



- ・特任准教授
- ・丸山 潤一

2001年 東京大学農学生命科学研究科 博士課程修了
2001年 東京大学農学生命科学研究科 研究員
2006年 東京大学農学生命科学研究科 助教
2010年 ドイツ ゲッティンゲン大学 客員研究員
2016年 東京大学農学生命科学研究科 特任准教授

麹菌におけるゲノム編集を利用した染色体改変による 交配技術開発

1. 背景と目的

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、日本の伝統的醸造産業において日本酒・醤油・味噌などの製造に用いられる、日本食の味に欠かせない重要な微生物である。麹菌では有性世代が発見されておらず、有性生殖を利用した交配が不可能であることが長年の課題である。有性生殖が実現すれば、異なる株の優れた特性を併せもつ株が得られるとともに、予想外の性質をもつ株を取得する可能性がある。麹菌株がもつ機能の多様性を広げることは、これまでにない味や食品機能性の創出につながり、醸造食品において新たな付加価値を生み出す可能性を秘めている。

研究代表者らのグループは以前、麹菌において2つの接合型 (MAT1-1型と MAT1-2型) が存在することを発見して、麹菌が有性生殖を行うことができる可能性を示した (Wada *et al.* 2012)。さらに、有性生殖に必要な細胞融合能力を麹菌が有することを約60年ぶりに再発見した (Wada *et al.* 2014; Tsukasaki *et al.* 2014)。麹菌には日本酒・醤油・味噌などの多様な用途に特化した多くの実用株が存在するが、研究代表者らはこれらの株の組み合わせによって融合体が存在しない不和合性という現象を麹菌で初めて見いだした (Okabe *et al.* 2018)。

次世代シーケンサー解析技術のさらなる発展により、ロングリードによるゲノム配列のシーケンス解析が可能となって染色体構造に関する情報が得られるようになり、麹菌の株間で染色体構造の比較ができるようになった。染色体構造が異なる場合、麹菌において有性生殖による交配を試みたとしても、減数分裂時に相同染色体の対合・組換え・分離が正常に行われないことを意味している。しかし従来は、麹菌の様々な実用株を対

象として染色体構造をデザインしたとおりに改変することはきわめて困難であり技術的に不可能であった。

研究代表者らは最近、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子改変技術を、麹菌において初めて確立した(Katayama *et al.* 2016, 2019)。このことにより、麹菌実用株における遺伝子改変の飛躍的な高効率化に成功した。

本研究では、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを染色体構造の改変に活用することにより、交配を不可能とする染色体構造の不一致を解消する。これにより、減数分裂における相同染色体の対合・組換え・分離が可能な麹菌株を取得して、有性生殖を利用した交配技術の確立を目指す。

2. 研究方法

2-1. *A. oryzae* 株の染色体構造の比較解析

A. oryzae の接合型が MAT1-1 型の RIB40 株(Machida *et al.* 2005)と、これと接合型が異なる MAT1-2 型の AO6 株(Wada *et al.* 2012)について、PacBio 社 Sequel を使用してゲノムシーケンス解析を行った。AO6 株では今回初めてゲノムを解析したため、ショートリードシーケンサー HiSeq を用いて、PacBio で得られた配列解析でのエラーを修正した。これらのデータをもとに、ソフトウェア mauve を用いて長鎖アライメントを行い、株間のゲノムを染色体レベルで比較した。

2-2. 特異的な染色体領域の大規模欠損

以上の比較ゲノム解析で見いだした特異的な染色体領域について、*A. oryzae* RIB40 株において、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムによる大規模欠損を行った。特異的領域を含む約 140 kb の両端、すなわち上流と下流の 2 か所に標的配列を設計した。これら 2 か所で DNA の二重切断を起こし、非相同末端結合 Non-Homologous End Joining (NHEJ) による修復の過程で切断末端どうしが接続されるような形のノックアウトを行った。

3. 結果と考察

3-1. *A. oryzae* 株の染色体構造の比較解析

最初に、*A. oryzae* の株ごとのゲノム情報の比較を行った。*A. oryzae* において最初に全ゲノム解析が行われ、接合型 MAT1-1 である RIB40 株(Machida *et al.* 2005)、これと接合型が異なる MAT1-2 型として初めて発見された AO6 株(Wada *et al.* 2012)を用いることにした。ロングリードシーケンサー PacBio を用いた配列解析を行った結果、それぞれの株において、*A. oryzae* で報告されている染色体数の 8 本に近い 11 個のコンティグを得ることができた。

