

機関番号：82111  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20580374  
 研究課題名（和文） アスペルギルス・オリゼのテロメア機能を活用した染色体工学の構築  
 研究課題名（英文） Construction of chromosome engineering for *Aspergillus oryzae* with its telomere function  
 研究代表者  
 楠本 憲一（KUSUMOTO KEN-ICHI）  
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・応用微生物研究領域・ユニット長  
 研究者番号：80353978

研究成果の概要（和文）：*Aspergillus oryzae* は、醸造・食品産業で麹菌として用いられる重要な微生物である。担当者らは、以前、*A. oryzae* の染色体末端に存在するテロメア配列が、12塩基を単位とする新規な繰り返し配列であることを明らかにした。本研究では、天然の4倍長のアスペルギルス・オリゼテロメア配列を PCR 法により合成し、直鎖状ベクターに連結することにより、当該菌株の特定の染色体末端の欠落に成功した。

研究成果の概要（英文）：*Aspergillus oryzae* is known as an important microorganism utilized as *koji* mold in fermentation food industry. Person in charge previously found that the terminal sequences known as telomere is a novel repeat sequence with twelve nucleotides as a repeat unit. The telomeric sequence of *Aspergillus oryzae*, whose length was four times of the native telomere, was synthesized. It was linked to the linear vector. Then the transformants by the vector revealed to have chromosomes whose specific terminal region was successfully deleted.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：アスペルギルス、オリゼ、テロメア、染色体工学

## 1. 研究開始当初の背景

*Aspergillus oryzae* は、醸造・食品産業で麹菌として用いられる重要な微生物であり、タンパク質等の物質生産能力が高いことに特徴がある。現在の *A. oryzae* の組換えDNA技術は、大腸菌ベクターをベースとして、数種類ある *A. oryzae* の遺伝子マーカーを連結した組み込み型ベクターを用いるものが主体である。担当者らは、*A. oryzae* の染色

体末端に存在するテロメア配列の分離に成功し、12塩基を単位とする新規な繰り返し配列であることを明らかにした（Appl. Microbiol. Biotechnol., 61: 247-251, 2003）。

テロメアは酵母や原生動物、哺乳類を中心に研究が進んでおり、染色体の末端を保護すると共に染色体複製時にも機能することが知られている。その構成因子は、繰り返し配

列を有する DNA と共に、テロメア伸長に関与するテロメラーゼ等、複数種類のタンパク質よりなる。哺乳類では、テロメアはガン細胞及び生殖細胞ではその長さが維持されるが、その他の細胞では、細胞増殖に伴いテロメア長が減少し、テロメアとガン化や細胞の寿命との関連が解明されつつある。また、糸状菌では哺乳類と異なり細胞増殖に伴うテロメア長の減少は見られず、安定にその長さが維持される [Bhattacharyya et al., (1997)]。したがって、テロメア長が安定に維持される糸状菌において、テロメア付加ベクターを構築して遺伝子導入等に利用する研究は糸状菌でのみ可能な、極めて特徴のあるものあり、哺乳類の系では解明できないような普遍的な現象を明らかにできる可能性がある。

糸状菌 *Aspergillus nidulans* 及び *Pestalotiopsis microspora* のテロメアに関する研究報告 [Aleksenko et al., Mol. Gen. Genet. 260:159-164 (1998); Long et al. Fungal Genet. Biol. 24:335-344 (1998)] では、テロメア配列を両末端に有したベクターが線状の形態で染色体外に複製・維持されるが、その維持率は 20% 程度と低いことが知られている。研究担当者は取得した *A. oryzae* のテロメアの機能を解明するため、得られた *A. oryzae* のテロメア配列を、マーカー遺伝子 ptrA (チアミンアナログ耐性遺伝子) を有するベクターに連結して *A. oryzae* に導入した。導入したベクターは既知の糸状菌のテロメアと同様の線状の形態で維持されると想定していたが、予想に反して複数のテロメアの近傍に組み込まれ、ベクター由来のテロメアが染色体上のテロメアと置換して染色体末端として機能することを示す結果が得られた。また、形質転換頻度は、テロメアを有しないベクターの約 5 ないし 10 倍高く、導入したマーカー遺伝子は安定に維持された。

