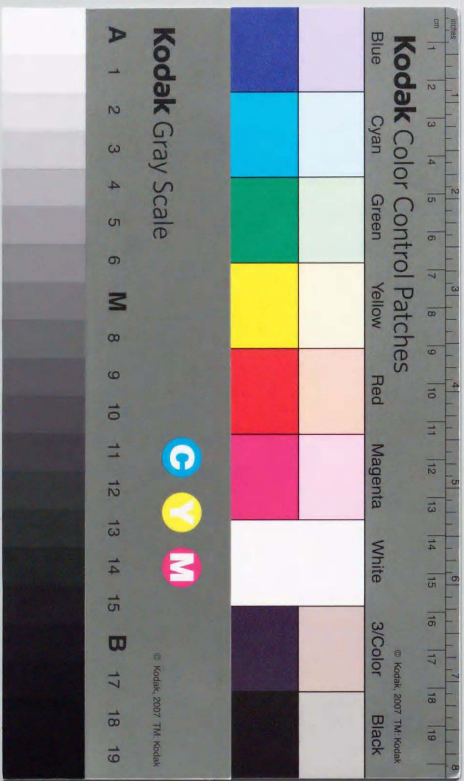


麹菌遺伝子プロモーターの
解析と形質転換法に関する研究

尾関 健二



①

麴菌遺伝子プロモーターの
解析と形質転換法に関する研究

1995年

尾 関 健 二

目次

序論	1
実験方法	6
第一章 麹菌 (<i>A. oryzae</i>) リボヌクレアーゼT ₂ 遺伝子のクローニングとその発現制御	16
第二章 <i>Aspergillus</i> 属形質転換株からの自律増殖プラスミドの回収	37
第三章 <i>Aspergillus</i> 属で機能する自律増殖配列を用いたプロモーター検索用ベクターの構築と <i>A. oryzae</i> と <i>A. niger</i> のプロモーター領域の性質	51
第四章 エレクトロポレーション法によるインタクトな <i>A. niger</i> への形質転換	71
総括	86
発表論文	90
引用文献	91
謝辞	100

序論

糸状菌（カビ）は、麴菌 *Aspergillus oryzae* のように古くから我が国で、酒類、醤油、味噌などの発酵食品の生産に広く利用されているものや、黒麴菌 *Aspergillus niger* や *Aspergillus awamori*（両菌株とも分類的には別種とされてきたが、その遺伝子の相同性から最近同種とみなす研究者が増えてきている）のように、酵素製剤や有機酸の生産などに利用されている産業上非常に重要な微生物である。このような見地から、“東洋の文化はカビの文化”と言われているように、良きにつけ悪きにつけ我々は、古くからカビと非常に密接な関係にある。そのため我が国では、カビに関して莫大な研究がなされ、数多くの重要な成果が得られている。しかしカビの遺伝学的研究になると、我が国で利用されている麴菌や *Penicillium* などの工業的に重要なカビが、有性生殖環を持たないため、交雑による遺伝解析が行えないことや菌糸だけでなく胞子も多核であり、変異株の分離も困難であることなどの理由により、ほとんど研究がなされていなかった。

一方外国では、カビは有用菌と言うよりはどちらかというと、有害菌として捉えられていることが多く、工業的には余り重要ではないが遺伝解析が可能な *Neurospora crassa* や *Aspergillus nidulans* などのカビを用いた遺伝学的研究が数多くなされてきた。このような

カビの遺伝学的研究の成果の蓄積を基盤として、1979年に *M. crassa* (Case *et al.*), 1983年に *A. nidulans* (Ballance *et al.*, Tilburn *et al.*)の形質転換系が報告されはじめ、我が国でも1987年に *A. oryzae*での形質転換が可能であることをImuraら(1987)とGomiら(1987)により相次いで報告された。これにより *A. oryzae*の遺伝子のクローニングや解析が可能になり、 α -amylase (Tada *et al.* 1989) や glucoamylase (Hata *et al.* 1991a, b) や alkali-protease (Tatsumi *et al.* 1989) や acid-protease (Gomi *et al.* 1993) をはじめとする酵素の遺伝子が単離され遺伝子構造が解析されてきている。

最初に、カビの形質転換方法については、ほとんど全て適当な細胞壁溶解酵素でカビをプロトプラス化し、プロトプラス融合が起こる際にDNAが同時に細胞内に導入させるものである。形質転換に用いられる宿主としては、形質転換株の検出が可能な遺伝子マーカーが付与されている必要があり、主に栄養要求性マーカーが用いられている。工業的に利用されている菌に対しては、栄養要求性などのマーカーを付与するための変異処理は、元来その菌が有している優良な性質を損なうことが多く、余り好ましくない。そこで、優性のマーカーとして種々のカビで栄養要求性変異株を造成せずに、薬剤耐性遺伝子が利用されることが多くなってきている。*A. oryzae*の場合、このような薬剤に対する耐性が高いため、薬剤耐性遺伝子を利用するにはプロモーターの改変など工夫をする必要がある。

次に、菌体内に取り込まれた外来DNAの大部分は、染色体DNAに組

み込まれ、遊離の状態で存在することは希である。カビでは一般的に、相同的組み換えと非相同的組み換えのいずれでも染色体への組み込みが起こるが、ベクターDNAが何コピーもタンデムにつながって組み込まれることが多い。染色体への組み込みにより形質転換頻度は低くなるが、染色体へ組み込まれたDNAは、体細胞分裂を繰り返しても脱落せず、形質転換株の性質が極めて安定であるという長所もある。このことは、麹菌のような実用株を用いて酵素などの生産を行う場合には、生育の良い栄養培地を使用することが多いので、このような非選択的な条件下で培養しても、形質が安定していることは重要なことである。

1990年代になり、カビの細胞内で自己複製配列の単離が試みられ、*A. nidulans*から *AMAI* (Autonomously Maintained in *Aspergillus*) がクローニングされ、プラスミド型のベクターとして、組み込み型のそれに比べ、250倍の形質転換頻度の上昇が認められた (Gems *et al.* 1991)。この配列は、*A. oryzae* や *A. niger* でも同様に形質転換株内でフリーの状態が存在し、形質転換頻度を大幅に上昇させた。最近、この *AMAI* 配列を利用して *A. oryzae* の *argB* 遺伝子 (牛場ら 1992)、*A. niger* の *nicB* 遺伝子 (Verdoes *et al.* 1994) のクローニングなどの報告がなされるようになった。従って、今後有用遺伝子のショットガンクローニングに、この *AMAI* プラスミドが汎用されるものと考えられる。

以上のように、カビの遺伝子操作技術の発展により、遺伝子導入

が可能になるに従って、*A. nidulans*だけでなく*A. niger*や*A. oryzae*が異種タンパクの生産の宿主として注目されてきている。異種タンパク生産系としては、大腸菌、枯草菌をはじめ、酵母、昆虫、動物細胞などの数多くの系が開発されており、生産目標とするタンパクに適するものが選択されている。カビの多くは異種タンパク生産の宿主として、優れた点をいくつか持っている (Saunders *et al.* 1989)。即ち、カビは多種のタンパクを菌体外に分泌することから、分泌能が高いと考えられ、その他*A. oryzae* (Barbesgaard *et al.* 1992)、*A. niger*、*A. awamori*などは、長い間醸造に用いられて来たことから、宿主としての安全性が認められている。また、培養や生成物精製などのプロセスに関する研究の蓄積があり、大量培養などが容易である。異種タンパクを活性ある形で生産させるためには、タンパクの折りたたみや糖鎖の付加などの翻訳後の修飾が、本来の生物と同様に行われることが重要である。カビは、大腸菌や酵母より進化過程がより高等動物に近いので、人や動物由来の有用なタンパクを活性ある形で分泌することが期待できる。

本研究は、以上述べた背景を基に *Aspergillus* 属で機能するプロモーターを取得し、異種タンパク生産の強力なプロモーターの一つである、*A. oryzae* の α -amylase のプロモーター (*amyB*) との比較を行い、取得したプロモーターで異種タンパクの生産に利用することを目的に行ったものである。最初に、*A. oryzae* の各種菌体外酵素の内、生命現象に不可欠であるリボヌクレアーゼ (RNase) T₂ 遺伝子のプロモ-

ーターがどの程度のプロモーター活性を持ち、その発現誘導について推定し、異種タンパク生産の可能性を探った (第一章)。次に、組み込み型のベクターの場合は、形質転換株からのDNAの回収が容易ではないので、今後利用が大いに考えられる *AMA1* プラスミドを持つ、多数の形質転換株からプラスミドを簡単に回収する方法について検討を加えた (第二章)。そして、*AMA1* 配列を利用して、*A. niger* と *A. oryzae* の染色体から、*amyB* プロモーター以上の強力なプロモーター活性のあるDNA断片を検索した。取得したプロモーターは、液体培養、麹培養ともに *amyB* プロモーターよりも数倍高いプロモーター活性を示し、物質生産の可能性を広げた (第三章)。最後に、高生産株の取得には不可欠である形質転換方法について、基礎的な研究が不足している中で、簡便に形質転換できる方法について模索した。*A. niger* の場合、プロトプラストを経由することなく、発芽した胞子にエレクトロポレーションにより、直接DNAを導入できることを見出した (第四章)。

実験方法

1. 使用菌株

第一章の野性株と染色体ライブラリー調製用株として *A. oryzae* RIB40株を使用した。また同様に野性株として *A. nidulans* IF02006株を使用した。第三章のプロモーター検索用の染色体ライブラリー調製用株として、*A. oryzae* IF04290株と *A. niger* IF06428株を使用した。

第一章の *A. oryzae* の形質転換の宿主として、*A. oryzae* M-2-3 (*argB*; オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ欠損株; Gomi *et al.* 1987) を用いた。第二章以下の *A. oryzae* の形質転換の宿主は、*A. oryzae* IF05240 から変異処理により取得した *argB* 株を使用した。*A. nidulans* および *A. niger* の形質転換の宿主は、*A. nidulans* G034 (*argB*, FGSC89), *A. niger* van Tieghem ATCC20739 (*argB*) をそれぞれ使用した。

組み換えプラスミドの取得には、大腸菌 *Escherichia coli* HB101 および JM109 (Yanisch-Perron *et al.* 1985) を用いた。*E. coli* Q359 (Maniatis *et al.* 1982) は、第一章の λ ファージライブラリーの宿主として、および *E. coli* DH5 は、第三章のプロモーター検索用の染色体ライブラリーとして用いた。

2. 使用プラスミド

第一章のプラスミドベクターとして pUC118 (Vieira and Messing 1987) と pUC119 と pSal23 (Gomi *et al.* 1987) を、 λ ファージベクターとして EMBL3 (Frishauf *et al.* 1983) を用いた。第二章以降のプラスミドベクターとして pUC18 と pUC19 と Bluescript II SK⁻ を用いた。また *Aspergillus* 属のマーカ―遺伝子として、*A. nidulans* 由来の *argB* 遺伝子を持つ pDG3 (Buxton *et al.* 1985) を加工して用い、プラスミドベクターとして、*A. nidulans* 由来の *AMA1* 配列を持つ ARp1 と pDHG25 (Dr. Clutterbuck; Glasgow 大学より購入, Gems *et al.* 1991) をそれぞれ加工して用いた。またレポーター遺伝子として、*E. coli* の β -グルクロニダーゼ (*GUS*) 遺伝子 (*uidA*; Jefferson *et al.* 1987) を持つ pBI121 と pBI101 (東洋紡) を加工して用いた。

3. 使用培地

Aspergillus 属の液体培養には下記の培地を用いた。

Czapek-Dox (CD) 培地: 2%炭素源, 0.3%NaNO₃, 0.2%KCl, 0.1%KH₂PO₄, 0.05%MgSO₄·7H₂O, 0.002%FeSO₄·7H₂O, pH5.5。

Dextrin-Peptone (DP) 培地: 2%デキストリン, 1%ポリペプトン, 0.5%KH₂PO₄, 0.1%NaNO₃, 0.05%MgSO₄·7H₂O。

A. oryzae の固体培養は、岡崎ら (1979) の方法に従い、70%精白米を用い α 米を調製後、恒温恒湿器中で米麴を調製した。

4. *A. niger*の発芽率の測定

発芽率測定用の培地は以下のものを用いた。

DP培地：前述

1/2DP培地：DP培地の半分の濃度の培地

MYG培地：1%麦芽エキス，0.4%酵母エキス，2%グルコース

MY培地：0.3%麦芽エキス，0.3%酵母エキス，1%グルコース，0.5%プトン

MY20培地：0.3%麦芽エキス，0.3%酵母エキス，20%グルコース，0.5%プトン

上記培地中*A. niger*(*argB*)の胞子を接種し、25℃で15時間培養後、発芽胞子を遠心分離で集菌し、0.1%ツイーン20で分散後、顕微鏡下で発芽胞子数を測定した。

5. 形質転換株の取得

A. oryzae, *A. niger*の形質転換は、通常のプロトプラスト法(Gomi *et al.* 1987)に以下のように多少の改良を加えて行った。

プロトプラスト化の溶菌酵素は、Yatalase (宝酒造)を用い、プロトプラストの集菌のための濾過は、30 μ mのナイロンメッシュを用いた。*A. nidulans*の形質転換は、KellyとHynes(1985)の方法に従った(cotransformation)。

*A. niger*の電トロポレーション法は、発芽胞子を電トロポレーション用緩衝液で洗浄後、遺伝子導入装置(島津製作所)を用い、キューベットにDNAと混合し、電トロポレーションを行った。以上の宿主は全て、DNAの導入によりアルギニン要求性が相補された

株を、CD寒天培地上で形質転換株として分離し、数回の植え継ぎを行った。

また大腸菌の形質転換は、Hanahan(1983)の方法に準じて行った。

6. *Aspergillus*属からのDNA画分の調製

*Aspergillus*属を100mlのDP培地で、30℃、3日間振とう培養を行い、ガラスフィルター(3G1)で集菌後、蒸留水で洗浄した。水分を除いた菌体を、液体窒素下の乳鉢で粉砕した。TE緩衝液(10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA)に粉砕菌体を懸濁し、等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25/24/1)を加え攪拌後、遠心分離により水相を集めた。この操作を2回繰り返し、エタノール沈殿によりDNA画分を回収した。DNAをTE緩衝液に溶解し、リボヌクレアーゼA処理を行い、再びDNAを回収し、TE緩衝液に懸濁した。

また、*AMA1*プラスミドを持つ形質転換株からの簡易DNAの回収方法として、50ml容量のファルコンチューブ中、10mlのCD培地で形質転換株を30℃で2日間培養後、上清を5ml除き、2倍濃度の溶菌酵素液(1% Yatalase, 1.6M NaCl, 50mMリン酸緩衝液, pH6.0) 5mlを加え、30℃で3時間プロトプラスト化反応を行った。遠心分離によりプロトプラストを集め、50mM Tris-HCl緩衝液pH7.5, 50mM EDTA, 0.5%SDSに懸濁し、37℃で30分間処理し、DNAを抽出後、同上のフェノール/クロロホルム抽出に従ってDNA画分を調製した。また本法は、最終的にPEG沈によりDNAを精製した。DNA濃度は、260nmの吸光度から、

$A_{260}=1$ のとき $50\mu\text{g/ml}$ として計算した。

7. *A. oryzae*からのRNA画分およびmRNAの調製

*A. oryzae*からのRNA画分の調製は、Cathalaら(1983)の方法を改変して行った。100mlのCD培地で培養した菌体を集菌洗浄後、液体窒素下の乳鉢で粉碎し、6mlの10% 2-メルカプトエタノールを含む5Mグアニジンチオシアン酸溶液に懸濁した。これに30mlの4M塩化リチウム溶液を加えた後、4℃に一晩置き、低速遠心分離(3000rpm)により不溶性の菌体残査を分離した。上清を高速遠心分離(15000rpm)、沈澱をRNA画分として分離し、更にこの沈澱を3M塩化リチウム溶液によって洗浄した。沈澱を0.1%SDSを含むTE緩衝液に懸濁し、等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを加え、遠心操作により水相を分離し、エタノール沈澱によりRNA画分を回収し、蒸留水に懸濁した。