次に、AO6 株では今回初めてゲノムを解析したため、ショートリードシーケンサー

HiSeq を用いて、PacBio で得られた配列解析でのエラーを修正した。これらのデータをもとに、長鎖アライメントを行い、株間のゲノムを染色体レベルで比較した。

図 1 に、2 つの株のゲノム染色体構造が異なる部分を比較した結果を示す。X 番染色体に RIB40 株が有する約 120 kb の領域が、AO6 株の該当染色体部位には存在しなかった。一方、これと相同性をもつ領域が、AO6 株では Y 番染色体の 1 つの遺伝子を分解して割り込む形で存在していた。したがって、約 120 kb の染色体領域が RIB40 と AO6 株の異なる染色体に存在することがわかった。

さらに、この染色体領域の有無について、2019 年に東京工業大学のグループによりゲノム情報が報告された、種麴として保存されている *A. oryzae* 株(Watarai *et al.* 2019)において調べた。その結果、82 株のうち、56 株において該当染色体領域が存在することがわかった。

続いて、*A. oryzae* の祖先とされる *A. flavus* で最初にゲノムが解読された NRRL3357 株 (Payne *et al.* 2006)について調べた。その結果、*A. flavus* の NRRL3357 株には、*A. oryzae* が有する染色体領域と相同性を有する領域がゲノム全体に存在しなかった。図 1 では、*A. oryzae* RIB40 株の X 番染色体の、*A. oryzae* AO6 株の Y 番染色体の特異的染色体領域を含む部分を比較しており、いずれも *A. flavus* 株が相同領域をもたないことを示す。以上の結果から、本研究で見いだした染色体領域は *A. oryzae* に特異的に存在することが示唆された。

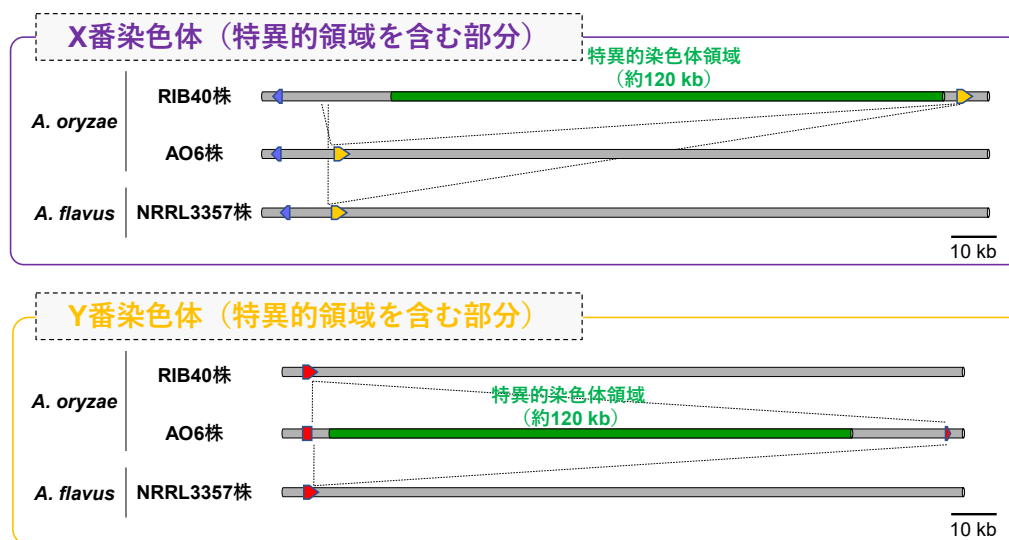


図1 *A. oryzae* の RIB40 株 AO6 株と *A. flavus* NRRL3357 株との染色体構造の比較

さらに、他の *Aspergillus* 種でも見いだした特異的染色体領域が存在するかを調べた。その結果、興味深いことに、醤油麴菌 *Aspergillus sojae* (Sato *et al.* 2011)においても、*A.*

oryzae でみとめられた特異的領域に相同性を有する染色体領域が存在した。一方で、*A. sojae* の祖先とされる *Aspergillus parasiticus* で最初にゲノムが解析された株 SU-1 (Linz *et al.* 2014)においては、特異的領域が存在しなかった。

