

研究ノート

小染色体を保有する*Aspergillus oryzae*株について

楠本 憲一*, 服部 領太, 鈴木 聡

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門
〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

Aspergillus oryzae strain holding a mini-chromosome

Ken-Ichi Kusumoto*, Ryota Hattori, Satoshi Suzuki

Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, 2-1-12
Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

Abstract

Electrophoretic karyotype of four stocked strains of *Aspergillus oryzae* by contour-clamped homogeneous electric field-gel electrophoresis was analyzed. Two strains had similar karyotype, but one strain had totally different karyotype. Moreover, one strain held a mini chromosome of about 660 kbp in size, which might be the smallest among mini chromosomes reported from *Aspergillus* fungi. This mini chromosome may be a candidate for the material of top-down type artificial chromosome in filamentous fungi.

Key words: *Aspergillus oryzae*, 小染色体 (a mini chromosome)

緒言

*Aspergillus oryzae*は、味噌、醤油、清酒等、我が国の伝統発酵食品の醸造に麹菌として使用される重要な糸状菌である。*A. oryzae*は糖質やタンパク質等、高分子加水分解酵素群の生産力が高いことが知られてい

る。*A. oryzae*の物質生産能力を高めるため、1980年代後半頃以来、環状プラスミドベクターを用いた遺伝子導入法を利用し、高発現プロモータによる酵素高生産の研究例が急増した。

一方、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*等で開発されている人工染色体は、染色体レベルの長さのDNAを維持するためのベクターとしての活用が考えられる¹⁾。

* 連絡先 (Corresponding author), kusumoto@affrc.go.jp

セントロメアの塩基配列は、*S. cerevisiae*では約120 bpと極めて短く、人工染色体が構築しやすいため、YAC (Yeast Artificial Chromosome) ベクターに活用され、100～200 kbp以上のDNAをクローニングしてライブラリ化するためなどに使用されている。

*A. oryzae*のゲノム解析においては、8本の各染色体のセントロメア領域と一部の領域を除いて全てのDNA配列が決定されている²⁾。*A. oryzae*のテロメア配列は、それまで知られていた糸状菌に共通なテロメア繰り返し配列の繰り返し単位TTAGGGとは異なる、TTAGGGTCAACAを繰り返し単位とした130 bp程度の新規なテロメアであった³⁾。*A. oryzae*では、高橋らにより、染色体レベルの改変が報告されている⁴⁾。また、多田らにより、テロメア配列を用いた染色体末端の削除に関する報告がある⁵⁾。しかしながら、出芽酵母のように、新たに人工染色体を*A. oryzae*に導入、あるいは構築するためには、*A. oryzae*のセントロメア等の染色体構造に関する情報が著しく不足している。*A. oryzae*はグラム単位のタンパク質生産能力を有していると共に、多数の二次代謝合成遺伝子群をゲノム中に有しており、酵素に加えて二次代謝物質の生産力が高いことが知られる。もし、*A. oryzae*に新たな二次代謝遺伝子群や各種分解酵素を一度に導入できるなら、*A. oryzae*に新たな物質生産能力を付与することが可能になる。これらの多数の遺伝子を導入するためのベクターとして、これらのDNAを安定的に維持可能な人工染色体の構築が望まれる。

染色体の複製、分配や維持に関わるセントロメアおよび、染色体の末端維持に関わるテロメアを組み合わせて構築する。この人工染色体作成法は「ボトムアップ型」と呼ばれる。一方、既存の染色体を加工して人工染色体ベクターとして利用する方法は「トップダウン法」と呼ばれる。糸状菌のセントロメアに関する情報としては、モデル生物である*Aspergillus nidulans*ではセントロメア周辺に複数のトランスポゾンが存在することが報告されている^{6,7)}。しかし、その配列は解明されていない。*A. oryzae*のセントロメアは100 kbp程度のDNA領域と予想されており、同様にその塩基配列は解明されていない。そこで、出芽酵母のようにボトムアップ式の組み立て型人工染色体よりは、既存の染色体をベクターとして利用するトップダウン式の人工染色体を構築することがより現実的であると考えられる。既に構造が明らかになっているRIB40株の最小の第8番染色体の活用が考えられるが、この染色体は3.3 Mbpの大きさであり、多くの必須遺伝子を有するため、ベ

