

# 醤油麹菌 *Aspergillus oryzae* の *ku70* 遺伝子破壊による 高頻度相同組換え宿主の開発

北本則行<sup>\*1</sup>、安田庄子<sup>\*2</sup>

## Highly Efficient Gene Targeting of the *ku70* Gene Disruption in the Shoyu Koji Mold, *Aspergillus oryzae*

Noriyuki KITAMOTO<sup>\*1</sup> and Shoko YASUDA<sup>\*2</sup>

Food Research Center, AITEC<sup>\*1\*2</sup>

醤油麹菌 *Aspergillus oryzae* KBN616 株の *ku70* 遺伝子の塩基配列は、*A. oryzae* RIB40 株の *ku70* 遺伝子の塩基配列と 100% 一致していた。*prtA* 遺伝子を選択マーカーとして構築した *ku70* 遺伝子破壊用ベクターで *A. oryzae* KBN616 株を形質転換し、*ku70* 遺伝子が破壊された *A. oryzae* KBN616-K85 株を取得した。*A. oryzae* KBN616-K85 株から取得した *ku70*、*pyrG* 遺伝子二重破壊株である *A. oryzae* KP8502 株では高頻度 (82.3%) で遺伝子ターゲティングされ、醤油麹菌遺伝子の機能解析に十分使用できることが明らかとなった。

### 1. はじめに

醤油醸造において麹菌が果たす役割は、耐塩性乳酸菌や耐塩性酵母が果たす役割に比べてはるかに大きい。そのため、麹菌が生産する酵素類が醤油醸造において果たす役割を詳細に解析することは、醤油醸造工程の改良や醤油の品質向上などに大きく貢献することができる。麹菌酵素の役割を明らかにするためには遺伝子破壊による機能欠損が必要であるが、麹菌などの糸状菌では非相同末端結合修復系により二重鎖切断修復が主に行われるため、外来 DNA は染色体上のランダムな位置に組み込まれることが多い。また、麹菌の形質転換効率が低頻度 (約 20 コロニー/ $\mu$ gDNA) で遺伝子ターゲティング頻度が非常に低い (10% 以下) ため、12,074 個の麹菌推定遺伝子の機能解析がシステムチックにできるゲノムワイドな破壊株を作成することが困難である。しかし、非相同末端結合修復系に関わるタンパク質をコードする遺伝子の 1 つを破壊すれば、非相同末端結合修復系を遮断することができ、相同組換え修復系による遺伝子ターゲティング頻度を顕著に上昇させることができる。実際に *Neurospora crassa* では *ku70* 遺伝子破壊により遺伝子ターゲティング頻度が 100% に上昇し<sup>1)</sup>、*Aspergillus fumigatus* でも *ku70* 遺伝子破壊により遺伝子ターゲティング頻度が 96% に上昇している<sup>2)</sup>。また、ゲノム解析が行われた *A. oryzae* RIB40 株では *ku70* 遺伝子破壊

により遺伝子ターゲティング頻度が 63.4% に達することが報告されている<sup>3)</sup>。

そこで、当センターで遺伝子解析を行っている醤油麹菌 *A. oryzae* KBN616 株から非相同末端結合修復系に関わる *ku70* 遺伝子破壊株を取得し、醤油麹菌における効率的な遺伝子ターゲティングシステムの確立を試みたので、その結果について報告する。

### 2. 実験方法

#### 2.1 使用菌株及び使用培地

醤油麹菌 *A. oryzae* KBN616 株を染色体 DNA の調製及び形質転換の宿主に用いた。*E. coli* DH5 株は、種々の DNA 断片のクローニングに使用した。*A. oryzae* 染色体 DNA 調製用培地には GP 培地 (グルコース 2.0% , ポリペプトン 1.0% ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5% ,  $\text{NaNO}_3$  0.1% ,  $\text{MgSO}_4$  0.05%) を用いた。

#### 2.2 *A. oryzae* KBN616 株由来 *ku70* 遺伝子破壊株の取得

*A. oryzae* RIB40 株のゲノム情報から合成した P1 プライマー (5'-TGGAATTCGGACCATTTTCGCATAGG-3') 及び P2 プライマー (5'-CTGAATTCATCTGTGTATTATTTCTGCC-3') を用いて Raeder らの方法<sup>4)</sup> により調製した *A. oryzae* KBN616 株の染色体 DNA を鋳型 DNA として PCR 反応を行い、*ku70* 遺伝子の特異的に増幅させた。増幅された *A. oryzae* KBN616 株の *ku70* 遺伝子

