

麹菌における有用遺伝子の高発現を可能にする ゲノム編集技術の開発

西谷 篤（鹿児島大学 先端科学研究推進センター）

NISHITANI Atsushi :

Development of genome editing technology for high expression of useful genes in koji fungi

Koji fungi produce useful substances such as α -amylase and citric acid. Genome editing technology is usually used for loss of function in breeding, but we attempted to insert a floating target gene into the cleavage site of a high-expressing promoter by simultaneously cleaving the target gene and promoter at three sites.

1. 目的

麹菌は、発酵食品の製造に利用されている重要な産業微生物であり、米や麦、大豆などの原料に含まれるデンプンを分解する α -アミラーゼや、雑菌汚染を防ぐクエン酸を生産する。先行研究では、これらの有用物質の生産機構について深く解析されてきた。

近年、新しい育種技術としてゲノム編集が注目されている。ゲノム編集は、部位特異的にはたらくヌクレアーゼで標的 DNA を切断し、それが修復される際のエラーを利用して変異を導入することができる（図 1）。その効率の良さから様々な生物種での利用が急速に広まっており、著者らの研究グループでも麹菌のゲノム編集法を開発した¹⁾。しかし、ゲノム編集には、遺伝子の機能を失わせることはできるが、特定の遺伝子を高発現させることは難しいという問題がある。そこで本研究では、ゲノム編集を用いて特定の遺伝子を高発現させるプロモーター交換技術を開発することを目的とした。

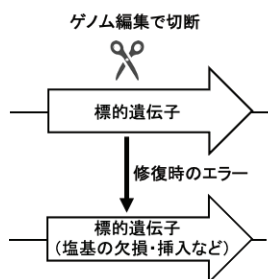


図 1. これまでのゲノム編集

2. ゲノム編集の研究戦略

麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノムには、強力なプロモーターで発現する α -アミラーゼ遺伝子が複数存在し、そのうち 1 つの機能が失われても生育に影響はなく産

業利用に問題は生じない。このことを利用し、 α -アミラーゼ遺伝子のプロモーターと高発現させたい標的遺伝子のプロモーターをゲノム編集によって同時に切断し、その修復時のエラーでプロモーターをつなぎ変えるというアイデアを着想した（図 2）。これまでに、遺伝子組換え実験により、クエン酸の生産に関わるクエン酸輸送体遺伝子のプロモーターを α -アミラーゼ遺伝子のプロモーターに交換し、クエン酸生産量が 20 倍向上するという結果を得た²⁾。そこで本研究ではクエン酸輸送体遺伝子を標的としてプロモーター交換技術が実用可能かどうかを評価した。

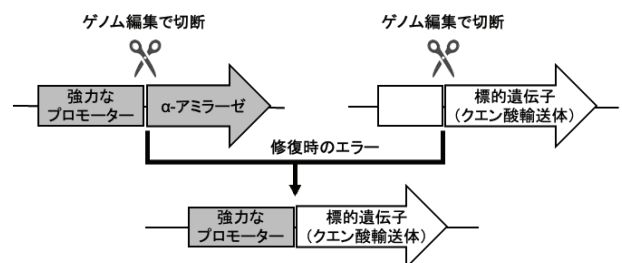


図 2. ゲノム編集による新規なプロモーター交換技術 1

3. 方法および結果

(1) ゲノム編集には CRISPR/Cas9 システムを利用した。 α -アミラーゼ遺伝子とクエン酸輸送体遺伝子のプロモーターを標的とするガイド RNA を、黄麹菌のゲノム編集プラスミドベクターに付加した。本プラスミドを、プロトプラスト-PEG 法により黄麹菌に導入した。なおゲノム編集プラスミドには *Aspergillus* 属等で複製起点として働く AMA1 配列を有するものを使用した。(2) 取得した形質転換体を pH 指示薬としてメチルレッドを含有する培地で培養し、クエン酸高生産株をスクリーニングした。クエン酸輸送体遺伝子が α -アミラ

