

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 14 年度博士課程進学

氏 名 金 鋒杰

指導教員名 北本 勝ひこ

論文題目

麹菌 *Aspergillus oryzae* による異種タンパク質高生産に関する研究

麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本で清酒、味噌、醤油などの伝統的な醸造に古くから利用されており、また α -アミラーゼなどの酵素生産にも用いられている。さらに、タンパク質を大量に分泌する能力を有することや長年食品製造に使用されてきた安全な微生物であるとの認識から、異種タンパク質生産の宿主としても注目されている。

A. oryzae は有性生活環をもたない、分生子が多核であるなどの理由から、その高い有用性にもかかわらず古典遺伝学的な基礎研究の対象としてはほとんど用いられて来なかったが、1987年に *A. oryzae* の形質転換系が開発されて以来、遺伝子レベルでの研究が飛躍的に進展した。さらに最近、*A. oryzae* のゲノムプロジェクトがほぼ完了し、あらゆる遺伝子を操作することによる育種が可能となっている。しかし、これまでの *A. oryzae* の宿主・ベクター系において、2重栄養要求性を用いた最大2ステップの遺伝子操作しか行えず、より多種類の遺伝子を導入あるいは破壊する手法の開発が望まれていた。また、生産量増強のための高発現プロモーターの開発は精力的に行われ

てきたものの、異種タンパク質分解に関与すると考えられるプロテアーゼ遺伝子の破壊に関する報告は全くなかった。また、今後の分子生物学的研究の発展により操作する遺伝子の数が増加すると予想されることから、より多くのマーカーをもつ宿主・ベクター系の構築が必要であると考えられる。

本研究では、*A. oryzae* の新たな 4 重栄養要求性宿主・ベクター系を開発し、これを用いて各種プロテアーゼ遺伝子を破壊することにより、異種タンパク質ヒトリゾチームの高生産を試みた。

1. *A. oryzae* の新規 4 重栄養要求性宿主・ベクター系の構築

酵母などでアデニン要求性株のコロニーが赤色を呈することが知られている。この知見を利用して、2 重栄養要求性を持つ *A. oryzae* NS4 株 (*niaD⁻ sC*) より 4 重栄養要求性株の育種を行った。

NS4 株の分生子を UV 処理したのち、生育した約 4 万のコロニーから赤色のものを選択することにより、12 株のアデニン栄養要求性変異株を取得した。一方で、*A. oryzae* ゲノム情報を用いて、アデニン生合成に関与する遺伝子を検索し、*adeA*、*adeB* 遺伝子 (*Saccharomyces cerevisiae* *ADE1*、*ADE2* ホモログ) をクローニングした。これらのどちらか一方を導入することで、すべての変異株のアデニン要求性が相補され、コロニーが赤色を呈さなくなったことから、取得した株が *adeA* あるいは *adeB* 変異株であることが示唆された。実際、相補した遺伝子を該当するアデニン要求性株のゲノムから変異遺伝子をクローニングして DNA シークエンスを行った結果、一塩基変異または欠失が起こっていることを確認した。これにより、NS4 株にアデニン要求性が付与された 3 重栄養要求性株の取得が確認された。

次に、3 重栄養要求性 NSR13 株 (*niaD⁻ sC adeA*) を用いて、4 重栄養要求性株の取得を試みた。Fusion PCR 法により *adeA* 遺伝子をマーカーとして *argB* 遺伝子破壊 DNA 断片を作製した。これを NSR13 株に形質転換することによりアルギニン要求性を付加した NSA1 株 (*niaD⁻ sC ΔargB*) を取得した。続いて、NSA1 株の分生子を UV 処理したのち赤いコロニーを選択することにより、アデニン要求性を再度付与した 4 重栄養要求性 NSAR1 株 (*niaD⁻ sC ΔargB adeA*) を取得した。この株は各マーカー (*niaD*, *sC*, *argB*, *adeA*) をそれぞれ有するプラスミドにより形質転換されたことから、*A. oryzae* において新規の 4 重栄養要求性宿主・ベクター系の構築に成功した。

