

こうじ菌の遺伝子組換え技術

こうじ菌 (*Aspergillus oryzae*) は古くから醤油や酒類などの醸造食品の製造に使用されており、こうじ菌菌体とその生産物の安全性が極めて高いことから、GRAS (Generally Regarded As Safe) のリストに掲載されている。また、こうじ菌は菌体外に多量の酵素タンパク質を分泌生産する能力を備え、こうじ菌の培養技術に関する知識の蓄積もあることなどから、異種有用タンパク質生産の宿主としてこうじ菌を利用することが期待され、実際に異種有用タンパク質の分泌高生産が行われている。こうじ菌において遺伝子操作を行う際には、外来 DNA を細胞内に導入することが不可欠であるため、こうじ菌の形質転換法及び関連する応用技術について紹介する。

1. 形質転換法

こうじ菌の形質転換は、一般に菌糸から細胞壁溶解酵素で調製したプロトプラストにポリエチレングリコール存在下で DNA を細胞内に取込ませ、導入された DNA を染色体に組み込ませることにより行われる。形質転換株 (外来 DNA 導入株) の選択には、*argB*、*pyrG*、*niaD*、*amdS*、*sC* などの遺伝子が利用されている。導入される DNA は染色体の任意の部位に組み込まれ (非相同的組換え)、組み込まれる遺伝子のコピー数や部位は形質転換株により異なる。糸状菌の形質転換効率は低い、外来遺伝子はすべて染色体上に組み込まれて安定に保持されるため、有用タンパク質の安定生産を期待することができる。

2. 遺伝子破壊法

こうじ菌遺伝子の機能解明や実用菌株の育種で望ましくない性質に関わる遺伝子を特異的に破壊するために、染色体上の標的部位への相同的組換えによる遺伝子破壊法が利用されている。こうじ菌では相同的組換え頻度が低い、ため遺伝子破壊株の取得が困難であり、こうじ菌での遺伝子破壊の実施例はまだ少ない。遺伝子破壊の方法としては図に示すような2つの方法が行われている。遺伝子挿入破壊法 (図 1 A) では染色体上に2コピーの N 末端領域または C 末端領域が欠けた不完全な遺伝子が生じるが、C 末端領域の欠失状態によっては機能が完全に失われない可能性

がある。標的遺伝子を完全に破壊することができる遺伝子置換法 (図 1 B) が遺伝子破壊に適した方法として考えられるが、二重交叉によって遺伝子置換が起きるため組換え頻度がかなり低い。現在、簡便で高効率な遺伝子破壊株作製技術の開発が要望されている。

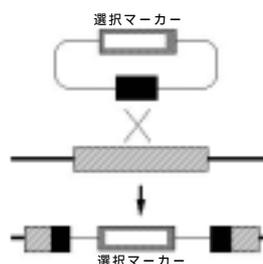
3. 異種タンパク質の分泌生産

各種カビ由来有用酵素のこうじ菌による分泌高生産は、タカアミラーゼ A 遺伝子プロモーターなどの強力なプロモーターを用いて行われている。*Rhizomucor meihei* 酸性プロテアーゼ、*Humicola lanuginosa* リパーゼ、*Trametes villosa* ラッカーゼなどは工業的に生産され、チーズ製造に用いられる仔ウシ・キモシンの代替酵素、洗剤用酵素、ブルーデニム漂白用酵素として実際に利用されている。こうじ菌を用いて異種有用タンパク質を高生産させるためには、こうじ菌の強力なプロモーターを用いて目的遺伝子を高発現させ、効率よく菌体外に分泌させ、そしてこうじ菌プロテアーゼによる分解を最小限に抑えることが必要となってくる。異種有用タンパク質の効率的生産に向けて、より適したこうじ菌の検索・造成やより優れた発現ベクターの構築などが、現在も行われている。

4. おわりに

こうじ菌ゲノムプロジェクトが現在進行中であり、数年以内にゲノムの全塩基配列が明らかになると考えられる。こうじ菌ゲノム情報を基盤とした遺伝子発現制御機構やタンパク質分泌機構の解明が行われ、こうじ菌の特長を生かしたより素晴らしい異種有用タンパク質生産システムが開発されるものと考えられる。(基盤技術部 北本則行)

A 遺伝子挿入破壊



B 遺伝子置換破壊

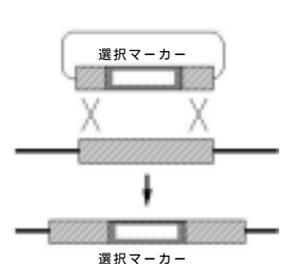


図 1 遺伝子破壊法