

令和元年6月24日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07706

研究課題名(和文)修復エラーを介したゲノム編集時に引き起こされる麹菌の大規模欠失機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism for large deletions in *Aspergillus oryzae* caused by genome editing via 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：麹菌野生株において、TALENs を用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。また、CRISPR/Cas9 を用いて同様にゲノム編集を麹菌野生株に対して行っても、大規模欠失が観察されたことから、ゲノム編集ツールの切断様式に、大規模欠失が依存していないことが示唆された。また、NHEJの末端結合に必要な ligase をコードする *ligD* 遺伝子破壊株を用いて、ゲノム編集を行ったところ、野生株で観察された大規模欠失が、*ligD* 破壊株では部分的に抑制されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、麹菌の新規育種を目指して、ゲノム編集ツールの一つである TALEN を用いた非相同末端結合修復エラーによるゲノム編集を行ったところ、酵母や高等動植物で見られるような数 bp の欠失の他に1 kb 以上もの大規模な欠失が観察されたことに端を発している。本研究結果により、従来、他の生物と同様と考えられていた麹菌の DNA 2本鎖切断修復機構において、麹菌独自の機構が存在する可能性が示唆され、このメカニズムの解明により新規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 transient expression of TALENs. Targeted mutations were observed as various mutation patterns. Notably, about half of the TALEN-mediated deletion mutants had deletions larger than 1 kb in the TALEN-targeting region. In addition, when we performed genome editing using a ribonucleoprotein complex formed from Cas9 enzyme in *A. oryzae* wild-type strain, large deletions were also observed. Therefore, it was suggested that the large deletion was not depend on the cleavage styles of the genome editing tool. To examine the mechanisms for these large deletions and the influence of alternative NHEJ repairs, we conducted genome editing in *A. oryzae* *ligD* disruptant, which involved in the final step of NHEJ repair. As a result, the genome edited mutations were still observed as well as wild-type and the ratio of the large deletions reduced compared with that of wild-type strain.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ゲノム編集 黄麹菌 TALEN CRISPR/Cas9 大規模欠失 DNA 切断修復 *ligD*

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

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 本差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 本差切断を引き起こし、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。

申請者は以前に、マーカー遺伝子回収技術等で利用されている Cre-loxP システムにおいて、部位特異的組換え酵素 (Cre) を麹菌細胞内に直接導入することに成功し、ターゲット配列 (loxP) 間に挟まれたマーカー遺伝子を、従来より簡便且つ迅速に除去できる方法を開発している。このタンパク質直接導入技術を TALENs にも応用できないかと研究を進めていた。その過程で、糸状菌用に構築された高活性型 Platinum Fungal-TALENs (PtFg-TALENs) 発現力セットを染色体に組込むことなく、形質転換時に一過性的に発現させることで、NHEJ による修復エラーを狙ったゲノム編集を行った。その結果、得られた株の 97% の効率で TALEN が麹菌内で機能することを見出し、更に欠失株の約半分程度の割合で 1~5 kb もの大規模な欠失が引き起こされることが明らかとなった。

また、これらの欠失は、TALENs 切断領域を中心に、上流のみ、上流及び下流、下流のみの 3 パターンで大規模欠失が起きていることが観察された (図 1)。このような大規模欠失は、酵母や高等生物ではほとんど見られず、糸状菌特有の現象と思われた。

large deletion (5' region)	
WT (RIB40) :	CCGCAGAGCTGCGCATCCACTTTGACAagctcggtggtcccGAGTTGTCGCTTCCAGACCAGGTACTTT
TsC no. 3 :	-----GAGTTGTCGCTTCCAGACCAGGTACTTT -2933
TsC no. 4 :	-----GAGTTGTCGCTTCCAGACCAGGTACTTT -2313
TsC no. 7 :	-----CGCTTCCAGACCAGGTACTTT -5045