を pUC18 の *Sma* 部位に組み込んで、プラスミド pku70 を得た。プラスミド pku70 を制限酵素 *EcoRV* で消化し、0.9 kb の *EcoRV* 断片を除去した。プラスミド pTRI<sup>5</sup> から P3 プライマー(5'-TGGATATCGGGCAATTGATTACGGGATCCCAT-3')及び P4 プライマー(5'-ACGATATCATGGGGTGACGATGAGCCGCT-3')を用いて PCR 増幅させた *ptrA* 遺伝子(ピリチアミン耐性遺伝子)を制限酵素 *EcoRV* で消化した後、*EcoRV* で消化したプラスミド pku70 に組み込んで、*ku70* 遺伝子破壊用プラスミド pDisku70 を構築した。*ku70* 遺伝子破壊用プラスミド pDisku70 で *A. oryzae* KBN616 株を形質転換し、得られた形質転換株をピリチアミン(0.1 µg/ml)添加ツアベック寒天培地上で単胞子分離により純化した後、安定な形質転換株を取得した。安定な形質転換株の中より *ku70* 遺伝子破壊株を選択するために形質転換株の染色体 DNA を鋳型 DNA として P1 プライマー及び P2 プライマーを用いて PCR 反応を行い、4.4 kb の DNA 断片が増幅された形質転換株を *ku70* 遺伝子破壊株とした。

### 2.3 *A. oryzae* KBN616 株由来 *ku70*, *pyrG* 遺伝子二重破壊株の取得

*A. oryzae* KBN616 株の染色体 DNA を鋳型 DNA として P5 プライマー(5'-GCGAGCTCTACATTGGCAAAGGAT-3')及び P6 プライマー(5'-GGTCTAGAATATTTAATCAGCTACC-3')を用いて PCR 反応を行い、*pyrG* 遺伝子プロモーター上流領域を特異的に増幅した。また、P7 プライマー(5'-TGTCTAGACACTAGCTATACCGCC-3')及び P8 プライマー(5'-CTAAGCTTATCAGCTGCATATCTCT-3')を用いて PCR 反応を行い、*pyrG* 遺伝子ターミネーター下流領域を特異的に増幅した。制限酵

素 *SacI* 及び *XbaI* で消化した *pyrG* 遺伝子プロモーター上流領域(1.6 kb)と制限酵素 *XbaI* 及び *Hind* で消化した *pyrG* 遺伝子ターミネーター下流領域(1.4 kb)とを pUC18 の *SacI-Hind* 部位に組み込んで、*pyrG* 遺伝子破壊用プラスミド pDispyrG を構築した。*pyrG* 遺伝子破壊用プラスミド pDispyrG で *A. oryzae* KBN616-K85 株(*ku70* 遺伝子破壊株)を形質転換し、得られた形質転換株の中から 5-フルオロオロチン酸(5-FOA)0.1%、ウリジン 0.1525%及びウラシル 0.07%を添加したツアベック寒天培地で生育してきた形質転換株を単胞子分離により純化した後、安定な 5-FOA 耐性株を取得した。5-FOA 耐性株の染色体 DNA を鋳型 DNA として P5 プライマー及び P6 プライマーを用いて PCR 反応を行い、3.0 kb の DNA 断片が増幅された 5-FOA 耐性株を *ku70*, *pyrG* 遺伝子二重破壊株とした。

### 2.4 *ku70* 遺伝子破壊株の遺伝子ターゲティング頻度測定

*ku70* 遺伝子破壊による遺伝子ターゲティング頻度への影響を検討するために AmyR(デンプン分解酵素遺伝子群の誘導発現因子)をコードする遺伝子の破壊を行った。*amyR* 遺伝子破壊用プラスミド pDisAmR100<sup>6)</sup>を用いて *A. oryzae* KP8502 株(*ku70*, *pyrG* 遺伝子二重破壊株)を形質転換した。得られた形質転換株をツアベック寒天培地上で単胞子分離により純化し、安定な形質転換株を取得した。デンプン分解酵素活性が低下し、可溶性デンプンを唯一の炭素源とした最小寒天培地上で生育が著しく悪くなった形質転換株を *amyR* 遺伝子破壊株とした。試験に供した形質転換株に占める *amyR* 遺伝子破壊株の割合から遺伝子ターゲティング頻度を算出した。