クターとしての活用には限界がある。

この問題を解決するためには、*A. oryzae*で非必須の染色体を有する株を探索することが必要である。さらにその染色体の長さが短いほど加工がしやすく、人工染色体のベクターに改変するための素材となりえる。このような目的で、*A. oryzae*数株の染色体型(電気泳動的核型=electrophoretic karyotype)を分析した。このため、染色体レベルの巨大なDNAを電気泳動により分離するために開発されたcontour-clamped homogeneous electric field-ゲル電気泳動装置⁸⁾(以下、CHEFと省略)を用いた。その結果、約660 kbpの小染色体と考えられるDNAを有する菌株を見出したので、報告する。

実験手法

1. 試薬、供試菌株及び培養

用いた試薬は、メーカー名を記していない場合は特級のものである。供試菌株として、研究室保存の*A. oryzae* 4株(AML1572, 1577, 1599, 1601, それぞれ旧食品総合研究所保存のNFRI株を研究室にて継代培養を繰り返した)を使用した。これらの菌株の保存は、胞子懸濁液を20%グリセロール中に懸濁して-80℃にて行った。菌株を培養する際は、以下のように行った。すなわち、オートクレーブ滅菌を行ったポテトデキストロース寒天培地(バクトン・ディッキンソン)を25 ml, 滅菌シャーレに分注し、固化後、胞子懸濁液約5 μlを寒天培地の中央に接種し、30℃にて約1週間静置培養を行った。胞子が十分に形成されたのち、コロニー上に10 mlの0.1% Tween 80, 0.8% NaCl水溶液を無菌的に添加し、無菌コンラージ棒を用いて胞子懸濁液を調製した。液体培養を行う際は、血球計算盤を用いて胞子懸濁液の濃度を測定し、ポテトデキストロース培地1 mlにつき胞子が106個となるように接種した。液体培地はツァベックドックス培地(6.0 g/l NaNO₃, 0.52 g/l KCl, 1.52 g/l KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄·7H₂O, 10.0 g/l Glucose, 1 ml Trace elements solution (1.0 g/l FeSO₄·7H₂O, 8.8 g/l ZnSO₄·7H₂O, 0.4 g/l CuSO₄·5H₂O, 0.1 g/l Na₂B₄O₇·10H₂O, 0.05 g/l (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O) (1 N KOHでpH6.5に調整)を用い、オートクレーブ滅菌を行うことにより調製した。

2. 試料調製と染色体型電気泳動

500 mlの三角フラスコに調製した100 mlのポテトデキストロース培地にて*A. oryzae*株の液体培養を行った。培養した菌体を不織布(Miracloth, Calbiochem)で集

め, 0.8 M NaClで菌体を洗浄後, 50 mlの滅菌プラスチックチューブ (アシスト)に移した. あらかじめ, プロトプラスト化液 (2 mg/ml Yatalase (タカラバイオ), 10 mg/ml Lysing enzyme, from *Trichoderma harzianum* (Sigma), 2 mg/ml Cellulase Onozuka R-10, 0.8 M NaCl, 10 mM リン酸ナトリウム, pH 6.0, 1 mM ジチオスレイトール) を調整後に0.2 μ m滅菌フィルターでろ過しておき, チューブ内の菌体に添加した. 30 $^{\circ}$ Cで2~3時間穏やかに振盪し, プロトプラスト化を行った. 途中, 目視および光学顕微鏡でプロトプラストの生成を確認した. 十分にプロトプラストが生成した後, 不織布と漏斗を用いて溶液をろ過し, ろ液を4 $^{\circ}$ C, 1,500 rpmで5分間遠心してプロトプラストを集めた.

