

*Aspergillus oryzae*のテロメア配列を付加したプラスミドの細胞内における形態の解析

楠本 憲一, 木村 多江, 鈴木 聡, 柏木 豊

Structure of the plasmid with telomeric repeat sequences for *Aspergillus oryzae*

Ken-Ichi Kusumoto, Tae Kimura, Satoshi Suzuki, Yutaka Kashiwagi
National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, JAPAN

Abstract

Two types of the plasmid were prepared. One was the circular plasmid having the inverted repeat of two units of the telomeric repeat unit (5'-TTAGGGTCAACA) for *Aspergillus oryzae* and the autonomous replicating sequence AMA1 for *Aspergillus nidulans*. The other was the linear plasmid having two telomere units with both ends and AMA1 inside. Both plasmids were introduced in *A. oryzae*. The resulting transformants using the circular plasmid appeared to harbor the original circular one. The transformants with the linear plasmid harbored the circular one which was derived from the linear one by self-circularization. Therefore the two telomeric units were not recognized as the terminus of the DNA. More telomeric repeat units might be necessary for construction of the linear vector using the telomeric sequence of *A. oryzae*.

(Received Dec. 12.11, 2003; Accepted Jan. 29, 2004)

緒言

真核生物の染色体は直鎖状DNAで構成され、その末端はテロメアと呼ばれる特殊な配列にタンパク質が結合して保護されている¹⁾。現在までに、哺乳類、植物、酵母、糸状菌のテロメア配列が解明されている²⁻⁴⁾。著者らは、麹菌*Aspergillus oryzae*のテロメア配列を解明し、それが5'-TTAGGGTCAACA(染色体内部から末端に向かう方向の配列)の12塩基を単位とする繰り返し配列であること、繰り返し回数は9~11回であること、これらが染色体の末端に存在することを解明した⁵⁾。

数種の糸状菌においては、テロメアの末端保護機能を利用して、両末端にテロメア配列を付加した線状プラスミドが開発されている。ただし、それらの安定性は極めて低い^{3,6,7)}。本研究では、*A. oryzae*のテロメア

配列を用いた新規ベクター開発の一端として、*A. oryzae*のテロメア配列による糸状菌線状プラスミドに対するDNA末端保護機能について検討した。

実験方法

1. 使用菌株およびその培養方法

Aspergillus oryzae NFRI 1599 (RIB 40) を麹菌の形質転換用宿主として使用した。本株は麦芽エキス寒天斜面培地(2%麦芽エキス, 2%グルコース, 0.1%ペプトン, 2.5%寒天)で25℃にて培養を行い、4℃で保存した。また、孢子懸濁液調製のために、本株を麦芽エキス寒天平板培地上に接種し、25℃にて培養を行った。

2. プラスミドおよび合成DNA

糸状菌用自己複製プラスミドpPTRIIは宝酒造(株)

より入手した。合成DNA (TELLET1, AGC TTA GGG TCA ACA TTA GGG TCA ACA GAT CTG TTG ACC CTA ATG TTG ACC CTA; KIMF1, CTG TTC TTC TAG TGT AGC CG; KIMR1, GTA TCA GCT CAC TCA AAG GC) はエスベックオリゴサービス (株) より入手した。

3. テロメア付加プラスミドの作成

プラスミドpPTRII-tellet1は、以下のようにして作成した。TELLET1は回転対称配列となっており、その2分子が互いに逆方向にアニーリング可能な相補的配列になるように設計している。125 μ M TELLET1 20 μ lを70 °Cで5分間処理し、5 × アニーリングバッファ (0.5M Tris-HCl, pH7.4, 0.35M MgCl₂) 5 μ lを添加してさらに70 °Cで5分間処理した。その後、1時間かけて徐々に室温に戻すことによりアニーリングを行った。この処理により、TELLET1は2本鎖DNAとなり、その末端がHindIII消化DNAと結合できるようになっている。また、このDNAはテロメア繰り返し単位2回分を2コピー、逆向き繰り返し配列として有し、その2コピーの配列の境界に制限酵素BgIII認識部位AGATCTがある。pPTRIIを制限酵素HindIIIで消化後、DNAライゲーションキットVer. 2 (宝酒造) を用いて、2本鎖TELLET1とライゲーションを行った。TELLET1のpPTRIIへの挿入の確認は、塩基配列決定および、BgIIIで消化されて