## 3. 実験結果および考察

### 3.1 *A. oryzae* KBN616 株由来 *ku70* 遺伝子破壊株の取得

*A. oryzae* RIB40 株の *ku70* 遺伝子<sup>7)</sup>の上流及び下流の塩基配列に基づいて合成したプライマーによって、*A. oryzae* KBN616 株の *ku70* 遺伝子を PCR 法で増幅した結果、3,592 bp の DNA 断片が増幅された。この領域の塩基配列は *A. oryzae* KBN616 株と *A. oryzae* RIB40 株との間で、プライマー部分を除いて 100%一致していた。

*A. oryzae* KBN616 株は他の *A. oryzae* と同様に糸状菌の形質転換の選択マーカーに通常用いられている抗生物質に高い耐性を示すため、抗生物質耐性遺伝子を選択マーカーに利用できない。しかし、チアミンのアナログであるピリチアミンに対しては非常に高い感受性を示すことから、*ku70* 遺伝子の一部を *ptrA* 遺伝子に置き換えて *ku70* 遺伝子破壊用プラスミド pDisku70 を構築した

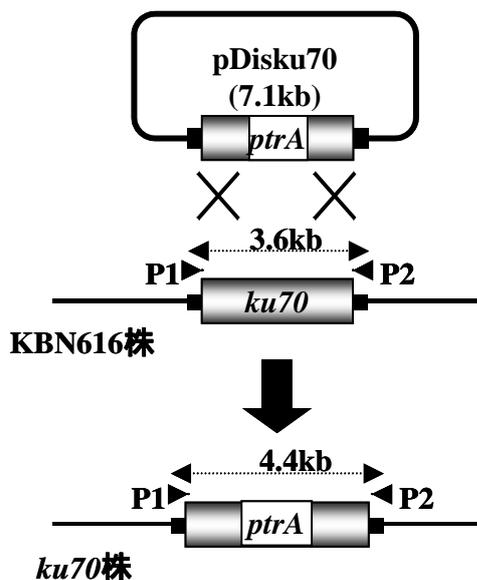


図1 *ku70* 遺伝子破壊の模式図

(図1) 組換え頻度を高めるように直鎖状にした *ku70* 遺伝子破壊用プラスミド pDisku70 を用いて *A. oryzae* KBN616 株の形質転換を行った。*N. crassa* の *ku70* 遺伝子破壊株はメチルメタンスルホン酸、エチルメタンスルホン酸及びブレオマイシンに対して感受性が高くなるが<sup>1)</sup>、*A. oryzae* RIB40 株の *ku70* 遺伝子破壊株はこれらの薬剤に対する感受性はほとんど差がなく目立った表現型が見られない<sup>3)</sup>。そのため、実験方法 2.2 で述べたように得られた形質転換株から抽出した染色体 DNA を用いて PCR 反応を行い、*ku70* 遺伝子破壊株の検索を行った。*ku70* 遺伝子が破壊されていれば、増幅 DNA 断片のサイズが 3.6 kb から 4.4 kb へと変化することになる(図1、2)。このような PCR 増幅 DNA 断片のサイズ変化を指標にして検索を行ったところ、114 株の形質転換株から 9 株の *ku70* 遺伝子破壊株を取得することができた。*A. oryzae* RIB40 株では *ku70* 遺伝子破壊頻度は 10% であり、ほぼ同程度の効率で *ku70* 遺伝子破壊株を取得することができた。

### 3.2 *A. oryzae* KBN616 株由来 *ku70*、*pyrG* 遺伝子二重破壊株の取得

*A. oryzae* KBN616 株においてシステマチックに遺伝子の機能解析を行うシステムを確立するために 3.1 で得られた 9 株の *ku70* 遺伝子破壊株の中より *A. oryzae* KBN616-K85 株を選び、形質転換系の開発を行うこととした。先に述べたように *A. oryzae* は種々の薬剤に対して耐性を有するため選択マーカーとして利用できる優性マーカーはほとんどない。また、分生子が多核であるため多重栄養要求性株を分離することは大変困難である。

