

第3章 麹菌の形質転換系の開発

麹菌はわが国で古くから清酒・醤油・味噌などの醸造産業に利用されている非常に重要な微生物である。このような産業上の重要性から麹菌の生理学的・生化学的な研究が盛んに行われてきており、膨大な成果の蓄積がある。しかし、それにも拘らず、遺伝学的な知見に関しては非常に少なく不足しているのが現状であった。これは、麹菌が酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のように有性世代をもたず、形態的にも多核多細胞の菌糸体で増殖し、唯一の単細胞である分生子も2～4個の核をもっているために、遺伝解析が困難であったことによる。このような状況の下で、1950年代に石谷ら^{79,83,90)}は菌糸間の吻合(anastomosis)を利用して、麹菌の交雑を試み、得られたヘテロ2倍体から組換え体を作成し、麹菌においても有性世代に似たいわゆる準有性世代(parasexual life cycle)が存在することを示した。彼女らとその後小田ら¹⁵⁾は、この手法を利用して麹菌の育種といくつかの遺伝的解析を行ったが、得られた情報は少ないものであった。その後は、麹菌の遺伝的解析は全くといってよいほど顧みられず、1980年代になってプロトプラスト融合によって容易に交雑株が作出できることが明らかになって、ようやく育種への利用と同時に遺伝解析の試みも検討されてきた。しかし、著者らも認めたように、プロトプラスト融合の育種への利用は有望な手法の一つとなり得るが、得られた株が示す多様な性質を遺伝的に解析することは、依然として非常に難しいのが現状である。

一方、1960年代の後半から大腸菌を用いて開発されてきた遺伝子組換え技術は1980年代に入って手法等が飛躍的に改良されたことによって、あらゆる生物のDNAレベルでの解析を容易に行うことを可能にする画期的な技術となった。初めは、いろいろな生物からの遺伝子を大腸菌で解析することが主として行われていたが、研究対象の生物における形質転換系が開発されるに従って、その生物自身での遺伝子の発現機構や染色体レベルでの存在様式

等の詳細な解析が行われるようになってきた。麹菌と同様、醸造において重要な働きをしている酵母 *S. cerevisiae* では、1978 年に初めて形質転換の報告がなされた^{91,92)}のを機に、その後の形質転換技術の改良と従来の古典遺伝学での豊富な研究の成果の蓄積もあって、飛躍的に分子生物学分野の研究が進展した。麹菌をはじめとするカビにおいても、有性世代が存在し、遺伝学的研究のなされているアカパンカビ (*N. crassa*) で 1979 年²²⁾に、また麹菌と同属の *A. nidulans* で 1983 年^{23,24)}に形質転換の報告がなされた。しかし、酵母に比べて生物材料として扱いにくいことや、プラスミドが存在せず、形質転換技術が飛躍的に改良できなかったことにより、酵母ほど爆発的には研究が進んだわけではなかった。とは言うものの、カビでも遺伝子組換え技術が利用できることが示されたわけで、著者も従来とは異なるこの手法を利用して、麹菌の有している多様な生物的特質を分子レベルで解明することができるものと考えた。

また、遺伝子組換え法は生命現象の分子レベルにおける解析を可能にしただけでなく、有用生物の育種への利用という面で非常に大きな可能性を有している。すなわち、有用な酵素遺伝子を多コピー菌体内に導入し、その遺伝子増幅効果によって目的の酵素を大量に生産することが可能となるので、有用菌株の育種にとって非常に有望な手法となる。ここで用いることができる遺伝子は麹菌の近縁の微生物のものだけでなく、全生物種の遺伝子が利用可能である。そこで、麹菌自身の有用酵素の生産性の増強だけにとどまらず、麹菌の菌体外へのタンパク質の分泌能力の高さに依存した異種生物由来の有用タンパク質の生産にも期待がもたれている。哺乳動物のホルモンやインターフェロンなどのような有用ではあるが、生産性の低いタンパク質を大量に生産することは、バイオテクノロジーの一つの大きな課題であり、麹菌などのカビの利用が有望視されている。

一方、異種タンパク質の生産性の向上とは別に、遺伝子組換えの手法を用いて、実用上好ましくない性質に関与している遺伝子を破壊・不活化するこ

とにより、有用な性質に悪影響を及ぼさずに目的の変異株を造成することも可能になると考えられる。

このように麹菌に関しても、遺伝子組換え技術を利用した研究が盛んになっていくことが予想されるが、これまでそのために必要不可欠である麹菌の形質転換系が開発されていなかった。そこで、著者は、麹菌の分子生物学的研究の基本的な手法として確立するためと、麹菌の有用菌株の育種への利用を目的として、最も必要とされる麹菌の形質転換系の開発に着手し、いくつかの宿主・ベクター系を確立することができた。

第1節 *Aspergillus nidulans* argB遺伝子による麹菌の形質転換

カビの形質転換に関しては、1979年のCaseらによるアカパンカビ (*N. crassa*) を宿主として行われたものが最初の報告である²²⁾。これは、キナ酸代謝に関与する酵素であるデヒドロキナーゼの遺伝子 *qa-2* を選択マーカーとしてもプラスミドを *N. crassa* のプロトプラストにポリエチレングリコールと塩化カルシウムの存在下で導入したものである。その後、*Aspergillus* 属のカビについても、1983年になって *A. nidulans* における形質転換が報告された^{23,24)}。*N. crassa* と *A. nidulans* はともに有性世代をもち、遺伝学的な研究が最も進んでいるカビで、形質転換系が開発された後は、この系を利用して分化や代謝制御に関する遺伝子の発現調節機構などが研究されている^{93,94)}。

N. crassa と *A. nidulans* における形質転換系を利用した研究が進むに従って、これらの研究成果を基盤にして、麹菌などの工業的に重要なカビについても形質転換系を確立しようとする試みが盛んになってきた。その結果、現在では工業的に重要なカビのみならず、植物病原性のあるカビについても形質転

換系が開発されている⁹⁴⁾。

著者らが、麹菌の遺伝子組換えに関する研究を開始しようと考えたときには、*N. crassa* と *A. nidulans* のほかには *A. niger* で形質転換の報告がなされていた^{95,96)}だけで、麹菌については利用できる系は開発されていなかった。そこで、著者はこれらのカビでの研究を参考にしながら、まず麹菌の宿主・ベクター系の開発に着手した。

形質転換に用いられる宿主は、外来のDNAが導入されたことが容易に検出できるような遺伝子マーカーが付与されている必要がある。このような形質転換体の選択に利用される遺伝子マーカーとしては、通常は栄養要求性が用いられており、*A. nidulans* においては3種の栄養要求性を相補する遺伝子がマーカーとして利用されていた^{24,97-99)}。このうち、*A. nidulans* 由来の *argB* 遺伝子は、アルギニン生合成系のオルニチンからシトルリンを生成する反応を触媒するオルニチン・カルバモイルトランスフェラーゼをコードしていて、Berse ら¹⁰⁰⁾はこの遺伝子を酵母 *S. cerevisiae* の *arg 3* 変異を相補する断片として単離した。また、遺伝子を含む断片の塩基配列を決定したところ、酵素タンパクのコード領域には、カビの遺伝子に一般的に見いだされるイントロンが存在しないことがわかった¹⁰¹⁾。この *A. nidulans* の *argB* 遺伝子は *A. nidulans* や *S. cerevisiae* のアルギニン要求性変異を相補するだけでなく、*N. crassa*¹⁰²⁾ と *A. niger*⁹⁶⁾ でも機能し、*A. niger* では選択マーカーとして用いられている。そこで、麹菌においてもこの遺伝子が形質転換の選択マーカーとして利用できるものと考え、本遺伝子を用いた形質転換系の研究を行った。

実験方法

1. 使用菌株

宿主として用いる *argB* 変異を有する麹菌株は、第2篇第2章のプロトプ

ラスト融合の研究で用いた *A. oryzae* FN-16 株を親株として紫外線処理等の変異操作によって造成したアルギニン要求性株の中から選択した。*argB* 遺伝子は、アルギニン生合成経路のオルニチンからシトルリンを生成する反応を触媒するオルニチン・カルバモイルトランスフェラーゼをコードしている

(図 2-25) ので、この遺伝子に変異をもつ株は最少培地にオルニチンを添加した培地には生育してこないが、シトルリンを添加した培地にはアルギニンを含む培地と同じように生育することができる。そこで、アルギニン要求性変異株の中からこのような表現型を示す株をスクリーニングした結果、M-2-3 株が *argB* 変異をもっていることがわかった。この株は、*argB* 変異のほかに分生子の色が白いという変異 (*w*) をもつ二重変異株である。

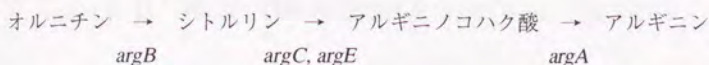


図 2-25 アルギニン生合成経路に関与している *A. nidulans* の遺伝子

argB, オルニチン・カルバモイルトランスフェラーゼ; *argC*, *argE*, アルギニノコハク酸合成酵素;
argA, アルギニノコハク酸リアーゼ

argB 遺伝子のサザン・ハイブリダイゼーションとオルニチン・カルバモイルトランスフェラーゼ活性の測定の標準株としては、*A. nidulans* IAM 2006 を使用した。

プラスミドの調製および回収実験に使用した大腸菌は JA221 (*hsdM hsdR lacY leuB6 trpE5 recA1*) である。

2. 培地ならびに培養方法

麹菌の菌体調製用培地は第 2 篇第 1 章第 1 節に記載したデキストリン-ペプトン培地を用いた。形質転換体の培養のための最少培地と完全培地は、第 2 篇第 1 章第 2 節に記載した Czapek-Dox (CD) 培地と麹汁培地を用いた。また、形質転換体の選択培地は、プロトプラストが再生できるように最少培地に 0.8 M NaCl を浸透圧調節剤として加えたものを用いた。麹菌の培養は全

て30℃で行った。

大腸菌の培養は LB broth (バクト・トリプトン(Difco社) 1%、酵母エキス(Difco社) 0.5%、NaCl 1%、pH 7.5) を用いて、37℃で行った。大腸菌の形質転換体の選択用培地は LB に 50 ppm になるようアンピシリンを添加して用いた。いずれも平板培地を作成する場合は、粉末寒天を 1.5% 添加した。

3. 使用したプラスミド

argB 変異株である M-2-3 株の形質転換に用いたプラスミドは主として pSal43^{98,103} である。このプラスミドは Berse らによって構築されたもので、ワルシャワ大学の Weglenski 教授より恵与されたものである。本プラスミドは大腸菌のプラスミドベクターである pBR327 の基本構造をもち、2.6 kb の *A. nidulans* の *argB* 遺伝子を含む DNA 断片のほかに、酵母の選択マーカーの *LEU2* と 2 μ m DNA 由来の複製開始点を含んでいる (図 2-26)。

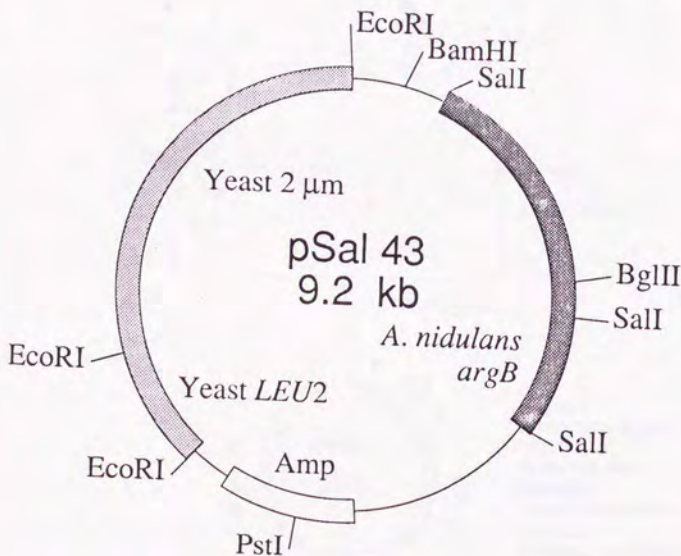


図 2-26 *A. nidulans* の *argB* 遺伝子を選択マーカーとしてもつプラスミドベクター pSal43 の構造

酵母用のDNA配列は麹菌の形質転換に必要なので、この部分を含む3.4 kbのEcoRI断片を除いたプラスミドを構築し、pSal23と命名した。さらに、形質転換体の外来DNAのコピー数を推定するために、このpSal23に麹菌由来のメチオニン要求性を相補するDNA断片(*met*)を挿入したpRBM1を構築した。プラスミドの構築ステップを図2-27に示した。

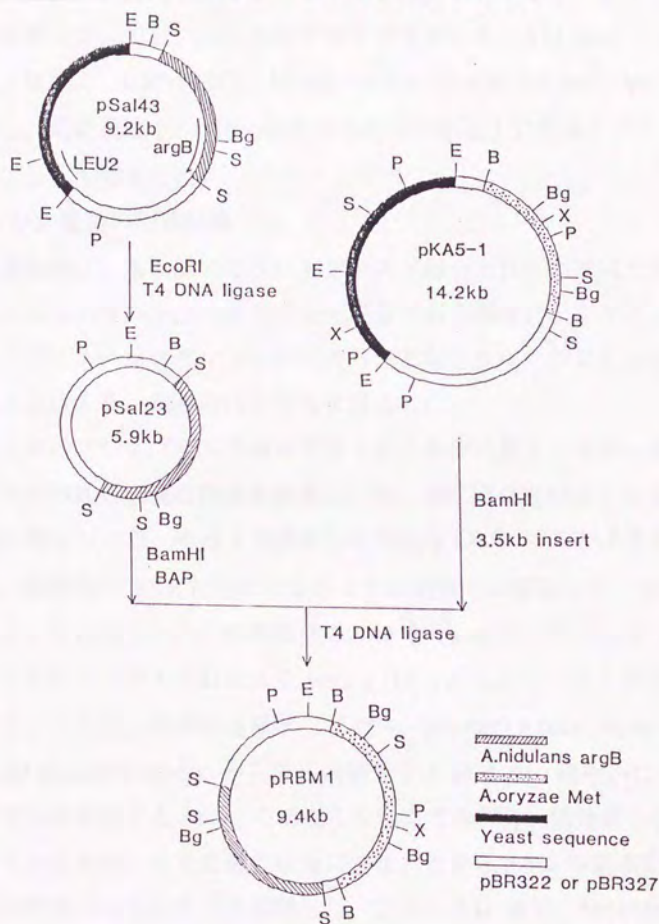


図2-27 プラスミドベクター pRBM1 の構築

4. 麹菌のプロトプラストの調製

カビの細胞内にDNAを導入するためには、プロトプラストを用いる方法が一般的であり^{93,94,97)}、ここでも麹菌の菌体からプロトプラストを調製して、ポリエチレングリコールと塩化カルシウム存在下でDNAを取り込ませた。

麹菌のプロトプラストは、第2篇第1章第2節および第2章に記載した方法に準じて調製した。但し、得られたプロトプラストを0.8 M NaClで2回洗浄した後、溶液I (0.8 M NaCl、10 mM CaCl₂、10 mM Tris-HCl、pH 7.5)で1回洗浄し、最終濃度 2.5×10^8 /ml になるように溶液Iに懸濁して、形質転換用の宿主として使用した。

5. 麹菌および大腸菌の形質転換

麹菌の形質転換は、基本的にはプロトプラスト融合とほとんど同じ方法で行った。すなわち、プロトプラスト同士を混合する代わりに、プラスミドDNAを加え、ポリエチレングリコール (PEG) と塩化カルシウムを含む溶液で処理することにより、細胞内にDNAを導入した。

第2篇第2章のプロトプラスト融合で得られた条件に関する知見と酵母や *A. nidulans* で行われた形質転換法を参考にして、はじめに次のような方法で麹菌の形質転換を行った。溶液Iで洗浄したM-2-3のプロトプラストを低速遠心で集め、最終濃度 2.5×10^8 /ml になるように溶液Iに懸濁して、形質転換用の宿主として使用した。この懸濁液0.2 mlを15 ml容ファルコンチューブにとり、これにプラスミドDNAを10 μ g (10 μ l) 加えて、よく混合し、30分氷冷する。これに、融合促進剤として25%(w/v) PEG 4,000、50 mM CaCl₂、10 mM Tris-HCl(pH 7.5) から成る溶液IIを1 ml添加し緩やかに混合して、室温で15分放置する。6 mlの溶液Iを加えて希釈し、低速遠心によりプロトプラストを集め、全量を最少培地にのせ、上から0.5%の寒天を含む同一の組成の培地(45℃)を注ぎ重層した。プレートは30℃、5~10日間培養して形質転換体を取得した。

なお、形質転換頻度を改良する目的で、上に述べた方法におけるPEG濃

度や操作手順等を変更して検討した。詳細は実験結果に記した。

大腸菌の形質転換は、主として塩化ルビジウムと塩化カルシウムを使用する Kushner の方法¹⁰⁴⁾に従って行った。

6. DNAの調製法

麹菌の全DNAの調製は第2篇第1章第3節に記載した方法によって行った。

大腸菌からのプラスミドDNAの調製および精製は、アルカリ-SDS法¹⁰⁵⁾及び Maniatis らの実験書¹⁰⁶⁾に記載されている方法に従って行った。すなわち、50 ppm のアンピシリンを含む LB 培地に目的のプラスミドを含む大腸菌を接種し、37℃、一晩振盪培養する。遠心して菌を集め、TEG 溶液 (50 mM グルコース、10 mM EDTA、25 mM Tris-HCl, pH 8.0) に懸濁した後、2 倍量のアルカリ-SDS 溶液 (0.2 M NaOH、1% SDS) を加え溶菌する。これに半分量の 5 M 酢酸カリウムを加えて、氷中で 30 分放置後、遠心してタンパクや菌体を除去した。イソプロパノールを 5 分の 3 量加えて室温で遠心して核酸画分を沈澱させる。TE 溶液に溶かして、100 分の 1 量のリボヌクレアーゼ A (10 mg/ml) を加えて、37℃、30 分反応させ RNA を分解する。フェノール-クロロホルムおよびクロロホルムで抽出した後、エタノール沈澱で回収し、CsCl-エチジウムブロマイド超遠心を行って、プラスミド DNA を精製した。

7. DNAのハイブリダイゼーション

形質転換体の全 DNA を用いたサザン・ハイブリダイゼーションは、以下のように行った¹⁰⁷⁾。

DNA を適当な制限酵素で分解した後、0.8% アガロースゲル電気泳動にかける。エチジウムブロマイド染色した後で、ゲルを変性溶液 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) に浸し 30 分放置後、中和溶液 (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.2, 1 mM EDTA) で中和して、ナイロン・メンブレン (Hybond-N、Amersham 社) にサザン・プロットした。プロット終了後、乾燥させ

トランスイルミネーターの上でメンブレンに紫外線をあて、DNAを固定した。ドット・プロットは、全DNAをあらかじめ100℃、5分間加熱処理して変性させた後、2 μ g から順次2倍に希釈したものをナイロンメンブレンにスポットした。

DNAプローブは、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ を使用して nick translation kit (Amersham 社) によってラベルした¹⁰⁸⁾。ハイブリダイゼーションは、5 \times SSC、5 \times Denhardt 溶液、100 μ g/ml 変性サケ精子DNA、50% 脱イオン化ホルムアミド中で、42℃、20時間行った。ハイブリダイゼーション終了後のメンブレンの洗浄は、65℃で、2 \times SSC、0.1% SDS 中で30分および0.1 \times SSC、0.1% SDS 中で30分を行い、メンブレンを洗浄後、X線フィルムに-80℃で感光させた。

8. パルスフィールドゲル電気泳動

麹菌の染色体を分離し、外来DNAの存在様式を調べる目的で、パルスフィールドゲル電気泳動¹⁰⁹⁾を行った。

形質転換体および宿主株のプロトプラストを前に述べた方法で調製し、0.8 M NaCl 溶液で洗浄後、SET buffer (2 M ソルビトール、50 mM EDTA、50 mM Tris-HCl、pH 7.5) に2 $\times 10^8$ /mlとなるように懸濁する。これをプラスチックのシリンジにいれ、等量の SET buffer に溶かした1% 低融点アガロース (42℃) を加えよく混合した後、氷中で固化させる。固化したアガロースゲルをシリンジから取り出して、ナイフで5 mm 程度の厚さのブロックに切り、溶菌溶液 (2 mg/ml プロテイナーゼK、1% N-ラウロイルサルコシン、0.5 M EDTA、50 mM Tris-HCl、pH 9.5) 中で55℃、40時間インキュベートして溶菌させる。アガロースのブロックを50 mM EDTA (pH 9.0) で3回洗った後で、0.5 M EDTA (pH 9.0) 中で4℃で保存した。

このようにして調製したアガロースゲルを薄く切り、0.6% アガロースゲルのスロットに入れて0.5% の低融点アガロースを加え固定する。ゲルを手製の orthogonal-field-alteration gel electrophoresis (OFAGE) 用の泳動槽にセットして、0.5 \times TBE 中で60 V、50分のパルス時間で12~15℃、144時間泳

動した。泳動後のゲルをエチジウムブロマイド溶液 (1 mg/l) で染色し、トランスイルミネーター上で写真を撮影した。

サザン・ハイブリダイゼーションに用いるときには、ゲルを 0.25 M HCl に15分浸してDNAを細断化した後、アルカリ変性と中和処理を行ってナイロンメンブレンへのプロットングを行った。

9. 酵素活性の測定

麹菌をデキストリン-ペプトン培地と CD 培地で生育させ、その菌体を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) に懸濁し、乳鉢中でガラスビーズとともに破碎した。20,000×g、15分の遠心により菌体残渣を除いた上清を細胞抽出液として酵素活性の測定に用いた。

オルニチン・カルバモイルトランスフェラーゼ活性はオルニチンからシトルリンへの生成量で測定した。反応液は 0.7 ml の 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) と 0.1 ml の 50 mM L-オルニチンに適当に希釈した細胞抽出液 0.1 ml を加え、37℃、5分間インキュベートしておく。これに直前に調製した 50 mM カルバミルリン酸を 0.1 ml 加えて反応を開始する。37℃で 10分反応させた後で、15% 過塩素酸を 1 ml 加えて反応を止め、3,000 rpm で 5分遠心して変性タンパクを除いて、反応液中に生成したL-シトルリンを Prescott と Jones の方法によって定量した¹¹⁰⁾。

試料 1 ml に 1 ml の発色試薬 (0.5% アンチピリンを 50%(v/v) 硫酸に溶解したA液と 0.8% ジアセチルモノオキシムを 5%(v/v) 酢酸に溶解したB液を使用前に 2:1 に混合する) を加え、60℃、2時間光を遮断して反応させた後、466 nm の吸光度を測定した。

アルギナーゼ活性はアルギニンを基質として、生成してくる尿素量を酵素法によって測定して求めた。20 mM L-アルギニン(pH 9.5) 0.5 ml に 0.1 M グリシン-NaOH buffer (pH 9.5) 0.4 ml を加え、これに細胞抽出液 0.1 ml を添加して 37℃、30分反応後、2 N HCl 0.2 ml を加えることにより反応を止める。37℃、10分放置した後、2 N NaOH 0.2 ml を加えて中和し、尿素・アンモニ

ア測定キット (Boeringer-Mannheim) を用いて生成した尿素量を定量した。

なお、細胞抽出液中のタンパク質含量は Lowry らの方法¹¹¹⁾で測定した。

10. SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmli らの方法¹¹²⁾に従って、12.5% の SDS ポリアクリルアミドゲルを作成し、宿主株および形質転換体の細胞抽出液 (タンパク量として $30\mu\text{g}$) をかけた。電気泳動後、ゲルは 0.04% Coomassie Brilliant Blue G250 を 3.5% 過塩素酸に溶解した染色液で染色し、酢酸-メタノールで脱色を行った。

実 験 結 果

1. 麹菌 M-2-3 の pSal43 による形質転換

表現型から *argB* 変異株であると考えられる M-2-3 株を宿主株として *A. nidulans* の *argB* 遺伝子をもつプラスミド pSal43 による形質転換を試みた。M-2-3 株はその分生子を最少培地に 2×10^8 の濃度でプレートしてもコロニーは認められず、復帰変異率が非常に低いことがわかった。また、 5×10^7 個のプロトプラストを最少培地で再生させてもコロニーは全く生じてこなかった。

5×10^7 個のプロトプラストを含む溶液 I 0.2 ml に pSal43 を $10\mu\text{g}$ 加えて、実験方法に記載してあるように 25%(w/v) PEG 4,000、50 mM CaCl_2 、10 mM Tris-HCl(pH 7.5) を加えて融合させることによって DNA を菌体内に取り込ませた。最少培地に融合処理後のプロトプラストを 0.5% 軟寒天で包埋して 30°C 、1 週間培養したところ pSal43 を加えたものでは数個の旺盛な生育を示すコロニーの形成がみられた。また、この大きなコロニーのほかに数十個の小さなコロニーも観察された。一方、プラスミドを加えなかったものや pBR322 を加えたものでは、小さいコロニーも認められなかった。pSal43 を加えた区分で認められた大きなコロニーは分生子が白色であり、プラスミド無添加の対照区分では全くコロニーが認められなかったことから、得られた株は野生株のコンタミでも M-2-3 株の復帰変異株でもなく、pSal43 によって

形質転換された株であると考えられる。大きなコロニーとは別に小さいコロニーが多く認められたが、これらは最少培地に釣菌しても生育が遅く途中で生育が停止するものもあり、*A. nidulans* の形質転換でも観察されているような "abortive" な形質転換体²⁴⁾であると考えられる。

この時の形質転換実験では 10 μ g のプラスミド DNA で 7 個の生育の良好な株を得ることができ、これらを真の形質転換体と考えると形質転換頻度は DNA 1 μ g 当たり 0.7 個となる。この値は *A. nidulans* の形質転換の報告と比べて低いものではあるが、同様に *A. nidulans* の *argB* 遺伝子をマーカーとして *A. niger* を形質転換した場合⁹⁶⁾とほぼ同じであった。

また、形質転換に用いたプロトプラストを完全培地で再生させると、融合処理する前では、60~70% の高い再生率が得られたが、PEG 処理後では 5~7% と低くなった。しかし、今回の実験では第 2 章の細胞融合の場合よりやや再生率が良かった。

2. 形質転換方法の検討

pSal43 を用いてアルギニン要求性変異株である M-2-3 の形質転換が可能であることが示されたが、上記の方法で何回か同じ形質転換実験を繰り返したところ、全く形質転換体を得られないことが多く、再現性に問題があると考えられたので、形質転換方法について改良を試みた。

はじめに用いた方法は著者がプロトプラスト融合で得た経験的なものに基づいており、ここでは新たに *N. crassa* と *A. nidulans* で行われている方法を検討した。しかし、方法とはいっても根本的に大きな違いはなく、融合処理に使用する試薬の濃度や操作手順が異なっているだけなので、ここでは次の 3 つの方法についてのみ比較した。

①はじめに用いた方法と同じ、②PEG の濃度を変えて 40% とし (溶液Ⅱの組成は 40%(w/v) PEG 4,000、50 mM CaCl₂、50 mM Tris-HCl(pH 7.5) とした)、①と同じように DNA を混合した後に PEG 溶液を加えた。また、PEG 濃度を高くしたのに伴って希釈容量を 10 ml と多くした。③融合処理に用いる溶

液は②と同じだが、この PEG 溶液を用いる方法を Case らの報告²²⁾を参考に
して行った。すなわち、プロトプラストを溶液 I に懸濁してコンピテントセ
ルを調製する際に、予め PEG 溶液を最終容量の 5 分の 1 量 (PEG 濃度は 8
%となる)を加えておき、この 0.2 ml を形質転換に使用する。それ以降の操
作は②と同じにした。

これらの 3 方法について M-2-3 を宿主として pSal23 を $10\mu\text{g}$ 用いて形質
転換を 2 回ずつ繰り返して行った結果を表 2-19 に示す。ここからも明らか
のように①および②の方法では形質転換頻度が低く、形質転換体を得られ
たり、得られなかったりと再現性が乏しいのに対し、③の方法では DNA $1\mu\text{g}$
あたり 1 ~ 2 個と高い効率とは言えないが、常に形質転換体を得られること
がわかった。

表 2-19 形質転換方法と形質転換体数

形質転換方法	形質転換体数	
	1 回目	2 回目
①	2	0
②	1	2
③	12	15

そこで、この方法を用いて、DNA の添加量と形質転換体数の関係を調べ
ると (図 2-28)、添加量にほぼ比例して形質転換体を得られることがわかつ
た。Case らの方法は *N. crassa* の形質転換に用いられたものであるが、*A.*
nidulans では PEG 溶液を DNA 添加直後に一部加えている方法^{23,113)}もとら
れているので、この方法についても検討したが、麴菌に関しては③の方が良
かった。なお、Vollmer ら¹¹⁴⁾は Case らの方法に改良を加え、コンピテント
セルを調製する際に PEG 溶液と同時に 100 分の 1 量のジメチルスルホキシド
(DMSO)を加えておくことにより -80°C に保存できることを報告している。

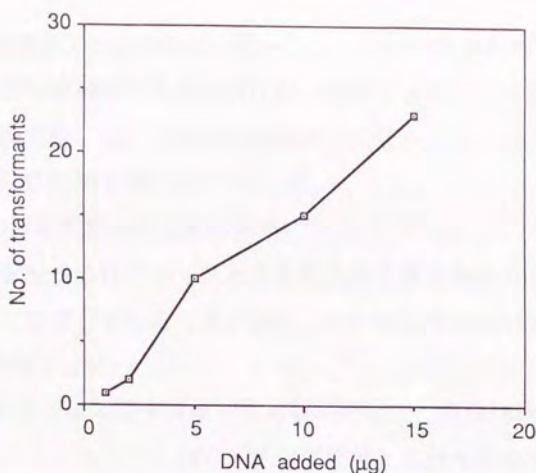


図 2-28 DNA 添加量と形質転換体数

ガラスフィルター 3 G 3 でろ過して得られたプロトプラスト



2,000 rpm, 5分遠心分離し、0.8 M NaCl で 2 回洗浄後、溶液 I (0.8 M NaCl、10 mM CaCl₂、10 mM Tris-HCl、pH 7.5) で 1 回洗浄



最終濃度が 2.5×10^8 個/ml となるように、5 分の 4 量の溶液 I に懸濁し、5 分の 1 量の溶液 II (40%(w/v) PEG 4,000、50 mM CaCl₂、50 mM Tris-HCl、pH 7.5) と 100 分の 1 量の DMSO を加える。(このまま -80°C に保存しても 1 ヶ月は使用できる)



0.2 ml のプロトプラスト懸濁液に DNA を最大 20 μl 加え、氷中で 30 分放置



溶液 II を 1 ml 加えて、室温で 20 分放置



溶液 I を 10 ml 添加し PEG を希釈する



遠心後、0.8 M NaCl を含む Czapek-Dox 平板培地に懸濁液をのせ、0.5% の寒天を含む培地を重層し、 30°C 、5~10 日培養

図 2-29 麹菌の形質転換の操作手順

著者もこの DMSO の添加効果を調べたが、やや再生率が低下するものの、約1ヶ月は形質転換頻度に大きな変化なく使用できることを認めた。以降の麹菌の形質転換実験には、この方法を採用して行うこととし、プロトプラスト調製以降の操作方法を図 2-29 に示した。

3.M-2-3 株の形質転換体の性質の解析

はじめの形質転換条件で得られた形質転換体と考えられる 7 株のうち、最少培地で良好に生育してくる 3 株を選び、その性質等について検討した。

1) 形質転換体の安定性

形質転換体を 3 回ほど最少培地で植え継いだ後に、完全培地（麹汁寒天平板培地）にストリークして、30℃、2 週間培養して分生子を着生させた。このプレートに 10 ml の 0.01% Tween 80 溶液を加え、白金耳で分生子をかきとり懸濁させた後、3 G 3 のガラスフィルターでろ過して分生子のみを集めた。この分生子懸濁液を適当に希釈して再度完全培地にプレートした。単一コロニーの分生子を 100 個前後選んで最少培地に接種してその栄養要求性の表現型の出現頻度を調べた。表 2-20 に示す通り、供試した 3 株ともに完全培地で生育させても形質は非常に安定であることがわかる。特に、形質転換体の 2 (TR2) は選んだ 125 個の株の全てが栄養要求性を示さず、形質転換で相補された表現型は安定に保持されていた。