プロトプラストを0.8 M NaClで2回洗浄し, ペレットにした後, ヒートブロックで38 $^{\circ}$ Cに保温しながら, ソルビトール緩衝液 (2 M sorbitol, 100 mM EDTA)で融解した1%低融点アガロース (Sea Plaque GTG, FMC) を42 $^{\circ}$ C保温しておいたものを38 $^{\circ}$ Cのブロック上で等量混合した. Plastic molds (バイオラッド)にそそぎ込み, 4 $^{\circ}$ Cで20~60分間固化させた. 最終細胞密度は 2.4×10^9 /mlであった. このDNA・アガロースプラグをES緩衝液 (1% w/v sodium lauryl sarcosinate, 0.5 M EDTA, pH 8.0, 1 mg/ml proteinase K (Clontech), 1 mM ジチオスレイトール) で55 $^{\circ}$ C 3時間, 10時間, その後約8時間おきにES緩衝液を新しく交換して, ゆっくり振盪処理を行った. さらに, 55 $^{\circ}$ C (60 $^{\circ}$ C) のSDS緩衝液 (1% Sodium dodecyl sulfate, 10 mM EDTA) で4回洗浄した. その後, 0.1 mg/mlのPhenylmethylsulfonyl Fluoride (和光純薬) で2時間処理して, プロテアーゼを失活し, 新しいチューブにプラグを移した. 次に, 10倍容のTE緩衝液 (pH 8.0) で2時間以上, 1回目は室温, 以降は4 $^{\circ}$ Cで, 6回~8回程度, 洗浄を繰り返した.

電気泳動は, バイオラッド社製のCHEF-DRIIシステムを用いて行った. 電気泳動に先んじて, 同システムの電気泳動用アガロースゲル作製装置を組み立て, 100 mlの1% Chromosomal Grade Agarose (0.5 \times TBE) を注ぎ込み, 固化させた. あらかじめ調製しておいた電気泳動用試料ブロックをアガロースゲル上のウェルに挿入した. 42 $^{\circ}$ Cで保温しておいた0.6% InCert Agarose (0.5 \times TBEで0.6%となるよう溶解) を用いて試料ブロックとアガロースゲル間の間隙を埋めた. このアガロースゲルを電気泳動槽に設置した後, 4 $^{\circ}$ Cに冷却した電気泳動用緩衝液 (5.4 g/l Tris, 2.75 g/l ホウ酸, 1 ml/l 0.5 M EDTA, pH8.0) を電気泳動槽にゲル

が移動しないように注意しながら注ぎ入れた. システムに付属の冷却機とポンプで緩衝液を14 $^{\circ}$ Cに維持しながら電気泳動槽内を循環させた. 温度が一定になった後, 電気泳動を開始した. 電気泳動条件は, 高分子DNA分離条件 {1.5 V/cm (50 V), 内角120 $^{\circ}$, 電圧方向切り替え時間15分~50分の直線勾配, 電気泳動時間132時間 (または111時間. 文中に記載)}, 低分子DNA分離条件 {6 V/cm (200 V), 内角120 $^{\circ}$, 電圧方向切り替え時間24秒~73秒の直線勾配, 電気泳動時間22時間}の2種類を設定した. 電気泳動が複数日にわたる場合は, 1日1度, 電気泳動用緩衝液を交換した. 電気泳動終了後, エチジウムブロミドを適宜希釈した水溶液により染色し, 蛍光イメージアナライザー (タイフーン, GE), または紫外線イルミネータと蛍光フィルター付カメラにより画像を取得した.

結果及び考察

*A. oryzae*株4株 (AML1572, 1577, 1599, 1601) の染色体長多型を, CHEF電気泳動装置を用いて分析した. 泳動条件は, 高分子DNA分離条件を用いて132時間かけて分離を行った. その結果, 4株のうちAML1577が, 他の株と比較して極めて短いDNAを有するを見出した (図1). AML1577の染色体に由

