

琉球大学学術リポジトリ

[総説] 麹菌の遺伝子組換え技術の進展

メタデータ	言語: 出版者: 南方資源利用技術研究会 公開日: 2019-08-09 キーワード (Ja): 麹菌, 遺伝子組換え, 非相同末端結合, Cre-loxP システム キーワード (En): Aspergillus oryzae, genetic transformation, non-homologous end-joining, Cre-loxP system 作成者: 水谷, 治, Mizuntani, Osamu メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002017074

麹菌の遺伝子組換え技術の進展

水谷 治

琉球大学農学部亜熱帯生物資源科学科

Recent advances in technology of genetic transformation in *Aspergillus oryzae*

Osamu MIZUTANI

Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus

キーワード：麹菌、遺伝子組換え、非相同末端結合、Cre-*loxP* システム

Key words : *Aspergillus oryzae*, genetic transformation, non-homologous end-joining, Cre-*loxP* system

1. はじめに

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、古来より醸造や発酵食品の製造に利用されており、近年では、酵素剤や二次代謝産物の生産など、幅広く利用されている産業微生物である¹⁾。1986年に五味らによって麹菌の形質転換法が発表されて以来²⁾、多くの研究者らにより、麹菌の遺伝子破壊株を用いた遺伝子機能解析が行われてきた。遺伝子機能を解析するには、特定の遺伝子を狙って破壊する遺伝子相同組換え(ターゲティング)技術が必須であるが、麹菌を含め多くの糸状菌や高等生物では、相同組換え効率が非常に低く、遺伝子機能解析には多大の時間と労力を必要としていた。加えて、2005年に麹菌ゲノムが解読され、遺伝子数が約12,000個と推定されると³⁾、当時、すでに遺伝子機能が報告されていた遺伝子は、僅か0.5%程度であることがわかり、遺

伝子ターゲティング技術の大きなブレークスルーが望まれていた。

このブレークスルーは、埼玉大学の井上らによるアカパンカビ (*Neurospora crassa*) の研究によってもたらされた^{4, 5)}。これ以降、麹菌を含む多くの糸状菌において同様の研究が数多く行われ、遺伝子ターゲティング効率上昇株の作出が報告されるようになった⁶⁻⁹⁾。また、糸状菌の相同組換え技術が容易になったことで、次の課題として、多重遺伝子の破壊株や数種の遺伝子を制御可能な株の作出が期待されていた。麹菌は、他の *Aspergillus* 属と比較してマーカー遺伝子となる候補が少ないため、多重遺伝子破壊等を行うためには、マーカー遺伝子のリサイクル技術も重要な課題となっていた⁷⁾。本総説は麹菌のマーカー遺伝子リサイクル技術に焦点を当てる。

マーカー遺伝子のリサイクル技術は、酵母等で良く用いられるループアウト法等の様々な方法が報告されている^{10, 11)}。そこで、我々は、後述する麹菌

による Cre-*loxP* システムを用いたマーカー遺伝子の回収技術の構築を試みた (Cre-*loxP* システムの概要についても後述)¹²⁾。本総説では、麴菌における相同組換え上昇株と Cre 酵素直接導入法を用いた Cre-*loxP* システムによるマーカー遺伝子の回収技術について概説する。

1. 遺伝子ターゲティング効率上昇株の発見

外来 DNA の宿主染色体への導入は、主に相同組換え (HR; homologous recombination) 経路と非相同末端結合 (NHEJ; non-homologous end joining) 経路の 2 つの経路に依存していると考えられている。これらの経路は、いずれも DNA 二本鎖切断 (DSBs; DNA double strand breaks) が生じた際の修復経路として発見されている (図 1)¹³⁾。HR 経路は、DNA の相同配列間の組換えに依存する経路であり、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は、DSBs の修復を主に HR 経路によって行っているため、相同配列を持つ外来 DNA 断片を導入した場合、酵母染色体上の相同部位へと導入される。そのため、酵母における遺伝子ターゲティング効率は非常に高く、遺伝子操作の扱いやすい真核微生物としてその名を轟かせている。一方、酵母以外の真核生物の多くは、DSBs の修復を主に NHEJ 経路によって行っているため、たとえ外来 DNA 断片が長い相同配列を有していても、その DNA 断片は染色体上の任意の部位、即ち非相同に導入されてしまう

ことが多い。

井上らは、外来 DNA が NHEJ 経路を介して非相同でランダムに染色体上に導入される現象に着目し、アカパンカビの NHEJ 経路の構成因子である Ku70 および Ku80 タンパク質をコードする *mus51* (*ku70*) および *mus52* (*ku80*) の各遺伝子を破壊した株を宿主に用いると、100% の確率で遺伝子ターゲティングが起こることを発見した⁴⁾。さらに、同じ NHEJ 経路の非相同末端結合に関与する ligase をコードする *mus53* (*lig4*) 遺伝子についても同様に調べ、*ku* 遺伝子破壊株と同様に 100% の確率で遺伝子ターゲティングが可能であることを報告している⁵⁾。加えて、100-500bp といった短い相同領域を利用した遺伝子ターゲティングにおいて、*ku* 遺伝子破壊株ではターゲティング効率が低下するが、*lig4* 遺伝子破壊株では形質転換頻度が下がるものの 100% のターゲティング効率を示すことも示している⁵⁾。これらの事実から、目的遺伝子の特異的な遺伝子破壊に対しては、*lig4* 遺伝子破壊株を宿主に用いたほうが有用であると考えられたため、麴菌においても *lig4* 遺伝子に着目して研究を行うこととした。

