

1P-001 突然変異誘発処理を行わずに育種した麹菌 *Aspergillus oryzae* の宿主

○朽方 康裕, 辻 華奈, 利根川 唯, 森谷 翔太, 中島 春紫
(明治大・農)
harushi@meiji.ac.jp

麹菌 *Aspergillus oryzae* は高いタンパク質分泌能を有する日本の代表的な醸造微生物であり、さまざまな酵素タンパク質の生産宿主に用いられている。しかし、現在国内で遺伝子工学研究に幅広く用いられている多くの *A. oryzae* の宿主菌株は紫外線照射等による突然変異誘発操作を繰り返して育種されているため、非意図的な変異の蓄積が懸念される。実際に、代表的な宿主株は標準的な野生株 RIB40 株と比較して分生子形成能が 1/3~1/4 程度に低下していることが観察されている。今後の基礎的な *A. oryzae* の分子機構の解明および有用タンパク質生産宿主への応用を見据えると、野生型 RIB40 株に対して突然変異誘発処理を行わずに育種した宿主の取得が望まれる。

野生型 RIB40 株は非相同組換えの頻度が高い(80~90%)ため、導入遺伝子の染色体上への組み込み座位の制御が難しい。そこで、本研究では非相同組換えに関与する *ligD* 遺伝子およびウラシルの生合成に関与する *pyrG* 遺伝子を破壊して新しい宿主の構築を行った。さらに、*Aspergillus nidulans* 由来選択マーカー AnpyrG-MR をリサイクリングマーカーとして繰り返し用いることにより、外来タンパク質生産の障害となりうる *amyR*(アミラーゼ系転写因子)、*tpaA*(トリペプチジルペプチダーゼ)、*pepE*(酸性プロテアーゼ)の破壊株を作製した。

新規宿主 HiMe20 株(*AligD.ApyrG.AamyR.ApepE.AtpaA*)に *Trichoderma reesei* 由来セルラー遺伝子 *Tregl3* を *enoA* プロモーター制御下で発現させたところ、従来型宿主の NSPID1 株と比較して *Tregl3* の生産性が 2.9 倍に向上することを観察した。

Construction of non-mutagenized host strains in *Aspergillus oryzae*

○Yasuhiro Kuchikata, Kana Tsuji, Yui Tonegawa, Shota Moriya, Harushi Nakajima
(Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, molecular breeding, heterologous production, protein expression

1P-002 親水性ドメインを持つヒドロフォービン HypD の特性解析

○石倉 幹大, 藤井 祐希, 土屋 貴寛, 稲葉 拓哉, 中島 春紫
(明治大・農)
harushi@isc.meiji.ac.jp

ヒドロフォービンは、糸状菌や担子菌の細胞表層に局在する低分子量タンパク質で、特徴的な配置の 8 つの Cys 残基を有する。これまでに麹菌 *Aspergillus oryzae* から 4 つのヒドロフォービン (HypA-D) を見出し出している。HypD は全長 207 アミノ酸で、C 末端に特異な 63 個の荷電アミノ酸を含む 93 アミノ酸の親水性領域を有している。この C 末端領域はデータベース上に相同タンパク質の報告がなく、既存のヒドロフォービンと異なる性質および機能を持つことが予想される。そこで本研究では、HypD の機能と性質について解析を行った。水分が不足した乾燥条件下で *hypD* 遺伝子発現量の有意な増加が認められたこと、および *hypD* 遺伝子の欠失により乾燥条件下での分生子形成量が増加したことから、乾燥環境における分生子形成に HypD が関与していることが示唆された。さらに、麹菌の HypD 高生産株を作製し、培養上清を回収して陰イオン交換カラムと疎水性相互作用カラムを用いることにより、精製 HypD を得た。精製 HypD により疎水性/親水性基材の表面を被覆したところ、基材表面の濡れ性の変化が観察され、ヒドロフォービンとしての吸着性と表層修飾の性質が認められた。

Characterization of a hydrophobin HypD from *Aspergillus oryzae*

○Kandai Ishikura, Yuki Fujii, Takahiro Tsuchiya, Takuya Inaba, Harushi Nakajima
(Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, hydrophobin, osmotic stress