またmRNAの調製は、poly(U)-Sepharose 4B(ファルマシア)を用いて行った。RNA濃度は、260nmの吸光度から、 $A_{260}=1$ のとき $33\mu\text{g/ml}$ として計算した。

8. *Aspergillus*属の菌体内酵素の抽出

*Aspergillus*属の菌体内酵素の抽出法は、集菌、洗浄した菌体を液体窒素下の乳鉢で粉碎し、これを10mM EDTA, 0.1%Triton X-100, 0.1%Sarkosyl, 10mM 2-メルカプトエタノールを含む50mMリン酸緩衝

液(pH7.0)に懸濁し、遠心分離後、上清を酵素抽出液とした。

9. 酵素活性の測定

(1)リボヌクレアーゼ(RNase)T₂活性

Satoら(1966)の方法に準じて行った。反応液(2.5ml)は、0.25Mクエン酸-NaOH緩衝液(pH6.0):0.25mlと、ウリジン2',3'環状リン酸の4mg/ml溶液:0.25mlを含み、酵素液10 μ lを添加したときのOD₂₇₅の経時変化を測定した。その勾配から、 $\Delta\epsilon_{275}=1.0\times 10^3$ として分解量を求め、1分間に1 μ moleの基質を分解する酵素量を1単位とした。

(2) β -グルクロニダーゼ(GUS)活性

GUS活性の寒天培地上での定性的な発色法は、0.005% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide(X-gluc)を含むCD培地上で、青色の強度により判定した。

定量的な活性は、Jeffersonら(1986)の方法に準じて行った。10mM p-nitrophenyl glucuronide溶液0.1mlを0.8mlの活性測定用緩衝液(50mMリン酸緩衝液pH7.0, 10mM 2-メルカプトエタノール, 0.1%Triton X-100)と混和し、酵素抽出液0.1mlを加え、37℃で反応させた。2.5M 2-amino-2-methyl propanediol 0.4mlを加え反応を停止し、遊離するp-nitrophenolを415nmの吸光度で測定した。この反応系で、0.010 ODは、p-nitrophenolの分子吸光係数14000で1nmole生成し、1単位は一分間に1nmoleのp-nitrophenolを生成する酵素量とした。

10. タンパク量の定量

Bradford(1976)の方法に準じ、牛血清アルブミンを標準として定量した。

11. オリゴDNAの合成

DNA合成機(アプライド バイオシステムズ 381A)を使用してオリゴDNAの合成を行った。

12. Polymerase Chain Reaction (PCR) 法によるDNA断片の増幅

GeneAmp DNA Amplification Reagent Kit(宝酒造)を使用して行った。即ち、Reaction buffer, 200mM dNTPs mix, 1mMのセンスおよびアンチセンスプライマー、鋳型DNA, 2.5units Taq DNA polymeraseを混合後、遺伝子増幅恒温槽(Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler)を用いて、目的とするDNA断片を増幅した。反応条件は通常は、DNAの熱変性、94°C, 1分、プライマーとのアニーリング、50°C, 2分、ポリメラーゼ伸長反応、72°C, 3分とし、この反応を30回繰り返した。

13. DNA断片の放射能標識

オリゴDNAの5'末端の放射能標識は、HarrisonとZimmerman(1986)の方法に準じ、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ とMEGALABEL Kit(宝酒造)を用いて行った。

DNA断片の放射能標識は、FeinbergとVogelstein(1983)の方法に準じ、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ とRandom Primer DNA Labeling Kit(宝酒造)を用いて行った。

14. ブラークスクリーニング

*A. oryzae*の染色体ライブラリーを、放射能標識したオリゴDNAで、以下の条件のハイブリダイゼーションを行い、陽性のブラークを検出した。

6×SSC, 5×Denhardt's, 0.1%SDS, 100μg/ml変性サケDNAのハイブリダイズ溶液で、55°C, 16時間ハイブリダイズした。洗浄は、2×SSC, 55°C, 30分間、0.2×SSC, 55°C, 1時間行った(Maniatis *et al.* 1982)。

15. ドットおよびサザン解析

ドットプロットは、DNA画分をHybond-N⁺ナイロンメンブラン(アマシャム)にドットし、サザンプロットは、DNA画分をアガロース電気泳動により分画したゲルから、同上のメンブランにプロットした。そしてECL法(enhanced chemiluminescence, アマシャム, Knight 1990)によりベルオキシダーゼ標識したDNA画分、または放射能標識したDNA断片をプローブとして、以下の条件のハイブリダイゼーションを行い、目的のDNAを検出した。

ハイブリダイズ溶液は、ブラークスクリーニングの時の溶液と同

一で、65°C、16時間ハイブリダイズし、洗浄は2×SSCと0.1%SDSで、65°C、30分間、3回行った。

16. ノーザン解析

RNA画分をホルムアミド-アガロースゲル電気泳動により分画したゲルから、Hybond-Nナイロンメンブラン（アマシャム）にプロテイングし、放射能標識したDNA断片をプローブとして用いて検出した。

17. 転写開始点の決定

*A. oryzae*の形質転換株のmRNAを用いて、石川(1987)の解説に準じてS1マッピングを行った。プローブは、転写開始点が含まれると予想されるDNA断片の5'末端を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ で標識し、mRNAとDNA断片がハイブリダイズしていない1本鎖をS1ヌクレアーゼで分解した後、mRNA-DNAのハイブリッド断片を分子量マーカーと同時に電気泳動することにより検出した。ハイブリダイゼーションの温度は、 $T_m=22+0.5 \times (G+C)-500/n$ (n :ハイブリダイズする二重鎖の長さ)の計算式により50°Cで16時間行った。

18. ウェスタン解析

Laemmli(1970)の方法に準じて、10-20%のグラジエントゲル（第一化学）でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行いタンパクを分画し、ファルマシアのセミドライプロテイングシステムにより、

タンパクをゲルからニトロセルロースメンブラン（ミリポア）にプロテイングした。タンパク染色はクマシーブリリアントブルー R-250で行い、常法通り脱色した。GUSの検出には、抗ウサギGUS抗体（クローンテック）を用いた。抗体の検出は、ペルオキシダーゼ標識した抗ウサギイムノグロブリンG抗体（アマシャム）とイムノステインキット（コニカ）によるペルオキシダーゼ反応により行った。

第一章 麹菌 (*A. oryzae*) リボヌクレアーゼ (RNase)_{T2} 遺伝子のクローニングとその発現制御

第一項 緒言

RNase_{T2}は、SatoとEgami(1957)によって*A. oryzae*の培養液中(タカジアスターゼ)で発見され、Naoiら(1959)により部分精製された。続いてUchidaとEgami(1967)およびRushizkyとSober(1963)のニグループによりそれぞれ独立に精製され、タンパク的に均一な標品が得られた。RNase_{T2}は、タカジアスターゼ中の含量は低く、塩基特異性が非特異的で分子量36000と他の特異的RNase(T₁, N₁, U₁, U₂)と性質が異なっている。タンパクの特徴としては、比較的酸性のpH領域でも安定であり、加熱に対しても安定である(Uchida 1966)。またRNase_{T1}と異なり中性のタンパクであり、このことによりタカジアスターゼ中から混在するRNase_{T1}を除去し、精製が進められている。

Kawataら(1988)によってRNase_{T2}のタンパクの一次構造が決定され、同年*Rhizopus niveus*の同じ非特異的RNaseRhのクローニングの報告(Horiuchi *et al.* 1988)、および1990年には同じ*Aspergillus*属で*A. saitoi*の非特異的RNaseMのアミノ酸配列の報告もある(Watanabe *et al.*)。

*A. oryzae*の各種菌体外加水分解酵素のうち、遺伝子の解析例は、

1989年に α -アミラーゼ遺伝子(Tada *et al.*, Wirsal *et al.*, Gine s *et al.*, Tsukagoshi *et al.*)、およびアルカリプロテアーゼ(Tatsumi *et al.*)だけであった。その当時、 α -アミラーゼ遺伝子のプロモーターは、異種タンパクを大量に生産する能力を持つ強力な、および炭素源により制御可能なプロモーターであることが解明されつつあった(Tada *et al.* 1991a, b)。そこで、この高発現なプロモーター領域の塩基配列と比較検討する目的で、*A. oryzae*のRNase_{T2}遺伝子のクローニングとシーケンスを行った。またRNase_{T2}遺伝子のプロモーター領域を利用して、レポーター遺伝子として大腸菌の β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子(*uidA*, Jefferson *et al.* 1987)を連結して、*Aspergillus*属の形質転換株でのGUSの生産量から、 α -アミラーゼ遺伝子(Tada *et al.* 1991a)とのプロモーター活性を比較した。またこのGUSの生産量から、RNAなどの基質の添加でGUS活性の誘導について検討し、麹菌での細胞内外での局在性についても推察を行った。

第二項 実験結果

(1) リボヌクレアーゼ (RNase)_{T2} 遺伝子 (*rntB*) の単離

*A. oryzae*のRNase_{T2}タンパクの一次構造のアミノ酸配列の報告(Kawata *et al.* 1988)と、 α -アミラーゼ遺伝子(*amyB*)の三番目のコドンの使用頻度の報告(Tada *et al.* 1989)を参考にして、N末端29mer、コ

ドンの揺らぎの少ない中間領域29mer、C末端30merの三種類のプローブを以下のように合成した。

プローブ1：N末端 29mer

Glu¹-Phe-Pro-Ser-Cys-Pro-Lys-Asp-Ile-Pro¹⁰
 GAR TTC CCN WSN TGT CCN AAR GAY ATH CC

プローブ2：中間領域 29mer

Glu¹⁰⁶-Phe-Trp-Glu-His-Glu-Trp-Asn-Lys-His¹¹⁵
 GAR TTC TGG GAR CAY GAR TGG AAC AAR CA

プローブ3：C末端 30mer

Ile²³⁰-Lys-Tyr-Leu-Pro-Lys-Lys-Ser-Glu-Asn²³⁹
 ATH AAR TAY YTN CCN AAR AAR WSN GAR AAC

RはA or G; NはA, C, G or T; WはA or T; SはG or C; YはC or T;
 HはA, C or T

A. oryzae RIB40株のEMBL3の染色体ライブラリー10000ブラックから、N末端とC末端のプローブで共にハイブリダイズするクローン12個を得た。その内4個のクローンが同一で、*Hind*III 4.8kbが三種類のプローブで共に陽性の断片であり、pUC118にサブクローンした(pART-1)。その制限酵素地図とシーケンスを行うためのデレションシリーズを作成した(Fig. 1-1)。

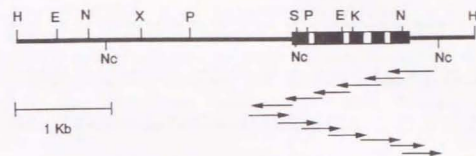


Fig.1-1 Restriction map and sequencing strategy of the genomic DNA encoding rntB. Arrows show the DNA sequencing strategy. The coding sequence is indicated by the solid (exons) and open (introns) boxes. Abbreviations: E, *Eco*RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; N, *Nhe*I; Nc, *Nco*I; P, *Pst*I; S, *Sph*I; and X, *Xho*I

(2) *rntB*遺伝子の塩基配列

次にpART-1の*Nhe*I断片3.3kbをpUC119にサブクローニングし(pART-2)、シーケンスを決定した。その断片の中には、予想に反してストップコドンが見いだせず、更にC末端を含む*Nco*I断片1.5kbのシーケンスを決定した(Fig. 1-2)。

-200 -150

5' CCGCTATCAACAGTCAGTGGATCGAAGGAGGATTCCTCTCTAGTCAATAAACCCTGTGTCTTCTGTCTTTAGACCATATGG

-100 -50

GGCTCCGCAATAATAATAGGGCAATGCTCCCTCCCGCCATCTCTGACCACTCTCCAGCTTCTCCAGCTTCTATCGGATCATTTTC

1

1 MetI 5pH1

TGGAGATGCTTCCACACCATCTCTCCCTCCAGG GGC ATG CTT GCC CTT GGT GGT ATG CAA TTA GCA GCG GGC GCA
Met Gly Met Leu Ala Leu Gly Ala Met Gln Leu Ala Ala Gly Ala

-17 100

50

GTG TTT GAG TTC CCG TCC TCC CCG AAG GAT ATT CCC TTC AGC TGT CAG AAC TCG ACC GCA GTA GCC GAC
Val Phe Glu Phe Pro Ser Cys Pro Lys Asp Ile Pro Phe Ser Cys Gln Asn Ser Thr Ala Val Ala Asp

1 20

TCC TCC TCC TTC AAC TCC CCA GCA GGC GGC CTC CTG CAG ACA CAA TTT TGG GAC ACA AAT CCC GCA AGT
Ser Cys Cys Phe Asn Ser Pro Gly Gly Ala Leu Leu Gln Thr Gln Phe Trp Asp Thr Ala Val Ala Asp

150pH1 40

200

GGT CCC TCC GAT TCC TGG ACC ATC CAC GGA CTT TGTtagtgpgaaataactcaaaacacagppatagagctgagaaag
Gly Pro Ser Asp Ser Trp Thr Ile His Gly Leu Tr

300

tetag G CTT GAT AAT TGT GAC GGC ACC TAC GGG GAA TTT TGC CAG AAC TCG CCG GAC TAC TCG AAC ATC
P Pro Asp Asn Cys Asp Gly Ser Thr Gly Gln Phe Cys Asp Lys Ser Arg Glu Tyr Ser Asn Ile

60 400

ACT GCC ATT CTT CAG GAG CAG GGC GGG ACC GAA CTT CTG TCC TAC ATG AAG AAA TAC TGG CCC AAC TAT
Thr Ala Ile Leu Gln Glu Gln Gly Arg Thr Glu Leu Leu Ser Tyr Met Lys Lys Tyr Trp Pro Asn Tyr

80 100

EcoRI 450

GAG GGC GAC GAT GAA GAA TTC TGG GAG CAG CAG TGG AAC AAG CAG Gtaagcatcagttacactacagccctta
Gly Glu Asp Asp Glu Glu Phe Trp Glu His Glu Trp Asn Lys His G

500 550

agggccactataagpctcgtggtgctgaaattctgtgttaacggaa GT ACC TGC ATC AAC ACG AT GAA CCG AGC TGT
ly Thr Cys Ile Asn Thr Ile Glu Pro Ser Cys

120

600

TAC AAG GAT TAC TCC CCG CAG AAG GAA GTG GGT GAT TAT TTG CAG AAG ACT GTA GAC CTT TTC AAG GGT
Tyr Lys Asp Tyr Ser Pro Gln Lys Glu Val Gly Asp Tyr Leu Gln Lys Thr Val Asp Leu Phe Lys Gly

140 700

CTG GAT AGC TAC AAGttgttatctcactcaactcagaaacccatcgcatatagccactttaatttaattttgtgpgtgtttt
Leu Asp Ser Tyr Lys

750

ccagtcaccatcagaagaccactctgaaaccagct CTC GCC AAA GGC GGT ATC GTC CCC GAT TCC TCC AAA ACT
Ala Leu Ala Lys Ala Gly Ile Val Pro Asp Ser Ser Lys Thr

160 850

800

TAC AAA CCG AGT GAG ATC GAA TCC GCT CTT GCC GCG ATC CAT GAC GGC AAG AAG CCC TAC ATC AGC TGC
Tyr Lys Arg Ser Glu Ile Glu Ser Ala Ala Ile His Asp Gly Lys Lys Pro Tyr Ile Ser Cys

180

900

GAG GAC GGT GCA CTC AAC GAG ATT TGG TAT TTC TAT AAC ATC AAG GGC AAT GCG ATC ACT GGC GAG TAC
Glu Asp Gly Ala Leu Asn Glu Ile Trp Tyr Phe Tyr Asn Ile Lys Gly Asn Ala Ile Thr Gly Glu Ala Tyr

200 1000

950

CAG CCA ATC GAC ACT Cgtaaagtctccagtcacatgcttattgtattgttctcaagtgctaaattctgatgcccag TT ACG TCT
Gln Pro Ile Asp Thr L

eu Thr Ser 220

1050

CTT GGA TGT TCC ACC TCA GGT ATT AAG TAC CTG GCC AAG AAG AGC GAG AAC TCC ACT GCT TCA GGC TGG
Pro Gly Cys Ser Gly Ser Gly Ile Lys Tyr Leu Pro Lys Lys Ser Glu Asn Ser Thr Ala Ser Ala Tyr

239 240

1100pH2 1133

AAA TTT CDT AGT GAC AAG GCT AGC CAG TCT GTT CCG TTC AAC TGAGATGTTCAATATAAGGCTGATGAAGATGGG
Lys Phe Arg Ser Asp Lys Ala Ser Gln Ser Val Arg Phe Asn Stop

259

1200

AGCTGATGTTCTAAGAGTACTGTATGTTCTATGGTGGTAAAGTTTTCAGATGATGATATATATAGGATATTTTGGTGTAGGTG
GAGCTATGTGTACATGTCAGAAAGTCTCTCCGATAGTTAACTACAGTGTGTGGCTCCGGCGGTACAAATGATAACTTGTACTGTAT3'

Fig.1-2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the RNase T₂ gene from *A. oryzae*. Amino acid residues -17 to -1 represent the presumed signal peptide sequence, and 240 to 259 represent the C-terminal processing region. The transcription start points, determined by S1 nuclease protection, are double underlined (A: -55, -47) relative to the translation start point (+1). The putative CAAT and TATA-like sequences are overlined; sequences homologous to the internal consensus sequence, BCTRAY, found near the 3' terminus of the fungal intervening sequence, are underlined.