2. 麴菌の *ligD* 遺伝子破壊株と遺伝子ターゲティング効率

井上らの報告⁵⁾をもとに、我々は NHEJ 経路の *lig4* ホモログ遺伝子に注目し、麴菌ゲノムデータベースよりゲノム配列中にアカパンカビ由来 *lig4*

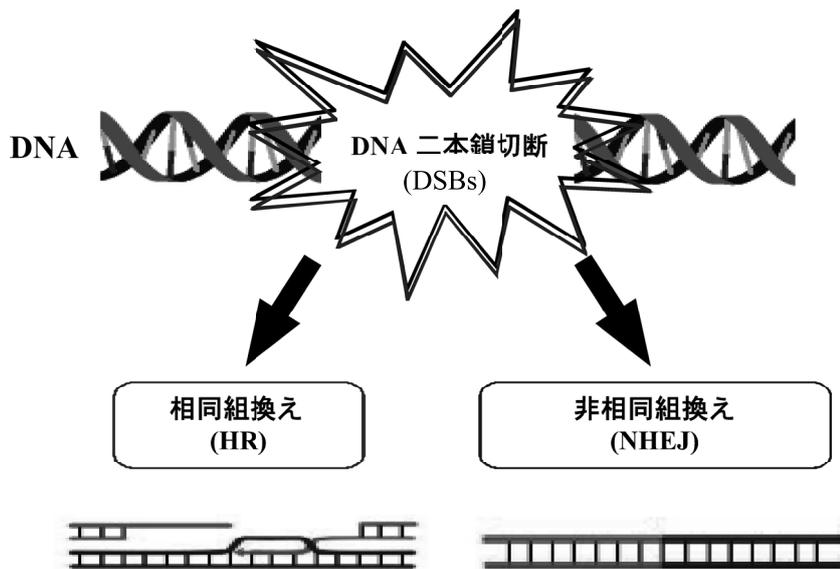


図 1 DNA 二本鎖切断 (DSBs ; DNA double strand breaks) の主な修復経路
HR: Homologous recombination, NHEJ: Non-homologous end-joining

のホモログ遺伝子を見出し、その遺伝子を *ligD* と命名した。麹菌 *ligD* 遺伝子の破壊は、ゲノム解析株である *Aspergillus oryzae* RIB40 株から造成された NS4 株 (*niaD*⁻, *sC*⁻) を親株¹⁴⁾ として、*Aspergillus nidulans* 由来の硫酸塩資化マーカである *sC* 遺伝子及び *A. oryzae* 由来のピリチアミン耐性マーカ遺伝子である *ptrA* を用いて遺伝子置換法により、それぞれ $\Delta ligD::sC$ 株および $\Delta ligD::ptrA$ 株を造成した。得られた *ligD* 遺伝子破壊株の表現型と生育速度を観察したところ、プレート培養及び液体培養のいずれにおいても親株の NS4 株と比較して殆ど変化はなかった。また、*N. crassa* の *ku* 遺伝子や *lig4* 遺伝子の破壊株は、Ethyl methanesulfonate (EMS) や Methyl methanesulfonate (MMS) といった DSBs 誘発剤に対して感受性を示すことが報告されている^{4,5)}。そこで、麹菌の *ligD* 遺伝子破壊株でも EMS や MMS に加えて、DSBs を引き起こす抗がん剤としても有名な Phleomycin (PLM) に対する感受性試験も行った。その結果、EMS や PLM では、いずれの濃度においても親株と同等の感受性であった (図 2A)。一方、MMS において低濃度では親株と同程度の感受性を示したが、高濃度では親株よりも高い感受性を示すことが明らかとなった (図 2B)⁷⁾。

ligD 遺伝子破壊株のターゲティング効率を調べるために、菌体外プロテアーゼの発現に関与する転写因子 *prrR* をターゲットとして、*A. oryzae* 由来の *ptrA* 遺伝子マーカの両端に *prrR* ORF の上流および下流 1000 bp の相同領域を連結した DNA 断片を準備し、 $\Delta ligD::sC$ 株を宿主に遺伝子ターゲティングを行った。その結果、親株である NS4 株のターゲティング効率が 8% だったのに対し、 $\Delta ligD::sC$ 株では 96% であった (表 1)。一方、 $\Delta ligD::ptrA$ 株を宿主に、*A. nidulans* 由来の *sC* 遺伝子マーカを用いて同様のコンストラクトで *prrR* 遺伝子のターゲティング効率を調べた結果、親株のターゲティング効率が 28% であったのに対し、 $\Delta ligD::ptrA$ 株では 100% であった (表 2)。また、この株を宿主として、アスパラギン酸プロテアーゼである *pepA* 遺伝子を用いて遺伝子ターゲティングを行った場合においても、その効率は 100% であった。これらの結果から、麹菌 *ligD*

