

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05952

研究課題名(和文) 麹菌のゲノム編集時における大規模欠失を介した DNA 修復機構に関する研究

研究課題名(英文) Study on DNA repair mechanism via large-scale deletion in *Aspergillus oryzae* caused by genome editing due to error of non-homologous end-joining repair.

研究代表者

水谷 治 (Mizutani, Osamu)

琉球大学・農学部・准教授

研究者番号：10443996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：麹菌野生株において、非相同末端結合(NHEJ)修復エラーを介したゲノム編集を行うと、得られたゲノム編集株の約半分程度で1 kb以上もの大規模欠失が観察された。そこで、NHEJ経路に関与すると予想されたDNA分解活性を有するDNAポリメラーゼ(poID)等の遺伝子破壊株を作成し、ゲノム編集による大規模欠失の有無を調べた結果、PoIDは大規模欠失に関与していないことが示唆された。また、大規模欠失抑制株のゲノム解析から17個の変異遺伝子を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、麹菌において非相同末端結合修復エラーを介したゲノム編集を行うと、酵母や高等動植物で観察されるような数bpの欠失の他に1 kb以上もの大規模な欠失が高頻度で観察されることについて、どのような因子が大規模欠失に関与しているかを明らかにしようとしている。本研究が進展すれば、従来、他の生物と同様と考えられていた麹菌のDNA二本鎖切断修復機構において、麹菌独自の機構の発見やこのメカニズムを利用した新たな麹菌育種法の開発等に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：We performed genome editing of *Aspergillus oryzae* wild-type strain via error of nonhomologous end-joining (NHEJ) repair by TALENs and CRISPR/Cas9. Targeted mutations were observed as various mutation patterns. Notably, about half of the mediated deletion mutants caused by genome editing had deletions larger than 1 kb in the targeting region of TALEN or CRISPR/Cas9. In this study, we aim to elucidate the mechanism of large deletions caused by double-strand breaks during genome editing in *Aspergillus oryzae*. To investigate whether this large deletion is related to the NHEJ pathway, we constructed disruptant of poID gene which may be related to the NHEJ pathway and performed genome editing using the strain as host. As a result, it was suggested that *A. oryzae* poID gene was not involved the large deletion via genome editing. On the other hand, genome analysis of a large deletion-suppressed mutant revealed 17 mutated genes.

研究分野：応用微生物学

キーワード：麹菌 ゲノム編集 人工ヌクレアーゼ (TALENs) CRISPR/Cas9 DNA 二本鎖切断修復

1. 研究開始当初の背景

Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) は、植物病原菌キサントモナス属が有する任意の塩基配列を認識する DNA 結合ドメイン (TAL effector) に、2 量体時に DNA 切断活性を示す酵素 Fok I のヌクレアーゼドメインを融合させた人工ヌクレアーゼであり、第 2 世代のゲノム編集ツールとして使用されている。続いて、2012 年後半に真正細菌や古細菌が有する獲得免疫(外来 DNA の排除機構)である CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein) システムの一部を応用したゲノム編集ツール CRISPR/Cas9 が報告され、ガイド RNA と Cas9 酵素の 2 つの分子でゲノム上の任意の位置で DNA 2 本鎖切断を引き起こせることから、その簡便さにより多くの生物でゲノム編集が試みられるようになった。ゲノム編集とは、ゲノム編集ツールを用いて対象の生物のゲノムの任意の位置に DNA 2 本鎖切断を引き起こし、その修復の過程で非相同末端結合 (non-homologous end-joining; NHEJ) の修復エラーによる数 bp の欠失や挿入変異が、また、ドナー DNA を用いた相同組換えによるノックインや塩基置換等が可能となる技術である。

研究代表者は、黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) においてゲノム編集ツールである人工ヌクレアーゼ TALENs や RNA 誘導型 CRISPR/Cas9 を用いて NHEJ による修復エラーを狙ったゲノム編集を行った結果、得られたゲノム編集株において、ターゲット領域の欠失が観察された株の約半分程度に 1 ~ 5 kb もの大規模な欠失が引き起こされていることを明らかにした(図 1)(1)。このような大規模欠失は、酵母や高等生物では観察されず、糸状菌特有の現象と思われた。

