

タカアミラーゼA高生産麹菌の検索と宿主・ベクター系の開発

北本則行・安田庄子・松井淳子・近藤徹弥・林 直宏・安田佳生・花井將裕

麹菌 (*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、麹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、麹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、麹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麹菌を利用することが期待されている。麹菌の形質転換系はこれまでにいくつか開発されているが、実用醤油麹菌や実用清酒麹菌が単に宿主として使用されるだけで、真にタンパク質高生産に適した麹菌が宿主として選択されていない。非常に優れたタンパク質分泌能力を持つ麹菌を宿主として用いることができれば、異種有用タンパク質(環境浄化関連酵素や環境負荷軽減酵素など)をより効率的に分泌生産することが可能となる。また、遺伝子の転写量を増加させる強力な麹菌プロモーターを新たに創出し、非常に優れたタンパク質分泌能力を持つ麹菌と合わせて用いれば、さらに大量の異種有用タンパク質を分泌生産させることが可能となる。そこで、本研究では、タンパク質分泌能力に優れた麹菌において異種有用タンパク質の効率的生産システムを確立することを最終的に目指すこととした。

実験方法

餅ビオック保存の麹菌を供試菌株として使用した。アミラーゼ活性は可溶性デンプンを基質として測定した。タカアミラーゼA遺伝子、タカアミラーゼA遺伝子cDNA及びアミラーゼ遺伝子誘導発現因子遺伝子はPCR法で増幅した後、常法に従って塩基配列を決定した。麹菌の形質転換はプロトプラスト-PEG法で行った。

実験結果及び考察

麹菌が最も大量に分泌する酵素、タカアミラーゼAの分泌生産能力を指標としてタンパク質分泌能力の優れた

麹菌の検索を行い、当センターで常用している実用醤油麹菌 *A. oryzae* KBN616 株の約20倍のアミラーゼ活性を持つ *A. oryzae* KBN6217 株が得られた。*A. oryzae* KBN6217 株は2個のタカアミラーゼA遺伝子を保有し、その遺伝子及び既知の麹菌タカアミラーゼA遺伝子のプロモーターの塩基配列は同一であった。したがって、*A. oryzae* KBN6217 株の高いアミラーゼ活性は、タカアミラーゼA遺伝子の高い発現量、あるいは、その優れたタンパク質分泌能力によるものであると推定された。また、2個のタカアミラーゼA遺伝子の発現量の違いから、CCAAT配列への転写促進因子(HAP complex)の結合がタカアミラーゼA遺伝子の高発現には不可欠であり、*A. nidulans* で得られている結果と同じ結果が示された。一方、麹菌のアミラーゼ遺伝子誘導発現に関わる因子をコードする遺伝子は、*A. oryzae* KBN6217 株と既知の麹菌との間で3か所で塩基の違いが確認され、1か所のアミノ酸置換が認められた。

麹菌の形質転換に利用されている宿主株の取得にあたり、麹菌実用株の優れた性質を損なう可能性が低い選択マーカーである *niaD* 遺伝子及びピリチアミン耐性遺伝子を用いる *A. oryzae* KBN6217 株の形質転換系の開発を行った。*A. oryzae* KBN6217 株は、この2つの選択マーカーで *A. oryzae* KBN616 株とほぼ同じ形質転換効率(約20/ μ g DNA)で形質転換された。また、*A. oryzae* KBN6217 株の *pyrG* 遺伝子破壊株の取得を行い、*pyrG* 遺伝子を選択マーカーとする形質転換系の確立も試みた。