はアカパンカビの *lig4* と同様に NHEJ 経路に関与し、その遺伝子破壊株はターゲティング効率を顕著に上昇させる事が明らかとなった。続いて、*prrR* を用いて相同配列の長さを 500 bp, 100 bp および 50 bp と短くした場合のターゲティング効率を検証した結果、親株でのターゲティング効率は、それぞれ 13%, 0% および 0% であったのに対し、 $\Delta ligD::ptrA$ 株では、500 bp でも 100% であった (表 2)。また、アカパンカビでは、相同配列が 100 bp までのターゲティング効率が 100% であり、50 bp では形質転換体が得られなかったのに対し⁵⁾、麹菌 *ligD* 遺伝子破壊株では相同配列が 100 bp であっても形質転換体がほとんど得られないという違いが観察された⁷⁾。以上の結果から、相同配列の長さが 500 bp 以上である場合において、麹菌 *ligD* 破壊株

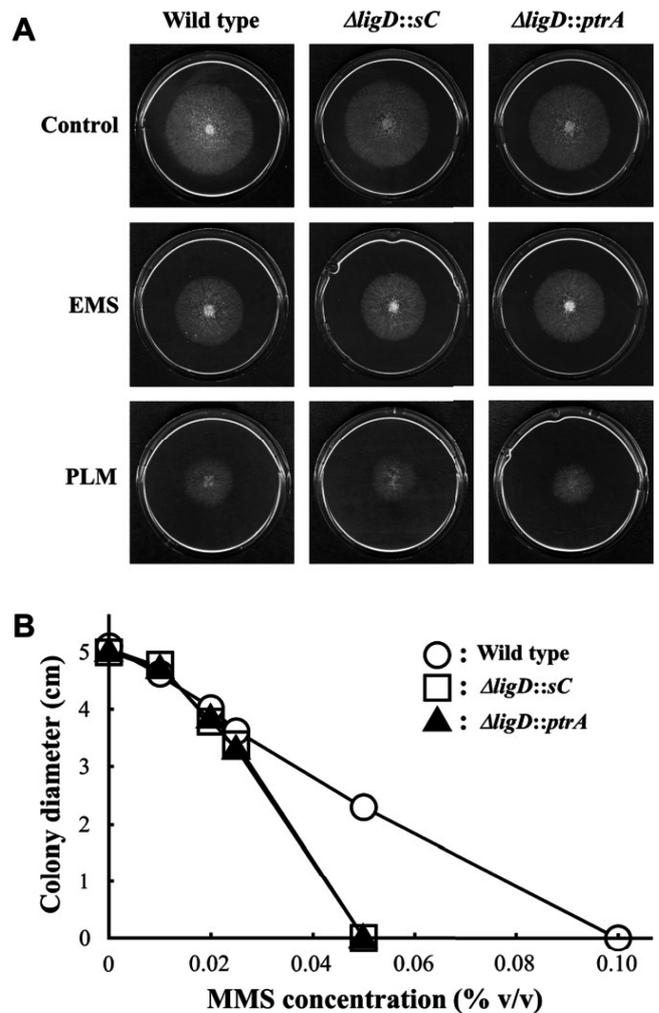


図 2 *ligD* 遺伝子破壊株の表現型
(A) 最少寒天培地、EMS、PLM 入り最少寒天培地における *ligD* 遺伝子破壊株の表現型
(B) MMS 入り最少寒天培地における *ligD* 遺伝子破壊株の生育直径

表 1 $\Delta ligD::sC$ 株の *ptrA* マーカー遺伝子を用いた *prtR* 遺伝子のターゲティング効率

宿主	PCRを行った形質転換体数	相同組換え体数	遺伝子ターゲティング効率(%) ^a
NS4	60	5	8.3
$\Delta ligD::sC$	55	53	96

相同組換えの確認は PCR により行った。

^a 遺伝子ターゲティング効率は、PCR が行われた形質転換体数に対する相同組換え体数の割合で算出した。

表 2 $\Delta ligD::ptrA$ 株の *sC* マーカー遺伝子を用いた *prtR* 遺伝子のターゲティング効率と相同配列の長さにおけるターゲティング効率

宿主	相同領域 (bp)	PCRを行った形質転換体数	相同組換え体数	遺伝子ターゲティング効率(%) ^a
NS4	1,000	50	14	28
	500	52	7	13
	100	50	0	0
	50	65	0	0
$\Delta ligD::ptrA$	1,000	49	49	100
	500	46	46	100
	100	1 ^b	0	0
	50	0 ^b	0	0

相同組換えの確認は PCR により行った。

^a 遺伝子ターゲティング効率は、PCR が行われた形質転換体数に対する相同組換え体数の割合で算出した。

^b 3 回の形質転換実験で得られた合計値を示している ($n=3$)。

は高頻度相同組換え宿主として非常に有用である事が明らかとなり、この破壊株を宿主とすることで麹菌の遺伝子機能解析の発展に寄与できることが期待された。

3. Cre 酵素直接導入法による Cre-*loxP* システムを用いた麹菌のマーカー遺伝子回収

これまで述べてきたように、高頻度相同組換え宿主が開発されたことで、多重遺伝子破壊株や数種の遺伝子を制御できる株の造成が期待されていた。しかしながら、他の *Aspergillus* 属と比較してマーカー遺伝子となり得る候補が少ない麹菌は、マーカー遺伝子のリサイクリング技術が重要な課題の一つと考えられていた。そこで我々は、Cre-*loxP* システムによるマーカー遺伝子の回収技術を構築することを試みた¹²⁾。Cre リコンビナーゼ (Cre) とは、大腸菌を宿主とするバクテリオファージ P1 がコー