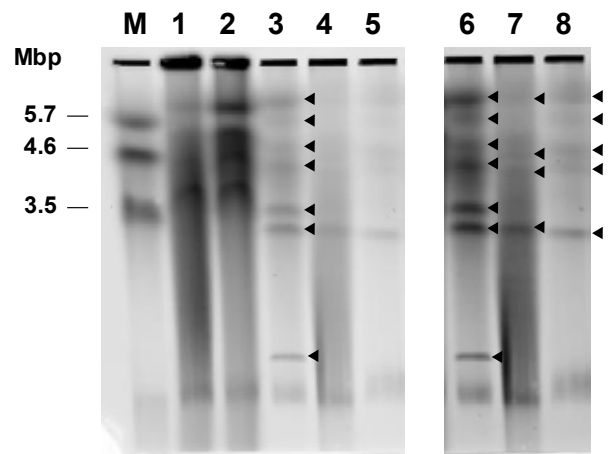


図1 *A. oryzae*株の染色体長多型

M, サイズマーカー (*Schizosaccharomyces pombe*); レーン1, AML1599; レーン2, AML1599 (レーン1の試料の2倍量のDNA); レーン3, AML1577; レーン4, AML1601; レーン5, AML1572; レーン6~8, 3から5と同じ (タイフーン高感度検出). 電気泳動は高分子DNA分離条件で132時間泳動を行った. エチジウムブロミドを用いて染色した. 画像取得はタイフーンを用いて行った. 矢印は染色体の位置を示した.

来するバンドは7本観察された。最も移動度の大きいDNAバンドはマーカーDNAを含む全てのサンプルから検出され、バンドが広がっているため、電気泳動中に生じたDNAの分解産物と考えられた。次に、各菌株間の染色体長多型の相違について検討した。不明瞭なバンドがあるため明確に言及できないが、図1のレーン3~5, 6~8で検出されたバンドパターン間の比較では、AML1577(レーン3, 6)とAML1572(レーン5, 8)に関して、移動度の小さい2本の染色体(図1レーン5, 8の上側2本)の移動度が類似していたが、他の染色体の移動度は一致しなかった。AML1601(レーン4, 7)はバンドの位置の確認できる染色体が限られており、類似の程度については言及できない。また、AML1599については、図1で判別可能なバンドが濃縮試料、希釈試料共に最大のもののみに限られていた。4株中、AML1577については、移動度の大きい、低分子の染色体DNAと考えられるバンドが検出された(レーン6)。そこで、AML1577とAML1599について、電気泳動用試料を再度調製し、高分子DNA分離条件を用いて図1の実験よりも短めに、111時間かけて分離を行った。その結果、AML1577の試料からは先ほどの

図1における結果と同様、7本のバンドが観察された(図2A, レーン1)。一方、AML1599の試料からは5~6本のバンドが観察され、AML1577のバンドパターンとは明確に異なっていた(図2A, レーン2)。上記の図1及び図2Aの結果から、高分子の染色体DNA群に加えて移動度の大きい小分子DNAを検出したのは、AML1577のみであった。高分子染色体DNAについては、4株の間で類似すると考えられる株も見受けられた一方で、AML1577とAML1599のように染色体型が完全に異なる株が見られた。

これら4株は、旧農研機構食品総合研究所保存株に由来する株を当研究室で独自に継代培養し、凍結保存していたものである。このうちAML1599はゲノム解析株であるRIB40に由来し、各染色体のセントロメア領域と数か所の領域以外は塩基配列の解析が終了している株である。本株はRIB40に由来するが継代培養を経ており、継代に伴うゲノムレベルの変化は不明である。もしRIB40の染色体長と同等であるならば、高分子側から、6.4, 6.2, 5.0, 4.8, 4.4, 4.1, 3.4, 3.3 Mbpの長さの8本の染色体でゲノムDNAが構成される。この配列解析の結果得られた染色体長を図1Aレーン2で観察された5~6本のバンドと対応させると、最も移動度の小さいバンドは6.2及び6.4 Mbpから構成されると考えられる。次に移動度の小さいバンド4本は、それぞれ順に5.0及び4.8 Mbpの混合DNA, 4.4 MbpのDNA, 4.1 MbpのDNA, そして3.4及び3.3 Mbpの混合DNAと考えられた。2番目から4番目のバンドにかけては、上下のバンドが一部重複している可能性が考えられた。レーン1のAML1577試料から検出されたDNA長は、2種類のサイズマーカーのバンド位置から、>6.4 Mbp, 5.8 Mbp, 4.8 Mbp, 4.3 Mbp, 3.6 Mbp, 3.0 Mbpと推定された。これらの長さを合計すると、>27.9 Mbpである。RIB40の染色体DNAの合計は34.3 Mbpである。もしAML1577とAML1599の遺伝子構成が同等であるとすれば、その差は6 Mbpより大きな染色体2本が最も移動度の小さいバンドの中に重複して存在しているために生じた可能性がある。AML1577の全塩基配列解析の実施や、RIB40の各染色体特有のDNAによりサザンブロット解析を行うことにより、この可能性を検証できるかもしれない。

