



・肩書き 講師
・氏名 児島 孝明

・経歴
2006年 名古屋大学大学院生命農学研究科
博士課程修了 博士(農学)
2006年 大阪府立大学大学院理学系研究科研究員
2008年 名古屋大学大学院生命農学研究科助教
2017年 同講師, 現在に至る

バイオインフォマティクスを駆使した高機能麹菌の合理的育種

1. 背景と目的

Aspergillus oryzae(麹)は、味噌、醤油、酒などの我が国の伝統的醸造食品飲料の製造に必要な不可欠な安全かつ多用途の微生物ツールである。一方、高速シーケンシング技術とゲノム編集技術の普及により、微生物に新たな代謝パスウェイを導入し、任意の特性を付与する合成生物学的アプローチが現在注目されている。このアプローチを *A. oryzae* の合理的育種に実装し、任意の機能を保持する変異株を作出することで、従来の発酵産業への貢献は勿論、米、大豆などの農資源利用の多様性の向上が見込まれる。しかし、このアプローチには目的の物質生産に関与する

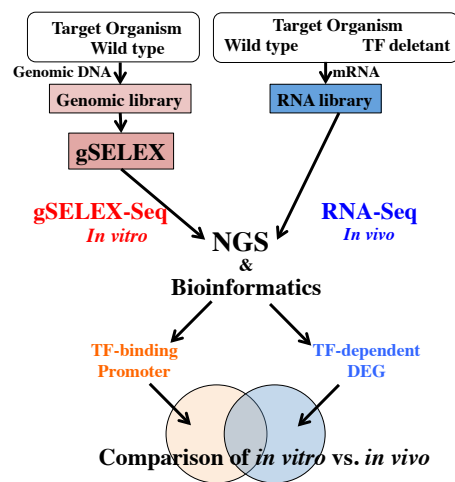


図1. CaT-Seqの概要

代謝パスウェイ全体の最適化が必要であり、この代謝パスウェイ最適化の鍵となるのが転写制御機構である。この機構は、転写因子と呼ばれる DNA 結合タンパク質に依存し、その複雑な制御機構の詳細は一部のモデル生物を除いて未知である。そのため、*A. oryzae* のような非モデル生物に産業目的を満たす機能を付与する為には、この転写制御機構を包括的に理解することが必要となる。

我々が開発した転写因子の制御部位の解析システム、CaT-Seq 法(Combinatorial genome-wide analysis pipeline for identifying Transcription factor-regulated genes using high-throughput Sequencing)は転写因子によって直接的に発現制御を受ける遺伝子の高精度かつ網羅的な同定を可能とする(図 1)。このシステムを用いて我々は、我が国の農資源の機能性の向上と、発

醸産業での技術革新を指向し、この CaT-Seq 法を発酵産業微生物である *A. oryzae* における有用物質生産関連転写因子の標的遺伝子の網羅的同定に応用し、転写制御ネットワークの全貌解明を目指している。さらに、この転写制御機構を基盤情報とし、ゲノム編集技術を駆使して改変型 *A. oryzae* の創生技術を確認する。この技術基盤構築を通して *A. oryzae* の利活用による醗酵生産物の効率的・安定的供給や新たな味の創出に寄与し、本アプローチの社会還元を目指す。

この研究目的の一環として本研究では、*A. oryzae* において合成される有用有機酸、コウジ酸(KA)の高効率生産を指向し、KA 関連遺伝子の発現制御に関与する転写因子 KojR の転写制御システムの解明と高効率生産に特化した新奇 *A. oryzae* の創生を試みた。