上述の Aleksenko らや Long らの報告によるテロメアを有する複製型ベクターと、研究担当者らの作製した染色体組み込み型ベクターが構造的に異なる点として、導入するテロメアの長さの違いが考えられた。テロメア付加ベクター中のテロメアやマーカー遺伝子が染色体末端に組み込まれる原因を解明することで、染色体のさらに内部にベクターを組み込むことが可能になれば、*A. oryzae* 染色体の分断加工が可能になり、新規な育種技術の確立が期待できる。また、複製型ベクターを得ることができれば、細胞内での維持を安定化するようなセントロメア機能を有する配列を連結し、新たな染色体を *A. oryzae* で構築することが可能となり、染色体維持機構の解明や、大規模な遺伝子導入ツールとなる。

また、*A. oryzae* のテロメア配列は上述の糸状菌と異なる独自配列であるため、染色体

操作には *A. oryzae* 自身のテロメアを用いる必要がある。工業微生物として用いられている *A. oryzae* で染色体工学が開発されれば、糸状菌の先駆的成果になるのみならず、*A. oryzae* での新規物質生産系に向けた研究にも結びつく。*A. oryzae* はタンパク質等の物質生産力が高く、我が国で古来より醸造に利用されている菌であるため、その先駆的利用のためには我が国で世界に先駆けて *A. oryzae* の染色体工学を開発する必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、*A. oryzae* の染色体工学、すなわち染色体分断加工及び新規染色体構築による *A. oryzae* の育種法開発のため、そのツールとなるテロメア付加ベクター作製と改良を目指し、①改変テロメアベクターの作製、②改変テロメアベクターを用いた *A. oryzae* 染色体の分断条件及び複製型ベクター生成条件の解明の 2 点を目的とする。*A. oryzae* 染色体には、その末端に機能の無い遺伝子クラスターが存在していることが知られている。染色体分断条件の解明においては、その遺伝子クラスターを除去することを目指した。

## 3. 研究の方法

*A. oryzae* テロメア配列を有するベクターにより、*A. oryzae* 染色体が分断される条件を解明するため、以下の研究を行う。すなわち、*A. oryzae* テロメア配列 (隣接配列を含む) を単独で有するベクター、テロメア配列を 2 コピー有したベクターを作製する。後者のベクターの場合は、2 コピーのテロメアの方向を逆方向に反復させる。テロメア配列は、すでに研究対象としているテロメアクローン (TEL134、テロメア繰り返し単位を 11 回有し、それに隣接して A. オリゼゲノム配列を約 600bp 有する) の他に、繰り返し配列のみ有し長さの異なるテロメアを PCR 等により作製して用いる。また、*A. oryzae* 由来のマーカー遺伝子として、ピリチアミン耐性遺伝子 ptrA を用いる。

次に、上記の分断ベクターを環状で、あるいは切断点を変化させて線状にし、*A. oryzae* に形質転換により導入する。形質転換体のゲノム分析により、染色体分断が行われる条件を明らかにする。ベクターの挿入状況は、染色体電気泳動後のサザン法による解析及び、マーカーの安定性を計測して評価する。上記の実験により、テロメアベクターが染色体に組み込まれるために必要な条件を明らかにする。

