

令和元年6月7日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14887

研究課題名(和文)糸状菌の遺伝子組換えを革新的に変えるマルチコピー遺伝子導入法の開発

研究課題名(英文)Development of novel multi-copy gene integration method in genetic engineering of filamentous fungi

研究代表者

若井 暁(Wakai, Satoshi)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命准教授

研究者番号：50545225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌の一種である麹菌はコトランスフォーメーション法によりマルチコピーで外来遺伝子をゲノム上に導入することが可能である。これまで、シングルベクター導入法よりもマルチコピーで導入されることが分かっていたが、その数をコントロールしたり、導入遺伝子がゲノム上のどの位置に入っているかは明らかになっていなかった。本研究において、導入遺伝子の末端配列を改変することでコピー数の多型性が変わることを明らかにし、また、ナノポアシーケンス解析を導入することでコピー数の異なる様々な形質転換体の遺伝子導入部位を明らかにし、これまでにないタンデムリピート構造の人為的創出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、持続可能な社会の形成を目指して、合成生物学の分野の研究が進められている。合成生物学分野では、種々の遺伝子組み換え技術を用いて、有用で安全な微生物をさらに有用な微生物へと育種し、様々な有用物質を生産することが求められている。本研究では、日本において1000年以上の食文化での使用実績がある麹菌の安全性とポテンシャルに可能性を見出し、複雑な遺伝子改変を小さな労力で達成し、迅速に有用な遺伝子組換え麹菌を作成する技術の作成を目指した。結果として、コピー数多型をコントロールする技術や生体内で数10kbを越える長鎖DNAを合成する技術の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Filamentous fungus *Aspergillus oryzae* can be genetically engineered by co-transformation. In co-transformation, external gene fragments are integrated at random and at multiple copy on the chromosome. Therefore, positions and copy number of integrated genes are unknown and uncontrollable. In this study, I revealed that copy numbers of integrated genes in the co-transformation was altered depending on the edge sequences of integrated gene fragment. Furthermore, I successfully determined the position and copy number of integrated genes on the chromosome of some genetically engineered strains using nanopore sequencer MinION, and firstly detected long tandem repeat structure of integrated genes at length in over 50~100 kb. In the future, this result will contribute to develop in vivo construction method of artificially designed long chain DNA fragment in eukaryotic cell.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Aspergillus oryzae ナノポアシーケンス ゲノム構造 遺伝子組換え タンデムリピート 長鎖DNA合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の形質転換は分子ツールが潤沢ではないため、遺伝子工学的改変に多くの制限を受ける。例えば、プラスミドを安定的に保持させることが難しく、大腸菌などのようにハイコピープラスミドと強力なプロモーターを用いて遺伝子産物を高発現させることが難しい。一方、マーカーリサイクリング手法や高効率な相同組換え手法の開発は進められている。

麹菌の形質転換には、ベクターインテグレーション型とコトランスフォーメーション型導入がある。後者では、マルチコピーで遺伝子が導入されることは経験的に知られているが、遺伝子導入数と導入部位について体系的に調べた報告は無い。このマルチコピーでの遺伝子導入は、強いプロモーターと同時に使用することで遺伝子産物を高発現させることを可能にするだろう。実際、麹菌にセルラーゼ遺伝子をマルチコピーで導入し、ベクターインテグレーション型形質転換で作成した株よりもセルラーゼ活性を 10 倍高くすることに成功している。

これを単なる経験則として伝承させるだけでなく、分子的に理解して体系的に利用することが麹菌の遺伝子改変技術を格段に向上させると考えている。著者は、上記のセルラーゼ遺伝子をマルチコピーで導入した株を作成する際に、挿入遺伝子断片の両末端に位置するプロモーターとターミネーターによって導入遺伝子コピー数が大きく変わることを見出している。これらの株を用いて遺伝子の導入部位の特定とその導入部位を足場として相同組換えすることで部位特異的マルチコピー導入が可能になると考え、新しいマルチ遺伝子破壊法や多種類遺伝子の新しい同時導入法の確立を目指すこととした。