ドする部位特異的組換え酵素であり、*loxP* 配列は、8 bp (スペーサー配列) が対称配列の 13 bp (アーム配列) で両端を挟まれた 34 bp からなる Cre の特異的な標的配列である。Cre は、同一 DNA 鎖上に 2 つの *loxP* 配列が同方向にある場合、*loxP* で挟まれた DNA 領域を効率よく環状に切り出して脱落させる事ができる(図 3)。即ち、選択マーカーカセットの両端に *loxP* 配列を同一の向きで配置して染色体上に導入し、細胞内で Cre を作用させることにより、選択マーカーカセットのみを特異的に脱落させることが出来る。

Cre を細胞内で作用させるためには、一般的に Cre 遺伝子の発現カセットを有するプラスミドを作成し、細胞内に導入してプラスミドとして保持させる必要がある。その細胞を Cre 遺伝子の発現誘導条件下に移すことで Cre を細胞内に発現させる。実際に、麹菌近縁種である *Aspergillus fumigatus* や *A. nidulans* でも報告されている^{15, 16)}。しかし

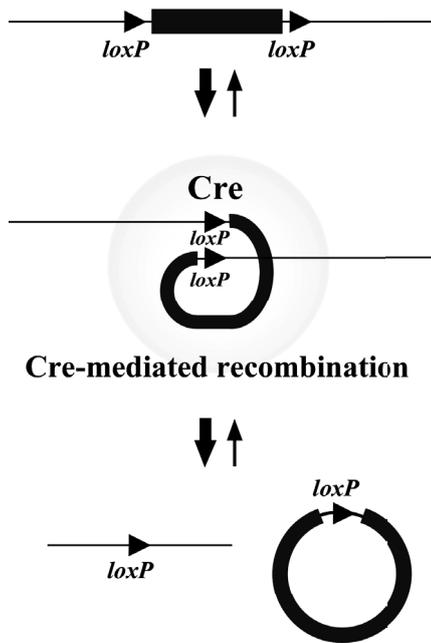


図3 Cre-loxPシステムの概略

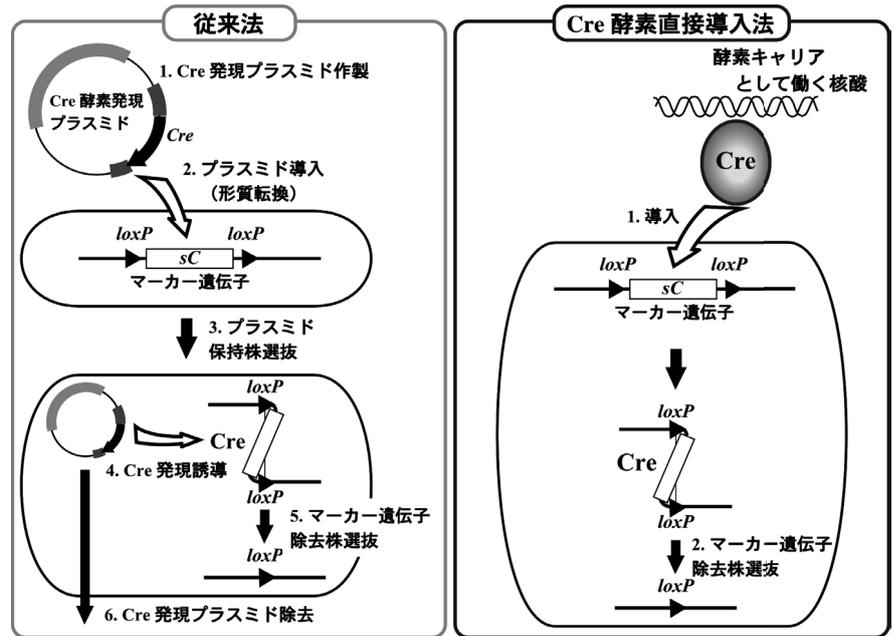


図4 Cre 酵素直接導入法による Cre-loxP システム概念図

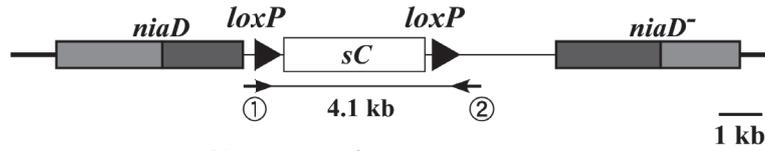
ながら、この手法を用いてマーカー遺伝子を除去するには、図4の左図に示すように、Cre 発現プラスミドの導入、発現誘導、マーカー遺伝子の脱落株の選抜および Cre 発現プラスミドの除去等、非常に多くの煩雑なステップを必要とする。そこで、我々は菌体内に Cre 酵素を直接導入することでマーカー遺伝子の除去が行えるか検討し、核酸を Cre 酵素のキャリアとして利用することで、Cre-loxP システムが機能する事を明らかにした (図4)。

Cre-loxP システムの手順として、まず麹菌細胞を定法に従いプロトプラスト化し、市販の Cre 酵素及び酵素キャリアとなる DNA にポリエチレングリコール (PEG 4,000) と塩化カルシウム溶液を混合してプロトプラスト化した麹菌細胞と混和する。その後の操作は、一般的に麹菌で用いられているプロトプラスト・PEG 法による形質転換法で導入が可能となる。実際の実験では、マーカー遺伝子に ATP sulfurylase をコードする sC 遺伝子を用いて行った。sC 遺伝子は硫酸塩の資化に必要な遺伝子であり、この遺伝子が存在すると、硫酸塩のアナログであるセレン酸に対して感受性となり、硫酸塩を唯一の S 源として生育可能となる。一方、sC 遺伝子が破壊されると、セレン酸に耐性となる。sC 遺伝子カセットの両端に loxP 配列を同方向に配置したフラグメントを搭載したプラスミドを麹菌 NS4

