

# 麹菌のゲノム科学と産業利用

## 日本の伝統的発酵産業の発展に寄与

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、酒・醤油・味噌などの日本の伝統的発酵産業およびバイオテクノロジーに広く使われている。麹菌のゲノム解析は国内の産学官連携チームによって行われ、37 Mbのゲノム塩基配列が解析され、約12,000の遺伝子が予測された。これにより、麹菌が多数の加水分解酵素遺伝子を有すること、麹菌特有の遺伝子が他の *Aspergillus* 属と synteny が無い領域にモザイク状に存在していることが解明された。この研究成果により、日本で「国菌」とも呼ばれている麹菌のゲノム情報基盤が整った。国内では既に、DNA マイクロアレイによる解析、プロテオーム解析などが進められ、麹菌の遺伝子の機能解析と産業利用に関する研究が進められている。

The genome sequencing of *Aspergillus oryzae*, a filamentous fungus widely used in Japanese fermentation industries, has been completed by a Japanese research group. The *A. oryzae* genome consists of c.a. 37 Mb nucleotides and 12,000 predicted genes. The genome sequence revealed that *A. oryzae* has redundant secretory hydrolases and that the *A. oryzae* specific genes are enriched in the blocks without synteny to other *Aspergilli*. Establishment of genomic research basis of *A. oryzae* has facilitated functional analysis and the research for industrial applications of the *A. oryzae* genes.

### はじめに

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、酒・醤油・味噌などの日本の伝統的発酵産業に広く使われてきた糸状菌(カビ)であり(図1)、「国菌」と呼ばれることもある日本の産業にとって重要な糸状菌である。一般的に糸状菌は様々な加水分解酵素などを分泌することにより、栄養源が乏しい環境でも生育できるが、麹菌は糸状菌の中でもタンパク質の分泌生産能力が高く、近年では、バイオテクノロジーによる酵素などの分泌生産にも利用されている。麹菌が属する *Aspergillus* 属の中では、*Aspergillus nidulans* が基礎研究に広く使われている。一方、麹菌は有性世代が見いだされていないことから遺伝的解析を行うことができず、分泌酵素な

どの産業に直接関係する研究は精力的に行われているものの、基礎的な研究は容易ではなかった。

麹菌のEST解析(発現している遺伝子の解析)は、1996年に当時の工業技術院生命工学工業技術研究所(現:産総研)で開始された。また、1998年からは、7大学・研究機関が連携して大規模なEST解析を行い、2001年3月には全遺伝子の約1/3の部分配列の解析を完了した。麹菌の全ゲノム解析は、EST解析に携わった研究者を中心として産学官連携のコンソーシアムが組織され、製品評価技術基盤機構との共同研究によって2001年8月に開始された(図2)。



提供: 月桂冠(株)

