

タカアミラーゼA高生産麹菌の形質転換系の開発

北本則行^{*1}、松井淳子^{*2}、安田庄子^{*2}

Development of the Transformation System for a High-Taka-amylase A-producing *Aspergillus oryzae*

Noriyuki KITAMOTO, Junko MATSUI and Shoko YASUDA

Food Research Center, AITEC^{*1*2}

醤油麹菌 *Aspergillus oryzae* KBN616 株の約 20 倍のアミラーゼ活性を有する麹菌 *A. oryzae* KBN6217 株を取得することができた。本菌は 2 個のアミラーゼ遺伝子を保有し、その遺伝子構造は既知の麹菌アミラーゼ遺伝子と一致していた。本菌の 5-FOA 耐性株の中よりウラシル要求性を示す *pyrG*⁻ 株を分離することができた。得られた *pyrG*⁻ 株は約 50 形質転換体/μg プラスミド DNA の効率で *pyrG* 遺伝子により形質転換することができた。また、ピリチアミン耐性遺伝子を選択マーカーとしても形質転換することができた。

1. はじめに

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いる麹菌(*Aspergillus oryzae*)は、極めて安全性が高いうえに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ていることなどから、異種有用タンパク質生産の微生物宿主として期待されている。非常に優れたタンパク質分泌能力を持つ麹菌と遺伝子の転写量を増加させる強力な麹菌遺伝子プロモーターとを組み合わせて用いれば、異種有用タンパク質の効率的な分泌生産が可能となる。そこで、タカアミラーゼA高生産麹菌を宿主とするエコザイム効率的生産システムの確立を最終的に目指して、形質転換系の開発を行った。

2. 実験方法

2.1 使用菌株

A. oryzae KBN616 株、*A. oryzae* KBN930 株、*A. oryzae* KBN1010 株、*A. oryzae* KBN1015 株、*A. oryzae* KBN6217 株、*A. oryzae* KBN6319 株及び *A. oryzae* JCM2239 株の7株の麹菌をアミラーゼ高生産株の選択に用いた。一般的な遺伝子操作には *E. coli* DH5 株を用いた。

2.2 アミラーゼ活性測定方法

アミラーゼ活性は、Saito の方法¹⁾にしたがって可溶性デンプンを基質に用いて測定した。

2.3 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

Laemmli の方法²⁾にしたがい 12.5%ゲル濃度で SDS-PAGE を行った。電気泳動後、タンパク質を CBB 染色によって検出した。

2.4 *A. oryzae* の染色体 DNA 調製方法

染色体 DNA は Raeder らの方法³⁾にしたがって、凍結乾燥後粉碎した菌体より調製した。

2.5 *A. oryzae* の形質転換方法

形質転換用培地で培養して得られた *A. oryzae* の菌体を Novozyme234 でプロトプラスト化した後、PEG 存在下でプラスミド DNA を取り込ませて形質転換を行った。

2.6 サザンプロット解析

種々の制限酵素で消化した *A. oryzae* の染色体 DNA を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供した後、AlkPhos Direct System (Amersham Biosciences)を用いてハイブリダイゼーション及びシグナルの検出を行った。

3. 実験結果及び考察

3.1 タカアミラーゼA高生産麹菌の検索

実験方法に記述した7株の麹菌の液体培養時のアミラーゼ活性を測定した結果、*A. oryzae* KBN6217 株が *A. oryzae* KBN616 株の約 20 倍のアミラーゼ活性を有していることが判った(表1)。これら7株の麹菌の培養液中のタンパク質を SDS-PAGE で解析したところ、タカアミラーゼA及びグルコアミラーゼと考えられるタンパク質が認められた。また、そのタンパク質量は、アミラーゼ活性に比例して増加していた(図1)。

麹菌は菌株により異なるが、2~3種類のタカアミラーゼA遺伝子を保有しており、小さいながら一種のファミリーを形成している⁴⁾。サザンプロット解析の結果及び PCR 反応によるタカアミラーゼA遺伝子の増幅の結果から *A. oryzae* KBN6217 株には *taaGI* 遺伝子及び

*1 食品工業技術センター 応用技術室 *2 食品工業技術センター 加工技術室

表1 *A. oryzae* のアミラーゼ活性の比較

Strain	Amylase Activity (U/ml)
KBN6217	26,800 (21.1)
KBN6319	11,999 (8.7)
KBN1010	9,380 (7.4)
KBN930	4,940 (3.9)
KBN1015	5,050 (4.0)
JCM2239	2,750 (2.2)
KBN616	1,270 (1.0)

