

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高橋 理

麹菌は相同組換え頻度が低く、また分生子の期間を含めて常に多核の状態を保持するため、遺伝子破壊株を取得するのに労力がかかる。本論文は、麹菌を用いた相同組換えによる遺伝子破壊法について研究を行い、効率的な遺伝子破壊法の確立を試みたものである。

第1部では麹菌 *Aspergillus sojae aflR* のアフラトキシン生合成クラスター活性化能の検定を行った。アフラトキシンの前駆体である VERA を蓄積する *A. parasiticus* CS-10N2 (*niaD pyrG ver1*) を親株として *niaD* をマーカーとした遺伝子 targeting により *aflR* 破壊株 CS10-N2 $\Delta aflR$ を作製した。この株に *A. sojae* の *aflR*、*A. parasiticus* の *aflR*、*A. sojae* と *A. parasiticus* 間で C 末端部分を入れ換えた *aflR* 等を導入した結果、*A. sojae aflR* を導入した場合には全く VERA の蓄積が見られず、アフラトキシン生合成クラスターが活性化されないこと、またその原因が *A. sojae aflR* の C 末端部分における pre-termination による不活化であることが判明した。

第2部第1章では Positive-Negative 法を用いた *A. sojae* の遺伝子破壊法の確立を試みた。まず、*A. nidulans* 由来のオリゴマイシン耐性遺伝子 *oliC31* (mitochondrial ATPase subunit 9) が麹菌においても triethyltin 感受性マーカーとして使用できることを見出した。次に *pyrG* を positive セレクションマーカーとし、*oliC31* を negative セレクションマーカーとして相同領域の外側に配置した targeting ベクターを作製し、*A. sojae* $\Delta pyrG$ 株を親株として positive-negative 法を用いた遺伝子破壊実験を行った。*niaD*、*areA*、*aflR* に対する遺伝子 targeting 頻度の測定を行った結果、positive-negative セレクションにより 3~4 倍程度の相同組換え体の濃縮効果があることが判明した。

第2章では麹菌 *ku70* および *ku80* の同定および破壊株の作製と解析を行った。まずデータベース検索により麹菌 *ku70* および *ku80* を同定した。続いて *A. sojae* $\Delta pyrG$ 株を親株とし、*pyrG* をマーカーとして *ku70* 破壊株 (*ku70::pyrG*) および *ku80* 破壊株 (*ku80::pyrG*) を作製した。また得られた *ku70* 破壊株中の *ku80* を *ptrA* をマーカーとして破壊し、*ku70-ku80* 二重破壊株 (*ku70::pyrG, ku80::ptrA*) を作製した。同様に *A. oryzae ku70* 破壊株 (*ku70::pyrG*) も作製した。得られた *ku* 破壊株の生育、胞子着生、温度感受性、メチルメタンスルホン酸、ヒドロキシウレア、ブレオマイシンに対する感受性を調べたところ、親株と比較して大き

な差が見られないことが判明した。

第3章では *ku* 破壊株における遺伝子 targeting 頻度について検討した。*A. sojae ku70* 破壊株の *ku70::pyrG* を *ku70::ptrA* で置き換えた株を作製し、*tannase* および *aflR* に対する targeting 頻度を親株と比較した。その結果、親株では targeting 頻度が 1~2%程度であったが、*ku70* 破壊株では 70~80%程度まで上昇することが判明した。*ku80* 破壊株でも同様であった。続いて *pyrG* が分子内組換えにより切り出されるように重複領域を設けた *ku80* 破壊ベクターを作製し、*A. sojae ku70* 破壊株 (*ku70::ptrA*) の *ku80* を破壊した後、5FOA 耐性により *ku80* 部分の *pyrG* を切り出して *ku70-ku80* 二重破壊株 (*ku70::ptrA ku80Δ*) を作製した。この株を使用して targeting 頻度を測定したところ、*ku70* あるいは *ku80* 破壊株同様、親株と比較して顕著な targeting 頻度の上昇が見られた。また *A. oryzae ku70* 破壊株 (*ku70::ptrA*) も同様に作製し、targeting 頻度を親株と比較したところ、顕著な上昇が見られた。

以上、本研究は、実用菌である麹菌においても positive-negative 法を用いることにより ectopic な組込み株ではなく、遺伝子 targeting された株を効率よく取得できること、また非相同組換えに関与する遺伝子である *ku70* または *ku80* を破壊または抑制することにより、相同組換え頻度が顕著に上昇し、効率的な遺伝子 targeting を行う為の宿主となることを示したものであり、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。