

# 麹菌における多様な醸造実用株の機能開発を 可能とするゲノム編集育種

丸山 潤一\*・片山 琢也

## はじめに

麹菌 *Aspergillus oryzae* は古くより日本の伝統的醸造産業において、日本酒・醤油・味噌の製造に使用されてきた。また、大量のタンパク質を培地中に分泌する能力をもとに異種タンパク質生産の宿主として利用され、さらに最近では天然物の異種生産の利用への可能性が示されている。このように麹菌は、醸造にはもちろんのこと、物質生産においても有用な微生物として利用されている。

醸造をはじめとする産業利用において、麹菌の機能開発を目指した育種は重要である。微生物の育種方法としては、変異育種が代表的なものとしてあげられよう。ところが、麹菌は菌糸のみならず無性胞子である分生子も多核であり<sup>1)</sup>、一つの核に変異が導入されても同じ細胞内に他の核も存在するため目的の形質が現れにくい。そして、目的の形質を得るためには変異処理を強くする必要があり、生育や分生子形成効率の低下などの二次的な影響が生じてしまうという難点がある。また、麹菌ではこれまで有性世代が見つかっておらず、有性生殖による交配育種が不可能である。

1987年に形質転換技術が確立されたのを契機に<sup>2)</sup>、麹菌は遺伝子操作による分子育種の時代に入った。その後、種々の栄養要求性を利用することで宿主・ベクター系が確立され<sup>3)</sup>、さまざまな方法で遺伝子操作ができるようになった。そして、麹菌の全ゲノム配列が2005年に解読され、12,074個の遺伝子が存在することが明らかになり<sup>4)</sup>、麹菌の分子育種の標的となる遺伝子の探索ができるようになった。また2006年以降、非相同末端結合に関与するKu70やLigDの欠損により、麹菌の遺伝子破壊効率が飛躍的に向上し<sup>5,6)</sup>、遺伝子の機能解析が大きく進展した。たとえば筆者らは、タンパク質分泌輸送に関連する遺伝子を改変することにより、異種タンパク質生産量の増加に成功した<sup>7-9)</sup>。さらに、形質転換マーカーのリサイクリング技術を利用した多重遺伝子破壊技術により<sup>10,11)</sup>、プロテアーゼ遺伝子10重破壊を行うことで、もとの株の3~4倍の異種タンパク質生産量を示す株を育種した<sup>12)</sup>。

以上のような麹菌における遺伝子機能解析や機能開発

を目指した遺伝子改変は、もともとは産業的に使用されておらず、実験室での解析に適した野生株であるRIB40株に限定されていた。しかし実際に麹菌では、多様な特性をもつ膨大な数の醸造実用株が存在し、これらが醸造や酵素生産などさまざまな用途に応じて使い分けられている。これらの株の醸造特性の遺伝的解析や優良な性質をもつための分子育種には遺伝子操作技術が必要となるが、一つひとつの実用株において宿主・ベクター系を構築して遺伝子改変を行うには多大な労力と時間を要する。

本稿では、麹菌の多様な醸造実用株の遺伝子改変を劇的に改善したゲノム編集による遺伝子改変技術について述べる。

## ゲノム編集技術による麹菌への高効率変異導入

2000年代前半より、細菌由来のヌクレアーゼ（DNA切断酵素）を用いて標的遺伝子を書き換えるゲノム編集技術が開発され、微生物から高等生物まで広範な生物に利用されるようになってきた。この技術は、ゲノム上の標的とする部位をヌクレアーゼで切断することにより、切断部位での変異導入を誘発する方法である。なかでも、CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR-associated proteins 9) システムは、もっとも低コストで簡便な手法であり、動物や植物など多くの生物の遺伝子改変で利用され、医療や農業への応用が期待されている。CRISPR/Cas9システムでは、ヌクレアーゼとして主に細菌 *Streptococcus pyogenes* 由来のCas9とガイドRNAを用いる。

CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集の原理を、図1に示す。まず、ゲノム上の標的とするDNA配列に相補的に結合するガイドRNA、およびその配列の直後に存在するprotospacer adjacent motif(PAM)配列(NGG)によって、Cas9が標的配列にリクルートされる。その後、Cas9が標的としたDNA領域で2本鎖切断を起こして、非相同末端結合によって修復される過程で変異が導入される。

筆者らは、麹菌において初めて、CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集技術を利用した変異導入法を確立した<sup>13)</sup>。CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集技術

\* 著者紹介 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 (特任准教授) E-mail: amaruju@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

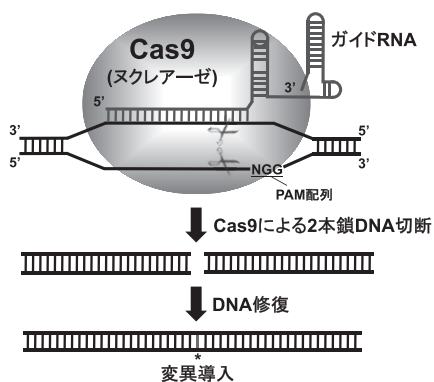


図1. CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集の原理

を確立する際に、Cas9をコードする遺伝子を麹菌での発現に適したコドンに改変した。Cas9を核に局在させるために、N末端C末端両方に核移行シグナルSV40 NLSを付加した。そして、標的遺伝子に変異を導入するため、そのコード領域内よりPAM配列の直前に位置する20～21塩基の標的配列を選択し、この配列を含むガイドRNAについて、核内低分子RNAをコードするU6遺伝子のプロモーターとターミネーターの制御下で発現するようにした。Cas9およびガイドRNAを発現するゲノム編集プラスミドを導入することにより、従来は遺伝子操作がきわめて困難であった麹菌の実用株において、遺伝子改変効率を向上させることに成功した。例として、もともと緑色である麹菌の胞子の色を制御する遺伝子の標的配列に変異を導入すると、白色や黄色の胞子を形成する麹菌を取得することができる(図2)。

しかしこの時点で、変異株の取得効率は10～20%と比較的低かった。さらに、ゲノム編集プラスミドの導入のために栄養要求性株(このときは、硝酸塩資化に関与する*niaD*遺伝子の欠損株)の作製が必要であり、産業で使用されている麹菌株にゲノム編集を適用するには労力が必要であった。

そこで以降は、形質転換マーカーとしてピリチアミンに対する薬剤耐性遺伝子*ptrA*を用いることにした。これにより、麹菌のさまざまな実用株において、形質転換のために栄養要求性の宿主を取得する必要がなくなった。さらに、プラスミドの自律複製を可能とする*Aspergillus nidulans*由来のDNA断片AMA1の半分の領域を挿入した。作製したプラスミドを用いて変異導入を試みた結果、野生株RIB40および日本酒製造用株RIB128、醤油製造用株RIB915において50～100%の高い割合で変異株を取得することに成功した<sup>14)</sup>。

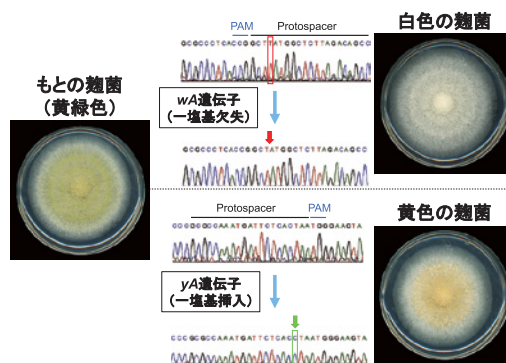


図2. 麹菌におけるCRISPR/Cas9システムによるゲノム編集技術の確立

### ゲノム編集による多重遺伝子改変技術の確立

産業で使用される株は通常、多段階の遺伝子改変過程を経て優良な性質をもつ株として育種される。CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集技術の利点の一つとして、別々の遺伝子を標的とするガイドRNAを同時に発現させることで、一度に複数の遺伝子に変異を導入できることがあげられる。しかし、同時に改変する遺伝子の数が増えるに従い、その効率が低下するために、一度に改変できる遺伝子の数には限りがある。また、多段階で複数の遺伝子を改変するためには、その都度、導入したゲノム編集プラスミドを除去しなければならない。