2. 研究の目的

コトランスフォーメーションによるマルチコピー遺伝子導入方法は、物質生産を担う有用株を育種する上で以前から使われてきた方法ではあったが、その分子メカニズムの理解は進んでいない。コトランスフォーメーションによるマルチコピー遺伝子導入は、基本的に非相同組換えである。非相同組換えは、文字通り非相同な部分と組換えを起こすものであるが、その組換えが完全にアトランダムなものであるのか、ある程度の法則性(導入部位偏重)を持っているのか、明らかにした研究はない。したがって、コトランスフォーメーション時の導入コピー数に関わる要因を洗い出し、また、これまでに構築したマルチコピー遺伝子導入麹菌のゲノム解析による導入遺伝子の場所と数を明らかにし、新しいマルチ遺伝子破壊法や多種類遺伝子の新規同時導入法の開発を目指すこととした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子組み換え麹菌のゲノム解析

これまでに構築した形質転換体の中でも特にコピー数が多いものを解析株とした。ロングリード解析には、解析対象となる DNA 分子が長鎖である必要があり、ビーズビーティング等の激しい物理破砕方法では DNA 分子がせん断されるため、液体窒素中で糸状菌菌体をすり潰し、フェノール・クロロホルム法により DNA を抽出した。DNA 溶液は市販の DNA 抽出キットのカラムを通すことで不純物を除去し、BluePippin により長鎖 DNA を回収し、1D キットを用いてナノポアシーケンサ MinION を用いて解析した。Albacore を用いて fast5 ファイルから fastq ファイルを

(2) 非相同的組換えにおける導入部位偏重の解析

得られた fastq ファイルに対して、canu による de novo アセンブル、minimap2 および samtools-1.3 を用いてマッピング等を行い、IGV を用いて可視化した。

(3) 非相同組み換えに

これまでに、同じ遺伝子配列であってもプロモーターとターミネーター配列、すなわち、導入遺伝子断片の末端配列が変わることで形質転換効率が変わることを判っていた。そこで、末端配列のどの部分までが影響するかを調べるために、末端配列に 30~200bp の付加配列を付けてコトランスフォーメーションを実施した。形質転換効率および導入コピー数を調べた。導入コピー数は定量 PCR にて実施した。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンス解析による導入部位の特定

研究開始当初の予定としては、すで実績のあった次世代シーケンサ (MiSeq) を用いたリシーケンスを考えていたが、超並列ショートリード解析の場合、ゲノム上の導入部位を特定することは可能であるが、導入遺伝子が並んでいたり、タンデムリピート構造を取っていたりする場合には、その構造やコピー数を調べることが難しいという問題が生じた(図 1)。そこで、

Integration sites => OK

Direction => OK

(but only single)

Structure => NOT

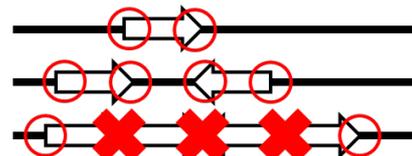


図 1. 超並列型ショートリードシーケンスが苦手なゲノム構造

近年、技術開発が進んでいるロングリード解析が可能なナノポアシーケンサを導入することとした。

ロングリード解析には鎖長の長い DNA が必要であるため、菌糸からの DNA 抽出法について検討を行い、液体窒素中ですり潰しフェノール・クロロホルム法で抽出することとした。長鎖 DNA 分子の精製を行わずに解析を実施した場合、リード全体の 25% が 1000 bp 以下の鎖長となってしまった為、さらに、DNA 抽出過程で生じる短い断片を除去し、長鎖 DNA を濃縮する目的で BluePippin を用いることとした。0.75% アガロースゲルカセットを用いて、6 kbp 以上の DNA 分子を標的として分取し、この長鎖 DNA 溶液 (約 5 μg) をテンプレート DNA として、Ligation Sequencing Kit 1D (SQK-LSK108) を用いてライブラリーを調製し、Flow cell 11 (R9.4.1) を用いて MinION により解析を実施した。