線状になることにより行った。図1に使用したプラスミドの構造を示した。

4. プラスミドDNAによる*A. oryzae*の形質転換

麦芽エキス寒天平板培地上に形成した*A. oryzae* NFRI 1599のコロニーに適量の無菌水を添加し、コンラージ棒を用いてコロニーに着生した胞子を懸濁した。胞子懸濁液を滅菌したMiraCloth (CalBiochem, USA) を用いてろ過した。胞子懸濁液中の胞子数を血球計算版を用いて計測し、約10⁵ spores/mlになるよう、100mlのCzapek-Dox液体培地に接種し、30 °Cで42時間、振とう培養を行った。培養菌体を滅菌したMiraClothを用いて回収した。以降の*A. oryzae*の形質転換操作はGomiら⁸⁾の方法により行った。図1に示した3種のプラスミドDNA導入後のプロトプラストは、0.8M NaClおよび0.1 mg/lピリチアミン (宝酒造) を含有させたCzapek-Dox寒天平板培地 (再生培地) に乗せ、ソフトアガー (0.5%寒天含有の再生培地) で包埋し、30 °Cにて静置培養した。

5. 形質転換体中のプラスミド保持率算出法

形質転換体を2回ピリチアミン含有Czapek-Dox寒天平板培地上で継代培養した後、形成した胞子をCzapek-Dox寒天平板培地に接種し、生育したコロニー50個をそ

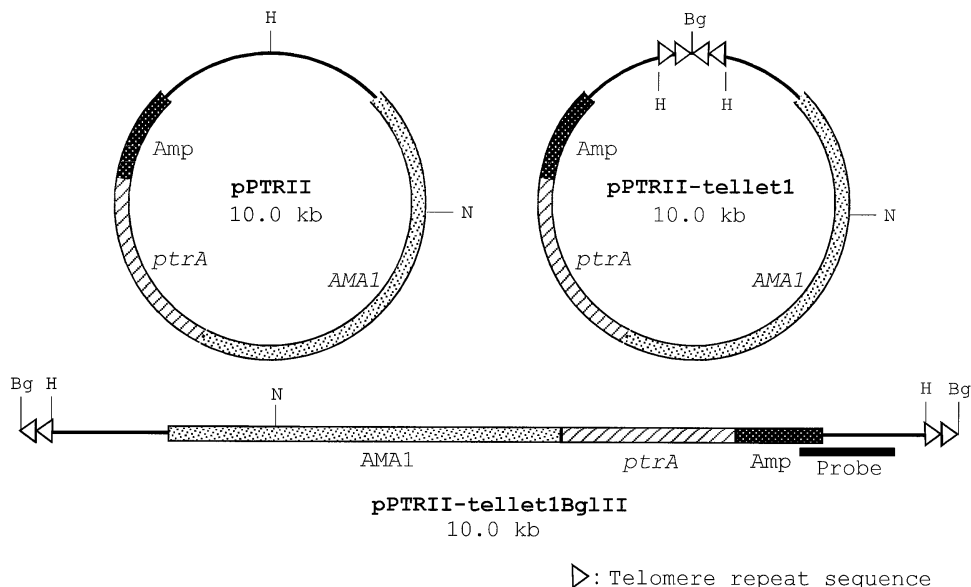


図1 使用したプラスミドの構造

Amp, アンピシリン耐性遺伝子; ptrA, ピリチアミン耐性遺伝子; AMA1, *A. nidulans*の自己複製配列; H, HindIII認識部位; Bg, BgIII認識部位; N, NaeI認識部位; , テロメア繰り返し単位 (TAAGGGTCAACA); 黒太線, プラスミド検出用プローブ作成に使用した領域。