SP 培地 (2%可溶性デンプン) で 30、4 日間振盪培養

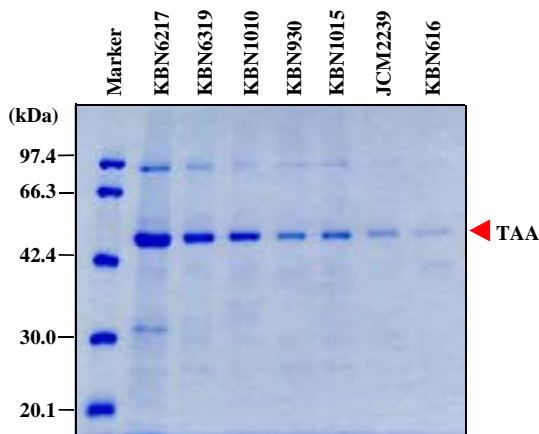


図1 培養上清の SDS-PAGE 解析

taaG3 遺伝子の 2 個のタカアミラーゼ A 遺伝子が存在していた (データ省略)。この 2 個のタカアミラーゼ A 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を比較した結果、他の麹菌のタカアミラーゼ A 遺伝子プロモーターと同様に *taaG1* 遺伝子プロモーター及び *taaG3* 遺伝子プロモーターの塩基配列は、転写促進因子 (HAP complex) の結合配列 (CCAAT 配列) 中の 1 塩基を除いて完全に一致していた。一方、タカアミラーゼ A 遺伝子の誘導発現に関わる因子 (AmyR) をコードする *amyR* 遺伝子の塩基配列を解析した結果、*A. oryzae* KBN6217 株の *amyR* 遺伝子の塩基配列は既知の麹菌の *amyR* 遺伝子^{5,6)} とは 3 か所 (-227、577 及び 1149) で塩基の違いが確認され、1 か所のアミノ酸置換 (Glu-193 Lys-193) が認められた。

3.2 *A. oryzae* KBN6217 株の形質転換系の開発

pyrG⁻ 株は 5-FOA 耐性株として positive selection により容易に選択・分離できる⁷⁾。*A. oryzae* KBN6217 株の優れた性質へのダメージを考慮して遺伝子破壊による取得を試みた。*pyrG* 遺伝子破壊用ベクター、pdprG100 で形質転換し再生してきたコロニーより 5-FOA 耐性を示すウラシル要求株、*A. oryzae* KBN6217-56 株を分離することができた (図 2)。サザンブロット解析の結果

から *A. oryzae* KBN6217-56 株は目的とする *pyrG* 遺伝子破壊株ではなかったが、*pyrG* 遺伝子の一部が欠失していると考えられた。*A. oryzae* KBN6217-56 株を *A. oryzae* KBN616 株 *pyrG* 遺伝子で形質転換したところ、約 50 形質転換体/μg プラスミド DNA の効率で形質転換できた。また、*A. oryzae* KBN6217-56 株は他の麹菌と同レベルのピリチアミン濃度 (0.1μg/ml) で生育が抑制され、ピリチアミン耐性遺伝子 (*ptrA* 遺伝子) を選択マーカーとしても形質転換することができた。

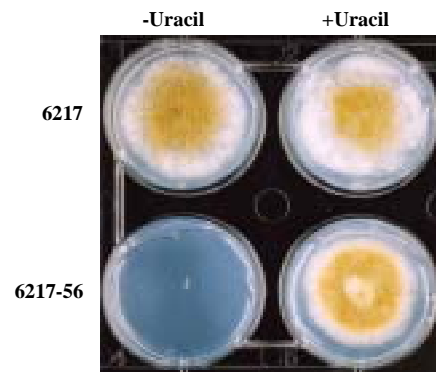


図2 *A. oryzae* KBN6217 株からの *pyrG*⁻ 株の取得

4. 結び

醤油麹菌、*A. oryzae* KBN616 株の約 20 倍のアミラーゼ活性を持つ *A. oryzae* KBN6217 株を取得し、その形質転換に成功した。本菌を用いた異種有用タンパク質の効率的生産に向けて、種々の変異株取得や各種発現ベクターの構築などを行っていく予定である。

文献

- 1) Saito, N.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 290(1973)
- 2) Laemmli, U. K.: *Nature*, **227**, 680(1970)
- 3) Raeder, U., and P. Broda: *Lett. Appl. Microb.*, **1**, 17(1985)
- 4) Tsukagoshi, N., M. Furukawa, H. Nagaba, N. Kirita, A. Tsuboi, and S. Udaka: *Gene*, **84**, 319(1989)
- 5) Petersen, K. L., J. Lehmbeck, and T. Christensen: *Mol. Gen. Genet.*, **262**, 668(1999)
- 6) Gomi, K., T. Akeno, T. Minetoki, K. Ozeki, C. Kumagai, N. Okazaki, and Y. Iimura: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 816(2000)
- 7) Boeke, J. D., F. LaCrute, and G.R. Fink: *Mol. Gen. Genet.*, **197**, 345(1984)