解析対象とした株は、それぞれ異なるプロモーター/ターミネーターセットを有する三種セルラーゼ (セロビオハイドロラーゼ [CBH]、エンドグルカナーゼ、 α -グルコシダーゼ) をタンデムに並べた DNA 断片を導入された株、それぞれ異なるプロモーター/ターミネーターセットを有する三種セルラーゼをバラバラの遺伝子断片として導入された株、異なるプロモーター/ターミネーターセット (PsvaA/TsvaA、PhlyA/ThlyA、および、PsodM/Tglab) を持つ CBH 遺伝子断片をそれぞれ導入された三株の合計五株とした。それぞれの株について、100 万 ~ 200 万リード、平均鎖長 1,000 ~ 4,000 bp、総塩基長 5 ~ 10 Gbp の解析量を得た。

canu を用いて de novo assembly を実施した結果、いずれの株においてもゲノム全体をカバーする contig が得られ、D-Genies を用いたドットプロット解析の結果、多くの contig において、セントロメアを含む染色体一本に相当していた (図 2)。得られた contig の配列と、レファレンスとの相同性は、99.9% 以上となっており、ナノポアシーケンサの解析精度の低さを十分にカバーする結果となった。しかしながら、SNP 解析には不十分な精度であり、ナノポアシーケンサからの配列だけでアセンブルした場合には、ある程度の大きさの欠失や挿入、重複、反転等のゲノム構造変化の解析にとどめる必要が現状ではあるだろう。

次に、*A. oryzae* RIB40 株のゲノム配列をレファレンスとしてリードのマッピングを実施し、セルラーゼ遺伝子の導入部位の確認を行った。全リードをマッピングした場合、セルラーゼ遺伝子の導入部位を特定することが難しかったので、図 3 に示すスキームでセルラーゼ遺伝子配列を含むリードのみを抽出して、再度 RIB40 株の配列にマッピングすることで、セルラーゼ遺伝子と *A. oryzae* ゲノム配列を含むキメラ断片により導入部位の同定に成功した。

染色体上での導入部位はこれまでゲノム全体に割って複数個所で導入されていると予想していたが、ほとんどの断片が染色体上の一か所に集約的に導入されていることが判った。また、導入部位では RIB40 株では遺伝子がアノテーションされており、遺伝子の全体あるいは部分欠失が生じていた。また、導入遺伝子が 50 kbp 以上に渡ってロングタンDEMリピート構造を形成しており、このロングタンDEMリピート構造中に部分的に欠失を起こした断片ユニット、反転方向断片、栄養要求性相補遺伝子を含むベクター配列を含むことが判った (図 4)。最も長いインサート構造では、CBH 遺伝子が同方向に 26 コピー以上連なったロングタンDEMリピート構造も見られ、総長で 100 kbp を超える挿入配列になっていると予想された。これらの超ロングタンDEMリピート構造はこれまでに報告がなく、ナノポアシーケンサを用いた複数株のゲノム構造解析の結果、コトランスフォーメーションでこのような構造が頻繁に形成されていることが初めて明らかにされた。一