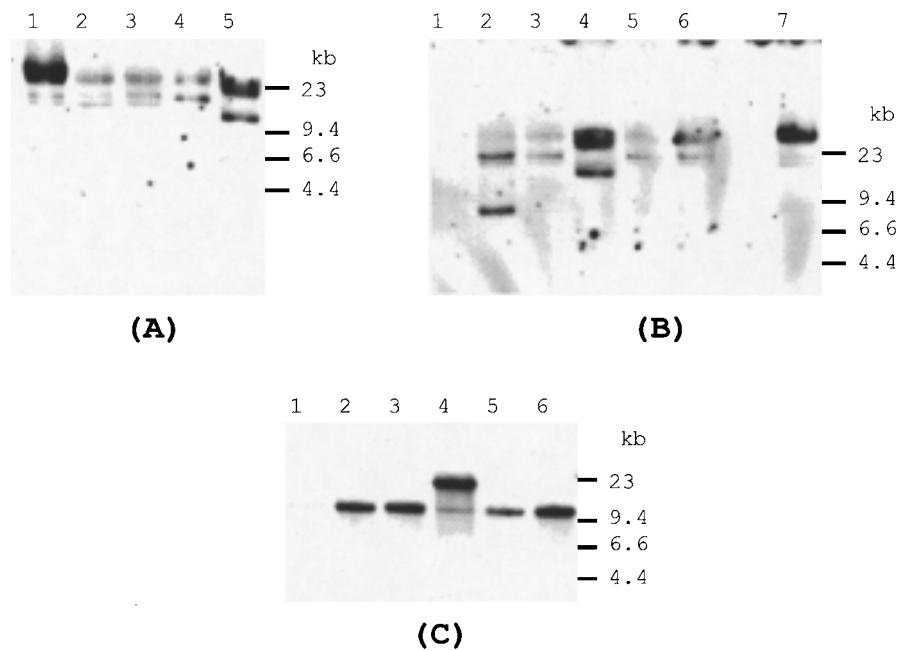


図2 プラスミド導入形質転換体中のプラスミドのサザン解析

- (A) 形質転換体各2株ゲノムDNAのサザン解析．レーン1，pPTRII導入株；レーン2，pPTRII-tellet1導入株1；レーン3，pPTRII-tellet1導入株2；レーン4，pPTRII-tellet1BglII導入株3；レーン5，pPTRII-tellet1BglIII導入株4．
 (B) pPTRII-tellet1BglIII導入株6株のゲノムDNAのサザン解析．レーン1，導入株1；レーン2，導入株2；レーン3，導入株3；レーン4，導入株4；レーン5，導入株5；レーン6，導入株6；レーン7，pPTRII導入株．
 (C) pPTRII-tellet1BglIII導入株6株のNaeI消化ゲノムDNAのサザン解析．各レーンは，図2(B)の1～6と同じ．

れぞれピリチアミンを含むCzapek-Dox寒天平板培地に接種し，30℃にて静置培養した．ピリチアミンを含む平板培地上で生育した割合をプラスミド保持率とした．

6．サザンプロットによる形質転換体保有プラスミドの形状分析

*A. oryzae*のゲノムDNAをIimuraら⁹⁾の方法によりプロトプラストから調製した．ゲノムDNAの制限酵素消化を行い，1%アガロースゲルを用いた電気泳動分析を行った．ゲル内のDNAを，VacuGene XL Blotting System (アマシャム(株))を用いてナイロンメンブレンに転写した．プローブとして，pPTRIIを鋳型とし，KIMF1およびKIMR1をプライマーとして，DIG DNA Labeling and Detection Kit (ロッシュダイアグノスティックス(株))により標識反応を行い，DIG標識をした大腸菌ベクター部分(0.5 kb)を作成した．その後このプローブを用いてハイブリダイゼーションおよびDNAの検出を行った．

実験結果および考察

*A. oryzae*のテロメア繰り返し配列を付加したプラスミドの作製を行った．pPTRII-tellet1は，*A. nidulans*の自己複製配列AMA1が付加された自己複製ベクターpPTRIIのHindIII認識部位に，テロメア繰り返し単位2回分を2コピー逆向き繰り返し配列として挿入したものである(図1)．この挿入により，本プラスミドはもとのプラスミドよりも約50塩基大きくなっている．また，pPTRII-tellet1BglIIIは，pPTRII-tellet1をBglIII認識部位で切断して線状にしたもので，両端にテロメア繰り返し配列がそれぞれ2回付加された形になっている(図1)．

ベクタープラスミドpPTRIIで*A. oryzae*NFRI1599を形質転換したところ，形質転換頻度は110-390/μg DNAであった(形質転換頻度は，単位DNAあたりの出現形質転換株数)．一方，テロメア配列を付加したpPTRII-tellet1で*A. oryzae*を形質転換したところ，形質転換頻度は80-210/μg DNAであり，pPTRIIを用いた時のおよそ60%であった．また，pPTRII-tellet1BglIIIで形質転換したと

ころ、形質転換頻度は20-90/ μg DNAで、pPTRII-tellet1を用いた時のおよそ40%であった。また、形質転換体における2のプラスミド保持率は、pPTRII導入株とpPTRII-tellet1導入株では10~12%であったが、pPTRII-tellet1BgIII導入株では、9~13%のグループと2~5の低保持率のグループに分かれた。

