

麴菌の育種のためのゲノム編集技術開発

醸造微生物研究部門 織田 健

1. はじめに

清酒醸造や味噌、醤油などの多様な和食の調味食品に関わる麴菌は、一般的には種麴メーカーから供給されています。種麴メーカーは、所蔵している菌株のストックの混合利用（複菌）や UV 変異などによる形質の付与により新しい麴菌を開発し、新たな商品を生み出してきました。しかしながら、下に掲げた要因により、革新的な形質をもった麴菌の新たな育種は非常に困難であり、麴菌の多様化において重要な課題でした。この課題を解決するため、麴菌のゲノム編集技術の開発に取り組みました。

2. 遺伝子組換えとゲノム編集の違い、及び麴菌の育種の問題点

現在、生物の遺伝子組換えによる育種法は、カルタヘナ法に抵触するため実利用のハードルが非常に高い。その代替の手法として、ゲノム編集に注目が集まっています。遺伝子組換えとゲノム編集の違いは、端的に述べると外来の DNA 等の核酸を導入することで変異を起こさせるかの違いになります。通常の遺伝子組換えは、他の生物などの外来の配列を含むあるいは、自身由来の DNA を生物に取り込ませて、非常に低い確率で起こる組み換えにより、目的とする変異を導入します。一方、ゲノム編集は、主に Cas9 という DNA 切断酵素とターゲットとする配列と相同な配列をもつ sgRNA を使用して複合体を形成させ、目的の位置の切断を繰り返して変異を導入する方法です。Cas9 での真核生物のゲノム編集法は、効率が良く多様な生物に適用できることから 2020 年、開発者のエマニュエル・シャルパンティエ博士およびジェニファー・ダウドナ博士にノーベル化学賞が授与されました。

麴菌の育種の問題点として、単核生物である酵母等とは異なり、一つの菌体の中に核を多数持っている多核生物であり、全ての核に同時に変異の導入を行わなければ、目的とする表現型を示すことが出来ません。黄麴菌は、無性孢子である分生子を形成しますが、一つの分生子内には 2~4 個程度の核が存在しており、継代培養により単核化させて同じ核の構成に単離することが難しい。また、酵母のように自然界から新たな菌を単離しようとしても、類縁菌のカビ毒の問題があり難しい。植物やほ乳類では、育種の際に有用な形質を持つ親同士を掛け合わせる交雑育種が行われるが、麴菌では有性世代が見つかっておらず交雑ができないなど、多数の問題を抱えておりました。これらの育種上の問題を解決したのが、ゲノム編集による変異の導入です。

3. 麴菌におけるゲノム編集

東京大学・丸山准教授の研究グループにより麴菌においてプラスミドで発現した Cas9 タンパク質および sgRNA にて遺伝子組換えでのゲノム編集による変異の導入が初めて実証されました¹⁾。当研究所では、実用育種の観点から異なるアプローチとして、細胞外から Cas9 タンパク質および sgRNA を直接導入することで、ゲノム編集が起こせるか確認を行いました（直接導入法）^{2),3)}。変異が導入されると 5-FOA という薬剤に対して耐性を示す遺伝子 *pyrG* をターゲットとして、ゲノム編集実験を行ったところ、有意に狙った位置で遺伝子の変異が導入出来ました。さらに、清酒醸造や醤油製造用の実用菌株でも同様に確認したところ、ゲノム編集が実施出来ることが確認され、実用育種への適用の可能性が示されました。

さらに多様なターゲットに対する変異の導入ができるように、目立った形質を示さない遺伝子の破壊を目的として、外からマーカーを挿入するノックインの手法、マーカーを持たない株に対して目的

の遺伝子にゲノム編集を起こさせる共ゲノム編集の技術を開発しました⁴⁾。

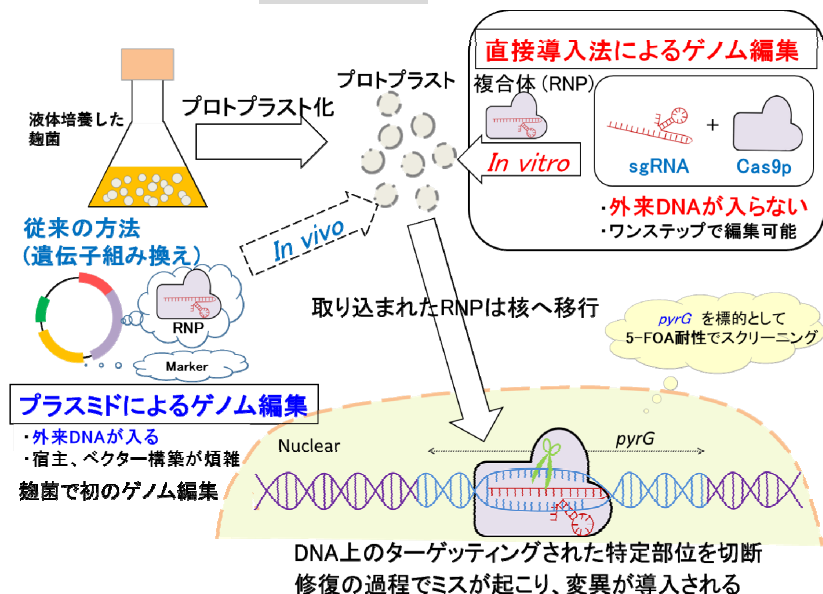


図 Cas9 直接導入によるゲノム編集の概要

4. ゲノム編集技術の開発、展開

開発された共ゲノム編集技術をさらに展開させ、麴菌が作る物質の生産性の改変を指標として、遺伝子組換えの一般的な手法がゲノム編集技術によって実施できるかを確認しました。

- (1) 遺伝子破壊：コウジ酸の生産制御を担っている遺伝子の破壊を実施し、生産性を向上
- (2) ノックイン：コウジ酸の生産制御を担っている遺伝子に誘導プロモーターを挿入して生産をオンオフできるように改変
- (3) 相同組換え：麴菌が作る有用物質（エルゴチオネイン）の誘導生産系を構築
- (4) 小規模領域欠失：コウジ酸の生合成クラスターの領域を欠失させ、生産性を失くした
- (5) 大規模領域欠失：機能していないアフラトキシンの生合成クラスター領域を完全欠失させ、より安全性を担保

以上、ゲノム編集技術の展開により、有用育種の基盤技術を確立しました。

5. まとめ

開発したゲノム編集育種の技術は、現状では、目的外に変異が導入される可能性（オフターゲット変異）、Cas9 や sgRNA の菌体内での残存性確認など実利用を行う上での課題を抱えており、安全性を担保するために鋭意研究を進めています。麴菌の遺伝子組換え系が確立して以降の約 30 年におよぶ先達の研究成果を利用して、本研究での技術により麴菌のデザインされた有用育種ができるようになりつつあります。生物のゲノム編集育種の理解が進み、開発した技術をご活用いただき、さらに麴菌の利用の多様性が広がることを願うばかりです。

6. 参考文献

- 1) Katayama T., *Biotechnology letters* 38, 4, 637-642 (2016)
- 2) Iwashita K, Abstract of 17th Fungal Genetics and Molecular biology (2017)
- 3) 織田, 生物の科学 遺伝, 75(3), p.207-212 (2022)
- 4) 特許第 6994730 号 「ゲノム編集タンパク質の直接導入による糸状菌のゲノム編集方法」