

論文の内容の要旨

論文題目 麴菌の相同組換えを用いた遺伝子破壊に関する分子生物学的研究

氏名 高橋 理

麴菌は相同組換え頻度が低く、また分生子の期間を含めて常に多核の状態を保持するため、遺伝子破壊株を取得するのに労力がかかる。そこで、本研究では麴菌を用いた相同組換えによる遺伝子破壊法について研究を行い、効率的な遺伝子破壊法の確立を試みた。

[麴菌 *Aspergillus sojae aflR* の導入による活性化能の検定]

アフラトキシンの前駆体である VERA を蓄積する *A. parasiticus* CS-10N2 (*niaD*, *pyrG*, *ver1*) を親株として *niaD* をマーカーとした遺伝子 targeting により *aflR* 破壊株 CS10-N2 Δ *aflR* を作製した。この株を用いると VERA の蓄積の有無によりアフラトキシクラスターの活性化の有無が判る。また VERA は明るい黄色の色素であるため、プレート上で容易に判別可能である。CS10-N2 Δ *aflR* に対して intact な *A. sojae* の *aflR*、*A. parasiticus* の *aflR*、*A. sojae* と *A. parasiticus* 間で C 末部分を入れ換えた *aflR*、amylase プロモーターにより発現させた *A. sojae* および *A. parasiticus* の *aflR* 等を導入した結果、*A. parasiticus aflR* を導入した場合には AF 前駆体である VERA が蓄積されるが、*A. sojae aflR* を導入した場合には全く蓄積が見られないことを示した。これらのことから *A. sojae aflR* は AF 生合成クラスターを活性化できないことが証明された。また *A. parasiticus aflR* の後半部分を *A. sojae aflR* の後半部分と入れ

換えると VERA の蓄積がなくなり、逆の場合には蓄積が見られた。さらにリアルタイム PCR により *A. parasiticus* 中での *A. sojae aflR* の転写が確認されたことから、*A. sojae aflR* は C 末の pre-termination により不活化しており、プロモーターは機能を持っていることが判明した。

[Positive-Negative 法を用いた *Aspergillus sojae* の遺伝子破壊]

Aspergillus sojae を用いて positive-negative 法による遺伝子破壊法の確立を試みた。まず *Aspergillus nidulans* 由来のオリゴマイシン耐性遺伝子 *oliC31* (mitochondrial ATPase subunit9) が麹菌においても triethyltin 感受性マーカーとして使用できることを見出した。次に *A. sojae pyrG* deletion 株を作製し、*pyrG* を positive セレクションマーカーとし、*oliC31* を negative セレクションマーカーとして相同領域の外側に配置した targeting ベクターを作製し、*A. sojae pyrG* deletion 株を親株として positive-negative 法を用いた遺伝子破壊実験を行った。*niaD*、*areA*、*aflR* に対する遺伝子 targeting 頻度の測定を行った結果、何もしない場合に比較して positive-negative セレクションにより、3~4 倍程度の相同組換え体の濃縮効果があることが判明した。

[*ku70* および *ku80* の同定および破壊株の作製と解析]

Aspergillus oryzae ゲノムシーケンスに対して BLAST 検索を行い、アカパンカビ *ku70* および *ku80* に対する相同性により、*A. sojae* および *A. oryzae* の *ku70* および *ku80* を同定した。*A. sojae* Δ *pyrG* 株を親株とし、*pyrG* をマーカーとして *ku70* 破壊株 (*ku70::pyrG*) および *ku80* 破壊株 (*ku80::pyrG*) を作製した。また得られた *ku70* 破壊株中の *ku80* を *ptrA* をマーカーとして破壊し、*ku70-ku80* 二重破壊株 (*ku70::pyrG, ku80::ptrA*) を作製した。また *A. oryzae ku70* 破壊株 (*ku70::pyrG*) も同様に作製した。得られた *ku* 破壊株の生育、孢子着生、温度感受性、メチルメタンスルホン酸、ヒドロキシウレア、ブレオマイシンに対する感受性を調べたところ、親株と比較して大きな差が見られないことが判明した。

[*ku* 破壊株における遺伝子 targeting 頻度の上昇]

A. sojae ku70 破壊株 (*ku70::pyrG*) の *ku70::pyrG* を *ku70::ptrA* で置き換えた株を作製し、*tannase*、*aflR* に対する targeting 頻度を親株と比較した。その結果、親株では targeting 頻度が 1~2%程度であったが、*ku70* 破壊株では 70~80%程度まで上昇することが判明した。*A. sojae ku80* 破壊株 (*ku80::pyrG*) も同様に *ku80::ptrA* で置き換えた株を作製し、targeting 頻度を比較したところ、*ku70* 破壊株同様に親株と比較して顕著な上昇が確認された。続いて *pyrG* が分子内組換えにより切り出されるように重複領域を設けた *ku80* 破壊ベクターを作製し、このベクターを用いて *A. sojae ku70* 破壊株 (*ku70::ptrA*) の *ku80* を破壊した後、5FOA 耐性により *ku80* 部分の *pyrG* を切り出して *ku70-ku80* 二重破壊株 (*ku70::ptrA, ku80 Δ*) を作製した。この株を使用して targeting 頻度を測定したところ、*ku70* あるいは *ku80* 破壊株同様、親株と比較して顕著な targeting 頻度の上昇が見られたが、単独の破壊と頻度に差は見られなかった。また *A. oryzae ku70* 破壊株 (*ku70::ptrA*) も同様に作製し、targeting 頻度を親株と比較したところ、顕著な上昇が見られた。

本研究の結果、麹菌においても positive-negative 法を用いることにより ectopic な組込みを伴うことなく遺伝子 targeting の効率がアップすることが示された。また非相同組換えに関与する遺伝子である *ku70* または *ku80* を破壊または抑制することにより、相同組換え頻度が顕著に上昇し、効率的な遺伝子 targeting を行う為の宿主となることが判った。これらの手法を駆使することにより、従来は非常に労力のかかる作業であった麹菌の遺伝子破壊株の取得を効率的に行うことが可能となった。また全ゲノム配列も決定されたことから、実用菌である麹菌で効率的な遺伝子 targeting が出来るようになった意義は大きく、今後は実用的な面も含めた麹菌研究の進展の促進に大きく寄与するものと考えられる。