

クリスパー・キャス9技術を用いた麹菌の増殖抑制因子の決定

浜中祐弥^{1*} 黒田裕樹^{1**}

¹慶應義塾大学 環境情報学部
*t17673yh@sfc.keio.ac.jp, **hkuroda@sfc.keio.ac.jp

要旨

発酵産業・食品における主役的な微生物である麹菌(種名: *Aspergillus oryzae*)を培地上で培養するとコロニー間に増殖抑制効果が生じることが広く知られている。しかしその原因となる分子機構は分かっておらず、私はこの現象に強い興味を抱き、その原因を解明する研究に取り組んだ。まず、麹菌の増殖抑制時と非抑制時それぞれの転写産物をRNA-seq解析を用いて網羅的に調べ、増殖抑制時に発現量が上昇する遺伝子を48個同定した。そして、ゲノム編集技術であるクリスパー・キャス9を用いて麹菌野生株からRNA-seq解析で得られた候補遺伝子をノックアウト(以下 KO)し、取得した株を対峙培養することで機能を検証した。現在、3つの候補遺伝子KO株を作成したが、それらは少なくとも単独では増殖抑制に関与していないことが判明した。今後、残りの候補遺伝子のKO株を作成し、麹菌の増殖抑制因子を特定していく。

キーワード: 麹菌、*Aspergillus oryzae*、増殖抑制、ゲノム編集、RNA-seq

1 背景

麹菌 *Aspergillus oryzae* は味噌や醤油、酒の生産に用いられる糸状菌である。二次代謝産物生産の宿主にも用いられており、発酵産業においても重要な微生物である(Alberti *et al.*, 2017)。麹菌は2008年に日本醸造学会によって国菌に定められており、日本人に馴染み深い微生物でもある(Kitamoto, 2015)。

麹菌を寒天培地上の1か所に植菌し培養すると、植菌した地点から同心円状にコロニーが成長する(図1A)。しかし2か所に植菌し培養すると形成された2つのコロニー間に間隙が形成される(図1B)。図1Aに示したように、麹菌は同心円状にコロニーが成長する性質があるので、本来ならば2か所に植菌したコロニーは2つの円が重なった形状をとることが予想される。つまり2つのコロニー間には何らかの増殖を抑制する現象が生じていると考えられる。このように糸状菌が増殖を抑制する現象について、糸状菌が防御物質を分泌することで他種の微生物の接近を妨げるという報告があるが(Leeder *et al.*, 2011)、麹菌で見られる同種のコロニー間において増殖抑制が生じるという報告はこれまでにない。また、この現象は麹菌を扱う研究者や醸造に関わる人の中ではよく知られている現象であるが、具体的なメカニズムは知られていない。そこで麹菌の増殖を抑制するメカニズムを解明するため、本研究では、まず増殖抑制が確実に現れる系を確立した上で、その際に生じる遺伝子発現量の差異をRNA-seq解析を用いて調べる。そして、得られた候補遺伝子について、2020年度のノーベル化学賞でも有名になった最新鋭のゲノム編集技術であるクリスパー・キャス9を用いてノックアウト(以下、KO)する。そして、この現象に関わる分子機構を特定していく。

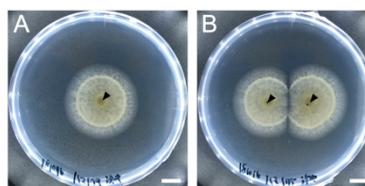


図1: 寒天培地上で培養した麹菌コロニー

浜中自身が遺伝子スクリーニングのために実施したもの。(A) 寒天培地上の1か所に植菌し(矢頭)、3日間培養した麹菌コロニー。コロニーは同心円状に広がっている。(B) 寒天培地上の2か所に植菌し(矢頭)、3日間培養した麹菌コロニー。コロニーが対峙する場所では間隙が形成される。スケールバーは10 mm。