ーゼ遺伝子のプロモーターで高発現する株はクエン酸の分泌により周囲の pH が低下するため、メチルレッドによる赤色のハローの形成を指標とした。

しかしながら、結果として赤色のハローの形成株を取得することができなかった。

4. 考察

本研究では、ゲノム編集により染色体 DNA の 2 箇所を同時切断し、修復時のエラーによって配列がつながり変わるという染色体の再編成を狙った。麹菌の染色体は線状であり、クエン酸輸送体遺伝子と α -アミラーゼ遺伝子の染色体上のセントロメアとの位置を考慮して再編成し得ると予想した。しかし、ゲノム編集により染色体の再編成が生じる頻度については過去に報告がなく、その頻度が低いために、スクリーニングした株の数では目的の株を取得できなかった可能性がある。本研究で用いたゲノム編集ベクターの形質転換効率は 1 回の形質転換あたり出現するコロニー数が 20 以下であり、AMA1 を保持する通常のプラスミドの形質転換と比較して、効率が低いと推測される。そのため、形質転換効率を上げる必要があると考えられた。

また、ゲノム編集においては、標的配列ごとに切断および変異導入の効率に差があることが知られている。標的配列が染色体 DNA においてユークロマチン領域に存在するのか、あるいはヘテロクロマチン領域に存在するかなどによって影響を受けると考えられる。実際に、麹菌 *Aspergillus kawachii* ではクエン酸排出輸送体遺伝子の発現がヘテロクロマチン形成因子により制御を受けることが示唆されていた³⁾。したがって、今回の試験で用いた標的配列の切断効率が低かったために目的の株を取得できなかった可能性もあり、今後その効率を評価し、より効率の高い標的配列を選定して試験を行う必要がある。

今後の研究ではゲノム編集の方法を変更し、 α -アミラーゼ遺伝子、標的遺伝子の前後の 3 箇所を同時切断し、切断された標的遺伝子をプロモーターの切断部位に挿入する方法を試験する予定である (図 3)。

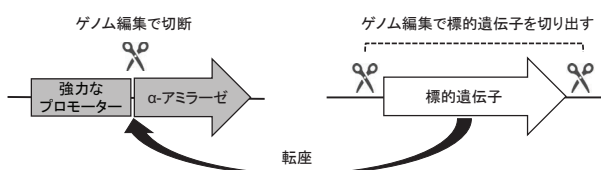


図 3. ゲノム編集による新規なプロモーター交換技術 2

また、予備実験として、ChIP (クロマチン免疫沈降)-qPCR を行い、標的配列のクロマチン構造を確認する。

麹菌はコウジ酸、コエンザイム Q、ピラノニグリン、グルコシルセラミド、エルゴチオネインなどの様々な有用代謝物を生産することが知られている。ゲノム編集を用いて特定の遺伝子を高発現させるプロモーター交換技術を開発できれば、これらの有用物質を高生産する麹菌の育種に利用できる。今回は目的のクエン酸高生産株を得ることはできなかったが、ゲノム編集の新たな利用法を提案することができた。引き続き、研究を進めていきたい。

謝辞

本研究の一部は、JSPS 科研費 (22H04262) の助成を受けたものです。厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Chihiro Kadooka, Masaaki Yamaguchi, Kayu Okutsu, Yumiko Yoshizaki, Kazunori Takamine, Takuya Katayama, Jun-Ichi Maruyama, Hisanori Tamaki, Taiki Futagami (2020) A CRISPR/Cas9-mediated gene knockout system in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Volume 84, Issue 10, 2 October 2020, Pages 2179–2183
- 2) Eri Nakamura, Chihiro Kadooka, Kayu Okutsu, Yumiko Yoshizaki, Kazunori Takamine, Masatoshi Goto, Hisanori Tamaki, Taiki Futagami (2020) Citrate exporter enhances both extracellular and intracellular citric acid accumulation in the koji fungi *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* and *Aspergillus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 131, Issue 1, January 2021, Pages 68-76
- 3) Atsushi Nishitani, Kentaro Hiramatsu, Chihiro Kadooka, Kazuki Mori, Kayu Okutsu, Yumiko Yoshizaki, Kazunori Takamine, Masatoshi Goto, Hisanori Tamaki, Taiki Futagami (2023) Expression of heterochromatin protein 1 affects citric acid production in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 136, Issue 6, December 2023, Pages 443-451