表 2-20 形質転換体の安定性

Transformant	Colonies counted		Stability (%)
	CM	MM	
TR1	118	110	93
TR2	125	125	100
TR3	106	88	83

形質転換体の形質が完全培地のような非選択圧条件下でも非常に安定であるということは、外から導入した DNA が麹菌の染色体の中に組み込まれ、

染色体と一緒に複製されて新しい細胞に分配されていることを示していると考えられる。

TR2 が非常に安定なのに比べて、TR1 と TR3 の安定性はやや低かった。このことは、TR1 と TR3 では染色体に組み込まれたDNAが増殖しているうちに切り出されて脱落したというよりも、細胞がヘテロカリオンの状態にあるということで説明できると考えられる。麹菌の菌体（菌糸）は多核多細胞であるし、分生子も多核である（細胞融合の項で記したように、麹菌の分生子は2～3個の核を含んでいる）。そのため、外来DNAが麹菌の染色体に組み込まれて形質転換が起こったとしても、全ての核の染色体に組み込まれるというわけではなく、もとのままの核も存在している。つまり、形質転換の初期にはヘテロカリオンの状態の細胞が得られるわけで、形質転換体が増殖するうちに外来のDNAを持つ核と持たない核の細胞に分離してしまうことが考えられる。

形質転換体は何度か最少培地で植え継いではいるが、TR1 と TR3 はまだヘテロカリオンの状態であって、完全培地で培養している間に、pSal43 が組み込まれていない核だけをもつ分生子が分離してきたものと考えられる。一方、TR2 は導入されたDNAが組み込まれた核だけをもつホモカリオンとなっているため、完全培地で培養しても形質が脱落することはなかったのであろう。TR1 と TR3 もさらに継代培養を行ってホモカリオンにしておけば、形質は極めて安定になると思われる。

このように、染色体に組み込まれたDNAは容易には脱落せず、形質転換体の性質はきわめて安定になるという利点があり、実用菌株の育種にとっては重要である。一般に酵素などの生産には合成培地よりも組成の複雑な天然培地を使用することが多いので、非選択圧下の培養でも形質が安定していることが望ましいからである。

2) 形質転換体からのプラスミドDNAの回収

上で述べたように、形質転換体の形質が非常に安定であることから、プラ

スミドDNAは麹菌の染色体に組み込まれていることが強く示唆されているが、細胞内にフリーの状態のプラスミドが存在するという可能性もある。そこで、形質転換体の全DNAから大腸菌へのプラスミドDNAの回収を試みた。

表2-21に示すように、形質転換体の全DNA約50 μ gを未処理のままで大腸菌JA221を形質転換したが、アンピシリン耐性を示すコロニーは全く認められなかった。一方、全DNAを *Bam*HI や *Eco*RI などの制限酵素で分解後、T4 DNA ligase でセルフ・ライゲーションさせたもので形質転換すると、頻度には差があるもののアンピシリン耐性を示す株が得られた。これらの結果から、形質転換体の細胞内には外から導入したDNAがフリーの状態では存在していないことがわかった。

表2-21 形質転換体からのプラスミドDNAの回収

DNA source	No. of amp ^R transformants		
	Uncut	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI
M-2-3 (recipient)	0	0	0
TR1	0	0	6
TR2	0	52	143
TR3	0	3	5

また、TR2 と TR3 から *Bam*HI で分解した後でライゲーションして回収したプラスミドの制限酵素による分解パターンを調べたところ、これらは形質転換に用いた pSal43 に由来することが示された。TR1 のDNAを *Bam*HI で分解したものをセルフ・ライゲーションしても、大腸菌の形質転換体を得られなかったのは、後でも述べるように、染色体へ組み込まれる際にDNAの組換えや再配列(rearrangement)が起こって *Bam*HI 切断部位が失われたためであらう。

3) 形質転換体の染色体DNAのサザン・ハイブリダイゼーション

形質転換に用いたプラスミドDNAが形質転換体の染色体中でどのような存在様式をしているかを調べるために、サザン解析を行った。

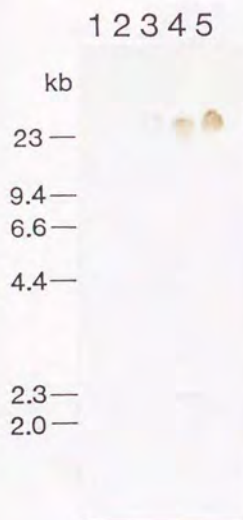


図 2-30 未分解DNAのサザン解析

1、FN-16；2、M-2-3；3、TR1；4、TR2；5、TR3

図 2-30 には親株 FN-16 及び宿主の M-2-3 と形質転換体 3 株の全 DNA 10 μ g をそのままアガロースゲル電気泳動にかけたもののサザン・ハイブリダイゼーションの結果を示した。プローブは pSal43 を用いたが、親株及び宿主の DNA には全くハイブリダイズしなかった。一方、形質転換体の DNA では、3 株ともに染色体の大きさの位置に強くハイブリダイズするシグナルが得られた。また、それより小さい分子量のところには何のバンドも検出できなかった。このことは上でも述べてきたように、形質転換体ではプラスミド DNA は染色体に組み込まれており、フリーでは存在していないことを示している。M-2-3 の DNA は、ゆるいハイブリダイゼーション条件（ハイブリダイゼーション温度が 37℃、洗浄は 2×SSC、0.1% SDS で 42℃）でも形質転換に用いた pSal43 とはハイブリダイズしなかったので、麹菌の染色体には pSal43 と高いホモロジーをもつ配列はないと考えられる。

次に形質転換体の DNA をいくつかの制限酵素で分解し、アガロースゲル

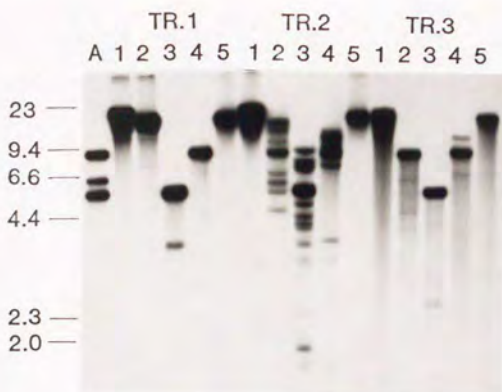


図 2-31 形質転換体の全DNAのサザン解析

形質転換体のDNAをそれぞれ、未分解（レーン1）、*Bam*HI（レーン2）、*Eco*RI（レーン3）、*Bgl*II（レーン4）、*Xho*I（レーン5）分解して電気泳動した。pBR322をプローブにしてハイブリダイゼーションを行った。レーンAは pSal43 を *Bam*HI、*Eco*RI、*Sal*I で分解したものを流した。

電気泳動で分離したもののサザン解析の結果を図 2-31 に示した。それぞれの形質転換体のDNAのゲルのレーン1には上と同じ酵素未処理のDNAをした。また、レーン2と4には pSal43 を1ヶ所で切断する酵素 *Bam*HI と *Bgl*II で分解したDNAを、レーン5は pSal43 に切断部位のない *Xho*I で分解したDNAを流した。*Bam*HI と *Bgl*II で分解した場合には、TR1 の *Bam*HI の場合を除いて、pSal43 と同じ大きさである 9.2 kb に強いバンドが現われた。*Xho*I で分解した場合には、未処理のままで流した時と同じように大きなサイズのところに強いシグナルが認められた。このことは外から導入したDNAがタンデムに多コピーつながって、宿主の染色体DNAに組み込まれていることを示している。

TR1 と TR3 ではうすいバンドがいくつか見いだされたが、これらは、組み込みが起こった部位の境界にある配列や rearrangement によって生じたバンドであると思われる。また、TR2 では、9.2 kb のバンドのほかにも強いバンドがいくつも認められる。これは、rearrangement だけでなく、プラスミド

の染色体への組込みがいくつもの場所で起こっていることを示しているものと考えられる。

TR1 の全 DNA を *Bam*HI で分解したときのサザン・ハイブリダイゼーションで予想される 9.2 kb の部位にバンドが認められず、大きいサイズのところにバンドが存在していた。これは、TR1 の染色体に *pSal43* が組み込まれる際または組み込まれた後になんらかの rearrangement が起こって、*Bam*HI 切断部位が欠失したものと考えられる。このために、TR1 の DNA を *Bam*HI で分解しても *Xho*I の場合と同じように大きいサイズのところにハイブリダイズするバンドが現われる。このように、*Bam*HI で分解した時には、プラスミドを含む断片が非常に大きくなってしまうので、ライゲーション後に大腸菌への回収ができなかったことが考えられる。

4) プラスミド DNA の染色体中でのコピー数

サザン解析の結果、プラスミド DNA は形質転換体の染色体にタンデムの形で多コピー存在することが示唆されたので、そのコピー数の推定を行った。

形質転換体 3 株と宿主 M-2-3、さらに *A. nidulans* IAM 2006 の全 DNA を最初に 2 μ g から順次 2 倍に希釈したものをナイロン・メンブレンにドット・プロットし、図 2-25 で示したプラスミド *pRBM1* をプローブとするハイブリダイゼーションを行った。*pRBM1* は、*A. nidulans* の *argB* 遺伝子と次の節で述べる麹菌由来のメチオニン要求性を相補する遺伝子 (*met*) を一緒にもつプラスミドである。*argB* 遺伝子は *A. nidulans* の野生株に 1 コピー存在し、*met* は麹菌の染色体に 1 コピー存在していると考え、コピー数の測定の内部標準として用いた。図 2-32 (A) に、結果を示したが、形質転換体の DNA は希釈してもドット・ハイブリダイゼーションで強いシグナルが得られた。対照として *met* を 1 コピーもつ M-2-3 と *argB* を 1 コピーもつ *A. nidulans* の DNA の 2 μ g と同程度の強さのハイブリダイゼーション・シグナルを図中には矢印で示したが、そのときの希釈倍率からおおまかなコピー数を求め、TR1 では 30 コピー、TR2 では 60 コピー、TR3 では 15 コピーの外来 DNA

が存在していると推定された。

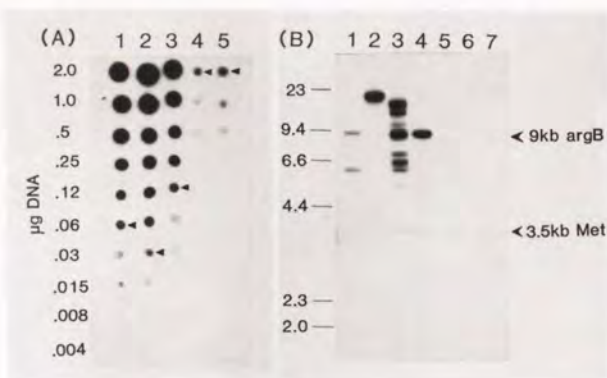


図 2-32 形質転換体の染色体中の外来DNAのコピー数の推定とサザン解析

(A) 全DNAを2μgから順次半減して、フィルターにスポットし、*A. nidulans* の *argB* および *A. oryzae* の *met* 遺伝子をプローブにしてハイブリダイゼーションを行った。同程度の強さのスポットを矢印で示したが、1～3の形質転換体 (TR-1～TR3) にはそれぞれ約30、60、15コピーのDNAが存在することがわかる。4は宿主のM-2-3、5は*A. nidulans* IAM 2006。(B) 全DNAを*Bam*HIで分解後、サザン解析を行った。1はpSal43、2～4は形質転換体 (TR-1～TR3)、5、6は宿主のM-2-3および親株のFN-16、7は*A. nidulans* IAM 2006。

図 2-32 (B) には同じ菌株のDNAを *Bam*HI で分解したものサザン・ハイブリダイゼーションを示した。M-2-3 では 3.5 kb に *met* 由来のバンドが、また *A. nidulans* では 9 kb 付近に *argB* のバンドがうすく認められるのに対し、形質転換体ではそれらに比べて非常に濃いバンドが認められた。このオートラジオグラムのデンストメトリーは正確にはできなかったが、おおよそドット・プロットで求めた値と大きな差はなかった。

5) パルスフィールドゲル電気泳動による形質転換体のカリオタイプ

ここで解析に用いている形質転換体では、外から導入したプラスミドDNAが染色体に多コピー組み込まれていることが明らかとなったが、これらの外来のDNAがどの染色体に組み込まれているのかを調べる目的で、麹菌の染色体をパルスフィールドゲル電気泳動によって分離し、サザン・ハイブリ

ダイゼーションを行った。

1984年にCantorらのグループ¹¹⁵⁾とCarleとOlsonのグループ¹¹⁶⁾によって開発されたパルスフィールドゲル電気泳動は、従来のアガロースゲル電気泳動では不可能であった染色体のような巨大DNAの分離を可能にした。この手法を用いて、酵母では16本の染色体が分離され、遺伝子のフィジカルマッピングが容易になされている。酵母よりも染色体が大きいカビについても*N. crassa*¹¹⁷⁾や*A. nidulans*¹¹⁸⁾において同様に染色体が分離され、フィジカルマッピングに利用されている。麴菌についても最近になって高田ら¹⁰⁹⁾によって、染色体の分離が可能になり、著者らのグループが単離した麴菌の遺伝子のフィジカルマッピングが行われつつある。ここでは、高田らの方法によって麴菌の染色体を分離し、プラスミドDNAが組み込まれている染色体を特定することを試みた。

実験方法の項に記載されているようにして、宿主および形質転換体のプロトプラストから染色体サンプルを調製し、OFAGE(orthogonal-field-alternation gel electrophoresis)を行った。図2-33にOFAGE後のアガロースゲルをエチジウムブロマイド染色した時の染色体パターンと、ナイロン・メンブレンにサザン・プロットしてpBR322をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った時のオートラジオグラムを示した。宿主のM-2-3の染色体は6本のバンドとして分離され、ここでは便宜上小さいバンドからI～VIの番号を付けた。高田らによれば、IとVIのバンドはエチジウムブロマイド染色の強さから2本の染色体が重なっていると考えられ、その結果、麴菌でも*A. nidulans*や*A. niger*と同じように染色体は8本存在していると推定されている¹⁰⁹⁾。

形質転換体のうちTR3についてはプロトプラストは十分得られるのにOFAGEでは全く染色体パターンが認められなかった。このことは2回繰り返して行ったが、うまくいかなかった。しかし、TR1とTR2については図に示したようにきれいな染色体バンドの分離ができた。TR1ではM-2-3とは同じ染色体パターンが認められ、ハイブリダイゼーションの結果から、プ

ラスミドDNAはIVのバンドの染色体に組み込まれていることがわかった。

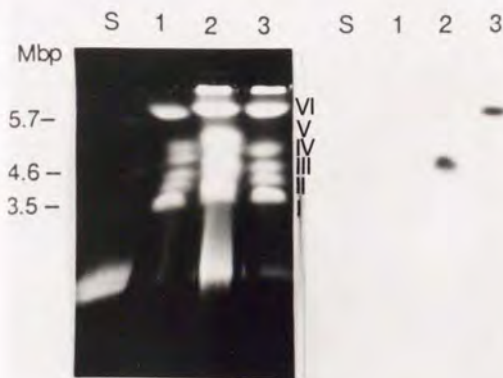


図 2-33 形質転換体の OFAGE サザン解析

(左) エチジウムブロマイド染色 (右) オートラジオグラム

S, *Schizosaccharomyces pombe* (サイズマーカー); 1, M-2-3; 2, TR1; 3, TR2

一方、TR2 では M-2-3 と TR1 の染色体パターンと比較すると、V のバンドの染色体が失われていることがわかる。新しいバンドが生じていないことから、V のバンドに相当する染色体はプラスミドが多コピー組み込まれたためにサイズが大きくなり、VI のバンドと重なってしまったことが考えられた。

ハイブリダイゼーションの結果、プラスミド DNA は VI のバンドにある染色体に組み込まれていることがわかり、上の推定を支持するものと考えられる。しかし、VI のバンドにハイブリダイズするからといって、必ずしも本来なら V のバンドに相当する染色体に DNA が多コピー組み込まれていると結論付けることもできない。もし、V のバンドに相当する染色体に多コピー組み込まれて、VI のバンドと重なったとすれば、VI には 3 本の染色体が存在することになるが、エチジウムブロマイド染色の強さが 3 本分に相当するのかわかる必要がある。また、TR2 では約 60 コピーの pSal43 が存在すると推定されたが、pSal43 のサイズは 9.2 kb であり、60 コピーではおよそ 500~600 kb の大きさとなり、この分だけ染色体が大きくなると考えられる。しかし、

サイズマーカーの *Schizosaccharomyces pombe* の染色体DNAの大きさから比較して、VとVIのバンドの大きさは1,000 kb以上の差があると推定されるので、組み込まれたDNAのコピー数と一致しない。但し、コピー数も染色体の大きさも厳密に正確な値ではないので全く一致していないというわけでもないかも知れない。このように、TR2ではVのバンドに相当する染色体に pSal43 が組み込まれていると思われるが、確定はできなかった。とは言うものの、図 2-31 のサザン・ハイブリダイゼーションの結果、TR2では非常に多くのバンドが認められることから、染色体のいろいろな場所に組み込まれているものと考えたが、OFAGE サザン解析からは、おそらく1本の染色体だけにDNAが組み込まれているのであろうと考えられた。

6) 形質転換体での *argB* 遺伝子の発現

3株の形質転換体の染色体には pSal43 が多コピー存在していることがわかったので、このDNAにのっている *argB* 遺伝子の発現に遺伝子増幅効果が認められるかは非常に興味深い。そこで、*argB* 遺伝子がコードしているオルニチン・カルバモイルトランスフェラーゼ (OCTase) の菌体内の活性を測定した。

最少培地である CD 培地と完全培地であるデキストリン-ペプトン培地で形質転換体と宿主 M-2-3 およびその親株 FN-16 を培養し細胞抽出液を調製し、その OCTase 活性を測定した結果を表 2-22 に示した。表からも明らかに形質転換体の細胞抽出液中の OCTase の比活性は *argB* 変異株の親株である FN-16 の 15~50 倍を示し、これはプラスミドDNAのコピー数とは一致している。表 2-23 にはコントロールとして測定したアルギニン分解に関与する酵素であるアルギナーゼの活性を示したが、菌株によってこの酵素活性は大差なかった。また、今回用いたプラスミドは *A. nidulans* 由来の *argB* 遺伝子をもっているので、*A. nidulans* と麹菌 *A. oryzae* の OCTase の比活性自体が異なる可能性もあるため、対照として *A. nidulans* IAM 2006 の菌体内 OCTase の比活性を調べたが、表 2-22 に示す通り FN-16 とほとんど同

も強く染色されるバンドが認められた。*A. nidulans* の *argB* 遺伝子のコードする OCTase タンパク質のアミノ酸は 359 個であって、分子量は 39 kD であり、成熟 OCTase はミトコンドリアに局在するためのターゲット配列がプロセシングされ、分子量 36 kD のタンパクとなることが知られている¹⁰¹⁾。

SDS-PAGE で親株と違いのあったタンパクバンドは約 41 kD であって、予想される OCTase の分子量よりやや大きかった。このバンドに相当するタンパクが高発現した *A. nidulans* の OCTase であるかは、精製して性質を調べるか、または、OCTase に対する抗体を用いたウェスタン解析によって確認する必要がある、今後の課題であると考えられる。また、*A. nidulans* と同様に麹菌の中でも OCTase はミトコンドリアに移行して局在しているかは興味深い。

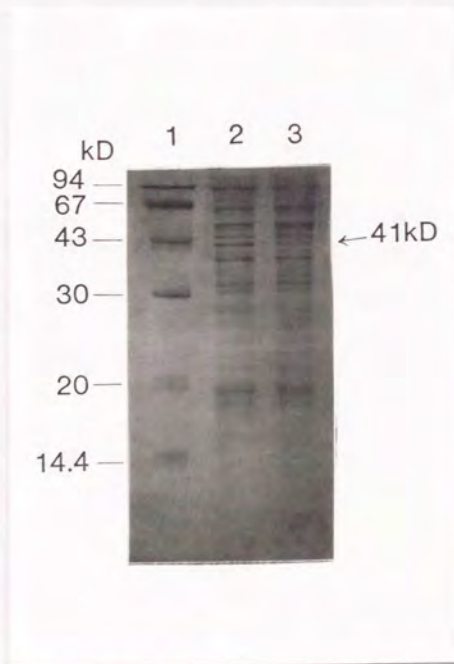


図 2-34 麹菌細胞抽出液の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

1、タンパク質サイズマーカー；2、TR1；3、M-2-3

じであった。

表 2-22 麹菌の菌体内オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ活性

Strain	Czapek-Dox medium		Dextrin-pepton medium	
	Spec. act. ^a	Ratio ^b	Spec. act. ^a	Ratio ^b
FN-16	17.1	1.0	2.8	1.0
M-2-3	—	—	0.6	0.2
TR1	469.9	27.5	71.3	25.6
TR2	904.6	52.9	133.7	47.9
TR3	514.3	30.1	42.3	15.2
2006 ^c	22.2	1.3	3.4	1.2

^a Specific activity; μg L-citrulline/min/mg protein.

^b Specific activity of FN-16 is expressed as 1.0.

^c *Aspergillus nidulans* IAM 2006.

表 2-23 麹菌の菌体内アルギナーゼ活性

Strain	Czapek-Dox medium		Dextrin-pepton medium	
	Spec. act. ^a	Ratio ^b	Spec. act. ^a	Ratio ^b
FN-16	2.0	1.0	3.3	1.0
M-2-3	-	-	2.1	0.6
TR1	1.3	0.6	3.0	0.9
TR2	2.3	1.1	5.4	1.6
TR3	1.6	0.8	4.3	1.3

^a Specific activity; mg urea/min/mg protein.

^b Specific activity of FN-16 is expressed as 1.0.

形質転換体では OCTase 活性が著しく上昇していることから、その細胞抽出液のタンパク質画分に占める OCTase タンパクの比率は高いと考えられる。そこで、宿主である M-2-3 と形質転換体のうちで 30 コピーの *argB* 遺伝子が組み込まれた TR1 の細胞抽出液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) し、Coomassie Brilliant Blue G250 で染色されるタンパクバンドを比較した。

図 2-34 に示すように、TR1 のタンパクのレーンで 40 kD 付近に親株より

上で述べてきたように、形質転換体では組み込まれて多コピーとなった *argB* 遺伝子はその大部分が正常に発現しており、遺伝子増幅効果が認められることが明らかになった。

なお、pSal43 には *argB* の他に酵母の *LEU2* 遺伝子も含まれているので、この遺伝子も形質転換体で発現しているかを調べるため、細胞抽出液の β -イソプロピル・リンゴ酸脱水素酵素活性を測定したが、親株とほとんど大差がなかった。多コピー存在しているにもかかわらず、活性の上昇が認められなかったことから、酵母の遺伝子は麹菌では効率的には働かないと考えられる。これは、逆に麹菌や他の *Aspergillus* の遺伝子が酵母で機能しないことと一致している。

考 察

A. nidulans 由来のオルニチン・カルバモイルトランスフェラーゼをコードしている *argB* 遺伝子をもつプラスミドベクター pSal43 を用いて、麹菌 *A. oryzae* のアルギニン要求性変異株の形質転換を行うことができた。このことは、*A. nidulans* の *argB* 遺伝子が種の異なる麹菌でも正常に機能し、麹菌の形質転換の選択マーカーとして利用できることを示している。実際、形質転換体の細胞内の OCTase 活性は組み込まれた遺伝子のコピー数に比例して上昇していたことから、これは証明される。*A. nidulans* の *argB* 遺伝子は *N. crassa* や酵母、大腸菌でも機能することが報告されていることから、麹菌と *A. nidulans* とは同じ *Aspergillus* 属であり、生物学的には非常に近い種であるので、*argB* 遺伝子は麹菌でも効率よく働くことができたものと考えられる。

argB 遺伝子を選択マーカーとして麹菌の形質転換が可能であることが明らかとなったので、形質転換頻度の改良を目的として形質転換方法の検討を行った。プロトプラスト融合とほぼ同じ方法でも形質転換体は得られたが、形

質転換頻度は低かった。一方、プラスミドDNAを添加するときに10%程度のPEGを共存させておくことにより形質転換頻度が上昇し、形質転換体が容易に得られるようになった。うすい濃度のPEGが存在することによって、プロトプラストとDNAの吸着が起こりやすくなるのではなかろうか。

さらに、ここでは述べなかったが、電気パルスを与えることによってDNAをプロトプラスト内に導入する電気穿孔法(electroporation)についても2、3社の装置を使用して行ってみたが、PEG法に比べて効率が悪く利用できなかった。最近、*A. niger*と*A. awamori*でelectroporationによる形質転換が報告されている¹¹⁹⁾が、PEG法と形質転換頻度に大差がなかったようである。

また、酵母でよく利用されているアルカリ金属(カルシウムまたはリチウム塩を用いる)法¹²⁰⁾は、プロトプラストを調製する必要がなく非常に有用な方法であり、*N. crassa*では酢酸リチウムを使用した形質転換が報告されている¹²¹⁾。この方法について麹菌でも検討したが、形質転換体は得られなかった。分生子から発芽したばかりの菌糸体にリチウム処理を行う際に、菌糸がフロック状になってしまうため操作が困難になることや、酵母でもPEG法に比べて形質転換頻度が低くなることが知られているので、麹菌ではPEG法でも頻度が低いのでうまくいかなかったと思われる。

今回の実験で得られた形質転換体の全DNAを用いた大腸菌へのプラスミドの回収およびサザン解析の結果、用いたプラスミドベクターは染色体に組み込まれており、フリーの状態で存在していないことが明らかになった。サザン解析により、宿主のM-2-3株の染色体にはpSal43と高いホモロジーのある配列が存在しないことがわかったので、pSal43は麹菌の染色体に非相同的な組換えによって組み込まれているものと考えられた。これまで報告されている*A. nidulans*における形質転換では、*A. nidulans*由来のホモロジーのあるDNAをもつプラスミドを用いても染色体の相同的な部位に組み込まれるだけでなく、非相同的な組換えによっても組み込まれることが知られており、麹菌の場合でも同様な現象が起っていると考えられる。一方、同じ下等真核

生物である酵母 *S. cerevisiae* では相同的組換えによってのみ染色体に組み込まれるといわれており¹²²⁾、麴菌などのカビと組換えに関して何らかの機構の違いがあるものと思われる。

このように麴菌で pSal43 を形質転換用のプラスミドとして用いた場合には染色体に非相同的に組み込まれるので、もし染色体上の生育に必須の遺伝子のところに DNA が組み込まれると、この菌は生育できなくなる。また、選択マーカーの遺伝子が分離されるようにして組み込まれた場合も形質転換体としては得られないことになる。このようなことにより、pSal43 を用いた場合の形質転換頻度が *A. nidulans* の場合に比べて低くなることが考えられる。そのため、麴菌由来の相同配列をもつプラスミドの利用が考えられる必要がある。例えば、今回の実験ではコピー数の測定に使用した pRBM1 のように麴菌の *met* をもつプラスミドを用いた形質転換を検討することがあげられる。この結果については次の節で詳しく述べる予定である。

麴菌の pSal43 による形質転換は非相同的な染色体への組込みのため、形質転換頻度は低いものではあったが、形質転換体の形質の安定性について調べたところ、完全培地で継代培養しても、非常に安定で形質の脱落はほとんど認められなかった。さらに、長期間の植え継ぎと保存によっても多コピーの組み込まれた DNA の脱落は認められなかった。このように、染色体に組み込まれた DNA は容易には脱落せず、形質転換体の性質がきわめて安定であることは、実用菌株の育種にとっては重要である。麴造りはもとより、酵素などの生産も合成培地ではなく組成の複雑な天然培地を使用することが多いので、選択圧のない条件で培養しても形質が安定していることが望ましい。

形質転換体に組み込まれている DNA のコピー数を測定したところ、3 株ともに 15~60 個の多コピーの組込みが起っていた。このうち、TR1 と TR3 では染色体のある 1 部位にタンデムにつながって組み込まれていると考えられた。また、TR2 では、ゲノミックサザン解析の結果からは、いろいろな染色体の異なる部位への組込みが予想されたが、OFAGE を用いた染色体レベ

ルでの解析から、ある1本の染色体に多コピー組み込まれていると思われた。そして、ゲノミックサザン解析においてたくさんのハイブリダイズするバンドが存在するのは、1本の染色体のいろいろな部位に組み込まれているのか、組み込まれる時かそれ以降に再配列 (rearrangement) が起ったためと考えられる。

A. nidulans の場合でもこのようなタンデムに多コピーの形質転換に用いたプラスミドDNAの染色体への組込みが認められており、タンデムに組み込まれる機構についていくつかモデルが考えられている^{96,123)}。一つは、染色体に組み込まれる前にプラスミドDNAがタンデムにつながって多量体を形成することが考えられる。別の仮説としては、一旦1個のプラスミドが染色体に組み込まれてから、そこをターゲットとして染色体外に存在しているプラスミドが相同的な組換えによって組み込まれることも考えられる。当然のことながら、この2つの事象が並列的に起ることも考えられる。現在までのところ、これらのいずれの機構によりタンデムの組込みが起きるのかは明らかでないが、今後、カビにおける組換え機構が分子レベルで解明されることによって、この現象が説明されてくるであろう。

機構は今のところ明らかではないが、麹菌の染色体に外来のDNAが多コピー組み込まれ、そのDNAは体細胞分裂においても非常に安定で脱落することがないこと、また形質転換体では組み込まれたコピー数にほぼ比例してOCTase活性が上昇しており、導入した遺伝子のほとんど全てが正常に発現していることが示された。OCTaseは実用上特に重要な酵素ではないが、今回の実験で得られた結果は、麹菌に有用な酵素やタンパク質の遺伝子を多コピー導入することによって、遺伝子産物を高生産させることが可能であることを示唆しており、遺伝子組換え法が有用菌株の育種の手法としてきわめて有望であると期待される。現在、著者が開発したこの系を利用して麹菌 *A. oryzae* の α -アミラーゼ遺伝子¹²⁴⁾、グルコアミラーゼ遺伝子¹²⁵⁾、リボヌクレアーゼT₂遺伝子¹²⁶⁾の高発現が試みられており、また焼酎麹菌 *A. usamii* mut.

shirousamii のグルコアミラーゼ遺伝子¹²⁷⁾やヒト・リゾチーム遺伝子¹²⁸⁾などの異種遺伝子の発現にも成功している。

また、 α -アミラーゼ遺伝子^{129,130)}、グルコアミラーゼ遺伝子¹³¹⁾、リボヌクレアーゼT₂遺伝子¹³²⁾のプロモーター領域の解析にも利用されている。

第2節 麹菌由来の選択マーカー遺伝子のクローニング

第1節で述べたように *A. nidulans* の *argB* 遺伝子を用いることによって、麹菌の形質転換が可能であることを認め、麹菌での遺伝子組換えの研究の端緒を開くことができた。しかし、*A. nidulans* の *argB* 遺伝子は麹菌の相当する遺伝子とあまりホモロジーが高くなく、麹菌の染色体の非相同部位へ組み込まれることにより形質転換頻度が低くなっていることが考えられる。また、実用上好ましくない性質に参与している遺伝子を *in vitro* で破壊して、目的の変異株を造成するためには、目的の遺伝子の部位に特異的に組み込まれる必要がある。さらに、現在までのところ、麹菌をはじめとするカビでは、酵母のように染色体外で自己複製ができるプラスミドが利用できないので、遺伝子の発現調節機構の研究は染色体へ組み込まれた形で解析をしなければならないが、このためには非相同部位へ組み込まれることは好ましくない。すなわち、染色体のどの部位に組み込まれるかによって、発現量に影響が生じるという、いわゆる位置効果が認められることがある。そのため、目的とする遺伝子が染色体に組み込まれる部位は常に一定であることが重要なわけである。そこで相同的組換えによる形質転換頻度の向上とプラスミドDNAの部位特異的組込みについて検討することを目的として、麹菌由来の選択マー