2. 方法

2-1) *A. oryzae* 由来 KojR を用いた gSELEX-Seq

A. oryzae ゲノムライブラリーと大腸菌による組換えタンパク質発現により調製した KojR の DNA 結合ドメインを用いて gSELEX による KojR と特異的に結合する DNA 断片の選択を行った。選択ラウンドを 4 回実施し、各ラウンドにおいて取得した DNA プールの回収率をリアルタイム PCR によって評価した。さらに、選択された各ラウンド由来の DNA プールを高速 DNA シーケンサー、Nanopore MinION に供した。なおこの際、各ラウンド由来の DNA プールを識別するバーコードを付加する独自の手法を考案した(図 3)。バーコードを付加した DNA プールの混合物を

ライブラリーとしてアプライすることにより、シーケンス解析 1 ランのみですべての DNA プールのデータを取得した。これにより最終的に約 1 Gb の DNA 配列データを取得した。

取得した配列データを *A. oryzae* のゲノム配列データにマッピングし、KojR 結合領域の情報を網羅的に取得した。得られた結合領域の位置情報を配列情報に変換した後、KojR の結合 DNA モチーフならびにプロモーター中に KojR 結合配列を保持する遺伝子リストを取得した。

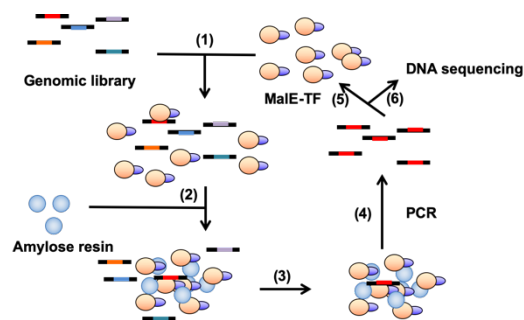


図2. gSELEX-Seqの概要

(Kojima et al., PLoS One 2016, 一部改訂)

各ラウンドにおいて取得した DNA プールの回収率をリアルタイム PCR によって評価した。さらに、選択された各ラウンド由来の DNA プールを高速 DNA シーケンサー、Nanopore MinION に供した。なおこの際、各ラウンド由来の DNA プールを識別するバーコードを付加する独自の手法を考案した(図 3)。バーコードを付加した DNA プールの混合物を

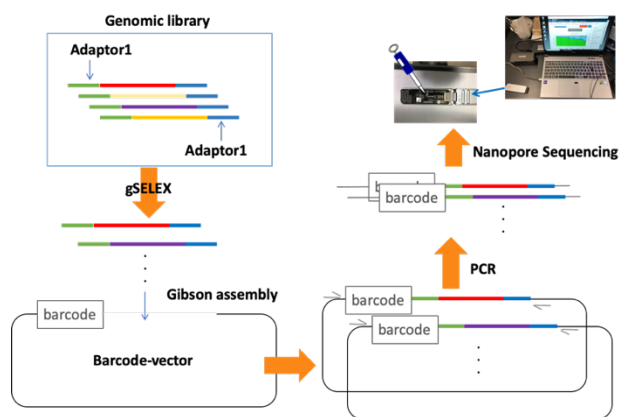


図3. gSELEXより取得したDNAプールを用いた Nanoporeシーケンシング用ライブラリーの調製

2-2) CRISPR/Cas9 を用いた *A. oryzae* KojR 欠損株の構築

A. oryzae ゲノム中の *kojR* 遺伝子領域を標的とした CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集による *kojR* 欠損株の構築を試みた。具体的には、KojR の DNA 結合ドメインの一部を変異のターゲットとし、Cas9 遺伝子を保持する発現ベクターに sgRNA をコードする配列を組み込んだプラスミドを *A. oryzae* RIB40 に導入し、シングルコロニーを取得した。なお、この発現ベクターは、東京大学丸山潤一 特任准教授よりご恵与頂いた (Katayama, T., Appl Environ Microbiol. 2019)。得られたコロニーを鋳型とした PCR により変異導入箇所周辺の DNA 配列を増幅したのち、DNA シーケンス解析を行うことにより、*kojR* 遺伝子への変異を確認した。

