

糸状菌におけるマーカーリサイクル法の確立 及び *Aspergillus aculeatus* 多重栄養要求性宿主の開発

川口 剛司

(大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科)

研究の目的

現在セルロース系バイオマスからの燃料用エタノールなどのバイオマスエネルギーへの変換に焦点が当てられ実用化段階に入りつつあるが、糖化プロセスは硫酸処理が主流となっている。将来的には穏和な酵素糖化の実用化が望まれているが、現在の酵素剤の触媒効率が充分でなく大量の酵素が必要であるといった問題が工業化を阻んでいる。これらを克服するためには、個々のセルラーゼの機能強化や相乗効果の解明に加えて、最終的にはセルラーゼ高生産系を確立し強力なセルラーゼ剤を安価に供給することが必須と考えられる。

*A. aculeatus*は *Trichoderma* 属のセルラーゼ剤と強い相乗作用を示す多様なセルラーゼ群を生産する糸状菌として土壤中から分離され、両者のセルラーゼ剤をアルカリ処理した稲ワラに同時に作用させるとほぼ完全に単糖にまで分解できることが示された^{1,2)}。その後、*A. aculeatus*の宿主ベクター系を開発し、ヘミセルラーゼの一種である α-マンノシダーゼ遺伝子を発現させたところ、*A. oryzae*を宿主としたときの10倍近くの生産量を得た^{3,4)}。これは *A. aculeatus*のタンパク質生産工場としての高いポテンシャルを示すものである。一方、結晶性セルロースを効率よく単糖にまで分解するためには作用機作の異なるセルラーゼ成分が協奏的に作用することが必要とされている。このことから、複数のセルラーゼ遺伝子を同時に高発現するスーパー真菌を育種し強力なセルラーゼ剤を生産すると同時に固体培養でのセルロース性バイオマスの直接糖化を目指している。それには、複数の遺伝子を同時に導入できる宿主すなわち多重栄養要求性変異体を遺伝子破壊により作製することが必要である。効率よく遺伝子をノックアウトするためには相同組換えの効率が低い必要があるが、糸状菌では一般的に非相同組換えが優先的といわれている。しかし最近非相同組換えに関わるヘテロダイマータンパク質 (Ku70/80) やLig4 ホモログを破壊することで糸状菌でも高い頻度で相同組換えが起こることが示された⁵⁻⁹⁾。これらのことから、本研究課題では、() *A. aculeatus* におけるKu70/80 またはLig4 ホモログ破壊株の作製、() 糸状菌におけるマーカーリサイクリング法の確立、() 本方法を用いた遺伝子破壊による複数の栄養要求性変異マーカーを導入した *A. aculeatus* 宿主株の作製を目的とした。

方法

5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) 耐性を指標に自然変異で取得したウリジン要求性株 (pyrG13)³⁾を *ku80* ホモログ遺伝子 (*Aaku80*) 破壊カセットで形質転換し、ウリジンを含まない培地で生育する形質転換体を取得した (図 1-a)。さらに、得られた形質転換体の中からサザンブロット解析によって、破壊カセットが二重交叉により目的の位置に1コピー導入された株を選択した (R1)。その後、得られた株の胞子を5-FOAを含む培地に塗布し、分子内相同組換えによって *pyrG* が切り出された結果再び5-FOA耐性

となり生育してきたコロニーを得た。このうちの一株を *Aaku80* 破壊株 (MR12) とした (図 1-b)。MR12 株を用いて実際に *argB* 遺伝子を標的とした遺伝子破壊を行い、野生株と比較することによってターゲティング効率を評価した。

MR12 株 (*Aaku80⁻*, *pyrG⁻*) にマーカーリサイクリング法により新たに *argB* 変異を導入し、二重の選択マーカーを付与した宿主を作製した。その際、20, 98, 495 bp の異なる長さの同方向反復配列 (DR) を持つ破壊カセットを作製し、DR の長さが分子内交叉による切り出しの効率に与える影響を評価した。