カー遺伝子のクローニングを試みた。

まず、麴菌の遺伝子ライブラリーを作製し、ショットガン法で麴菌の栄養要求性変異株に導入し、栄養要求性が相補された形質転換体を得ることを試みた。栄養要求性株としては第1節で用いたアルギニン要求性株に加えてメチオニン要求性株を用いて、これらの変異を相補する遺伝子のクローニングを試みたが、アルギニン要求性株を相補するクローンは得られなかった。一方、メチオニン変異を相補するDNA断片は形質転換体から回収することができ、この断片についていくつかの性質の解明とこれを利用して相同部位への組込みを検討した。

実 験 方 法

1. 使用菌株

麴菌のアミノ酸変異株としては、アルギニン要求性株は第1節で使用した *argB* 変異をもつ M-2-3 株、メチオニン要求性株は *A. oryzae* var. *viridis* RIB 203 から造成した M-28 とこの分生子の白色変異株である M-28W を用いた。遺伝子ライブラリーを作製するのに使用した麴菌は、野生型の *A. oryzae* var. *viridis* RIB 40 である。また、遺伝子ライブラリーのプラスミドの増幅および形質転換体からのプラスミドの回収等のために、第1節で用いた大腸菌 JA221 を使用した。

2. 培地および培養方法

麴菌の培養方法ならびに用いた最少培地と完全培地は第1節に記載した。また、大腸菌の培養方法と培地組成も前節に述べた通りである。

3. 使用プラスミド

麴菌の遺伝子ライブラリーを作製するために、大腸菌-酵母のシャトルベクターである YEp13¹³³⁾ を使用した (図 2-35)。このベクターは大腸菌の選択マーカーとして、アンピシリン耐性とテトラサイクリン耐性の2つをも

ち、酵母の *LEU2* と $2\mu\text{m}$ DNA の複製開始点をもっている。また、麹菌の形質転換のコントロール実験には pBR322 を用いた。

部位特異的な組込みのためには pRBM1 を使用した。

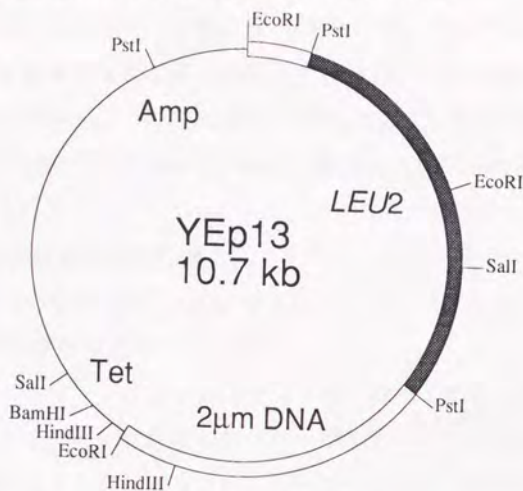


図 2-39 YEpl3 の構造

4. 全 DNA およびプラスミドの調製

前節に記載した。

5. 麹菌遺伝子ライブラリーの作製

野生株である *A. oryzae* RIB 40 の全 DNA を *Bam*HI で部分分解し、エタノール沈澱後、10–40% (w/v) の蔗糖密度勾配遠心を行った（日立 70P-72; 24,000 rpm, 20時間、20℃）。DNA を分画し、アガロースゲル電気泳動で 3–5 kb の範囲の大きさの DNA 断片を含む画分を集め、エタノール沈澱により回収した。YEpl3 は、*Bam*HI で完全分解した後、アルカリ・ホスファターゼ処理して脱リン酸化しておく。これに RIB 40 の *Bam*HI 部分分解 DNA を加え、T4 DNA ligase によりライゲーションを行った後、JA221 の形質転換に用いた。およそ 18,000 個のアンピシリン耐性でテトラサイクリン感受性の

大腸菌の形質転換体が得られ、これらを麹菌の遺伝子ライブラリーとしてアンピシリンを含む LB 寒天培地に培養して保存した。この 18,000 個のクローンを約 500 クローンずつまとめて 100 ml の LB 培地で培養して、アルカリ-SDS 法によってプラスミドを抽出後、CsCl-エチジウムブロマイド超遠心を行って精製して麹菌の形質転換に使用した。なお、ここで得られた 18,000 個のクローンに平均 5 kb の DNA 断片が挿入されていると考え、麹菌の染色体の全サイズが約 3×10^4 kb とすれば、麹菌の全 DNA のほぼ 95% をカバーしていることになる。

6. 麹菌および大腸菌の形質転換

第 1 節で述べた方法に従って行った。

7. DNA のハイブリダイゼーション

ゲノミック・サザンハイブリダイゼーションは第 1 節で述べたように、主としてラジオアイソトープを用いてプローブをラベルして行った。しかし、部位特異的な組込みを確認するために行ったサザンハイブリダイゼーションでは、ラジオアイソトープを使用した場合にはバンド像がブロードになってしまい、解析が困難であったため、感度は悪いが、よりシャープなバンド像が得られるケミプローブ法を使用した。ケミプローブは宝酒造より購入し、詳細な操作方法は製品に添付されているプロトコールに従った。

実 験 結 果

1. 麹菌栄養要求性株の形質転換

A. *oryzae* RIB 40 の DNA を用いて作製した遺伝子ライブラリーから約 500 個のクローンずつをミックスして培養後、抽出精製したプラスミドを麹菌の栄養要求性変異株に導入した。第 1 節で使用したアルギニン要求性変異株 M-2-3 を用いたときは、形質転換体は得られなかった。一方、メチオニン要求性株 M-28 を用いた場合には、15 個のプラスミドミックスのうち 1 つによ

り形質転換体と思われるコロニーが出現した。このプラスミドミックスを構成するもの約 500 個のクローンを細かく区分けして、再度プラスミドミックスを調製して M-28 を形質転換した。これを繰り返すことによって、最終的に M-28 を形質転換できるクローンを単離した。このクローンからプラスミドを調製し、pKA5-1 と名付けた。

2. pKA5-1 の構造解析および pKA5-2 の構築

得られたプラスミド pKA5-1 の構造を調べる目的で、まず各種の制限酵素で分解し、制限酵素地図の作製を行った。その結果明らかとなった pKA5-1 の制限酵素地図を図 2-36 に示した。基本的には遺伝子ライブラリーの作製のために使用された YEp13 (10.7 kb) に麹菌の 3.5 kb の DNA 断片が挿入されている構造をとっている (図 2-37)。

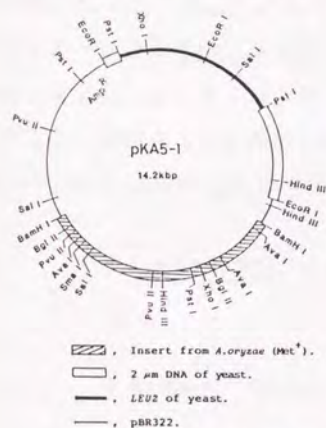


図 2-36 pKA5-1 の構造

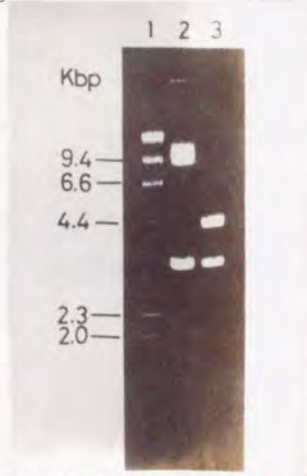


図 2-37 pKA5-1、pKA5-2 の

*Bam*HI 分解パターン

1、DNA サイズマーカー (λ/*Hind*III) 2、pKA5-1
3、pKA5-2

pKA5-1 には酵母由来の *LEU2* ならびに 2 μm DNA の配列が存在するので、この配列が含まれている *Eco*RI 断片を除去したプラスミド pKA5-2 を構築した。pKA5-2 を *Bam*HI で分解したときのパターンを図 2-37 に示した。

3. pKA5-1 および pKA5-2 を用いた麴菌の形質転換

上で述べた2つのプラスミドを用いてメチオニン要求性変異株である M-28、M-28W の形質転換を行った。その結果を表 2-24 に示した。M-28、M-28W はともに分生子を最少培地に 1×10^8 個接種してもコロニーは認められなかったが、今回の実験で、プロトプラストを 5×10^7 個最少培地で再生させると2~3個の復帰変異株と考えられるコロニーが出現した。しかし、pKA5-1 および pKA5-2 を加えたものではDNA 1 μ g あたり4~6個の大きなコロニーと10~20個の小さいコロニーが得られた。この中には復帰変異株のコロニーも混在している可能性もあるが、復帰変異株の出現する割合は低いので、無視できるものと考えられる。小さいコロニーは第1節で述べたように、生育が途中で停止するものや再度最少培地に植え継いでも生育してこない株であって、"abortive" な形質転換体であると考えられる。一方、大きいコロニーは最少培地に植え継いでも良好な生育を示し、真の形質転換体であると考えられる。そこで、真の形質転換体得られる効率を形質転換頻度とすると、DNA 1 μ g あたり4~6個となり、*A. nidulans* の *argB* 遺伝子をもつ pSal43 のものよりわずかではあるが良かった。

表 2-24 麴菌メチオニン要求性株の形質転換

Recipient	Plasmid	Transformation frequency ^a		
		Large colony ^b	Small colony ^c	Total
M-28	pKA5-1	4	10	14
M-28	pKA5-2	5	9	14
M-28W	pKA5-1	6	15	21
M-28W	pKA5-2	5	27	32

^a Number of colonies obtained on transformation with 1 μ g of transforming DNA.

^b Colonies showing vigorous growth.

^c Abortive colonies.

4. 形質転換体の諸性質の検討

1) 形質転換体の最少培地での生育速度

pKA5-1 で形質転換した M-28 および M-28W で得られた形質転換体のうち、代表的な株を 1 株ずつ選び、その分生子を最少寒天平板培地の中央にスポットした。また、宿主株である M-28 および M-28W を 30 ppm のメチオニンを加えた最少寒天培地にスポットした。プレートは 30℃ で 10 日間培養し、経時的にコロニーの直径を測定した。図 2-38 に示したように、形質転換体はいずれもその宿主として用いた株よりも生育が遅かった。しかし、形態的には宿主の株と違いはなかった。

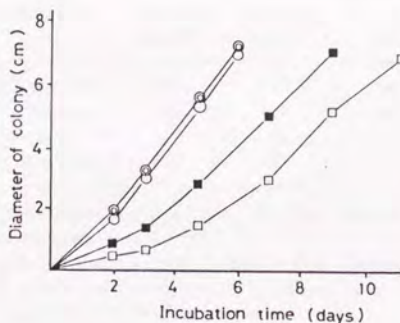


図 2-38 形質転換体の生育速度

○, M-28 (宿主); ●, M-28W (宿主); □, M-28W (pKA5-1); ■, M-28 (pKA5-1)

2) 形質転換体の安定性

argB 遺伝子による形質転換の場合と同じようにして、形質転換体を完全培地（麴汁寒天平板培地）に接種して、30℃、10日間培養して分生子を着生させた。M-2-3 に比べて M-28 と M-28W は分生子の着生が良好なので培養期間は短くてすむ。このプレートに 10 ml の 0.01% Tween 80 溶液を加え、分生子を懸濁した後、3 G 3 のガラスフィルターでろ過して分生子のみを集め

た。この分生子懸濁液を適当に希釈して再度完全培地にプレートして、生育してきた単一コロニーの分生子を 100 個程度選んで最少培地に接種してその栄養要求性の表現型の出現頻度を調べた。表 2-25 に結果を示したが、pKA5-1 および pKA5-2 のいずれで形質転換した株でもメチオニン要求性を示すコロニーが多く認められた。argB の場合では安定性が悪いものでも 83% のものが形質転換体の表現型を示していたのに対し、今回は高いものでも 74% の安定な株しか得られず、低いものでは 64%、すなわち 3 分の 1 のコロニーが元の栄養要求性株に戻ったことになる。

表 2-25 形質転換体の安定性

Transformant ^a	Number of colonies tested ^b	Number of colonies (Met ⁺) ^c	Reversion rate ^d (%)
M-28 (pKA5-1)	108	69	36
M-28 (pKA5-2)	103	76	26
M-28W (pKA5-1)	116	81	30
M-28W (pKA5-2)	118	86	27

^a Transformation was due to the plasmid in parentheses.

^b Colonies which formed conidia on KE medium.

^c Colonies grown on minimal medium after incubation without selective pressure.

^d Rate of reversion to Met⁻; $b - c/b \times 100$.

今回の形質転換も外から導入した DNA の染色体への組み込みによって起っているとすれば、安定性を検討するまでの植え継ぎでも、核がホモカリオンの状態になっている分生子の割合が低かったことが考えられる。また、プラスミド DNA が組み込まれるとしても、選択圧のない条件では染色体から切り出されて脱落しやすいのかも知れない。この現象が用いたプラスミドに固有のものなのか、または宿主の性質に由来するのかは不明であるが。これとは別に、形質転換体内でフリーのプラスミドとして存在するために、非選

収圧条件下で培養すると、プラスミドが脱落することも考えられる。

3) 形質転換体のサザン・ハイブリダイゼーション

pKA5-1 で形質転換して得られた M-28W の形質転換体の 1 株から全 DNA を調製し、サザン・ハイブリダイゼーションを行った。また、対照としてメチオニン要求性の宿主 M-28W 株からも DNA を抽出してサザン解析に用いた。

プラスミドの pKA5-1 および形質転換体と宿主の DNA を *Bam*HI で分解後、アガロースゲル電気泳動を行い、ナイロン・メンブレンにプロットングした。プローブとしては pKA5-1 と YEp13 を使用して、 ^{32}P -dCTP でラベルしてハイブリダイゼーションを行った。図 2-39 に示すように、プローブとして pKA5-1 を用いたときは、形質転換体の *Bam*HI 分解した DNA では 10.7 kb と 3.5 kb の 2 本の強いシグナルのバンドが認められた。一方、宿主株の DNA では、3.5 kb のバンドのみが認められた。



図 2-39 麹菌 DNA のサザン解析

(I) プローブ、pKA5-1 (II) プローブ、YEp13

1, 4, *Bam*HI 分解 pKA5-1; 2, 5, M-28W (宿主);

3, 6, M-28W (pKA5-1)

また、YEp13 をプローブとした場合には、宿主株ではバンドは検出されず、

形質転換体でのみ 10.7 kb のバンドが検出された。pKA5-1 を *Bam*HI で分解した時のハイブリダイゼーションのバンドのパターンと比較して、形質転換体の DNA で認められた 10.7 kb のバンドは YEp13 由来のもので、3.5 kb のバンドはクローニングされた DNA 断片に相当することがわかる。形質転換体の DNA のレーンで検出される 3.5 kb のバンドには外からプラスミドのせて導入した DNA 断片と、もともと宿主の染色体に存在するもののシグナルが重なっている。これらの結果から、pKA5-1 を導入することによって、メチオニン要求性が相補された株にはこの導入したプラスミドに由来する DNA が存在しており、クローニングした 3.5 kb の DNA 断片にメチオニン要求性を相補する遺伝子 (*met* とよぶこととする) が含まれていると考えられる。

なお、ここでは示さなかったが、形質転換体の DNA を制限酵素で分解せずにアガロースゲル電気泳動にかけて、YEp13 をプローブとしてサザン解析を行ったところ、染色体に相当する位置に強いシグナルが認められ、この場合にもプラスミド DNA は染色体に組み込まれていることが予想された。

4) プラスミド DNA の大腸菌への回収

今回の場合でも、得られる形質転換体の染色体に *met* を含むプラスミドが組み込まれることが示唆されたが、一部は細胞内にフリーの状態で存在している可能性もある。このことを調べるために大腸菌への回収実験を行った。

形質転換体の DNA を未処理のまま、大腸菌 JA221 に形質転換したところ、1 µg あたり 10 個程度のアンピシリン耐性の株が得られた。このアンピシリン耐性の形質転換体の 1 つからプラスミドを調製し、サザン・ハイブリダイゼーションを行った。図 2-40 にその結果を示したが、ハイブリダイゼーション・パターンから麴菌の形質転換に用いた pKA5-1 と同じ構造をしていることがわかった。

このように形質転換体の DNA をそのまま用いて、大腸菌でプラスミドが回収できたことから、形質転換体内でフリーのプラスミドとして存在してい

る可能性が示唆された。しかし、サザン解析の結果からは、染色体に組み込まれていることがわかっているのも、おそらく一部のプラスミドがフリーの状態にあるものと思われる。

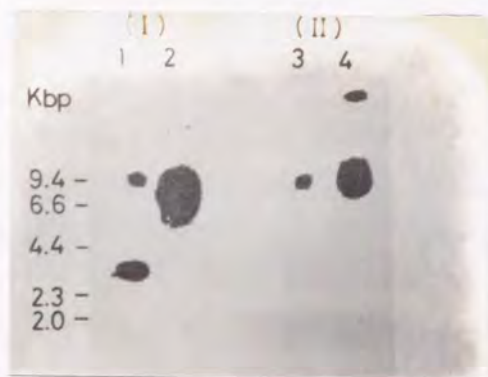


図 2-40 回収プラスミドのサザン解析

(I) プローブ、pKA5-I (II) プローブ、YEp13

1, 3, 回収プラスミド; 2, 4, YEp13

これまで *A. nidulans* などでも形質転換体からプラスミドが大腸菌で回収できたことが報告されているが、このような場合でもサザン解析などから外から導入したDNAは染色体に組み込まれていることが示されているので、回収できたプラスミドは一旦組み込まれた後で切り出されたものであらうと考えられている¹³⁴⁾。今回の実験で回収されたプラスミドが麹菌の染色体とは別に自己複製されているのか、*A. nidulans* で報告されているように組み込まれたDNAが単に切り出されてきたものかについては、今後検討する必要があると考えられる。

また、予備的な実験として、3.5 kb の断片に存在する制限酵素切断部位を利用して短縮したDNA断片をサブクローニングして M-28W の形質転換を行った結果、メチオン要求性の相補能と染色体外に維持される機能はともに 2.2 kb の *Bam*HI-*Pvu*II 断片に存在することが予想された。

5. 麹菌染色体の部位特異的組込みの検討

麹菌の染色体由来のDNA断片が単離され、この断片をもつプラスミドは染色体に組み込まれるだけでなく、染色体外にフリーの状態で維持されていることが示唆された。一方、このDNA断片は麹菌の染色体から得られたものであり、当然のことながら麹菌の染色体と高いホモロジーをもっている。そこで、染色体に組み込まれる場合には、相同的な組換えによって染色体の相同部位に組み込まれる可能性がある。おそらくこのような相同的な組換えが起こる割合が高いために、pKA5-1 や pKA5-2 を用いた場合の形質転換頻度が pSal43 を用いた場合よりも高くなったのであろう。

そこで、このDNA断片を含むプラスミドを用いた形質転換の場合に、プラスミドが染色体の相同部位に組み込まれる可能性について検討した。通常ならば、単離した *met* をもつ pKA5-1 または pKA5-2 を用いて検討するのが妥当であろうが、宿主である M-28 の復帰変異率があまり低いこと、現在までのところ *met* がメチオニン生合成経路のどの反応系に関与しているのか不明なことから、今回は第1節で構築した *argB* をもつプラスミド pSal23 にこの 3.5 kb の *Bam*HI 断片を挿入した pRBM1 を用いて、アルギニン要求性株 M-2-3 を宿主として形質転換を行った。また、この *met* を含む断片が *argB* 遺伝子による形質転換頻度の向上と形質転換体中でフリーの状態で維持されるのに寄与するかについても調べた。

酵母 *S. cerevisiae* では、染色体への組込みは相同的な組換えによって行われ、非相同部位へは組み込まれないことが知られている¹²²⁾。さらに、用いるプラスミドを染色体と相同な配列の中で切断して直鎖状にして形質転換することによって、相同的な組換えが起こりやすくなるため、環状のプラスミドを用いた場合に比べて形質転換頻度が 100~1,000 倍程度も上昇することが認められている¹²²⁾。そこで、ここでは pRBM1 を環状のまま *met* 内の *Xho*I 部位と pBR327 の配列に存在する *Eco*RI 部位 (図 2-27 参照) で切断して直鎖状にした DNA を用いて M-2-3 株の形質転換を行った。

pRBM1 と対照として pSal23 を用いて 3 回の形質転換実験を行い、その結果を表 2-26 に示した。この時の形質転換頻度は全般的に低かったが、環状のプラスミドを用いた場合には、いずれも pRBM1 の方が pSal23 よりも 3 倍ほど効率が上がった。pRBM1 には麹菌由来の *met* 遺伝子断片が存在していることから、染色体への相同的な組込みが起りやすくなったために形質転換頻度が上昇したものと思われる。

表 2-26 環状及び直鎖状 pRBM1 による麹菌の形質転換

plasmid	No. of transformants		
	Exp.1 ^a	Exp.2 ^a	Exp.3 ^b
No plasmids	0	0	0
pSal23	3	3	1
pRBM1(circular)	8	9	3
pRBM1(<i>Xho</i> I)	17	52	19
pRBM1(<i>Eco</i> RI)	-	-	4

^a 10 µg DNA was used.

^b 5 µg DNA was used.

また、pRBM1 による形質転換体のうち 3 株を選んで、全 DNA を調製し、大腸菌へのプラスミドの回収を試みたところ、1 株からの DNA 20 µg で 11 個のアンピシリン耐性の大腸菌形質転換体が得られた。この大腸菌からプラスミドを抽出して制限酵素で分解してバンドのパターンを調べた結果、形質転換に用いた pRBM1 と同じ構造をしていることがわかった。pKA5-1 の場合に比べて回収率は低かったが、pSal23 では全く回収されなかったので、*met* を含む 3.5 kb の断片に麹菌の染色体外で維持されるためのなんらかの機能があるのではないかと考えられる。

一方、pRBM1 を *met* 内の *Xho*I 部位で切断して直鎖状にしたものを形質転換に用いると、環状のプラスミドに比べて、2～6 倍に形質転換頻度が上昇した。しかし、麹菌の染色体とはホモロジーのない pBR327 の配列にある

EcoRI 部位で切断して直鎖状にしても、形質転換頻度は環状の pRBM1 とほとんど変わらなかった。

6. pRBM1 による形質転換体のサザン解析

pRBM1 の環状ならびに直鎖状の DNA を用いることによって、相同配列のない pSal23 よりも形質転換頻度が上昇したことから、染色体の相同部位への組込みが高い割合で起っているものと考えられたので、得られた形質転換体の全 DNA を調製して、サザン解析を行った。

pRBM1 が麴菌の染色体の *met* 部位に相同的組換えによって組み込まれているかどうかを確認するために、宿主の M-2-3 および形質転換体の DNA を 3.5 kb の *met* 内に制限酵素切断部位がある *XhoI* と、*met* 内に切断部位がなく pBR327 の配列に切断部位がある *Clal* で分解した後、3.5 kb の *met* をプローブとしてサザン・ハイブリダイゼーションを行った。

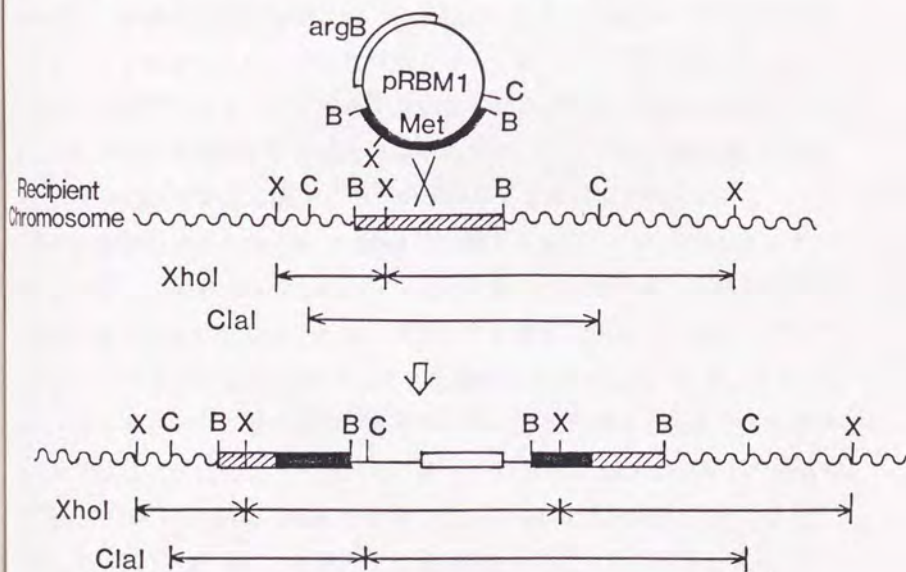


図 2-41 相同的組換えによる形質転換体のサザン解析で生じるバンドの模式図

B, *Bam*HI; C, *Cla*I; X, *Xho*I

染色体の *met* 部位に相同的に組み込まれた場合、宿主と形質転換体の DNA を *XhoI* または *Clal* で分解して生じるハイブリダイゼーション・バンドの大きさの変化を模式的に図 2-41 に示した。

XhoI で分解した場合には、宿主の DNA では 2 本のハイブリダイゼーション・バンドが生じるが、相同的に組み込まれた形質転換体の DNA ではこの 2 本のバンドの他に新たに pRBM1 と同じ大きさの 9.4 kb のバンドが生じてくる。さらに、*Clal* で分解するとより顕著な変化が現われる。すなわち、宿主の DNA では 1 本のバンドしか現われないが、相同部位にプラスミドが組み込まれた形質転換体では、このサイズのバンドが消失し、新しく別に 2 本のバンドが現われてくることになる。そこで、*Clal* で分解して宿主に認められる大きさのバンドが消失していれば、プラスミドが *met* 部位に相同的な組換えによって組み込まれたことがわかる。一方、このバンドが消失せず、別のバンドが現われてくる場合は、*met* 部位とは異なる場所に非相同的組換えによって、組み込まれていると結論できる。図 2-41 で模式的に表したパターンは 1 個のプラスミド DNA が染色体に組み込まれた場合のものであるが、タンデムに組み込まれた場合にはこれらのバンドの他に pRAM1 と同じ大きさの 9.4 kb の位置に濃いバンドが現われてくるはずである。

形質転換体の DNA を *Clal* と *XhoI* で分解してサザン・ハイブリダイゼーションを行い、宿主の DNA のバンドとと比較して、プラスミド DNA が相同部位に組み込まれているかを調べたが、この時の代表的なハイブリダイゼーション・パターンを図 2-42 に示す。実験方法の項でも述べたが、ここではハイブリダイゼーションはラジオアイソトープを使用する従来の方法ではなくケミプローブ法によって行った。宿主の DNA を *Clal* で分解した場合には 7 kb のバンドが現れ、*XhoI* で分解すると 10 kb と 2.5 kb の 2 本のバンドが生じる（図 2-42、R）。相同部位に pRBM1 がシングルで組み込まれた 2 個の形質転換体が図に示してあるが（図 2-42、H）、いずれの株も *Clal* で分解すると 7 kb のバンドが消失し、新たに 12 kb と 4 kb のバンドが生じてい

る。ここで、新しく生じたバンドの大きさの和 (16 kb) と元のバンドの大きさ (7 kb) との差 9 kb は pRBM1 のサイズ 9.4 kb とほぼ同じであって、シングル・コピーの pRBM1 が *met* 部位に組み込まれていることが確認できる。



図 2-42 形質転換体の DNA のサザン解析

C, *Clal* 分解; X, *XhoI* 分解 R, M-2-3 (宿主); H, 相同的組換え;
NH, 非相同的組換え; H(T), 相同的組換え (タンデムな組み込み)

一方、*XhoI* で分解した場合には分解不十分のものもあってバンドがはっきりしていないが、10 kb と 2.5 kb のバンドの他に 9.4 kb のバンドが生じている。

また、相同部位にタンデムに組み込まれていると考えられる株のパターンは (図 2-42、H(T))、シングル・コピーのものと同一バンドの他に 9.4 kb の pRBM1 に相当するバンドが濃く現われてくる。しかし、*met* の部位でなく非相同的な組換えで組み込まれた株では (図 2-42、NH)、*Clal* で分解した場合にも 7 kb のバンドが消失しないことから確認できる。

このようなサザン・ハイブリダイゼーションのパターンをもとにして、今回得られた形質転換体の DNA を *Clal* 分解したもののサザン解析を行った。図 2-43 と図 2-44 にはそのハイブリダイゼーション・パターンを、また表 2-27 にはこれらのパターンから推定したプラスミドの組み込まれた様式をまと

めて示した。

これからもわかるように、環状の pRBM1 を用いて形質転換した株では予想に反して相同部位に組み込まれている割合は低かった。13 株の形質転換体について調べ、図 2-43 にはそのうちの 11 株についてパターンを示したが、相同部位へのシングル・コピーの組込みは 1 株しかなかった。また、もう 1 株は相同部位に組み込まれているパターンを示したが、多コピーの組込みが起こっており、そのほかにもいくつかのバンドが認められたので相同部位だけでなく非相同部位への組込みも起こっていることが推測された。そのほかの株については 7 kb のバンドが存在することから、非相同部位への組込みによるものであることがわかった。また、これらには多コピーのプラスミドが組み込まれていることも明らかになった。

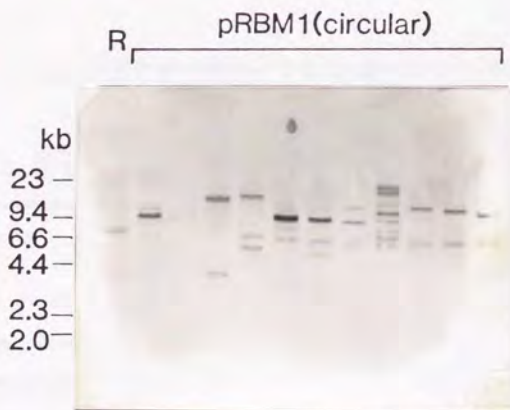


図 2-43 環状 pRBM1 による形質転換体のサザン解析

それとは逆に、pRBM1 を *Xho*I で直鎖状にして形質転換した株では、相同部位に組み込まれる割合が高いことがわかった。12 株について調べた結果、相同部位に組み込まれたものは 8 株で、そのうち 4 株はシングル・コピーの組込みであった。また、2 株は *met* のところだけでなく非相同部位にも組み

込まれていることが推定された。pRBM1 を *Eco*RI で直鎖状にしたものでは、環状の場合と同じく、相同部位へ組み込まれる率が低く、今回調べた4株の形質転換体では1つもなかった（図 2-44）。

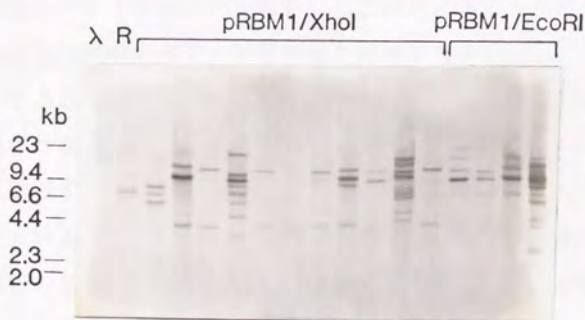


図 2-44 直鎖状 pRBM1 による形質転換体のサザン解析

表 2-27 環状及び直鎖状 pRBM1 による形質転換体の組み込み型

plasmid	No. of transformants		
	Homologous	Non-homologous	Homo+Non-homo
pRBM1(circular)	1 (0) ^a	11 (8)	1 (1)
pRBM1(<i>Xho</i> I)	6 (2)	4 (1)	2 (2)
pRBM1(<i>Eco</i> RI)	0	4 (3)	0

^a タンデムな組み込みが起こっている株

考 察

麹菌の形質転換系の開発の一環として、麹菌の染色体由来の選択マーカーの検索を行い、メチオニン要求性を相補することのできるDNA断片を単離した。麹菌の遺伝子ライブラリーを作製し、これから調製したプラスミドを麹菌の栄養要求性変異株に導入して要求性を相補するクローンを単離しようと試みたわけであるが、当初目的としたアルギニン要求性を相補する遺伝子(*argB*)は得られなかった。しかし、同様の方法によって、メチオニン要求性を相補する遺伝子を含むと考えられるDNA断片を単離することができた。この断片に含まれると考えられる遺伝子がメチオニン生合成経路のどこに関与するかは現在のところ不明であり、遺伝学および生化学的な解析はできないが、このDNA断片をもったプラスミドを形質転換に利用していくつかの知見が得られた。