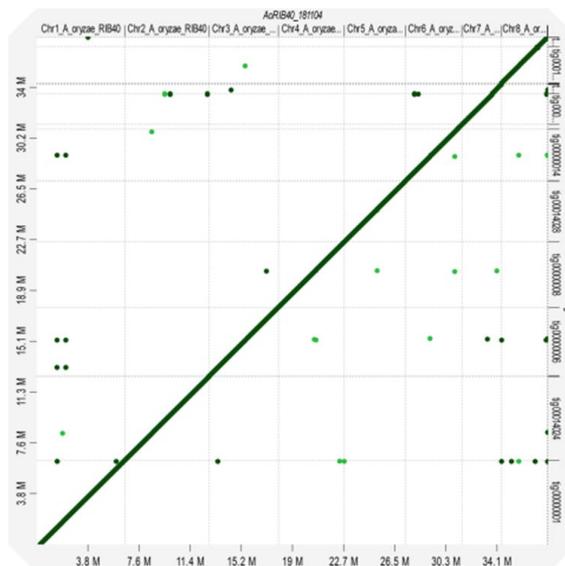


図 2 . RIB40 株と NS1-3 株の Dot plot 解析

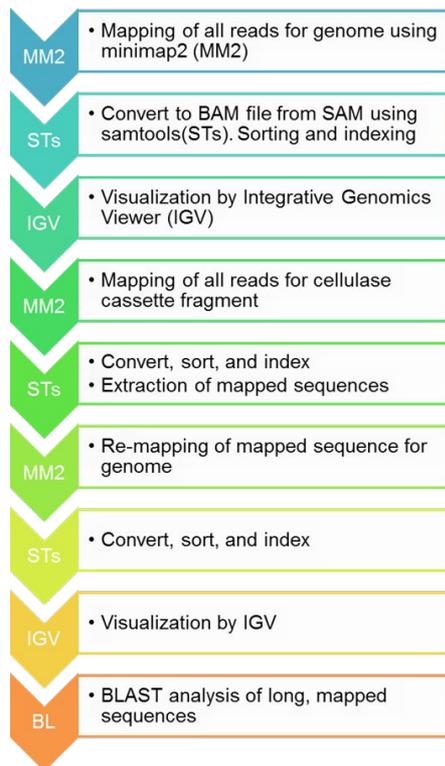


図 3 . リード配列の解析スキーム

方で、これらの超ロングタンデムリピート構造が原因となり、canu による de novo assembly で完全な染色体をカバーする contig が得られないという結果にもなっている。完全長 contig の解読には、より鎖長の長い DNA 分子を標的とした解析が必要となるだろう。

(2) 非相対的組換えにおける導入部位偏重の解析

著者はこれまでに多数の遺伝子組み換え麹菌を構築しており、それらを構築する過程で様々なコピー数で導入遺伝子を持っている株を見つけている。同じ方法で形質転換を実施しているのに、形質転換体を得難い系や形質転換体が安定的に取れるがコピー数は少ない系などが存在し、この原因が何にあるのかはこれまで分かっていなかった。本研究では、これらの形質転換効率や導入遺伝子コピー数に影響する因子を洗い出すために、導入遺伝子の末端配列の影響を検討した。

これまでの研究成果で明らかとなっていたコピー数の多型性が顕著なプロモーター/ターミネーター配列の末端 30~200 bp を他のプロモーター/ターミネーターの外側に付与することで作製した DNA 断片を用いてコトランスフォーメーションを実施した。コピー数が多くなる一方で形質転換体数が少なくなる傾向にある PhlyA/ThlyA セットの外側に、コピー数が少なくなるが形質転換体数が増える傾向にある PsodM/TglA_B セットの配列を付与した結果、30 bp よりも 100 bp の断片を付与した場合に有意に形質転換体数が増加した。また、PhlyA/ThlyA と同様の傾向を示す PsvaA/TsvaA の配列を付与した場合は、形質転換体数が増加しなかった。これらの結果より、PsodM/TglA_B の末端 100 bp が形質転換体形成効率の向上に寄与すると考えられる。さらに、PsodM/TglA_B の配列特性を調べた結果、PsodM の末端部分において顕著に GC 含量が低いことが判った。A. oryzae のゲノム全体の GC 含量は 48.3% であるが、PsodM の末端 100 bp は 38.0% しかない。一方で、PhlyA や PsvaA では、48.0% および 52.5% となっており、ゲノム全体の GC 含量と近く、ターミネーター側ではいずれも、34~40% と低い傾向にあるので、PsodM の低い GC 含量が形質転換体形成効率の向上に寄与しているかもしれない。また、(1)の研究結果から明らかになったように、コトランスフォーメーションでは導入部位の遺伝子が一部欠失することが見受けられるため、形質転換体形成率が悪い場合は、ハウスキーピング遺伝子を欠失させてしまう可能性が高く、形質転換体に対する致命的な影響が出ている可能性が考えられる。

以上の結果より、コピー数の多い形質転換体を得たい場合には、麹菌のゲノム GC 含量に近い配列を付与し、効率的に形質転換体を得たい場合には末端に低 GC 含量の配列を付与することで、形質転換体形成効率やコピー数をコントロールできる可能性が示された。

(3) 将来展望

本研究において、物質生産用有用株の構築過程で得られた複数の遺伝子組み換え麹菌のゲノム構造をナノポアシーケンサを用いて解析することで、これまでに明らかにならなかったコトランスフォーメーションにより構築された形質転換体内での導入遺伝子の場所や数、形状について詳細に明らかにすることに成功した。また、ただその構造を明らかにしただけでなく、染色体上の一か所に集約的にロングタンデムリピート構造で導入されていることを明らかにした。これまで、導入数については、定量 PCR やサザンブロット解析で測定されてきたが、完全長の遺伝子が入っているかどうか、どこに入っているかは分からなかったし、ゲノムシーケンスで多用されている超並列型ショートリード解析では、今回発見されたロングタンデムリピート構造の可視化は困難を極めたと考えられる。