large deletion (3' region)	
WT (RIB40) :	CCGCAGAGCTGCGCATCCACTTTGACAagctcggtggtcccGAGTTGTCGCTTCCAGACCAGGTACTTT
TsC no. 11 :	-----GAGTTGTCGCTTCCAGACCAGGTACTTT -1396
TsC no. 19 :	-----GAGTTGTCGCTTCCAGACCAGGTACTTT -1543
TsC no. 26 :	-----GAGTTGTCGCTTCCAGACCAGGTACTTT -1520

large deletion (5' and 3' regions)	
WT (RIB40) :	CCGCAGAGCTGCGCATCCACTTTGACAagctcggtggtcccGAGTTGTCGCTTCCAGACCAGGTACTTT
TsC no. 6 :	-1235 bp in 5' region, -15 bp of targeting region, and -143 bp in 3' region -1393
TsC no. 12 :	-2083 bp in 5' region, -15 bp of targeting region, and -564 bp in 3' region -2662
TsC no. 20 :	-2409 bp in 5' region, -15 bp of targeting region, and -1001 bp in 3' region -3425

図 1. TALENs を用いた麹菌のゲノム編集結果 (大規模欠失の例)

2. 研究の目的

麹菌において糸状菌用高活性型 PtFg-TALENs を用いて NHEJ 修復エラーを介したゲノム編集を行うと、得られた株の半分程度で 1 kb 以上の大規模な欠失が引き起こされることを見出し、この現象は、麹菌を含む糸状菌に特有な機構であることが示唆された。そこで本研究では、大規模欠失は他のターゲット領域や、突出末端で切断される TALENs とは異なり、平滑末端で切断される CRISPR/Cas9 システムでも引き起こされるのかを検討した。また、麹菌において、このメカニズムに参与する遺伝子を同定し、なぜゲノム二本鎖切断時にこのような大規模欠失を伴った修復エラーが起きるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 2 本鎖切断ターゲット領域の変更は、Sakuma ら及び、Arazoe らによって開発された Platinum gate 法 (four-module assembly system) を用いて、新たに PtFg-TALENs 発現力セットを

作成した。ターゲット遺伝子は、破壊されるとセレン酸に耐性となる ATP sulfurylase をコードする *sC* 遺伝子を以前と同様に用い、ターゲット領域は、前回より 1 kb 上流の開始メチオン領域とした。PtFg-TALENs 発現ベクターはプロトプラスト・PEG 法にて導入し、染色体に組み込むことなく、一過性的に PtFg-TALENs を発現させ、NHEJ 修復エラーを介したゲノム編集を行った。また、市販 Cas9 酵素とガイド RNA (gRNA) の複合体を 37°C, 10 分インキュベートすることで Ribonucleoprotein (RNP) を作成し、麹菌プロトプラスト及び PEG を用いて直接導入することで、*sC* 遺伝子をターゲットとした NHEJ 修復エラーを介したゲノム編集を行った。大規模欠失の調査は、ターゲット領域を含む PCR とシーケンス解析により行った。

(2) 麹菌 *ligD* 遺伝子破壊株 (*niaD*⁻, *sC*⁻) に対して、上述と同様なコンストラクトでゲノム編集を行うために、*sC* 変異領域を野生型 *sC* 遺伝子に置き換えた株 (Δ *ligD/sC*⁺) を作成した。 Δ *ligD/sC*⁺ 株に対して、*sC* 遺伝子をターゲットとしたゲノム編集を PtFg-TALENs 及び RNP を用いて行った。

(3) *ligD* 遺伝子を高発現用プロモーター PenoA142 の下流に連結したプラスミド O*ligD*/pNEN142 を作成した。続いて、本プラスミドを麹菌 *niaD*300 株 (*niaD*⁻) に対して導入し、*ligD* 過剰発現株 (O*ligD*) を作成した。更に O*ligD* 株に対して、上記と同様なゲノム編集を行い、大規模欠失の有無を調べた。