報告されているアミノ酸配列(Kawata *et al.* 1988)と比較すると、239アミノ酸は全て一致したが、成熟タンパクの1残基目のグルタミン酸の上流17残基目にシグナルペプチドの始めと予想されるATGが存在していた(Kreil 1981, von Heijne 1983)。更にシークエンスの結果、239アミノ酸よりも20アミノ酸多く存在しており、RNase T₂タンパクのC末端が、プロセッシングを受けていることが明らかとなった。更に、イントロン領域が4箇所存在し、それぞれ50, 77, 109, 59bpの大きさで、5'-GTPuNGT...PyAG-3'配列(Lerner *et al.* 1980, Mount 1982, Gurr *et al.* 1987)および3'末端に近い方に、スプライスされる際のラリアット構造を形成するための5'-PuCTPuAPy-3'配列(Ramb osek and Leach 1987)がほぼ保存されていた(Table 1-1)。

Table 1-1 Splice signals within the introns of the *rntB* gene

Intron*	Sequence ^b			Intron length (nt)
	5'-splice site	Internal site	3'-splice site	
I	GTTAGT.....AACTGACA...TAG			50
II	GTAAGC.....TGCTAACT...AAG			77
III	GTTTGT.....TACTAACC...CAG			109
IV	GTAAGT.....AGCTAATT...CAG			59
Consensus sequence in Filamentous fungi ^c	GTRNGT.....RCTRAY.....YAG			

- a The locations of the introns are shown in Fig.1-2
 b R, purine; Y, pyrimidine; N, any of the four nt
 c Rambossek and Leach (1987)

真核生物のプロモーター領域では、CAATモチーフが転写因子の一つであるTF II Dの結合領域と考えられているTATAモチーフよりも上流に位置するが(Gurr *et al.* 1987)、*rntB*遺伝子のプロモーターの場合も同様で、CAAT配列は存在していたが、典型的なTATA配列は存在せず、TATA様の配列が認められた。またターミネーター領域には、ポリA付着シグナルであるAATAAA配列は認められなかった。

尚、基質特異性が無い、同じ*R. niveus*のRNaseRhと比較すると、タンパクのホモロジーは42%と報告(Horiuchi *et al.* 1988)されているが、イントロンを除いた成熟タンパクをコードする部分のDNAのホモロジーは、51%となり高いホモロジーであった。イントロンの数は同じ4つであったが、その挿入箇所および大きさは全く異なっていた。

(3) 使用コドンの比較とサザン解析

*rntB*遺伝子の使用コドンと同じ*A. oryzae*の α -amylase(Taka-amylase)の遺伝子(*amyB*, Tada *et al.* 1988)と*R. niveus*のRNaseRh(Horiuchi *et al.* 1988)遺伝子のコドンの比較を行った(Table 1-2)。

*rntB*と*amyB*では、三番目の使用コドンのGまたはCの割合が、それぞれ65%(180/277アミノ酸)と66%(328/500)とGCに偏る傾向が認められた。一方RNaseRhにおいては、三番目のコドンの使用頻度は、Uが55%(131/239)と多く認められ、属間による相違と考えられる。

野生株である*A. oryzae* RIB40の染色体に存在する*rntB*遺伝子のサザン解析を行った(Fig. 1-3)。

Table 1-2 Comparison of the codon usage between the RNase T₂ (*rntB*), the Taka-*amyA* (*amyB*) gene from *A. oryzae* and the RNase Rh gene from *R. niveus*

Amino acid	Codons	RNase T ₂	Taka- <i>amyA</i>	RNase Rh	Amino acid	Codons	RNase T ₂	Taka- <i>amyA</i>	RNase Rh	
Phe	UUU	3	3	2	Ala	GCA	4	12	4	
	UUC	8	12	4		GCG	3	10	0	
Leu	UUA	1	1	3	Thy	UAU	4	12	12	
	UUG	1	10	3		UAC	11	24	5	
	CUU	8	5	6	STOP	UAA	0	0	1	
	CUC	2	13	3	UAG	0	0	0		
	CUA	0	3	0	UGA	1	1	0		
Ile	CUG	5	6	0	His	CAU	1	3	3	
	AUU	5	7	5		CAC	3	4	0	
	AUC	10	19	3	Gln	CAA	3	8	3	
	AUA	0	2	0	CAG	8	15	2		
Met	AUG	4	11	5	Asn	AAU	3	3	8	
	GUU	1	5	7		AAC	10	23	5	
Val	GUC	1	12	3	Lys	AAA	6	7	7	
	GUA	2	4	2		AAG	15	13	3	
	GUG	2	11	0	Asp	GAU	8	20	11	
	UCU	2	4	8		GAC	10	21	5	
Ser	UCC	12	9	6	Glu	GAA	6	5	6	
	UCA	2	4	3		GAG	11	7	2	
	UCG	3	10	0	Cys	UGU	4	8	5	
	AGU	3	4	15		UGC	6	1	5	
	AGC	7	6	4		UGG	8	12	5	
	Pro	CCU	2	5	7	Arg	CGU	1	1	2
		CCC	7	8	2		CGC	3	2	1
CCA		3	3	0	CGA	0	2	0		
CCG		4	5	0	CGG	1	2	0		
Thr	ACU	6	9	8	AGA	AGA	0	0	1	
	ACC	5	13	4		AGG	0	3	0	
	ACA	2	10	4	Gly	GGU	8	9	16	
	ACG	2	8	1		GGC	9	18	1	
Ala	GCU	5	5	15	GGA	3	10	2		
	GCC	8	15	1	GGG	1	5	0		

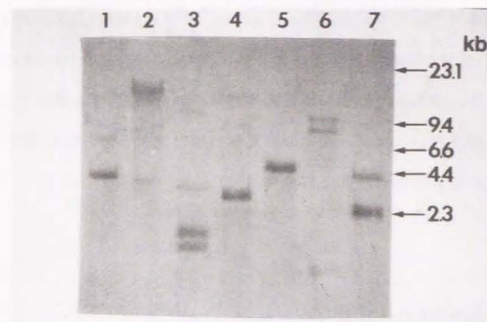


Fig.1-3 Southern blot analysis of *A. oryzae* RIB 40 genomic DNA. DNA was digested with *EcoRI*, *PstI*, *HindIII*, *NheI*, *NcoI*, *SphI* and *KpnI*, and separated by 0.7% agarose gel electrophoresis. The separated fragments were transferred onto a Hybond-N⁺ nylon membrane and hybridized with the 4.8 kb *HindIII* fragment using the ECL gene detection system (Amersham Corp.) (Knight 1990). Arrows indicate the λ /*HindIII* digested size markers. Lane 1, *KpnI*; lane 2, *SphI*; lane 3, *NcoI*; lane 4, *NheI*; lane 5, *HindIII*; lane 6, *PstI*; lane 7, *EcoRI*

ブローブとして4.8kbの*HindIII*断片を使用しているが、Fig.1-1の制限酵素地図に示すような結果が確認され、 α -*amylase*の遺伝子が *A. oryzae*の染色体に3コピー存在 (*amyA*; *amyB*; *amyC*; Wirsal *et al.* 1989, 五味ら 1989)しているのに対して、*rntB*遺伝子は染色体に1コピー存在するものと判断した。

(4) 形質転換株のRNaseT₂活性

麹菌用プラスミドpSal23(Gomi *et al.* 1987)とpART-1とを、元々のRNaseT₂活性が少ないと予想される*A. nidulans* G034にcotransformationした。得られた形質転換株の培養液のRNaseT₂活性を測定すると、*rntB*を持たないベクターだけの形質転換株と比べると、比活性で45倍程度の上昇が認められた(Table 1-3)。

Table 1-3 RNase T₂ activity produced by transformants

Strain	Plasmid	Spec. act. ^a U/mg protein	Ratio ^b
<i>A. oryzae</i>	pSal23	36	1.0
M-2-3	pSRT-1	100	2.8
"	"	89	2.5
<i>A. nidulans</i>	pSal23	11	0.3
G034	pSal23+pART-1	464	12.9

a Specific activity ($\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein)

b Specific activity of M-2-3 transformed with pSal23 is taken as 1

また、Fig. 1-4に示すpSRT-1を作成して、*A. oryzae*(*argB*) M-2-3株を形質転換すると、元々の親株に比べ形質転換株では、比活性で2.8倍上昇した株が得られた。

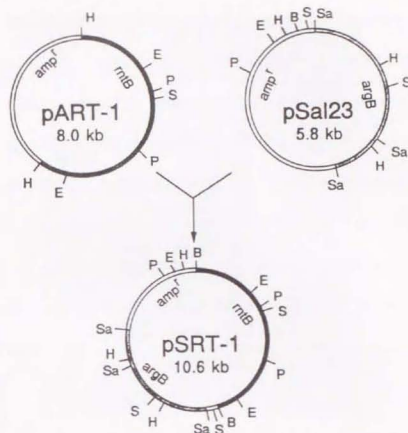


Fig. 1-4 The structure of plasmids pART-1 and pSRT-1. The 4.8 kb *Hind*III fragment containing the entire RNase T₂ gene was subcloned into plasmid pUC118 to construct pART-1. The DNA was digested with *Hind*III and the fragment was blunt-ended with T4 DNA polymerase, ligated to *Bam*HI linkers, and inserted into the *Bam*HI site of pSal23 to construct pSRT-1. Abbreviations: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; N, *Nhe*I; Nc, *Nco*I; P, *Pst*I; S, *Sph*I; and Sa, *Sal*I

*A. nidulans*の形質転換株の培養液の濃縮後のSDS-PAGEでは(Fig. 1-5)、*A. oryzae*のRNaseT₂タンパクは、分子量が36kDaで糖含量が8%であると報告(Kawata *et al.* 1988)されているが、*A. nidulans*で発現させても分子量が同程度で、糖鎖が付加されているスメアーなRNase T₂タンパクを生産した。これらのことにより、*rntB*遺伝子は活性あるRNaseT₂をコードしていることが明らかとなった。

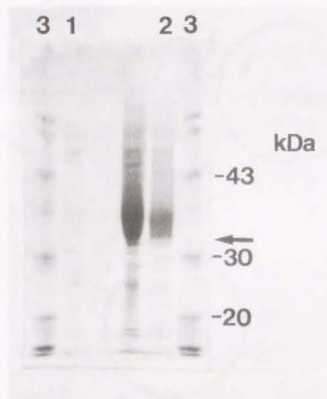


Fig.1-5 The SDS gel electrophoresis pattern of *A. nidulans* G034 cotransformants. Cultures of the cotransformants with pSal23 and pSal23-pART-1 were concentrated and then subjected to SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Lane 1, transformant with pSal23 (40 μg protein); lane 2, transformant with pSal23 and pART-1 (40 μg protein); lane 3, molecular size markers. The arrow indicates the position of native *A. oryzae* RNase T₂ (36 kDa).

(5) *rntB*遺伝子のプロモーター領域の解析

転写開始点をS1マッピングにより決定した。野生株である *A. oryzae* RIB40のmRNAでは、開始点のバンドは認められず、*A. oryzae* M-2-3のRNaseT₂活性の高い形質転換株のmRNAを用いて決定できた。このことにより、*rntB*遺伝子の発現量が少ないことが推定できる。翻訳開始点のATGの上流、-47と-55bpの両アデニンの位置に、バンドが認められ転写開始点と推定した (Fig. 1-2)。

次に、Tadaらの報告(1991a)した *A. oryzae* RIB40株の *amyB*プロモーターに、レポーター遺伝子として大腸菌のβ-グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子(*uidA*)をpSal23に連結したpTAG1を譲っていただいた。このpTAG1の *amyB*プロモーターの代わりに *rntB*遺伝子のプロモーター領域と考えられる *Pst*Iと *Nco*I (Fig. 1-1, 1-2: ATGをMung bean nucleaseで削ったもの)の1kbのプロモーターにすげ替えたベクターを構築した(pRNG)。このベクターとpTAG1を用いて、*A. oryzae* M-2-3の形質転換株を取得し、それぞれ二株の菌体内に生産するGUS活性の平均を比較した (Table 1-4)。

Table 1-4 Comparison of GUS activity in the *rntB* and *amyB* promoter transformants

Transformant*	CD ^b	GUS nmole/min/ml	Protein mg/ml	Specific activity nmole/min/mg protein
pSal23	glucose	N.D. ^c	2.3	N.D.
pRNG (<i>rntB</i>)	glucose	21.7	1.7	12.9
pTAG1* (<i>amyB</i>)	glucose	128	2.6	50
pTAG1 (<i>amyB</i>)	dextrin	2900	2.3	1290

- a Two independent *A. oryzae* transformants with pSal23, pRNG, and pTAG1 were tested for GUS activity
 b Each transformant was cultivated in CD medium containing 2% glucose or 2% dextrin
 c Not detected
 d Tada *et al.* (1991a)

GUSの比活性を比較すると、*rntB*プロモーターは、*amyB*プロモーターの炭素源がグルコース培養での非誘導条件よりも弱く、1/4程度となり、誘導条件であるデキストリン培養の1/100程度と、予想通り弱いプロモーター活性であることが確認できた。

(6) *rntB*遺伝子のプロモーターの発現、誘導

A. oryzae M-2-3株の*rntB*プロモーターの形質転換株を用い、GUS活性を指標として、誘導基質と成り得ると考えられるRNA、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸の添加による発現の誘導について検討した (Table 1-5)。