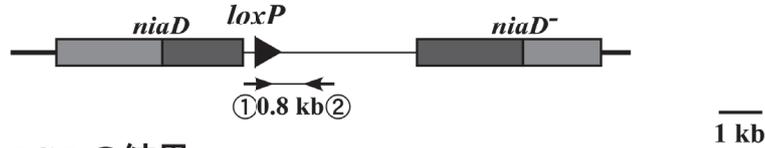
株の *niaD* 遺伝子をターゲットとして遺伝子挿入法にて組込んだ株 (*loxP::sC/NS4* 株) を供試菌株として上述の方法に従い、pUG6 プラスミドを酵素キャリアに用いて Cre 酵素を麹菌細胞へ直接導入した。セレン酸含有培地において生育してきた株において、実際に sC マーカー遺伝子が脱落しているかゲノム PCR 法にて調べた (図5)。PCR のコンストラクトは、sC マーカー遺伝子が抜けてない場合には 4.1 kb の増幅産物が確認され、sC マーカー遺伝子が抜けた場合には 0.8 kb の増幅産物が確認できる (図5A, B)。その結果、コントロールとして Cre 酵素のみを用いた場合、マーカー遺伝子の除去は確認出来なかったが、Cre 酵素と酵素キャリアに pUG6 プラスミドを用いた場合には、マーカー遺伝子の完全な除去が観察された (図5C)。得られた sC マーカー遺伝子除去株を *loxP/NS4* 株と命名した。

以上のように、Cre 酵素と酵素キャリア DNA (ここでは pUG6 プラスミド) を用いて菌体内に Cre 酵素を直接導入することにより、マーカー遺伝子を効率よく除去できることが示唆された。得られた *loxP/NS4* 株の栄養要求性試験を行ったところ、*loxP/NS4* 株は硫酸塩を資化出来なくなっている事が確認された (図6)。これにより、*loxP/NS4* 株で sC マーカー遺伝子が使用出来る事が改めて示された。続いて、*loxP::sC/NS4* 株を宿主に用い、Cre

(A) *sC* marker が抜けない場合



(B) *sC* marker が抜けた場合



(C) PCR の結果

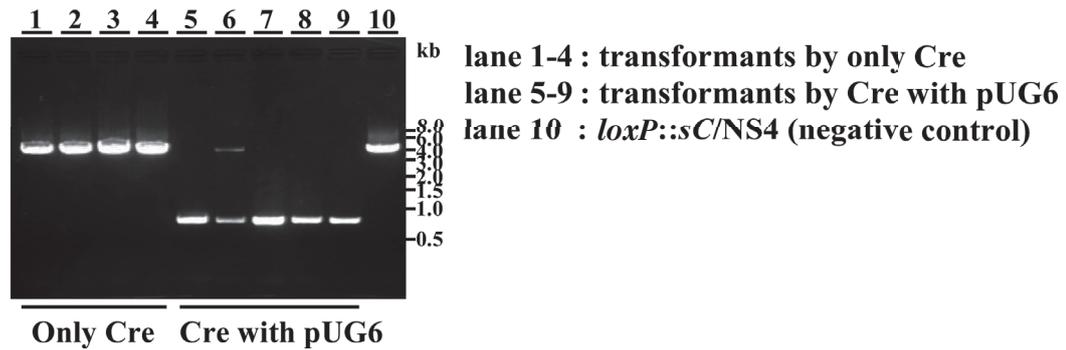


図5 Cre 酵素直接導入法による *sC* マーカー遺伝子の除去

- *loxP/NS4* (*sC*⁻, *niaD*⁺) → SO₄ 資化×, NO₃ 資化○
- *loxP::sC/NS4* (*sC*⁺, *niaD*⁺) → SO₄ 資化○, NO₃ 資化○
- *NS4* (*sC*⁻, *niaD*⁻) → SO₄ 資化×, NO₃ 資化×

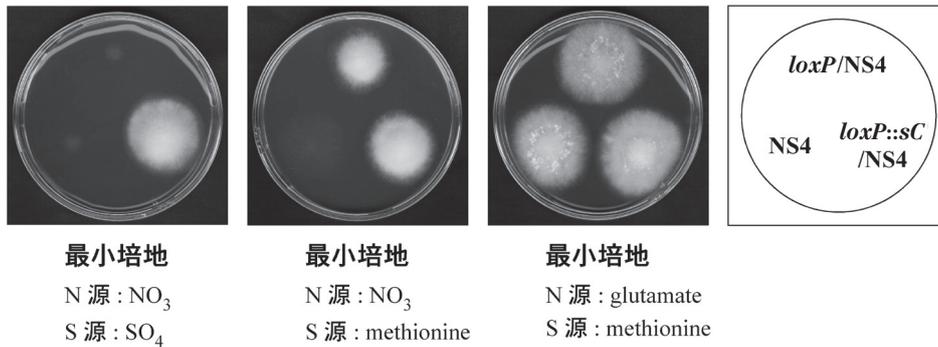


図6 *loxP/NS4* 株の栄養要求性
 10³ 個の分生子をスポット植菌し、30°Cで4日間培養した。

酵素の直接導入時に使用する酵素キャリアの検討を行った。その結果、oligo DNA (34 bp) の様な非常に短い核酸ではキャリアとなり得ないが、一般的なプラスミドやその切断産物および single strand DNA などのある程度の鎖長を持った DNA であれば、いずれも機能することが明らかとなった¹²⁾。このため、酵素キャリアとする DNA をマーカー