3. 結果

3-1) *A. oryzae* 由来 KojR を用いた gSELEX-Seq による KojR 結合部位の網羅的同定

A. oryzae ゲノムライブラリーと精製 KojR を用いた gSELEX を 4 ラウンド実施し、すべての選択ラウンドにおいて KojR 依存的に結合 DNA が濃縮されていることを確認した。各ラウンド由来の DNA プールをナノポアシーケンサーに供し、取得した配列情報をもとに *A. oryzae* のゲノム上の KojR 結合部位のマッピングを行った。その結果、一部の領域において KojR が選択的に結合していることを示すピークが確認された(図 4)。

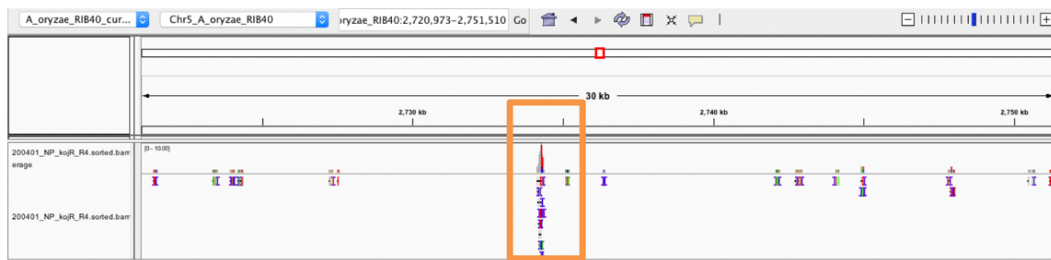


図 4 マッピングにより検出されたKojR結合部位の例

さらに、これら検出されたピークを開始コドン 1000 b 以内に保有する約 160 種類の遺伝子のリストを取得した。KojR 結合部位をプロモーター領域に保有するこれらの遺伝子は、KojR によって発現制御をうける候補遺伝子と考えられる。また、取得した結合部位の結合 DNA モチーフ解析を実施した。その結果一部の配列より (G/c)(G/a)(T/c)(G/c)ACGT(C/g)(A/g)などの配列が共通配列として検出された。

3-2) *A. oryzae* CRISPR/Cas9 による KojR 欠損株の取得

kojR の DNA 結合ドメインのコード領域を標的部位とした CRISPR/Cas9 用のプラスミド 2 種類を作製し、*A. oryzae* RIB40 に導入した。シングルコロニー由来の各標的部位の変異候補クローンを 2 種類ずつ単離、計 4 クローンのシーケンス解析を行ったところ、3 クローンにおいて変異を確認した(図 5)。変異導入効率率は 3/4 であり、本手法により、*A. oryzae* の転写