図1 伝統的な酒造りの風景

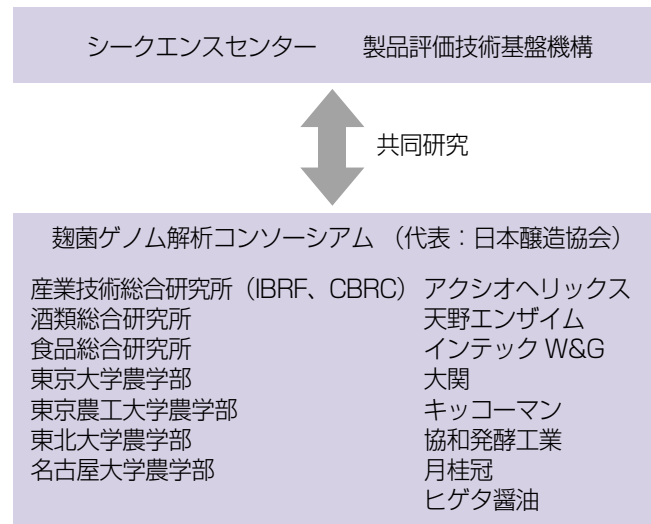


図2 麹菌ゲノム解析の実施機関

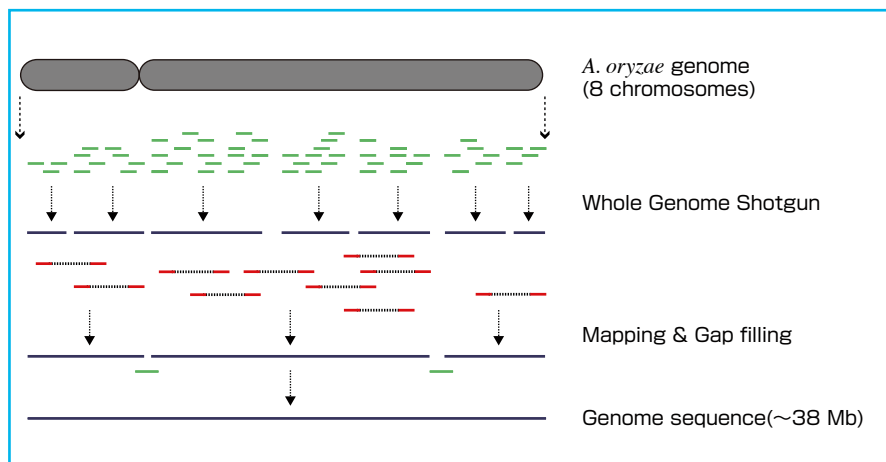


図3 麹菌のゲノム解析

### 麹菌ゲノム解析の方法

麹菌のゲノム解析はホールゲノムショットガン法によって行われた(図3)。この方法では、麹菌の全ゲノムを1~2 kb (kb: 1000塩基対)程度に断片化してクローニングしたライブラリーを作成し、約30万個のコロニーを無作為に選択して両末端の配列解析を行った。こうして得られた塩基配列をコンピュータを用いて同一の配列を指標として接続し、コンティグ(少しづつ重なりあったクローン一群)を形成させた。さらに、コスミド(3万~4万塩基対のクローン)とBAC(バクテリア人工染色体)のライブラリーを作成し、それぞれのライブラリーから数千個のコロニーを選択して同様に両末端の塩基配列を解析し、先に作成したコンティグの塩基配列との相同性を用いて、コンティグを連結してスキヤホルド(連続していることが既知である一群の配列)を形成させた。スキヤホルドの数が全体で数十程度になった段階で、Southern hybridization(似た配列の有無を解析する方法)によって各スキヤホルドを染色体上にマッピングし、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法などを用いて隣接するスキヤホルドを決定した。残されたgapなどは、PCR法などを用いて鋳型DNAを調製し、塩基配列を逐次決定した。最終的に、麹菌が有する8本の染色体は、6個のスキヤホルドと10個のコンティグから形成され、解析された塩基配列の総数は約37 Mb (Mb: 100万塩基対)となった(図4)。

これ以外に、高度な繰返し配列で現在の技術では決定することが困難なrDNAが約0.6 Mb、セントロメア領域などのAT(アデニン、チミン)含量が極度に高くクローニングなどができない領域が約0.4 Mbあり、ゲノム全長としては約38 Mbになる<sup>1)</sup>。

### 麹菌のゲノム塩基配列の特徴

われわれは、本格的な麹菌のゲノム解析が開始される以前の予備的な解析から、麹菌には特に解析のむずかしい高度な繰返し配列などは見られず、GC(グアニン、シトシン)含量も50%を若干下回る程度で、ゲノム解析が行いやすい微生物と考えていた。しかし、実際にゲノム解析を進めていくと、コンティグの末端がAT含量の高い配列の存在<sup>1)</sup>で読めなくなることが頻繁に発生し、gap領域をPCR法で増やすことすらできない場合も多数あった。

製品評価技術基盤機構ではこの状況を克服するために、AT含量の高いDNA断片を増幅するためのPCR条件の検討など、非常に手間のかかる作業が丹念に行われた。この結果、ほとんどのgapを埋めることに成功し、残された領域のほとんどは、他の糸状菌でも解析が困難なセントロメア領域だけとなった。特筆すべきことは、遺伝子地図、制限酵素地図の両方が存在しない状態でゲノム解析を行ったにもかかわらず、約38 Mbのゲノム全体にわたって1ヶ所の矛盾も無かったことである。