次に、AML1577が有する小染色体の長さを明らかにするため、低分子DNA分離条件で22時間電気泳動を行い、エチジウムブロミドを用いて染色した。サイズマーカーとして、Lambda DNA ladder及び*S. cerevisiae*を用いた。その結果、Lambda DNA ladderマーカーの630

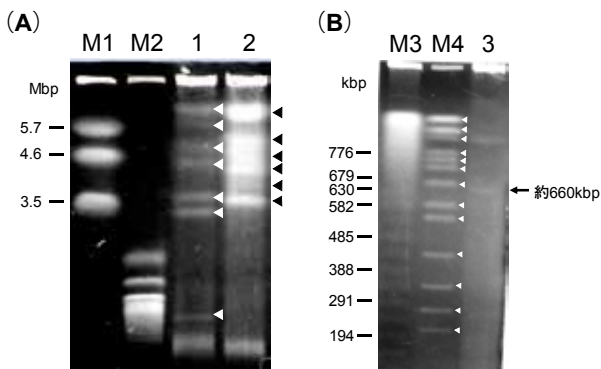


図2 AML1577の小染色体の電気泳動による分離

(A) M 1, サイズマーカー (*S. pombe*); M 2, サイズマーカー (*Saccharomyces cerevisiae*); レーン 1, AML1577; レーン 2, AML1599. 電気泳動は高分子DNA分離条件で111時間泳動を行い、エチジウムブロミドを用いて染色した後、蛍光フィルター付きカメラで撮影した。白三角印(AML1577)および黒三角印は染色体のバンドの位置を示した。(B) M 3, サイズマーカー (Lambda DNA ladder); M4, サイズマーカー (*S. cerevisiae*); レーン 3, AML1577. 低分子DNA分離条件で22時間電気泳動を行い、エチジウムブロミドを用いて染色した後、蛍光フィルター付きカメラで撮影した。白三角印は*S. cerevisiae*サイズマーカーのバンドの位置、矢印は約660 kbpの染色体のバンドの位置を示した。

kbpと679 kbpの間, *S. cerevisiae*マーカーの下から6番目(610 kbp)と7番目(680 kbp)の間にAML1577の小染色体DNAのバンドが移動した(図2B, レーン3). このことから, 同染色体長は約660 kbpと推定された. この大きさは, RIB40が有する最小染色体の約5分の1であった.

これまでに, *A. oryzae*が属する*Aspergillus*属についての染色体長多型に関しては, 実験生物である*Aspergillus nidulans*の菌株間の多型の報告がある⁹⁾. この報告では, 以前から知られている染色体転座株の1株が, CHEFにより1.6 Mbpの小染色体を有することが明らかにされた. また, *Aspergillus niger*では, CHEFにより3.5~6.6 Mbpの染色体長の幅を有することが示されている¹⁰⁾. また, *A. oryzae*が属する*Aspergillus Section Flavi*の広範にわたる種と株の染色体型のCHEFによる解析に関する研究では, 約1.5 Mbpの小染色体を有する*A. nidulans*株(FGSC 354), 1.5 Mbp以下の長さの小染色体を有する*A. flavus* SRRC 285について報告されている¹¹⁾. この報告では, 1.5 Mbp以下の長さの小染色体はそれまで*A. flavus*や*A. parasiticus*で報告例がなく, Kellerらは余剰な染色体ではないかと推測している. 同時に, 他の糸状菌種では, このような余剰染色体の存在が, その小さなサイズ, 長さの多様性や有性生殖における不安定性と共に報告されていることを引用している. 本研究で見いだされたAML1577の660 kbpの小染色体は, Kellerらの推測のように, 本株において余剰染色体か否かについては, 今後, ゲノム解析とRIB40株のゲノム構造との比較を行うとともに, 当該染色体の安定性を検討し, 確認する必要がある. また, 660 kbpのDNA分子が他の染色体のサイズと大きく異なることから, 近年報告のある糸状菌のウイルス(マイコウイルス)の可能性も考えられる. これまでに報告されている知見では, マイコウイルスは二重鎖RNAで構成され, そのサイズは大きいもので9 kbp程度であった¹²⁾. 660 kbpのDNAが糸状菌に感染するウイルスに由来する可能性は低いと考えられるが, 詳細については今後のゲノム構造解明により明らかになると考えられる.