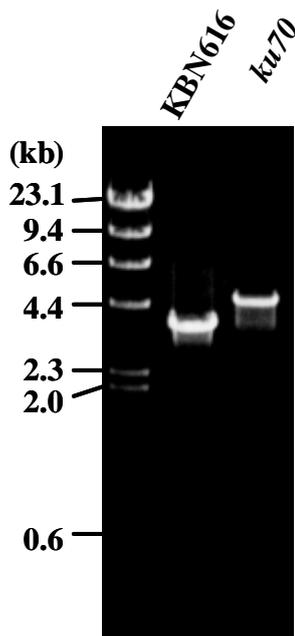


図2 PCR 法による *ku70* 遺伝子破壊の確認

一方、酵母ではオロチジン酸デカルボキシラーゼをコードしている *URA3* 遺伝子とウラシル要求性を示す *ura3* 宿主株を用いて連続的遺伝子破壊法が開発されている<sup>8)</sup>。そこで、*URA3* 遺伝子のホモログである *pyrG* 遺伝子とウリジン要求性を示す *pyrG* 遺伝子破壊株を宿主とする形質転換系の開発を試みた。

ウラシル生合成経路の中間代謝物であるオロチン酸のアナログである 5-FOA が存在すると野生株は生育できない。しかし、*pyrG* 遺伝子破壊株ではオロチン酸を UMP(ウリジン 5'-リン酸)に変換できないため 5-FOA を含む培地で生育することができる。このような性質を利用して、直鎖状にした *pyrG* 遺伝子破壊用プラスミド pDispyrG で形質転換することにより *A. oryzae* KBN616-K85 株から *pyrG* 遺伝子破壊株の取得を試みた。形質転換株から多数の 5-FOA 耐性株が得られたため、任意に選択した 3 株の 5-FOA 耐性株から抽出した染色体 DNA を用いて実験方法で述べたように PCR 反応を行い、*pyrG* 遺伝子破壊の確認を行った。*pyrG* 遺伝子が破壊されていれば、増幅 DNA 断片のサイズが 4.9 kb から 3.0 kb へと変化することになる(図3、4)。このような PCR 増幅 DNA 断片のサイズ変化を指標にして *pyrG* 遺伝子破壊の確認を行ったところ、3 株の 5-FOA 耐性株はすべて *pyrG* 遺伝子破壊株であることが判明した。同様にして親株である *A. oryzae* KBN616 株から *pyrG* 遺伝子破壊株の分離を試みたところ、約 10 株の 5-FOA 耐性株しか得ることができなかった。*ku70* 遺伝子を破壊することによって遺伝子ターゲティング頻度が著しく上昇した結果、*A. oryzae* KBN616-K85 株では多数の 5-FOA 耐性株が出現したものと考えられた。

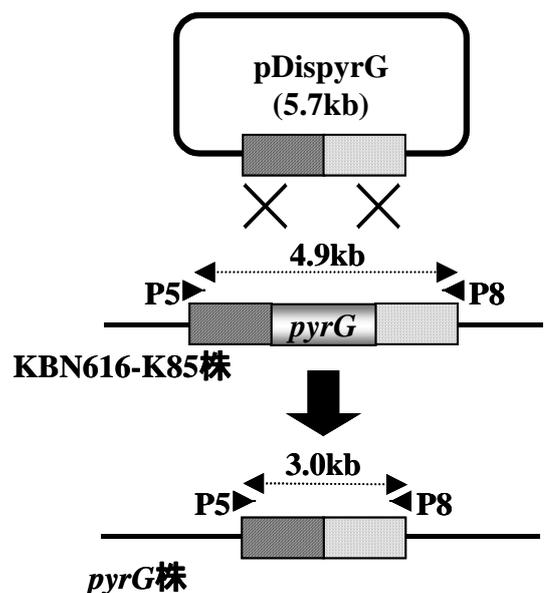


図3 *pyrG* 遺伝子破壊の模式図

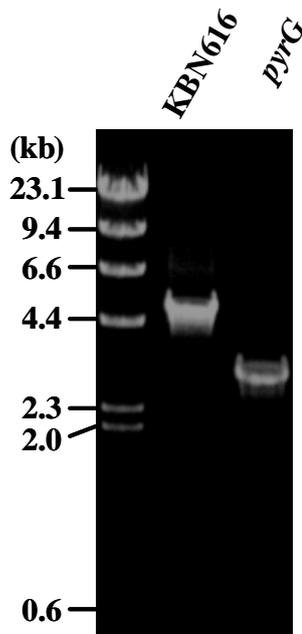


図4 PCR法による *pyrG* 遺伝子破壊の確認

### 3.3 *ku70* 遺伝子破壊株の遺伝子ターゲティング頻度測定

*ku70* 遺伝子破壊によって遺伝子ターゲティング頻度が *N. crassa* では 100%、*A. oryzae* RIB40 株では 63.4%に向上することが報告されている<sup>1, 3)</sup>。*A. oryzae* KBN616 株でも *ku70* 遺伝子破壊によって同様に遺伝子ターゲティング頻度が向上していると考えられた。そこで、3.2 で分離した 3 株の *ku70*、*pyrG* 遺伝子二重破壊株の中より *A. oryzae* KP8502 株を選び、遺伝子ターゲティング頻度の変化を検討した。