上記で得られた形質転換体のうち、各プラスミド導入株から各2株を選び、ゲノムDNAを抽出してサザン解析を行った。その結果を図2Aに示した。本解析では、pPTRIIプラスミドの大腸菌ベクター部分をプローブとして使用しており、プラスミドに由来するDNAのみが検出される。テロメア繰り返し配列挿入プラスミド導入株では、pPTRII-tellet1が2株共(図2A, レーン2および3)、pPTRII-tellet1BgIII導入株1株(図2A, レーン4)が、pPTRII導入株(図2A, レーン1)と同様のバンドパターンを示した。pPTRIIは環状DNAとして染色体外で複製して保持されることが知られている¹⁰⁾。したがって、これらの結果は、pPTRIIと同様、pPTRII-tellet1導入の2株とpPTRII-tellet1BgIII導入株3番が環状DNAとしてプラスミドを保持していることを示している。

*Aspergillus nidulans*では、テロメア配列は哺乳類と同様、TTAGGGを繰り返し単位としている¹¹⁾。ヒトのテロメア配列を両端に有した線状プラスミドあるいは、当該配列を2回逆位に有する環状プラスミドは、*A. nidulans*に導入すると、いずれの場合も線状DNAのまま保持されることが知られている⁶⁾。また、自己複製配列AMA1を連結しなくともヒトテロメア配列を連結するだけで自己複製した⁶⁾。この場合、挿入したヒトのテロメア配列部分の長さは0.6 kbであるため、約100回の繰り返し回数であるから、染色体末端としての認識には十分な長さと考えられ、環状で導入しても線状DNAとして保持され、末端がテロメア結合タンパク質群で保護されると考えられる。本研究で、*A. oryzae*テロメア繰り返し配列2回を逆位で繰り返しした環状プラスミドならびに両末端にテロメア繰り返し配列2回を有した線状プラスミドのいずれもが、*A. oryzae*内で環状プラスミドとして保持された。このことから、*A. oryzae*ではテロメア繰り返し配列2回では末端として認識されないため、環状プラスミドpPTRII-tellet1は開裂せず、線状プラスミドpPTRII-tellet1BgIIIはAleksenko¹²⁾が述べているように線状プラスミド両端の連結反応により自己閉環化したものと考えられる。

pPTRII-tellet1BgIII導入株4番が保持するプラスミドは、他のサンプルよりもサイズが小さくなっていた(図2A, レーン5)。同導入株3番では、保持されて

いるプラスミドは環状化したものの、ほぼ元のサイズのままであった。線状で導入したプラスミドのうちに他にもサイズが小さくなっているものがあるか調べるため、さらに4株のpPTRII-tellet1BgIII導入株が保持するプラスミドのサイズを分析した(図2B)。また、同じサンプルを、制限酵素*NaeI*(pPTRII-tellet1BgIII内に1ヶ所認識部位が存在する)により消化した結果を図2Cに示した。その結果、導入株5番と6番は、3番およびpPTRII導入株のプラスミド(図2B, レーン3, 5, 6, 7; 図2C, レーン3, 5, 6)と同様のサイズであった。これらのプラスミドも環状化したサイズは元のままであった。一方、導入株4番では、*NaeI*消化により高分子側にバンドが検出され(図2C, レーン4)、*NaeI*消化をしない場合(図2B, レーン4)と同様のバンドパターンであった。したがって、導入株4番では、プロトプラスチン内に取り込まれたpPTRII-tellet1BgIIIの*NaeI*認識部位がヌクレアーゼ等で除去されて、プラスミドが短くなったあと、自己閉環したものと考えられる。また、導入株2番では未処理のまま導入株3番などと同じパターンのバンドの他に、導入株4番よりも小さなサイズのバンドが検出された(図2B, レーン2)。ところが、これを*NaeI*消化すると、導入株3番などと同じサイズのバンドが検出され、小さなサイズのバンドは見られなかった(図2C, レーン2)。この菌株中の低分子に検出されたDNAは、テロメア配列を有することによりプラスミドの位相が変化した可能性があるが、詳細は不明である。また、導入株1番では、保有プラスミドDNAの大きさはほぼpPTRIIと同じであるがシグナルが著しく弱かった(図2BおよびC, レーン1。図2Bではバンドが検出されず、図3では約10kbのごく薄いバンドが検出された)。AMA1あるいは*ptrA*領域に突然変異が生じたものと考えられる。