以上の結果から, *A. oryzae* AML1577が保有する660 kbpの小染色体は, *Aspergillus*属糸状菌で知られる限り, 最小の染色体であった. *A. oryzae*のセントロメア領域が約100 kbp内外であることを考慮すると, 当該染色体は末端からセントロメアまでの距離が300 kbp内外と考えられ, *A. oryzae*のセントロメア領域の解析やトップダウン型人工染色体の構築の素材として有力と考えら

れる.

要約

*Aspergillus oryzae*の研究室保存株4株のcontour-clamped homogeneous electric field-ゲル電気泳動装置を用いた染色体型分析を行った. その結果, 4株のうち2株は染色体型が類似していたが, 明確に異なる染色体型を有する株も見られた. また, 1株は約660 Mbpの小染色体を有することを明らかにした. 当該染色体はこれまでに報告された*Aspergillus*属糸状菌のうちで最小の染色体であり, 糸状菌におけるトップダウン型人工染色体の素材として有力と考えられる.

文献

- 1) Schlessinger, D., Yeast artificial chromosomes: tools for mapping and analysis of complex genomes, *Trends Genet.*, **6**, 248, 255-258 (1990)
- 2) Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K. et al., Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*, *Nature*, **438**, 1157-1161 (2005).
- 3) Kusumoto, K. I., Suzuki, S., and Kashiwagi, Y., Telomeric repeat sequence of *Aspergillus oryzae* consists of dodeca-nucleotides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **61**, 247-251 (2003).
- 4) Takahashi, T., Jin, F. J., and Koyama, Y., Nonhomologous end-joining deficiency allows large chromosomal deletions to be produced by replacement-type recombination in *Aspergillus oryzae*, *Fungal Genet Biol.* **46**, 815-824 (2009).
- 5) Tada, S., Ohkuchi, H., Matsushita-Morita, M., Furukawa, I., Hattori, R., Suzuki, S., Kashiwagi, Y., and Kusumoto, K., Telomere-mediated chromosomal truncation in *Aspergillus oryzae*. *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 43-46 (2015).
- 6) Cullen D., Wilson, L. J., Grey, G. L., Henner, D. J., Turner, G., and Balance, D. J., Sequence and centromere proximal location of a transformation enhancing fragment ans1 from *Aspergillus nidulans*, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 9163-9175 (1987).
- 7) Nielsen, M. L., Hermansen, T. D., and Aleksenko, A., A family of DNA repeats in *Aspergillus nidulans* has assimilated degenerated retrotransposons, *Mol. Genet.*

- Genomics*, **265**, 883-887 (2001).
- 8) Schwartz, D. C., and Cantor, C. R., Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis, *Cell*, **37**, 67-75. (1984).
 - 9) Brody, H., Carbon, J., Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6260-6263 (1989).
 - 10) Debets, A. J., Holub, E. F., Swart, K., van den Broek, H. W., and Bos, C. J., An electrophoretic karyotype of *Aspergillus niger*. *Mol. Gen. Genet.* **224**, 264-268 (1990).
 - 11) Keller, N. P., Cleveland, T. E., Bhatnagar, D., Variable electrophoretic karyotypes of members of *Aspergillus* Section *Flavi*, *Curr. Genet.*, **21**, 371-375 (1992).
 - 12) Kanhayuwa, L., Kotta-Loizou, I., Özkan, S., Gunning, A. P., and Coutts, R. H., A novel mycovirus from *Aspergillus fumigatus* contains four unique dsRNAs as its genome and is infectious as dsRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 9100-9105 (2015).