本研究で得られた成果は、遺伝子組み換え微生物のゲノム構造解析に対するナノポアシーケンサの有用性だけでなく、糸状菌を用いて外部から導入した遺伝子断片を自動でアセンブルする新しい長鎖 DNA 合成技術に資する可能性がある。今後は、新しい長鎖 DNA 合成技術に向けた技術開発、および、超マルチコピー形質転換体をホストとした相同組み換えによる超並列型有用遺伝子多重導入方法の開発を目指す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Satoshi Wakai, Nanami Nakashima, Chiaki Ogino, Hiroko Tsutsumi, Yoji Hata, and Akihiko Kondo. Modified expression of multi-cellulases in a filamentous fungus *Aspergillus*

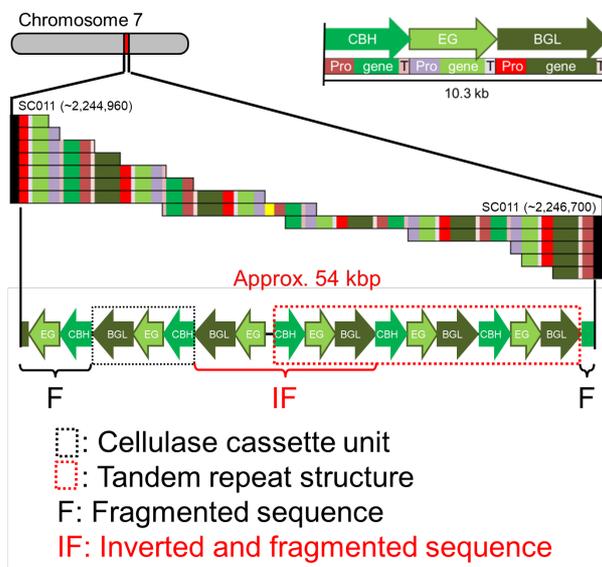


図 4. NS1-3 株におけるロングタンデムリピート構造

oryzae. *Bioresource Technology*, 276, 146-153 (2019)

doi:10.1016/j.biortech.2018.12.117

Satoshi Wakai, Takayoshi Arazoe, Chiaki Ogino, and Akihiko Kondo. Future insights in fungal metabolic engineering. *Bioresour. Technol.*, 245(B):1314-1326 (2017)

doi: 10.1016/j.biortech.2017.04.095.

猪熊健太郎、若井暁、近藤昭彦、多様な糖を用いた高収率物質生産技術の開発、ケミカルエンジニアリング、Vol. 63 No. 11、827-835 (2018)

〔学会発表〕(計7件)

Satoshi Wakai, Silai Zhang, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo. Tandem-repeat structure of integrated genes on the genomes of genetically engineered *Aspergillus oryzae* strains. ASM Microbe 2019, 2019年

若井 暁、張 斯来、荻野 千秋、堤 浩子、秦 洋二、近藤 昭彦 ナノポアシーケンサを用いた遺伝子組換え麹菌のゲノムクスおよびトランスクリプトミクス、日本農芸化学会2019年度大会、2019年

若井 暁、荻野 千秋、堤 浩子、秦 洋二、近藤 昭彦、マルチコピー遺伝子導入黄麹菌のゲノム構造解析、第18回糸状菌分子生物学コンファレンス、2018年

若井 暁、多彩なアウトプット能を示す *Aspergillus* 細胞工場、第8回合成生物学シンポジウム、2018年

若井 暁、荻野 千秋、堤 浩子、秦 洋二、近藤 昭彦、ナノポアシーケンサを用いた遺伝子組換え麹菌ゲノム上の長鎖タンDEMリピート構造の解析、第70回日本生物工学会大会、2018年(トピックス研究選出)

Satoshi Wakai, Construction of *Aspergillus* Cell Factory for bioproduction. the China-Japan Joint Workshop on Frontiers of Systems Biotechnology and Biomanufacturing, 2018年(Invited)

若井 暁、荻野 千秋、堤 浩子、秦 洋二、近藤 昭彦、麹菌の co-transformation 時のコピー数多型性に関する解析、第17回糸状菌分子生物学コンファレンス、2017年

〔その他〕

新聞報道

2017年10月26日 日刊工業新聞「大学・産学連携 オリゴ糖こうじ菌で生産」

2017年10月11日 日刊工業新聞(第一面)「神戸大・月桂冠など、機能性オリゴ糖を効率生産 遺伝子組み換えこうじ菌活用」

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。