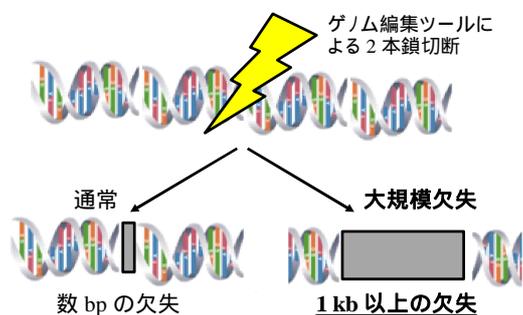


図 1. 黄麹菌の NHEJ 修復エラーを介したゲノム編集結果のイメージ

真菌(主に酵母)の NHEJ による修復機構は、主に DNA の対合、末端処理、末端結合によって行われる機構の他に、代替的機構として DNA 末端のマイクロホモロジーを利用する経路 (microhomology-mediated end joining: MMEJ) 等が存在する (2)。糸状菌においては、アカパンカビや麹菌で、NHEJ 経路において対合に必要な Ku70/80 タンパク質や末端結合に必要な LigD を破壊した株を宿主に用いると相同組換え効率が劇的に上昇することが知られているが (3, 4) それら以外の因子については、相同性より存在が示唆されるのみで、機能解析等の報告例はない。研究代表者は大規模欠失が起きてしまう理由として NHEJ 経路以外の修復機構の影響が強い可能性を予想し、研究をスタートしたが、予想に反して NHEJ 経路の ligD 遺伝子破壊株を宿主にゲノム編集を行うと大規模欠失が部分的に抑制されることを見出した。加えて、偶然にも大規模欠失が抑制される変異株を発見している。

2. 研究の目的

麹菌において、糸状菌用高活性型 PtFg-TALENs の一過的発現や Cas9 タンパク質 gRNA 複合体 (RNP: Ribonucleoprotein) の細胞への直接導入による NHEJ 修復エラーを介したゲノム編集を行うと、得られた欠失株の半分程度で 1 kb 以上の大規模な欠失が引き起こされることが見出されている。本研究では、麹菌のゲノム編集に伴う 2 本鎖切断により引き起こされる大規模欠失のメカニズム解明を目指し、NHEJ 経路に関与していると思われる遺伝子の破壊

株や過剰発現株を造成し、これら破壊株を宿主にゲノム編集を行うことで、大規模欠失が NHEJ 経路と関連があるのかを考察する。加えて、大規模欠失が抑制される変異株のゲノム解析を行い、野生株ゲノムと比較することで大規模欠失に起因する因子のスクリーニングを試みた。

3. 研究の方法

- (1) 高頻度で引き起こされた大規模欠失が NHEJ によって引き起こされているのかを調べるために、NHEJ に関連する遺伝子を破壊した株を宿主に野生株と同様の条件でゲノム編集を行った。まず、黄麹菌の NHEJ において機能が同定されている *ku70* 遺伝子及び、ヒトの NHEJ に関与する *polμ* 遺伝子のホモログである *polD* 遺伝子の破壊株の造成を黄麹菌 *niaD300* 株を宿主に行った。また宿主を合わせるために、改めて *ligD* 遺伝子破壊株の造成も行った。すべての実験において、ドナー DNA に ピリチアミン耐性遺伝子 *ptrA* の両端に 25 bp 程度の相同領域を付与したものや *ptrA* 断片のみのもを用い、プロトプラスト-PEG 法によって形質転換を行った。またゲノム編集ツールには CRISPR/Cas9 を使用した。
- (2) 造成した NHEJ 関連遺伝子破壊株を宿主に NHEJ 修復エラーを介したゲノム編集を行った。ターゲットは ATP スルフィラーゼをコードする *sC* 遺伝子とし、硫酸塩のアナログであるセレン酸培地で生育したものをゲノム編集候補株とした。切断様式の違いによる大規模欠失の有無や頻度を比較するため、ゲノム編集ツールには TALENs 及び CRISPR/Cas9 の 2 つを用いた。
- (3) $\Delta ligD$ を宿主としたゲノム編集に加えて、*ligD* 遺伝子の過剰発現株 (OE*ligD*) を宿主としたゲノム編集も同様の条件で行い、大規模欠失の頻度を比較した。
- (4) 変異株のゲノム解析は、HisSeq で得られたデータを CLC Genomics Workbench 及び breseq を用いて行った。