これらのことから、pPTRII-tellet1をBgIII消化して線状にしたDNAを*A. oryzae*に導入すると、環状化することがわかった。すなわち、テロメア繰り返し単位を2回末端に有するだけでは線状DNAとして保持されず、自己閉環して環状化されることがわかった。また、自己閉環する前にヌクレアーゼ等による消化が見られたので、テロメア繰り返し単位2回では末端配列の保持とテロメアの伸長が行われないことがわかった。*A. nidulans*では、ヒトテロメア配列とAMA1を連結したプラスミドは、*A. nidulans*に導入後線状化した⁶⁾が、AMA1のみ連結した線状DNAを細胞内に導入すると環状化することが知られている¹²⁾。本研究においては、

線状プラスミド上にAMA1とともに連結した*A. oryzae*のテロメア配列が機能しなかったために同様に環状化したと考えられる。著者らが発見した*A. oryzae*のテロメア配列を利用して線状ベクターを作製するためには、今後テロメア繰り返し単位の数を増加させる必要があると考えられる。

要 約

*Aspergillus oryzae*のテロメア配列のうち、繰り返し単位(5'-TTAGGGTCAACA)2回ずつを逆方向繰り返し配列として付加し、*Aspergillus nidulans*の自己複製配列AMA1を連結した環状プラスミドおよび繰り返し単位2回を両端に有し、内部にAMA1を連結した線状プラスミドを作成した。これらのプラスミドを*A. oryzae*に導入した結果、環状プラスミドとして導入すると環状のまま保持され、線状プラスミドの場合は自己閉環した。このことから、テロメア2回繰り返し配列は末端として認識されず、*A. oryzae*のテロメア配列を利用して線状ベクターを作成するためにはさらに多くの繰り返し単位が必要と考えられた。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト・環境研究による課題「農林水産バイオリサイクル研究」により行われた。

文 献

- 1) Karlseder, J., Telomere repeat binding factors: keeping the ends in check, *Cancer Lett.*, **194**, 189-197 (2003).
- 2) Garcia-Pedrajas, M. D., Roncero, M. I., A homologous and self-replicating system for efficient transformation of *Fusarium oxysporum*, *Curr. Genet.*, **29**, 191-198 (1996).
- 3) Long, D. M., Smidansky, E. D., Archer, A. J., Strobel, G. A., *In vivo* addition of telomeric repeats to foreign DNA generates extrachromosomal DNAs in the taxol-producing fungus *Pestalotiopsis microspora*, *Fungal. Genet. Biol.*, **24**, 335-344 (1998).
- 4) Zakian, V. A., Telomeres: beginning to understand the end, *Science*, **270**, 1601-1607 (1995).
- 5) Kusumoto, K., Suzuki, S., Kashiwagi, Y., Telomeric repeat sequence of *Aspergillus oryzae* consists of dodeca-nucleotides, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **61**, 247-251 (2003).
- 6) Aleksenko, A., Ivanova, L., *In vivo* linearization and autonomous replication of plasmids containing human telomeric DNA in *Aspergillus nidulans*, *Mol. Gen. Genet.*, **260**, 159-164 (1998).
- 7) Barreau, C., Iskandar, M., Turcq, B., Javerzat, J. P., Use of a linear plasmid containing telomeres as an efficient vector for direct cloning in the filamentous fungus *Podospira anserina*, *Fungal. Genet. Biol.*, **25**, 22-30 (1998).
- 8) Gomi K., Iimura, Y., and Hara, S., Integrative transformation of *Aspergillus oryzae* with a plasmid containing the *Aspergillus nidulans argB* gene. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2549-2555 (1987).
- 9) Iimura, Y., Gomi, K., Uzu, H., and Hara, S., Transformation of *Aspergillus oryzae* through plasmid-mediated complementation of the methionine-auxotrophic mutation, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 323-328 (1987).
- 10) Kubodera, T., Yamashita, N., Nishimura, A., Pyrithiamine resistance gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae*: cloning, characterization and application as a dominant selectable marker for transformation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1416-1421 (2000).
- 11) Bhattacharyya, A., Blackburn, E. H., *Aspergillus nidulans* maintains short telomeres throughout development, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 1426-1431 (1997).
- 12) Aleksenko, A., Cointegration of transforming DNAs in *Aspergillus nidulans*: a model using autonomously replicating plasmids, *Curr. Genet.*, **26**, 352-358 (1994).