単離した3.5 kbの*Bam*HI断片をもつプラスミドpKA5-1は*argB*遺伝子をもつpSal23またはpSal43と同じように形質転換体の染色体に組み込まれていと考えられたが、大腸菌で回収することができたので、一部は染色体に組み込まれずにフリーの状態で存在しているものと考えられる。pKA5-1には酵母由来の*LEU2*と2 μ m DNAが含まれているが、この配列を除いたpKA5-2でも大腸菌で回収できること、第1節で述べたように酵母由来の同じ配列をもつpSal43では回収できなかったことから、染色体外でフリーの状態でも存在できる機能は酵母由来のDNAにあるのではなく、今回単離した*met*断片にあるものと考えられる。この*met*断片をpSal23に挿入して*argB*変異株を形質転換した場合にも、大腸菌で形質転換に使用したものと同じ構造のプラスミドが回収できたことから、このDNA断片に染色体外に維持されるのに必要な何らかの機能が存在していると考えられる。この機能がどのようなものか不明であり、サザン解析からもフリーの状態のDNAが多コピー存在するわけではないので、染色体とは別に自己複製できるというより

も、組み込まれたDNAが切り出されやすくなることに関与している可能性が考えられる。いずれにしても今後検討すべき問題であろう。

一般に染色体へのプラスミドDNAの組込みの機構には次の3つのタイプが考えられている⁹³⁾。すなわち；タイプⅠ（相同的組換え）：プラスミドに存在する配列とホモロジーの高い染色体上の部位に組み込まれる場合、タイプⅡ（非相同的組換え）：ベクターがまったくホモロジーがない染色体の部位に組み込まれる場合、タイプⅢ（置換）：相同的組換えでは、低頻度ではあるが、二重交叉（double crossover）により外から導入した遺伝子が、染色体にもともとあった遺伝子と交換されることがある。また、一度組み込まれたプラスミドDNAが切り出されて交換されることもある。

酵母ではタイプⅠの相同的組換えで、ヒトなどの動物ではタイプⅡの非相同的組換えで染色体に組み込まれると考えられている。*N. crassa* や *A. nidulans* などのカビでは一般にその中間で、相同的および非相同的組換えのいずれでも染色体への組込みが起これと言われている。そのため、プラスミド上にカビの染色体と相同な部位が存在しない場合でも、タイプⅡの非相同的組換えにより染色体に組み込まれる。他方、相同部分がある場合でも、相同部位に組み込まれるだけでなく、それ以外の部位に組み込まれることもある。このようにカビではいろいろな様式に従って染色体に組み込まれる可能性があり、このことは遺伝子の発現調節機構の解析や遺伝子破壊などを行う場合に問題になり得る。

そこで、ここで得られた麹菌由来のDNA断片を利用して、麹菌の染色体への部位特異的な組込みについて検討した結果、麹菌でもいろいろな組み込まれ方をすることがわかった。特に、相同な配列をもったプラスミドを環状のまま形質転換しても、相同部位へ組み込まれる割合が低かったことは予想に反していた。相同配列をもたない pSal23 に比べて、形質転換頻度が上昇していたことから、その原因が相同組換えによる組込みが起これることによるものと考えていたが、サザン解析の結果からは非相同部位への組込みが大部

分であり、この考えを支持するものではなかった。今回の実験では3回形質転換を行っているが、いずれの場合も形質転換頻度が低く、そのレベルと比較をしても誤差範囲であって形質転換頻度に差はないのかも知れない。

一方、*met* 断片の中にある *XhoI* 部位で切断し直鎖状にして形質転換した場合には、形質転換頻度の有意な上昇が認められた。しかし、酵母の場合のように頻度の上昇は顕著ではなかった。調べた形質転換体 12 株のうち 8 株で染色体の相同な場所への組込みが起こっており、その半数ではシングル・コピーで組み込まれていた。このことから、相同配列内で直鎖状に切断した場合の形質転換頻度の上昇は、相同的組換えによる組込みが起こりやすくなったことによるものと考えられた。

このように、プラスミド DNA に存在する麹菌染色体とホモロジーのある配列が両端に生じるように切断して形質転換することによって、部位特異的に組込ませることができることがわかった。さきに述べたように、麹菌の形質転換系を利用して遺伝子の発現調節機構の解析を行う場合には、部位特異的に DNA を組み込ませた株を用いる必要があるが、今回の実験から相同配列の中で切断して形質転換すればよいことが示唆された。しかし、いくつかの株では非相同的な組換えによる異なる部位への組込みも起こっており、遺伝子の発現の解析に使用するためには得られた形質転換体のサザン解析を行って、相同部位にのみ組み込まれた株を選択しなければならない。また、シングル・コピーで組み込まれている場合も多いので、このような株を選ぶことによって解析が定量的に行えることも示唆された。さらに、同じようにして目的の場所に組み込ませることによって、遺伝子破壊ができることも示された。

第3節 麴菌アセトアミダーゼ遺伝子のクローニングと優性マーカーとしての利用

一般にカビの形質転換の宿主としては栄養要求性株が用いられており、著者らも前の節ですでに述べたように、アルギニンやメチオニン要求性の麴菌を使用した形質転換系を開発した。しかし、麴菌のような産業上重要なカビでは、栄養要求性株を造成するために通常用いられている変異処理によって、生育能や分生子着生能などをはじめとする本来の優良な性質が損なわれることが多く好ましくない。そこで、形質転換によって工業的に実用な菌株を育種するためには、選択マーカーとして優性マーカーを利用することが有効と考えられる。優性マーカーとしては通常は薬剤耐性遺伝子が利用されており、酵母ではG418 (geneticin)¹³⁵⁾やハイグロマイシンB¹³⁶⁾などの耐性に関与する遺伝子(これらの薬剤のリン酸転移反応を行って不活性化する酵素をコードしている)がよく用いられている。一方、カビにおいても、最近になってこれらの薬剤耐性遺伝子が優性マーカーとして利用され始めてきた。例えば、*A. nidulans* ではハイグロマイシンB耐性遺伝子^{137,138)}とオリゴマイシン耐性遺伝子¹³⁹⁾が形質転換に利用されている。

著者は麴菌の各種薬剤に対する感受性の強さについて調べたところ、これらの酵母やカビで有効な薬剤の大部分に対して耐性が強いことが判明し優性マーカーとしては利用できなかった。しかし、ベノミルとフレオマイシンに対しては感受性が高いことを認め、この2つの薬剤に対する耐性遺伝子によって形質転換ができるのではないかと考えた。

ベノミルはカビの複製された染色体の分離に関与する β -チューブリンに結合して生育阻害を生じさせる薬剤である。このベノミルに対する耐性遺伝子は *N. crassa* や *A. nidulans* のベノミル耐性変異株から分離され^{140,141)}、 β -チューブリン遺伝子が変異したものであることがわかっている。特に、*N. crassa* では変異型の β -チューブリン遺伝子の塩基配列などが解明され、167

番目のアミノ酸が正常型ではフェニルアラニンであるところが変異型ではチロシンになっているという1個のアミノ酸置換でベノミル耐性が生じることが明らかにされており¹⁴⁰⁾、さらにこの変異遺伝子を優性マーカーにして形質転換も試みられている^{114,140)}。 β -チューブリンは生物間で非常に保存性が高いタンパクであって、*N. crassa* と *A. nidulans* の β -チューブリンではアミノ酸レベルで約93%の高いホモロジーがある¹⁴¹⁾。そこで、麴菌の β -チューブリンも *N. crassa* とホモロジーが高いと考えられ、同様なアミノ酸置換によってベノミル耐性が付与できるのではないかと思われる。

著者は麴菌の β -チューブリン遺伝子をクローニングして、167番目に相当するアミノ酸のフェニルアラニンのチロシンへの部位特異的変異を行い、変異型の遺伝子を構築した。そして、この変異型遺伝子を pSal23 につないでアルギニン要求性株の形質転換を行い、形質転換体のベノミル耐性を調べた。その結果、形質転換体では対照の親株に比べてベノミルに対する耐性が約4倍と高くなることがわかり、変異型遺伝子がベノミル耐性に関与することが明らかとなった。しかし、この遺伝子を用いて実用菌株のベノミル耐性をマーカーとする形質転換を行ったが、用いるベノミルの適正な濃度が設定できず、今のところまだ成功していない。

一方、フレオマイシン耐性遺伝子¹⁴²⁾は放線菌から分離されており、フレオマイシンと結合するタンパクをコードしていて、それによって耐性が生じる。この遺伝子は放線菌由来なので、そのままでは麴菌で働かないためプロモーター領域を麴菌の α -アミラーゼ遺伝子のプロモーターに置換して、これを pSal23 に挿入してアルギニン要求性株に導入した。ベノミルの場合と同じように、形質転換体はフレオマイシン耐性が非常に高くなったが、実用株の形質転換については今のところうまくいっていない。

このように、麴菌でも薬剤耐性遺伝子を導入することによって、相当する薬剤に対する耐性が高くなることが認められたが、直接形質転換体を選択するまでにはいかなかった。プロトプラストが再生する条件では薬剤の濃度が

少し低いとコントロールでも生育が認められ、逆に少しでも高いと対照も生育しない代わりにプラスミドを加えたものでも全くコロニーが認められないという結果になってしまい、形質転換体の選択が可能になる薬剤の濃度を正確に設定できなかったことが一つの原因である。

カビの形質転換の優性マーカーとしては薬剤耐性のほかに、炭素・窒素源の資化に関与する遺伝子があり、その代表的なものにアセトアミダーゼ遺伝子¹⁵⁰⁾がある。アセトアミダーゼはアセトアミドを酢酸とアンモニアに分解する反応を触媒し、アセトアミドを炭素源および窒素源として利用できるように働く。この遺伝子が *A. nidulans* から単離され¹⁴³⁾、実用菌の中でアセトアミド資化能のない *A. niger*⁹⁵⁾や *Penicillium chrysogenum*¹⁴⁴⁾、*Trichoderma reesei*¹⁴⁵⁾の形質転換の優性マーカーとして利用されている。そこで、麹菌でもこの遺伝子が利用できるのではないかと考えたが、麹菌はアセトアミド単一窒素源培地で *A. nidulans* と同程度に生育してくることから、麹菌にも相当する遺伝子が存在しているものと考えられた。しかし、野生型の *A. nidulans* でもアセトアミダーゼ遺伝子を多コピーで導入すると、アセトアミド単一窒素源培地での生育が旺盛になることにより、DNAの導入された株を選択することができることが報告されている¹⁴⁶⁾。このことから、麹菌でも同様の系で形質転換が可能と考えられる。実際、その後になって麹菌において *A. nidulans* のアセトアミダーゼ遺伝子 (*amdS*) を用いた形質転換が報告され¹⁴⁷⁾、その有用性が示された。

著者は、薬剤耐性遺伝子を優性マーカーとする系では、形質転換体を選択するのに適当な薬剤の濃度を設定するのが困難であったので、次に優性マーカーとしてアセトアミダーゼ遺伝子が利用できるものと考えた。ここでは、麹菌由来の相当する遺伝子を単離し、この遺伝子を用いた実用麹菌株の形質転換が可能であることを認めた。また、これまで単離され解析が行われていた麹菌の遺伝子は少ないことから、ここで得られた遺伝子について構造および発現に関して解析を加えた。

実験方法

1. 使用菌株

麹菌の遺伝子ライブラリーの作製には第2節で使用した *A. oryzae* RIB 40 を用いた。また形質転換の宿主として *argB*⁻ 株である M-2-3 とその親株で実用菌株である FN-16 を用いた。

遺伝子ライブラリーの作製とファージDNAおよびプラスミドDNAの調製に使用した大腸菌は DH1 (*F*⁻ *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 hsdM hsdR* λ) である。また、塩基配列の決定のための1本鎖DNAの調製は JM 109 (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 hsdR* λ $\Delta(lac-proAB)$ [*F*⁺ *proAB lacI*^q Δ M15 *traD36*]) を使用した。

2. 培地および培養方法

通常の麹菌の培養には、第1節に記載した完全培地（デキストリンーペプトン培地）および最少培地（CD 培地）を使用した。また、アセトアミド単一窒素源培地は、CD 培地の窒素源を 0.3% NaNO₃ から 10 mM アセトアミドに代えて使用した。形質転換体の選択培地としては、アセトアミダーゼ遺伝子そのものをマーカーとする場合は、アセトアミド培地の炭素源をグルコースから 1 M シュクロースに代え、浸透圧調節の役割も持たせた。一方、プロモーターを α -アミラーゼのものに交換した遺伝子をマーカーとする場合には、炭素源をマルトースに代えた。この時は、浸透圧調節には 0.8 M NaCl を用いた。さらにいずれの培地にも野生型の株の生育を抑えるために 15 mM CsCl を添加した²⁴⁾。

大腸菌の培養には、プラスミドDNAの調製は LB 培地を、1本鎖DNAの調製には 2 \times YT 培地（1.6% バクトトリプトン、0.8% 酵母エキス、0.6% NaCl、pH 7.5）を使用した。

3. プラスミドおよびファージ

A. nidulans のアセトアミダーゼ遺伝子 (*amdS*) をもつプラスミド p3SR2 は、オーストラリア・メルボルン大学の M. J. Hynes 教授より恵与していた。p3SR2¹⁴³⁾ は 6.5 kb の *amdS* 遺伝子を含む DNA 断片をもっていて、この制限酵素地図を図 2-45 に示した。

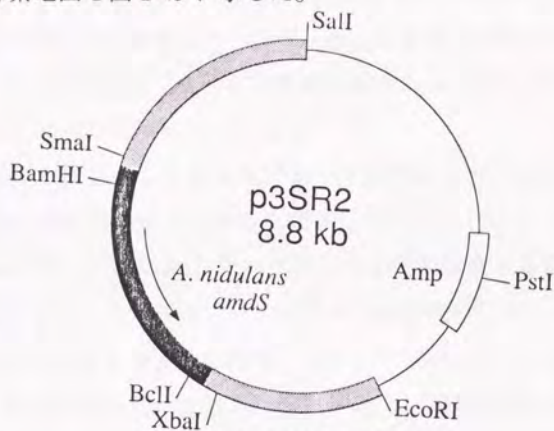


図 2-45 p3SR2 の構造

麹菌 M-2-3 の形質転換用ベクターは pSal23 を用いた。また、麹菌の *amdS* のサブクローニングおよび塩基配列決定用のデレーション・ミュータントの作製には pUC118 および pUC119 を使用した。

麹菌遺伝子ライブラリーの作製はファージ λEMBL3 を用いて行った。

4. 麹菌染色体のファージ遺伝子ライブラリーの作製

第2節のプラスミドを用いた遺伝子ライブラリーを作製したときと同じように、麹菌 *A. oryzae* RIB 40 の染色体 DNA を *Sau3AI* で部分分解した。ここでは、λEMBL3 をベクターとして用いたため挿入 DNA の大きさが 10~25 kb になるように酵素濃度と反応時間を調節した。得られた DNA 断片の約 5 μg をファージベクター EMBL3 の *Bam*HI アーム 1 μg に加え、最終容量 20 μl でライゲーション反応を行った。この反応液 4 μl を市販の *in vitro* packaging kit (GIGAPACK GOLD, Stratagene) を用いてファージ粒子へのパ

パッケージングを行った。パッケージング反応液の一部を用いて DH1 に感染させ、プラークの形成数を測定して組換え型ファージの総数を求めたところ、約 3×10^4 個の組換えファージができていることがわかった。挿入 DNA 断片の平均サイズを 15 kb とし、麴菌の染色体 DNA のサイズを 3×10^4 kb とすれば、約 1 万個の組換えファージで、麴菌染色体の 99% をカバーできることから、今回得られたファージ溶液で十分であると考えられた。

5. プラーク・ハイブリダイゼーション

大腸菌 DH1 を宿主として組換えファージを感染させ、1 枚のプレート (径 80 mm) に約 1000 個のプラークを形成させた。この上にナイロン・メンブレン (Hybond-N、Amersham) をのせて、約 1 分間放置することでファージ粒子を吸着させた。このメンブレンのファージが吸着している面を上にして変性液および中和液を含ませたろ紙 (5 A、アドバンテック東洋) にそれぞれ 7 分間ずつのせてファージ DNA の変性および吸着を行った。2×SSC で軽く洗浄した後、乾燥させてトランスイルミネーター上で紫外線を照射して DNA を固定した。

メンブレンをハイブリダイゼーション用のプラスチックバッグにいれ、ハイブリダイゼーション溶液 (5×SSC、5×Denhardt 溶液、100 μ g/ml 変性サケ精子 DNA) を加えてシールし、56℃で 5 時間プレハイブリダイゼーションした後で、ラベルした DNA プローブを加えて 56℃、20 時間のハイブリダイゼーションを行った。2×SSC、0.1% SDS で 42℃、15 分の洗浄を 2 回行った後、X 線フィルムに感光させた。

6. ファージ DNA の調製

大腸菌 DH1 を LB に 0.2% マルトースを含む培地で 37℃、一晩の培養を行った後、集菌し 4 分の 1 量の 20 mM MgCl₂ 溶液で 37℃、1 時間振盪培養する。これに、SM 溶液に懸濁したファージを感染させ、37℃、20 分吸着させた後、20 ml の LB 培地を加え 37℃で振盪培養した。5～6 時間後に大腸菌の溶菌が起こったら、0.1 ml のクロロホルムを加えてさらに 10 分間振盪培養

して完全に溶菌させる。遠心分離で菌体残渣を除去した後5分の1量のPEG溶液(20% PEG 6,000、2.5 M NaCl)を加えてファージ粒子を沈澱させて回収した。このファージをSM溶液に懸濁して、SDSとEDTAを加え50℃、10分処理した後、フェノール・クロロホルム処理してファージDNAを抽出する。さらに、クロロホルム処理を行い、エタノール沈澱させて精製DNAを得た。

7. 麹菌の全RNAの調製

Cathalaらの方法¹⁴⁸⁾を少し変更して麹菌からRNAを抽出した。麹菌菌体を3 G 1 ガラスフィルターで集め、滅菌水で洗浄後ペーパータオルで菌体をプレスして脱水する。菌体を乳鉢に入れ、液体窒素を注いで凍結した後で乳棒で細かく粉碎した。破碎菌体を10分の1量の β -メルカプトエタノールを加えた5 M グアニジン・チオシアネートに懸濁し、室温で30分放置する。これに4倍量の4 M LiClを加えて混合して4℃で一晩放置した後、3,000 rpm、5分の遠心で沈澱を除去した。上清を8,000 rpm、90分の遠心にかけペレットを回収した。ペレットを3 M LiClで洗浄後、0.1% SDSを含むTEに懸濁し、フェノール・クロロホルムおよびクロロホルム処理を行って最終的にエタノール沈澱によって精製RNAを調製した。

8. ノーザン・ハイブリダイゼーション

麹菌の全RNA約20 μ gをホルムアルデヒドとホルムアミドの存在下で70℃、10分処理して変性させた。このRNAを0.66 M ホルムアルデヒドを含む1% アガロース・ゲルにのせ、1 μ g/mlのエチジウムブロマイドを入れたMOPS buffer中で100V、4時間電気泳動した。ゲルはトランスイルミネーター上で写真をとった後、ナイロン・メンブレンに20×SSCでプロットティングした。プロットティング終了後紫外線をあててRNAをメンブレンに固定した。ハイブリダイゼーションは第1節で記載したサザン・ハイブリダイゼーションの方法で行った。

9. 塩基配列の決定

1) デレーション・シリーズの作製 目的の遺伝子のコード領域を含む DNA断片を pUC118 または pUC119 に連結し、Henikoff の方法¹⁴⁹⁾に従って、一方向へのデレーション・シリーズを作製した。すなわち、5' 突出末端が生じる制限酵素と 3' 突出末端が生じる制限酵素でプラスミドを切断し、エキソヌクレアーゼⅢで反応時間を変化させて処理しいろいろな長さの 1 本鎖化を行った。1 本鎖部分をマングベーンヌクレアーゼ処理で消化し、DNA ポリメラーゼⅠ（クレノウ・フラグメント）で修復して平滑末端とした後、T4 DNA リガーゼによりライゲーションを行い、デレーションの長さの異なるプラスミドのシリーズを作製した。

2) 1 本鎖 DNA の調製 いろいろな長さの DNA 断片をもつプラスミドを保持している *E. coli* JM109 形質転換体を 150 ppm のアンピシリンを含む 2 ×YT に接種して、37℃、一晩前培養する。0.1 ml の前培養液に 0.1 ml のヘルパーファージ M13KO7 を加え、37℃、20分吸着を行わせた後、10 ml の 2 ×YT (150 ppm アンピシリン、70 ppm カナマイシン、0.01% チアミンを含む) を加えて 37℃で 20時間振盪培養した。15,000 rpm、15分、4℃で遠心し、大腸菌の菌体を除き、上清に 5 分の 3 量の PEG 溶液を加え、室温で 15分放置してファージを沈澱として回収する。TE に懸濁し、DNaseⅠと RNaseA でファージ外の DNA と RNA を分解した後、フェノール・クロロホルム抽出を数回繰り返して除タンパクを行い、クロロホルム抽出の後エタノール沈澱により精製 1 本鎖 DNA を得た。

3) ジデオキシ法による塩基配列の決定 精製 1 本鎖 DNA を鋳型として Sanger らの方法¹⁵⁰⁾に準じて DNA ポリメラーゼⅠ（クレノウ・フラグメント）で伸長反応を行い、主として自動 DNA シークエンサー（アプライド・バイオシステムズ、MODEL 371A）を使用して塩基配列を決定した。クレノウ・フラグメントによる伸長反応はシークエンス・ロボット（セイコー電子、DSP-240A）を用いて行った。

また、部分的には Sequenase kit（東洋紡）を用いてラジオアイソトープに

より塩基配列の決定を行った。

10. オリゴヌクレオチドの合成

in vitro mutagenesis の目的でオリゴヌクレオチドをホスホアミダイド法によってDNA合成機（アプライド・バイオシステムズ、MODEL 381A）を使用して合成した。合成したDNAはOPCカートリッジ（アプライド・バイオシステムズ）により精製した。

実 験 結 果

1. 麹菌のアセトアミダーゼ遺伝子のクローニング

アセトアミドを単一の窒素源とする培地に、麹菌も *A. nidulans* と同程度の生育を示したので、麹菌にもアセトアミダーゼ遺伝子が存在しているものと予想された。そこで、図 2-45 に示した *A. nidulans* のアセトアミダーゼ遺伝子 (*amdS*) のコード領域を含んでいる *XbaI*-*Bam*HI 断片を用いて、麹菌 *A. oryzae* RIB 40 のゲノミック・サザン・ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション条件がきつい場合（65℃）には、シグナルが認められなかったが、緩い条件（50℃）では弱いシグナルが得られた。そこで、この断片をプローブとして RIB 40 のファージライブラリーのプラーク・ハイブリダイゼーションを行った。この時のハイブリダイゼーション条件は実験方法に記載されている通りである。

約 10,000 個のプラークをスクリーニングした結果、プローブとハイブリダイズする 6 個のクローンが得られた。麹菌の染色体DNA断片はλEMBL3 の *Bam*HI 部位に挿入されているので、その両端にはλEMBL3 由来の *SalI* 部位が存在する。そこで、これら 6 個のプラークからファージDNAを調製し、*SalI* で分解してアガロースゲル電気泳動の後サザン・ハイブリダイゼーションを行ったところ、大部分のクローンで共通の 5 kb のバンドにプローブがハイブリダイズした。この 5 kb の *SalI* 断片を回収して pUC118 にサブクロ

ーニングして、その制限酵素地図を作製した（図 2-46）。

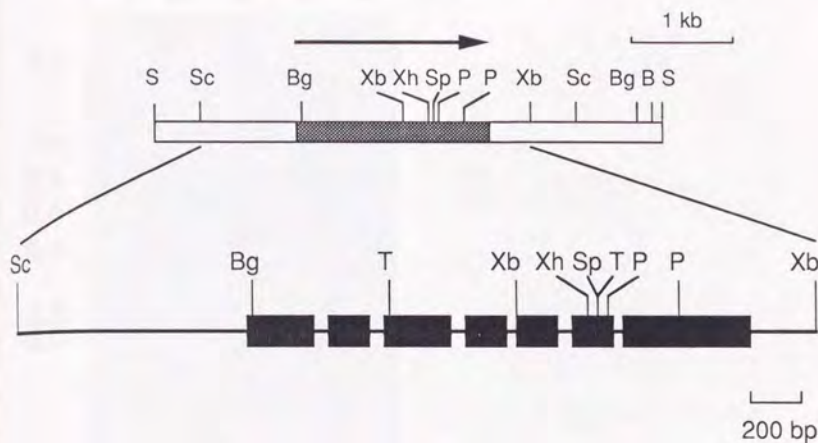


図 2-46 麹菌のアセトアミダーゼ遺伝子を含む DNA 断片の制限酵素地図

B, BamHI; Bg, BglII; P, Pst I; S, Sall; Sc, SacI; Sp, SphI; T, EcoT22I; Xb, XbaI; Xh, XhoI.

2. 麹菌染色体 DNA のサザン解析

A. nidulans の *amdS* 遺伝子をプローブに用いて、麹菌の遺伝子ライブラリーから同様の酵素をコードする *amdS* 遺伝子をクローニングした。そこで、ここでクローニングした DNA 断片が麹菌の染色体 DNA に由来していることを確認するために、サザン解析を行った。

単離した 5 kb の断片の中に切断部位が存在しない制限酵素によって、遺伝子ライブラリーの作製に用いた RIB 40 の DNA を分解してアガロースゲル電気泳動し、5 kb の DNA 断片をプローブとしてサザン・ハイブリダイゼーションを行った。なお、ハイブリダイゼーション条件は 50% ホルムアミド存在下で 42℃で行った。図 2-47 にオートラジオグラムを示したが、いずれの制限酵素で分解しても 1 本のバンドにハイブリダイズすることがわかった。このことから、得られた DNA 断片は麹菌の染色体に由来し、かつ染色体に 1 コピー存在していることが示された。

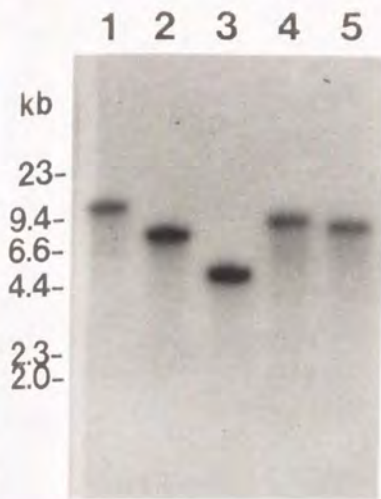


図 2-47 麹菌 RIB 40 のサザン解析

1, BamHI; 2, EcoRI; 3, SalI; 4, KpnI; 5, HindIII



図 2-48 各種麹菌株のサザン解析

1, λ /HindIII.; 2, *A. oryzae* RIB 40; 3, *A. oryzae* RIB 155; 4, *A. oryzae* RIB 203; 5, *A. oryzae* RIB 647; 6, *A. sojae* RIB 401; 7, *A. sojae* RIB 1045; 8, *A. awamori* RIB 2801. *EcoRI* で分解後、3.7 kb *SacI* 断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。

また、RIB 40 以外の麹菌 *A. oryzae* および非常に近縁の醤油麹菌 *A. sojae* の染色体を用いて、サザン解析を行ったが、図 2-48 の通り、RIB 40 と同様 1 本のバンドとのみハイブリダイズした。しかし、*A. oryzae* と *A. sojae* ではハイブリダイズするバンドのサイズが異なっており、種の違いによるものと思われる。一方、焼酎麹菌である *A. awamori* では麹菌の *amdS* と強くハイブリダイズするバンドは認められなかった。

3. 麹菌のアセトアミダーゼ遺伝子の確認

上で単離した 5 kb の DNA 断片に完全長のアセトアミダーゼ遺伝子が含まれ、正常に機能するとすれば、麹菌に多コピー導入されることによって、アセトアミド単一窒素源培地における生育が旺盛になるものと考えられる。たまたま、著者らがよく用いている形質転換用の宿主 M-2-3 は野性型の RIB 40 よりもアセトアミド培地での生育が悪いので、この菌株に得られた DNA 断片を導入して生育への影響を調べた。

pUC118 の *Sal*I 部位にサブクローニングされている DNA 断片の *Bam*HI 部位が *Sal*I 部位のすぐ近くにあるので、このプラスミドから *Bam*HI 断片として回収すれば、もとの断片のほぼ全長が含まれていることになる。この *Bam*HI 断片を pSal23 の *Bam*HI 部位に挿入して pSamd1 を構築した。こうして得られたプラスミドを *argB* 株である M-2-3 の形質転換に用いた。

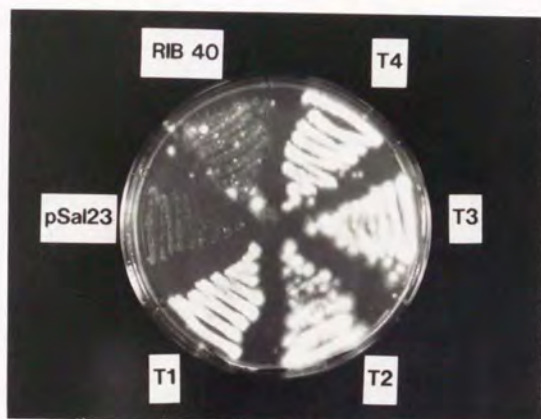


図 2-49 形質転換体のアセトアミド培地での生育

アセトアミド培地は、1% シュクロース、10 mM アセトアミド、15 mM CsCl を含む CD 培地を使用した。

得られた形質転換体のうち 4 株を選んで、アセトアミド単一窒素源培地に接種して生育を調べたところ、図 2-49 に示すように、RIB 40 および pSal23 で形質転換した対照株と比べて、生育が非常に旺盛になっていることがわかる。

この形質転換体の染色体 DNA のサザン解析を図 2-50 に示したが、全ての株で多コピーの DNA の組込みが起こっていた。また、4 株のうち 1 株 (T1) では麹菌の染色体の相同部位に組み込まれていることがわかった。

非相同部位に組み込まれた場合には、組み込まれた周辺の配列によって遺伝子の発現に影響がでるおそれがあるが、相同部位に組み込まれた形質転換

でもアセトアミド単一窒素源培地での生育が良いことから、導入されたDNA断片には機能することのできるアセトアミダーゼ遺伝子が含まれていると考えられた。また、ここではデータは示さなかったが菌体内のアセトアミダーゼ活性を測定すると、形質転換体では非常に高い値を示していた。

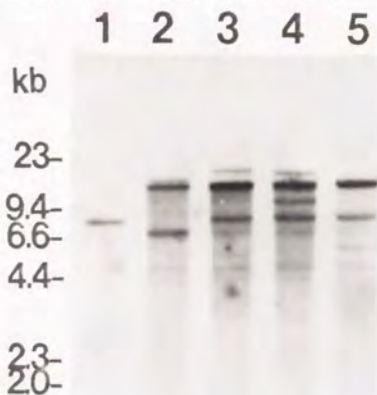


図 2-50 形質転換体のDNAのサザン解析

1, pSal23 による形質転換体; 2, T1; 3, T2; 4, T3; 5, T4. ブローブは 5 kb の *SalI* 断片を用いた。

また、得られたDNA断片に存在すると考えられるアセトアミダーゼ遺伝子が麹菌のアセトアミド資化能に関与していることを確認するために、遺伝子破壊実験を試みた。塩基配列から推定される酵素タンパクをコードしている領域のうち、アミノ末端側とカルボキシ末端側の両方を欠失しているDNA断片である 0.8 kb の *EcoT22I* 断片（図 2-46 参照）を pUC118 に挿入した。このプラスミドを *EcoRI* と *BamHI* で分解してこのDNA断片を回収し、pSal23 の *EcoRI*-*BamHI* 部位に挿入して遺伝子破壊用プラスミド pSΔamd1 を構築した。