4. 研究成果

- (1) ドナー DNA である *ptrA* が挿入されるとピリチアミン耐性が付くため、ピリチアミン含有培地にて生育した株を形質転換候補株とした。ガイド RNA はターゲット遺伝子の ORF 上流と下流に設計した。候補株を PCR に供したところ、それぞれの破壊株において、目的の株 ($\Delta ku70$, $\Delta polD$, $\Delta ligD$) を得ることができた。しかしながら、25 bp では相同領域が短いためか、*ptrA* マーカー遺伝子が逆向きに挿入されているものも散見された。一方で、相同領域を持たせないドナーを使用した場合、短い相同領域をもたせたドナー DNA の場合と比較して、多くの破壊株が得られたが、削り込みが起きて挿入されたものや、マーカーがタンデムに挿入されたもの等、予想とは違った形で破壊された株が多く見られた。
- (2) $\Delta ku70$ を宿主としたゲノム編集 (N=2) では、TALENs で 11 株、CRISPR/Cas9 で 68 株のセレン酸耐性株が得られたが、標的領域に変異が生じていたのは CRISPR/Cas9 で 3 株のみであった。そのうち 2 株が置換による変異で、欠失株は 1 株 (約 200 bp の欠失) であった。そのほかの株においては、シーケンス解析まで行ったがゲノム編集はされていない。今後は、試行回数を増やすことで、本当にゲノム編集が起きにくい、即ち、Ku タンパク質を欠失すると、NHEJ 修復エラーを介したゲノム編集が起きなくなるのかを判断したい。 $\Delta polD$ を宿主としたゲノム編集 (N=1) では、TALENs で 38 株、CRISPR/Cas9 で 47 株のセレン酸耐性株が得られた。そのうち標的領域に変異が生じていた株の株数を欠失長ごとに表にまとめた (表

表 1. ゲノム編集による $\Delta polD$ 株 *sC* 遺伝子の変異パターン

	Length of deletion			
	1~100 bp	100~1000 bp	1000 bp ~	other
$\Delta polD/sC$ -	47	8	25 (30%)	3
TALEN	15	3	16 (47%)	2
CRISPR/Cas9	32	5	9 (20%)	1

1) この結果から、 $\Delta polD$ を宿主としたゲノム編集では、大規模欠失が抑制されないことが示唆された。ヒトの NHEJ に関与する Pol μ はポリメラーゼ活性と共にヌク

レアーゼ活性も有することが知られているため、麹菌の大規模欠失にそのホモログである PolD が関与しているのではないかと予想したが、今回の結果からはその関与は薄いと示唆された。

$\Delta ligD$ を宿主としたゲノム編集 (N=3) では、TALENs で 45 株、CRISPR/Cas9 で 19 株のセレン酸耐性株が得られた。そのうち、約 200 bp の欠失が生じていた株が TALEN で 6 株、CRISPR/Cas9 で 4 株であった。また、1 kb 以上の大規模欠失が生じていたのが、TALENs で 2 株であった。そのほかの株においては、ゲノム編集されていなかった。

(3) *OeligD* を宿主としたゲノム編集に関しては、*ligD* 遺伝子の誘導が構成的なバージョンと構成的よりも更に強く誘導が引き起こされるバージョンの 2 種類の実験を行った。*ligD* 遺伝子の構成的な発現によるゲノム編集では、TALENs で 22 株、

表 2. ゲノム編集による *OeligD* 株 *sC* 遺伝子の変異パターン

	Length of deletion				
	1~100 bp	100~1000 bp	1000 bp ~	insertion	substitution
Constitutive ver.	9 (31%)	6 (17%)	13 (43%)	2	0
TALEN	4	1	5 (45%)	1	0
CRISPR/Cas9	5	5	8 (42%)	1	0
Strong induced ver.	39 (55%)	7 (10%)	16 (23%)	5	4
TALm	24	4	12 (27%)	2	2
CRISm	15	3	4 (15%)	3	2

CRISPR/Cas9 で 29 株のゲノム編集株が得られ、シーケンス解析の結果、大規模欠失の割合が野生株とほぼ同等レベルに回復した (表 2)。一方で、より強く *ligD* 遺伝子の誘導をかけた場合には、TALENs で 65 株、CRISPR/Cas9m で 43 株のゲノム編集株が得られた。シーケンス解析の結果、大規模欠失の割合が構成的誘導と比較して、約半分程度に減少した。以上の結果から、*ligD* 遺伝子の欠損はゲノム編集時に生じる大規模欠失を抑制し、その機能相補は野生株の大規模欠失割合と同等に戻るが、過剰に *ligD* 遺伝子を発現させても大規模欠失の割合が増加することはなく、むしろ減少することが観察された。今後は、試行回数を増やし、大規模欠失の割合の増減が統計的に有意な差であるかを調べていく。