Table 1-5 Effect of medium condition on GUS expression

Transformant	Liquid medium	GUS (intercellular) nmole/min/mg protein
pSal23	CD (2% glucose)	N.D. ^a
pRNG	CD	14.3
	+0.2% RNA	8.5
	+0.2% Nucleotides	8.6
	+0.2% Nucleosides	13.4
	+0.2% (A+U+G+C)	14.8
	Solid medium	GUS (<i>kaji</i> extract) ^b nmole/min/mg protein
pSal23	70% Polished Rice	N.D.
pRNG	Rice	15.6
	+0.2% RNA	15.3
	+0.2% Nucleotides	15.0
	+0.2% Nucleosides	14.3
	+0.2% (A+U+G+C)	16.0

a Not detected

b The rice-*kaji* was frozen in liquid nitrogen and then ground with glass beads for rice-*kaji* disruption

液体培養および固体培養において、これらの誘導基質と成り得る物質の添加により、GUS活性の上昇は認められなかった。従って、*A. oryzae*のRNaseT₂タンパクは、菌体外の核酸などによって誘導条件とは働かず、その他の α -amylase (Tada *et al.* 1991a)、glucoamylase (Hata *et al.* 1992)などの分泌酵素とは異なる発現制御機構であること、あるいはRNaseT₂は分泌酵素ではないことなどが推察できる。

第三項 要約

(1) *A. oryzae*の *rntB* 遺伝子をクローニングし、シーケンスを決定したところ、N末端の17アミノ酸のシグナルペプチドだけではなく、C末端の20アミノ酸がプロセッシングを受けていることが判った。

(2) この *rntB* 遺伝子は、活性あるRNase₂をコードしていることが判り、RNase₂活性が低いと考えられる *A. nidulans* では、活性が45倍以上昇した形質転換株が取得できた。

(3) *rntB* プロモーターと *amyB* プロモーターを *A. oryzae* の形質転換株におけるGUSの生産量で比較した。*rntB* プロモーターは *amyB* プロモーターの非誘導の1/4、誘導条件の1/100程度と弱いプロモーター活性であった。

第四項 考察

A. oryzae RIB40株のリボヌクレアーゼ(RNase)₂遺伝子を単離し、塩基配列を決定し、そのアミノ酸配列を推定したところ、報告されているタンパクの一次構造と239アミノ酸は全て一致した(Kawata *et al.* 1988)。しかしN末端の17アミノ酸が付加されており、分泌系のタンパクであるのでシグナルペプチドと推定された。*A. niger*のglucoamylase(Boel *et al.* 1984)、*A. oryzae*の α -amylase(Tada *et al.* 1989)、*A. oryzae*のRNase₁(山岡ら 1991)がそれぞれ、24、21、26アミノ酸であると報告されているのに対して、やや短いシグナルペプチドである。一方、基質特異性が同じ非特異的である、*R. niveus*のRNaseRhが、ほぼ同程度の16アミノ酸と報告されている(Horiuchi *et al.* 1988)。

RNase₂タンパクは、糖タンパクで三箇所N-グリコシド結合糖鎖(Asnと結合している糖鎖: Asn-X-Thr or Ser)が存在しており、Asn¹⁵とAsn⁷⁰には、2つのグルコサミンと3~4つのマンノースが結合し、タンパクのC末端のAsn²³⁹にも1つのグルコサミンが結合していると報告されている(Kawata *et al.* 1988)。塩基配列を決定すると、Asn²³⁹-Ser²⁴⁰-Thr²⁴¹と確かにグリコシレーションサイトと推定されるが、ストップコドンは認められず、結局20アミノ酸が付加されており、post-translationalなプロセッシングを受けていると考えられる。この様なプロセッシングはこれまでの所、*A. oryzae*では報告が

無く、*N. crassa*のpro-laccase(Germann *et al.* 1988)とpro-tyrosinase(Kupper *et al.* 1989)が、それぞれ13と213アミノ酸のC末端が、ペプチダーゼによりプロセシングされる報告があり、限られたタンパクだけと考えられる。しかし、その役割については、今後解明が待たれる所である。

1990年前後になりRNaseが再び注目され始め、例えば牛膝臓のRNaseAは、1960年代は生化学研究の中心に位置していた酵素であるが(Anfinsen 1973)、ガン細胞の成長(アンジオゲニン;腫瘍血管造成因子、Strydom *et al.* 1985, Kurachi *et al.* 1985)や神経細胞の発生(Gleich *et al.* 1986, Price *et al.* 1987)など、生物学的分化に影響を与える一連の細胞外タンパクにそっくりであることが明らかになってきている。この様によみがえるRNaseとして、RNaseT₂タンパクもまた、タバコ*Nicotiana glauca*の花柱に存在する、分子量32000のS2-グリコプロテイン[自家不和合性(self-incompatibility)遺伝子(S遺伝子, Anderson *et al.* 1986)]に非常に高い相同性を持つ領域が発見され(タンパクのホモロジー40%、DNAのホモロジー47%)、このS2-グリコプロテインはRNase活性を持っていることが明らかになってきている(McClure *et al.* 1989, Kawata *et al.* 1990)。

以上のような本来のRNaseの働きだけでなく、新しい機能が見出され始めているが、*A. oryzae*には、分泌酵素であるRNaseT₁がT₂に比べ10倍量程度生産量が多く、RNaseT₂が新たな機能を持つ可能性も十分考えられる。また、C末端がプロセシングを受けていること、培地

中のRNAなどの核酸で誘導が認められないことを総合して判断すると、RNaseT₂は菌体外に分泌されるタンパクではなく、*A. oryzae*の液胞あるいはペリプラズムなどに留まっているような、菌体内のタンパクの可能性が十分考えられる。このことは、1960年代からRNaseの研究をされておられる、内田庸子先生(三菱化成生命科学研究所)が「菌体外の分泌酵素である証拠は無い」と言われていることよりも裏付けられると考えている(酵素ハンドブック p. 488, 1982)。

また、*A. oryzae*のRNaseT₂遺伝子(*rntB*)のプロモーター活性を、レポータータンパクのGUSの発現量から検討すると、同じ*A. oryzae*の α -amylase遺伝子(*amyB*)プロモーターの非誘導時の1/4程度と弱い活性であった。このことは、*A. oryzae*の培養物抽出液であるタカジアスターゼ中のRNaseT₂のタンパク含量が0.2%と低く(Uchida 1966)、そのタンパクをコードしている遺伝子のプロモーター活性も、想像通り弱い結果を意味している。しかし、この推測もGUSの生産量が、*rntB*プロモーター支配下で発現しているかという疑問がある。このことは、タカジアスターゼのSDS電気泳動から、56kDaの α -amylaseのタンパクが全体の20~30%である(私信)ことおよびタカジアスターゼ中、RNaseT₂/ α -amylaseの存在比は、1/100~1/150程度の含量であり、Table 1-4よりGUSの比活性の比が、*amyB*の誘導時の1/100であることより判断すると、*rntB*プロモーターは正常に機能して、GUSを生産していると結論付けることができると考えられる。

これらのことにより、逆に言えば、タンパクの分泌量も含めた生

産量の多いタンパクをコードしている遺伝子のプロモーター程、強力なプロモーターであると推察でき、*A. oryzae*の α -amylase遺伝子(*amyB*)あるいはglucoamylase(*glgA*)などは強力なプロモーターであると言って良いと考えられる。しかし現在の所、*A. oryzae*では解析されている遺伝子のプロモーターが数例であるので、*Aspergillus*属全体でもまだまだ未知の強力なプロモーター、あるいはエンハンサーなどの配列の存在が予想される。

第二章 *Aspergillus*属形質転換株からの自律増殖プラスミドの回収

第一項 緒言

麹菌は、古くから我が国の醸造産業に利用されており、我々にとって非常に親近感のある微生物である。残念ながら、麹菌の場合、酵母のように分子育種は進んでおらず、その研究者の数もかなり少ないのが現状である。この理由の一つに、これまで麹菌ではプラスミドのような染色体とは別に、自己複製能のあるDNAが見い出されていなかったことが考えられる。

酵母においても初めての形質転換は、染色体への組み込みによるもので、その形質転換頻度は低いものであった。その後、2 μ mプラスミドや、染色体に存在する自己複製配列(autonomously replicating sequence; ARS)を利用して、酵母細胞内で自己複製できるベクターが作られ、形質転換頻度が飛躍的に上昇した。麹菌においても、ARSとして働くDNA断片を単離する試みもされてきているが、成功しているとは言い難い。その中で、*A. nidulans*の染色体から、*ansI*と呼ばれるDNA断片を分離し、これを組み込み型のベクターに連結することにより、形質転換頻度が100倍以上上昇した報告(Ballance and Turner, 1985)があるが、その後このDNA断片が幅広く利用されているわけではない(Cullen *et al.* 1987)。

この研究とは別に、*A. nidulans*の細胞内でARSとして働く染色体断片が、*A. nidulans*の遺伝子ライブラリーから単離された(Johnstone, 1985)。その後、この*AMAI*(autonomously maintained in *Aspergillus*)配列を持つDNAを用いて、*A. nidulans*の形質転換を行ったところ、組み込み型のベクターに比べ頻度が250倍上昇し、*A. nidulans*だけでなく、*A. oryzae*、*A. niger*でもフリーのプラスミドとして存在し、頻度が上昇した(Gems *et al.* 1991)。また最近、この*AMAI*配列を利用して*A. oryzae*の*argB*遺伝子(牛場ら 1992)、*A. niger*の*nicB*遺伝子(Verdoes *et al.* 1994)などの宿主の栄養要求性相補での、ショットガンクローニングの報告が目立ち始めてきている。今後、この*AMAI*プラスミドを始め、ARS配列を利用した*Aspergillus*属の有用遺伝子のクローニングにと道が開けるものと期待できる。

麹菌の場合、遺伝子組み換えの基礎的な研究あるいはテクニックに関する報告は少ない。そこで、上記のような*AMAI*プラスミドの利用を考え、多くの形質転換株から同時に、修飾を受けていないプラスミドを簡単に回収する方法について検討を加えた。

第二項 実験結果

(1) *argB*宿主-ベクター系での形質転換頻度

宿主として*A. oryzae*(*argB*⁻)と*A. niger*(*argB*)を用い、ベクターとして*A. nidulans*由来の*Aspergillus*属で自己複製可能な配列(*AMAI*)とマーカー遺伝子の*argB*の入ったプラスミド型のベクターARp1とpDHG25、更に*AMAI*配列を持たないインテグレート型のベクターであるpBXba2 (pDG3の*Xba*I断片(*argB*)をBluescript II SK⁻の*Xba*Iサイトに挿入したDNA)を用いて形質転換を行った(Table 2-1)。

Table 2-1 Comparison of transformation efficiencies with different vectors

Type	Vector	<i>AMAI</i> length (kb)	<i>A. niger</i> transformants	<i>A. oryzae</i> transformants (μ g DNA)
<i>AMAI</i> plasmid	ARp1	6.1	750	93
	pDHG25	5.1	584	122
Integration	pBXba2	-	4	0.7

Transformation was done using the protoplast-forming method.

尚、ARp1とpDHG25の*AMAI*配列の大きさは、それぞれ6.1kbと5.1kbである(Fig. 2-1, Gems *et al.* 1991)。

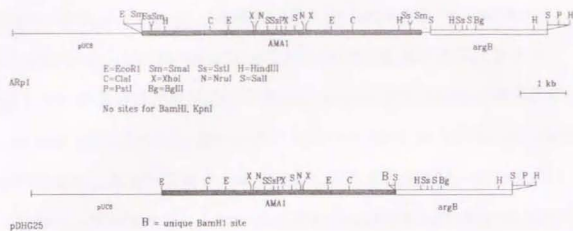


Fig. 2-1 Restriction site maps of plasmid ARp1 and pDHG25. The open boxes, shaded boxes, and single lines represent the *A. nidulans argB* sequences, the *AMA1* sequences, and the bacterial sequences (pUC8), respectively.

形質転換頻度を比較すると、*AMA1*配列が1kb短くなったプラスミド型ベクターでも、大きな頻度の低下は認められず、*A. oryzae*、*A. niger*共にインテグレート型のベクターより、少なくとも100倍以上の頻度の上昇が認められた。また、*A. oryzae*と*A. niger*で比較すると、両ベクターともに、*A. oryzae*よりも*A. niger*の方が頻度が5倍程度高いことが判った。

従って、この程度の頻度が得られれば有用遺伝子のショットガンクローニングにも、*AMA1*配列が利用可能と考えられる。しかし、これまでの研究は、組み込み型のベクターで行った場合であり、組み込まれたDNAを麹菌より調製し、大腸菌から回収することが必要である。この操作が非常に煩雑であり、更に組み換えが起こる可能性も存在する。そこで、この*AMA1*ベクターを簡単に回収するに当たり、まず最初に染色体のDNAを抽出する方法について検討した。

(2) 形質転換株のDNA画分の抽出方法

麹菌の染色体DNAを調製する方法は、液体窒素下で菌体を乳鉢中で粉砕する方法が報告(Tada *et al.* 1991a)されているが、多くの菌体を処理する場合、集菌のためのガラス濾過器、乳鉢などの滅菌操作が煩雑となる。そこで、*A. niger*の形質転換株(ARp1)の培養菌体を用い、以下の三種類の方法によりDNA画分を調製した。

- (A) Iimuraら(1987)の方法を改良して行った。集菌した菌体をYatalase (宝酒造)を用いてプロトプラスト化し、50mM EDTAと0.5% SDSを含む50mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.5)中で、溶菌処理を行い、フェノール/クロロホルム抽出、RNaseA、PEG沈処理を行って、DNA画分を精製した。
- (B) Yatalaseを用いて同様にプロトプラスト化し、ガラスビーズを加えてプロトプラストを破砕後、同様にDNA画分を精製した。

(C) 菌体をそのままガラスビーズで破碎後、同様にDNA画分を精製した。

これら(A)~(C)の方法で、MM (CD)培地とCM (DP)培地で培養した *A. niger* の形質転換株からDNA画分を調製した (Fig. 2-2)。

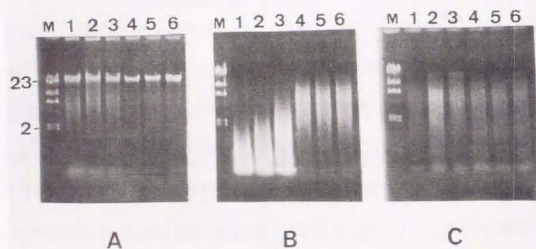


Fig.2-2 Comparison of *A. niger* total DNA extraction methods [Method(A), (B), and (C)]. Columns number 1-3 are total DNAs extracted after growth on MM medium. Columns number 4-6 are total DNAs extracted after growth on CM medium. The sizes of the molecular weight markers (M) are given in kb. *A. niger* was incubated in 2% Yatalase and 1M(NH₄)₂SO₄ for 3h at 30°C and shaken at 50rpm to produce protoplasts.

Yatalaseでプロトプラスト化した後、溶菌処理を行ったDNA画分 (方法A) がMM、CM培地からの菌体共に、比較的分解を受けていないDNA画分を調製できることが判った。

そこでYatalaseを用いて、宿主となる *A. niger*(*argB*) と *A. oryzae* (*argB*) の最適なプロトプラストの調製条件について検討を加えた (Table 2-2)。

Table 2-2 Comparison of the protoplast producing conditions with *A. niger* and *A. oryzae*

	Yatalase (%)	Stabilizer	Incubation time(h)				
			1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
×10 ⁸ protoplasts/10ml							
<i>A. niger</i>	0.5	1M(NH ₄) ₂ SO ₄	2	3	4	3	0
	1.0		3	4	7	3	3
	2.0		1	7	17	9	7
	0.5	0.8MNaCl	0	5	7	1	3
	1.0		1	4	5	6	5
	2.0		2	4	8	4	2
<i>A. oryzae</i>	0.5	1M(NH ₄) ₂ SO ₄	47	110	180	200	180

The protoplast producing conditions for *A. niger* were incubation in 0.5-2% Yatalase in 1M(NH₄)₂SO₄ or 0.8M NaCl for 1-3h at 30°C with shaking at 50rpm. *A. oryzae* was protoplasted by incubation in 0.5% Yatalase in 1M(NH₄)₂SO₄ for 1-3h at 30°C with shaking at 50rpm.