2 方法

2.1 RNA-seq解析による増殖抑制に関わる遺伝子の探索

実験には野生株である麹菌RIB40株(*Aspergillus oryzae* RIB40, NBRC100959) (Machida *et al.*, 2005)を用いた。培地はPD (Potato Dextrose)培地(#05709, ニッスイ)を用いて、9 cmプラスチックシャーレ(#1-8549-04, アズワン)に固化したものを使用した。縦40-50 mm、横40-50 mmに切り取ったセロファン紙(#CO-176, 薦田紙工業)を滅菌蒸留水に浸した後PD培地上に置き、15分ほど乾燥した。セロファン紙上に10000個/10 μ Lに調整した分生子懸濁液を1点(非増殖抑制条件)(以下、single)、もしくは20 mm離して2点(増殖抑制条件)(以下、double)に10 μ Lずつスポット植菌し、30 $^{\circ}$ Cで3日間培養した。doubleにおいて増殖抑制が生じていることを確認後、使い捨て耳掻き綿棒(#G035-118, ダイソー工業)を用いてそれぞれのプレートから菌体を1.5 mLチューブに採取した。1つのサンプルにつき2プレートから菌体を回収し、サンプルは各条件でそれぞれ2つずつ計4サンプル(single1, single2, double1, double2)作成した(図2)。

回収した菌体は-80 °Cで凍結後にバイオマッシャー(#320152, nippi)で破砕し、RNAiso (#9107, TaKaRa)に溶解しフェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿によって不純物を取り除いた。その後RNeasy (#74104, QIAGEN)を用いて、total RNAを抽出した。抽出したtotal RNAサンプルを用いて、RNA-seq解析を行った。RNA-seq解析は株式会社生物技研に依頼し、遺伝子発現比較は比較1 (single1 vs. double1)と比較2 (single2 vs. double2)の2種類とした。検出された発現変動遺伝子を比較し、比較1と比較2で重複している遺伝子を抽出した。RPKM正規化後の数値を用いて、doubleのRPKM値の平均値とsingleのRPKM値の比を取り、singleとdouble間の発現差を計算した。発現変動遺伝子はblast検索を行い、検索結果の中から相同性が95 %以上のもので機能面に即した命名がされているものを探し、遺伝子の機能を推定した。また、GO (Gene Ontology)エンリッチメント解析 (<https://elbe.hki-jena.de/fungifun/fungifun.php>)を行い、発現変動遺伝子の機能で多く含まれるものを検索した。SignalP (ver. 5.0, DTU Health tech)を用いて抽出した遺伝子のシグナルペプチドの有無を調べ、分泌タンパク質であるかどうかを推定した。

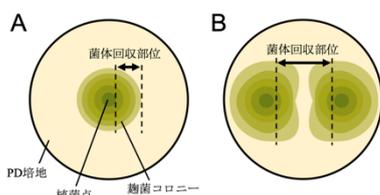


図2：菌体サンプルの回収部位の模式図

(A) 非増殖抑制条件の菌体回収部位。植菌点付近を避けて、コロニーの半分をサンプルとして用いた。(B) 増殖抑制条件の菌体回収部位。植菌点付近を避けて、2つのコロニーが面している部位をサンプルとして用いた。

2.2 ゲノム編集によるノックアウト株の作成

2.2.1 プラスミドの構築

先行研究で確立されているクリスパー・キャス9システム(Katayama *et al.*, 2019)を用いて、RNA-seq解析で得られた増殖抑制に関与する候補遺伝子のKO株を作成した。先行研究で作成されたゲノム編集プラスミド(ppAsATC9a2)を制限酵素Sma Iで切断したものをベクターとし、CRISPR direct (Naito *et al.*, 2015)でデザインしたsgRNA発現カセット(表1)をIn-Fusion HD cloning kit (Clontech)を用いて挿入した(ppAsATC9a2gxx)(図3)。また本研究では相同組換えによるKOを行うため、ドナーDNAを含むプラスミドも作成した。対象遺伝子の開始コドンよりも上流側、終始コドンよりも下流側のそれぞれ1000 bpの領域をゲノムDNAより増幅し、これら2断片をBamHIで処理したpUC19(#3219, TaKaRa)に挿入し、ドナープラスミドとした。

