



Self-excising Cre/mutant *lox* marker recycling system for multiple gene integrations and consecutive gene deletions in *Aspergillus oryzae*

麴菌において多重遺伝子導入・破壊を可能とする自己切断型 Cre/*lox* 選択マーカーリサイクリングシステムの構築

(JBB, Vol. 123, No. 4, 403–411, 2017)

張 斯来^{*1,a}・伴 暁彦^{1,b}・江原 直樹^{1,c}・水谷 治^{2,d}
田中 瑞己^{1,e}・新谷 尚弘¹・五味 勝也¹

麴菌は多数の二次代謝関連遺伝子を有しているものの、その多くはきわめてわずかにしか発現していないため、二次代謝化合物生産のクリーンホストとしての利用が期待されている。二次代謝化合物は多くの生合成遺伝子から構成されており、これらの遺伝子をすべて導入する必要がある。また、麴菌のゲノム塩配列が決定されて、約12,000遺伝子が明らかになったが、その多くは機能未知の遺伝子である。これらの遺伝子の機能を解析するため、多重遺伝子の破壊などが必要である。しかし、生合成遺伝子群を個別に麴菌に導入する場合や遺伝子多重破壊にあたり、もっとも問題となるのは利用できる選択マーカーの数である。そのため、筆者らは変異型 *lox* 配列を用いた Cre/*lox* システムによる選択マーカーリサイクリングシステムを開発してきた¹⁾が、望まない Cre 反応を完全に抑制するために、選択マーカーと Cre 発現カセットを同時に脱落させる自己切断型選択マーカーカセットを用いた多重遺伝子導入・破壊システムを構築した。

形質転換マーカーとして、*Aspergillus nidulans* の *adeA* と麴菌のキシラナーゼ遺伝子 (*xynG2*) プロモーターに連結した Cre 発現カセットを同時に脱落させるため、両者を変異型 *lox* 配列で挟んだプラスミドの構築を試みた。しかし、大腸菌内で Cre 反応が生じてしまい、マーカーと Cre 発現カセットが切り出されたプラスミドのみが得られた。そこで、大腸菌内での Cre 発現を抑えるために Cre 遺伝子内に人為的にイントロンを挿入したところ、目的のプラスミドを取得することができた。作製したプラスミドを *adeA* 破壊株に導入し、得られた形質転換体をグルコースおよびキシロースを炭素源とした培地で培養後、ゲノム PCR を行った結果、Cre 誘導条件で *adeA* マーカーと同時に Cre 発現カセットも脱落していることが確認された。しかし、麴菌内でリサイクリングプラスミド

が *xynG2* プロモーターの位置に挿入されて、選択マーカーと Cre 発現カセットが脱落されない形質転換体も得られた。そのため、Cre 発現のための条件的発現プロモーターとして *Penicillium chrysogenum* の *xylP* 遺伝子のプロモーターを使用することとした。*xylP* 遺伝子のプロモーターを用いたりサイクリングプラスミドを構築し、*adeA* 破壊株に導入した。得られた形質転換体は Cre 誘導条件で *adeA* マーカーと同時に Cre 発現カセットも脱落していることが確認された。また、PCR でマーカーの脱落が確認された株の表現型を調べた結果、*adeA* 破壊株と同様に YPD 培地上で赤色を呈し、アデニン要求性を示した。以上のことから、自己切断型選択マーカーカセットを用いたマーカーリサイクリングシステムの構築に成功したことが示された。このシステムでは高効率で選択マーカーと Cre 発現カセットを脱落させられることから、野生株でも使用できるように *adeA* の代わりにピリチアミン耐性を付与できる *A. nidulans* の *ptrA* に置換した自己切断型選択マーカーカセットも構築した。

構築したシステムを用いて麴菌の持つコウジ酸生合成酵素遺伝子 *kojA*、*kojT* 高発現株を作製し、コウジ酸の生産性を調べた結果、コウジ酸の生産が著しく向上した。一方、*kojA* 高発現株を宿主株とし、本システムを用いた *kojT* の破壊にも成功した。作製した *kojA* 高発現・*kojT* 破壊株ではコウジ酸の生産が見られたものの、*kojA* 単独高発現株より生産量が著しく低下したことから、*kojT* 遺伝子がコウジ酸の分泌高生産に大きく寄与していることがあらためて示された。今後、本システムを用いることにより、通常条件下では十分量生産されないような異種由来の有用物質を迅速かつ容易に高生産することや機能未知遺伝子の解析への利用が期待される。

1) 江原直樹ら：生物工学, 90, 298 (2012).

*著者紹介 東北大学 (現, 神戸大学科学イノベーション研究科 学術研究員) E-mail: zhangsilai@people.kobe-u.ac.jp
¹東北大学, ²酒類総合研究所, ^a現, 神戸大学, ^b現, 中外製薬, ^c現, 味の素, ^d現, 琉球大学, ^e現, 静岡県立大学
生物工学 第97巻 第2号 (2019)