*A. oryzae*では、糸状菌の細胞壁溶解酵素であるYatalaseで、細胞壁が良く溶けて、プロトプラスト調製だけでなく、胞中の麹菌菌体量の推定も可能となる (藤井ら 1992)。従って、その使用量は少なくても良い (0.5%; Takara 1994-1995)。しかし *A. niger* では、Yatalase生産菌 (*Corynebacterium* 属) の酵素誘導時、*A. niger* の菌体を用いてないので、*A. niger* に対してはプロトプラストの生成効率が余り良くない。

く、2%濃度で、浸透圧調整剤として、1M硫酸を用いることで効率が上昇した。

(3) AMAIプラスミドを持つ形質転換株のサザン解析

ARp1プラスミドで形質転換した *A. oryzae* の形質転換株を3回継代培養を繰り返し、MM培地とCM培地で1~3日間培養した菌体から(A)の方法でDNA画分を調製し、プローブとして *argB* 遺伝子の一部を用いて、サザン解析を行った(Fig. 2-3)。



Fig. 2-3 Southern blot analysis of the total DNAs from *A. oryzae* transformants. The blot was hybridized with a 1.7kb *Sa*/I fragment encoding the *argB* gene. The lanes contain total DNA (1μg) from *A. oryzae* transformants as follows: 1, grown in CD for 1day at 30°C; 2 and 3, grown in CD for 2days at 30°C; 4 and 5, grown in CD for 3days at 30°C; 6, size marker; 7 and 8, grown in DP for 1day at 30°C; 9 and 10, grown in DP for 2days at 30°C; 11 and 12, grown in DP for 3days at 30°C. The bands corresponding in size to supercoiled ARp1 monomer(M) and dimer(D) are marked. The sizes of the molecular weight markers are given in kb.

*A. oryzae*においてARp1プラスミドは、3回の継代培養では、両培地共に染色体に組み込まれることなく、フリーのプラスミドの環状のモノマー、ニックの入ったモノマー+環状のダイマー、ニックの入ったダイマーのそれぞれの位置に存在していた。しかし、CM培地よりもMM培地のもの程、そのハイブリダイズするバンドの濃さが強い傾向であった。そこで、デンストメーターを用いて、同じDNA濃度に対する環状のモノマーのプラスミドで存在するDNAの割合を測定した(Table 2-3)。

Table 2-3 The proportion of cccARp1 monomer compared to *A. oryzae* genomic DNA from cells grown on CD or DP medium

Transformants	Time(day)	CD(area)	DP(area)	CD/DP
1	1	-	2.6	-
2	1	19.7	10.3	1.9
1	2	42.6	3.3	12.8
2	2	56.0	2.2	25.5
1	3	38.6	2.8	13.8
2	3	41.1	2.6	15.8

The developed film (supercoiled ARp1 monomer portion) was analyzed by densitometry at 633nm.

環状のモノマーのプラスミドは、二種類の形質転換株ともにMM培地であるCzapek-Doxでの培養の方が、CM培地であるDextrin-Peptoneでの培養よりも、2~26倍程度その存在割合が大きくなった。従って、フリーのプラスミドの脱落は、MM培地、即ち選択圧のある条件下で培養した形質転換株の方が、少ないことが明らかとなった。このことは、*A. niger*においてもほぼ同様な結果を得、3世代までは少なくとも、両菌株共にARp1プラスミドは、染色体に組み込まれていないことを示した。

(4) AMAIプラスミドの回収方法

環状のモノマープラスミドの存在割合が多い、*A. oryzae*と*A. niger*のARp1の形質転換株のDNA画分を用いて、大腸菌から実際に回収されるプラスミドDNAについて検討を加えた(Table 2-4)。

Table 2-4 Comparison of types of ARp1 plasmid rescued from *Aspergillus* transformants

Time (days)	CD			DP		
	monomer	dimer	total	monomer	dimer	total
1	13	7	20	6	14	20
2	14	6	20	3	17	20
3	10	10	20	2	18	20

Aspergillus transformants were cultivated in CD or DP medium for 1-3 days at 30°C with gentle shaking. *Aspergillus* total DNAs were used to transform *E. coli* HB101. Three transformation experiments were totaled.

環状のプラスミドとして存在する割合の多い、CDによる培養から得た形質転換株のDNA画分は、モノマーとして得られるプラスミドが多くなる傾向であった。一方、DPによる培養を長期間行うに従って、ダイマーとして得られるプラスミドの割合が多くなった。またCDおよびDP共に、調査した範囲内では、ARp1プラスミドの場合、サイズあるいは制限酵素サイトが変化したプラスミドは得られなかった。

pDHG25プラスミドの場合、CDの長期間培養では、ARp1と同様な傾向であったが、DPの長期間培養になると、回収されるプラスミドにリアレンジメントを受けているプラスミドが、20個中2個存在していた(1個はBamHIで断片の大きさが異なり、1個はEcoRIで大きさが異なる、Fig. 2-4)。



Fig. 2-4 Analysis of the pDHG25 plasmids re-isolation from *A. niger* transformants. *A. niger* transformants were grown in DP medium for 3 days at 30°C. Lanes: 1, 5, 10, 14, plasmid DNA; 2, 6, 11, 15, DNA digested with BamHI; 3, 7, 12, 16, DNA digested with PstI; 4, 8, 13, 17, DNA digested with EcoRI; 9, size marker. The sizes of the molecular weight markers are given in kb.

第三項 要約

AMAIプラスミドを持つ *Aspergillus* 属の形質転換株の培養液からDNA画分の調製まで、1本のチューブ内で行えないか、更にプラスミドを回収する方法について検討すると、以下の方法が考えられる。

AMAIプラスミドを持つ *Aspergillus* 属の形質転換株

↓

10ml, Czapek-Dox培地/50ml容 Falcon tube, 30°C, 2days

↓

上清5mlを除く、2倍濃度のYatalase溶菌酵素液 5ml, 30°C, 3hrs

↓

溶菌処理、フェノール/クロロホルム、RNaseA、PEG沈処理

↓

精製DNAで大腸菌を形質転換

↓

修飾を受けていないAMAIプラスミドの回収

第四項 考察

我々の研究室で使用している *argB0* の宿主 (*A. oryzae*, *A. niger*)-へ

クター系においても、AMAIプラスミドを利用することにより、組み込み型のプラスミドに比べ、形質転換頻度が少なくとも100倍以上上昇することを認めた。Gemsら(1991)は、*A. nidulans*においては、250倍上昇した報告および *A. oryzae*, *A. niger*においても、頻度が大幅に上昇したと報告している。従って、各宿主でのプロトプラストの最適条件(溶菌酵素の種類、量、あるいは菌令、浸透圧調整剤など、一般的には用いる麹菌によって、その最適のプロトプラスト生成条件が異なると言われている)を詳細に検討すれば、我々の系においても更に数倍の効率の上昇は期待できると考えている。いずれにしても、組み込み型のベクターでは、不可能であったショットガンクローニングのように、遺伝子ライブラリーから宿主の栄養要求性を、相補するような遺伝子をクローニングすることが可能と考えられ、実際、その報告も増えてきている(牛場ら 1992, Gems and Clutterbuck 1993, Verdoes *et al.* 1994, Aleksenko 1994)。

また、*A. oryzae*が *A. niger*に比べ、形質転換頻度が5倍程度低い現象は、私が醸造資源研究所に向向して、醸造試験所の第四研究室で共同研究させて頂いていたとき、使用した *A. nidulans* G034と *A. oryzae* M-2-3の形質転換でも、*A. nidulans*の方が効率が良かったことを経験している。従って、*A. oryzae*で効率が低いのは、DNAの取り込みの違いも考えられるが、*A. niger*, *A. nidulans*が単核であるのに対し、*A. oryzae*が多核であることも影響しているものと考えられる。

AMAIプラスミドの有効性は確かめられたので、次に比較的短時間

で、道具の用意が余り要らない、手間の掛からない形質転換株からのDNA画分を調製する方法を開発した。その方法を用いて、*A. oryzae*、*A. niger*共に、選択培地ではAMAIプラスミドの脱落、染色体への組み込みも3世代までは比較的少なく、予想外にプラスミドとして安定であることが判った。一方Gemsら(1991)は、*A. nidulans*の場合、AMAIプラスミドでの形質は不安定で、培養を繰り返すと外来DNAの脱落する率も高くなると報告している。更に、その条件で培養した菌体のDNA画分で、大腸菌数個の内からの1つは、修飾されていないシングルタイプのAMAIプラスミドを回収できることが判った。

AMAI配列は、形質が比較的不安定であるので、実用菌株の育種には不利になると言われているが、比較的安定な宿主もあり、AMAI配列を除去すると、組み込み型のベクターになるので、有用遺伝子を単離すれば、その遺伝子を高発現する菌株の育種は十分可能となる。従って、このAMAIプラスミドの利用は、*Aspergillus*属で有用な遺伝子、あるいは強力に働くプロモーター、あるいはエンハンサー配列などのショットガンクローニングに有効となり、本研究はその基礎的な部分で、汎用されることを期待したい。更に、このAMAI配列がもう少し短いものは更に利用価値が上がるし、また*A. oryzae*由来の別のARS配列の単離、あるいは形質転換頻度を上昇させるような方法、あるいはより簡単な形質転換法の開発などの仕事も、研究者が増えれば、その方面の研究も増えてくることが期待できる。

第三章 *Aspergillus*属で機能する自律増殖配列を用いたプロモーター 一検索用ベクターの構築と*A. oryzae*と*A. niger*のプロモーター 一領域の性質

第一項 緒言

麴菌の遺伝子工学の発展に伴って、麴菌を宿主とした異種生物由来の有用なタンパクの生産が注目されてきている。遺伝子組み換えによる異種タンパク生産の宿主としては、これまで大腸菌や酵母が主に用いられてきた。しかし、大腸菌では、異種タンパクを高発現させた場合、菌体内に不溶性のinclusion bodyを形成したり、真核生物のタンパクに特徴的な糖鎖の付加などの、翻訳後の修飾はみられず、活性のあるタンパク質を得るためには少なからず困難が伴っている。また酵母では、糖鎖の付加は起こるが、生産量が低いという問題がある。そこで、1980年代後半になり、麴菌に焦点が集まってきた。というのは、麴菌は菌体外に各種の酵素タンパクを大量に分泌生産し、*A. niger*ではグルコアミラーゼを20g/l以上生産し、また*A. oryzae*でも α -アミラーゼを50g/kg727程度生産すると言われているからである。実際、ムコールレンニン(Christensen *et al.* 1988)、アルカリリパーゼ(Boel and Høge-Jensen 1989)などは、商業ベースで組み換え体によって生産されているものもある。

異種遺伝子を発現させるためには、その生物内で強力に働くプロモーターが必要になってくる。一般には、解糖系酵素の遺伝子のプロモーターが用いられることが多いが(*A. niger adhA*; Upshall *et al.* 1987, *A. nidulans gpdA*; Archer *et al.* 1990)、この他にも*A. oryzae*の α -アミラーゼ(*amyB*; Tsuchiya *et al.* 1992b, 1993, Ward *et al.* 1992)、*A. niger*のグルコアミラーゼ(*glaA*; Gwynne *et al.* 1987, Ward *et al.* 1990)、*A. oryzae*の*glaA*(Tsuchiya *et al.* 1994)などのプロモーターが用いられている。これらは澱粉などの多糖類で発現が誘導されることから、生産の制御面で都合が良い。

以上のように異種タンパクの生産に、強力なプロモーターが利用されており、第一章においては、*A. oryzae*の*amyB*プロモーターは*rntB*プロモーターより100倍ほど強いプロモーターであることが判っている。しかし一般に、麹菌の場合、様々な環境で生育が旺盛であり、従って、液体培養あるいは固体培養においても、培養温度、時期の違いにより高発現する種々のタンパクをコードする遺伝子のプロモーターの存在が予想される。また第二章では、*Aspergillus*属全般でフリーのプラスミドとして自己複製する配列(AMA1)が、二種類の宿主でもプラスミドとして存在し、更に形質転換効率を組み込み型のベクターに比べ、100倍以上上昇することを認めている。

これらのことを組み合わせると、AMA1配列を利用して*Aspergillus*属で機能する強力なプロモーターあるいはエンハンサーなどの配列が取得できる可能性が考えられ、このことについて検討を加えた。

第二項 実験結果

(1) プロモーター検索用ベクターの構築と染色体ライブラリーの作製

AMA1配列の大きさの違いにより、二種類のプロモーター検索用ベクターの構築を行った(Fig. 3-1)。

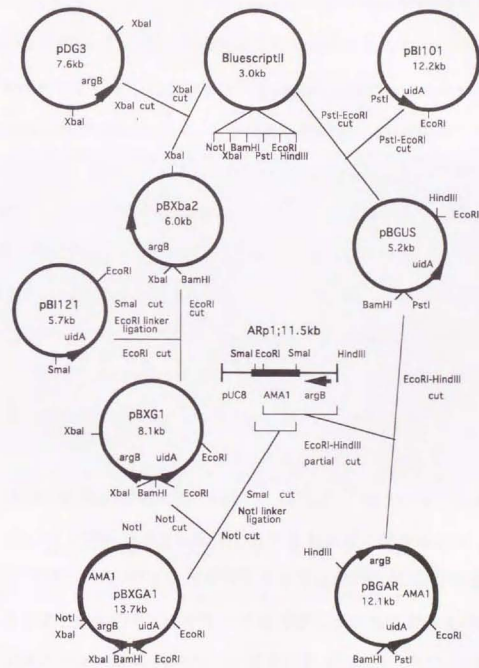


Fig.3-1 Construction of promoter probe vector in *Aspergillus*.

Plasmid pBXG1 was constructed by insertion of the 2.1-kb *EcoRI* fragment of pB1121, containing the *E. coli uidA* coding region and the nopaline synthetase polyadenylation site (NOS term.), into the *EcoRI* site of pBXba2. A 5.6-kb *SmaI* fragment containing the *A. nidulans AMA1* region was cloned into the pBXG1 *NotI* site. Plasmid pBGUS was constructed by insertion of the 2.1-kb *PstI-EcoRI* fragment of pB1101, containing the coding region of *uidA* and NOS term., into the *PstI-EcoRI* site of Bluescript II SK⁺. A 6.4-kb partially digested *EcoRI-HindIII* fragment containing the 3.7-kb *AMA1* region and 2.7-kb *A. nidulans argB* gene was cloned into pBGUS between the *EcoRI-HindIII* sites. Both pBXG1 and pBGAR contained a unique *BamHI* site.

両ベクター共に Bluescript II SK⁺ のベクターのマルチクローニングサイト (MCS) に、pBXG1 の場合は、*A. nidulans* 由来の *argB* 遺伝子を持つ pDG3 (Buxton *et al.* 1985) の *XbaI* 断片と、レポーター遺伝子として大腸菌の *uidA* 遺伝子を持つ pB1121 の *EcoRI* 断片と、更に *A. nidulans* 由来の *AMA1* 配列を持つ ARp1 ベクター (Gems *et al.* 1991) の *NotI* 断片を連結した。一方、pBGAR の場合は、*uidA* 遺伝子を持つ pB1101 の *PstI-EcoRI* 断片と、*AMA1* および *argB* 遺伝子を持つ ARp1 ベクターの *EcoRI-HindIII* 断片を連結した。作製した pBXG1 と pBGAR は、それぞれ 13.7 kb と 12.1 kb のプロモーター領域検索用のベクターであり、両者共に *BamHI* がユニークサイトとなっている。

次に、*A. oryzae* IF04290 と *A. niger* IF06428 の染色体の DNA を調製し、四塩基認識の制限酵素である *Sau3AI* で部分分解した 0.5 から 2 kb の断片を pBXG1 と pBGAR の両ベクターの *BamHI* サイトに挿入し、大腸菌 DH5 を形質転換して、染色体ライブラリーを四種類作製した。作製したライブラリーの大腸菌の数は、pBXG1-*A. oryzae* が 20000、pBXG

A1-*A. niger* が 26000、pBGAR-*A. oryzae* が 24000、pBGAR-*A. niger* が 20000 コロニーであり、それぞれプラスミド DNA として調製した。

(2) GUS 活性を持つ *A. oryzae* の形質転換株

(1) で調製した四種類の DNA を *A. oryzae* (*argB*⁻) と *A. niger* (*argB*⁻) の両者を形質転換し、X-gluc を含む炭素源がグルコースと澱粉のそれぞれの MM 培地で、青色を示す形質転換株を検索したときの一例を示す (Fig. 3-2)。



Fig.3-2 *A. oryzae* transformants with pBXG1-*A. oryzae*.