因子を標的とした場合においても高効率に変異導入できることが示された。

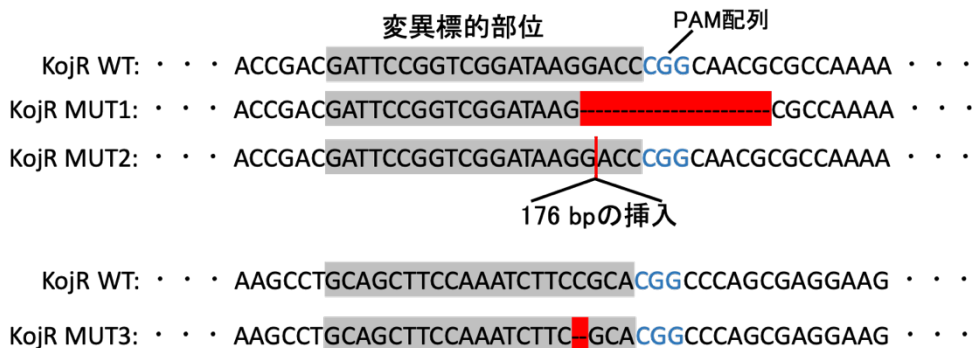


図. 5 *A. oryzae* CRISPR/Cas9により取得した*kojR*欠損株

4. 考察

我々の研究グループではこれまでに、gSELEX-Seq を用いて様々な転写因子の結合部位の網羅的同定に成功してきた(Kojima et al., PLoS One 2016, Oka et al., BMC Genomics, 2019)。この際、高速 DNA シーケンサーは、イルミナ社の HiSeq もしくは MiSeq を用いており、実際、本研究の申請時には MiSeq の使用を予定していた。しかしながらこの解析は、専門の解析施設への外注に依存しており、個々の研究室レベルでの迅速かつ簡便なシーケンス解析には適していなかった。そこで、シーケンシング精度の向上とともに近年急速に普及し始めているオックスフォード社提供のプラットフォーム、Nanopore MiniON を gSELEX-Seq へ導入することを試みた。その結果、5 種類の DNA プール(選択ラウンド 0-4)より総計約 1 Gb のシーケンシングデータを取得した。この Nanopore MiniON を用いることにより、従来の手順に比べて迅速性の飛躍的向上が期待できる。一方で、ライブラリーあたり百 Mb レベルのシーケンシングデータは *A. oryzae* のゲノム領域をカバーするにはやや低く、今後、ライブラリー調製手順やシーケンシングに供するライブラリー数の選定などをより慎重に検討する必要があると考えられる。

今回実施した gSELEX-Seq により約 160 種類の遺伝子を KojR によって発現制御をうける候補遺伝子として同定した。一方で、これらの遺伝子の大半は機能未知であり、また、先行研究においてコウジ酸代謝への関与が報告されている遺伝子 *kojA*, *kojT* (Marui, et al., JBB 2011)、*kpeA* (Arakawa, et al., Fungal Genet Biol. 2019)は今回取得した候補遺伝子リストには含まれていなかった。さらに、今回標的とした KojR は Zn(II)₂Cys₆ 型転写因子であり、このタイプの転写因子は CGG トリプレットと呼ばれる配列に結合することが知られているが、今回結合モチーフ解析によって抽出された共通配列にはこの配列が含まれていなかった。これらの要因として、1) gSELEX における選択条件の影響、2) シーケンシングデータのカバー率の不足、その他、3) *kojA*, *kojT*, *kpeR* は上流に KojR の結合部位を保持しない

KojRの間接的な影響下にある遺伝子、などが考えられる。1)に関して、今回、選択ラウンドを4回実施したものの、結合DNAの濃縮率の劇的な増加は観察されなかった。これは今回実施したgSELEXにおける選択条件が必ずしも適切ではなかったことを示唆している。今後、gSELEXにおけるKojRの*in vitro*結合反応ならびに洗浄条件を再検討した上で再度gSELEXを実施する予定である。また、2)に関して、今回取得したデータ量を参考に、解析DNAプール数をより絞った上でシーケンス解析を実施し、KojR結合領域をゲノムレベルで網羅的に同定するために十分なデータ量の確保を試みる。3)の*kjA*、*kjT*、*kpeR*がKojRによる間接的な影響下にある可能性を検討するためには、後述のRNA-Seqによる発現変動遺伝子解析も含めたより詳細な解析が必要となると考えられる。

今回実施した*A. oryzae*の*kjR*遺伝子をターゲットとしたCRISPR/Cas9により、標的部位に変異を導入した3種類の*kjR*変異株の取得に成功した。変異導入効率も75%と非常に高く、この結果は、本手法の有用性を示す証左と言える。本申請研究は、コウジ酸高効率生産株の作出を目的としており、この高機能株の創出には、KojRによって発現制御をうける遺伝子のプロモーター領域上のKojR結合部位を標的とし、変異を順次導入する戦略を採用する。この際、ゲノム上の任意の部位に変異を簡便に導入する技術が必要不可欠である。この観点からも、*A. oryzae*におけるCRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術を本研究に実装することに成功した意義は非常に大きい。