そこで、多重変異導入を同一の株で行うことを目的として、麹菌のゲノム編集に対応したプラスミドリサイクリング技術の確立を試みた。糸状菌において自律複製プラスミドを強制的に脱落させる報告はこれまでになく、さらには形質転換マーカーとして使用する薬剤耐性遺伝子を再利用する手法の開発はなされていなかった。そこで、過剰発現すると生育阻害を示す遺伝子を使用することにした。筆者らは以前、麹菌の分化器官の一つである菌核の形成機構の解明を目的として、転写因子欠損株ライブラリーを用いたスクリーニングを行い、欠損すると菌核形成が顕著に促進されるAoAce2を見いだした<sup>15)</sup>。この機能を解析する過程で、炭素源の違いによって誘導・抑制が可能な $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子*amyB*プロモーター制御下でAoAce2を発現させる実験を行った。その結果、炭素源にグリセロールを用いた発現抑制条件では影響はなかったが、発現を誘導するデキストリンを用いた場合に生育が著しく阻害された<sup>14)</sup>。

以上の知見を利用して、麹菌の自律複製型ゲノム編集プラスミドのリサイクリングによる多重遺伝子改変技術を確立した(図3)。*amyB*プロモーター制御下で発現するようにしたAoace2遺伝子を、ゲノム編集プラスミド

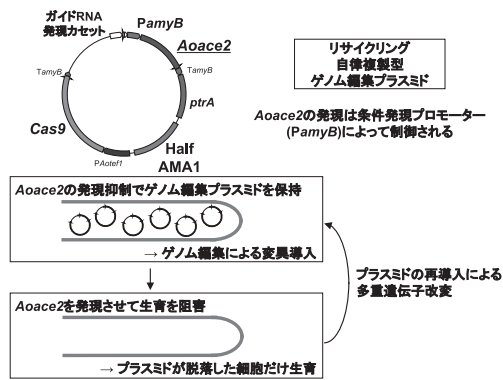


図3. 自律複製型ゲノム編集プラスミドのリサイクリングによる多重変異導入技術

に挿入する。そのプラスミドを使用して、ピリチアミン存在下で麹菌に対して形質転換を行い、マーカーである *ptrA* 遺伝子により耐性となった形質転換体を取得する。最初は、*Aoace2* の発現を抑制した状態でプラスミドを保持させ、その間にゲノム編集による変異導入を行う。目的の変異株が取得できたら、そのゲノム編集に使用したプラスミドは不要となる。そこで、*amyB* プロモーターの発現を誘導する炭素源に代えて *AoAce2* を過剰発現することで、生育阻害を起こす。その際に、プラスミドが脱落して生育した株を選択するが、実際に、ピリチアミンを含む培地では感受性を示すために生育できず、サザン解析でプラスミド由来のDNA断片が検出されないことを確認している。そして、次の標的とする遺伝子に変異を導入するための、ゲノム編集プラスミドを用いて形質転換を繰り返すことにより、多重変異株の取得が可能となる。これまでに、麹菌野生株 RIB40、日本酒製造用株 RIB128 など複数の株で、ゲノム編集プラスミドのリサイクリングによる多重変異株の取得に成功した<sup>14)</sup>。ここで特筆すべきは、最終的に取得される変異株では、外来DNAを含むゲノム編集プラスミドは脱落して存在しないのに対し、標的とする遺伝子に変異が導入されたままの状態であることである。すなわち、ゲノム編集プラスミドのリサイクリング技術を利用すると、自然界で起こる突然変異で得られるのと同様の変異株を効率的に取得することが可能である。

