

研究ノート

醤油用麹菌および味噌用麹菌の *ligD* 遺伝子削除株の取得

安田（吉野）庄子*¹、増田裕一郎*²、加藤雅士*²、
小野奈津子*¹、長谷川摂*¹、北本則行*³

Construction of *ligD* Deletion Strains of *Shoyu Koji* Mold and *Miso Koji* Mold

Shoko YOSHINO-YASUDA*¹, Yuichiro MASUDA*², Masashi KATO*²,
Natsuko ONO*¹, Osamu HASEGAWA*¹ and Noriyuki KITAMOTO*³

Food Research Center*^{1,3} Faculty of Agriculture, Meijo University*²

pyrG 遺伝子を破壊した醤油用麹菌 *Aspergillus oryzae* KBN616-P4 株および味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630-P17 株から、非相同末端結合修復系に関わる *ligD* 遺伝子削除株を取得した。*ligD* 遺伝子削除株の *amyR* 遺伝子座への遺伝子ターゲッティング頻度はそれぞれ 100%および 98%と高頻度であったことから、これらの株は醤油用麹菌および味噌用麹菌の遺伝子機能解析ツールとして有用であることが明らかになった。

1. はじめに

醤油および味噌の醸造における麹菌の役割は非常に大きいため、麹菌が生産する酵素類を詳細に解析することは、醸造工程の改良や製品の品質向上の観点で非常に重要である。麹菌では元来遺伝子ターゲッティング頻度が非常に低く、遺伝子破壊による機能欠損株の取得が困難であった。しかし近年、かびの非相同末端結合修復系に関わるタンパク質をコードする遺伝子を破壊することにより、遺伝子ターゲッティング頻度が顕著に上昇することが明らかになった。そこで我々は醤油用麹菌および味噌用麹菌から非相同末端結合修復系に関わる *ku70* 遺伝子破壊株を取得し、醤油麹菌における効率的な遺伝子ターゲッティングシステムを確立した¹⁾²⁾。今回は非相同末端結合修復系に関わる別の遺伝子 *ligD*³⁾を醤油用麹菌および味噌用麹菌において削除し、遺伝子ターゲッティングへの効果を測定した。

2. 実験方法

2.1 使用菌株及び使用培地

醤油用麹菌 *A. oryzae* KBN616 株を染色体 DNA の調製に用いた。*pyrG* 遺伝子破壊によりウリジン要求性を付与した醤油用麹菌 *A. oryzae* KBN616-P4 株および味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630-P17 株（KBN630-17 株²⁾と同一）を形質転換用宿主に用いた。DNA 断片のクローニングには *E. coli* DH5α 株を用いた。*A. oryzae* の培養はツアペック培地を基本培地とし、*pyrG* 遺伝子破壊

株の培養には 0.2%ウリジンを、*ligD* 遺伝子削除株 (*pyrG* 遺伝子破壊株) の選抜には 0.1% 5-フルオロオロチン酸 (5-FOA)および 0.2%ウリジンを添加した。染色体 DNA 調製用培地には GP 培地¹⁾を用いた。

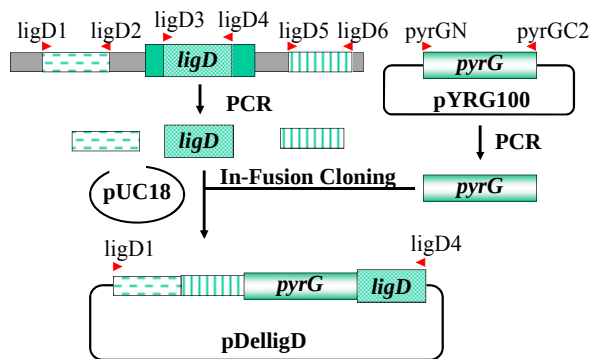
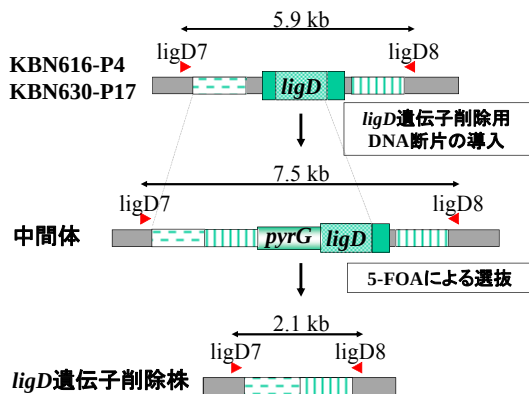
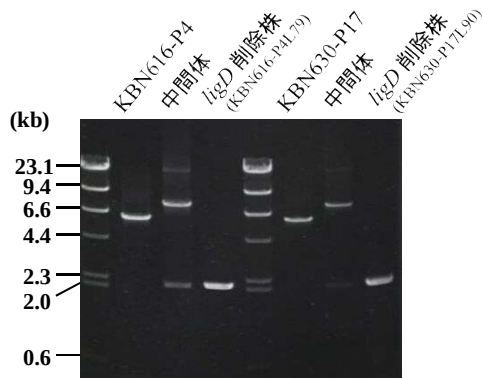
2.2 醤油用麹菌および味噌用麹菌の *ligD* 遺伝子削除株の取得と遺伝子ターゲッティング頻度の測定