以上のことから、見いだした染色体領域が *A. oryzae* と *A. sojae* といった日本の伝統的醸造産業に利用されている種に特異的に存在することが示唆された。

3-2. 特異的な染色体領域の大規模欠損

前項で見いだした *A. oryzae* に特異的な染色体領域は、MAT1-1 型の RIB40 株と MAT1-2 型の AO6 株で異なる染色体に存在することが示された。また、*A. oryzae* の祖先とされる *A. flavus* では有性世代が報告されていることから、特異的染色体領域は有性生殖に必須ではないことが考えられた。そこで、交配実験での染色体構造の不一致をなくすため、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムによる大規模欠損を行うことにした。

特異的染色体領域を含む約 140 kb の両端、すなわち上流と下流の 2 か所に標的配列を設計した。これら 2 か所で DNA の二重切断を起こし、非相同末端結合 NHEJ による修復の過程で切断末端どうしが接続されるような形でノックアウトを試みた。*A. oryzae* RIB40 株において行った結果、サザン解析ならびにシーケンス解析により大規模欠損が起きたことが確認された。

以上のことから、ゲノム編集を利用して、特異的染色体領域の大規模欠損株の取得に成功した。

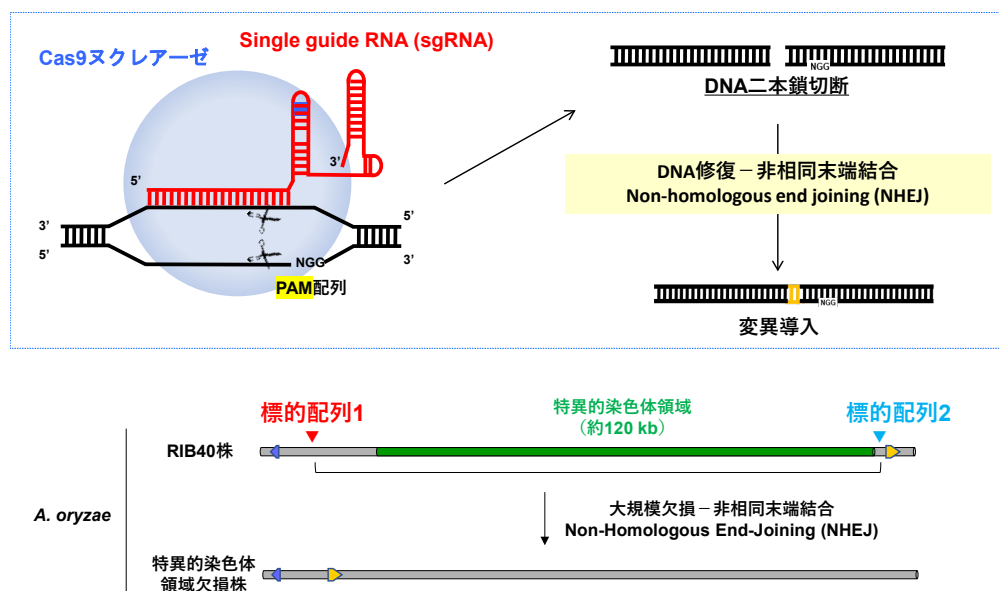


図2 ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムの原理(上段)と *A. oryzae* の RIB40 株における特異的染色体領域の大規模欠損(下段)

本研究では、ゲノム比較解析によって、日本の醸造産業に使用される *A. oryzae* と *A. sojae* に特異的に存在すると示唆される染色体領域を発見した。そして、ゲノム編集を利用することにより、*A. oryzae* において特異的染色体領域の大規模欠損に成功した。現在、MAT1-2 型の AO6 株での特異的染色体領域の大規模欠損を行い、MAT1-1 型の RIB40 株との染色体構造の不一致をなくすことを試みている。

さらに、作製した交配可能な染色体改変株を用いて、有性生殖による交配技術の確立を試みる。ここでは、研究代表者らが既に構築した交配による遺伝的掛け合わせを高感度に検出できる系を用いる。具体的には、ゲノム編集技術によってそれぞれの接合型株に異なる 2 重栄養要求性を付与して、遺伝的な掛け合わせが起こった株が生育可能になるような条件を設定することで、有性生殖による交配の有無を特異的に検出することを予定している。