### 麹菌の遺伝子の特徴と麹菌の性質

麹菌のイントロン(挿入配列)の長さは高等動植物に比較して短く比較的一定していたことから、当初は麹菌の遺伝子の予測は比較的容易に達成できると考えていたが、実際には正確な予想は困難な遺伝子がかかり存在した。現在公開されている他の糸状菌のゲノム解析での遺伝子予測でも同様であるが、これは、糸状菌の遺伝子数が微生物で最大級であり、かなりの遺伝子の情報が少ないということが原因かもしれない。麹菌の遺伝子予測では、SIM<sup>4)</sup>によるESTとのアラインメント、ALN<sup>3)</sup>による相同遺伝

子とのアラインメント、GeneDecoder<sup>4)</sup>によるab initioの予測、Glimer M<sup>5)</sup>によるab initioの予測など(ALNとGeneDecoderは産総研生命情報科学研究センターが開発)、それぞれの特徴を生かした予測と評価が行われており<sup>1)</sup>、これまでに解析された糸状菌ゲノムの中で、遺伝子の予測に関しても最高クラスの精度であると考えている。

麹菌のゲノムサイズは、同じ*Aspergillus*属に属する*Aspergillus fumigatus*や*Aspergillus nidulans*と比較して30%程度大きい約38 Mbからなるが、遺伝子数についても*A. fumigatus*と*A. nidulans*が9,000~10,000程度であるのに対し、麹菌は約12,000強とゲノムサイズの増加にほぼ比例した遺伝子数が予測された。この約3,000の増加分は、タンパク質分解酵素などの加水分解酵素や、アミノ酸の代謝系や二次代謝系の遺伝子などによるもので、加水分解酵素やアミノ酸代謝系遺伝子の数が多いことは、麹菌が食品の発酵産業に利用されてきたことを合理的に説明できる。一方、二次代謝系の遺伝子が増大していることは、麹菌の祖先が植物に対する感染性を持っていた可能性を示唆している。また、major facilitator superfamily transporter 遺伝子の数が多く、麹菌の高い薬剤耐性を説明できる<sup>1)</sup>。

## 麹菌のゲノム構造の特徴

麹菌のゲノムと*A. fumigatus*と*A. nidulans*のゲノムとの遺伝的相同性を比較すると、麹菌のゲノムには、*A. fumigatus*や*A. nidulans*のゲノムと共通の領域と麹菌に特有の領域がモザイク状に存在することがわかった。前項の麹菌に特有

の遺伝子の多くは、この麹菌に特有の領域に集まっていた。また、EST解析の結果と合わせて解析した結果、麹菌に特有な領域の遺伝子の発現は、共通領域の遺伝子と比較して明らかに低いことが分かった。このことは、麹菌が持つ二次代謝系遺伝子は発現が抑えられていることを意味しており、麹菌が高い安全性を有していることを支持する結果である<sup>1)</sup>。また、麹菌特有の領域には、原核生物である*Agrobacterium tumefaciens*と相同性が非常に高く、他の真核生物からは見つからない遺伝子が存在していた。このことから、麹菌は原核生物から遺伝子を獲得した可能性が考えられる。

麹菌のゲノムサイズが*A. fumigatus*と*A. nidulans*の2種に比較して約30%も大きいことは非常に興味深い。麹菌のゲノム上で遺伝的相同性を持つ領域が、*A. fumigatus*と*A. nidulans*の2種のゲノムに対して共通であることから、*A. fumigatus*と*A. nidulans*のゲノムは似た構造を有し、麹菌だけが特異的な領域をモザイク状に持っていることになる。一方、系統学的な解析から、麹菌と*A. fumigatus*の分岐は*A. nidulans*との分岐の後であることが示されている<sup>6)</sup>。これらのことから、3種の共通の祖先は*A. fumigatus*や*A. nidulans*と同様のゲノムサイズを有し、*A. nidulans*と*A. fumigatus*が分岐した後に、麹菌が他の生物種から遺伝子を獲得した可能性が高いと考えられる<sup>1)</sup>。