The transformants were grown on CD plates, containing 2% glucose or 2% starch as a carbon source, supplemented with 50 μ g/ml X-gluc for 10 days at 30°C.

またその時の *A. oryzae* の形質転換株のまとめを示す (Table 3-1)。

Table 3-1 Screening of blue colonies of *A. oryzae* transformants

Vector	Origin	Carbon source	Number of transformants	No. of blue colonies
pBXGAI	<i>A. oryzae</i>	glucose	3,500	2
		starch	3,500	42
pBGAR	<i>A. oryzae</i>	glucose	3,000	2
		starch	3,000	59
pBXGAI	<i>A. niger</i>	glucose	12,000	31
		starch	8,000	10
pBGAR	<i>A. niger</i>	glucose	5,000	9
		starch	4,500	46

A. oryzae (*argB*) was transformed with each 100 μ g of pBXGAI-*A. oryzae*, pBGAR-*A. oryzae*, pBXGAI-*A. niger*, or pBGAR-*A. niger* plasmid DNA. Transformants were regenerated on MM plate, containing 2% glucose or 2% starch as a carbon source and 0.3% NaNO₃ as a nitrogen source, supplemented with 50 μ g/ml X-gluc for 10 days at 30°C.

かなりの形質転換株が炭素源がグルコースでも澱粉でも青色を示した。その中で、青色の発色が非常に強い、*A. niger*由来のプロモーター領域をNo. 8ANと、*A. oryzae*由来のプロモーター領域をNo. 9AOと命名した。一方、*A. niger*の形質転換も同様に行ったが、青色の形質転換株は1つも得られなかった。

(3) GUS生産 *A. oryzae* の各種炭素源および窒素源による影響

Czapek-Dox培地を基本として、0.3%の窒素源を硝酸ナトリウム、硫酸、アスパラギン、カザミノ酸に、2%の炭素源をグルコース、マルトース、デキストリンにそれぞれ変化させて、No. 8ANとNo. 9AOを持つ形質転換株のGUS活性への影響について検討した (Table 3-2)。

Table 3-2 Comparison of GUS activity in the presence of a variety of C and N sources

Nitrogen source	Carbon source	No. 8AN GUS (nmole/min/mg protein)	No. 9AO GUS (nmole/min/mg protein)
NaNO ₃	glucose	4,295	2,007
	maltose	3,186	1,507
	dextrin	4,859	1,686
(NH ₄) ₂ SO ₄	glu	4,293	1,261
	mal	5,744	1,744
	dex	3,682	1,790
asparagine	glu	2,573	1,534
	mal	2,737	1,649
	dex	3,221	1,658
casamino acids	glu	3,324	1,446
	mal	3,585	1,598
	dex	1,963	1,764

Both No. 8AN and No. 9AO GUS-producing transformants carrying *AMA1* plasmid were grown in liquid CD medium, containing NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, asparagine, or casamino acids as the 0.3% nitrogen source and glucose, maltose, or dextrin as the 2% carbon source, with shaking for 3 days at 30°C. The cell-free extract from each culture was assayed for GUS activity.

No. 8ANがNo. 9AOに比べて、全ての培養条件で高くなった。また、No. 8AN、No. 9AO共に全ての窒素源、炭素源でほとんど影響を示さず、炭素源がグルコースであっても恒常的に高発現するプロモーターであることが明らかとなった。このことは、Tadara (1991a)、Tsuchiyaら (1992a)がGUSの生産量から解析した*amyB*プロモーター、Hataら (1992)が同様に解析した*glcA*プロモーターのアミラーゼ系のプロモーターとは異なることを示している。

(4) 組み込み型ベクターでの形質転換株のコピー数とGUS活性

No. 8ANとNo. 9AOのプロモーター活性を*amyB*のプロモーターと比較するために、No. 8ANとNo. 9AOの*AMAI*配列を持つ形質転換株から、第二章で開発した方法に従って、修飾を受けていないシングルタイプのプラスミドをそれぞれ回収した。そのDNAは共にpBXGA1由来であり、*NotI*で消化することにより、*AMAI*配列を除いて組み込み型のベクターとした。一方、比較のための*amyB*遺伝子については、Wirselら (1989)の報告に従い、プロモーター領域597bpとターミネーター領域189bpの間に、同様に*uidA*の構造遺伝子を連結したDNA断片を、*argB*遺伝子を持つインテグレート型のベクターであるpBXba2に挿入した。このDNAを用いて同様に形質転換株を得た。形質転換株4~5株をランダムに選び、2%黴粉を含むCD培地でGUS活性と染色体中でのコピー数を測定した。コピー数は、*A. nidulans* IF02006株の染色体の*argB*遺伝子が1コピーとして、その染色体中での量と同じ強度を示すドット

解析により行った (Table 3-3)。

Table 3-3 Determination of copy number and GUS activity in *A. oryzae* transformants

Transformant	GUS nmole/min/mg protein	Copy number
No. 9AO-1	1,860	50
-2	2,929	60
-3	1,055	8
-4	2,568	60
	average 2,103	average 45

No. 8AN <i>AMAI</i>	1,635	4

No. 8AN-1	2,720	8
-2	4,985	30
-3	3,729	20
-4	7,086	15
	average 4,630	average 18

<i>amyB</i> -GUS-1	1,381	10
-2	1,050	20
-3	2,238	30
-4	708	4
-5	995	15
	average 1,274	average 16

No. 9AO-1 to -4 and No. 8AN-1 to -4 are transformants of *A. oryzae* (*argB*) carrying the integrative plasmid. No. 8AN *AMAI* is a No. 8AN GUS-producing transformant carrying the *AMAI* plasmid. *AmyB*-GUS-1 to -4 are transformants of *A. oryzae* (*argB*) carrying the integrative plasmid, which was constructed by the *E. coli uidA* gene inserted between the *A. oryzae amyB* promoter region (597 bp) and terminator region (189 bp) synthesized by PCR and this *amyB* promoter-GUS-*amyB* terminator was inserted into pBXba2. The copy number of the transformants was determined by dot blot analysis.

No. 9A0の平均コピー数は45で、GUS活性は2100であり、No. 8ANはコピー数が18で、GUS活性が4630であり、*amyB*はそれぞれ16コピーで1270であった。No. 9A0はコピー数がやや高いが、No. 8ANと*amyB*（誘導条件）はほぼ同程度で、GUS活性の平均は、3倍程度No. 8ANの方が高くなった。またこのことは、プラスミドとして存在しているNo. 8 ANAMA1のコピー数と*amyB*-GUS-4のコピー数が同じであり、活性が2倍以上高いことから判断できる。AMA1のコピー数が少ないことは、*A. nidulans*においても報告がある (Gems *et al.* 1991)。

(5) *A. oryzae*と*A. niger*の液体培養でのGUS活性の比較とノーザン解析
炭素源がデキストリンとグルコースで、窒素源が硝酸ナトリウムと硫酸のCD培地で、No. 8ANと*amyB*のプロモーターの*A. oryzae*と*A. niger*の形質転換株を液体培養したときの、GUS活性の平均を比較した (Table 3-4)。

Table 3-4 Comparison of the GUS activity in *A. oryzae* and *A. niger* transformants

Transformant	Average of <i>A. oryzae</i> 8 transformants GUS (nmole/min/mg protein)	Average of <i>A. niger</i> 6 transformants GUS (nmole/min/mg protein)
No. 8AN	4,147	549
C: glucose N: (NH ₄) ₂ SO ₄		C: glucose N: (NH ₄) ₂ SO ₄
	↑ 2.8	↑ 3.2
<i>amyB</i> -GUS	1,479	173
C: dextrin N: NaNO ₃		C: dextrin N: NaNO ₃
	↑ 12	↑ 2.2
<i>amyB</i> -GUS	120	78
C: glucose N: NaNO ₃		C: glucose N: NaNO ₃

A. oryzae (*argB*) and *A. niger* (*argB*) were transformed with No. 8AN promoter-GUS integrative plasmid. *AmyB* promoter-GUS plasmid was also transformed *A. oryzae* (*argB*) and *A. niger* (*argB*). Each GUS-producing transformant was grown in CD medium, containing glucose or dextrin as the 2% carbon source and NaNO₃ or (NH₄)₂SO₄ as the 0.3% nitrogen base, with shaking for 3 days at 30°C. The cell-free extract from each culture was assayed for GUS activity. *A. oryzae* and *A. niger* transformants were averaged GUS activity of 8 and 6 transformants, respectively. Arrows reveal the ratio of high to low GUS activity.

*A. oryzae*では8株の形質転換株の平均で、No. 8ANが*amyB*の誘導条件に比べ、2.8倍と高いGUSの生産量を示した。*amyB*プロモーターのグルコースでの非誘導、デキストリンでの誘導時のGUS活性の値は、Tadaら (1991a)、Tsuchiyaら (1992a)が報告している*amyB*のプロモーターのGUS活性に近いものであった。従って、No. 8ANが*amyB*プロモ-

ターよりも、グルコース存在下では35~110倍以上も高生産するプロモーターであることが判った。

一方、*A. niger*では6株の平均で、GUSの生産量はNo. 8ANも *amyB*も共に *A. oryzae*の同条件と比べ、8倍程度低い生産量であったが、プロモーターの強さは、*A. niger*で生産させても3倍程度、No. 8ANが強いプロモーター活性であった。

次に、No. 8ANと *amyB*のプロモーターを持つ *A. oryzae*の形質転換株2株をランダムに選び、炭素源がグルコースとデキストリンで、窒素源がYeast nitrogen baseのCD培地で生育させた菌体からRNAを調製後、*uidA*遺伝子をプローブとして、ノーザン解析を行った(Fig. 3-3)。

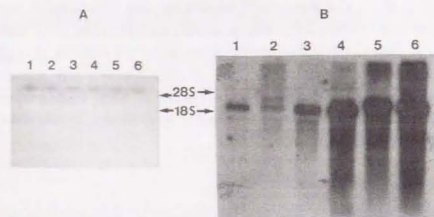


Fig. 3-3 Northern blot analysis of GUS gene transcription in *A. oryzae* transformants. Two *A. oryzae* No.8AN-GUS transformants (column number 5 and 6) and *amyB* promoter-GUS transformants (column number 1-3, and 2-4) chosen at random were grown in CD medium containing: 1, 2, 5, and 6; 2% glucose, or 3, 4; 2% dextrin as a carbon source, and 1-6; 0.3% yeast nitrogen base as a nitrogen source, with shaking for 2 days at 30°C. RNA was extracted from the mycelia and analyzed using the ³²P-labelled 1.8-kb *E. coli uidA* gene as a probe. (A) is an ethidium bromide-stained gel of the total RNA. (B) is the autoradiogram after 2 days exposure.

*uidA*遺伝子の発現量は、2株ともに *amyB*の誘導条件よりもNo. 8ANの方が多くなり、転写レベルで差が認められた。尚、*amyB*の誘導と非誘導でもGUS活性の差の通り、転写レベルで大きな差であった(Tada et al. 1991a)。

(6) *A. oryzae*の麴培養でのGUS活性とウエスタン解析

*A. oryzae*の形質転換株4~5株(Table 3-3の液体培養と同一の株)で、 α 米より麴を調製した。この麴から粗酵素を抽出して、GUS活性とタンパク量を測定した(Table 3-5)。

Table 3-5 Comparison of GUS producing transformants grown on rice-koji

Transformant	GUS(nmole/min/mg protein)
1 control	not detected

2 No.9A0-1	4,159
3 -2	4,713
4 -3	1,080
5 -4	3,312
	average 3,320

6 No.8AN <i>AMAI</i>	3,668

7 No.8AN-1	2,340
8 -2	22,870
9 -3	13,647
10 -4	14,495
	average 13,340

11 <i>amyB</i> -GUS-1	2,176
12 -2	1,499
13 -3	3,467
14 -4	956
15 -5	3,058
	average 2,230

16 control	not detected

The GUS activity of the *A. oryzae* GUS-producing transformants (two *argB* complemented *A. oryzae* transformants are control and the other transformants are the same transformants used to determine the copy number) cultivated on the steamed rice for 2 days at 30-40°C as described in Materials and Methods was determined. Column number 1, 16 are control, 2 to 5 are No.9A0 transformants, 6 is No.8AN *AMAI*-transformant, 7 to 10 are No.8AN transformants, 11 to 15 are *amyB* promoter transformants.

対照として、*uidA*遺伝子を持たない *argB*相補だけの形質転換株2株 (No.1とNo.16)も加えて、Table 3-3の液体培養の株と同じであるので比較が可能である。麴での菌糸の生育の差が多少認められ、更にタンパク量は米タンパク由来のものがかなり入ってきており、GUSの比活性を液培と麴培養では、単純には比較はできないが、No.8ANのプロモーターは、麴培養になると生産量が上がり、*amyB*プロモーターと比較すると6倍程度の差が認められた。また、No.9A0、*amyB*プロモーターも液培に比べ、麴培養ではその生産量が上がっているが、両者の比はほとんど変化なかった。

次に、この粗酵素液のSDSを含んだ電気泳動を行い、GUSの抗血清を用いてウエスタン解析を行った (Fig.3-4)。

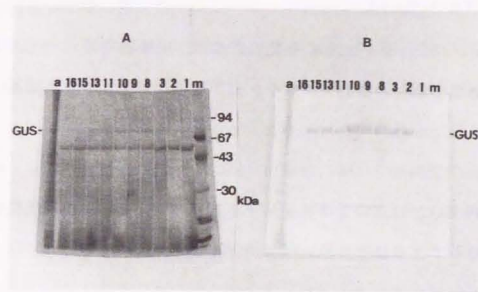


Fig.3-4 Western blot analysis of the GUS protein isolated from rice-koji. The rice-koji extracts (1 mg protein) were analyzed by SDS-PAGE (A) and Western blot analysis (B). The lane number corresponds to the sample number of Table 3-5. Lane (a) is authentic GUS, and (m) is molecular size maker.