プラスミドの不完全な *amdS* 内にある *XhoI* で切断し、直鎖状にして M-2-3

を形質転換した。得られた形質転換体のうち約 30 株を最少培地で 2～3 回継いでホモカリオンの状態にした後で、アセトアミドを単一窒素源とする培地に接種して生育を調べた。その結果、約 3 分の 1 の形質転換体は対照株に比べて、非常に生育が悪くなっていた。形質転換体の代表的なもののアセトアミド単一窒素源培地における生育を図 2-51 に示したが、pSal23 を用いて形質転換した対照株に比べて $\Delta amd24$ を除いて、生育が悪くなっていることがわかる。



図 2-51 遺伝子破壊株のアセトアミド培地での生育

アセトアミド培地は、1% シュクロース、10 mM アセトアミドを含む CD 培地を使用した。

これらの株から DNA を調製して、*EcoRI* で分解し、サザン解析を行ったが、このときに遺伝破壊株の予想されるハイブリダイゼーションパターンを図 2-52 に模式的に示した。すなわち、宿主の *EcoRI* 分解では 7.8 kb のバンドが 1 本生じるが、相同的に組換えが起こった遺伝子破壊株では 10.4 kb と 3.8 kb のバンドが新たに生じてくる。

図 2-51 の 6 株についてサザン解析を行った結果を図 2-53 に示したが、生育が悪くなった株は全て 7.8 kb のバンドが消失し新たに 10.4 kb と 3.8 kb のバンドが現れていることから、本来の染色体にある遺伝子が外から導入され

た不完全の遺伝子で破壊されたことが明らかになった。なお、これらの破壊株には 6.4 kb のバンドも出現しているが、このバンドは破壊用のプラスミド pSΔamd1 がタンデムに組み込まれたことに由来するものである。

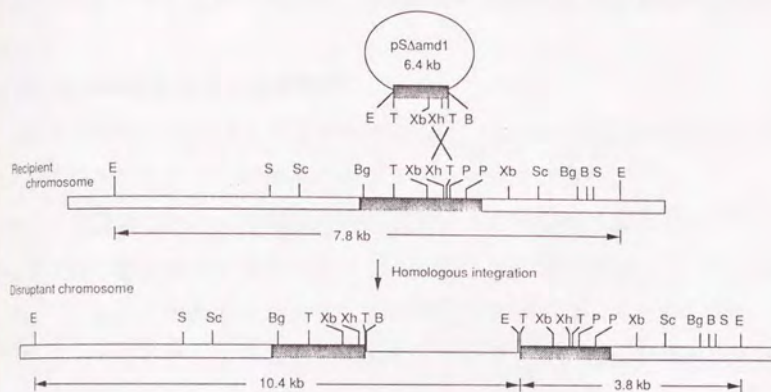


図 2-52 遺伝子破壊株のサザン解析で生じるバンドの模式図

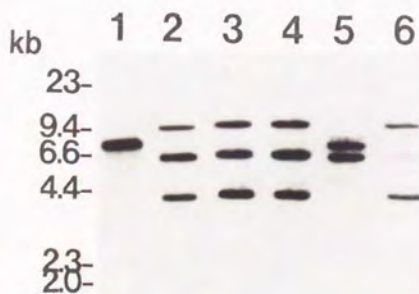


図 2-53 アセトアミダーゼ遺伝子の破壊株のサザン解析

1, pSal23による形質転換体; 2, Δamd4; 3, Δamd7; 4, Δamd8; 5, Δamd24; 6, Δamd37.
EcoRI で分解後、3.7 kb SacI 断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。

一方、生育のよい株では 7.8 kb のバンドが存在しており、遺伝子の破壊は起こっていないことがわかった。

これらのことから、5 kb の DNA 断片にはアセトアミダーゼをコードする遺伝子が存在することが示唆され、*A. nidulans* と同じように *amdS* と名付けた。

4. 麹菌の *amdS* 遺伝子の塩基配列

5 kb の *SacI* 断片にアセトアミダーゼをコードしている領域が含まれていることが示されたので、この部分の塩基配列の決定を試みた。

5 kb の全領域にわたって塩基配列を決定するのは困難であったので、はじめに部分的に塩基配列を決定した。その結果、*SacI* 断片の中にコード領域が含まれていることがわかったので、この断片をサブクローニングして、デレーション・ミュータントを作製し塩基配列を決定した。なお、塩基配列はセンスおよびアンチセンスの両方の 1 本鎖 DNA について調べた。

図 2-54 にコード領域を含む約 3 kb の塩基配列を示した。タンパクのコード領域は *A. nidulans* のアセトアミダーゼのアミノ酸配列¹⁵¹⁾と比較して決定した。また、イントロンの存在箇所についても *A. nidulans* のアセトアミダーゼとの比較により推定した。そのため、イントロンの正確な位置等は今後 cDNA を単離して確認しておく必要があると思われる。

1) *amdS* 遺伝子のコードするタンパクのアミノ酸配列とコドン使用頻度

麹菌のアセトアミダーゼ遺伝子は、6 個のイントロンが存在し、545 個のアミノ酸からなるタンパクをコードしていた。*A. nidulans* のアセトアミダーゼが 548 個のアミノ酸からなる¹⁵¹⁾ことを考えれば、この 2 つの酵素は非常によく似ていることがわかる。実際、塩基配列から推定される麹菌のアセトアミダーゼのアミノ酸配列は、*A. nidulans* のものと約 70% のホモロジーがあった。図 2-55 に麹菌と *A. nidulans* のアセトアミダーゼのアミノ酸配列の比較を示したが、ホモロジーは酵素タンパクの全般にわたって認められた。また、ホモロジーを同一アミノ酸だけでなく同種のアミノ酸も含めて計算す

caatcagtcgtgtagaatgctggaccagccccgaaagcactcccaggcttggtgaatttata -301
 atggtaaagcaatgggttatctcatgtgggtccagacaactcccagaaccacatggccaag -241
 ataaacacagagataaaccgggttttatcgcccaattaaaagctaaaaagcctcacttatgct -181
 tccattttctccttgccggtccggtatggccgcgatgcaaaagttgaggttgccggggtaac -121
 ccaaatgtgagacttgaggttgagagataataagcaacgtacggccatgggtcaatgttctg -61
 tggaaacaccaggtgattgtctctaccatcgctctacagctgtatttatcactttgtcaact -1
 ATG CCA TCT GCC AGC TGG GAA GAT CTC GCT GCC GAC AAG AGG GCA 45
 Met Pro Ser Ala Ser Trp Glu Asp Leu Ala Ala Asp Lys Arg Ala 15
 CGT TTG GAG AAG TCC ATC CCC GAC GAA TGG AAA TTC AAG TCA GTC 90
 Arg Leu Glu Lys Ser Ile Pro Asp Glu Trp Lys Phe Lys Ser Val 30
 CCA ATA GAA GGC TCG GTC ATC GAT CTA CCT GAG AAG TCT GGG ATT 135
 Pro Ile Glu Gly Ser Val Ile Asp Leu Pro Glu Lys Ser Gly Ile 45
 CTG TCG CCT TCT GAA ATA AAG ATT ACA AAC TCG TCT GCC ACA GAA 180
 Leu Ser Pro Ser Glu Ile Lys Ile Thr Asn Ser Ser Ala Thr Glu 60
 CTT GTC GCT CAA TTA GCC AAT GGC ACG TTG AAG TCC GTG GAT GTG 225
 Leu Val Ala Gln Leu Ala Asn Gly Thr Leu Lys Ser Val Asp Val 75
 ACA CTC GCA TTC TGT AAA AGA GCT GCA CTG GCT CAT CAA CTT gtgg 271
 Thr Leu Ala Phe Cys Lys Arg Ala Ala Leu Ala His Gln Leu 89
 gtataaccttcgctcgatcgagagatacatgaaactaatgagaataa GTT AAT TGC 327
 Intron I Val Asn Cys 92
 GCA CAT GAC TTC TTC CCA GAG CTA GCA CTA GCC CAG GCC AGG GAA 372
 Ala His Asp Phe Phe Pro Glu Leu Ala Leu Ala Gln Ala Arg Glu 107
 CTT GAT CGG TAT TTC GAG ACG CAC AAG AAA CCC GTG GGA CCA TTG 417
 Leu Asp Arg Tyr Phe Glu Thr His Lys Lys Pro Val Gly Pro Leu 122
 CAT GGA TTA CCG ATT TCT TTG AAA GAC CAA TTA CGA GTC AAG gtaa 463
 His Gly Leu Pro Ile Ser Leu Lys Asp Gln Leu Arg Val Lys 136
 gacgagcttcctacactctgtgtgcctctcttctaacatagaactaa GGA ACT GAA 520
 Intron II Gly Thr Glu 139
 ACA TGC ATG GCC TAT ATC TCT TGG CTG GGT AAG CGC GAC ACC AGC 565
 Thr Cys Met Ala Tyr Ile Ser Trp Leu Gly Lys Arg Asp Thr Ser 154
 GAT TCG ATA TTG ACT GCC CTC TTG AGA AAA GCG GGC GCA GTA TTC 610
 Asp Ser Ile Leu Thr Ala Leu Leu Arg Lys Ala Gly Ala Val Phe 169
 CTT GTT AAG ACG AGT GTA CCA CAA ACA CTG ATG GTA TGT GAG ACC 655
 Leu Val Lys Thr Ser Val Pro Gln Thr Leu Met Val Cys Glu Thr 184
 GTC AAT AAT ATT ATC GGT CGG ACA TCG AAC CCA AGG AAT CTC AAC 700
 Val Asn Asn Ile Ile Gly Arg Thr Ser Asn Pro Arg Asn Leu Asn 199
 CTT TCT TGC GGT GGT AGT TCG GGA GGC GAA GGT GCC ATG ATT GCA 745
 Leu Ser Cys Gly Gly Ser Ser Gly Gly Glu Gly Ala Met Ile Ala 214
 ATG CGT GGA GGC GCC ATC GGT ATA GGA ACT GAT ATC G gtagctatcc 792
 Met Arg Gly Gly Ala Ile Gly Ile Gly Thr Asp Ile 226
 atacttggttcacagttattctggcgactaatgatatacag GT GGA TCT ATT CGT 848
 Intron III Gly Gly Ser Ile Arg 231
 GTC CCA GCC GCA TTC AAC TCC TTG TAT GGG ATT CGT CCA AGT CAC 893
 Val Pro Ala Ala Phe Asn Ser Leu Tyr Gly Ile Arg Pro Ser His 246
 GAT CGT CTG CCT TAC GGT GGT ATG ACG AAC AGC ATG GAA GGT CAG 938
 Asp Arg Leu Pro Tyr Gly Gly Met Thr Asn Ser Met Glu Gly Gln 261
 GAA ACG ATA CAC AGC GTC GTT GGA CCA ATT GCG CAT TCT GCT CAA 983
 Glu Thr Ile His Ser Val Val Gly Pro Ile Ala His Ser Ala Gln 276
 G gtagggatctgggatatttcttcgcgtcgagataactgaatgctttctaa AT GTC AGA 1040
 Intron IV Asp Val Arg 279
 CTC TTC CTT CAG TCT GTC CTT AAG GAG GAA CCT TGG AAG TAT GAT 1085
 Leu Phe Leu Gln Ser Val Leu Lys Glu Glu Pro Trp Lys Tyr Asp 294

TCG AAA GTC ATA CCG CTT CCT TGG AGG GAG GCC GAG GAG AAC GCC	1130
Ser Lys Val Ile Pro Leu Pro Trp Arg Glu Ala Glu Glu Asn Ala	309
GCC CAA GCA AAA ATT GCT GAG AAG AGT CTA AAT TTC GCA TTT TAC	1175
Ala Gln Ala Lys Ile Ala Glu Lys Ser Leu Asn Phe Ala Phe Tyr	324
GAT TTT GAT GGC GTT <u>gtaagtattagtcgctcctcctccttcgcaatcatgcctg</u>	1230
Asp Phe Asp Gly Val Intron V	329
<u>acagttggataag</u> GTA CGT CCT CAC CCT CCG ATT ACT CGT GGC GTT GAG	1279
Val Arg Pro His Pro Pro Ile Thr Arg Gly Val Glu	341
ATC GTC CGG TCT ACG CTC GAG AAG GAC GGA CAT ACC GTG GCA CCC	1324
Ile Val Arg Ser Thr Leu Glu Lys Asp Gly His Thr Val Ala Pro	356
TGG ACA CCC TAC AAG CAT GCA TTT GCC GTA GAT TTA GCC AAC AAA	1369
Trp Thr Pro Tyr Lys His Ala Phe Ala Val Asp Leu Ala Asn Lys	371
ATC TAC GCT GCA GAT GGA AGC ACG <u>gtaagtagccccctaaagaaaattagtat</u>	1422
Ile Tyr Ala Ala Asp Gly Ser Thr Intron VI	379
<u>acgtcctaacatattgtaag</u> GAT GTT TAC AAG CAC ATC AAC GCC TCA GGA	1471
Asp Val Tyr Lys His Ile Asn Ala Ser Gly	389
GAA CCC GCT ATT CCG AAC ATC AAG GAC CTC ATG AAT CCC AAC CTA	1516
Glu Pro Ala Ile Pro Asn Ile Lys Asp Leu Met Asn Pro Asn Leu	404
CCC AAG GCA GAT CTG AAT GAG GTA TGG GAC GCG CAG CTG CAA AAA	1561
Pro Lys Ala Asp Leu Asn Glu Val Trp Asp Ala Gln Leu Gln Lys	419
TGG CGT TAT CAG TGT GAA TAC CTT GAC AAA TGG CGC GAA TGG GAG	1606
Trp Arg Tyr Gln Gys Glu Tyr Leu Asp Lys Trp Arg Glu Trp Glu	434
GAA CGG ACG GGC AAG GAG CTT GAC GCT ATC ATC GCC CCG GTG GCG	1651
Glu Arg Thr Gly Lys Glu Leu Asp Ala Ile Ile Ala Pro Val Ala	449
GCG ACA GCT GCA GTC CGC CAC AAC CAA TTC CGG TAC TAT GGG TAT	1696
Ala Thr Ala Ala Val Arg His Asn Gln Phe Arg Tyr Tyr Gly Tyr	464
GCT ACT GTC TTT AAC GTG TTA GAT TAC ACC AGT GTT GTT GTC CCG	1741
Ala Thr Val Phe Asn Val Leu Asp Tyr Thr Ser Val Val Val Pro	479
GTT ACC TAT GCA GAC AAG GCG GTG GAT CAC AGA TTG GCG GAT TAT	1786
Val Thr Tyr Ala Asp Lys Ala Val Asp His Arg Leu Ala Asp Tyr	494
CAG CCG GTT AGT GAT ATG GAT AAG GCG GTT TAT GCG GAG TAT GAT	1831
Gln Pro Val Ser Asp Met Asp Lys Ala Val Tyr Ala Glu Tyr Asp	509
CCC GAG GTT TAT CAT GGC GCA CCC GTT GCC GTG CAG ATT ATC GGC	1876
Pro Glu Val Tyr His Gly Ala Pro Val Ala Val Gln Ile Ile Gly	524
AGA CGT CTT AGT GAG GAG CGG ACC CTG GCT ATT GCG GAG TAT GTT	1921
Arg Arg Leu Ser Glu Glu Arg Thr Leu Ala Ile Ala Glu Tyr Val	539
GGG AAG TTG TTA GGT CAC TAG <u>ctttcaagctcagtttttagccactacttgaag</u>	1974
Gly Lys Leu Leu Gly His ***	545
<u>cgtctttgtcgagtgagactactgtaattagcataccatttacgaggccacgcccagtat</u>	2034
<u>ttcgccattcaaaagcagcttatatcgatccatgggttggtctgatatatgggtagcttat</u>	2094
<u>aatctccactcctcgattccgaagataccccaaaatcctttacaatctgtctaatgcct</u>	2154
<u>tgtgtaatggcgccacatccacaaggtcggtgtcatcttttcgagccgtaattgtttctacc</u>	2214
<u>aaggatgtactaatgacactccttgacagcttagacctactacgcaagcctcggttatgtg</u>	2274
<u>tgtcagagacaaaataagcactatctaga</u>	2302

図 2-54 麹菌アセトアミダーゼ遺伝子の全塩基配列とアミノ酸配列

5'上流領域に存在する TATA および CAAT 配列は二重下線で示した。また、イントロン内のコンセンサス配列は下線で示した。

ると約85% となり、非常に高いホモロジーが得られた。

AOAMDS:	MPSASWEDLAADKRRARLEKSIPEDEWKFSV...PIEGSVIDLPEKSGILSPSEIKITNSSATELVQAQNGT-LKSVDTVLT	77
ANAMDS:	QS- E A T --- QTL A D F K EA L EA AD SK -AGE T E	76
AOAMDS:	AFCKRAALAHQLVNCAHDFPELALAQARELDYFETHKKPVGPHGLPISLKDQLRVKGTETCMAYISWLGRKRTSDSIL	158
ANAMDS:	I Q T E DA E YAK R Y S G N Y EG V	157
AOAMDS:	TALLRKAGAVFLVKTSVPQTLMCVETVNNIIIGRTSNPRNLNLSCGSSGGEGAMIAM-RGGAIGIGTDIGGSIRVPAAFNS	238
ANAMDS:	TM Y V K W - VGI V V F	237
AOAMDS:	LYGIRPSHDLRPLPYGGMTNSMEGQETIHSVVGPIAHSQDVRFLQSVLKEEPWKYDSKVIPLPWREAEENAAQA-KIAEKS	318
ANAMDS:	L G AK A D V T VE L TK GQ M QS SDII- S - N	315
AOAMDS:	--LNFAFYDFDGVVRPHFPITRGVEI-VRSTLEKDGHVAPWTPYKHAFVDLANKIYAADGSTDVYKHINASGEPAIPNI	396
ANAMDS:	GG IGY N N L L TT AA- A T D GH ISH A MRD S	395
AOAMDS:	KDLNPNLPAKDL-NEVMDAQLQKWRYQCEYLDKWEWEERTGKELDAIIPVAATAAVRHNQFRYYGYATVFNVDYTSV	476
ANAMDS:	L I- VNM L TH N M E A KA ITP D S I L F	475
AOAMDS:	VVPVTYADKAVDHRL-...ADYQPVSDMDKA-VYAEYDPEVYHGAPVAVQIIGRRLSEERTLAIAEYVYVGLLGH-...	545
ANAMDS:	F NI KKNESFK EL - L QE A V E NVVTP	548

図 2-55 麹菌と *A. nidulans* のアセトアミダーゼのアミノ酸配列の比較

AOAMDS, 麹菌のアセトアミダーゼ; ANAMDS, *A. nidulans* のアセトアミダーゼ

なお、最近酵母 *S. cerevisiae* からアミダーゼ様のタンパクをコードしている遺伝子が単離され、その塩基配列から推定されるアミノ酸配列は *A.*

nidulans のアセトアミダーゼと約 40% のホモロジーが認められている¹⁵²⁾。

酵母と *A. nidulans* のアミダーゼで一致しているアミノ酸は麹菌のアセトアミダーゼでも一致しており、これらの 3 種の酵素はよく似ていることが示された。

麹菌の *amdS* ではアミノ酸をコードする 61 個のコドン全てが使用されており、コドンの使用頻度に偏りは認められなかった(表 2-28)。カビの遺伝子でも発現量が多いものではコドンの使用頻度に偏りがあり、またコドンの 3 番目の塩基が G か C である傾向が認められている¹⁵³⁾。一方、発現量の低い遺伝子ではこれらの傾向が少ないといわれている。麹菌の *amdS* ではコド

の使用頻度に偏りがなく、コドンの3番目の塩基の G+C の割合は 51% と偏ってはいなかった。麹菌と比較するために *A. nidulans* の *amdS* のコドンの使用頻度を表 2-30 に併せて示してあるが、*A. nidulans* の *amdS* では麹菌のものよりもコドンに偏りが認められる。これらのことから、麹菌の *amdS* は発現量が低い遺伝子であって、*A. nidulans* の *amdS* はこれよりも発現量が高い可能性があると考えられる。

表 2-28 麹菌のアセトアミダーゼ遺伝子のコドン使用頻度

aa	codon	Ao ^a	An ^b	aa	codon	Ao ^a	An ^b	aa	codon	Ao ^a	An ^b	aa	codon	Ao ^a	An ^b
Phe	TTT	4	1	Ser	TCT	11	5	Tyr	TAT	13	4	Cys	TGT	3	1
	TTC	10	13		TCC	3	9		TAC	8	16		TGC	3	3
	Leu	TTA	6		1	TCA	2		3	TAA	0		0	Stop	TGA
TTG		10	3		TCG	7	6	Stop	TAG	1	1	Trp	TGG	10	10
Leu	CTT	11	6	Pro	CCT	7	7	His	CAT	7	6	Arg	CGT	9	1
	CTC	7	17		CCC	9	4		CAC	8	8		CGC	3	9
	CTA	5	5		CCA	9	8		CAA	8	1		CGA	1	2
	CTG	7	14		CCG	7	12	Gln	CAG	7	14		CGG	6	6
Ile	ATT	13	9	Thr	ACT	5	1	Asn	AAT	8	6	Ser	AGT	7	6
	ATC	13	25		ACC	6	13		AAC	12	17		AGC	5	5
	ATA	6	0		ACA	8	5		AAA	9	12	AGA	5	2	
Met	ATG	9	10		ACG	8	10	Lys	AAG	23	23	Arg	AGG	4	3
Val	GTT	14	14	Ala	GCT	12	7	Asp	GAT	21	14	Gly	GGT	11	12
	GTC	14	14		GCC	19	20		GAC	11	15		GGC	10	14
	GTA	6	3		GCA	17	13		GAA	15	17		GGA	11	4
	GTC	8	13		GCG	10	14	Glu	GAG	20	22		GGG	4	11

^a *A. oryzae* *amdS*

^b *A. nidulans* *amdS* (Corrick et al., 1987)

2) 麹菌の *amdS* 遺伝子の塩基配列の特徴

麹菌と *A. nidulans* の *amdS* 遺伝子のコード領域の塩基配列のホモロジーは約 58% であり、イントロンに関してはスプライシング周辺以外はほとんどホモロジーがなかった。また、5' 上流領域および 3' 下流領域にホモロジーは認められなかった。

麹菌の *amdS* にはイントロンが 6 個存在することが予想されたが、これらのうち IVS 1、IVS 2 と IVS 4 の 3 つは *A. nidulans* の遺伝子とほとんど同じ部位に存在しているが、そのほかの 3 個のイントロンは麹菌の遺伝子にのみ認められた。6 個のイントロンはすべて 5'-GT/AG-3' 則に従っており、3' 側

のスプライシング部位の約 10 bp 上流にスプライシングに必要なラリアート構造の形成に関与すると考えられる真核生物の遺伝子に共通する配列 5'-RCTRAC-3' (R はプリン塩基を表わす) が存在していた。麹菌と *A. nidulans* は同じ *Aspergillus* 属に属しているが、麹菌の *amdS* 遺伝子でイントロンが 3 個も余計にあるということは、麹菌と *A. nidulans* が進化的にある程度隔たっている関係にあることを示すのかも知れない。しかし、*amdS* 以外にこれまで麹菌と *A. nidulans* で、同じ機能のある酵素タンパクをコードする遺伝子の構造が解析された例がないので、これ以上の推論は避け、今後の研究の結果を待ちたい。

麹菌の *amdS* の 5' 上流領域には真核生物の遺伝子のプロモーターに共通して存在する配列が見いだされた。遺伝子の転写開始に関与すると考えられる TATA 配列が -90 (翻訳開始点を +1 とする) に存在し、CAAT 配列が -175 に存在した。そこで、転写開始点は TATA 配列と翻訳開始点の ATG の間にあると考えられるが、プライマー伸長法または S1 マッピング法による転写開始点の決定を行っていないので、正確な部位は不明である。*amdS* の 3' 下流領域にはポリアデニル化のシグナルと考えられている AATAAA 配列が認められなかった。しかし、この配列はカビの遺伝子に一般的に見いだされるわけではない¹⁵³⁾ので、*amdS* に存在していないのが例外というわけではない。

5. 麹菌の *amdS* 遺伝子の発現

前で述べたように、ここでクローニングした *amdS* 遺伝子を麹菌に導入することによって、アセトアミド培地での生育が旺盛になること、また反対に遺伝子破壊すると生育が極端に悪くなることから、この遺伝子が麹菌で正常に機能してアセトアミドの資化に関与していることが示唆された。そこで、ここでは麹菌でこの遺伝子が発現していることをノーザン解析によって確認した。

A. nidulans の *amdS* の発現は、炭素源として酢酸によって誘導されること、

また窒素源としては β -アラニンやアセトアミドで誘導されることが明らかにされている¹⁵⁴⁾ので、麹菌 RIB 40 をこれらの物質を含む培地で培養し、全 RNA を調製した。CD 培地のグルコースおよび NaNO_3 の代わりに 50 mM のアセトアミドまたは 50 mM 酢酸ナトリウムと 50 mM の β -アラニンを含む液体培地で麹菌を 30℃、20 時間培養し、実験方法に記載した方法で菌体から全 RNA を抽出した。約 20 μg の RNA をホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動で分離し、*amdS* を含む 5 kb の *SalI* 断片をプローブとしてノーザン・ハイブリダイゼーションを行った (図 2-56A)。

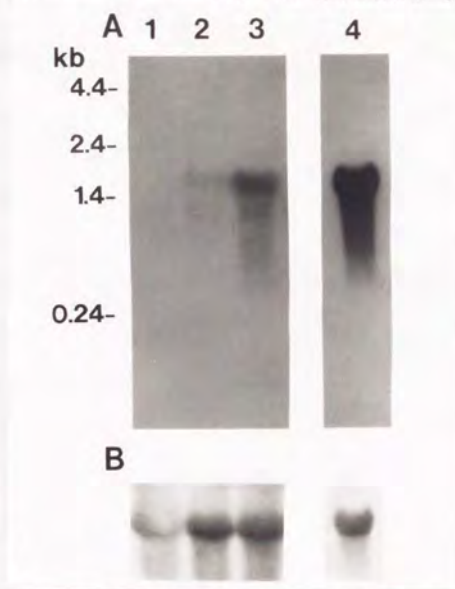


図 2-56 麹菌の *amdS* 遺伝子のノーザン解析

1, RIB 40 を CD 培地で培養した菌体からの RNA; 2, RIB 40 をアセトアミドを単一炭素源及び窒素源とする培地で培養した菌体の RNA; 3, RIB 40 を酢酸と β -アラニンを炭素源と窒素源にした培地で培養した菌体の RNA; 4, 形質転換体 T1 を酢酸と β -アラニンを炭素源と窒素源とする培地で培養した菌体の RNA。誘導されると考えられる条件で培養した菌体で、プローブとハイブリダイズするバンドが認められた。酢酸と β -アラニンをそれぞれ炭素源と窒素源に用いて培養した場合の方が、アセトアミドを炭素源および窒素源に用いた場合よりも *amdS* の mRNA に相当するバンドのシグナルが強かった。一方、

対照として通常の CD 培地で培養した菌体から調製した RNA を用いたが、プローブとハイブリダイズするバンドは検出されなかった。メンブレンから *amdS* のプローブを除いた後、麴菌の β -チューブリン遺伝子をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った結果を図 2-56B に示したが、ゲルにのせた RNA 量とメンブレンにトランスファーされた RNA 量はいずれの培養のものでもほぼ同じであることがわかる。

さらに、前に pSamd1 で形質転換して得られた株のうち、相同部位に組み込まれた形質転換体 T1 を用いて、酢酸と β -アラニンを含む培地で培養して RNA を調製し、ノーザン解析を行った結果、図 2-56A に示すように非常に強くハイブリダイズするバンドが認められた。このことから、麴菌でも *A. nidulans* と同じように *amdS* はアセトアミドや酢酸および β -アラニンで発現が誘導されることが明らかになった。

6. 麴菌の *amdS* 遺伝子の優性マーカーとしての利用

麴菌の *amdS* 遺伝子を pSal23 に挿入して形質転換した株は、アセトアミド単一窒素源培地で、pSal23 による形質転換体に比較して非常に旺盛な生育を示したことから、栄養要求性のない実用麴菌の形質転換のマーカーとして利用できることが予想された。そこで、M-2-3 の親株で栄養要求性のない FN-16 株を宿主とする形質転換について検討した。

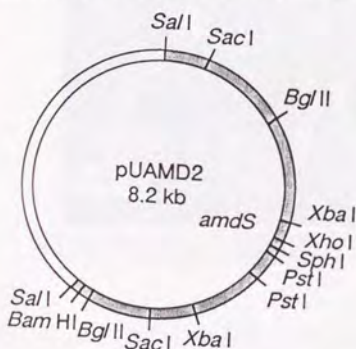


図 2-57 pUAMD2 の構造

麴菌の *amdS* を含む 5 kb の *SalI* 断片を pUC118 にサブクローニングした

pUAMD2 (図 2-57) と *A. nidulans* の *amdS* 遺伝子をもつ p3SR2 を使用して FN-16 の形質転換を行った。形質転換体の再生・選択培地は、当初実験方法に記載した培地に浸透圧調節剤として 0.8 M NaCl を加えたものを用いていたが、プラスミド無添加の対照でもかなり良い生育が見られたので、*A. nidulans* や *A. niger* で用いられているように、1.0 M のシュクロースを浸透圧調節剤と炭素源とする培地に変更した。この培地では、対照の未形質転換体の生育が抑えられるのに反して、*amdS* が導入され多コピーとなった株ではバックグラウンドと識別できるほど十分な生育を示す。麹菌および *A. nidulans* の *amdS* をもつプラスミドで形質転換した場合のプレートの写真を図 2-58 に示した。DNA 無添加のプレートでは生育の旺盛なコロニーは観察されないが、pUAMD2 および p3SR2 で形質転換したプレートでは 3～4 個程度の生育の良好なコロニーとそれよりも生育が遅い小さなコロニーが認められる。これらのコロニーは、アセトアミド単一窒素源培地に釣菌して生育の程度を調べることによって、真の形質転換体かどうか確認できた。

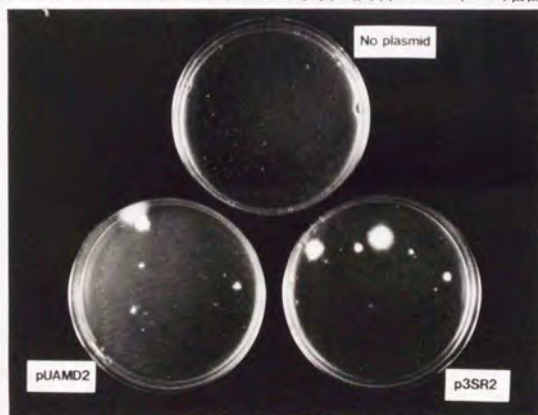


図 2-58 pUAMD2 と p3SR2 を用いて形質転換した時のプレート

pUAMD2 と p3SR2 を用いて得られた形質転換体 3 株ずつのサザン解析を行った結果を図 2-59 に示した。pUAMD2 による形質転換体は 3 株ともに多

コピーの組み込みが起こっていたが、p3SR2 による形質転換体では 1 株のみ多コピーで他の株はコピー数は少なかった。これは使用したプラスミドに特徴的な現象なのか解析した株の数が少なくて結論付けられないが、前に述べたように麹菌の *amdS* は発現量が低い可能性が示唆されているので、染色体に多コピー組み込まれることによって、アセトアミドを効率よく利用できるようになるのではないかと考えられる。多コピーのプラスミドが組み込まれないと形質転換体として単離できないということは、形質転換頻度が低くなるという欠点がある反面、得られた株には目的の DNA が多コピー存在しているという実用上の有利な面がある。pUAMD2 を用いた場合、多コピーとなる現象が常に認められるのかは、今後さらに調べる必要があろう。