## 麹菌ゲノム情報の産業利用に向けて

麹菌の機能をより高度に使いこなしていくために、遺伝

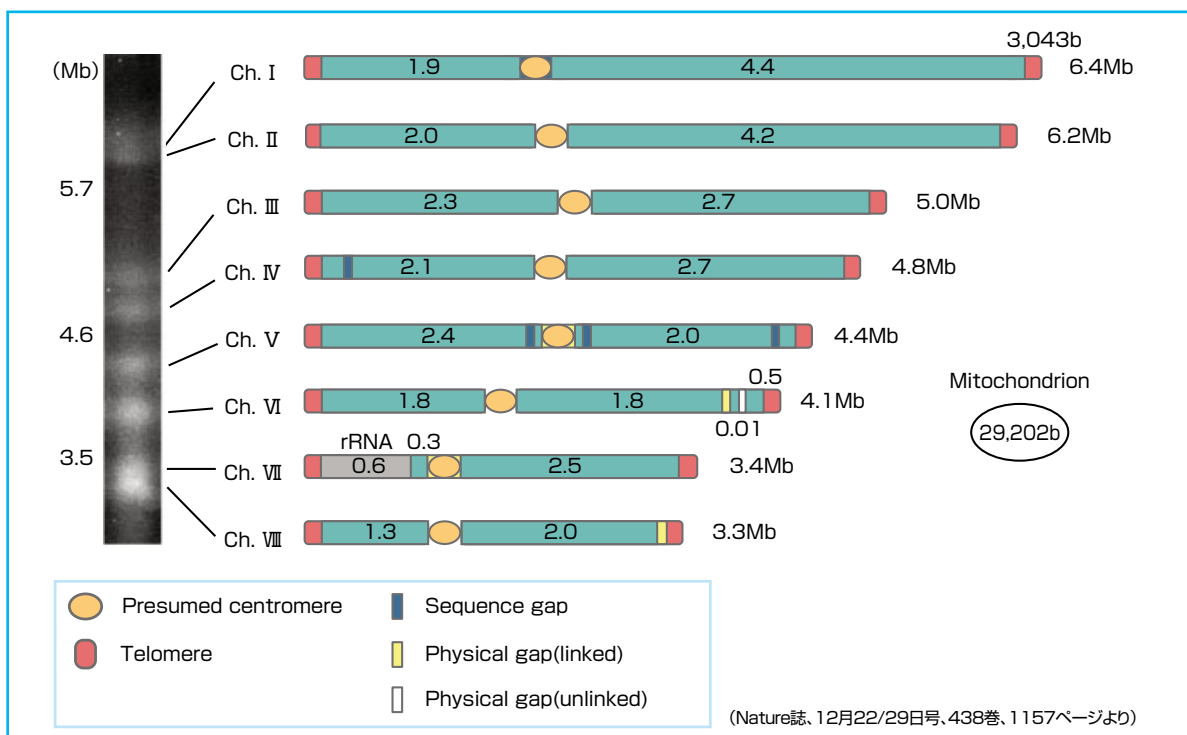


図4 各染色体の解析結果

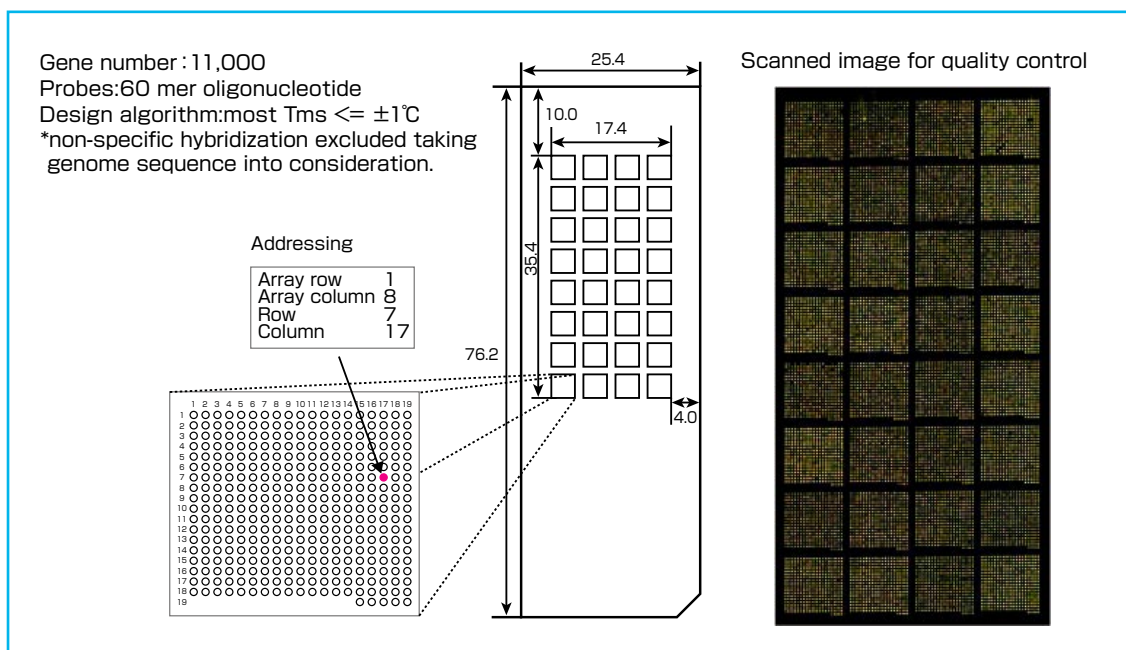


図5 *A. oryzae* DNA microarray

子の発現を網羅的に調べることは重要である。そこで、麹菌のゲノム塩基配列を利用して、麹菌の全遺伝子に対するプローブを搭載するDNAマイクロアレイを作製し、様々な条件による麹菌遺伝子の発現の変化を網羅的に解析した(図5)。DNAマイクロアレイによる解析は、麹菌の場合においても代謝経路のモニターに有効と確認されており<sup>7)</sup>、多数のDNAマイクロアレイによる解析は、麹菌の研究のために有用な情報基盤を提供すると期待される。

また、国内の研究機関で麹菌のプロテオームの解析も行われており、麹菌のゲノム塩基配列を基盤としたゲノム科学研究が進みつつある。最近、*Neurospora crassa*で非相同組換えに関する遺伝子が発見され、これを破壊すると相同組換えの効率が向上することが見いだされた。麹菌は多核であり、また、非相同組換え効率が高いことから、これまでは遺伝子の破壊は非常に困難であった。しかし、*N. crassa*と同様の方法が他の*Aspergillus*属でも可能であることが見いだされ、現在では麹菌でも比較的容易に遺伝子の破壊ができるようになり、出芽酵母などと同様に、網羅的な遺伝子破壊による遺伝子機能の解析が可能になりつつある。

このように、麹菌のゲノム情報基盤は整備されつつあり、麹菌の遺伝子や機能を産業に利用していくための基盤技術が整ってきた。しかし、ゲノム科学の産業利用には、高度な情報科学やゲノム科学と密着した生物学的ノウハウが必要である。そこで、産総研、東北大学、金沢工業大学が培ってきた麹菌のゲノム科学の産業利用に関する知的財産を技術移転して、麹菌のゲノム情報に基づいた技術を実用化するための産総研ベンチャー(株式会社ファームラボ)が立

ち上がった。ゲノム情報から生まれた技術を発酵産業に使いこなすことは容易ではないかもしれないが、このベンチャー企業が一つの試金石として麹菌ゲノム科学に基づいた産業の発展に貢献することを期待したい。

#### 関連情報

- 1) Machida, M. et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438, 1157-1161 (2005).