遺伝子、今回の場合ならば *sC* 遺伝子とすることで、Cre 酵素の直接導入時に *sC* 遺伝子が非相同で染色体に組み込まれた株を除外することが可能であることが示唆された。

4. Cre 酵素直接導入法による Cre-loxP システムを用いた麹菌のマーカ-遺伝子回収の応用

Cre 酵素直接導入法による Cre-loxP システムを用いたマーカ-遺伝子の回収技術を使って、 $\Delta ligD$ 株から *sC* 遺伝子マーカ-の除去を行った (図 7)。まず、*sC* 遺伝子カセットの両端に *loxP* 配列を同方向に配置したフラグメントの両端に *ligD* 遺伝子破壊に利用した相同領域を連結させた $\Delta ligD::loxPsC$ ターゲティングカセットを用いて、*ptrA* マーカ-遺伝子で *ligD* 遺伝子が破壊された $\Delta ligD::ptrA$ 株を形質転換した。得られた $\Delta ligD::loxPsC$ 株を宿主として Cre 酵素直接導入法による *sC* マーカ-遺伝子の除去を行った (図 7A)。マーカ-遺伝子の除

去株候補のゲノムを取得し、サザン解析を行った結果、候補株全てで目的通り *sC* マーカ-遺伝子が除去されたバンドパターンが観察された (図 7B)。これらの株を $\Delta ligD::loxP$ 株と命名し、栄養要求性試験を行ったところ、 $\Delta ligD::loxP$ 株は *sC* マーカ-遺伝子及び *ptrA* マーカ-遺伝子の両マーカ-遺伝子が除去されているため、S 源として硫酸塩を含む培地とピリチアミン入りの培地では生育できないことが明らかとなり、 $\Delta ligD::loxP$ 株で *sC* マーカ-遺伝子を使用できることが改めて示された (図 7C)。以上のように、Cre 酵素直接導入法を使うことで、マーカ-遺伝子の除去を簡便に行えることを明らかにした¹²⁾。また、この技術を用いて麹菌ゲノム中に存在する 3 種類の Taka-amylase 遺伝子群 (*amyA*, *amyB* および *amyC*) の三重遺伝

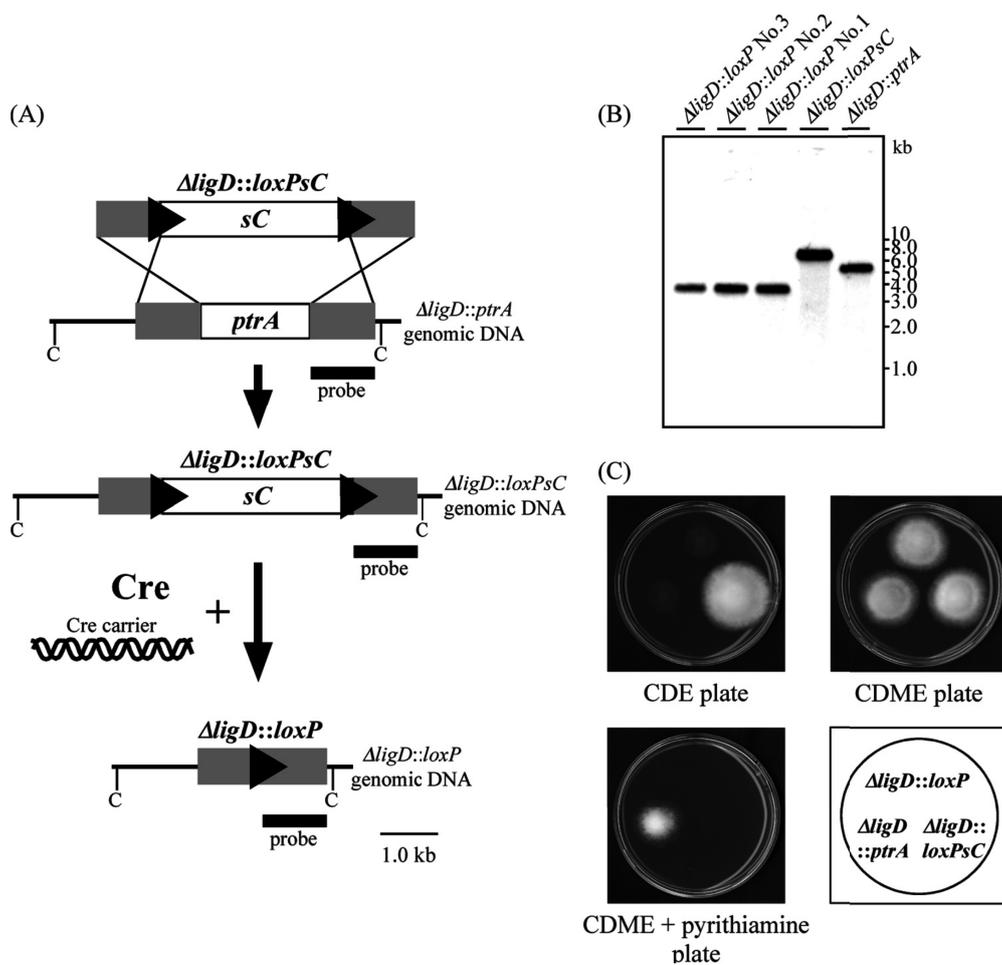


図 7 Cre 酵素直接導入法を用いたマーカ-遺伝子除去による $\Delta ligD::loxP$ 株の造成
 (A) $\Delta ligD::loxP$ 株造成コンストラクト
 (B) $\Delta ligD::loxP$ 株確認サザンプロット解析
 (C) $\Delta ligD::loxP$ 株の栄養要求性