## 4. 研究成果

麹菌 (*A. oryzae*) の染色体末端配列であるテロメアは、12 塩基を単位として約 9 ない

し 11 回繰り返した、特徴的な繰り返し配列であることを以前明らかにした。その約 4 倍長を有する合成長鎖テロメアを PCR 法により取得した。この際、プライマーとしては、テロメア繰り返し単位の 12 塩基を 4 回繰り返したフォワードプライマーと、これに半分の長さで相補的にアニーリング可能なリバースプライマーを準備し、PCR 反応を行った。その結果、サイズに幅のある増幅産物 (DNA) が取得された。これを大腸菌ベクターにクローニングし、導入された DNA のサイズを分析した。これらのうち最も長い増幅産物の塩基配列を決定した結果、天然のテロメア配列の約 4 倍長を有する長鎖テロメアであった。この合成長鎖テロメアを、その後の実験に使用した。さらに、染色体の末端から約 70 kb 内側に位置する偽遺伝子 B を PCR で取得した。同様に、偽遺伝子 B のセントロメア側に隣接した DNA 領域 E、そのさらにセントロメア側の領域 A、偽遺伝子 B のテロメア側に隣接した領域 C、領域 C から約 30kb テロメア側に位置する領域 D を取得した。領域 E、B、C、D は、当該染色体末端に存在している機能の無い遺伝子クラスターである (遺伝子クラスター内の遺伝子の順序は、テロメア側より、D-C-B-E-A の順)。領域 A、C、D はジゴキシンゲンにより標識して、プローブとしてサザンブロット解析に使用した。領域 E にマーカー遺伝子である *ptrA* (ピリチアミン耐性遺伝子) 及び、上記順方向合成テロメアを付加した直鎖状ベクター I (4XTEL-*ptrA*-E) を作製した。また、偽遺伝子 B、*ptrA*、及び逆方向合成テロメアが連結した直鎖状ベクター II (4XTEL-*ptrA*-B) を作製した。また、ベクター II を含む環状ベクター III を作製した。*A. oryzae* RIB40 株を宿主とし、上記 DNA により、プロトプラスト-PEG 法を用いた形質転換を行った。得られた形質転換株を純化した。なお、当該合成長鎖テロメア配列を逆方向に 2 コピー有した分断ベクターが *A. oryzae* に導入にされた場合、前述したような *A. nidulans* 及び *P. microspora* で、テロメア配列を両末端に有したベクターが線状の形態で染色体外に複製・維持されるという現象が *A. oryzae* でも再現可能と予測し、当該テロメア配列 2 コピーを逆向きに有するベクターの作製を試みたが、取得することができなかった。そこで、スパーサーを挟んで TEL134 を逆向きに 2 コピー連結したベクター IV を作製し、RIB40 株の形質転換を行った。

ベクター I による形質転換の場合では、宿主として RIB40 を用いると共に、RIB40 株を宿主として、アスペルギルス・オリゼの非同相的組換えに関与する酵素遺伝子の欠損株である RIB40  $\Delta$  *ligD* 株を作製し、同株の上述 DNA による形質転換株を取得した。これらの形質転換株のサザンブロット解析の結果、

RIB40 株が宿主の場合では約 5%の頻度で、偽遺伝子 B から染色体末端にかけての領域 B、C、D を含んだ遺伝子クラスターが欠損したと考えられる株が得られた。また、RIB40  $\Delta$  *ligD* 株が宿主の場合では、30%以上の頻度で、同クラスター欠損株と考えられる株が得られた (図 1)。これらの結果、機能のない遺伝子クラスターを合成長鎖テロメア含有ベクターを用いて、削除が可能になった。なお、導入した長鎖テロメア DNA は、導入後のサイズを分析の結果、以前に解明していた天然のテロメアと同程度のサイズに縮小していた。このことから、導入した合成テロメアは、天然のテロメアと同様に、テロメラーゼ等の染色体末端複製装置により長さを維持されながら機能していることが推察される。

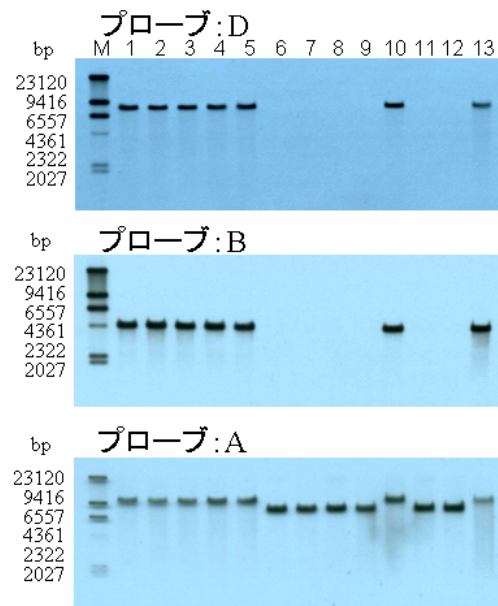


図1 ベクター形質転換体のサザンブロット解析

また、*ligD* 遺伝子破壊株を宿主とした場合では、当初、形質転換体を得られない可能性も考えられたが、特に問題なく取得された。出芽酵母では、テロメア領域には、テロメア合成と長さの維持に関わるテロメラーゼと共に、DNA 組換えに関わるタンパク質群や DNA リガーゼが相互作用していることが知られている。*A. oryzae* 等糸状菌類の *ligD* は、非同相末端再結合 (NHEJ) に関わる DNA リガーゼであり、本遺伝子の欠損株は糸状菌類においては相同組換え頻度が上昇する。*ligD* 遺伝子破壊株を宿主として目的のクラスター欠損株が取得できたことから、*ligD* 遺伝子産物は導入した *A. oryzae* 長鎖テロメアの維持には必要ないと考えられた。

