

## [成果情報名] 新たに作出した麹菌用ジーントラップベクター

[要 約] 麹菌における網羅的遺伝子破壊株作成法及びその遺伝子破壊株の高効率選抜法を合わせて開発した。本手法を用いることにより、未知遺伝子の発見、その破壊株の取得及びその DNA 配列の取得を一度に行うことが出来る。

[部 署] 食品総合研究所・応用微生物部・糸状菌研究室

[連絡先] 029-838-8077 satosuz@nfri.affrc.go.jp

[成果区分] 参考

[キーワード] 麹菌、ポストゲノム、遺伝子機能解析、タグライン

---

## [背景・ねらい]

麹菌ではゲノム情報が明らかとなり、研究はポストゲノムの段階に入った。現在コンピューターによる遺伝子機能推定が行われているが、塩基配列の相同性の情報だけでは遺伝子機能を完全に解明することは出来ない。他生物においては、網羅的な遺伝子破壊株を収集した研究基盤が確立しており、研究者の依頼に応じて分譲され、それぞれの遺伝子機能解析に役立てられている。麹菌においても、そのような遺伝子破壊株の蓄積が必要であり、そのための網羅的遺伝子破壊法と、破壊株の効率的な選抜法が開発が求められている。

## [成果の内容・特徴]

1. 麹菌における網羅的遺伝子破壊株作成法の開発のため、麹菌用ジーントラップベクターを開発した。  
(図1)本ベクターはピリチアミン耐性をマーカーとし、レポーター遺伝子として緑色蛍光タンパク質遺伝子を保持する。
2. 本ベクターの特徴は、レポーター遺伝子の直前で切断、直鎖化した後にゲノム内にランダムに挿入した場合、ゲノム内在遺伝子を分断破壊し、そのコード領域に正方向に挿入された場合にのみ当該内在遺伝子のプロモーター配列を利用してレポーター遺伝子である緑色蛍光タンパク質を発現させるものである。
3. 緑色蛍光を指標にすることにより、遺伝子破壊が成功した株のみを効率的に選抜することが可能である。
4. 多数の遺伝子破壊株候補を 96 穴プレート上で培養し、蛍光画像解析装置による測定を網羅的に行い、遺伝子破壊に成功した株のみを高効率に選抜する方法を開発した。(図2)
5. 本選抜法では、菌体量依存的に蛍光強度を増す赤色蛍光色素によって菌体を均一に染色することにより、計測時菌体量を定量し、菌体量あたりの緑色蛍光強度を算出する。遺伝子破壊株は緑色蛍光タンパク質を発現するため、菌体量あたりの緑色蛍光強度の大きい株を選抜することにより、容易に遺伝子破壊株を得ることができる。
6. 上記の二つの手法を用いて実際に遺伝子破壊株を取得した。(図3)

## [成果の活用面・留意点]

本研究により開発された手法を用いることにより、網羅的に遺伝子を破壊した麹菌株の集団を高効率に得ることが出来る。本手法は麹菌の機能未知遺伝子の解析に有用であり既にいくつかの新規遺伝子について実績がある。現時点では麹菌遺伝子破壊株の情報は不十分であり、今後、本手法を多くの麹菌研究者に利用してもらうことにより、共通の研究基盤を拡充することが望まれる。本手法は麹菌の他、数種の糸状菌にも応用可能であり、利用を研究目的に限ることを条件に依頼により提供可能である。

[具体的データ]

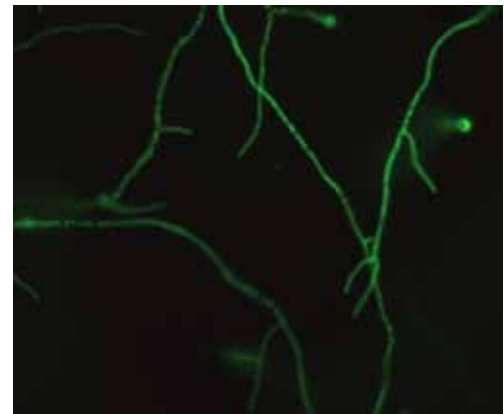
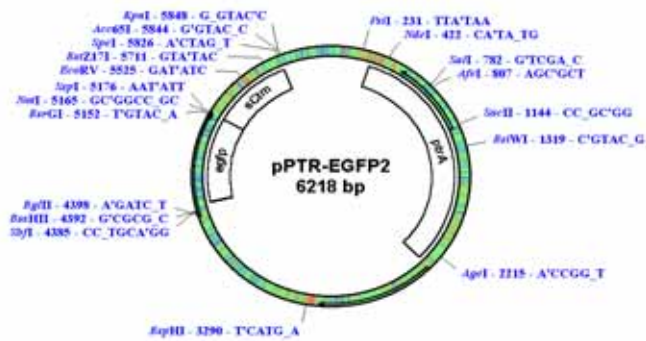