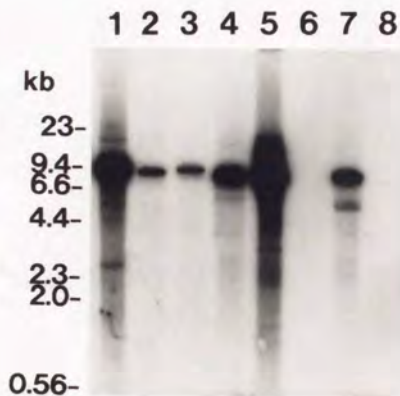


図 2-59 形質転換体のサザン解析

1-3, p3SR2 による形質転換体; 4,5,7, pUAMD2 による形質転換体; 6, FN-16; 8, λ /HindIII.
pUC118 をプローブにしてハイブリダイゼーションを行った。

7. プロモーター領域の変換による形質転換頻度の改良

上で述べたように、麹菌の *amdS* 遺伝子を用いて実用菌株 FN-16 の形質転換が可能であることがわかったが、形質転換頻度が低いこと、形質転換体がコロニーとして識別できるまで 2 週間はかかることなど不都合な点もある。

その原因として、*amdS* の発現量が低いことが考えられたので、高発現している麹菌の α -アミラーゼ遺伝子のプロモーターを利用して、*amdS* の発現量をあげることによってこれらの欠点を改良することを試みた。

麹菌の α -アミラーゼ遺伝子のプロモーターは、すでに著者らのグループの多田によって単離されており¹²⁴⁾、これを利用して異種の遺伝子、例えば大腸菌の β -グルクロニダーゼ遺伝子¹²⁹⁾やヒト・リゾチーム遺伝子¹²⁸⁾などの発現に成功している。

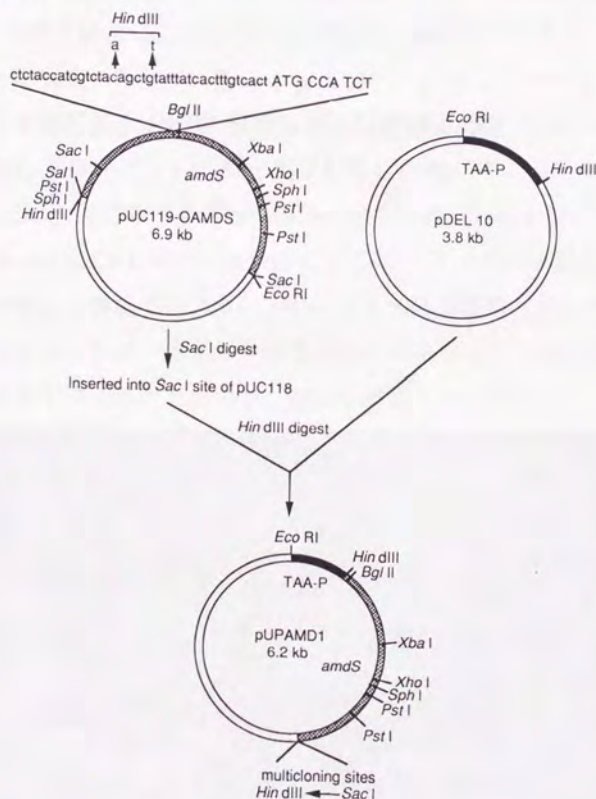


図 2-60 pUPAMD1 の構築

このような異種遺伝子の発現のために、 α -アミラーゼ遺伝子のプロモーター

ター領域のみをもつプラスミド pDEL10¹²⁹⁾が構築されており、これは α -アミラーゼ遺伝子の翻訳開始点の上流 -10 bp から -617 bp までを含んでいる。そしてこの約 600 bp の配列があれば、デンプンやマルトースによる誘導的な発現に十分であることも明らかになっている。そこで、*amdS* 遺伝子と α -アミラーゼ遺伝子のプロモーターを交換したプラスミドを図 2-60 のような手順で構築した。

はじめに *amdS* の翻訳開始点の上流 -15 bp のところに *in vitro* mutagenesis により *Hind*III 部位を新たに作製した。その後で、*Hind*III で分解し、*amdS* のプロモーターを欠失した DNA 断片を pDEL10 の α -アミラーゼ遺伝子のプロモーターの下流にある *Hind*III 部位に挿入して pUPAMD1 を構築した。

この pUPAMD1 を用いて FN-16 株を形質転換した時のプレートの写真を図 2-61 に示した。なおこの時の形質転換体の再生・選択培地には、浸透圧調節剤として 0.8 M NaCl を用い、炭素源としては α -アミラーゼ遺伝子のプロモーターが効率よく機能するように 1% マルトースを使用した。ややバックグラウンドも高かったが、形質転換体と考えられるコロニーが 1 週間程度で出現し、分生子もよく着生したので、識別は容易であった。

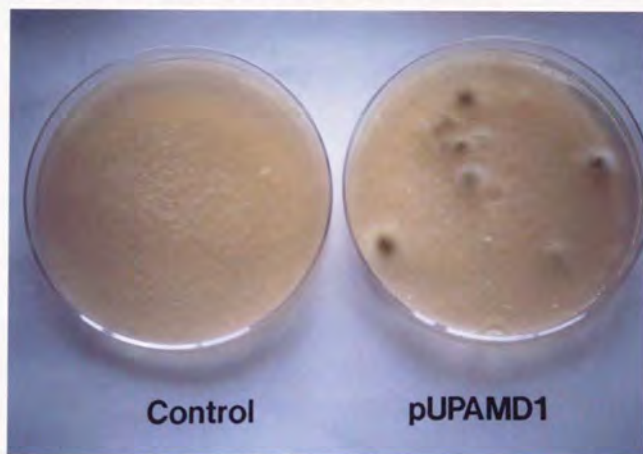


図 2-61 pUPAMD1 を用いて形質転換した時のプレート

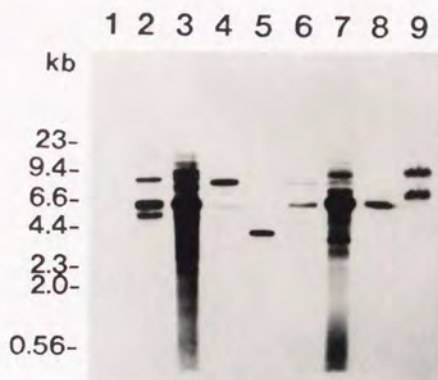


図 2-62 形質転換体のサザン解析

1, FN-16; 2-9, pUPAMD1 による形質転換体。プローブは pUC118 を用いた。

形質転換体の DNA を調製し、サザン解析を行った結果、全てにプラスミド由来のシグナルが検出された（図 2-62）。また、シグナルのパターンから、ここで得られた形質転換体では pUAMD2 を用いた場合とは異なり、多コピーの DNA が組み込まれている株は少なかった。

表 2-29 p3SR2、pUAMD2 と pUPAMD1 を用いた形質転換頻度

Plasmid (10 μ g)	No. of transformants	
	Exp. 1	Exp. 2
p3SR2	1	4
pUAMD2	2	3
pUPAMD1	12	14

表 2-29 には p3SR2、pUAMD2 それに pUPAMD1 を用いて FN-16 の形質転換を 2 回繰り返した時の形質転換体数を示した。この表からも明らかなように、プロモーターを α -アミラーゼ遺伝子のものに代えた pUPAMD1 を用いることによって、形質転換頻度は 4 ～ 6 倍に上昇した。また、形質転換体の

コロニーが出現してくるまでの期間も2分の1程度に短縮できることがわかった。しかし、pUAMD2を用いた場合ほど染色体に組み込まれるDNAのコピー数は高くないことが示唆された。

考 察

ここでは、麴菌のアセトアミダーゼ遺伝子を優性マーカーとして実用の麴菌株の形質転換が可能であることを示すことができた。はじめに炭素源または窒素源の資化に関与する遺伝子として代表的な *A. nidulans* のアセトアミダーゼ遺伝子を優性マーカーとして利用することを考えた。しかし、麴菌はアセトアミドの単一窒素源培地で生育できるので、麴菌にもアセトアミダーゼに相当する酵素が存在するものと考えられた。アセトアミドは窒素源としてはあまり利用しやすい化合物ではなく、野生型の株でも他の窒素源に比較して、旺盛な生育が見られるわけではない。そして *A. nidulans* の野生型株でもさらに外からアセトアミダーゼ遺伝子を導入すると、遺伝子増幅効果によって発現量を多くなるため、アセトアミド単一窒素源培地で生育が旺盛になる。これらの知見をもとに、麴菌のアセトアミダーゼ遺伝子をクローニングして、優性マーカーとして利用できないか検討した結果、マーカーとして十分に使用できることがわかった。

A. nidulans のアセトアミダーゼ遺伝子をプローブとして、麴菌の遺伝子ライブラリーからブラーク・ハイブリダイゼーションによって、麴菌のアセトアミダーゼ遺伝子をクローニングした。この遺伝子を pSal23 につないで麴菌を形質転換すると、得られた株はアセトアミド単一窒素源培地で旺盛に生育することができた。サザン解析によって、多コピーのDNAが組み込まれていることが明らかになり、麴菌でも *A. nidulans* と同じように遺伝子増幅効果が認められ、生育が旺盛になったものと考えられる。このことはクローニン

ゲした遺伝子が生物活性のある酵素を実際にコードしており、発現もしていることを示している。

しかし、正確にはアセトアミダーゼ欠損変異株に導入して確認する必要があるが、麹菌ではそのような株がない。そこで遺伝子破壊を行ってみたところ、サザン解析によって遺伝子が破壊されたと考えられる株は、アセトアミド単一窒素源培地での生育が非常に抑えられていた。全く生育が認められなくなるということはなかったが、麹菌のアセトアミドの資化にとってアセトアミダーゼが重要な役割を果していることが示唆された。また、ここで採用した遺伝子破壊の方法が、麹菌の遺伝子の構造や機能を調べる上で非常に有効であることも示されたと考える。

麹菌のアセトアミダーゼ遺伝子のコード領域、アミノ酸配列、イントロンの存在位置などは *A. nidulans* の遺伝子を参考にして決定したが、この推定を支持するいくつかの特徴が認められている。すなわち、翻訳開始点と考えられる ATG の -90 bp 上流に真核生物のプロモーターに普遍的に存在する TATA 配列が見いだされ、その上流には CAAT 配列も見いだされた。また、イントロンは全て GT-AG 則を満たしており、スプライシングの際のラリアート構造の形成に関与する共通配列も存在した。このことは、特に *A. nidulans* の遺伝子には認められない3つのイントロンが実際に存在していることを示しているものと考えられる。これらのイントロンを除いてアミノ酸配列を推定すると、*A. nidulans* の酵素と約 70% の高いホモロジーを示すこと、またノーザン解析から転写された産物は約 1.8 kb であることも、3つの余分のイントロンの存在を支持している。

麹菌のアセトアミダーゼ遺伝子は、コドン使用頻度の特徴から発現量が低い遺伝子に分類されることが考えられる。*Aspergillus* の遺伝子は酵母や *N. crassa* に比較して、それほどコドンの使用頻度に偏りはないが、発現量が高いと考えられている遺伝子はコドンの3番目の塩基がGかCである率が高くAであることは稀である¹⁵³⁾。例えば、*A. nidulans* の解糖系の酵素であるグリセルア

ルデヒド 3 リン酸脱水素酵素遺伝子 (*gpdA*) ではコドンの 3 番目の塩基の G+C は 79% であり¹⁵⁵⁾、ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子 (*pgkA*) は 70% であった¹⁵⁶⁾。また、A である割合はそれぞれ 2% と 5% と非常に低いのが特徴であった。一方、発現量が低いとされているトリプトファン合成酵素遺伝子 (*trpC*)¹⁵⁷⁾ とオルニチン・カルバモイルトランスフェラーゼ遺伝子 (*argB*)¹⁰¹⁾ では G+C はそれぞれ 51% と 62% であり、偏りは高くない。麹菌の *amdS* 遺伝子はコドンの 3 番目の G+C が 51% と低く、A である割合が 20% と比較的高いという発現量の低い遺伝子の特徴を示していた。また、ノーザン解析からも、アセトアミドや酢酸等で誘導をかけても構成的に発現している β -チューブリン遺伝子よりも転写産物が少ないことが認められるので、発現量の低い遺伝子であることが考えられる。しかし、麹菌の遺伝子では、発現が強いと考えられている α -アミラーゼ遺伝子で G+C が 66% であり¹²⁴⁾、グルコアミラーゼ遺伝子でも 59%¹⁵⁸⁾ とそれほど G+C に偏っているわけではないので、発現量の高低が G+C の割合で説明できるのかは、今のところ疑問である。

A. nidulans のアセトアミダーゼ遺伝子の構造や発現調節機構については、これまで非常に詳細な研究がなされている¹⁵⁹⁾。そこで、麹菌の遺伝子の発現についてノーザン解析によって若干の検討を行った。通常のグルコースと NaNO_3 を炭素源および窒素源とした培地で培養してもアセトアミダーゼ遺伝子の発現はほとんど見られなかった。一方、アセトアミドを炭素源と窒素源として使用した場合には、それほど強くはないがはっきりと遺伝子の転写産物の存在が認められた。さらに、炭素源を酢酸にし、窒素源を β -アラニンにして培養すると発現量が上昇することが明らかになった。ここで用いた化合物は全て *A. nidulans* のアセトアミダーゼ遺伝子の発現誘導を起こさせるもので、麹菌の遺伝子も同じように発現が誘導されていると考えられた。炭素源としてアセトアミドを用いた場合の転写レベルが低かったのは、アセトアミドの誘導能が実際はその分解産物である酢酸の誘導能に由来している¹⁵⁹⁾こ

とによると考えられる。このように麹菌と *A. nidulans* のアセトアミダーゼ遺伝子は同じような発現調節を受けていると考えられるが、そのプロモーター領域には高いホモロジーを示す配列は見いだされなかった。

クローニングした麹菌のアセトアミダーゼ遺伝子を用いて栄養要求性の付与されていない実用麹菌株 FN-16 の形質転換を行ったところ、頻度は低かったもののアセトアミドを単一窒素源とする培地で生育が旺盛なコロニーとして形質転換株が取得できることがわかった。これらの株は再度アセトアミド単一窒素源培地で培養してやることにより、本当に生育が良くなった形質転換体であるのか確認できる。得られる形質転換体の数は *A. nidulans* のアセトアミダーゼ遺伝子をマーカーに用いた場合と大差なかったが、組み込まれるプラスミド DNA が多コピーである点に特徴が認められた。このことは、有用酵素などを大量に生産する場合には遺伝子増幅効果が期待できるので、有利であると考えられる。

さらに、アセトアミダーゼ遺伝子のプロモーターを α -アミラーゼ遺伝子のプロモーターに変換し、マルトースを炭素源にして高発現させることにより、形質転換頻度が5倍以上に上昇し、形質転換体の選択が容易になることが明らかとなった。しかし、この場合にはアセトアミダーゼ遺伝子そのものを用いたときよりも多コピーで組み込まれることが少なく、有用酵素などの大量生産には適していないかも知れない。

遺伝子組換え法によって麹菌の有用菌株の育種を行う場合、宿主となる栄養要求性変異株を実用菌株から造成することは、時間や労力がかかる上に、変異処理によって本来の優良な性質も損なわれることがあるので、このような優性マーカーを用いた形質転換系の開発が重要である。また、いろいろな酵素生産性を麹菌に与えるためには利用できる選択マーカーが多くなければならない。そのため、著者は薬剤耐性遺伝子をマーカーとする形質転換も試みているが、麹菌は酵母や他のカビで用いられているような薬剤の多くに対して高い抵抗性をもっており、利用できるものが少なかった。しかし、ペノ

ミルやフレオマイシンのように効果のある薬剤もあり、それに対する耐性遺伝子が利用できる可能性を見いだしたが、現在までのところ、形質転換体の選択に適した薬剤の濃度が設定できていないため宿主・ベクター系としては確立していない。今後、引き続き詳細に検討して形質転換系として確立したいと考えている。

第4章 形質転換による有用麹菌の育種

第1篇と第2篇第2章で述べたように、著者は人工突然変異法と細胞融合法を用いて麹菌の有用菌株を育種することを試みてきた。しかし、人工変異法では不要な性質を欠失または弱めることは可能であったが、それに付随して生育能の低下や分生子の着生が悪くなることが認められ、より緩やかな条件での変異処理が望まれた。また、有用な性質、例えばアミラーゼ等の酵素生産性を向上させることは今後の問題と考えられた。細胞融合法によっても生育能などの菌体全般の性質の改良と新たな性質の付与は可能であるが、酵素生産性の飛躍的な向上は困難であると考えられる。一方、組換えDNAの手法によれば、目的の酵素遺伝子を麹菌に導入してコピー数を増加してやることにより、酵素の生産性を飛躍的に上昇させることができると考えられる。実際に、著者らは第3章第1節で確立した宿主・ベクター系を利用して麹菌の α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼの遺伝子を麹菌に再導入することにより、多コピーとなった形質転換体が元株の10倍近い酵素の生産性を示すことを認めている^{124,125)}。しかし、この時に用いた宿主はアルギニン要求性の変異株で生育が遅くなっている上に分生子の着生がきわめて悪いという欠点があり、麹造りなどの実用には適していない。一方、実用麹菌株でも形質転換可能なマーカーとしてアセトアミダーゼ遺伝子を利用した形質転換系が確立され、この系により麹菌の有用株の造成が可能になると考えられる。

本章では、遺伝子組換え法によって実用菌株の酵素生産性の向上した有用株の育種が可能であることを確認することを目的として、すでに多田ら¹²⁴⁾によってクローニングされている α -アミラーゼ遺伝子を、優性マーカーを利用した形質転換系を用いて麹菌に導入し、高生産性株の造成を試みた。なお、この過程において、麹菌の染色体にほとんど同一の構造の α -アミラーゼ遺伝子が3個存在していることを認めたので、これら3個の遺伝子の構造についても検討を加えた。

実験方法

1. 使用菌株

第3章第3節に記載した麹菌 RIB 40 を α -アミラーゼ遺伝子のクローニング用の遺伝子ライブラリーを作製するために使用した。

形質転換に用いたアルギニン要求性株は第3章第1節に記載した M-2-3 株と *A. nidulans* FGSC 89 (*biA1*, *argB2*) であり、後者はジョージア大学の Fungal Genetic Stock Center から分譲された菌株である。また、アセトアミダーゼ遺伝子による形質転換の宿主として用いた実用麹菌株は、デフェリフェリクローム非生産性かつ非褐変性の変異株である FN-16 株と、その親株の *A. oryzae* var. *viridis* RIB 203 である。

プラスミドの調製およびコスミド遺伝子ライブラリーの作製には、第3章第3節に記載した大腸菌 DH1 を用いた。

2. 培地および培養方法

麹菌菌体の培養は、第3章に記載したデキストリン-ペプトン培地を用いて行った。また、アセトアミダーゼ遺伝子をマーカーとする形質転換の際に用いた選択培地は、第3章第3節に記載した。 α -アミラーゼ生産用の培地は、デキストリン-ペプトン培地と CD 培地の炭素源のグルコースを 1% 小麦デンプンに代えた培地を使用した。

大腸菌は第3章で記載した LB 培地で培養した。

3. プラスミド

今回の遺伝子ライブラリーの作製にはコスミド pJB8 を使用した。

実用菌株の形質転換に使用したプラスミドベクターは、第3章第3節で構築した pUAMD2 から 4.8 kb の *SalI*-*Bam*HI 断片を切り出し pUC118 の *SalI*-*Bam*HI 部位に挿入した pUAMD3 と、麹菌の α -アミラーゼ遺伝子のプロモーターに交換したアセトアミダーゼ遺伝子をもつ pUPAMD1 である。この2つのベクターの *Bam*HI 部位に麹菌の α -アミラーゼ遺伝子の 1 つ (*amyC*) を含

む 5.4 kb の *Bam*HI 断片を挿入したプラスミドを構築し、それぞれ pUAMD3/*amyC* 及び pUPAMD1/*amyC* とした。

4. 麹菌のコスミド遺伝子ライブラリーの作製

第3章第3節でファージ遺伝子ライブラリーの作製に使用した麹菌 RIB 40 の全 DNA を *Sau*3AI で部分分解し、10–40% の蔗糖密度勾配遠心 (24,000 rpm、20時間、20℃) で分離して、30–40 kb の大きさの DNA 断片を回収した。これをコスミド pJB8 の *Bam*HI 部位に挿入した。DNA はファージの場合と同じようにして *in vitro* パッケージングによりファージ粒子に取り込ませた。このファージ粒子を大腸菌 DH1 に感染させ、50 ppm アンピシリンを含む LB 培地にプレートし、コロニーを形成させ、次のコロニー・ハイブリダイゼーションに用いた。

5. コロニー・ハイブリダイゼーション

1枚のプレートに約 600 個のコロニーが小さく現われてきたときに、Hybond-N ナイロン・メンブレン (Amersham) を上からのせてコロニーを写し取る。メンブレンはコロニーのある面を上にして再び LB-アンピシリン培地にのせて、コロニーが大きくなるまで培養する。これをアルカリ液によって変性させた後、中和して 2×SSC で洗い、風乾後紫外線照射により DNA を固定した。

ハイブリダイゼーションは、多田によってすでにクローニングされていた麹菌の α -アミラーゼ遺伝子を含む 3.7 kb の *Eco*RI 断片¹²⁴⁾を ³²P ラベルしたプローブを使用して、第3章第1節で記載した方法で行った。

6. DNA の調製方法

コスミド DNA の調製法は、通常のプラスミドの調製法と同じであり、第3章第1節に記載した。

7. 塩基配列の決定

第3章第3節に記載したように、主に自動 DNA シークエンサーを用いて行った。

8. 形質転換方法

麹菌 M-2-3 と *A. nidulans* FGSC 89 の形質転換は第3章第1節に記載した方法で行った。また、栄養要求性のない実用株の形質転換はアセトアミド単一窒素源培地を用いて第3章第3節で述べた方法で行った。

9. α -アミラーゼ活性の測定法

培養ろ液を用いて、第1篇第1章に記載されている方法によって測定した。麹菌菌体あたりの活性は、ろ過によって集めた菌体をペーパータオルで十分に水分を除いた後、遠心エバポレーターによって乾燥した菌体の重量を用いて換算して求めた。

10. 米麹の製造

第1篇第1章に記載したように、 α 米を用いて恒温恒湿装置で製麹した。なお、麹の酵素は0.5% NaClを含む20 mM 酢酸緩衝液を用いて抽出した。

実験結果

1. 麹菌及びその近縁のカビにおける α -アミラーゼ遺伝子の存在様式

麹菌の α -アミラーゼ遺伝子はすでに多田らによってクローニングされ、その塩基配列も決定されている¹²⁴⁾。多田らはクローニングした遺伝子をプローブとして麹菌のゲノミック・サザンハイブリダイゼーションを行ったところ、*Bam*HI 分解で5~7 kbに同じ程度の濃さの3本のバンドが現われることを認め、麹菌の染色体には複数の α -アミラーゼ遺伝子かそれに極めて似た配列が存在することを報告している¹²⁴⁾。

一方、第1章第3節でも述べたように、麹菌 *A. oryzae* は醤油麹菌 *A. sojae* やアフラトキシン生産菌として知られている *A. flavus* と *A. parasiticus* に分類学上極めて近縁のカビである。しかし、麹菌はその他の3種のカビと違い、 α -アミラーゼ生産性が高いことが知られていた⁶⁰⁾。そこで、麹菌の α -アミラーゼ生産性が高い原因の一つにこの遺伝子が麹菌にのみ複数個存在してい

ることがあるのではないかと考え、近縁の4種のカビについて α -アミラーゼ遺伝子をプローブとしたサザン解析を行った。

使用した菌株は第1章第3節で用いた4種のカビの代表株、*A. oryzae* RIB 40、*A. sojae* RIB 1045、*A. flavus* RIB 1427、*A. parasiticus* RIB 4032である。これらの菌株のDNAを各種制限酵素で分解し、すでにクローニングしていた3.0 kbのEcoRI-BamHI断片をプローブとしてサザン・ハイブリダイゼーションを行った。

図2-63に示すように、*A. oryzae*では使用した制限酵素のいずれでも複数のバンドが検出されるのに対して、その他の3種のカビでは1本のバンドしか認められなかった。*A. parasiticus*のHindIII分解で複数のバンドが検出されたが、これは分解が不十分だったことによるものである。このことから、3種の菌では麹菌の α -アミラーゼ遺伝子と非常に高いホモロジーのある配列は1個しか存在していないことが示された。

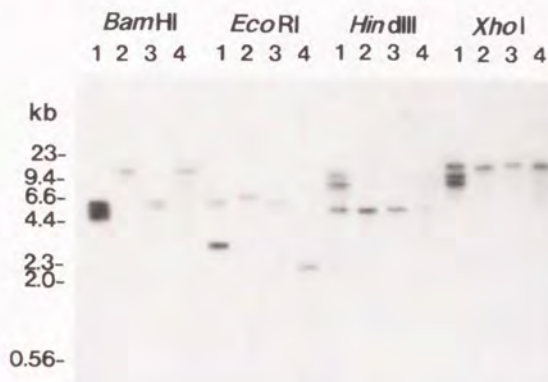


図2-63 麹菌及びその近縁のカビの α -アミラーゼ遺伝子をプローブにしたサザン解析

1, *A. oryzae* RIB 40; 2, *A. sojae* RIB 1045; 3, *A. flavus* RIB 1427; 4, *A. parasiticus* RIB 4032

さらに、第1章第3節で染色体のSmaI分解パターンを調べるのに用いた多くの株についてもサザン解析を行ったが、*A. oryzae*に属する菌株は全て複数

のバンドが存在していたが、*A. sojae*、*A. flavus*、*A. parasiticus* には1本のバンドだけが検出された。また、染色体の *Sma*I 分解パターンにより、*A. oryzae* と判定された株には複数のバンドが存在し、 α -アミラーゼ遺伝子の存在個数と染色体の *Sma*I 分解パターンはよく一致していた。

麹菌にのみ α -アミラーゼ遺伝子が複数存在していることから、麹菌の α -アミラーゼ生産性が高いことの一つの理由はこの遺伝子のコピー数が関与していることが示唆された。

2. 麹菌に存在する3個の α -アミラーゼ遺伝子のクローニング

麹菌に存在する α -アミラーゼ遺伝子と高いホモロジーを示す配列が α -アミラーゼ遺伝子そのものであり、麹菌で機能しているのかを確認するために、全ての遺伝子をクローニングした。なお、クローニング及び塩基配列の決定は、醸造資源研究所の多田との共同研究によって行ったものである。

少なくとも3個あると考えられる α -アミラーゼ遺伝子がお互いに近傍に存在していてクラスターを形成している可能性も考慮にいれ、遺伝子ライブラリーをコスミドを用いて作製した。すでにクローニングしていた 3.7 kb の *Eco*RI 断片をプローブとして、約 6,000 個のコスミド・ライブラリーをコロニー・ハイブリダイゼーションによってスクリーニングした。その結果、10 個のポジティブ・クローンが得られた。

これらのクローンからコスミドDNAを調製し、*Bam*HI で分解後スクリーニングに使用したプローブによってサザン・ハイブリダイゼーションを行った。図 2-64 に示すように、1 例を除いて他のいずれのクローンにも 5~7 kb の大きさが異なるバンドが1本だけ認められた。20 kb のバンドが存在するクローンは、遺伝子ライブラリーを作製するときに、*Bam*HI 部位の内側にある *Sau*3AI でコスミドに挿入されたため、一方の *Bam*HI 部位が失われたものと考えられる。コスミドには 30~40 kb という非常に大きいサイズのDNAが挿入できるので、今回得られたクローンに異なる大きさのバンドを2本以上もっているものがなかったことは、3本の遺伝子はお互いの近傍には存在

していないと考えられる。実際に本章第1節で行った OFAGE によって染色体を分離し、サザン解析を行うと、異なる3本の染色体にハイブリダイズするので、これらの3個の遺伝子はそれぞれ異なる染色体に分散して存在しているものと考えられる。

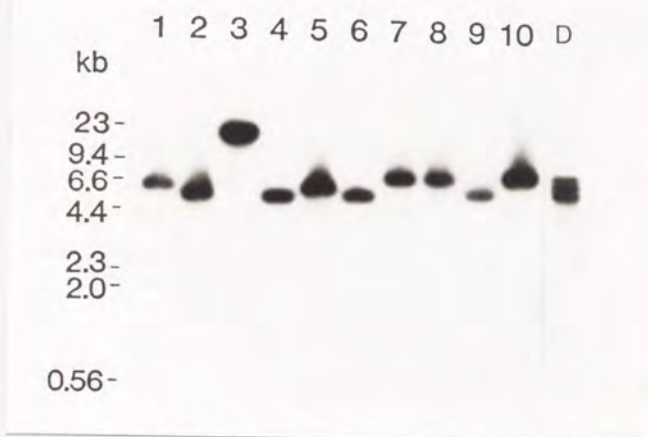


図 2-64 コスミドクローンの *Bam*HI 分解のサザン解析

1-10, コスミドクローン; D, RIB 40

ここで、6.6 kb、6.0 kb、5.4 kb の大きさの異なる *Bam*HI 断片をそれぞれのコスミドクローンから回収し、pUC118 に挿入して制限酵素地図および塩基配列の決定に用いた。また、*Bam*HI 断片の大きい順に *amyA*、*amyB*、*amyC* と名付けた。

単離した3つの α -アミラーゼ遺伝子の制限酵素地図を図 2-65 に示したが、すでにクローニングして塩基配列の決定されている遺伝子から推定されるタンパクのコード領域を含む周辺の酵素地図はほとんど一致していた。しかし、5'上流の *Eco*RI 部位からさらに上流領域の制限酵素地図は異なっていた。一方、*amyB* と *amyC* では 3' 下流の *Bam*HI 部位の場所は同じところにあるが、*amyA* には存在しなかった。

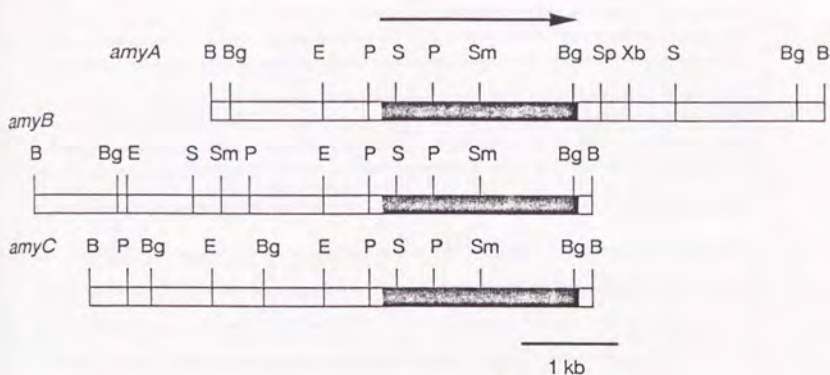


図 2-65 3つの α -アミラーゼ遺伝子の制限酵素地図

3. 3個の α -アミラーゼ遺伝子の塩基配列

ジデオキシ法によって、新たにクローニングした3個の α -アミラーゼ遺伝子の *EcoRI*-*Bam*HI または *EcoRI*-*Sph*I 断片の塩基配列を決定した(図 2-66)。

amyB と *amyC* は塩基配列を決定した範囲では、全く同じで区別できなかった。一方、*amyA* は *EcoRI* 部位から停止コドンの 69 bp 後までは、*amyB* および *amyC* と3個(5' 上流で1個、コード領域で2個)の違いが認められたが、3' 下流領域が著しく異なっていた。すでにクローニングしてあった α -アミラーゼ遺伝子¹²⁴⁾は、塩基配列の比較から *amyB* か *amyC* のいずれかであることがわかった。

4. 麹菌及び *A. nidulans* への α -アミラーゼ遺伝子の導入

麹菌に3個の α -アミラーゼ遺伝子が存在することが明らかになったが、この全てが麹菌で機能していることを確認するために、これらの遺伝子をそれぞれ、麹菌及び *A. nidulans* に導入して発現するか調べた。*A. nidulans* を使用したのは、この菌がほとんど α -アミラーゼを生産しないことから、麹菌の α -アミラーゼ遺伝子の発現の有無が明瞭に観察されるのではないかと考