さらに、ゲノム編集プラスミドとともにドナーDNAを同時に導入することで、麹菌において標的とする部位の相同組換えを効率よく行うことが可能になった<sup>14)</sup>。すなわち、標的の遺伝子を破壊するノックアウト、標的とする染色体部位に外来遺伝子を挿入するノックインができる(図4)。ここでは、ゲノム編集プラスミドの導入には形質転換マーカー(薬剤耐性遺伝子)を使用するが、

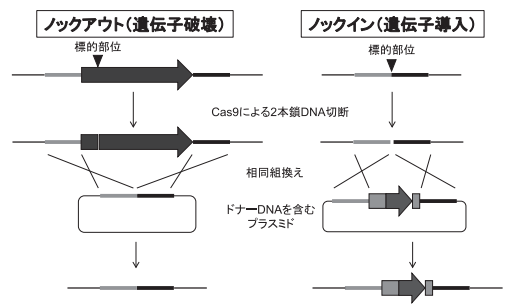


図4. ゲノム編集によるノックアウトとノックインの模式図。ゲノム編集プラスミドとともにドナーDNAを含むプラスミドにより形質転換することで、標的部に形質転換マーカーを挿入することなしにノックアウト・ノックインができる。

標的とする遺伝子座や染色体部位に形質転換マーカーを挿入しなくても、高効率でノックイン・ノックアウトが可能である。従来はノックアウトとノックインの効率を向上させるために、標的とする遺伝子座に形質転換マーカーを挿入する必要があったことを考えると、まさに革命的な遺伝子改変の方法論である。

以上のようなゲノム編集プラスミドのリサイクリングによって、麹菌において形質転換マーカーの数を気にすることなく、無制限の遺伝子改変が可能となった。

### ゲノム編集で明らかとなる麹菌株の多様性

以上に述べたゲノム編集技術を発展させることにより、麹菌の醸造実用株における高効率の遺伝子改変が可能になった。これを利用して、同じ遺伝子を破壊しても、麹菌の株によって異なる表現型を示すという現象が見いだされた。

その例は、糸状菌の分化器官の一つである菌核の形成に関与する遺伝子の破壊である。菌核は気中菌糸が凝集して形成する耐久性の構造である。一部の糸状菌が無性的に分化して形成する構造であるが、さらには菌核の内部で有性生殖器官が形成されることが報告されている。有性世代が見つからない麹菌における有性生殖の試みでは、菌核形成能力が低いもしくは菌核を形成しないことが課題である。筆者らは、菌核形成能力を向上させる目的で、この形成を負に制御する転写因子をコードする *ecdR* 遺伝子を複数の麹菌株において破壊した。野生株である RIB40 株は少ないながらも菌核を形成するが、*ecdR* 遺伝子の破壊により多くの菌核を形成ようになった(図5)。これは、*ecdR* 遺伝子の機能から予想どおりの結果であった。さらに、これまでまったく菌核形成ができなかった日本酒製造用株 RIB128 と醤油製造用株 RIB915 において、*ecdR* 遺伝子の破壊を行った。その結

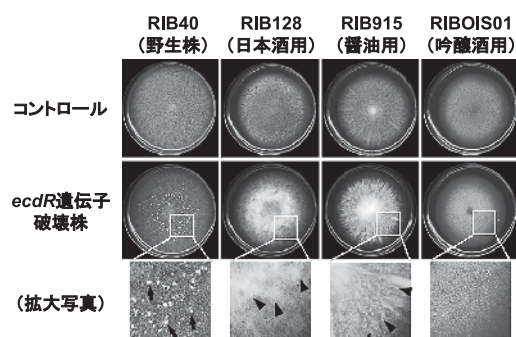


図5. 麹菌実用株での *ecdR* 遺伝子破壊. 矢印は菌核, 矢頭は菌核形成の初期段階と考えられる気中菌糸が凝集した構造. スケールバーは5 mm.