図1 ジーントラップベクター制限酵素地図

図3 遺伝子破壊株顕微鏡写真

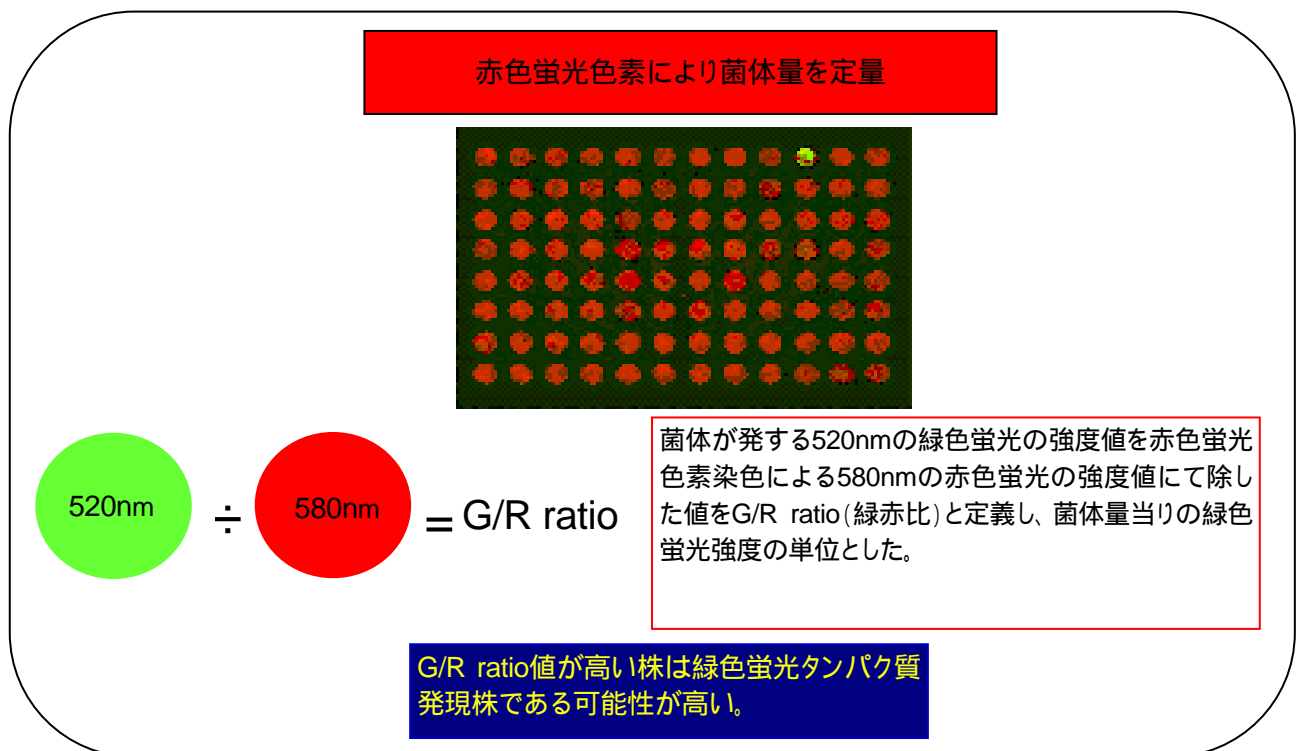


図2 遺伝子破壊株の高効率選抜法

[その他]

研究課題名：麹菌の形態変化にともなう高発現遺伝子の制御機構の解明

予算区分：形態・生理プロジェクト

研究期間：2001～2003年度(2003年度)

研究担当者：鈴木 聡、柏木 豊

発表論文等：

- 1) S. Suzuki, H. Taketani, K. Kusumoto, and Y. Kashiwagi: High-throughput Screening for Isolation of Enhanced Green Fluorescent Protein Expressing Transformants of Filamentous Fungus Using an Image Analyzer, J. Biosc. Bioeng., 96, 313-316 (2003)
- 2) S. Suzuki, K. Kusumoto and Y. Kashiwagi: Construction of a gene trap vector, pPTR-EGFP1, for the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*, Rep. Natl. Food Res. Inst., 67, 33-38 (2003)
- 3) 柏木豊、楠本憲一、鈴木聡：特許 糸状菌の菌体量測定法 特願 2003-292703