結果

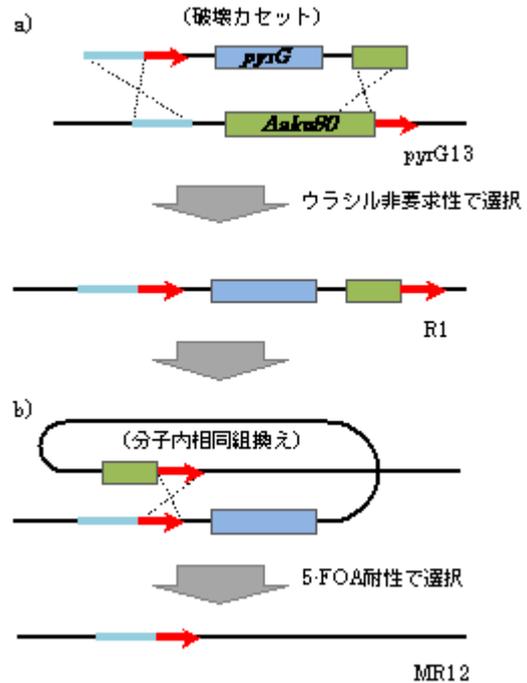
Aaku80 遺伝子の破壊と *pyrG* マーカーの除去：

破壊カセットで *pyrG13* 株を形質転換し、ウリジンおよびウラシルを含まない再生培地上で 40 株

の形質転換体を取得した。続いて、これらすべての形質転換体からゲノムを抽出し、サザンブロット解析によって破壊カセットが *Aaku80* 座位に正しく導入された株のスクリーニングを行った結果、二重交叉によってシングルコピーで導入された 1 株が得られた (R1)。次に、*Aaku80* 破壊の際のマーカーとして用いた *pyrG* を以後の形質転換に再利用するために、*S. cerevisiae* で報告された方法¹⁰⁾ を参考に R1 株 (*Aaku80⁻*, *pyrG⁺*) からの *pyrG* マーカーの切除を試みた。約 10⁴ 個の胞子を 5-FOA 含有培地に塗布したところ培養 10 日目において 20~30 株の 5-FOA 耐性株が出現した。得られた株をサザンブロット解析したところ、9 割以上の確率で DR 間の分子内相同組換えによって *pyrG* を含む断片の除去が起こっていることが明らかとなった。これらの DR 間の分子内組換えにより *pyrG* を失った株は、ウリジン要求性であることを確認した。これら株のうちの 1 株 (MR12) を以下の実験に用いた。

***Aaku80* 遺伝子破壊株の生理学的特徴：** MR12 株 (*Aaku80⁻*, *pyrG⁻*) とその親株である *pyrG13* 株 (*Aaku80⁺*, *pyrG⁻*) の基底菌糸伸張には有意な差は認められなかった。また、両株のコロニーを観察した結果、胞子形成能についても有意な差は見られなかった。一方、methyl methanesulfonate (MMS) に対する感受性は MR12 株の方が高く、0.05% MMS 存在下において有意な生育の差が認められた。これは *N. crassa* や *A. fumigatus* について報告された *ku* 破壊によって MMS に対する感受性が高くなるという知見と一致する^{5,9)}。

***Aaku80* 遺伝子破壊株の *argB* 座位におけるターゲティング効率：** *pyrG* をマーカーとする *argB* 破壊カセットにより *pyrG13* と MR12 をそれぞれ形質転換しウリジンを含まない培地で一次選択した。*pyrG13* 株より得られた 32 株の形質転換体のうち 1 株がアルギニン要求性を示しターゲティング効率は 3% であったのに対し、MR12 株より得られた形質転換体 31 株中 29 株がアルギニン要求性を示しターゲティング効率は 94% であった。さらに MR12 株から得られたアルギニン要求性株は、調べた限り全て *argB* 座