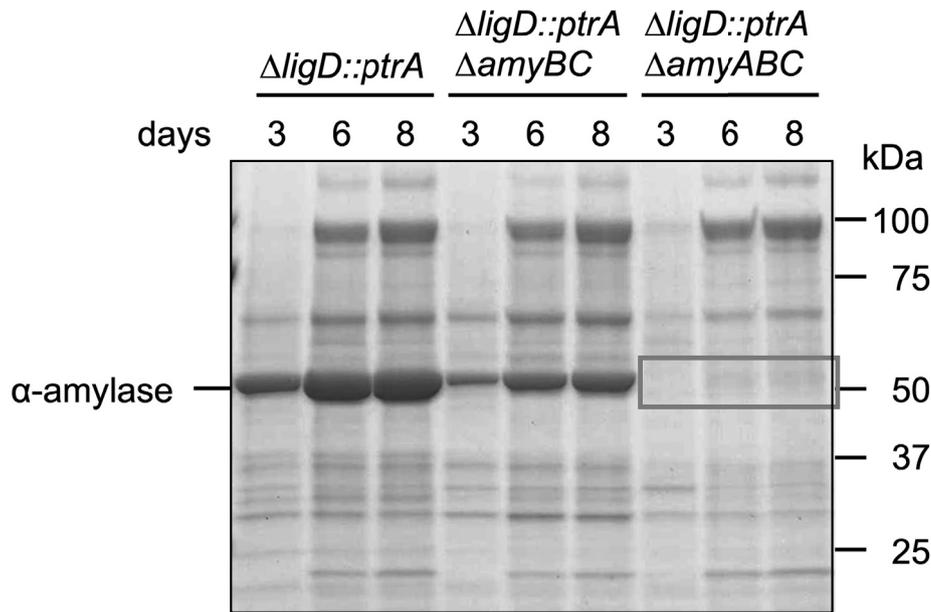


図8 *amyABC* 三重破壊株培養上清の SDS-PAGE

子破壊株 ($\Delta amyABC$) の造成も行い、培養上清中の Taka-*amylase* タンパク質のバンドが消失することを SDS-PAGE 上で確認した (図8)。この $\Delta amyABC$ 株は、麹菌で最も高発現している酵素タンパク質の一つを欠失していたことから、異種タンパク質生産の宿主としてはもちろんのこと、小胞体ストレス応答を調べるための宿主株等として利用されている¹⁷⁾。

5. おわりに

現在、麹菌を含む多くの糸状菌研究者が、遺伝子ターゲティングの宿主に *ku* 遺伝子や *ligD* 遺伝子の破壊株を使用して未知遺伝子の機能解析に取り組んでいる。アカパンカビでは、遺伝子ターゲティング効率の上昇株を宿主に用い、酵母と同様に全遺伝子破壊株のライブラリーが構築され、The Fungal Genetics Stock Center (<http://www.fgsc.net/scripts/StrainSearchForm.asp>) より頒布されている。日本においても、野田産業研究所を中心に各種転写因子の遺伝子を中心とした麹菌の破壊株ライブラリーが構築されている¹⁸⁾。

Cre-*loxP* システムを用いる際、多重遺伝子導入時に障害となる *loxP* 配列の染色体上への蓄積が課題となっている。しかしながら、共同研究者の張らは、片側のアーム配列に変異を導入した *loxP* セット (*lox66*, *lox71*) を用い、Cre 反応後の *loxP* 配

列が Cre に認識されない非変異型 *lox72* を生成させることで、*loxP* 配列の蓄積を回避する方法を開発した¹⁹⁾。これにより、同一染色体上の隣接した部位において新たに Cre 認識型変異 *loxP* 配列を導入しても、狙った領域のみで Cre 反応を引き起こすことが可能となっている。今後は、他の菌が保有する大規模な二次代謝産物クラスターの導入などにも応用が期待されている。

以上のように、麹菌の遺伝子組換え技術は、様々な課題があったものの着実に進展してきている。その中でも、井上らによる *ku* 遺伝子や *ligD* 遺伝子破壊による相同組換え率の劇的な改善という技術的課題の大きなブレークスルーが日本から発信されたことは、わが国の麹菌および糸状菌研究の発展にとって非常に誇らしい功績であるといえる。今後は、泡盛醸造で使用されている沖縄を代表する黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) を中心に、分子生物学の進展に寄与できればと考えている。

引用文献

- 1) Ichishima, E. Unique catalytic and molecular properties of hydrolases from *Aspergillus* used in Japanese bioindustries. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64: 675-688 (2000)
- 2) Gomi, K., Y. Iimura, S. Hara. Integrative transformation of *Aspergillus oryzae* with a