*ptrA* マーカー用選択培地における生育速度は、同クラスター欠損株が非欠損株の 6 割程度であった (図 2)。非欠損株では、 $\Delta$  *ligD*

変異により、導入した直鎖状ベクターのうち *ptrA* 領域のみが染色体上の *thiA* 領域と相同組換えにより置換したと考えられる。クラスター欠損株では合成テロメアに近接して *ptrA* マーカー遺伝子が座位するため、テロメア位置効果による *ptrA* 遺伝子の発現抑制が生じている可能性が考えられた。



クラスター欠損株      クラスター非欠損株

図2 クラスター欠損株(左)と非欠損株(右)の寒天培地上の生育の比較

また、ベクターIIによる形質転換の場合では、宿主としてRIB40を用いた。形質転換体の約20%の頻度で、偽遺伝子Bよりテロメア側に位置するDNA2箇所(DNA領域C及びD)がサザンブロット法で検出されなかった。本実験のような逆向き合成成長鎖テロメアを連結したベクターを使用しても、上述の実験と同様に当該遺伝子クラスターの欠落が観察された。この考察として、ベクター上の逆向きテロメア配列に向かい合う方向で、順方向のテロメア配列が発生し、そのテロメア配列が染色体脱落に寄与した可能性が考えられた。

一方、環状ベクターIIIによる形質転換体株は、1:2の割合で生育良好な株と、著しい生育阻害を示す株に分かれた。生育良好な株の解析結果、上述のような染色体脱落は発生せず、偽遺伝子B領域も含めた複数の領域にベクターが挿入されたと考えられた。これらのことから、染色体分断を制御するためには、直鎖状ベクターを使用する必要があることが考えられた。併せて、逆向きテロメア配列のみのベクターによっても染色体分断が発生することを初めて明らかにした。また、合成成長鎖テロメア連結ベクターにより機能を有しない遺伝子クラスターを欠損することが可能と考えられた。なお、ベクターIVを用いたRIB40形質転換体では、導入したDNAは染色体に組み込まれていることを確認した。予備的な染色体電気泳動の結果、大きな染色体レベルでの変化は観察されなかった(図3)。現在、これらの成果を取りまとめた論文の投稿を準備している。

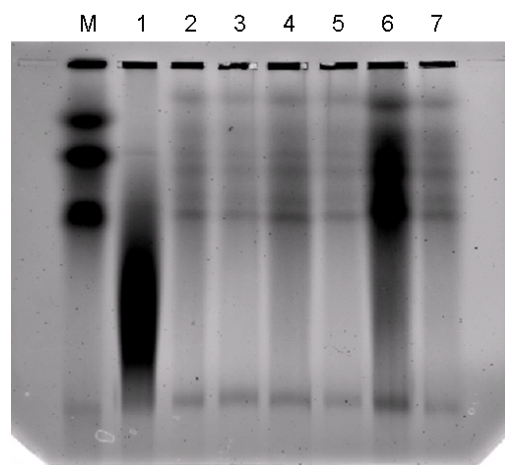


図3 ベクターIV形質転換体染色体のCHEF電気泳動  
M. S. pombe; 1, RIB40(分解); 2, 形質転換体(TF)1;  
3, TF2; 4, TF3; 5, TF4; 6, TF5; 7, TF6

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

楠本 憲一 (KUSUMOTO KEN-ICHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究  
機構・食品総合研究所・応用微生物研究領  
域・ユニット長

研究者番号：80353978

### (2) 研究分担者

鈴木 聡 (SUZUKI SATOSHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究  
機構・食品総合研究所・応用微生物研究領  
域・糸状菌ユニット・主任研究員

研究者番号：90353979