1P-003 麹菌における CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術の確立

○片山 琢也¹, 中村 英淳¹, 田中 勇気¹, 岡部 知弥¹, 藤井 渉²,
北本 勝ひこ¹, 丸山 潤一¹
(¹東大院・農生科・応生工, ²東大院・農生科・応動)
amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

【目的】 糸状菌の遺伝子改変は、多くの選択マーカーの開発や非相同末端結合に関わる遺伝子の欠失により効率よく行われるようになった。しかし産業的に用いられている株では、このような技術が十分に整備されておらず、遺伝子改変を行うには多大な労力が必要である。近年、より迅速かつ簡便なゲノム編集技術として、*Streptococcus* 属のエンドヌクレアーゼ Cas9 を用いた CRISPR/Cas9 システムが、動物や植物で利用されている。このシステムでは、ガイド RNA によって標的部位にリクルートされた Cas9 が DNA 二本鎖を切断し、この修復反応の際に変異が導入される。本研究では、麹菌 *Aspergillus oryzae* において、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術の確立を目的とした。

【方法・結果】 *A. oryzae* で安定に発現させるためにコドン改変を行った *cas9* 遺伝子、及びゲノム上の標的配列を含むガイド RNA を発現させるプラスミドを構築した。標的遺伝子にはウリジン/ウラシル生合成に必要な *pyrG* 遺伝子、分生子の色素合成に関与する *wA* 遺伝子を用いた。構築したプラスミドを *A. oryzae* の野生型株に導入したところ、標的配列中に塩基の挿入や欠失を持つ形質転換体を得られた。*pyrG* 変異株ではウリジン/ウラシル要求性となり、*wA* 変異株では分生子が白色となったことから、期待された表現型をそれぞれ示した。本研究により、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術が *A. oryzae* において利用可能であることが示された。

Development of genome editing using the CRISPR/Cas9 system in *Aspergillus oryzae*

○Takuya Katayama¹, Hidetoshi Nakamura¹, Yuuki Tanaka¹, Tomoya Okabe¹,
Wataru Fujii², Katsuhiko Kitamoto¹, Jun-ichi Maruyama¹
(¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²Dept. of Animal Res. Sci., The Univ. of Tokyo)

Key words *Aspergillus oryzae*, genome editing, CRISPR/Cas9, filamentous fungi

1P-004 麹菌 *Aspergillus oryzae* の菌核形成に関する転写因子の探索と解析

○中村 英淳¹, 丸山 潤一¹, 小川 真弘², 小山 泰二², 有岡 学¹,
北本 勝ひこ¹
(¹東大院・農生科・応生工, ²野田産研)
amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

【目的】 菌核は一部の糸状菌で観察される耐久性の休眠構造であり、*Aspergillus flavus* などではその内部に有性生殖器官が形成されることが報告されている。日本酒、醤油、味噌などの醸造に利用されている麹菌 *Aspergillus oryzae* においては、有性世代が見つかっておらず、その理由の一つとして、菌核形成能が低下していることが挙げられる。*A. oryzae* では転写因子である SclR と EcdR が菌核形成を、それぞれ正と負に制御することが知られている。しかし、菌核形成に関与する転写因子は、これらの他にも存在すると考えられる。本研究では、*A. oryzae* の菌核形成に関わる転写因子の探索と解析を目的とした。

【方法・結果】 転写因子破壊株ライブラリーより菌核形成能が変化した株をスクリーニングした結果、AO090003000678 の破壊株を見出した。同遺伝子は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞質分裂に関与する *ACE2*, *Aspergillus fumigatus* の分生子形成を正に制御する *ace2* と相同性を有していたことから、*Aoace2* と命名した。*A. oryzae* の *Aoace2* 破壊株では分生子形成能が低下し、*A. fumigatus* の *ace2* 破壊株と同様の結果であった。また、*Aoace2* 破壊株では菌核形成が顕著に増加したことから、*AoAce2* が菌核形成を制御する転写因子であることを初めて明らかにした。現在、他の転写因子に関しても解析を行っている。

Functional characterization of transcription factors in sclerotia formation of *A. oryzae*

○Hidetoshi Nakamura¹, Jun-ichi Maruyama¹, Masahiro Ogawa², Yasuji Koyama²,
Manabu Arioka¹, Katsuhiko Kitamoto¹
(¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²Noda Inst. Sci. Res.)

Key words *Aspergillus oryzae*, sclerotia, transcription factor