表1：候補遺伝子中の標的配列

CRISPR directで遺伝子中に設計したゲノム編集を施すための標的部位的配列。PAMを除いた配列をプラスミドに挿入した。

遺伝子名	標的配列+PAM
AO331	GGTCCACCAAGCCAAGTTAATGG
AO170	GTCTCGGTATCTGTTACGTTGG
AO195	GAGTCCGGACCAATGTATTGGG

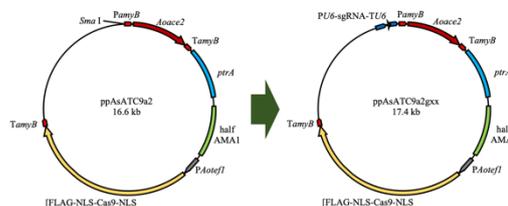


図3：ゲノム編集プラスミドコンストラクト

左側が元となるppAsATC9a2。amyBプロモーターの上流でSma Iで切断し、sgRNA発現カセットを挿入した。

2.2.2 麹菌の形質転換

麹菌の形質転換は先行研究 (Maruyama and Katsuhiko, 2011)の方法を一部改変し行った。GP培地 (2 % glucose, 1 % Hipolyptone(#392-02115, wako), 0.5 % KH₂PO₄, 0.05 % MgSO₄·7H₂O)を用いてRIB40株を30 °Cで一晩前培養したものをプロトプラスト作成に用いた。形質転換した株はピリチアミンと1.2 Mのsorbitolを含むCD培地(2 % glucose, 0.3 % NaNO₃, 0.2 % KCl, 0.1 % KH₂PO₄, 0.05 % MgSO₄·7H₂O, 0.002 % FeSO₄·7H₂O, 1.5 % Agar [pH 5.5])で2回培養した。その後Aocce2遺伝子を発現するために2%のdextrinを含むCD培地で培養し、プラスミドを脱落させたKO株を得た。

2.2.3 遺伝子のノックアウトの確認

作成したKO株から気中菌糸を少量かき取ったものを鋳型として、対象とする遺伝子の領域をPCRで増幅した。ドナーDNAの領域よりも外側にプライマーを設計した(表2)。PCRはPrimesSTAR HS DNA polymerase(TaKaRa)を用い、94 °C 5分、[94 °C 15秒、68 °C 4分]x 35、68 °C 4分で反応させた。RIB40株のゲノムDNAを鋳型として増幅した断片と比較し、KOの確認をした。

表2：用いたプライマー

プライマー名	配列(5'-3')
AO170-F	CAACATATCACCCGAGAAATTCCTAC
AO170-R	CTTCACATGATCTGCCAAGGACAG
AO195-F	GACGTGTACATGACTTCTACAGTAC
AO195-R	CGCTTTACATAGTGTACAGAGGTG
AO331-F	CACCCAATACTTGACGTAICTTATCTC
AO331-R	CGTAGACTCTACCACAGATTCTACC

2.3 ノックアウト株の増殖抑制の確認

DPY培地(2% glucose, 1% Hipolypeptone, 0.5% yeast extract, 0.5% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 1.5% Agar)上の2か所に15 mmの距離を開けてKO株もしくはRIB40株の分生子懸濁液を10 μLスポット植菌した。30 °Cで24時間培養後にプレートをスキヤナで撮影した。画像解析ソフトFiji (ver. 2.0.0-rc-65/1.51s) (Schindelin *et al.*, 2012)を用いて撮影した画像の2つの部位のコロニーの半径を測定し(図4)、増殖抑制の有無を確認した。各株のコロニー内側と外側の半径の間でスチューデントのt検定を行った。

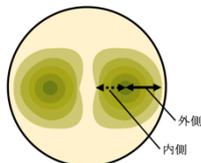


図4: 画像解析ソフトFijiで測定したコロニー上の場所の概略図
プレート裏側から見て右側のコロニーの内側、外側の2部位の大きさを測定した。

3 結果

3.1 増殖抑制に関わる候補遺伝子の同定

RNA-seq解析の結果、比較1では78個、比較2では61個の発現変動遺伝子が検出され、48個の遺伝子が比較1と2で重複していた(図4)。これらは全てdoubleで発現量が多く、内18個の遺伝子はシグナルペプチドを有していた(表2)。GOエンリッチメント解析の結果、複数の遺伝子で見られたenriched categoryは10個であった(表3)。生物学的なプロセスに関連するものが6個、分子としての機能に関連するものが4個見つかった。

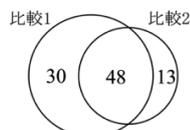


図4: RNA-seqで抽出された発現変動遺伝子の数
左側の円で表された比較1 (single1 vs. double1)と右側の円で表された比較2 (single2 vs. double2)の発現変動遺伝子の数。48個の遺伝子に重複して発現差が見られた。

表2: 比較1と2で重複して発現差の見られた遺伝子のリスト

候補遺伝子のKO株を作成した発現差上位3株以外の遺伝子名は非公開とするため、発現差4位以降は割愛した。発現差にはsingleとdoubleのFPKM値の比を、AAにアミノ酸残基数を示した。SPにはSignalPで調べたシグナルペプチドの有無を、有る場合は+、無い場合は-で示した。Blast検索結果には、blastで検索し相同性が95%以上で機能面に即した命名がされているものを示した。