4. 研究成果

(1) 申請者は麹菌野生株において NHEJ 修復エラーを介したゲノム編集を *sC* 遺伝子の活性中心部位近辺 (exon IV) をターゲットにして行ったところ、ゲノム編集に依存する欠失株の約半分程度で 1 kb 以上もの大規模な欠失が引き起こされることを見出した。そこで、この大規模欠失が配列特異的なのかを調べるために、他のターゲット領域でゲノム編集を行っても大規模欠失が引き起こされるかを調べた。TALEN のターゲット領域を *sC* 遺伝子の開始メチオン領域 (exon I) に変更して、同様にゲノム編集を行った。セレン酸耐性株となったゲノム編集候補株 30 株のターゲット領域の PCR 及び、得られた PCR 断片のシーケンス解析を行った。その結果、*sC* 遺伝子 exon IV をターゲットとした時と同様に大規模欠失が観察された (表 1)。この結果から、麹菌においてゲノム編集時に引き起こされる大規模欠失は、配列依存的ではないことが示唆された。

表 1. PtFg TALENを用いたゲノム編集による麹菌野生型*sC*遺伝子の変異パターン

Target region	Length of deletion					insertion	other
	1 ~ 100 bp	100 ~ 1000 bp	1000 bp ~				
			5' region ^a	3' region ^a	both region ^a		
<i>sC</i> gene exon V	8	8	8	3	3	3	1
<i>sC</i> gene exon I	11	6	5	1	3	4	0

^a These regions are based on the TALEN cutting site in the *A. oryzae sC* gene.

続いて、TALENs の 2 本鎖切断様式は、基本的に FokI のヌクレアーゼドメインによるため、5' 突出末端を生じていると考えられている。麹菌野生株で生じた大規模欠失は、この突出末端鎖が生じることにより、それがトリガーとなって引き起こされる可能性を考えた。そこで、DNA 2 本鎖切断が平滑で生じる CRISPR/Cas9 システムで麹菌野生株のゲノム編集を上記と同様に *sC* 遺伝子をターゲットとして行った。この時、TALENs のような一過的発現ではなく、市販 Cas9 と gRNA を反応させ RNP を作成した後、プロトプラスト及び PEG を用いて直接導入することで、NHEJ 修復エラーを介したゲノム編集を試みた。その結果、200 株程度のゲノム編集候補株が取得された。即ち、Cas9 酵素及びガイド RNA の直接導入によるゲノム編集が可能であることが示された。候補株をランダムに 45 株選択し、ターゲット領域の PCR 及び、得られた PCR 断片のシーケンス解析を行った。その結果、TALENs 時と同様に大規模欠失

が引き起こされることが明らかとなった。よって、麹菌においてゲノム編集ツールの違い、即ち 2 本鎖切断様式のの違いに関わらず大規模欠失は引き起こされることが明らかとなった。

(2) 次に麹菌のどの DNA 修復機構が大規模欠失を引き起こしているのかを調べることとした。一般的に DNA 2 本鎖切断の修復機構には、相同な DNA 鎖を用いた相同組換え及び、切断末端をそのまま直接繋ぎ合わせる NHEJ を用いた修復が知られている。その他に代替的な非相同末端修復として、マイクロ相同領域を利用したマイクロホモロジー媒介末端結合 (Microhomology-mediated end joining; MMEJ) 修復が存在する。麹菌野生株でゲノム編集時に大規模欠失が引き起こされる理由として、MMEJ による修復機構の影響が強い可能性を予想し、NHEJ 修復経路を遮断した形で TALENs による NHEJ の修復エラーによるゲノム編集を試みた。NHEJ 修復経路の遮断は、修復の最終反応である末端結合に必要な ligase をコードする *ligD* 遺伝子の破壊株を用いた。まず始めに PtFg-TALENs を用いて、 $\Delta ligD/sC+$ 株を宿主に NHEJ 修復エラーを介したゲノム編集を行った。その結果、*ligD* 遺伝子破壊株でも野生株とほぼ同程度の割合で、ゲノム編集による変異が観察され、興味深いことに、野生株で観察された大規模欠失が、*ligD* 破壊株では部分的に抑制されていた (図 2)。つまり、当初の予想とは逆で、*ligD* 依存的な NHEJ 経路が大規模欠失に関与していることが示唆された。また、従来観察される数 bp の欠失から数百、数千 bp の欠失領域のシーケンスからマイクロ相同領域で欠失修復を行った形跡があるかを調べた (表 2)。酵母では、MMEJ は 5–25 ヌクレオチドの長さで生じることが報告されている。そこで、5 ヌクレオチド以上のマイクロ相同領域を用いて欠失修復を行

