

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金 鋒杰

麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本で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。加えて、*A. oryzae* のゲノムプロジェクトが最近完了し、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。本論文は、*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ものであり、序章、第一章、第二章、第三章、および総括と展望からなる。

まず、序論において研究の目的を概説した後、第一章では *A. oryzae* の新規 4 重栄養要求性宿主・ベクター系の構築について述べている。一般にアデニン要求性株のコロニーは赤色を呈することから、2 重栄養要求性を持つ *A. oryzae* NS4 株(*niaD⁻ sC*)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 *adeA*、*adeB* 遺伝子 (出芽酵母 *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上記アデニン要求性変異株に導入したところ、すべての変異株のアデニン要求性が相補され、取得した株が *adeA* あるいは *adeB* 変異株であること、すなわち 3 重栄養要求性株であることが確認された。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。*adeA* 遺伝子を *argB* 遺伝子内部に挿入した *argB* 破壊用 DNA 断片で NSR13 株を形質転換し、アルギニン要求性を付加した NSA1 株(*niaD⁻ sC Δ argB*)を取得した。続いて、NSA1 株の分生子を UV 処理して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 Δ argB 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。

第二章では、第一章で取得した 4 重栄養要求性株を宿主に、また α -アミラーゼをキャリアーに用い、ヒトリゾチーム生産株の育種を試みた。 α -アミラーゼ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 コピー連結した発現プラスミドを作製した。それぞれの連結部位には Kex2 切断配列を挿入した。このプラスミドを NSAR1 株に形質転換し、その培養上清に対してウエスタン解析を行った。その結果、予想された分子量のヒトリゾチームが検出された。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 (pH8.0)、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。

第三章では 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、ヒトリゾチーム生産量の増加を試みた。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、*adeA* マーカーを用いて遺伝子破壊株を取得した。これらの株における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 にまで上昇した。さらに、プロテアーゼ遺伝子を 2 重に破壊することの効果についても検討を行った。

以上、著者は *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。さらに、これを用いてプロテアーゼ遺伝子を欠損したヒトリゾチーム生産株の育種を行い、野性株に比べ生産量が増加することを示した。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。同様の手法は他の異種タンパク質生産にも適用可能であることから、本論文で得られた知見は学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。