遺伝子名	発現差	AA	SP	Blast検索結果
AO090005000331 (以下AO331)	113.9	160	-	hypothetical protein
AO090003000170 (以下AO170)	84.4	248	+	hypothetical protein
AO090138000195 (以下AO195)	84.1	209	-	alpha-glucosidase related to nicotinamidase

表3: GOエンリッチメント解析の結果

GOエンリッチメント解析の結果、検索した遺伝子の中の複数の遺伝子で得られた結果を表にまとめた(genes/input)。GO nameにGO IDが示す機能の名前を記し、p-valueには抽出した遺伝子リストに占めるGOカテゴリーの割合についての検定結果を記した。ここに示したものは全てp-value<0.05であり有意差が見られた。

GO ID	GO name	p-value	genes / input
0052716	hydroquinone:oxygen oxidoreductase activity	3.47E-04	3 / 48
0031177	phosphopantetheine binding	1.69E-02	3 / 48
0009405	pathogenesis	4.08E-02	3 / 48
0006043	glucosamine catabolic process	5.56E-04	2 / 48
0006046	N-acetylglucosamine catabolic process	1.11E-03	2 / 48
0042243	asexual spore wall assembly	2.76E-03	2 / 48
0043324	pigment metabolic process involved in developmental pigmentation	7.86E-03	2 / 48
0042438	melanin biosynthetic process	1.69E-02	2 / 48
0005507	copper ion binding	2.62E-02	2 / 48
0016740	transferase activity	3.02E-02	2 / 48

3.2 候補遺伝子3個のノックアウト株の作成

発現差が高かった上位3位までの遺伝子のKO株を作成した。PCRで増幅しKOの有無を確認したところ、AO331とAO170のKO株は3株、AO195のKO株は2株取得することができた(図5)。

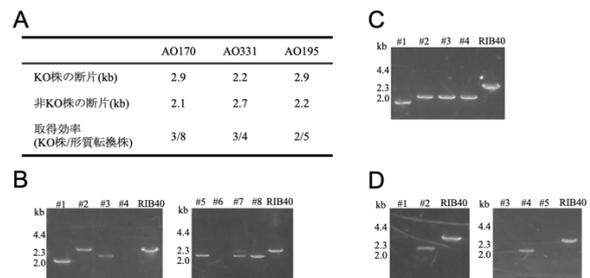


図5: 候補遺伝子のノックアウト株

(A) PCRで増幅した際にKO株と非KO株で得られる断片の大きさと、取得した形質転換株の内得られたKO株の数。(B) AO331のKO株の電気泳動結果。#3、#5、#8の3株のKO株を取得した。(C) AO170のKO株の電気泳動結果。#2、#3、#4の3株のKO株を取得した。(D) AO195のKO株の電気泳動結果。#2、#4の2株を取得した。

3.3 ノックアウト株の増殖抑制の有無の確認

作成したKO株を24時間培養し、コロニーを観察した。全ての株で2つのコロニーは接しておらず、2つのコロニーが面している方ではコロニーの外縁が曲線的ではなく直線的に変化していた(図6)。コロニーの大きさを計測したところ、比較に用いたRIB40株、AO331 KO株、AO170 KO株、AO195 KO株のいずれも外側のコロニーの半径に比べて内側のコロニーの半径が小さく、増殖抑制が生じていた(図7)。スチューデントのt検定を行った結果、培養した9株は全て内側と外側の半径の間で有意な差が見られた。KO株はそれぞれ複数株を対峙培養したが、

同じ遺伝子をKOした株間では、コロニーの半径に大きな差は見られなかった。

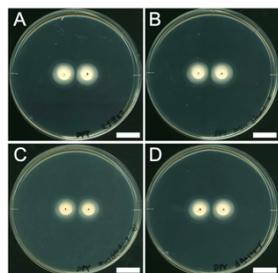


図6：24時間培養したKO株とRIB40株のプレート写真
(A) 24時間培養したRIB40株。(B) AO331のKO株(Δ AO331-#5)。(C) AO195のKO株(Δ AO195-#2)。(D) AO170のKO株(Δ AO170-#2)。スケールバーは15 mm。