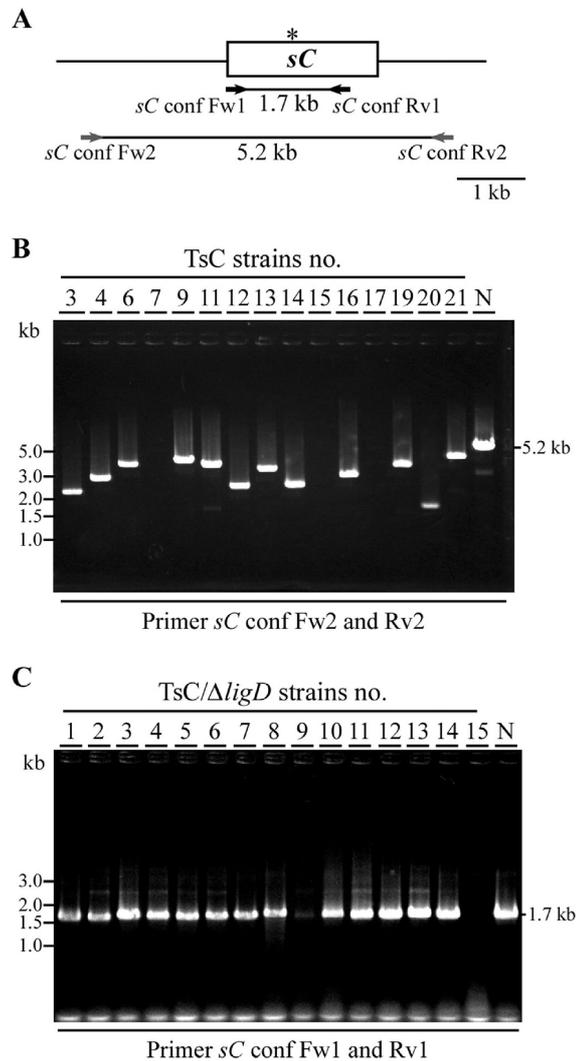


図 2. $\Delta ligD$ 株を宿主としたゲノム編集結果

- (A) ターゲット領域周辺のプライマーアニーリング位置
- (B) 麹菌野生株におけるゲノム編集株の PCR 結果例
- (C) $\Delta ligD/sC+$ 株におけるゲノム編集株の PCR 結果例

表 2. 麹菌野生株及び $\Delta ligD/sC+$ における TALEN の切断部位の上流及び下流配列の相同性領域の分布

Host strains	Length of homology (bp)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	
RIB40 (wild type)	5	6	10	2	4	1	1	1	
$\Delta ligD/sC+$	9	2	7	5	2	0	0	0	

These counts excluded insertions and other mutation patterns in all TsC and TsC/ $\Delta ligD$ strains.