ligD 遺伝子削除用ベクター pDelligD を In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit (タカラバイオ) を用いて次のように構築した。*A. oryzae* ゲノム情報上の *ligD* 遺伝子配列からプライマーを合成し (表 1)、*A. oryzae* 染色体 DNA を鋳型としてプライマーペア *ligD1/ligD2*、*ligD3/ligD4*、*ligD5/ligD6* および *pyrGN2/pyrGC2* を用いてそれぞれ PCR 反応を行った。得られた DNA 断片を In-Fusion 反応により pUC18 の *Bam*HI / *Sal*I 制限サイトに組み込み、pDelligD を構築した (図 1)。pDelligD とプライマーペア *ligD1/ligD4* を用いた PCR 反応により遺伝子削除用 DNA 断片を取得し、*A. oryzae* KBN616-P4 株および KBN630-P17 株を形質転換した。形質転換体を純化し、染色体 DNA とプライマーペア *ligD7/ligD8* を用いた PCR 反応により 7.5 kb の DNA 断片が増幅された株を中間体として選抜した。中間体の胞子を 5-FOA 培地に塗抹培養し、5-FOA 耐性株を取得した。取得した 5-FOA 耐性株の染色体 DNA とプライマーペア *ligD7/ligD8* を用いて PCR 反応を行い、2.1 kb の DNA 断片が増幅された株を *ligD* 遺伝子削除株とした (図 2、図 3)。遺伝子ターゲッティング頻度の測定には *amyR* 遺伝子座

*1 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 *2 名城大学農学部 *3 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 (現産業労働部 産業科学技術課)

表 1 本研究で使ったプライマー

名称	配列
ligD1	5'-CGGTACCCGGGGATCAATGGACACTTCGCATGATAC-3'
ligD2	5'-ACGGTCGATATGGAAGAACGTG-3'
ligD3	5'-ATTGATCAGGCCTTTGATGTGTTCCATCCAGACG-3'
ligD4	5'-ATGCCTGCAGGTCGAATAACACTTAGATGCCACCATTG-3'
ligD5	5'-TTCCATATCGACCGTGCATCATCATCCACATCAAG-3'
ligD6	5'-TTCCAGCAGGCCTTGCATGGGTCCCTCTTGTTCAC-3'
ligD7	5'-CGCGTTGGATAGTATCGGTGAAGTAG-3'
ligD8	5'-GGGAAAAGAATGCGAGACTGACTC-3'
pyrGN2	5'-CAAGGCCTGCTGGAATTGACATTATTATGG-3'
pyrGC2	5'-AAAGGCCTGATCAATACCGTACGGGAGATT-3'

図 1 *ligD* 遺伝子削除用ベクターの構築図 2 *ligD* 遺伝子削除の模式図図 3 PCR 法による *ligD* 遺伝子削除の確認

位を使用し、既報¹⁾²⁾の方法で測定した。

3. 実験結果および考察

3.1 醤油用麹菌および味噌用麹菌の *ligD* 遺伝子削除株の取得

醤油用麹菌 *A. oryzae* KBN616-P4 株および味噌用麹菌 KBN630-P17 株を親株として、2.2 に述べた方法で *ligD* 遺伝子削除株をそれぞれ 5 株および 3 株取得した。これらの株の生育は親株と比較して差が見られなかった。

3.2 *ligD* 遺伝子削除株の遺伝子ターゲッティング頻度

AmyR は麹菌のデンプン分解酵素遺伝子群の誘導発現因子であり、*amyR* 遺伝子破壊株はデンプンを唯一の炭素源とする最小寒天培地上では生育が著しく悪くなるため表現型の変化で容易に判別することができる。3.1 で取得した *ligD* 遺伝子削除株 *A. oryzae* KBN616-P4L79 株および *A. oryzae* KBN630-P17L90 株を *amyR* 遺伝子破壊プラスミドで形質転換した結果、形質転換株各 50 株のうち 50 株および 49 株のデンプン分解酵素活性が著しく低下した。すなわち *ligD* 遺伝子削除株 *A. oryzae* KBN616-P4L79 株および *A. oryzae* KBN630-P17L90 の *amyR* 遺伝子座位への遺伝子ターゲッティング頻度はそれぞれ 100% および 98% であり、親株の約 5% と比較して著しく向上した。また、*A. oryzae* KBN616 株および *A. oryzae* KBN630 株の *ku70* 遺伝子破壊株における同遺伝子座位への遺伝子ターゲッティング頻度はそれぞれ 82.3% と 92.0% であったことから、*ligD* 遺伝子削除による遺伝子ターゲッティング頻度の上昇効果は *ku70* 遺伝子破壊と同等以上であることが明らかになった。

4. 結び

本研究で取得した *ligD*, *pyrG* 遺伝子二重破壊株である醤油用麹菌 *A. oryzae* KBN616-P4L79 株および味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630-P17L90 株は、非常に高い遺伝子ターゲッティング効率を示した。本菌株の活用により、醤油や味噌醸造における麹菌酵素類の役割を詳細に解明したい。

文献

- 1) 北本則行, 安田庄子: 愛知県産業技術研究所報告, 7, 90 (2008)
- 2) S. Yoshino-Yasuda, A. Mori, N. Ishihara, O. Hasegawa, M. Kato and N. Kitamoto: *Food Sci. Technol. Res.*, 17, 161 (2011)
- 3) O. Mizutani, Y. Kudo, A. Saito, T. Matsuura, H. Inoue, K. Abe and K. Gomi: *Fungal Genet. Biol.*, 45, 878 (2008)