図 2-66 麹菌 α -アミラーゼ遺伝子の全塩基配列とアミノ酸配列

183

えられたからである。

amyA, *amyB*, *amyC* をそれぞれ含んでいる *Bam*HI 断片を pSal23 につないで、アルギニン要求性の宿主 M-2-3 と *A. nidulans* FGSC 89 の形質転換を行った。得られた形質転換体は、デンプンを含む最少寒天平板培地に接種して、30℃、5日間培養した後、ヨード蒸気をあててコロニーの回りに生じるデンプンの消化円 (halo) の大きさを観察した。麹菌 M-2-3 の形質転換体では、対照の pSal23 のものと halo の大きさに有意な差は認められなかったが、*A. nidulans* の形質転換体では、対照と比べて大きな halo を形成するものが多く認められた。これは、3 個のいずれの遺伝子を導入したものでも同じ程度認められた。

そこで、これらの大きな halo を形成した形質転換体を 1% 小麦デンプンまたは 1% グルコースを含む最少培地で培養し、培養液中の α -アミラーゼ活性を測定した。

表 2-30 *A. nidulans* の形質転換体の α -アミラーゼ活性

Transformant	α -amylase activity (U/mg of dry mycelium)	
	CD-starch	CD-glucose
pSal23-1	0.09	0.03
pSal23/ <i>amyA</i> -1	1.81	0.01
pSal23/ <i>amyA</i> -2	1.63	0.03
pSal23/ <i>amyA</i> -3	1.22	0.02
pSal23/ <i>amyA</i> -6	36.1	0.49
pSal23/ <i>amyB</i> -1	4.72	0.11
pSal23/ <i>amyB</i> -4	60.2	0.38
pSal23/ <i>amyB</i> -5	2.64	0.03
pSal23/ <i>amyC</i> -2	42.4	0.36
pSal23/ <i>amyC</i> -5	1.14	not tested
pSal23/ <i>amyC</i> -6	2.29	not tested
pSal23/ <i>amyC</i> -7	75.8	0.45

表 2-30 に示したように、*A. nidulans* に α -アミラーゼ遺伝子を導入したものでは、いずれも対照に比べて活性が 20~1000 倍と著しく高くなっていた。また、グルコースで培養したものでは、 α -アミラーゼ活性が顕著に上昇す

ることは認められなかった。これらのことから、*A. nidulans* では導入した3個の α -アミラーゼ遺伝子は、正常に発現しており、その発現の調節についても麹菌と同じようにデンプンで発現が誘導されるが、グルコースでは誘導されないことが示された。さらに、*A. nidulans* の形質転換体のDNAのサザン解析を行ったところ、活性が著しく上がっている株では導入した α -アミラーゼ遺伝子のコピー数が極めて多くなっていることがわかった（図2-67）。

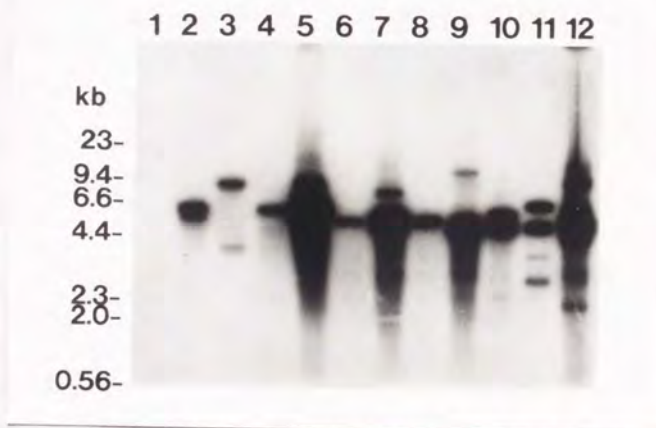


図2-67 *A. nidulans* の形質転換体のDNAのサザン解析

レーン1~12は、表2-32のpSal23-1~pSal23/amyC-7に相当する株のDNAをBamHIで分解し、3.0 kbのEcoRI-BamHI断片をプローブにしてハイブリダイゼーションを行った。

一方、麹菌ではデンプン平板培地での halo の大きさに大差はなかったが、何株か選択してデンプンを含む最少培地で培養し、 α -アミラーゼ活性を測定した。その結果、*A. nidulans* の場合と同様、3個の遺伝子のそれぞれを導入した株で α -アミラーゼ活性が2~8倍に上昇していた（表2-31）。*A. nidulans* に比べて活性の上昇率が低い、宿主の麹菌にはもともと3個の α -アミラーゼ遺伝子が存在しているので、コピー数の増加の効果が現われにくかったことによると考えられる。また、halo に差がなかったのも、対照の株が生産する α -アミラーゼの量で十分に大きな halo が形成されるために、そ

れ以上の生産量があっても識別できるほどの差が生じなかったのであろう。

表 2-31 麹菌の形質転換体の α -アミラーゼ活性

Transformant	α -amylase activity (U/mg of dry mycelium)
pSal23-a	15.2
pSal23/ <i>amyA</i> -a	59.8
pSal23/ <i>amyA</i> -b	24.4
pSal23/ <i>amyB</i> -a	128.3
pSal23/ <i>amyB</i> -b	28.1
pSal23/ <i>amyB</i> -c	66.3
pSal23/ <i>amyC</i> -a	71.3
pSal23/ <i>amyC</i> -b	64.3

以上の結果から、麹菌の染色体に存在している 3 個の α -アミラーゼ遺伝子は正常に機能している遺伝子であることが明らかにされた。

4. α -アミラーゼ高生産性の実用菌株の造成

麹菌にはもともと 3 個の α -アミラーゼ遺伝子が存在しており、これらはすべて正常に発現していることが明らかになり、このことが麹菌の α -アミラーゼ生産が他のカビに比べて高い理由の一つであると考えられた。このような麹菌にさらに組換え DNA 技術により α -アミラーゼ遺伝子を導入して、遺伝子のコピー数を増やしてやることによって、高生産性の菌株が造成できることも示唆された。しかし、上で用いた麹菌の宿主はアルギニン要求性で、生育が遅く分生子の着生が極めて悪いという欠点をもっていて、実用には適していない。そこでアセトアミダーゼ遺伝子を優性マーカーとして実用菌株へ α -アミラーゼ遺伝子を導入し、高生産株の造成を試みた。

先にクローニングした 3 個の α -アミラーゼ遺伝子は全て正常に発現することが示されているので、その中で最も小さい 5.4 kb の *Bam*HI 断片に含まれている *amyC* を、アセトアミダーゼ遺伝子をマーカーにもつ 2 つのプラスミドに挿入した。1 つは、麹菌のアセトアミダーゼ遺伝子そのものをもつ pUAMD3 であり、もう 1 つはプロモーターを α -アミラーゼ遺伝子のものに

交換したアセトアミダーゼ遺伝子をもつ pUPAMD1 である。これらのベクターの *Bam*HI 部位に *amyC* を挿入し、実用菌株である FN-16 および RIB 203 を形質転換した。

選択培地については前にも述べたが、pUAMD3/*amyC* では炭素源と浸透圧調節剤として 1 M シュクロースを用いており、pUPAMD1/*amyC* では炭素源は 2% マルトースである。この時の形質転換結果を表 2-32 に示した。

表 2-32 麹菌の形質転換結果

Plasmid (10 μ g)	No. of transformants	
	FN-16	RIB 203
pUAMD3	2	-
pUAMD3/ <i>amyC</i>	4	-
pUPAMD1/ <i>amyC</i>	16	5

第 3 章第 3 節で述べたように FN-16 では、得られる形質転換体の数は pUAMD2 及び pUPAMD1 単独で形質転換した場合とほとんど同じであった。一方、今回は野生株である RIB 203 についても形質転換を行ったが、pUAMD3/*amyC* では選択培地上でバックグラウンドと明瞭に区別できるような旺盛な生育を示す株は得られなかったが、pUPAMD1/*amyC* で旺盛に生育できる株が 5 株得られた。

FN-16 及び RIB 203 の形質転換体をデンプンを含む最少液体培地で 30℃、3 日間振盪培養し、その培養液中の α -アミラーゼ活性を測定した（表 2-33、表 2-34）。形質転換体の中には元株と活性に差がないものも存在するが、一方で活性が高いもので約 5 倍に上昇している株が得られた。

FN-16 で活性の高い株の DNA を調製し、pUC118 をプローブとしてサザン解析を行ったところ、pUAMD3/*amyC* を用いたときは非常に多くの DNA が組み込まれていた（図 2-68）。しかし、pUPAMD1/*amyC* で形質転換した

場合は、5 項で述べたようにコピー数は少なかった。

表 2-33 FN-16 の形質転換体の α -アミラーゼ活性

Transformant	α -Amylase activity	
	(U/mg of dry mycelium)	Ratio
FN-16	14.2	1.0
pUAMD3/ <i>amyC</i> -TR1	15.6	1.1
TR4	36.8	2.6
TR5	25.6	1.8
pUPAMD1/ <i>amyC</i> -TR1	24.4	1.7
TR3	33.4	2.4
TR4	24.3	1.7
TR5	30.5	2.2
TR6	35.0	2.5
TR9	37.1	2.6
TR10	44.5	3.1
TR11	38.7	2.7
TR12	44.3	3.1
TR15	64.5	4.5

表 2-34 RIB203 の形質転換体の α -アミラーゼ活性

Transformant	α -Amylase activity	
	(U/mg of dry mycelium)	Ratio
RIB 203	19.8	1.0
pUPAMD1/ <i>amyC</i> -TR1	24.0	1.2
TR2	82.9	4.2
TR3	32.4	1.6
TR4	61.2	3.1
TR5	51.6	2.6

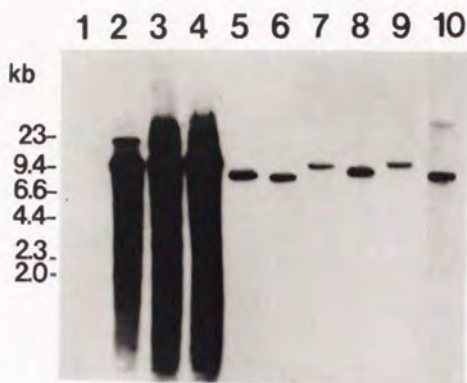


図 2-68 FN-16 の形質転換体のサザン解析

レーン 1, FN-16; 2, pUAMD3/amyC-TR1; 3, pUAMD3/amyC-TR4; 4, pUAMD3/amyC-TR5; 5, pUPAMD1/amyC-TR3; 6, pUPAMD1/amyC-TR5; 7, pUPAMD1/amyC-TR9; 8, pUPAMD1/amyC-TR10; 9, pUPAMD1/amyC-TR15; 10, pUPAMD1/amyC-TR12. DNA を *Bam*HI で分解し、pUC118 をプローブにしてハイブリダイゼーションを行った。

一方、RIB 203 の形質転換体のサザン解析では、最も高い活性を示した T2 株には pUC118 とハイブリダイズするバンドが認められなかった (図 2-69A)。しかし、そのほかの株では pUC118 とハイブリダイズするバンドが認められた。アセトアミダーゼ遺伝子をプローブとしてサザン解析を行うと、T2 でも本来の染色体に存在するアセトアミダーゼ遺伝子の他に α -アミラーゼ遺伝子のプロモーターに交換したベクターに存在した遺伝子のバンドが検出された (図 2-69B) ので、T2 では形質転換後にベクターの pUC118 に相当する配列が脱落しているものと考えられる。

今回得られた形質転換体では、組み込まれた DNA のコピー数が非常に高い株が存在したにも拘らず、これらの株でコピー数に比例した α -アミラーゼ活性の顕著な上昇は見られなかった。しかし、麹菌にはもともと 3 個の α -アミラーゼ遺伝子があって、 α -アミラーゼ生産性が高いことを考慮すれば、

5倍程度の活性の向上は実用的には有用であると思われる。

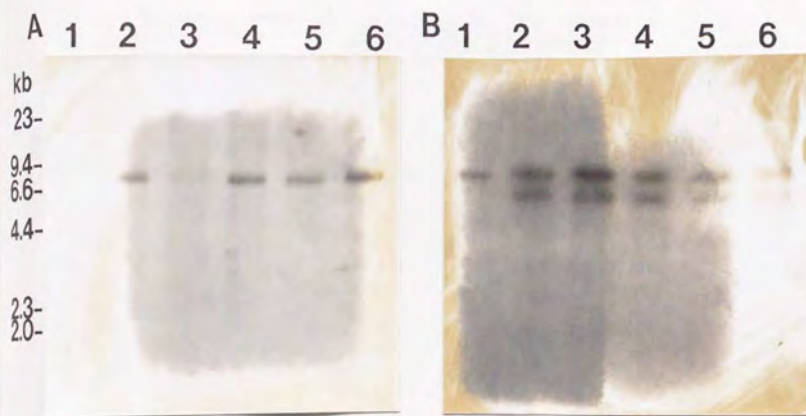


図 2-69 RIB 203 の形質転換体のサザン解析

レーン 1, RIB 203; 2, pUPAMD1/*amyC*-TR1; 3, pUPAMD1/*amyC*-TR2; 4, pUPAMD1/*amyC*-TR3; 5, pUPAMD1/*amyC*-TR4; 6, pUPAMD1/*amyC*-TR5. DNA を *Bam*HI で分解してハイブリダイゼーションを行った。(A) プローブ; pUC118 (B) プローブ; 5 kb *amyS* *Sal*I 断片。

表 2-35 FN-16 の形質転換体による米麹のアミラーゼ活性

Transformant	α -Amylase (U/g of rice-koji)	Glucoamylase (U/g of rice-koji)
FN-16	1110	219
pUAMD3/ <i>amyC</i> -TR1	1120	123
TR4	1520	119
pUPAMD1/ <i>amyC</i> -TR3	1740	272
TR4	900	227
TR5	2420	284
TR6	1380	232
TR9	1480	250
TR10	2030	271
TR12	1310	279
TR15	2030	260

表 2-36 RIB 203 の形質転換体による米麴のアミラーゼ活性

Transformant	α -Amylase (U/g of rice koji)	Glucoamylase
RIB 203	1500	197
pUPAMD1/amyC-TR1	1860	106
TR2	2560	195
TR3	1680	166
TR4	2220	168
TR5	1410	108

5. α -アミラーゼ高生産性の実用菌株による米麴の製造

上で得られた α -アミラーゼ高生産性の形質転換体を用いて、米麴を製造し、その α -アミラーゼ活性を測定した（表 2-35、表 2-36）。

形質転換体の製麴中の生育は対照の非形質転換体とほとんど差がなく、出麴時期の麴の状貌も違いはなかった。麴の α -アミラーゼ活性は、液体培養の時ほどは顕著ではなかったが、高いもので 2 倍以上の活性を示した。 α -アミラーゼ以外の酵素活性についても測定したが、ややバラツキはあるものの、 α -アミラーゼほど顕著な差は認められなかった。

考 察

遺伝子組換えの手法による麴菌有用菌株の育種の可能性を検討する目的で、本篇の第 3 章で開発した麴菌の形質転換系を利用して、 α -アミラーゼ高生産性の実用菌株の造成を試みた。

実用麴菌に導入しようとした麴菌の α -アミラーゼ遺伝子は、すでに多田らによってクローニングされていたが、麴菌の DNA のサザン解析によって単離した遺伝子と非常にホモロジーの高い、おそらく同一の遺伝子と考えられる配列が少なくとも 3 個染色体に存在することが示唆されていた¹²⁴⁾。

麹菌に近縁のカビについても α -アミラーゼ遺伝子のコピー数を調べた結果、複数の遺伝子が存在するのは麹菌に特有の現象であり、このことが、麹菌が α -アミラーゼ生産性が他の菌に比べて高いことの一つの理由であると考えられた。

次にこれらの遺伝子をクローニングして、構造と機能について解析した。

これらの遺伝子が染色体の近傍に存在し、クラスターを形成している可能性も考え、大きいDNA断片を挿入できるコスミドを用いて遺伝子ライブラリーを作製してコロニー・ハイブリダイゼーションを行った。その結果、遺伝子を重複してもつくクローンは得られず、クラスターを形成していないものと考えられた。

3個の遺伝子の制限酵素地図及び塩基配列から、このうちの2つ、*amyB* と *amyC* と名付けた遺伝子はタンパク質のコード領域と 5'-及び 3'-の周辺領域が完全に一致していた。一方、*amyA* は *amyB* と *amyC* と比べて、コード領域で2個の塩基の置換があり、相当するアミノ酸が変わっていた。また、5' 上流領域約 600 bp で1個の塩基が変わっていたただけだが、3' 下流領域では停止コドンの 70 bp 以降で全く配列が異なっていた。

著者らが麹菌に α -アミラーゼ遺伝子が3個存在していることを見いだしたと同じ頃、独立に異なる3グループから同様の報告がなされた。Wirsal ら¹⁶⁰⁾は、著者らと同じように3個の、また Gines ら¹⁶¹⁾と塚越ら¹⁶²⁾は2個の α -アミラーゼ遺伝子の存在を認め、それぞれの塩基配列を決定した。彼らの遺伝子の塩基配列と今回クローニングした遺伝子の配列とを比較すると、*amyB* と *amyC* は Wirsal らの *amyI*、Gines らの *AmyI*、塚越らの *Taa-G1* に相当していることがわかる。また、*amyA* は Wirsal らの *amy3*、Gines らの *AmyII* に相当していた。しかし、Wirsal らの *amy2* および塚越らの *Taa-G2* に相当するものはなかった。研究者によって用いている菌株が異なっており、遺伝子の数も2個と3個の違いはあるが、 α -アミラーゼ遺伝子が麹菌に複数存在していることは確かである。著者はさらに多くの麹菌株についてサザ

ン解析を行っているが、全て複数の遺伝子の存在を示唆し、ハイブリダイゼーション・パターンにもバラエティが認められたので、菌株によって周辺領域の塩基配列に違いがあるものと考えている。

今回 OFAGE で調べた系統的に異なる麹菌株で、 α -アミラーゼ遺伝子がクラスターを形成しておらず、別々の染色体に分散されていることを著者らは初めて見い出したが、他の菌株でもこのようなことが認められるのかは今後検討しなければならない。

Wirsal とも 3 個の遺伝子をクローニングしているが、ノーザン解析の結果から *amy2* の発現だけが認められないと報告している¹⁶⁰⁾。著者らは、3 個の遺伝子のそれぞれを *A. nidulans* と麹菌に導入し、いずれも正常に機能することを見いだした。*amy2* に相当する遺伝子は RIB 40 に存在していないことから、この遺伝子が機能しない pseudogene であるのかわからないが、塚越らの得ている *Taa-G2* の配列は *amy2* と同じであり、彼らはこの遺伝子に相当する cDNA も単離している¹⁶²⁾ので、おそらく正常に発現しているものと思われる。

著者らのクローニングした 3 個の α -アミラーゼ遺伝子は全て正常に機能することが明らかになったので、このうちの *amyC* を栄養要求性のない実用麹菌に導入して高生産性株の造成を試みた。2 種類のベクターを用いて、*amyC* をデフェリフェリクローム非生産性かつ非褐変性の実用株 FN-16 およびその野生型の RIB 203 に導入した。RIB 203 でアセトアミダーゼ遺伝子そのものを選択マーカーとした pUAMD3/*amyC* を用いた場合に、はっきりとした形質転換体を得られなかった以外は α -アミラーゼの高生産性株が得られた。RIB 203 はアセトアミダーゼ単一窒素源培地でも生育が比較的良いため、アセトアミダーゼ遺伝子が導入されても生育に大きな差が現われにくいことにより、形質転換体のみを識別できなかったものと考えられる。また、アセトアミダーゼ遺伝子は多コピーにならないければ生育に影響を及ぼさないこと

から、今回に実験では差が生じるほどには多コピーの組込みが起こらなかったことも考えられる。実際、再度形質転換を試みたところ、生育に差が認められる株も分離できているので、このような株についてそのコピー数を検討したいと考えている。

一方、 α -アミラーゼ遺伝子のプロモーターに代えたベクターでは、マルトース培地上でプロモーター機能が誘導されてアセトアミダーゼ遺伝子が高発現するので、生育に差が生じ、形質転換体のスクリーニングが可能であったと思われる。

形質転換体の α -アミラーゼ活性は最大5倍ほど上昇したが、これはもともと宿主に3個の α -アミラーゼ遺伝子が存在しているので、導入されたコピー数に比べて活性の上昇率が小さくなるのは当然である。

前にも述べたように、 α -アミラーゼ遺伝子のプロモーターに代えたベクターを用いた場合には、形質転換頻度は高くなる反面、コピー数はそれほど多くなならない。一方、アセトアミダーゼ遺伝子をそのままマーカーとしてもつベクターでは、多コピーにならないと生育に差が生じてこないで、形質転換体として選択された株には多コピーのDNAが組み込まれ遺伝子増幅効果が現われてくると考えられる。しかし、今回の試験では予想に反して、コピー数が非常に多くなった形質転換体が得られたにも拘らず、 α -アミラーゼ活性はコピー数の少ない株と大差がなかった。

これらのコピー数の多い株で遺伝子増幅効果が認められなかったことの理由としてはいくつか考えられる。一つには、導入した α -アミラーゼ遺伝子が組み込まれた染色体の部位によって発現が弱められるような、いわゆる位置効果が考えられる。また、麹菌にはもともと3個の α -アミラーゼ遺伝子が存在している上に、それらの遺伝子は高発現しているので、さらに多くの α -アミラーゼ遺伝子を導入してやっても、生産される α -アミラーゼタンパクが麹菌の分泌経路を飽和し、分泌が効率的に行われなくなっている可能性も考えられる。さらに、多コピーになっても α -アミラーゼ遺伝子の高発現

に関与している調節タンパク質の量に限度があるため、発現が効率的に行われていないこともあり得る。いずれにしても、導入した遺伝子が正常に発現しているのかを確認する必要があると考えられる。これに加えて、pUAMD3をベクターにした形質転換株の数が少なかったこともあり、確認するためにはもう少し多くの株について調べなければならないと考えている。

優性マーカーを用いて形質転換することにより、実用菌株の α -アミラーゼ生産能を数倍に上げることができたことは、その他のいろいろな有用酵素に関してもこの手法が利用できることを示唆するものである。 α -アミラーゼは麹菌にたまたまその遺伝子が複数個存在したためもあり、遺伝子増幅効果が顕著には現われなかったが、1コピーしか存在しない遺伝子や麹菌が有していない遺伝子では、よりはっきりとした遺伝子の増幅効果が認められるであろう。すでに、著者らは α -アミラーゼの他に醸造にとって重要な役割を果たしているグルコアミラーゼ¹⁵⁸⁾と酸性プロテアーゼ¹⁶³⁾の遺伝子をクローニングしており、ここで述べたのと同様のシステムで実用菌に導入を試みている。特に、これらの遺伝子は麹菌の染色体には1コピーしか存在していないので、形質転換によって多コピーの遺伝子が導入できれば、生産性は飛躍的に上昇することが期待できる。

このように、遺伝子組換え技術を利用することによって、これまで不可能であった麹菌の酵素生産能の飛躍的な向上が可能になったと考える。著者が第1篇で試みたような吟醸酒製造に適した麹菌株としてグルコアミラーゼ生産性が高い株に着目したように、今後は遺伝子組換えによって容易にこの目的にあった菌株を造成できるであろう。また、醤油用の麹菌ではプロテアーゼ-特にアルカリ・プロテアーゼが重要であり、この生産性を向上させるために人工変異や細胞融合が用いられてきたが、その効果には限界があるように思われる。一方、遺伝子組換え法によれば、変異等で造成したプロテアーゼ高生産株にこの遺伝子を多コピー導入してやることによって、さらに生産性を上昇させることも可能であろう。酵素生産性の向上だけでなく、第3

章第3節でアセトアミダーゼ遺伝子の遺伝子破壊を行ったように、遺伝子組換え法によって不必要な性質に関与する遺伝子を破壊することも可能であり、様々な変異株を任意に造成できることも示された。

著者は、さらに遺伝子組換え法で造成した麹菌株を用いた清酒の小仕込試験を行い、造成した菌株の有用性を検討したいと考えている。しかし、現在のところ組換えDNA実験に関しては規制の問題もあって、実用上非常に有用な菌株が得られても、すぐには清酒製造の場において用いることはできない。今後は、遺伝子組換え法によって得られた株の有用性を確認するだけでなく、その安全性についても詳細に調べていくことが必要であろう。そして、将来この手法によって育種された麹菌株が実用になることを期待し、またそうなるようにデータなどを整備しておくためにも、今後も遺伝子組換え技術を利用した研究を続けていく必要があると考えている。

要 約

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、わが国の清酒や醤油及び味噌などの醸造製品の製造にとって必要不可欠な重要な微生物である。また、麹菌はアミラーゼやプロテアーゼなどの酵素剤の工業生産にも広く利用されている。これらの工業的な重要性から、それぞれの目的にあった有用麹菌株の育種が精力的に行われてきた。著者は、清酒用の麹菌について (1) 人工突然変異法、(2) 細胞融合法、及び (3) 遺伝子組換え法の3つの手法を用いて有用菌株の育種を試みた。特に、麹菌の遺伝子組換えについては、これまで全く試みられていなかったものであり、著者の報告が世界で初めてのものとなった。

第1篇では、古典的ではあるが最も多くの試みがされている人工突然変異法によって吟醸酒製造に適した有用麹菌の造成を試みた。

吟醸酒は、エステルを主体とする果実様の芳香と淡麗な味の調和した高級酒であり、これまでエステル生産性の高い清酒酵母の育種がなされているが、麹菌については全く検討されていなかった。そこで第1章では、吟醸酒製造に適した麹菌の性質の一つとして、グルコアミラーゼ生産能の高いことに重点をおいて麹菌の育種・改良を行った。

はじめに醸造試験所の保存菌株の中からグルコアミラーゼ力価の高い株を検索した。清酒の小仕込試験を行い、麴の造りやすさや醪中での香りの高さを基準にしてRIB 642株を優良株の候補として選択した。しかし、本株を含めてグルコアミラーゼ力価の高い株はいずれも酸性カルボキシペプチダーゼ力価が高く、そのままでは清酒中のアミノ酸含量が多くなり、淡麗な味の吟醸酒製造には適さないため、変異処理により酸性カルボキシペプチダーゼ力価の低い株を造成した。

RIB 642株の分生子に紫外線照射による突然変異処理を行い、カゼイン培地を用いることにより、目的の有用株を得るためのスクリーニングを行った。すなわち、カゼインを主要窒素源とする液体培地に紫外線処理した分生子を接種し、30℃、24時間培養した後、ガラスフィルターでろ過して、酸性カルボキシペプチダーゼ等のタンパク質分解酵素活性が低いために生育速度が遅くなった株を濃縮した。得られた候補株はカゼインを含む寒天培地に接種し、消化円の小さい株を選択した。この操作を2回繰り返すことにより8株の有用株を分離した。これらの株を用いて、吟醸酒の小仕込試験を行い、吟醸香の高い醗となる642-12-A株を有用菌株として選択した。

第2章においては、造成した有用菌株を用いて総米150 kgの中間工業規模の吟醸酒製造試験を行った。製麹経過は市販種麹と比べて大差なく、グルコアミラーゼ力価が約3倍と高い一方で、酸性カルボキシペプチダーゼ力価は1.5倍とやや高い程度の目的に沿う麹となった。麹のグルコアミラーゼ力価が高いことに由来して、醗経過は進み気味で、グルコース濃度が普通の醗に比べて2～3倍と高いことが特徴的であった。また吟醸香が高く、グルコース濃度が高いことから日本酒度の割に甘く感じる新しいタイプの吟醸酒が醸出できた。

第2篇では、麹菌に外来の遺伝情報を導入することによって新たな有用菌株の育種を行うことを目的として、細胞融合及び遺伝子組換え法について検討した。

麹菌をはじめとするカビの細胞融合や形質転換を行うためには、細胞壁を除去したプロトプラストを調製して用いる必要がある。麹菌体から効率よく大量のプロトプラストを調製するためには、麹菌細胞壁の主要成分であるキチンと β -1,3-グルカン分解する強力な酵素が必要であるが、これまでに知

られている酵素剤は活性が不十分で単独では効果がなく、いくつかの酵素剤を併用する必要がある。そこで、第1章では、強力な麹菌細胞壁溶解酵素の開発を試み、酵母溶解菌として単離されていた *Oerskovia* sp. CK株が、麹菌細胞壁溶解酵素を最も著量に生産することを見だし、その生産条件及び酵素的諸性質と麹菌のプロトプラスト調製への利用を検討した。

Oerskovia sp. CK株の生産する細胞壁溶解酵素を大量に調製するために、生産条件の検討を行い、基質として容易に入手できる酵母菌体とキチン粉末を用い、30℃、40時間の培養を行うことにより最大の収量が得られた。細胞壁溶解酵素は、キチナーゼと β -1,3-グルカナーゼを主体とする混合物として生産され、溶解活性とキチナーゼおよび β -1,3-グルカナーゼ活性の培養経過における挙動から、細胞壁の溶解にはキチナーゼが主に関与していると考えられた。本酵素の最適 pH は 6.0~7.0、最適温度は 45℃、また pH 5.0~8.0 の間で安定で、40℃、15分の処理でもほとんど活性の低下は認められなかった。本酵素標品は単独で、かつ 0.5~1.0 mg/ml の少量で麹菌体から十分量のプロトプラストを産生することができた。さらに、接合菌類を除く広範囲のカビの細胞壁を溶解し、これらの菌のプロトプラストを作るのに有効であることが示唆された。

次に、麹菌細胞壁溶解酵素を用いて、麹菌のプロトプラストの生成と再生条件の検討を行った。プロトプラスト生成の最適条件として次のような条件を設定した。

デキストリン・ペプトン培地で 30℃、40時間培養した菌体をガラスフィルターで集菌、洗浄後L字管にとり、0.5 mg/ml の溶解酵素と浸透圧調整剤として 0.8 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液(pH 6.0) 10 ml を加え、30℃、2~3時間振盪した。プロトプラストが生成するにつれて、菌糸がバラバラに崩れ反応液が濁ってくるので、3G3 (孔径30~100 μ m) のガラスフィルターでろ過し、0.8 M NaCl 溶液で洗浄遠心してプロトプラストを得た。プロトプラスト化の反応温度は 35℃ 以上のほうが収率がよいが、菌体残渣も多くなり、細

胞融合や形質転換に用いるには不適當と考えられた。

得られたプロトプラストの再生条件を検討し、浸透圧調整剤を含む寒天平板培地に直接塗布するよりも、0.5%の軟寒天を含む上層培地で包埋したほうが再生率が著しく良いことを認めた。

また、麴菌細胞壁溶解酵素によって十分な量のプロトプラストが得られ、これから染色体DNAを無傷の状態で抽出することも可能となった。そこで麴菌 *Aspergillus oryzae* と分類学上極めて近縁な種である *A. sojae*, *A. flavus*, *A. parasiticus* の4種の分類についてDNAレベルでのアプローチを試みた。

まず4種の代表菌株の全DNAをプロトプラストから調製して、*Sma*Iにより分解後、アガロース・ゲル電気泳動を行ったところ、エチジウムブロマイドで明瞭に染色される3~5 kbのバンドが、それぞれの菌株で大きさに差が認められ、この差を指標として分類が可能であることが認められた。

代表菌株の他に4種に属するいくつかの菌株の全DNAを調製して、*Sma*Iにより分解しアガロース・ゲル電気泳動を行いエチジウムブロマイドで染色した結果、それぞれの種内の菌株では同一の大きさのバンドが存在し、これらの大きさは種間では異なっていた。また、例外的に種内で異なる大きさのバンドを与える菌株は分類が曖昧なものや分類され直したものであり、染色体DNAの*Sma*I分解パターンを用いることにより、従来の形態・生理的性質を指標とする方法に比較して、4種の分類が容易にかつ迅速にできることが明らかになった。

第2章においては、第1章で確立した麴菌のプロトプラスト化技術をもとに、デフェリフェリクローム非生産性麴菌間の細胞融合を行い、菌株の改良を試みた。

現在清酒醸造に利用されているデフェリフェリクローム非生産性麴菌のうち、生育が良好で酵素力価が高いが褐変性を有するA-27株と、この株から造成された非褐変性であるが酵素力価が低いFN-16株との間の細胞融合を行