- 2) Florea, L., Hartzell, G., Zhang, Z., Rubin, G.M. & Miller, W. A computer program for aligning a cDNA sequence with a genomic DNA sequence. *Genome Res.* 8, 967-974 (1998).
- 3) Gotoh, O. Homology-based gene structure prediction: simplified matching algorithm using a translated codon (tron) and improved accuracy by allowing for long gaps. *Bioinformatics* 16, 190-202 (2000).
- 4) Asai, K., Itou, K., Ueno, Y. & Yada, T. Recognition of human genes by stochastic parsing. *Pac. Symp. Biocomput.* 228-239 (1998).
- 5) Majoros, W.H., Pertea, M., Antonescu, C. & Salzberg, S.L. GlimmerM, Exonomy and Unveil: three ab initio eukaryotic gene finders. *Nucleic Acids Res.* 31, 3601-3604 (2003).
- 6) Galagan, J.E. et al. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438, 1105-1115 (2005).
- 7) Maeda, H. et al. Transcriptional analysis of genes for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence tags. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 74-83 (2004).

#### ● 問い合わせ先

独立行政法人 産業技術総合研究所

生物機能工学研究部門 遺伝子応用技術研究グループ

研究グループ長 町田 雅之

E-mail: m.machida@aist.go.jp

〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第6