(4) 大規模欠失抑制変異株のゲノムシーケンスを HiSeq にて行い、得られたゲノムデータを黄麹菌野生株 RIB40 のゲノムと比較解析したところ、アミノ酸にまで影響を及ぼす変異が 17 個の遺伝子で観察された。しかしながら、ほとんどの遺伝子が機能未知であり、今後、これらの遺伝子の破壊株を造成し、大規模欠失との関連を調べていく予定である。

< 引用文献 >

- (1) Mizutani O., Arazoe T., Toshida K. et al., Detailed analysis of targeted gene mutations caused by the Platinum-Fungal TALENs in *Aspergillus oryzae* RIB40 strain and a *ligD* disruptant. *J. Biosci. Bioeng.* 2017 123(3):287-293
- (2) McVey M., Lee SE. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet.* 2008 24(11):529-538
- (3) Ninomiya Y., Suzuki K., Ishii C. et al., Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 101(33):12248-12253

(4) Ishibashi K., Suzuki K., Ando Y. et al., Nonhomologous chromosomal integration of foreign DNA is completely dependent on MUS-53 (human Lig4 homolog) in *Neurospora*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 103(40):14871-14876

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamada Osamu, Nishibori Naoko, Hayashi Risa, Arima Toshihide, Mizutani Osamu	4. 巻 67
2. 論文標題 Construction of transcription factor gene deletion library of <i>Aspergillus luchuensis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 118 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2020.09.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uechi Keiko, Yaguchi Hajime, Tokashiki Jikian, Taira Toki, Mizutani Osamu	4. 巻 87
2. 論文標題 Identification of Genes Involved in the Synthesis of the Fungal Cell Wall Component Nigeran and Regulation of Its Polymerization in <i>Aspergillus luchuensis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e0114421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.01144-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tokashiki Jikian, Toyama Hirohide, Mizutani Osamu	4. 巻 85
2. 論文標題 Development of an itraconazole resistance gene as a dominant selectable marker for transformation in <i>Aspergillus oryzae</i> and <i>Aspergillus luchuensis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 722 ~ 727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbaa080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maeda Mayumi, Motosoko Marin, Tokashiki Tatsunori, Tokashiki Jikian, Mizutani Osamu, Uechi Keiko, Goto Masatoshi, Taira Toki	4. 巻 130
2. 論文標題 Phenolic acid decarboxylase of <i>Aspergillus luchuensis</i> plays a crucial role in 4-vinylguaiacol production during awamori brewing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 352 ~ 359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.05.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tokashiki Jikian, Hayashi Risa, Yano Shigekazu, Watanabe Taisuke, Yamada Osamu, Toyama Hirohide, Mizutani Osamu	4. 巻 128
2. 論文標題 Influence of -1,3-glucan synthase gene agsE on protoplast formation for transformation of <i>Aspergillus luchuensis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 129 ~ 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.01.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Setoguchi Sho, Mizutani Osamu, Yamada Osamu, Futagami Taiki, Iwai Kenichi, Takase Yoshikazu, Tamaki Hisanori	4. 巻 128
2. 論文標題 Effect of pepA deletion and overexpression in <i>Aspergillus luchuensis</i> on sweet potato shochu brewing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 456 ~ 462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.03.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 渡嘉敷 直杏, 外山 博英, 水谷 治
2. 発表標題 麹菌で利用可能なイトラコナゾール耐性マーカーの構築
3. 学会等名 第 73 回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上元 優, 玉井萌子, 渡嘉敷直杏, 外山博英, 水谷 治
2. 発表標題 黒麹菌 <i>Aspergillus luchuensis</i> のエレクトロポレーション法による形質転換系の開発
3. 学会等名 第 19 回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡嘉敷直杏, 水谷 治, 外山博英
2. 発表標題 麹菌におけるイトラコナゾール耐性を指標とした形質転換用マーカーの開発
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020 年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Arazoe T., Mizutani O.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 384
3. 書名 Genome Engineering via CRISPR-Cas9 System 1st Edition (担当範囲: 5. Targeted genome editing using CRISPR-Cas9 system in fungi)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------