一方で、現時点(2020年4月30日)において、今回取得した*kjR*変異株を用いたRNA-Seqの実施に至っていない。今後、*A. oryzae*野生株および*kjR*欠損株よりmRNAを取得し、これをライブラリーとしたRNA-Seqを早急に実施し、KojR発現依存的に発現変動する遺伝子の同定ならびに、gSELEX-Seqによって取得した遺伝子リストと照合することでKojRによって直接的に発現制御をうける遺伝子を同定する。

また、コウジ酸の高効率生産を目的とした代謝プロセスデザインには、目的生産物質に応じた最適な代謝パスウェイの予測が必要となる。我々は現在、生化学代謝反応系をPC上で簡便に実施できる解析シミュレータ、WinBEST-KITの実装(関口、前橋工科大学研究紀要、2018)を検討している。このWinBEST-KITを用いたコウジ酸代謝に関与する化合物を生化学反応で接続したコウジ酸代謝マップの作成は既に完了しており、今後、KojRによる制御遺伝子情報をもとにした*in silico*代謝シミュレーションを実施し、コウジ酸の生産量を最適化する代謝プロセスデザインを試みる。このシミュレーションによって提案されたコウジ酸生産の最適代謝プロセスをもとにCRISPR/Cas9による関連遺伝子の欠損やプロモーター領域への変異を導入するファイン・チューニングを実施し、コウジ酸高効率生産株取得を試みる。

本研究における技術基盤はコウジ酸の高効率生産のみならず、*A. oryzae*を用いた醗酵生産物の効率的・安定的供給などへの応用も可能である。今回得られた研究成果をベースに本研究を一層加速させ、社会還元を目指していく所存である。

5. 謝辞

本研究の遂行にご支援を頂きました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団に深く感謝いたします。また、*A. oryzae* CRISPR/Cas9 用の発現プラスミドをご恵与いただきました東京大学 丸山潤一 特任准教授に心より御礼申し上げます。

6. 参考文献

- Kojima, T., Kunitake, E., Ihara, K., Kobayashi, T., and Nakano, H. (2016) A Robust Analytical Pipeline for Genome-Wide Identification of the Genes Regulated by a Transcription Factor: Combinatorial Analysis Performed Using gSELEX-Seq and RNA-Seq. PLoS One 11 e0159011.
- Katayama, T., Nakamura, H., Zhang, Y., Pascal, A., Fujii, W., and Maruyama, J.I. (2019) Forced Recycling of an AMA1-Based Genome-Editing Plasmid Allows for Efficient Multiple Gene Deletion/Integration in the Industrial Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae*. Appl Environ Microbiol. 85. e01896-18.
- Oka, H., Kojima, T., Ihara, K., Kobayashi, T., and Nakano, H. (2019) Comprehensive investigation of the gene expression system regulated by an *Aspergillus oryzae* transcription factor XlnR using integrated mining of gSELEX-Seq and microarray data. BMC Genomics 20,16.
- Marui, J., Yamane, N., Ohashi-Kunihiro, S., Ando, T., Terabayashi, Y., Sano, M., Ohashi, S., Ohshima, E., Tachibana, K., Higa, Y., Nishimura, M., Koike, H., and Machida, M. (2011) Kojic acid biosynthesis in *Aspergillus oryzae* is regulated by a Zn(II)₂Cys₆ transcriptional activator and induced by kojic acid at the transcriptional level. J Biosci Bioeng. 112, 40-3.
- Arakawa, G.Y., Kudo, H., Yanase, A., Eguchi, Y., Kodama, H., Ogawa, M., Koyama, Y., Shindo, H., Hosaka, M., and Tokuoka, M. (2019) A unique Zn(II)₂-Cys₆-type protein, KpeA, is involved in secondary metabolism and conidiation in *Aspergillus oryzae*. Fungal Genet. Biol. 127, 35-44.
- 関口 達也 (2018) システム生物学のための統合解析シミュレータ WinBEST-KIT の開発 前橋工科大学研究紀要 21 29-36.