った形跡に注目すると、野生株宿主で 3 株、 $\Delta ligD/sC+$ 株で 0 株であった。加えて、RNP 直接導入法による CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集も試みたところ、ゲノム編集株が取得され、同様に大規模欠失が抑制

されていた。以上の結果から、 $\Delta ligD$ 宿主株で、NHEJ 修復エラーを介したゲノム編集が出来たことから、LigD 依存的な NHEJ 修復が麹菌では存在すること、マイクロ相同領域を用いて欠失修復を行った形跡を持つ株数が少ないため、正確ではないかもしれないが MMEJ 修復機構以外のその他の NHEJ 修復機構を用いてゲノム編集が行われている可能性が示唆された。

一方、 $\Delta ligD/sC+$ 株で大規模欠失が抑制されたので、 $ligD$ 過剰発現株では大規模欠失の頻度が大幅に向上するかを調べるために、 $ligD$ 過剰発現株を造成し、TALENs を用いて同様なゲノム編集を行った。その結果、親株の niaD300 ではゲノム編集株が取得されるのに対し、過剰発現株ではゲノム編集株が得られなかった。この結果より、改めて $ligD$ 遺伝子過剰発現株の表現型の解析、高発現用プロモーターの検討等が必要であることが示唆された。また、研究の過程で大規模欠失が抑制される変異株をストック株から偶然に見出すことが出来た。今後は、 $ligD$ 遺伝子の解析とともに大規模欠失抑制変異株のゲノム解析を行うことで、大規模欠失のメカニズム解明を進めていきたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1) **Osamu Mizutani**, Takayuki Arazoe, Kenji Toshida, Risa Hayashi, Shuichi Ohsato, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Shigeru Kuwata, Osamu Yamada, **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 Mar;123(3):287-293. 査読有り DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.09.014

〔学会発表〕(計 34 件)

- 1) 上元 優, 林 梨咲, 渡嘉敷直杏, 荒添貴之, 山田 修, 外山博英, 水谷 治, 麹菌 $ligD$ 遺伝子がゲノム編集に起因する大規模欠失変異に与える影響, ゲノム編集学会第 3 回大会, 広島, 2018 年 6 月 18 - 20 日
- 2) 水谷 治, 林 梨咲, 渡嘉敷直杏, 上里優希, 上元 優, 玉井萌子, 荒添貴之, 山田 修, 外山博英, ゲノム編集時に引き起こされる麹菌 *Aspergillus oryzae* の大規模欠失機構に関する研究, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 名古屋, 2018 年 3 月 15 - 18 日
- 3) 水谷 治, 山田 修, 家藤治幸, 麴菌における Cre-loxP システムの利用と TALEN を用いたゲノム編集, 第 69 回日本生物工学会大会, 東京, 2017 年 9 月 11 - 14 日
- 4) 水谷 治, 利田賢次, 林梨咲, 渡嘉敷直杏, 荒添貴之, 西田敬二, 和田悠作, 織田健, 岩下和裕, 山田 修, 外山博英, 麹菌における TALENs と CRISPR/Cas9 の違いによる大規模欠失変異の比較, ゲノム編集学会第 2 回大会, 大阪, 2017 年 6 月 28 - 30 日
- 5) 水谷 治, 麹菌を用いたゲノム編集 : ターゲット遺伝子変異の多様性について, 産総研中国センターシンポジウム, 広島, 2017 年 2 月 27 日
- 6) 水谷 治, 荒添貴之, 利田賢次, 林梨咲, 大里修一, 佐久間哲史, 山本 卓, 桑田茂, 山田 修, 非相同末端結合に關与する遺伝子破壊株における麹菌の TALENs を用いたゲノム編集, 第 68 回日本生物工学会大会, 富山, 2016 年 9 月 28 - 30 日
- 7) 水谷 治, 荒添貴之, 利田賢次, 林梨咲, 大里修一, 佐久間哲史, 山本 卓, 桑田茂, 山田 修, 麹菌野生株及び $ligD$ 遺伝子破壊株を宿主とした Platinum-Fungal TALENs を用いたゲノム編集, 日本ゲノム編集学会第 1 回大会, 広島, 2016 年 9 月 6 - 7 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

・ 出願財産権 (計 0 件)

・取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。