用いた2ステップの形質転換によるゲノム加工

まず、発現しただけでは強い毒性を示さない *HSVtk* をゲノム上のターゲット領域に組込んだ株を作出する(左). 次に改変したい遺伝子前後の相同な配列を用いて形質転換を行い、ダブルクロスオーバータイプの相同組換え株のみをネガティブセレクションによって取得する(右).

ングの効率化を目的としたネガティブセレクションとは異なり、2ステップの形質転換を行っている. すなわち、まず *HSVtk* をゲノムの目的部位に挿入した形質転換体を親株として作出する. 次に、改変を加えた目的遺伝子等の DNA 断片をダブルクロスオーバータイプの相同組換えによって導入し、ネガティブセレクションを利用し *HSVtk* 遺伝子配列が除去された株のみを選択する(図4). このようにポジティブセレクションとネガティブセレクションを組合わせた形質転換法は、目的の変異のみを導入した形質転換体を作出することが可能であり、またマーカー遺伝子を一切残さないため、多重遺伝子導入を行う際にも有用な技術である.

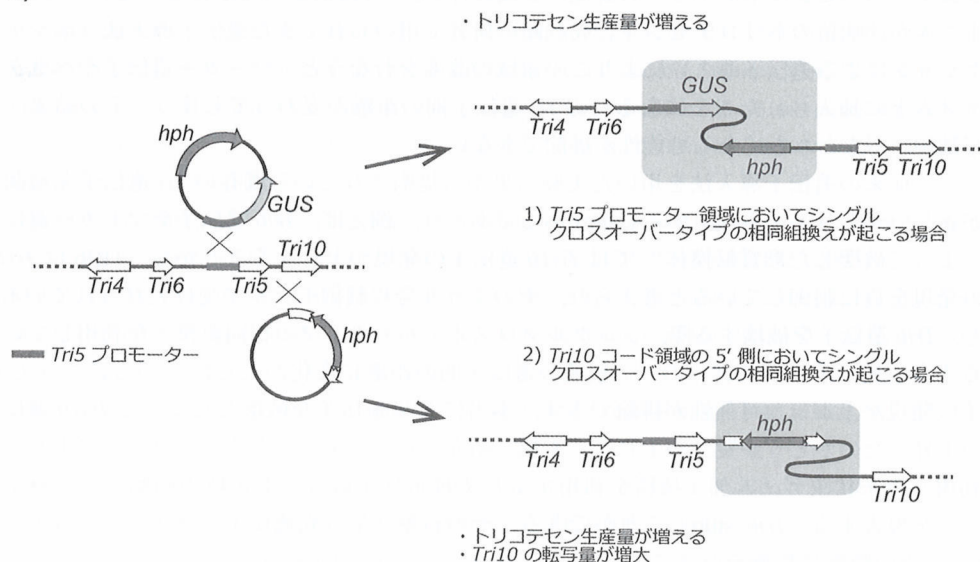
マイコトキシン産生制御機構に関する研究への応用

トリコテセン系マイコトキシン生産菌 *F. graminearum* や *Fusarium sporotrichioides* では、*F. graminearum* の C-8 位の酸化に関わる遺伝子を除く全トリコテセン生合成遺伝子 (*Tri* 遺伝子) が同定され、それらの機能が明らかになっている. トリコテセン骨格は *Tri4*, *Tri6*, *Tri5*, *Tri10* の4つの *Tri* 遺伝子産物の機能によって形成され、これら4遺伝子は生合成遺伝子クラスターのコア領域に位置している. 各 *Tri* 遺伝子は zinc finger 様転写因子をコードする *Tri6* 遺伝子の制御下にあるが、コア領域での *Tri* 遺伝子の発現様式については *TRI6* 転写因子による制御だけでは説明できない次のような現象が報告されている(図5を参照).

- (1) *Tri5* プロモーター領域をもつプラスミドベクターが *Tri5* 遺伝子上流にシングルクロスオーバータイプの相同組換えによって挿入され *Tri6* - *Tri5* 遺伝子間の距離が長くなった組換え *F. sporotrichioides* では、T-2 toxin の生産量が大幅に上昇する¹¹⁾
- (2) *Tri10* 遺伝子上流にベクターが挿入され *Tri5* - *Tri10* 遺伝子間の距離が長くなった株では、トリコテセン誘導条件下での *Tri10* 発現量と T-2 toxin 生産量が野生株に比べて上昇する¹²⁾
- (3) *F. graminearum* において *Tri4* プロモーターを生合成遺伝子クラスターのコア領域からクラスターの末端もしくはクラスター外へ配置するとプロモーターとして機能しない¹³⁾

以上の現象は、*Tri* 遺伝子の正常な発現には生合成遺伝子クラスターのコア領域において、各 *Tri*

A)



B)