No. 8ANのプロモーターが入ったGUS高生産株 (No. 8, 9, 10) は、No. 9AOのそれ (No. 2, 3)、*amyB*のそれ (No. 11, 13, 15) よりも免疫的に反応するGUSタンパクが大量に認められ、クマシーによるタンパク染色により、そのバンドがはっきり認められた。またNo. 9AO、*amyB*もGUSのタンパクを生産していた。

第三項 要約

(1) *A. nidulans*のAMAI配列を利用して、*A. niger*と*A. oryzae*の染色体の中から、GUSを高生産するプロモーター領域を、それぞれNo. 8ANとNo. 9AOとして単離した。

(2) 両プロモーターともに各種の炭素源、窒素源でGUSの生産は構成的な発現を示し、*amyB*プロモーターと異なりグルコース存在下でも高生産となった。

(3) No. 8ANとNo. 9AOプロモーターは、*amyB*プロモーターと比較して、液体培養ではそれぞれ約3倍と1.6倍GUSを生産しており、転写レベルで差が認められた。

(4) 麩培養での同様な比較は、それぞれ約6倍と1.5倍となり、GUSタンパクの生産量がウエスタン解析でも差が認められた。

第四項 考察

今回取得した方法は、*A. oryzae*でGUSタンパクを高発現するDNA断片ということで、正確にはプロモーター領域、あるいはプロモーター領域および翻訳開始点も含んでフレームが合う場合、その他には転写活性化領域(UAS)およびエンハンサー領域も含まれている。従って、青色に発色する形質転換株の数は、四種類のライブラリーからかなりの数の株を取得できていることから、このスクリーニングの方法に起因しているものと考えられる。

次に、形質転換の特徴については、最近Unkelsら(1989)は、*A. oryzae*の*niaD*系での宿主-ベクター系を報告している。それによると直鎖状にしてない環状のベクターで、半分近く*niaD*部位に相同的に組み込まれ、その内半分は1コピー組み込まれている。従って、この*niaD*系はプロモーターの解析には、非常に有効な系であると考えられ、その利用の報告も最近多くなってきている(Murakami *et al.* 1993, 山口ら 1993, 峰時ら 1994, 山田ら 1994)。本研究の*argB*系では、*A. nidulans*由来の*argB*遺伝子を使用しているのも、原因の一つと考えられるが*A. oryzae*の相同的な部位だけでなく、非相同的な部位にも組み込まれ、合計10~60コピー組み込まれると言うGomiら(1987)の報告と、同様な結果を得ている。従って、本研究では、コピー数および染色体に組み込まれる位置は制御できない系であるので、形質転換株数株のGUS活性の平均の比較という方法で行った。と

いうのは、*A. oryzae*の α -アミラーゼのプロモーターの解析で、*argB*の組み込み型のベクターでTadara (1991a)が行った結果と、*A. oryzae*の*met*遺伝子を利用して相同的な部位に1コピーの組み込み型のベクターによるTsuchiyaら(1992a)の結果とほぼ一致していることにより、本方法でのプロモーター活性の比較も、相同的な部位での解析と大きな違いはないものと考えられる。

*A. niger*由来のNo. 8ANのプロモーター、*A. oryzae*由来のNo. 9A0のプロモーターは、*A. oryzae*の*amyB*のプロモーターと比較して、*A. oryzae*の形質転換株のGUS活性の平均で、それぞれ約3倍と1.6倍の生産量を示した。No. 8ANのプロモーターについては、更にノーザン解析により、転写産物の量も*amyB*のプロモーターのものよりも多くなっていることが明らかとなった。これにより、第一章で行った*A. oryzae*の*rntB*遺伝子に比べ、同じ液体培養の比較でNo. 8ANプロモーターは300倍も強力なプロモーター活性を持っていることが判った。

この試験で*A. niger*も同時に比較を行ったが(Table 3-4)、*A. oryzae*に比べ活性が1/8程度であること、また青色に発色するプロモーターを検索する際、四種類のライブラリーDNAを*A. niger*に形質転換したとき、青色に発色する株が1株も得られなかった〔*A. niger*(*argB*)は孢子が黒色で、*A. oryzae*(*argB*)は白色なので青色が分かり難いと易いの違いはあると考えるが〕。これらのことにより、異種タンパクであるGUSの生産は今回用いた宿主では、*A. niger*よりも*A. oryzae*の方が有効と考えられる。しかし、他の異種タンパクもそう

かと言えば、発現させるタンパクの宿主内での安定性が大きく影響してくるものと考えられる。実際、*A. niger*での異種タンパクの分泌例として、種々の工夫を施し、Jeenesら(1993)はニワトリのリゾチームを1g/l以上生産しているし、同種と考えて良い*A. awamori*でも、Dunn-Colemanら(1991)はウシのキモシンを1.5g/l以上生産していることから考えても、*A. niger*が*A. oryzae*よりも生産性が劣っていると考え難い。逆に、単核であることによりプロテアーゼレスの宿主が得られ易いこと、形質転換効率が高いことなど、*A. niger*を宿主として利用するメリットも十分あると考えている。

一方、麴培養においては、*A. niger*由来のNo. 8ANのプロモーター、*A. oryzae*由来のNo. 9A0のプロモーターは、*amyB*プロモーターよりも、それぞれ約6倍と1.5倍の生産量を示した(Table 3-5)。これまで、麴菌の場合、液培よりも固体培養を行うと、タンパクの生産性が上がることに、小麦のフスマ培養などが酵素の実生産に用いられてきた(村上 1986)。異種タンパクの生産においても、Tsuchiyaら(1994)は、小麦のフスマ培養でキモシンの生産性が上がると報告している。このことは、No. 8ANのプロモーターは、グルコースの液体培養だけでなく、固体培養の系においても*amyB*のプロモーター以上に高い生産能を持つプロモーターであると期待でき、異種タンパクの実生産に向けて強力なプロモーターが取得できたと考えている。

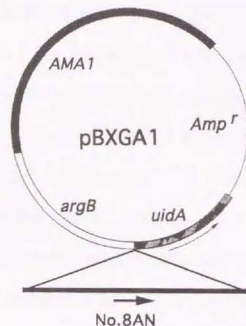
本研究で使用している宿主-ベクター系は、栄養要求性相補の*argB*系なので、培養条件としては、MM培地であるCzapek-Doxでの寒天培

プレート（半固体培地）で、*A. oryzae*内で高発現するプロモーター領域の検索という系で行えなかった。例えば、優性マーカーとなる薬剤耐性遺伝子で実用麹菌の宿主-ベクター系で、更に米粉の入ったプレートなどの固体培養に近い系で検索を行うことができれば、今回取得したプロモーター以外にも強力なものが取得できる可能性も存在する。

取得したプロモーターの特徴については、No. 8ANが787bp、No. 9AOが641bpの大きさであり、特にNo. 8ANはピリミジン(CT)リッチな領域が、転写開始点の上流に150bpほど存在している。また、最新のDNAおよびタンパクのデータベースとのホモロジー検索の結果、両配列とも全く新規な配列であることが判った。

いずれにしても、これらのプロモーターがそれぞれの麹菌の中で何をコードしている遺伝子か、高等生物由来の異種タンパクをどの程度生産できるのか興味を持たれる点が多い。また、*A. niger*由来のプロモーターが強力であったが、このようなAMA1配列を利用して、ショットガンクローニングが有効な方法であり、まだまだ未知の強力なプロモーター、エンハンサーが*Aspergillus*属全般にわたり存在する可能性を強く示唆しているものと考えられる。また、ショットガンクローニングを行う場合、あるいは実用麹菌の育種において、麹菌の形質転換の方法の改良なども、基礎的な研究が不足している中で重要な研究の一つであると考えられる。

補遺



Sau3AI
 gatcgcctgcgactcgaggattttactctgaagacgtacgggattgccattgggtttt 60
 kggacttcacatcctttccttctctcatcaaggccgctctgggaggcgtggggcctc 120
 agcgactagcttgcgataggaggagctggcgcttagaagaatggagtgacgaactggtt 180
 tggagaatcatcccgctgggaggattggccatttggtaggggatttttagttg 240
 atggaactattattatgaccaagaataaggagcagtaaccaggaatggggcaatgtaat 300
 agtcagattagaccagagaaatgcctaggatgctatcccaaaaaccagcttttggtaat 360
 aatgaatactactagcattccccctgacggagctcacgtgtcccttccggcaaaacta 420
 acgaaggaaactgcattgagcttctccctccaccggagcccccagccttcccaccaca 480
 aaacctccgtcgttcccttttaaacctttctctctcctatctcccttctctctcttc 540
 ctccacttctctgcccctccccccctcccaactccctaccattgacgagatttttcc 600
 CT-rich (134bp/152bp: 88%)
 ctctcctctccctctctccccctgtaccttcttctatctctgcccgtcaactcgcgca 660
 cactccccctgacgatgatgaaccattaataggctcagtttctATGCCACTACT 720
 MetProLeuLe 4
 HpaI
 GGTCTCAACCGGGTTTCTGCGGCTAGGCGGGAGTTAAACACCTGGCAGTCAGCGTTTCAA 780
 uValSerThrArgValCysAlaAlaArgArgGluLeuThrProGlySerGlnArgPheAs 24
 Sau3AI SmaI EcoRI linker (pBI121 SmaI site)
 CCTGATCCCCGGGCTCAGGAATTCCGGGTGGTCAGTCCCTTATGTTACGCTCTGTAGA 840
 nleuIleProArgValAlaGlyIleProGlyGlyGlnSerLeuMetLeuArgProValGI 44
 Bluescript II SK MCS pBI121 | → TSP

A. niger No. 8ANプロモーター領域と *uidA* 遺伝子との連結部位の塩基配列

*A. niger*由来No. 8ANプロモーターの構造遺伝子の塩基配列および各種プライマーを合成し、最大の転写領域を決定した後、No. 8ANのmRNAを鋳型とするRT(Reverse Transcription)-PCR産物の塩基配列を決定した。両塩基配列を比較した結果、787bpのプロモーター領域(13.7kbのpBXGA1の*Bam*HIサイトに*Sau*3AIの断片で挿入)には、154bp目に12bpのパリンドローム配列が、転写開始領域の前に当たる、493から644bp目までの152bp中にピリミジンリッチの配列が134bp、88%存在していた。ピリミジンリッチの領域の前に、caat配列は二箇所存在していたが、tataa配列は認められなかった。

また710bp目には、翻訳開始点のATGが存在し、26アミノ酸と、Bluescript II SK⁻のマルチクローニングサイト(MCS)と*uidA*遺伝子を持つpB1121の*Sma*Iサイトに*Eco*RIリンカーを付加した、対応するアミノ酸にすると合計12アミノ酸、従って、本来のGUSタンパクの前に、結局38アミノ酸が付いて、フレームが合って、融合タンパクとしてGUSを高生産していることが明らかとなった(1995年度 日本農芸化学会大会、講演要旨集 p.110)。

第四章 エレクトロポレーション法によるインタクトな*A. niger*への形質転換

第一項 緒言

カビの細胞内にDNAを導入する方法としては、これまで報告されている例では、ほとんど全てがプロトプラストを経由した方法が採られている。この方法は基本的には、細胞融合法と同じであり、初期の酵母における形質転換で用いられた方法である。即ち、適当な細胞壁溶解酵素により、菌糸からプロトプラストを調製し、ベクターDNAを混合後、ポリエチレングリコール(PEG)と塩化カルシウムで融合処理することによって、DNAを細胞内に導入している(Case *et al.* 1979, Ballance *et al.* 1983, Iimura *et al.* 1987, Gomi *et al.* 1987)。

また、エレクトロポレーション法は、DNAの新しい導入方法として発展してきており、酵母(Hashimoto *et al.* 1985)、大腸菌(Fiedler and Wirth 1988, Miller *et al.* 1988)においても数々の研究がなされている。カビにおいても検討されているが、PEG法と同様にプロトプラストを経由してDNAを導入している(Ward *et al.* 1988, 1989, Richey *et al.* 1989)。また、プロトプラスト化の必要のない、酵母の形質転換に良く用いられる、アルカリ金属法を*N. crassa*に利用した

例(Dhawala *et al.* 1984)や最近のパーティクルガン法を*A. nidulans*に利用した報告(Fungaro *et al.* 1995)もあるが、プロトプラスト法よりも形質転換効率は必ずしも優れていない。一方最近、ChakrabortyとKapoor(1990)は、*M. crassa*においてプロトプラストを調製せず、インタクトな状態で形質転換できることを報告している。

一般に、宿主となるカビのプロトプラスト調製には、キチナーゼ、グルカナーゼを主成分とする細胞壁溶解酵素の種類、量あるいは浸透圧調整剤の種類、濃度などのそれぞれのカビに対する最適条件を決定する必要がある、かなりの予備試験を必要とする。また、形質転換株を取得できるまでに、プロトプラストにDNAが取り込まれ、栄養要求性などが相補され、再生して胞子が着生するまでには、5~7日間程度必要となる。そこで、従来法に比べ、より簡便な方法としてエレクトロポレーション法を用い、インタクトな*A. niger*に形質転換できないかどうかを試み、できれば従来法よりも形質転換頻度の上昇できる方法について検討を加えた。

第二項 実験結果

(1) *A. niger*の発芽率の高い培養条件

A. niger(*argB*⁻)の 5×10^8 個の胞子を用い、Table 4-1に示す培地の組成で、25℃、15時間、100rpmの培養条件で、発芽率の高い培地について検討した。

Table 4-1 Germination rate of *A. niger*(*argB*⁻) in various culture media

Medium	Rate
DP: 2% Dextrin, 1% Peptone, 0.5% KH ₂ PO ₄ , 0.1% NaNO ₃ , 0.05% MgSO ₄	82.6%
1/2DP: 1% Dextrin, 0.5% Peptone, 0.25% KH ₂ PO ₄ , 0.05% NaNO ₃ , 0.025% MgSO ₄	83.3%
MYG: 1% Malt extract, 0.4% Yeast extract, 2% Glucose	46.3%
MY: 0.3% Malt extract, 0.3% Yeast extract, 1% Glucose, 0.5% Peptone	56.9%
MY20: 0.3% Malt extract, 0.3% Yeast extract, 20% Glucose, 0.5% Peptone	60.5%

A. niger(*argB*⁻) conidia (5×10^8 cells) were grown in the above media for 15h at 25°C with shaking at 100 rpm. The germination rate of *A. niger* was measured after dispersion of the germinating conidia by the addition of 0.1% Tween 20.

その時のDextrin-Peptone(DP)培地とその半分の濃度の1/2DP培地での写真をFig. 4-1に示す。

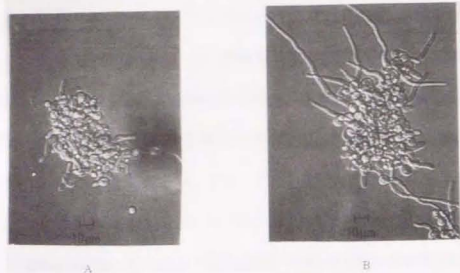


Fig.4-1 *A. niger* (*argB*) germination in 1/2DP (A) or DP (B) medium.
A. niger (*argB*) conidia (5×10^8 cells) were in 1/2DP or DP medium for 15h at 25°C with shaking at 100rpm.

尚、発芽胞子数の測定は、0.1%のツイーン20で胞子を分散後、顕微鏡下で行った。DPおよび1/2DP培地が、上記の培養条件で高い発芽率を示したが、DP培地においては発芽管が長く伸び、よりアグリゲーションが強く起こっているため1/2DPの条件に決定した。

(2) エレクトロポレーションの最適条件

酵母などで行われている一般的なエレクトロポレーションの条件を参考にすると、発芽胞子を集菌し、エレクトロポレーション用の緩衝液で洗浄、 $1 \times 10^7/0.4\text{ml}$ の胞子懸濁液を調製し、エレクトロポレーションのキューベットに入れDNAを混合し、10分間0°Cに保ち、エ

レクトロポレーションを行った（パルス電界強度4~8kV/cmと時定数3~12ms）。更に0°Cに10分間放置し、CDの寒天培地にまき、同ソフト寒天でまき広め、30°Cで数日間培養することにより、形質転換株が得られると考えられる。エレクトロポレーションの緩衝液を数種上記の培養条件で検討したところ、50mMマンニトールを含む1mM HEPES緩衝液(pH7.0)が、広い範囲で形質転換株が得られたので、エレクトロポレーション用緩衝液に決定した。

発芽胞子に対するパルス電界強度と生存率の関係(Fig.4-2)より、一般的に、酵母などでは生存率50%前後の条件で行っていることが多いので、その条件を*A. niger*に適用すると、パルス電界強度6kV/cm以上、時定数8ms以上の電場の条件が必要であることが判った。

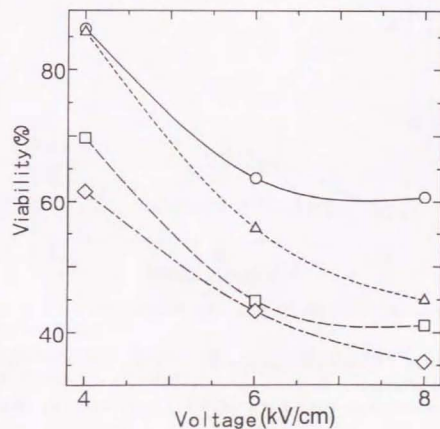


Fig.4-2 Effects of field strength (time constant: ○ 3 msec, △ 8 msec, □ 10 msec, ◇ 12 msec) on germinated cell viability. The suspension (1×10^7 cells/0.4 ml, 1 mM HEPES containing 50 mM mannitol buffer, pH 7.0) was electroporated at various voltages and time constants.