*A. oryzae* KBN616 株に由来する *pyrG* 株 (*A. oryzae* KBN616-P5) を宿主として *pyrG* 遺伝子を選択マーカーに用いて、既に *amyR* 遺伝子破壊株が相同組換えにより取得されている<sup>6)</sup>。*AmyR* タンパクは麹菌のデンプン分解酵素遺伝子群の誘導発現因子であり、*amyR* 遺伝子を破壊することによってデンプン分解酵素遺伝子の誘導発現が抑制される。そのため、*amyR* 遺伝子破壊株はデンプンを唯一の炭素源とする最小寒天培地上では生育が著しく悪くなり、表現型の変化で容易に判別することができる。そこで、*amyR* 遺伝子破壊プラスミド pDisAmR100 で *A. oryzae* KP8502 株の形質転換を行った。62 株の安定な形質転換株が得られ、その中の 51 株のデンプン分解酵素活性が著しく低下していた。遺伝子ターゲティング頻度は 82.3% となり、*A. oryzae* KBN616-P5 株の遺伝子ターゲティング頻度 (4.5%) と比較して著しく向上していた。*A. oryzae* KBN616 株では *ku70* 遺伝子破壊によって遺伝子ターゲティング頻度が 82.3% になり、*A. oryzae* RIB40 株の *ku70* 遺伝子

子破壊株の遺伝子ターゲティング頻度よりも約 20% 高くなった。*A. fumigatus* の *ku70* 遺伝子破壊株<sup>2)</sup>、あるいは *Aspergillus sojae* の *ku70* 遺伝子破壊株<sup>3)</sup> の遺伝子ターゲティング頻度を考慮すると、菌株、ターゲティングする遺伝子、ベクターの構築方法、形質転換方法などが遺伝子ターゲティング頻度に影響を与えていると思われた。

## 4. 結び

本研究の結果をまとめると、以下のとおりである。

- (1) *A. oryzae* KBN616 株の *ku70* 遺伝子の塩基配列は、*A. oryzae* RIB40 株の *ku70* 遺伝子の塩基配列と 100% 一致していた。
- (2) *prtA* 遺伝子を選択マーカーとして構築した *ku70* 遺伝子破壊用プラスミドで *A. oryzae* KBN616 株を形質転換し、*ku70* 遺伝子が破壊された *A. oryzae* KBN616-K85 株を取得した。
- (3) *pyrG* 遺伝子破壊用プラスミドで *A. oryzae* KBN616-K85 株を形質転換し、*ku70*、*pyrG* 遺伝子二重破壊株、*A. oryzae* KP8502 株を取得した。
- (4) *A. oryzae* KP8502 株では高頻度 (82.3%) で遺伝子ターゲティングされ、醤油麹菌遺伝子の機能解析に十分使用できることが明らかとなった。

今後、本研究で取得した *A. oryzae* KBN616 株の *ku70*、*pyrG* 遺伝子二重破壊株である *A. oryzae* KP8502 株を活用して、醤油醸造における麹菌酵素の役割の解明に貢献できるような連続的遺伝子破壊技術や大規模遺伝子欠損技術などの確立を試みる予定である。

## 文献

- 1) Y. Ninomiya, K. Suzuki, C. Ishii and H. Inoue : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 12248 (2004)
- 2) S. Krappmann, C. Sasse and G. H. Braus : *Eukaryot. Cell*, **5**, 212 (2006)
- 3) T. Takahashi, T. Masuda and Y. Koyama : *Mol. Gen. Genomics*, **275**, 460 (2006)
- 4) U. Raeder and P. Broda : *Lett. Appl. Microbiol.*, **1**, 17 (1985)
- 5) T. Kubodera, N. Yamashita and A. Nishimura : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1416 (2000)
- 6) 北本則行, 安田 (吉野) 庄子, 畑本修, 増田力 : 醤油研, **32**, 83 (2006)
- 7) T. Takahashi, T. Masuda and Y. Koyama : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 135 (2006)
- 8) J. D. Boeke, F. LaCrute and G. R. Fink : *Mol. Gen. Genet.*, **197**, 345 (1984)