(図 1) *Aaku80* 遺伝子破壊とマーカーリサイクリング

位に二重交叉によってシングルコピーで導入されていることがサザンプロット解析で明らかとなった。

***pyrG*, *argB*二重欠損株の作製とDRの長さが分子内相同組換えに与える影響:** *pyrG*を選択マーカーとするマーカーリサイクリングを行うため、保持するDRの長さが異なる(20, 98, 495 bp) 3種類の*argB*破壊カセットを作製し、MR12株を形質転換した。その結果、3種類の破壊カセットによる形質転換から、それぞれ15株, 10株, 20株の*pyrG*⁺の表現系を示す形質転換体を取得した。このうち、アルギニン要求性を示した株は、それぞれ11株, 10株, 17株であった。次に、サザンプロット解析により、これらのアルギニン要求性株の中より、各破壊カセットが、相同組換えによってゲノム上に1コピーで導入されている株を同定した [mrTA1-14 (DR; 20 bp), mrTA2-1 (DR; 98 bp), mrTA3-6 (DR; 495 bp)]。その後、mrTA3-6の孢子約10⁶個を5-FOA, ウリジン, アルギニンを含む培地に塗布したところ、5-FOA耐性株が出現した。得られた10株の耐性株は全てウリジン要求性を示したことから、計画通りに*pyrG*, *argB*二重欠損株を作製できた。一方、mrTA1-14, mrTA2-1, mrTA3-6株からの5-FOA耐性株出現頻度を算出したところ、それぞれ5.7×10⁻⁶, 1.4×10⁻⁵, 1.2×10⁻⁴であり、DRが長いほど耐性株出現頻度は高かった。さらに、得られた耐性株についてのサザンプロット解析の結果、分子内相同組換えによって*pyrG*遺伝子が正しく切り出された目的の株が得られていることが明らかになった。

結論

本研究で、*A. aculeatus*においても*ku*の破壊によってターゲティング効率が飛躍的に向上することが明らかとなった。また、酵母では一般的に行われているマーカーリサイクリング法が糸状菌でも利用できることが示され、*pyrG*のように positive/negative selection が可能な変異体を取得できれば、標的となる遺伝子配列情報を利用して次々に遺伝子破壊を行うことが可能である。酵母では分子内相同組換えのためのDRの長さは20 bp程度で充分と言われているが、糸状菌ではさらに長いDRが必要と考えられていた。しかし、効率は低いものの、酵母と同程度の長さのDRでも正しく切り出された株を取得することができた。20 bpのDRでこのようなマーカーリサイクリング系を利用できることは、破壊カセットの構築の簡便化という観点から非常に有用であると考えられる。今後この技術を利用して、さらに多くの選択マーカーを付与した宿主を作製し、結晶性セルロースの効率のいい分解に必須なセルラーゼ成分を大量に生産する菌株の育種を行っていきたい。

文献

1. Murao, S., Kanamoto, J., and Arai, M.: Isolation and identification of a cellulolytic enzyme producing microorganism. *J. Ferment. Technol.*, **57**, 151-156 (1979).
2. Murao, S., Sakamoto, R., and Arai, M.: Cellulases of *Aspergillus aculeatus*. *Methods Enzymol.*, **160**, 274-299 (1988).
3. Kanamasa, S., Yamaoka, K., Kawaguchi, T., Sumitani, J., and Arai, M.: Transformation of *Aspergillus aculeatus* using the drug resistance gene of

- Aspergillus oryzae* and the *pyrG* gene of *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 2661-2663 (2003).
4. Kanamasa, S., Kawaguchi, T., Takada, G., Kajiwara, S., Sumitani, J., and Arai, M.: Development of an efficient production method for β -mannosidase by the creation of an overexpression system in *Aspergillus aculeatus*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **45**, 142-147 (2007).
 5. Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C., and Inoue, H.: Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 12248-12253 (2004).
 6. Takahashi, T., Masuda, T., Koyama, Y.: Enhanced gene targeting frequency in *ku70* and *ku80* disruption mutants of *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*. *Mol. Genet. Genomics*, **275**, 460-470 (2006).
 7. Mizutani, O., Kudo, Y., Saito, A., Matsuura, T., Inoue, H., Abe, K., and Gomi, K.: A defect of LigD (human Lig4 homolog) for nonhomologous end joining significantly improves efficiency of gene-targeting in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 878-889 (2008).
 8. Ishibashi, K., Suzuki, K., Ando, Y., Takakura, C., Inoue, H.: Nonhomologous chromosomal integration of foreign DNA is completely dependent on MUS-53 (human Lig4 homolog) in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 14871-14876 (2006).
 9. Krappmann, S., Sasse, C., Braus, G. H.: Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end-joining-deficient genetic background. *Eukaryot. Cell*, **5**, 212-215 (2006).
 10. Akada, R., Kitagawa, T., Kaneko, S., Toyonaga, D., Ito, S., Kakihara, Y., Hoshida, H., Morimura, S., Kondo, A., and Kida, K.: PCR-mediated seamless gene deletion and marker recycling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **23**, 399-405 (2006).