

講演番号：2A07a11

講演日時：3月16日 11:10～ 共通講義棟北 A07 会場

人工 DNA 切断酵素 TALEN と一本鎖 DNA を用いた *Rhizopus* 属糸状菌における高効率相同組換え技術の確立

Efficient genome editing in the fungus *Rhizopus* by programmable nucleases, TALEN, and ssDNA

○壺井 雄一<sup>1</sup>、金田 実郎<sup>1</sup>、高橋 史員<sup>1</sup>、五十嵐 一暁<sup>1</sup>、瀧村 靖<sup>1</sup>、佐久間 哲史<sup>2</sup>、山本 卓<sup>2</sup> (1花王・生科研、<sup>2</sup>広島大院・理)

○Yuichi Tsuboi<sup>1</sup>, Jitsuro Kaneda<sup>1</sup>, Fumikazu Takahashi<sup>1</sup>, Kazuaki Igarashi<sup>1</sup>, Yasushi Takimura<sup>1</sup>, Tetsushi Sakuma<sup>2</sup>, Takashi Yamamoto<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Biol. Sci. Res., Kao Corp., <sup>2</sup>Grad. Sch. of Sci., Hiroshima Univ.)

【背景】*Rhizopus* 属糸状菌は、乳酸やフマル酸をはじめとする有機酸類を高生産することで知られており、バイオケミカル生産菌として期待されている。さらなる高生産化を目指した菌株育種には遺伝子組換えが有用であるが、*Rhizopus* 属菌に関しては遺伝子導入の報告例が少なく、また、遺伝子破壊の報告例は一例しかない。これは主に、相同組換え能が極めて低いためと、線状の二本鎖 DNA を環状化し複製起点がなくても複製するため、と考えられている。本検討では人工 DNA 切断酵素の 1 つである Transcriptional activator-like Effector Nuclease (以下、TALEN) を用いて、*Rhizopus* 属菌における相同組換えによる効率的な相同組換え技術の確立を目的に検討を行った。

【手段・結果】*Rhizopus delemar* (以下、*R. delemar*) を宿主として、ランダム変異育種により *trpC* 遺伝子 (トリプトファン合成遺伝子の 1 つ) が欠損した栄養要求性株を取得した。続いて *pyruvate decarboxylase* 遺伝子 (以下、*pdc* 遺伝子) を標的とした TALEN を合成し、弊社にて開発した *Rhizopus* 属用遺伝子発現ベクターに連結して、TALEN 発現プラスミドとした。また相同組換え用プラスミドとして、遺伝子導入マーカーである *trpC* 遺伝子断片の両側に、*pdc* 遺伝子の 5' 側と 3' 側のゲノムとの相同配列をそれぞれ 1000 bp 付加したものを作製した。以下の相同組換え検討では、マーカーノックインプラスミドを鋳型に、PCR により作製した相同配列部分を含む DNA 断片を形質転換に用いた。

TALEN 発現プラスミドと二本鎖 DNA 断片 (相同配列 1000 bp) を *R. delemar* に導入し、相同組換えによる *pdc* 遺伝子の破壊と *trpC* 遺伝子の導入を検討したところ、単離した 108 株全てにおいて相同組換えに失敗していた。これは、*Rhizopus* 属菌の性質である線状の二本鎖 DNA を環状化して複製起点なしでの複製が起こり、結果として、相同組換えが起こっていても菌が生育する偽陽性が頻出したためと推察された。そこで、ドナー DNA を「二本鎖 DNA」に代えて「一本鎖 DNA」として検討を行ったところ、単離した 8 株中 1 株において、相同組換えによる遺伝子破壊に成功した。また、必要な相同配列長の検討を行ったところ、最短で 50 bp にて相同組換えに到ることを確認した。加えて、近縁種である *R. oryzae* においても、同様の手法で相同組換えが可能であることを確認した。

【展望】本検討は、遺伝子破壊が困難と言われる *Rhizopus* 属菌において、相同組換えによる効率的な遺伝子破壊法を確立した初めての報告である。本技術を応用することで、今後 *Rhizopus* 属菌における代謝工学や基礎科学のさらなる発展が期待される。

genome editing, *Rhizopus*, homologous recombination