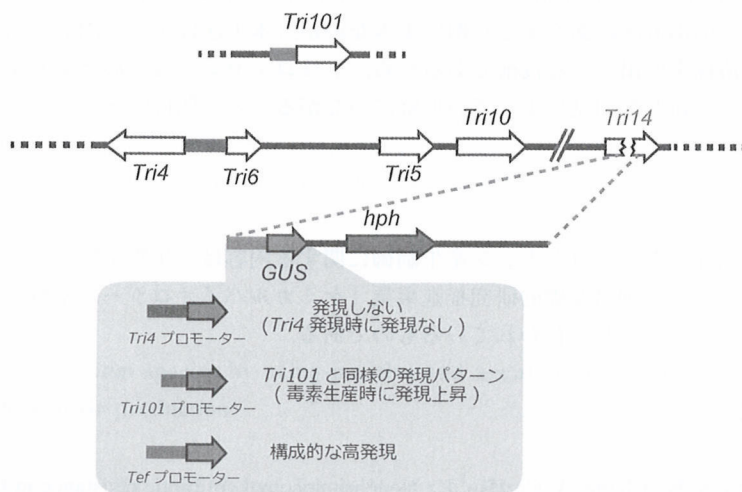


図5 生合成遺伝子クラスターのコア領域での *Tri* 遺伝子の発現様式

- A) *Tri6*–*Tri5* 遺伝子間の距離が長くなった組換え *F. sporotrichioides* では、T-2 toxin の生産量が大幅に上昇する (1)。*Tri5*–*Tri10* 遺伝子間の距離が長くなった株では、トリコテセン誘導条件下での *Tri10* 発現量と T-2 toxin 生産量が野生株 (WT) に比べて上昇する (2)。
- B) *F. graminearum* において *Tri4* プロモーターを生合成遺伝子クラスターのコア領域からクラスターの末端もしくはクラスター外へ配置するとプロモーターとして機能しない。*Tri14* 遺伝子と *Tri4* 遺伝子は 17.5 kb 離れており、*Tri14* 遺伝子は培地中でのトリコテセン生成には必要ない。

遺伝子の位置や遺伝子間の適正な距離が重要な役割を果たしていることを示唆している。このような生合成遺伝子クラスターの構造レベルでの発現制御機構は、クロマチンリモデリングを介した制御機構が関与していると考えられるが、今後、トリコテセン類をはじめとする二次代謝生合成遺伝

子クラスターのエビジェネティックス研究の展開に伴い、その機構が明らかとなっていくであろう。これまで赤かび病菌のトリコテセン合成経路の研究で用いられてきた遺伝子導入法（ポジティブセクションによる遺伝子導入）によりこの領域の改変を行なうと、マーカー遺伝子やベクター部分がゲノム上に挿入されたままになるため *Tri* 遺伝子間の距離が変わってしまう。その結果、正常な転写制御が行なわれなくなる可能性が排除できない。

従って、従来の遺伝子導入法を用いた実験結果から提唱されている既存の *Tri* 遺伝子発現制御モデルが正しいかどうかを再検討する必要があるであろう。例えば、*Tri6* 遺伝子をマーカー遺伝子の挿入によって破壊した形質転換体¹⁴⁾ では *Tri10* 遺伝子の発現が上昇することから、*TRI6* は *Tri10* 遺伝子の発現を負に制御していると考えられ、そのような発現制御モデルが受け入れられている¹²⁾。しかし、*Tri6* 遺伝子を破壊する際、シングルクロスオーバータイプの相同組換えを利用していることから合成遺伝子クラスターのコア領域の遺伝子間の距離に変化が生じた¹⁴⁾ ことによって *Tri10* 遺伝子の発現が上がった可能性が排除できず、本当に *Tri6* 遺伝子を破壊したことで *Tri10* 遺伝子の発現が上昇したのかどうか疑念が生じる。本稿で紹介したポジティブおよびネガティブセクションを利用した糸状菌ゲノム加工技術を利用すると *Tri6* 遺伝子のコード領域の開始コドン直下に終止コドンを導入する (*Tri6_stop*) ことができる。その結果、合成遺伝子クラスターのコア領域の *Tri* 遺伝子間の距離に影響を与えることなく *Tri6* 遺伝子が *Tri10* 遺伝子の発現に及ぼす影響を正確に解析することが可能となる。また、*Tri6_stop* の発現様式を調べることによって *Tri6* 遺伝子の発現が *TRI6* によって正に制御されているかどうかとも同時に確かめることができる。

上述した応用方法はあくまで一例にすぎないが、本手法はゲノム内の標的遺伝子や領域を自由に加工した菌株を作出できる技術であるため、トリコテセンをはじめとするマイコトキシン産生制御機構について新たな知見やより深い理解につながる事が期待できる。

