

講演番号：3C23p11

講演日時：3月19日 16:50～ C校舎 23会場

ポジティブセクションが出来ない遺伝子の麴菌ゲノム編集法の開発

Development of genome editing technique for *Aspergillus oryzae* genes that are unable to positive selection

○嶋本 孝平<sup>1,2</sup>、齋藤 亮太<sup>1</sup>、和田 悠作<sup>3</sup>、織田 健<sup>1</sup>、奥田 将生<sup>1,2</sup>、岩下 和裕<sup>1</sup> (<sup>1</sup>酒類総合研究所、<sup>2</sup>広島大院・生物圏、<sup>3</sup>(株)ファスマック)

○Kouhei SHIMAMOTO<sup>1,2</sup>, Ryouta SAITOU<sup>1</sup>, Yusaku WADA<sup>3</sup>, Ken ODA<sup>1</sup>, Masaki OKUDA<sup>1,2</sup>, Kazuhiro IWASHITA<sup>1</sup> (<sup>1</sup>NRIB., <sup>2</sup>Hiroshima Univ., <sup>3</sup>Fasmac Co., Ltd.)

【目的】麴菌は、産業で広く利用されている微生物で、宿主・ベクター系や相同組換え系の開発により遺伝子改変が可能である。こうした技術や突然変異処理による育種は煩瑣である上、オフターゲットな変異が産業株ではしばしば問題となる。そこで近年、標的部位を迅速かつ簡便に編集できるゲノム編集技術の CRISPR/Cas9 システムが注目されている。一般にこのシステムは、構築した Cas9 プラスミドベクターを導入することで用いられてきた。この場合、外来 DNA を入れる必要があり遺伝子組換え体となる。そこで我々は、これまでに *in vitro* で Cas9 タンパク質と標的遺伝子へ Cas9 をターゲットするガイド RNA の複合体 (Ribo-Nucleotide protein: RNP) を直接麴菌の細胞内に導入することで標的遺伝子を編集できる技術の開発を行ってきた。しかし、本技術を用いたゲノム編集法ではゲノム編集体の取得率が低く、ポジティブセクションマーカーとなるような表現型が現れない遺伝子のゲノム編集体を選別するのは事実上困難である。そこで、本研究ではそうしたポジティブセクション出来ない遺伝子でも本技術によるゲノム編集が行える方法を開発することを目的とした。

【方法・結果】ポジティブセクションが難しい遺伝子として分生子の着色に関わる *wA* 遺伝子を選出した。はじめに、ポジティブセクションマーカー遺伝子をターゲット箇所にノックインする方法 (Knock in genome edit 法) について検討した。宿主菌株として *pyrG* 遺伝子欠損をしている株を選出した。これに親株である RIB40 株から PCR により得た *pyrG* 遺伝子の DNA 断片、*wA* の RNP を麴菌に直接導入した。その結果、ウラシル要求性が相補された候補株のうち約 8 割が白色分生子であった。これらの株の *wA* 付近を PCR で確認した結果、半数以上で *pyrG* 遺伝子のターゲット箇所への Knock in を確認することが出来た。

次に我々は、ターゲット遺伝子のゲノム編集体を迅速に、より高確率で得られると期待して、マーカーとターゲット遺伝子を同時にゲノム編集する方法 (Co-genome editing 法) を検討した。麴菌 RIB40 株に対して、*wA* をターゲットにした RNP 溶液と *pyrG* をターゲットにした RNP 溶液を混合し、麴菌に直接導入した。5-FOA 含有培地で選択の結果、ウラシル要求性が相補された株の 2 割程度が白色分生子となる共ゲノム編集株を得た。

よって本研究により、ポジティブセクション出来ない遺伝子についてもワンステップでゲノム編集を行う事が可能となり、実用麴菌のゲノム編集に大きな道が示された。

*Aspergillus oryzae*, CRISPR/Cas9, genome editing