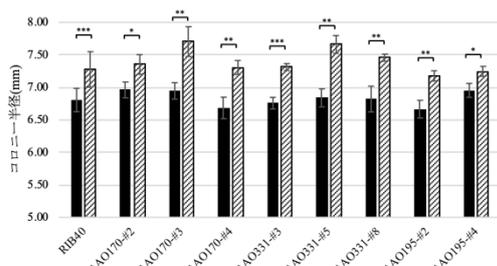


図7：24時間培養したKO株とRIB40株のコロニー半径の比較
RIB40と3種類のKO株をそれぞれ24時間対峙培養した際のコロニーが面している方(内側)と、その180°反対側(外側)の半径を計測した。黒色のグラフは内側、斜線の入ったグラフは外側の半径を示した。KO株はAO170とAO331ではそれぞれ3株、AO195では2株を培養した。グラフのエラーバーは平均値±標準偏差とした。また、学生t検定を行い、有意水準は* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ とした。RIB40は $n=9$ 、KO株はそれぞれ $n=3$ とした。

4 考察

今回の研究において、RNA-seq解析によって増殖抑制に関与する可能性のある遺伝子を48個リストアップすることができた。麹菌におけるクリスパー・キャス9技術の適用についても技術を習得し、あとは破壊株の増加、組み合わせの検証をするだけの段階まで到達した。以下、本研究において、特に留意すべき点について議論する。

上記の48遺伝子に対してGOエンリッチメント解析を行った結果、10個の項目が複数の遺伝子で該当した。この項目に含まれるグルコサミン異化作用について、グルコサミンは麹菌の細胞壁成分の一部であり(Ferdouse *et al.*, 2019)、増殖抑制が生じてコロニーの形態が変化する際に、細胞壁の成分や構造も変化している可能性がある。48遺伝子の内、KO株を作成していないものは遺伝子名を非公開とするが、シグナルペプチドを含む遺伝子は18個あり、これらがコードするタンパク質が細胞外に分泌され増殖抑制に関与している可能性がある。シグナルペプチドを有さない遺伝子は、シグナルの受容や、シグナル受容後の増殖抑制の機構に寄与することで増殖抑制に関わっていると思われる。発現差の大きい遺伝

子ほど増殖抑制に関与している可能性が高いと考え、RNA-seq解析で得られた候補遺伝子の発現差上位のものからクリスパー・キャス9でノックアウトを試みた。候補遺伝子上位3遺伝子をノックアウトし、遺伝子の機能を欠損させた株を作成した。これらの株を対峙培養したところ、RIB40株と同様に増殖抑制が生じていた。このことより、少なくともAO170、AO331、AO195は単独で増殖抑制に関与する遺伝子ではないことが示唆された。AO195以下の候補遺伝子は現在KO株の取得を行っており、引き続きRNA-seqで得られた候補遺伝子のKO株を取得・対峙培養を行うことで、増殖抑制に関与する遺伝子を調べていく。

5 謝辞

研究を行うにあたり山岸学生プロジェクト支援制度より支援をいただきました。また、麹菌の遺伝子ノックアウト実験では東京大学の丸山先生をはじめ丸山研究室の方にご指導をいただくとともに、ご協力いただきました。心より感謝申し上げます。

6 参考文献

- Alberti, F., Foster, G. D., Bailey, A. M. (2017) Natural Products From Filamentous Fungi and Production by Heterologous Expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101, p.493-500.
- Ferdouse, J., Miyagawa, M., Hirano, M., Kitajima, M., Inaba, S., Kitagaki, H. (2019) A new method for determining the mycelial weight of the koji-mold *Aspergillus oryzae* by measuring its glycosylceramide content. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 65, p.34-38.
- Katayama, T., Tanaka, Y., Okabe, T., Nakamura, H., Fujii, W., Kitamoto, K., Maruyama, J. (2019) Forced Recycling of an AMA1-Based Genome-Editing Plasmid Allows for Efficient Multiple Gene Deletion/Integration in the Industrial Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 85, e01896-18.
- Kitamoto, K. (2015) Cell biology of the Koji mold *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79, p.863-869.
- Leeder, A. C., Palma-Guerrero, J., Glass, N. L. (2011) The Social Network: Deciphering Fungal Language. *Nat. Rev. Microbiol.*, 9, p.440-451.
- Machida, M., Asai, K., Sano M., Tanaka T., Kumagai, T., Terai G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita O., Kashiwagi, Y., *et al.* (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438, p.1157-1161.
- Maruyama, J., Kitamoto, K. (2011) Targeted gene disruption in Koji mold *Aspergillus oryzae*. *Methods Mol. Biol.*, 765, p.447-56.
- Naito, Y., Hino, K., Bono, H., Ui-Tei, K. (2015) CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics.*, 31, p.1120-1123.