

講演番号：2C18p06

講演日時：3月18日 15:25～ C校舎18会場

麹菌実用株における CRISPR/Cas9 システムを用いた効率的な多重変異株取得法の確立
Efficient mutagenesis of multiple genes by the CRISPR/Cas9 system in *Aspergillus oryzae* industrial strains

○片山 琢也¹、藤井 渉²、丸山 潤一¹ (¹東大院・農生科・応生工、²東大院・農生科・応動)

○Takuya KATAYAMA¹, Wataru FUJII², Jun-ichi MARUYAMA¹ (¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²Dept. of Animal Res. Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景】麹菌 *Aspergillus oryzae* は食品醸造や酵素・タンパク質の生産に用いられる産業的に重要な糸状菌であり、このような様々な用途で数多くの *A. oryzae* 実用株が使用されている。これまでに野生株である RIB40 株に由来する株では非相同末端結合に関わる *ku70* や *ligD* の欠損株が取得され、効率的な遺伝子改変が可能となっている。一方、ほとんどの実用株ではこれらの欠損株は取得されておらず、遺伝子改変に多大な労力と時間を要する。近年、効率的な遺伝子改変の方法として複数のゲノム編集技術が確立されている。そのうちの一つである CRISPR/Cas9 システムは、ヌクレアーゼ Cas9 とそれを標的部位に誘導するガイド RNA (gRNA) の 2 つからなる簡便な方法である。これまでに我々は CRISPR/Cas9 システムを *A. oryzae* の遺伝子改変技術として確立している¹⁾。しかし、ゲノム編集用プラスミドの導入のために *niaD* 欠損株の作製が必要であること、変異株の取得効率が 10~20% と比較的低いことが課題であった。そこで、本研究ではゲノム編集用プラスミドを改良し、変異株取得効率の向上とプラスミドリサイクルによる多重変異株の作製を試みた。

【結果】まず、*niaD* に代わる選択マーカーとして、ピリチアミン耐性遺伝子 *ptrA* をゲノム編集用プラスミドに挿入した。さらに、プラスミドの自立複製を可能とするとされる *Aspergillus nidulans* 由来の DNA 断片 AMA1 の半分にあたる領域を挿入した。作製したプラスミドを用いて変異導入を試みた結果、RIB40 株および日本酒製造用 RIB128 株、醤油製造用 RIB915 株において 50~100% の割合で変異株が取得できた。

次に、導入したゲノム編集用プラスミドを変異株から脱落させるため、*amyB* プロモーター制御下で *Aoace2* を発現する断片をプラスミドに挿入した。*Aoace2* は分化に関わる転写因子をコードし、これまでに過剰発現によって生育が著しく低下することを示している²⁾。このプラスミドを用いて RIB128 株の標的遺伝子に変異を導入した後、*amyB* プロモーターの誘導条件で培養することでプラスミドを脱落した標的遺伝子の変異株を単離することができた。さらに、その株に別の遺伝子を標的とするゲノム編集用プラスミドを導入することによって、二重変異株の取得に成功した。以上の結果から、本研究で作製したプラスミドを用いることで、実用株において効率的に多重変異株を作製できることが示された。

1) Katayama *et al.*, *Biotechnol. Lett.*, 38, 637-642, 2016

2) 中村ら、第 67 回日本生物工学会大会要旨集 p.89, 2015

Aspergillus oryzae, Genome editing, CRISPR/Cas9

発表責任者：丸山潤一 (amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)