謝 辞

本稿で紹介したマイコトキシン産生制御に関する内容は、生物系特定産業技術研究支援センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業「ケミカルバイオロジーを基盤とした革新的な農薬等の探索研究」の一環として行われているものである。

引用文献

- 1) Cohen, S. N., Chang, A. C., Hsu, L.: Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **69**, 2110-2114 (1972)
- 2) Rose, M., Grisafi, P., Botstein, D.: Structure and function of the yeast *URA3* gene: expression in *Escherichia coli*. *Gene*, **29**, 113-124 (1984)
- 3) Grimm, C., Kohli, J., Murray, J., Maundrell, K.: Genetic engineering of *Schizosaccharomyces pombe*: a system for gene disruption and replacement using the *ura4* gene as a selectable marker. *Mol Gen Genet*, **215**, 81-86 (1988)
- 4) Benito, E.P., Diaz-Minguez, J.M., Iturriaga, E.A., Campuzano, V., Eslava, A. P.: Cloning and sequence analysis of the *Mucor circinelloides* *pyrG* gene encoding orotidine- 5'-monophosphate decarboxylase: use of *pyrG* for homologous transformation. *Gene*, **116**, 59-67 (1992)
- 5) Yagi, T., Ikawa, Y., Yoshida, K., Shigetani, Y., Takeda, N., Mabuchi, I., Yamamoto, T., Aizawa, S.:

- Homologous recombination at c-fyn locus of mouse embryonic stem cells with use of diphtheria toxin A-fragment gene in negative selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9918-9922 (1990)
- 6) Capecchi, M.R.: Altering the genome by homologous recombination. *Science*, **244**, 1288-1292 (1989)
 - 7) Gardiner, D.M., Howlett, B.J.: Negative selection using thymidine kinase increases the efficiency of recovery of transformants with targeted genes in the filamentous fungus *Leptosphaeria maculans*. *Curr Genet*, **45**, 249-255 (2004)
 - 8) Khang, C.H., Park, S.Y., Lee, Y.H., Kang, S.: A dual selection based, targeted gene replacement tool for *Magnaporthe grisea* and *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol*, **42**, 483-492 (2005)
 - 9) Ma, Y., Li, A., Wang, Y., Xie, M., Li, J., Zhang, S., Wang, Q.: Construction and experimental application of a highly efficient temperature-selection T-vector. *Biotechnol Appl Biochem*, **53**, 247-251 (2009)
 - 10) Qiu, J., Xu, J., Yu, J., Bi, C., Chen, C., Zhou, M.: Localisation of the benzimidazole fungicide binding site of *Gibberella zeae* β_2 -tubulin studied by site-directed mutagenesis. *Pest Manag Sci*, **67**, 191 - 198 (2011)
 - 11) Chen, L., McCormick, S.P., Hohn, T.M.: Altered regulation of 15 -acetyldeoxynivalenol production in *Fusarium graminearum*. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 2062-2065 (2000)
 - 12) Tag, A.G., Garifullina, G.F., Peplow, A.W., Ake, C., Jr., Phillips, T.D., Hohn, T.M., Beremand, M.N.: A novel regulatory gene, *Tri10*, controls trichothecene toxin production and gene expression. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 5294-5302 (2001)
 - 13) Tokai, T., Nakajima, Y., Ichikawa, H., Maeda, K., Nishiuchi, T., Kobayashi, T., Kimura, M.: A promoter of *Fusarium graminearum* *Tri4* does not function when placed at the end of the trichothecene gene cluster. *Mycotoxins*, **63**, 17-25 (2013)
 - 14) Proctor, R.H., Hohn, T.M., McCormick, S.P., Desjardins, A.E.: *Tri6* encodes an unusual zinc finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*. *Appl Environ Microbiol*, **61**, 1923-1930 (1995)

Genome engineering of *Fusarium* species by using positive and negative selection approaches for studying regulation of mycotoxin production

Yuichi NAKAJIMA¹, Hinayo ICHIKAWA¹, Kazuyuki MAEDA¹, Takumi NISHIUCHI², Tetsuo KOBAYASHI¹, Makoto KIMURA¹

¹ Department of Biological Mechanisms and Functions, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan

² Division of Functional Genomics, Advanced Science Research Center, Kanazawa University, 13-1 Takaramachi, Kanazawa, Ishikawa 920-0934, Japan

Marker genes are required for the genetic manipulation of living organisms. For selecting transformants after the process of transformation, two types of marker genes are employed: one for the positive selection of the transformants carrying the positive selection marker gene and another for the negative selection of the transformants lacking the negative selection marker gene. Here we have summarized the current advancements in genome engineering of

Fusarium species. We have focused on introducing arbitrary mutations by applying both positive and negative selection approaches that result in the exclusion of the marker genes from the target genome. We have discussed the advantages and necessity of using this technique in studies on the regulation of biosynthetic gene expression in mycotoxin production.