い、非褐変性で生育が良好かつ酵素力価の高い有用菌株の造成を試みた。

A-27 および FN-16 株から紫外線処理により、アミノ酸要求性と分生子の色のダブル・マーカーを付与した変異株を造成した。これらの変異株からプロトプラストを調製し、融合条件について検討した。その結果、融合剤のポリエチレングリコール濃度は 20% (w/v)、塩化カルシウム濃度としては 50 mM、pH は 9.5 が最適であった。また、用いるプロトプラスト数としては 5×10^6 個ずつを混合した場合が融合率が最も高くなった。これらの最適条件で細胞融合を行うことによって、最高 10% という高い率で融合株を得ることができた。

得られた融合株は、最小培地で生育させると細胞融合に使用した2つの変異株に由来する白色と黄色の分生子とそれらが相補して生じる緑色の分生子が混在したコロニーを形成した。また完全培地で培養すると、それぞれ白色と黄色の分生子を着生するセクターを形成することから、融合株はヘテロカリオンと考えられた。

ヘテロカリオンの融合株から安定なヘテロ 2 倍体を得るため、分生子を紫外線処理し、完全培地で緑色の分生子を着生する株を分離した。得られたヘテロ 2 倍体は、完全培地で継代培養しても安定であるが、半数体化剤であるベノミルや p-フルオロフェニルアラニンを含む培地ではもとの変異株と同じ表現型と組換え型の表現型を示すセグレガントに分離した。また、分生子の核染色を行った結果、ヘテロ 2 倍体の分生子の核数は細胞融合に用いた変異株の分生子の核数の約半分であった。一方、分生子当りの DNA 量はほとんど変わらず、ヘテロ 2 倍体を得られたものと考えられた。

これらのヘテロ 2 倍体を用いて麹を製造し、その酵素力価等を測定したところ、酵素力価が高いが褐変性を示す A-27 のタイプと非褐変性であるが酵素力価が低い FN-16 タイプの株のほかに、酵素力価が高く非褐変性で有用と考えられる株が認められた。

第3章では、麹菌において遺伝子組換え法を利用可能とするために、最も必要とされる形質転換系の開発を行った。

麹菌と同属である *A. nidulans* のオルニチン・カルバモイルトランスフェラーゼをコードしている *argB* 遺伝子をもつプラスミドベクター pSal43 を用いて、麹菌のアルギニン要求性変異株の形質転換について検討した。

宿主とするアルギニン要求性株はオルニチン・カルバモイルトランスフェラーゼ欠損株である必要があるため、実用麹菌株 FN-16 から、最小培地にオルニチンまたはアルギニンを補充した場合には生育できるが、シトルリンを加えただけでは生育できない変異株 M-2-3 を造成した。プロトプラストを調製し、プラスミドベクターを加えポリエチレングリコールと塩化カルシウムを含む溶液で処理することにより、細胞内にDNAを導入した。いくつかの形質転換条件について検討した結果、次のような形質転換の最適条件を決定した。プロトプラストを最終濃度 $2.5 \times 10^8/\text{ml}$ になるように溶液I (0.8 M NaCl, 10 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) に懸濁し、その5分の1量の溶液II (40%(w/v) PEG 4,000, 50 mM CaCl_2 , 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) と100分の1量のジメチルスルホキシドを加えて混合し、形質転換用のコンピテント・セルを調製する。コンピテント・セル 0.2 ml に対して $10 \sim 20 \mu\text{l}$ ($10 \mu\text{g}$) のプラスミドベクターを加え、氷冷下で30分放置した後、1 mlの溶液IIを添加し室温で15分放置する。10 mlの溶液Iを加えて希釈し、低速遠心によりプロトプラストを集め、全量をツアベック・ドックスの最少培地に包埋し、 30°C 、5~10日間培養して形質転換体を取得した。

M-2-3株を宿主として、形質転換頻度は低いものではあったが、アルギニン非要求性となった形質転換体を得られた。形質転換体の形質の安定性について調べたところ、完全培地で継代培養しても、非常に安定で形質の脱落はほとんど認められなかった。また、形質転換体の全DNAを抽出し、大腸菌へのプラスミドの回収を試みた。全DNAそのままでは大腸菌で回収できなかったが、*Bam*HIや*Eco*RIで分解後DNAリガーゼでライゲーションさせるこ

とにより、プラスミドとして回収できた。回収プラスミドの制限酵素による分解パターンから、これらは形質転換に用いたプラスミドに由来することが示された。以上の結果から、導入したプラスミドベクターは形質転換体内ではフリーの状態で存在しているのではなく、染色体DNAに組込まれていることが示唆された。形質転換体の全DNAを用いたサザーン・ハイブリダイゼーションの結果からも、ベクターは染色体に組込まれており、多コピー(15~60個)のDNAがタンデムにつながって組込まれていることがわかった。

形質転換体では、選択マーカーとして用いた *argB* 遺伝子がコードするオルニチン・カルバモイルトランスフェラーゼ活性が、組込まれたコピー数にほぼ比例して上昇していることから、導入した遺伝子のほとんど全てが正常に発現していることが示された。このことは、麹菌で有用な異種遺伝子を高発現させることが可能であり、有用菌株の育種の手法としてきわめて有望であることを示唆するものであった。

A. nidulans argB 遺伝子を選択マーカーとして初めて麹菌の形質転換が可能であることを認めたが、この遺伝子は麹菌のものとあまり相同性が高くなく、麹菌染色体のどの部位に組込まれるかは不明である。そこで相同的組換えによるDNAの部位特異的組込みについて検討することを目的として、麹菌由来の選択マーカー遺伝子をクローニングした。

麹菌の遺伝子ライブラリーをプラスミドベクター YEp13 を用いて作成し、メチオニン要求性株 M-28 を形質転換した。栄養要求性を示さない形質転換体を生じさせる遺伝子ライブラリーのセットから、メチオニン要求性を相補する遺伝子を含む3.5 kbの *Bam*HI 断片をもつプラスミドを単離した。このプラスミドは麹菌の形質転換体の全DNAをそのまま用いても大腸菌で回収することができること、また形質転換体の安定性が低いことなどから、染色体に組込まれるもののほかに細胞内でフリーの状態でも存在しているものと思われる。

得られたメチオニン要求性を相補する遺伝子を用いて、麹菌染色体への相

同的組換えによるDNAの組込みについて検討するために、この断片を pSal23 に挿入し、環状並びに直鎖状にして M-2-3 株の形質転換を行った。環状のプラスミドを用いた場合には染色体上の相同的な部位へ組込まれることはまれで、いろいろな部位への多コピーの組込みが起こっており、またフリーで存在するものも認められた。一方、相同部位に存在する *Xho*I で切断し直鎖状にして用いた場合には、形質転換頻度の上昇が認められ、形質転換体の約半数では染色体の相同な場所への組込みが起こっており、部位特異的にDNAを組込ませることができた。しかし、残りのものでは非相同的な組換えによる異なる部位への組込みが起きており、麹菌では酵母とは異なり、相同的な組換えの頻度が低いことが示唆された。

形質転換の宿主として通常用いられている栄養要求性株は変異処理によって得られるが、麹菌のような産業上重要なカビでは、このような変異処理は、生育能や分生子着生能などをはじめとする本来の優良な性質を損なわせることが多く好ましくない。そこで、実用株の形質転換を行うためには、選択マーカーとして薬剤耐性遺伝子のような優性マーカーの利用が有効と考えられる。しかし、麹菌はほかのカビで有効な薬剤の大部分に対して耐性が強く適用できない。そのため、*A. nidulans* におけるのと同様に、アセトアミダーゼ遺伝子を導入して多コピーにすることにより、アセトアミド単一窒素源培地での生育が旺盛となることを利用して、形質転換体を選択する方法を検討した。

A. nidulans のアセトアミダーゼ遺伝子 (*amdS*) をプローブとして、麹菌の EMBL3 ファージ・ライブラリーを用い、ゆるい条件でプラーク・ハイブリダイゼーションを行い、麹菌のアセトアミダーゼ遺伝子をクローニングした。ファージクローンから約 5 kb の *Sal*I 断片をサブクローン化し、アセトアミダーゼのコード領域について塩基配列を決定した。*A. nidulans* の *amdS* 遺伝子のアミノ酸配列と比較することにより、麹菌のアセトアミダーゼ遺伝子には 6 個のイントロンが存在しており、545 個のアミノ酸からなっていた。塩基

配列から推定されるアミノ酸配列は、*A. nidulans* のアセトアミダーゼと約 70 % のホモロジーがあった。しかし、5'-上流のプロモーター領域の塩基配列には、TATA配列やCAAT配列が共通に存在している以外にはほとんどホモロジーが認められなかった。

麹菌のアセトアミダーゼ遺伝子を pSal23 に連結してアルギニン要求性株である M-2-3 を形質転換したところ、得られた形質転換体は、pSal23 だけを含む形質転換体に比べてアセトアミド単一窒素源培地で生育が旺盛となり、アセトアミダーゼ遺伝子を導入することによるスクリーニングが可能であることがわかった。そこで、pUC118 にアセトアミダーゼ遺伝子を連結したベクターを用いて、M-2-3 の親株である実用菌株 FN-16 の形質転換を試みた。ベクターを加えていないものでもアセトアミド単一窒素源培地にゆっくりと生育してくるが、ベクターを加えたものではこれらのバックグラウンドのほか、旺盛な生育を示し分生子を着生する形質転換体が得られた。さらに、アセトアミダーゼ遺伝子のプロモーターを α -アミラーゼのプロモーターに変換し、マルトースを炭素源にして高発現させることにより、形質転換頻度が 4 倍以上に上昇し、形質転換体の選択が容易になることが明らかとなった。

第 4 章では、遺伝子組換えの手法による麹菌有用菌株の育種の可能性を検討する目的で、本篇の第 2 章で開発した麹菌の形質転換系を利用して、実用麹菌の育種を試みた。

α -アミラーゼは、麹菌の生産する酵素の中で、清酒醸造のみならず酵素工業上においても最も重要な酵素の一つである。そこで、 α -アミラーゼ遺伝子を多コピー導入することにより、 α -アミラーゼの高生産性麹菌実用株の育種を図った。

麹菌にはほとんど同一の α -アミラーゼ遺伝子が 3 個存在しており、これが麹菌に特有の性質であって、近縁な種である *A. sojae*, *A. flavus*, *A. parasiticus* では 1 個しか存在していないことを見いだした。そして、この 3

個の遺伝子全てをクローニングし、麹菌及び *A. nidulans* に導入することによって正常に発現することを確認した。

次に3個の遺伝子のうちの1個を選択マーカーとしてアセトアミダーゼ遺伝子をもつベクターに連結し、実用菌株である FN-16 及び RIB 203 株に導入し、アセトアミド単一窒素源培地で形質転換体を選択した。得られた形質転換体を、デンプンを炭素源とする液体培地で培養し、その上清中の α -アミラーゼ活性を測定した結果、宿主として用いた株に比べて3～5倍の高い α -アミラーゼ活性を示した。

さらに、これらの形質転換株を用いて米麴を製造し、その α -アミラーゼ活性を測定した。液体培養の場合に比べて、宿主との α -アミラーゼ活性の差は大きくはなかったが、2倍以上の高い活性を示すものが存在し、遺伝子組換え法により目的の高生産株の育種が可能であることが明らかとなった。

発 表 論 文

第 1 篇

- 1)五味勝也、飯村穰、辻巖、井上博、原昌道：吟醸酒用有用麹菌変異株の造成、醸協, **82**, 425 (1987)
- 2)五味勝也、飯村穰、原昌道：高グルコアミラーゼ生産性有用麹菌変異株による吟醸酒の製造、醸協, **82**, 430 (1987)

第 2 篇

- 1)五味勝也、保坂大二郎、岡崎直人、田中利雄、熊谷知栄子、飯村穰、原昌道：Oerskovia sp. CK株による麹菌細胞壁溶解酵素の生産と粗酵素の諸性質、醗酵工学, **64**, 479 (1986)
- 2) Katsuya Gomi, Akio Tanaka, Yuzuru Iimura, Kojiro Takahashi:
Rapid differentiation of four related species of koji molds by agarose gel electrophoresis of genomic DNA digested with *Sma*I restriction enzyme, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **35**, 225 (1989)
- 3) Katsuya Gomi, Yuzuru Iimura, Shodo Hara: Integrative transformation of *Aspergillus oryzae* with a plasmid containing the *Aspergillus nidulans argB* gene, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2549 (1987)
- 4) Yuzuru Iimura, Katsuya Gomi, Hiroshi Uzu, Shodo Hara: Transformation of *Aspergillus oryzae* through plasmid-mediated complementation of the methionine-auxotrophic mutation, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 323 (1987)

- 5) Katsuya Gomi, Katsuhiko Kitamoto, Chieko Kumagai: Cloning and molecular characterization of the acetamidase-encoding gene from *Aspergillus oryzae*, *Gene*, 投稿中
- 6) Katsuya Gomi, Katsuhiko Kitamoto, Chieko Kumagai: Transformation of industrial strains of *Aspergillus oryzae* with a homologous *amdS* gene as a dominant selectable marker, *Agric. Biol. Chem.*, 投稿中

参 考 文 献

- 1) 村上英也編著、麹学、日本醸造協会 (1986)
- 2) 秋山裕一ほか：微生物, **1**, 創刊号 (1985)
- 3) 井口信義：農化, **29**, 73 (1955)
- 4) Sekine, H., Nasuno, S., Iguchi, N.: *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1477 (1969)
- 5) Nasuno, S., Ohara, T., Iguchi, N.: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 291 (1971)
- 6) Nasuno, S., Ohara, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 836 (1971)
- 7) Nakadai, T., Nasuno, S.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 273 (1977)
- 8) 那須野精一、小原忠彦：調味科学, **19**, 42 (1972)
- 9) 古屋武、野口勝美、宮内謙吉、内田一生：農化, **59**, 605 (1985)
- 10) 原昌道、菅間誠之助、本郷和男、大場俊輝、長谷川佳広、村上英也：発酵工学, **52**, 306 (1974)
- 11) 原昌道、菅間誠之助、野白喜久雄、村上英也：醸協, **70**, 348 (1975)
- 12) 原昌道、菅間誠之助、村上英也：発酵工学, **53**, 12 (1975)
- 13) 小泉武夫、村井総一郎、鈴木明治：醸協, **69**, 862 (1974)
- 14) Uchida, K., Ishitani, C., Ikeda, Y.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **4**, 31 (1958)
- 15) Oda, K., Iguchi, N.: *Agric. Biol. Chem.*, **27**, 758 (1963)
- 16) 古屋武、石毛雅夫、内田一生、吉野宏：農化, **57**, 1 (1983)
- 17) 横山勉、門脇清：醬研, **9**, 137 (1983)
- 18) Ushijima, S., Nakadai, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1051 (1987)
- 19) 杉並孝二、安岡章夫、市川英治、水津哲義、今安聰：昭和58年度日本農芸化学会大会講演要旨、p. 336
- 20) 水津哲義、富永嘉男、岡田茂孝、杉並孝二、今安聰：昭和60年度日本農芸化学会大会講演要旨、p. 8
- 21) Kiyohara, H., Watanabe, T., Imai, J., Takizawa, N., Hatta, T., Nagao, K., Yamamoto, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 671 (1990)
- 22) Case, M. E., Schweizer, M., Kushner, S. R., Giles, N. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5259 (1979)
- 23) Ballance, D. J., Buxton, F. P., Turner, G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **112**, 284 (1983)
- 24) Tilburn, J., Scazzocchio, C., Tailor, G. G., Zabicky-Zissman, J. H., Lockington, R. A., Davies, R. W.: *Gene*, **26**, 206 (1983)
- 25) Gomi, K., Iimura, Y., Hara, S.: *Agri. Biol. Chem.*, **51**, 2549 (1987)

- 26) Iimura, Y., Gomi, K., Uzu, H., Hara, S.: *Agri. Biol. Chem.*, **51**, 323 (1987)
- 27) 原昌道、菅間誠之助：醸協, **70**, 169 (1975)
- 28) 伊藤清：醸協, **82**, 144 (1987)
- 29) Yoshioka, K., Hashimoto, N.: *Agri. Biol. Chem.*, **48**, 333 (1984)
- 30) 石川雄章、百瀬洋夫、吉沢淑：醸協, **79**, 62 (1984)
- 31) 栗山一秀、芦田晋三、斉藤義幸、秦洋二、杉並孝二、今安聰：発酵工学, **64**, 247 (1986)
- 32) 杉並孝二：第17回麹研究会会報, p. 31 (1986)
- 33) 岡崎直人、弘中吉雄、嶋崎順一、菅間誠之助：醸協, **73**, 402 (1978)
- 34) 岩野君夫、風間敬夫、布川弥太郎：醸協, **71**, 383 (1976)
- 35) 国税庁所定分析法注解、第3回改正、日本醸造協会 (1974)
- 36) 中台忠信、那須野精一、井口信義：調味科学, **18**, 435 (1971)
- 37) 岩野君夫、布川弥太郎：醸協, **71**, 792 (1976)
- 38) 佐藤信、大場皓蔵、蓼沼誠：醸協, **62**, 875 (1967)
- 39) 田中利雄、岡崎直人、五味勝也、今野宏、井出光彦：醸協, **79**, 274 (1984)
- 40) 岩野君夫、布川弥太郎：醸協, **73**, 555 (1978)
- 41) 秦洋二、大石薫、川戸章嗣、杉並孝二、今安聰：昭和60年度日本農芸化学会大会講演要旨, p. 112
- 42) 熊谷知栄子：醸協, **76**, 74 (1981)
- 43) 吉沢淑：醸協, **68**, 59 (1973)
- 44) Peberdy, J. F.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **33**, 21 (1979)
- 45) Bartnicki-Garcia, S.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **22**, 87 (1968)
- 46) Horikoshi, K., Iida, S.: *Nature*, **181**, 917 (1958)
- 47) Horikoshi, K., Sakaguchi, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **4**, 1 (1958)
- 48) Horikoshi, K., Iida, S.: *Nature*, **183**, 186 (1959)
- 49) Horikoshi, K., Koffler, H., Arima, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, **73**, 267 (1963)
- 50) 幸村一郎、加納英雄、山田和彦、熊谷知栄子、山下孝一、布川弥太郎：発酵工学, **53**, 249 (1975)
- 51) 小幡孝之、山下孝一、布川弥太郎：発酵工学, **53**, 256 (1975)
- 52) 熊谷知栄子、布川弥太郎、秋山裕一：農化, **55**, 391 (1981)
- 53) Berger, L. R., Reynolds, D. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 522 (1958)
- 54) Reissig, J. L., Strominger, J. L., Leloir, L. E.: *J. Biol. Chem.*, **217**, 959 (1955)
- 55) Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952)
- 56) Obata, T., Iwata, H., Namba, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2387 (1977)
- 57) Bacon, J. S. D., Davidson, E. D., Jones, D., Taylor, I. F.: *Biochem. J.*, **101**, 36C (1966)

- 58) 井口昌一郎、平野正：細胞, **12**, 314 (1980)
- 59) Raper, K. B., Fennell, D. I.: The Genus *Aspergillus*, Williams & Wilkins, Baltimore (1965)
- 60) Murakami, H.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **17**, 281 (1971)
- 61) 金子太吉：醸協, **83**, 384 (1988)
- 62) 鈴木健一朗：化学と生物, **26**, 858 (1988)
- 63) Kozlowski, M., Bartnik, E., Stepien, P. P.: *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 471 (1982)
- 64) Kurtzman, C. P., Smiley, M. J., Robnet, C. J., Wicklow, D. J.: *Mycologia*, **78**, 955 (1986)
- 65) 村上英也：醸造試験所報告, **143**, 207 (1971)
- 66) Klick, M. A., Mullaney, E. J.: *Exp. Mycol.*, **11**, 170 (1987)
- 67) Yuasa, K., Hayashi, K., Mizunuma, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1683 (1982)
- 68) Klick, M. A., Pitt, J. I.: *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **91**, 99 (1988)
- 69) Timberlake, W. E.: *Science*, **202**, 973 (1978)
- 70) Ferenczy, L., Kevei, F., Szegedi, M.: *Experientia*, **31**, 50 (1975)
- 71) Kevei, F., Peberdy, J. F.: *J. Gen. Microbiol.*, **102**, 255 (1977)
- 72) Kevei, F., Peberdy, J. F.: *Mol. Gen. Genet.*, **170**, 213 (1979)
- 73) Anne, J., Peberdy, J. F.: *Arch. Microbiol.*, **105**, 201 (1975)
- 74) Anne, J., Peberdy, J. F.: *J. Gen. Microbiol.*, **92**, 413 (1976)
- 75) Anne, J., Eyssen, H., De Somer, P.: *Nature*, **262**, 719 (1976)
- 76) Ohnuki, T., Etoh, Y., Beppu, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 451 (1982)
- 77) Goto-Hamamoto, M., Ohnuki, T., Uozumi, T., Beppu, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1467 (1986)
- 78) Burton, K.: *Biochem. J.*, **62**, 315 (1956)
- 79) Ishitani, C.: *Nature*, **178**, 706 (1956)
- 80) 菅間誠之助、原昌道、大場俊輝、山田純、村上英也：味噌の科学と技術, **254**, 25 (1975)
- 81) Pontecorvo, G., Roper, J. A.: *Advances in Genet.*, **5**, 218 (1953)
- 82) Pontecorvo, G., Roper, J. A., Forbes, E.: *J. Gen. Microbiol.*, **8**, 198 (1953)
- 83) Ishitani, C., Ikeda, Y., Sakaguchi, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **2**, 401 (1956)
- 84) Williamson, D. H., Fennell, D. J.: *Methods Cell Biol.*, **12**, 335 (1974)
- 85) Kangatharalingam, N., Ferguson, M. W.: *Curr. Microbiol.*, **10**, 99 (1984)
- 86) Herbert, D., Phipps, P. J., Strange, R. E.: *Methods in Microbiology*, Vol. 5B, ed. Norris, J. R., Academic Press, NY (1971) 324.
- 87) 大場俊輝、原昌道、菅間誠之助、村上英也：発酵工学, **50**, 704 (1972)
- 88) Ohba, T., Murakami, H., Hara, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 674 (1971)
- 89) Ushijima, S., Nakada, T., Uchida, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2781 (1987)
- 90) Ishitani, C., Sakaguchi, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **2**, 356 (1956)

- 91) Hinnen, A., Hicks, J. B., Fink, G. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1929 (1978)
- 92) Beggs, J. D.: *Nature*, **275**, 104 (1978)
- 93) Timberlake, W. E., Marshall, M. A.: *Science*, **244**, 1313 (1989)
- 94) Fincham, J. R. S.: *Microbiol. Rev.*, **53**, 148 (1989)
- 95) Kelly, J. M., Hynes, M. J.: *EMBO J.*, **4**, 475 (1985)
- 96) Buxton, F. P., Gwynne, D. I., Davies, R. W.: *Gene*, **37**, 207 (1985)
- 97) Johnstone, I. L.: *Microbiol. Sciences*, **2**, 307 (1985)
- 98) John, M. A., Peberdy, J. F.: *Enzyme Microbiol. Technol.*, **6**, 386 (1984)
- 99) Yelton, M. M., Hamer, J. E., Timberlake, W. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1470 (1984)
- 100) Berse, B., Dmochowska, A., Skrzypek, M., Weglenski, P., Bates, M. A., Weiss, R. L.: *Gene*, **25**, 109 (1983)
- 101) Upshall, A., Gilbert, T., Saari, G., O'Hara, P. J., Weglenski, P., Berse, B., Miller, K., Timberlake, W. E.: *Mol. Gen. Genet.*, **204**, 349 (1986)
- 102) Weiss, R. L., Puetz, D., Cybis, J.: in *Gene Manipulation in Fungi*, ed. Bennett, J. W., Lasure, L. L., Academic Press, NY (1985) 250
- 103) Dmochowska, A., Berse, B., Kowalska, I., Skrzypek, M., Weglenski, P.: *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 1729 (1986)
- 104) Kushner, S. R.: in *Genetic Engineering*, ed. Boyer, H. B., Nicosia, S., Elsevier, Amsterdam (1978) 17
- 105) Birnboim, H. C., Doly, J.: *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513 (1979)
- 106) Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1982)
- 107) Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, **98**, 503 (1975)
- 108) Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C., Berg, P.: *J. Mol. Biol.*, **113**, 237 (1977)
- 109) Takata, Y., Goto, K., Hara, S., Tamura, G.: *Agric. Biol. Chem.*, **56**, in press (1991)
- 110) Prescott, L. M., Jones, M. E.: *Anal. Biochem.*, **32**, 408 (1969)
- 111) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 112) Laemmli, U. K.: *Nature*, **227**, 680 (1970)
- 113) Ballance, D. J., Turner, G.: *Gene*, **36**, 321 (1986)
- 114) Vollmer, S. J., Yanofsky, C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4869 (1986)
- 115) Shwartz, D. C., Cantor, C. R.: *Cell*, **37**, 67 (1984)
- 116) Carle, G. F., Olson, M. V.: *Nucleic Acids Res.*, **12**, 5647 (1984)
- 117) Orbach, M. J., Vollrath, D., Davis, R. W., Yanofsky, C.: *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 1469 (1988)
- 118) Brody, H., Carbon, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6260 (1989)
- 119) Ward, M., Kodama, N. H., Wilson, L. J.: *Exp. Mycol.*, **13**, 289 (1989)
- 120) Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A.: *J. Bacteriol.*, **153**, 163 (1983)
- 121) Dhawale, S. S., Paietta, J. V., Marzluf, G. A.: *Curr. Genet.*, **8**, 77-79 (1984)

- 122) Struhl, K.: *Nature*, **305**, 391 (1983)
- 123) Wernars, K., Goosen, T., Wennekes, L. M. J., Visser, J., Bos, C. J., Van den Broek, H. W. J., Van Gorcom, R. F. M., Van den Hondel, C. A. M. J. J., Pouwels, P. H.: *Curr. Genet.*, **9**, 361 (1985)
- 124) Tada, S., Iimura, Y., Gomi, K., Takahashi, K., Hara, S., Yoshizawa, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 593 (1989)
- 125) Hata, Y., Tsuchiya, K., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C., Tamura, G., Hara, S.: *Gene*, submitted.
- 126) Ozeki, K., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C., Tamura, G., Hara, S.: *Curr. Genet.*, **19**, 367 (1991)
- 127) Shibuya, I., Gomi, K., Iimura, Y., Takahashi, K., Tamura, G., Hara, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1905 (1990)
- 128) 土屋幸三、多田節三、田村學造、地神芳文、五味勝也、北本勝ひこ、熊谷知栄子:
平成3年度日本発酵工学会大会講演予定
- 129) Tada, S., Gomi, K., Kitamoto, K., Takahashi, K., Tamura, G., Hara, S.: *Mol. Gen. Genet.*, in press (1991)
- 130) Tada, S., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., Tamura, G., Hara, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1939 (1991)
- 131) 秦洋二、北本勝ひこ、五味勝也、熊谷知栄子、田村學造、原昌道: 1991年度日本農芸化学会大会講演要旨、p. 166
- 132) 尾関健二、北本勝ひこ、五味勝也、熊谷知栄子、田村學造、原昌道: 1990年度日本農芸化学会大会講演要旨、p. 435
- 133) Broach, J. R., Strathern, J. N., Hicks, J. B.: *Gene*, **8**, 121 (1979)
- 134) Johnstone, I. L., Hughes, S. G., Clutterbuck, A. J.: *EMBO J.*, **4**, 1307 (1985)
- 135) Jimenez, A., Davies, J.: *Nature*, **287**, 869 (1980)
- 136) Gritz, L., Davies, J.: *Gene*, **25**, 179 (1983)
- 137) Punt, P. J., Oliver, R. P., Dingemanse, M. A., Pouwels, P. H., van den Hondel, C. A. M. J. J.: *Gene*, **56**, 117 (1987)
- 138) Cullen, D., Leong, S. A., Wilson, L. J., Henner, D. J.: *Gene*, **57**, 21 (1987)
- 139) Ward, M., Wilkinson, B., Turner, G.: *Mol. Gen. Genet.*, **202**, 265 (1986)
- 140) Orbach, M. J., Porro, E. B., Yanofsky, C.: *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 2452 (1986)
- 141) May, G. S., Tsang, M. L.-S., Smith, H., Fidel, S., Morris, N. R.: *Gene*, **55**, 231 (1987)
- 142) Gatingnol, A., Baron, M., Tiraby, G.: *Mol. Gen. Genet.*, **207**, 342 (1987)
- 143) Hynes, M. J., Corrick, C. M., King, J. A.: *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 1430 (1983)
- 144) Beri, R. K., Turner, G.: *Curr. Genet.*, **11**, 639 (1987)
- 145) Penttilä, M., Nevalainen, H., Ratto, M., Salminen, E., Knowles, J. K. C.: *Gene*, **61**, 155 (1987)

- 146) Kelly, J. M., Hynes, M. J.: *Curr. Genet.*, **12**, 21 (1987)
- 147) Christensen, T., Woeldike, H., Boel, E., Mortensen, S. B., Hjortshøj, K., Thim, L., Hansen, M. T.: *BioTechnology*, **6**, 1419 (1988)
- 148) Cathala, G., Savouret, J. F., Mendez, B., West, B. L., Karin, M., Martial, J. A., Baxter, J. D.: *DNA*, **2**, 329 (1983)
- 149) Henikoff, S.: *Gene*, **28**, 351 (1983)
- 150) Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463 (1977)
- 151) Corrick, C. M., Twomey, A. P., Hynes, M. J.: *Gene*, **53**, 63 (1987)
- 152) Chang, T. H., Abelson, J.: *Nucleic Acids Res.*, **18**, 7180 (1990)
- 153) Gurr, S. J., Unkles, S. E., Kinghorn, J. R.: in *Gene Structure in Eukaryotic Microbes*, ed. Kinghorn, J. R., SGM Special Publications, Vol. 22, IRL Press, Oxford (1987) 93
- 154) Hynes, M. J.: *J. Bacteriol.*, **131**, 770 (1977); Hynes, M. J.: *Mol. Gen. Genet.*, **161**, 59 (1978)
- 155) Punt, P. J., Dingemans, M. A., Jacobs-Meijnsing, B. J. M., Pouwels, P. H., van den Hondel, C. A. M. J. J.: *Gene*, **69**, 49 (1988)
- 156) Clements, J. M., Roberts, C. F.: *Curr. Genet.*, **9**, 293 (1985)
- 157) Mullaney, E. J., Hamer, J. E., Roberti, K. A., Yelton, M. M., Timberlake, W. E.: *Mol. Gen. Genet.*, **199**, 37 (1985)
- 158) Hata, Y., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C., Tamura, G., Hara, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 941 (1991)
- 159) Hynes, M. J., Davis, A.: *Bio Essays*, **5**, 123 (1986)
- 160) Wirsal, S., Lachmund, A., Wildhardt, G., Ruttkowski, E.: *Mol. Microbiol.*, **3**, 3 (1989)
- 161) Gines, M. J., Dove, M. J., Seligy, V. L.: *Gene*, **79**, 107 (1989)
- 162) Tsukagoshi, N., Furukawa, M., Nagaba, H., Kirita, N., Tsuboi, A., Udaka, S.: *Gene*, **84**, 319 (1989)
- 163) Gomi, K., Arikawa, K., Kamiya, N.: 投稿準備中

謝 辞

本研究を行うにあたりまして、終始、ご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学教授、別府輝彦先生に心から感謝申し上げます。

国税庁醸造試験所長、原 昌道博士、醸造試験所第4研究室長、熊谷知栄子博士、前第4研究室長（現在、札幌国税局鑑定官室長）、高橋康次郎博士、醸造試験所主任研究員、飯村 穰博士、岡崎直人博士、北本勝ひこ博士の方々には有益なご助言ならびにご支援をいただきました。深く感謝致します。

また、秋山裕一先生をはじめとする歴代の国税庁醸造試験所長の皆様と、東京大学名誉教授、田村学造先生には著者の研究の遅れにも拘らず、あたたかくお励まし下さいました。厚くお礼申し上げます。

さらに、本研究を遂行するために、醸造試験所第4研究室に在室された多くの共同研究員及び研修員の方々にご援助いただきました。感謝申し上げます。