一方で、研究代表者らは麹菌の株の組み合わせによって融合体が存在しない不和合性の現象を見いだしており (Okabe *et al.* 2018)、有性生殖の障害となる不和合性の解消を試みている (Mori *et al.* 2019)。そして、細胞融合に関与する新しい因子を見いだすことで (Katayama *et al.* 2021)、有性生殖の分子メカニズムに関する解明を行っている。

以上の一連のアプローチにより、麹菌における有性生殖による交配育種の開発が可能になることが期待される。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたりご支援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申し上げます。ゲノム配列解析でご協力いただきました基礎生物学研究所 重信秀治教授に心より御礼申し上げます。

6. 参考文献

- Wada R, Maruyama J, Yamaguchi H, Yamamoto N, Wagu Y, Paoletti M, Archer DB, Dyer PS, Kitamoto K (2012) Presence and functionality of mating-type genes in the supposedly asexual filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:2819-2829.
- Wada R, Jin FJ, Koyama Y, Maruyama J, Kitamoto K (2014) Efficient formation of heterokaryotic sclerotia in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:325-334.
- Tsukasaki W, Maruyama J, Kitamoto K (2014) Establishment of a new method to quantitatively evaluate hyphal fusion ability in *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78:1254-1262.
- Okabe T, Katayama T, Mo T, Mori N, Jin FJ, Fujii I, Iwashita K, Kitamoto K, Maruyama J (2018) BiFC-based visualisation system reveals cell fusion morphology and heterokaryon incompatibility in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Sci. Rep.* 8:2922.

Katayama T, Tanaka Y, Okabe T, Nakamura H, Fujii W, Kitamoto K, Maruyama J (2016) Development of a genome editing technique using the CRISPR/Cas9 system in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Lett.* 38:637-642.

Katayama T, Nakamura H, Zhang Y, Pascal A, Fujii W, Maruyama J (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.

Machida M, Asai K, Sano M, Tanaka T, Kumagai T, Terai G, Kusumoto K, Arima T, Akita O, Kashiwagi Y, Abe K, Gomi K, Horiuchi H, Kitamoto K, Kobayashi T, Takeuchi M, Denning DW, Galagan JE, Nierman WC, Yu J, Archer DB, Bennett JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Fedorova ND, Gotoh O, Horikawa H, Hosoyama A, Ichinomiya M, Igarashi R, Iwashita K, Juvvadi RR, Kato M, Kato Y, Kin T, Kokubun A, Maeda H, Maeyama N, Maruyama J, Nagasaki H, Nakajima T, Oda K, Okada K, Paulsen I, Sakamoto K, Sawano T, Takahashi M, Takase K, Terabayashi Y, Wortman J, Yamada O, Yamagata Y, Anazawa H, Hata Y, Koide Y, Komori T, Koyama Y, Minetoki T, Suharnan S, Tanaka A, Isono K, Kuhara S, Ogasawara N, Kikuchi H (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438:1157-1161.

Watarai N, Yamamoto N, Sawada K, Yamada T (2019) Evolution of *Aspergillus oryzae* before and after domestication inferred by large-scale comparative genomic analysis. *DNA Res.* 26:465-472.

Payne GA, Nierman WC, Wortman JR, Pritchard BL, Brown D, Dean RA, Bhatnagar D, Cleveland TE, Machida M, Yu J (2006) Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. *Med. Mycol.* 44(Supplement_1):S9-S11.

Sato A, Oshima K, Noguchi H, Ogawa M, Takahashi T, Oguma T, Koyama Y, Itoh T, Hattori M, Hanya Y (2011) Draft genome sequencing and comparative analysis of *Aspergillus sojae* NBRC4239. *DNA Res.* 18:165-176.

Linz JE, Wee J, Roze LV (2014) *Aspergillus parasiticus* SU-1 genome sequence, predicted chromosome structure, and comparative gene expression under aflatoxin-inducing conditions: evidence that differential expression contributes to species phenotype. *Eukaryot. Cell* 13:1113-23.

Mori N, Katayama T, Saito R, Iwashita K, Maruyama J (2019) Inter-strain expression of sequence-diverse HET domain genes severely inhibits growth of *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 83:1557-1569.

Katayama T, Bayram Ö, Mo T, Karahoda B, Valerius O, Takemoto D, Braus GH, Kitamoto K, Maruyama J (2021) Novel Fus3- and Ste12-interacting protein FsiA activates cell fusion-related genes in both Ste12-dependent and -independent manners in Ascomycete filamentous fungi. *Mol. Microbiol.* in press.