果, 菌核形成の初期段階と思われる気中菌糸の凝集が見られるようになり (図5)<sup>16)</sup>, 菌核形成能を付与できる可能性が示された. 一方で, 吟醸酒製造用株RIBOIS01では, *ecdR* 遺伝子破壊によって菌核形成につながる形態的变化はまったく見られなかった (図5)<sup>16)</sup>. このような同じ遺伝子の破壊にも関わらず異なる表現型が得られるという現象は, 醸造の各用途に特化するよう育種された麹菌の株ごとの遺伝的特性の多様性を示している.

最近筆者らは, 麹菌の株の組合せによって融合体が存在できない不和合性という現象を発見した<sup>17)</sup>. アカパンカビなど少数の糸状菌においては, *het* (heterokaryon incompatibility) 遺伝子の配列多型が不和合性を決定することが明らかにされている. しかし, このような知見がそのまま他の糸状菌で適用された例はないことから, 糸状菌の不和合性のメカニズムは多様で, 種によって異なる様式で獲得された可能性がある. 不和合性を説明する遺伝的なメカニズムを解明するためには, さまざまな麹菌株を対象とした遺伝子機能解析が必要であり, これにゲノム編集技術が貢献することが期待される.

### おわりに

筆者らはCRISPR/Cas9システムを利用したゲノム編集を発展させることで, 麹菌における高効率の多重遺伝子改変技術を確立した. 同時に, 従来は遺伝子操作が困

難であった麹菌の醸造実用株において, 形質転換用の栄養要求性株の取得も, 非相同組換えに関与するKu70やLigDを欠損させる必要もなく, 多重の遺伝子改変を効率よく行うことができるようになった. ゲノム編集技術の利用により, 今後, 膨大な数にのぼる麹菌の醸造実用株の遺伝的特性に関する新しい知見が集積することが期待される. 近年は次世代シーケンサーによってゲノム配列情報が入手できることから, 麹菌各株の特性と遺伝子機能を結びつけることが容易になるであろう. そのような知見をもとに, 醸造実用株の潜在的な能力を開発すれば, 用途に即した機能開発が可能となる. すなわち, 真の意味での醸造の現場における麹菌育種の時代に入ったと言えよう.

### 文 献

- 1) Maruyama, J. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1504 (2001).
- 2) Gomi, K. *et al.*: *Agri. Biol. Chem.*, **51**, 2549 (1987).
- 3) Jin, F. J. *et al.*: *FEMS Microbiol. Lett.*, **239**, 79 (2004).
- 4) Machida, M. *et al.*: *Nature*, **438**, 1157 (2005).
- 5) Takahashi, T. *et al.*: *Mol. Genet. Genomics*, **275**, 460 (2006).
- 6) Mizutani, O. *et al.*: *Fungal Genet. Biol.*, **45**, 878 (2008).
- 7) Yoon, J. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 5718 (2010).
- 8) Yoon, J. *et al.*: *PLoS ONE*, **8**, e62512 (2013).
- 9) Hoang, H. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 533 (2015).
- 10) Maruyama, J. and Kitamoto, K.: *Biotechnol. Lett.*, **30**, 1811 (2008).
- 11) Maruyama, J. and Kitamoto, K.: *Methods Mol. Microbiol.*, **765**, 447 (2011).
- 12) Yoon, J. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**, 747 (2011).
- 13) Katayama, T. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **38**, 637 (2016).
- 14) Katayama, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **85**, e01896 (2019).
- 15) 中村英淳ら: 日本生物工学会大会講演要旨集, p. 89 (2015).
- 16) Nakamura, H. *et al.*: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **63**, 172 (2017).
- 17) Okabe, T. *et al.*: *Sci. Rep.*, **8**, 2922 (2018).