- plasmid containing the *Aspergillus nidulans* *argB* gene. *Agric. Biol. Chem.*, 51: 2549-2555 (1987)
- 3) Machida, M., K. Asai, M. Sano, T. Tanaka, T. Kumagai, G. Terai, K., Kusumoto, T. Arima, O. Akita, Y. Kashiwagi, K. Abe, K. Gomi, H. Horiuchi, K. Kitamoto, T. Kobayashi, M. Takeuchi, D. W. Denning, J. E. Galagan, W. C. Nierman, J. Yu, D. B. Archer, J. W. Bennett, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, N. D. Fedorova, O. Gotoh, H. Horikawa, A. Hosoyama, M. Ichinomiya, R. Igarashi, K. Iwashita, P. R. Juvvadi, M. Kato, Y. Kato, T. Kin, A. Kokubun, H. Maeda, N. Maeyama, J. Maruyama, H. Nagasaki, T. Nakajima, K. Oda, K. Okada, I. Paulsen, K. Sakamoto, T. Sawano, M. Takahashi, K. Takase, Y. Terabayashi, J. R. Wortman, O. Yamada, Y. Yamagata, H. Anazawa, Y. Hata, Y. Koide, T. Komori, Y. Koyama, T. Minetoki, S. Suharnan, A. Tanaka, K. Isono, S. Kuhara, N. Ogasawara, H. Kikuchi. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438: 1157-1161 (2005)
 - 4) Ninomiya, Y., K. Suzuki, C. Ishii, H. Inoue. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 101: 12248-12253 (2004)
 - 5) Ishibashi, K., K. Suzuki, Y. Ando, C. Takakura, H. Inoue. Nonhomologous chromosomal integration of foreign DNA is completely dependent on MUS-53 (human Lig4 homolog) in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103: 14871-14876 (2006)
 - 6) Krappmann, S., C. Sasse, G. H. Braus. Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end-joining-deficient genetic background. *Eukaryot. Cell*, 5: 212-215 (2006)
 - 7) Mizutani, O., Y. Kudo, A. Saito, T. Matsuura, H. Inoue, K. Abe, K. Gomi. A defect of LigD (human Lig4 homolog) for nonhomologous end joining significantly improves efficiency of gene-targeting in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, 45: 878-889 (2008)
 - 8) de Boer, P., J. Bastiaans, H. Touw, R. Kerkman, J. Bronkhof, M. van den Berg, R. Offringa. Highly efficient gene targeting in *Penicillium chrysogenum* using the bi-partite approach in $\Delta lig4$ or $\Delta ku70$ mutants. *Fungal Genet. Biol.*, 47: 839-846 (2010)
 - 9) Takahashi, T., O. Mizutani, Y. Shiraishi, O. Yamada. Development of an efficient gene-targeting system in *Aspergillus luchuensis* by deletion of the non-homologous end joining system. *J. Biosci. Bioeng.*, 112: 529-534 (2011)
 - 10) Schneider, BL., B. Steiner, W. Seufert, AB. Futcher. pMPY-ZAP: a reusable polymerase chain reaction-directed gene disruption cassette for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12: 129-134 (1996)
 - 11) Kadooka, C., S. Onitsuka, M. Uzawa, S. Tashiro, Y. Kajiwara, H. Takashita, K. Okutsu, Y. Yoshizaki, K. Takamine, M. Goto, H. Tamaki, T. Futagami. Marker recycling system using the *sC* gene in the white koji mold, *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 62: 160-163 (2016)
 - 12) Mizutani, O., K. Masaki, K. Gomi, H. Iefuji. Modified Cre-*loxP* recombination in *Aspergillus oryzae* by direct introduction of Cre recombinase for marker gene rescue. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 4126-4133 (2012)
 - 13) Jeggo, PA. Studies on mammalian mutants defective in rejoining double-strand breaks in DNA. *Mutat. Res.*, 239: 1-16 (1990)
 - 14) Yamada, O., BR. Lee, K. Gomi. Transformation system for *Aspergillus oryzae* with double auxotrophic mutations, *niaD* and *sC*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61: 1367-1369 (1997)
 - 15) Krappmann, S., O. Bayram, GH. Braus. Deletion and allelic exchange of the *Aspergillus fumigatus* *veA* locus via a novel recyclable marker module. *Eukaryot. Cell*, 4: 1298-1307 (2005)
 - 16) Forment, JV, D. Ramón, AP. MacCabe. Consecutive gene deletions in *Aspergillus nidulans*: application of the Cre/*loxP* system. *Curr. Genet.*, 50: 217-224 (2006)

- 17) Yokota, JI., D. Shiro, M. Tanaka, Y. Onozaki, O. Mizutani, D. Kakizono, S. Ichinose, T. Shintani, K. Gomi, T. Shintani. Cellular responses to the expression of unstable secretory proteins in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101: 2437-2446 (2017)
- 18) Ogawa, M., M. Tokuoka, FJ. Jin, T. Takahashi, Y. Koyama. Genetic analysis of conidiation regulatory pathways in *koji*-mold *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, 47: 10-18 (2010)
- 19) Zhang, S., A. Ban, N. Ebara, O. Mizutani, M. Tanaka, T. Shintani, K. Gomi. Self-excising Cre/mutant *lox* marker recycling system for multiple gene integrations and consecutive gene deletions in *Aspergillus oryzae*. *J. Biosci. Bioeng.*, 123: 403-411 (2017)