2. *A. oryzae* の 4 重栄養要求性株を用いたヒトリゾチーム生産株の育種

A. oryzae を用いた異種タンパク質生産において、宿主の分泌タンパク質であるグルコアミラーゼ (GlaA) との融合タンパク質として発現することにより、生産量が上昇することがこれまでに報告されている。しかし他の分泌タンパク質をキャリアーに用いることは検討されていない。 α -アミラーゼは *A. oryzae* により最も大量に分泌されるタンパク質であることから、これをキャリアーに用い、異種タンパク質のモデルとしてヒトリゾチームの生産を試みた。 α -アミラーゼ (*amyB*) プロモーターおよび ORF の下流にヒトリゾチーム遺伝子をタンデムに 2 コピー連結したコンストラクトを MultiSite GatewayTM システムを用いて作製し、それぞれの連結部位には Kex2 切断配列を挿入した。この発現プラスミドを *Aspergillus nidulans* *sC* 遺伝子をマーカーとして 4 重栄養要求性 NSAR1 株に形質転換した。取得した株の培養上清に対してウエスタン解析を行った結果、予想された分子量のヒトリゾチームが検出された。このことから、ヒトリゾチームは Kex2 切断配列でプロセッシングされたのち、培地に分泌されたことが示唆された。以降の実験には、生産量が最も高い NAR-2L-7 株を用いた。この株について至適生産条件を検討した結果、アルカリ条件下 (pH 8.0)、5 倍に濃縮した DPY 液体培地 (5×DPY) で最大約 11 mg/l のリゾチーム生産量を示した。

3. プロテアーゼ遺伝子破壊によるヒトリゾチーム生産量の増加

リゾチーム生産株 NAR-2L-7 株を親株として、異種タンパク質の分解に関与する可能性のあるプロテアーゼについて遺伝子破壊株を系統的に作製した。菌体外酸性プロテアーゼ (*pepA*)、液胞内酸性プロテアーゼ (*pepE*)、トリペプチジルペプチダーゼ (*tppA*)、菌体外アルカリプロテアーゼ (*alpA*)、およびカルパイン様プロテアーゼ (*palB*) の 5 種の遺伝子について、Fusion PCR 法または MultiSite GatewayTM システムを用いて破壊用 DNA 断片を作製した。これらの断片を *adeA* マーカーによって NAR-2L-7 株に形質転換し、目的の遺伝子破壊株を取得した。遺伝子破壊によるプロテアーゼ活性の変化を検討するために、スキムミルク入りの寒天培地においてハローアッセイを行った。その結果、いずれの pH においても $\Delta alpA$ 株のプロテアーゼ活性が減少したが、他の破壊株においては顕著な変化は見られなかった。

プロテアーゼ遺伝子破壊株のヒトリゾチーム生産量を 5×DPY (pH 8.0) 液体培地で比較したところ、 $\Delta tppA > \Delta palB > \Delta pepE > \Delta alpA$ 株の順に生産量の増加が認

められた。このうち、 $\Delta tppA$ 株では生産量が約 17 mg/l まで上昇した。さらに、プロテアーゼ遺伝子を 2 重に破壊することによる異種タンパク質生産への効果を検討することを目的として、 $\Delta palB$ 、 $\Delta pepE$ 、 $\Delta alpA$ 株において $tppA$ 遺伝子を $argB$ マーカーにより破壊した。現在、これらのプロテアーゼ遺伝子 2 重破壊株のヒトリゾチーム活性及びプロテアーゼ活性について検討している。

まとめ

本研究では、*A. oryzae* において初めて 4 重栄養要求性宿主・ベクター系を開発し、最大 4 ステップの遺伝子操作を可能にした。また、赤いコロニーを形成するアデニン要求性株の選択と $adeA$ 遺伝子をマーカーとした遺伝子破壊を繰り返し、栄養要求性を増やすことに成功した。この手法はアデニン要求性株を繰り返し取得することで原理的には何回も ade 遺伝子を持つベクターでの形質転換が可能であり、交雑が困難で、かつ宿主・ベクター系が整備されていない他の有用糸状菌での効率的な育種に役立つと期待される。

さらに、ヒトリゾチーム生産株においてプロテアーゼ遺伝子破壊により、生産量が最大約 1.5 倍に増加した。これは、*A. oryzae* においてプロテアーゼ遺伝子破壊によって高等生物由来タンパク質の生産量が上昇した初めての例である。以前に報告された *A. oryzae* によるヒトリゾチーム生産量 (1.2 mg/l) と比較すると約 14 倍増加したことから、融合タンパク質としての発現とプロテアーゼ遺伝子破壊の有効性を示すことができた。今後、複数のプロテアーゼ遺伝子破壊、および分泌関連遺伝子の操作をすることにより、*A. oryzae* が様々な有用タンパク質生産のためのセルフファクトリーとして活躍することが期待される。

1. Jin, F.J., Maruyama, J., Juvvadi, P.R., Arioka, M. and Kitamoto, K. (2004) Adenine auxotrophic mutants of *Aspergillus oryzae*: Development of a novel transformation system with triple auxotrophic hosts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 656-662.
2. Jin, F.J., Maruyama, J., Juvvadi, P.R., Arioka, M. and Kitamoto, K. (2004) Development of a novel quadruple auxotrophic host transformation system by $argB$ gene disruption using $adeA$ gene and exploiting adenine auxotrophy in *A. oryzae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 239, 79-85.