次に、組み込み型のベクターである pXba192 [pDG3の *Xba*I断片 (*argB*)を pUC19の *Xba*Iサイトに挿入したDNA] を用いて、エレクトロポレーションを行った (Fig. 4-3)。

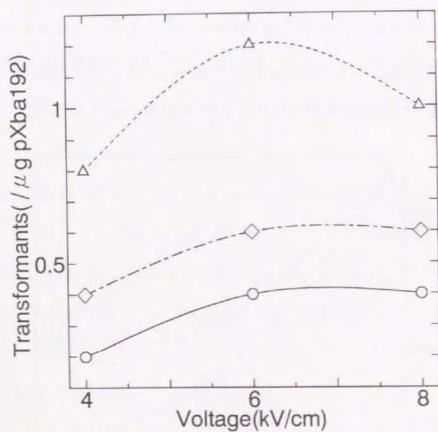


Fig.4-3 Effects of field strength (time constant: ○ 3m sec, △ 8m sec, ◇ 12m sec) on transformation efficiency. Cell and DNA concentrations were set at 1×10^7 /0.4 ml and 10 μ g/0.4 ml, respectively.

その結果、6kV/cmと8msのエレクトロポレーションの条件の時、形質転換頻度1.2個/ μ gDNAの最高値を得た。

更に、プラスミド型のベクターである ARp1 と上述の pXba192 を用いて、発芽胞子を $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ /0.4ml と変化させて、6kV/cm と 8ms でエレクトロポレーションを行った (Fig. 4-4)。

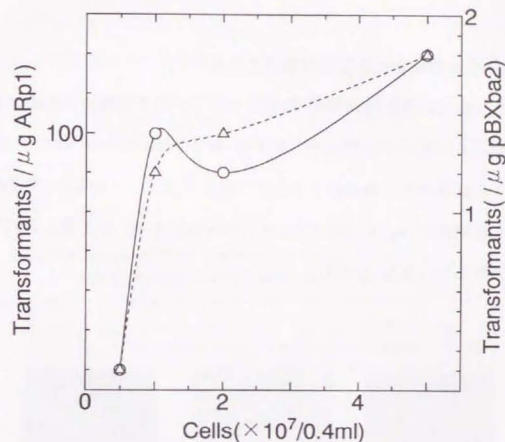


Fig.4-4 Effects of cell concentrations and vectors (○ ARp1 and △ pBXba2) on transformation efficiency. Field strength was set at 6 kV/cm and 8 msec. DNA concentration was set at 1 μ g/0.4 ml for ARp1 and 10 μ g/0.4 ml for pBXba2.

1×10⁷個/0.4mlの条件で、プラスミド型DNAの形質転換頻度は100個/μgDNAでインテグレート型は、前述と同じ1.2個/μgDNAとなり、プラスミド型の方が80倍高い効率となった。また、両ベクターともに孢子数を増加させると、頻度が上昇したが、2×10⁷個以上になると孢子同士のアグリゲーションの状態が激しくなり、扱い難くなり、操作上1×10⁷個/0.4mlの孢子数で良いと決定した。

(3) 細胞壁溶解酵素による発芽孢子の処理

ChakrabortyとKapoor(1990)の報告で、インタクトな*N. crassa*の形質転換において、カタツムリ由来のβ-グルクロナダーゼ(GUS)で発芽孢子を処理すると効率が上昇していた。そこで、*A. niger*の発芽孢子でも低濃度の1mg/ml GUSと2mg/ml Yatalaseを用いて、更に2時間の前処理を行った(Fig. 4-5)。

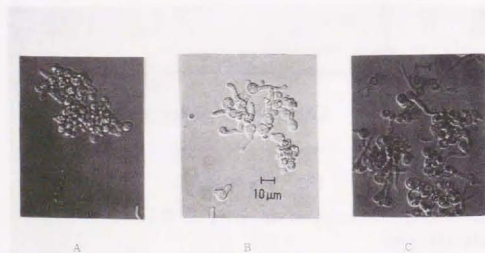


Fig.4-5 Influence of treatment with cell wall lytic enzymes, non-treatment (A), 1 mg/ml β-Glucuronidase (B) and 2 mg/ml Yatalase (C). *A. niger* (*argB*) conidia (5×10⁸ cells) were grown in 1/2DP medium for 15 h at 25°C with shaking at 100 rpm. Dilute β-glucuronidase or Yatalase was added to the culture, which was then incubated for 2 h at 30°C with shaking at 50 rpm.

これらの細胞壁溶解酵素で処理することにより、発芽孢子どうしのアグリゲーションが抑えられ、孢子がかなり分散できることが判った。

そこでYatalaseによる前処理を含め、このインタクトなエレクトロポレーション法、プロトプラスト-エレクトロポレーション法、プロトプラスト-PEG法について、ARp1とpBXba2の両ベクターで形質転換頻度を比較した(Table 4-2)。

Table 4-2 Comparison of the transformation efficiency of intact-EP, protoplast-EP, and protoplast-PEG methods

	ARp1 transformants(/μg DNA)	pBXba2 transformants(/μg DNA)
intact-EP(non)	120	1.8
intact-EP(Yatalase)	210	3.2
protoplast-EP	10	0.5
protoplast-PEG	500	4

EP, electroporation. Cell concentration was set at 1×10⁷/0.4 ml. DNA concentration was set at 1 μg/0.4 ml for ARp1 and 10 μg/0.4 ml for pBXba2.

Yatalaseによる前処理をする場合、エレクトロポレーションの条件を未処理の場合のように、最適な条件をはっきり決定しておらず、とりえず未処理の条件（パルス電界強度6kV/cmと時定数8ms）よりも低電場の方が良いことは確認した。従って、Yatalase処理のエレクトロポレーションは、6kV/cmと3msの条件で行った。また、プロトプラストのエレクトロポレーション法についても報告が少なく(Ward *et al.* 1988, 1989)、ほとんど条件検討をしていない。このような状況下で比較すると、従来法であるプロトプラスト-PEG法よりも効率が上昇する形質転換法は認められなかった。その中で、Yatalaseで前処理するインタクトなエレクトロポレーション法が従来法に近い効率であった。

(4) 形質転換株のサザン解析

プラスミド型ベクターのARp1とインテグレート型ベクターのpBXba2のDNAを用い、このインタクトなエレクトロポレーション法と、プロトプラスト-PEG法で得られる形質転換株のサザン解析を行った。プローブとしては、*A. nidulans* 1F02006株の*argB*遺伝子が染色体に1コピーであることを利用して、その染色体上での存在位置、およびそのバンドの濃さによってもコピー数のある程度の推定ができる(Fig. 4-6)。

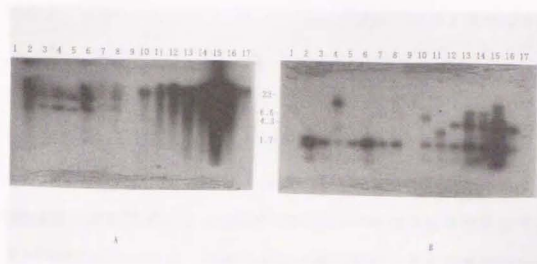


Fig.4-6 Southern blot analysis of the genomic DNAs (A) and *Hind*III digested genomic DNAs (B) of the *A. niger* transformants. The blot was hybridized with a 3-kb *Xba*I fragment encoding the *argB* gene. In panels (A) and (B), the lanes contain DNA (5 μ g) as follows: 1, *A. niger* wild type ATCC 46951; 2-5, ARp1-intact conidia electroporation transformants; 6-8, ARp1-Protoplast-PEG transformants; 9, size marker; 10-13, pBXba2-intact conidia electroporation transformants; 14-16, pBXba2-Protolast-PEG transformants; 17, *A. nidulans* IFO 2006. The sizes of the molecular weight markers are given in kb.

ARp1、pBXba2プラスミド共に、インタクトなエレクトロポレーション法と従来のプロトプラスト法による差は認められなかった。また、ARp1を持つ*A. niger*の組み換え株は、第二章の結果と同様に、3回継代培養を繰り返しても、染色体に組み込まれることはなかった。また、コピー数については、組み込み型に比べ低いことが推定できる。これらのことは、Gemsら(1991)の*A. nidulans*の報告、および第二章での結果と一致している。また、組み込み型のベクターでは、Gomiら(1987)が*A. oryzae*で報告しているように、相同的にも非相同的にも、宿主の染色体に組み込まれていることを、*A. niger*における

今回の結果も同様に確認できた。

第三項 要約

インタクトな *A. niger* の電ロポレーションによる形質転換法についてまとめると以下の操作法となる。

A. niger (*argB*⁻) の孢子 5×10^8 個を 1/2DP 培地で 25°C、15 時間培養

↓

2mg/ml Yatalase を加え、更に 30°C、2 時間培養

↓

遠心分離で集菌し、50mM マンニトールを含む 1mM HEPES 緩衝液 (pH7.0) で、孢子を 2 度洗浄

↓

$1 \times 10^7 / 0.4$ ml に懸濁した孢子を電ロポレーション用のキューベットに入れ (0.4 ml)、DNA を混合し、0°C で 10 分間静置

↓

6kV/cm、3ms で電ロポレーションを行い、更に 0°C で 10 分間静置

↓

MM 培地にまき、30°C、3 日間で形質転換株が得られる

第四項 考察

カビの分子育種を行う一つの方法として、プロトプラストを経由した細胞融合、遺伝子組み換えが考えられ、数々の報告がこれまでなされている。しかし、日本ではプロトプラストを経由しないで育種を行った報告はなく、また研究者の数自体が少ないのが現状である。その理由としては、今までも述べてきたが、カビの多くは、有性世代を持たず遺伝解析が困難であること、プラスミドが利用できなかったことなどが挙げられる。そこで、カビの分子生物学における基礎的研究の裾野を広げる意味もあり、プロトプラストを経由せずに、*A. niger* の発芽孢子に直接 DNA を導入する方法について検討した。

DNA の導入方法の一つとして、電ロポレーション法があり、操作も簡便で、装置の普及と共に広く一般的に用いられるようになってきている。これまで *Aspergillus* 属では電ロポレーション法による形質転換の方法は少なく、直接に導入する方法は報告されてなかった。今回開発した Yatalase で発芽孢子を前処理する方法については、発芽孢子どうしのアグリゲーションが抑えられていること、およびおそらく発芽管の細胞壁の一部が溶解すること (電子顕微鏡などで確認する必要があると考えられる) により、DNA が導入される効率が上昇したのと考えられる。しかし、この Yatalase で前処理する方法においては、電ロポレーションの緩衝液、電場

の強度など最適な条件を更に決定する必要があると考えている。

更に、エレクトロポレーションでは、細胞膜に形成される穴を通して、DNAが濃度勾配に応じて、流入し取り込まれるので、添加するDNAの濃度が高いほど、取り込みが高くなり、発現量が上昇すると言われている。従って、本法に適用すると、インテグレート型のベクターでは、従来法であるプロトプラスト法に近い形質転換効率を示しているが、プラスミド型のベクターでは、従来法の半分程度と、依然劣っている。そこで、キャリアーDNAを添加し、DNA濃度を上げることにより、形質転換効率の上昇は可能ではないかと推察している。

更に、今回使用したDNAは全て環状のままであり、直鎖状にしたDNAを用いると、カビにおいて遺伝子の導入効率が上昇していることは、プロトプラスト法(Paietta and Marzluf 1985)で、および動物細胞を用いたエレクトロポレーション法(Toneguzzo *et al.* 1986)で報告されている。従って、本法に適用すると、直鎖状のDNAによるプロトプラストの取り込み状態と、エレクトロポレーションで発芽した孢子細胞での取り込み状態と、異なることも十分に考えられるが、ある程度の効率の上昇もまた期待できる。

何れにしても、本方法は、孢子の着生の良い *A. niger*(*argB*⁻)においては十分に適用できるが、もう一つの *A. oryzae*(*argB*⁻)の宿主においては、孢子の着生が非常に悪いので、このような宿主の場合は、従来のプロトプラスト法あるいは、更なる新しい形質転換法が必要

となってくる。

今後益々、簡便な形質転換方法の開発は、これまで述べてきた観点から、AMAIベクターの汎用的利用方法の開発と同様に、重要な研究になると考えられ、これまでの研究がその一助になればと考えている。

総括

*Aspergillus*属をはじめとする糸状菌の多くは、醸造産業をはじめ、酵素剤、医薬品の生産にとって非常に重要な菌種である。その中でも *A. oryzae*, *A. niger*等は、タンパクの分泌量が多く、異種タンパクの生産の宿主として有用性が認められてきている。本研究は、*Aspergillus*属で機能するプロモーターを取得し、現在までに異種タンパクの生産が試みられている、強力なプロモーターの一つである、*A. oryzae*の α -アミラーゼのプロモーター(*amyB*)との比較を行い、異種タンパクの生産に利用することを目的に行ったものである。

最初に、*A. oryzae*の各種菌体外酵素の内、生命現象に不可欠であるが生産量が少ないと考えられるリボヌクレアーゼ(RNase) T_2 の遺伝子(*rntB*)が、どの程度のプロモーター活性を持ち、その発現誘導について興味を持たれた。そこで *rntB*遺伝子を単離し、その塩基配列を決定したところ、N末端の17アミノ酸のシグナルペプチドだけでなく、C末端の20アミノ酸がプロセッシングを受けていることが明らかとなった。また、本遺伝子プロモーター領域と大腸菌の β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子(*uidA*)との融合遺伝子を作成し、*A. oryzae*を形質転換した。得られた形質転換株の菌体内のGUSの生産量を比較すると、*rntB*プロモーターは*amyB*プロモーターより誘導時の1/100、非誘導時の1/4程度と、弱いプロモーター活性であることが明らかとなっ

た。また、GUSの生産量は、RNA等の核酸による誘導は認められず、RNase T_2 は菌体外に分泌されているのではなく、菌体内の酵素であると推定した。(第一章)

組み込み型のベクターの場合は、形質転換株からのベクターDNAの回収が容易ではない。また最近、*Aspergillus*属の細胞内でプラスミドの自己複製を可能にするDNA断片(AMAI)が単離され、今後プラスミドベクターとして大いに利用が考えられる。そこで、*A. oryzae*と *A. niger*のAMAIプラスミドを持つ形質転換株からプラスミドDNAを簡単に回収する方法について検討した。その結果、選択培地で2日間培養した菌体を、糸状菌の細胞壁溶解酵素であるYatalase(宝酒造)を用いてプロトプラスト化した後、DNAを大腸菌から回収することにより、修飾を受けてないAMAIプラスミドが得られることが明らかとなった。(第二章)

*Aspergillus*属には、種々の培養条件(液体培養および固体培養、温度、菌令など)で高発現している未知のプロモーターの存在が予想される。そこでAMAI配列と*uidA*遺伝子を利用して、*A. oryzae*と *A. niger*の染色体から、GUSを高生産する *A. oryzae*の形質転換株から強力なプロモーター活性を持つDNA断片を検索した。その結果、*A. niger*からNo. 8ANプロモーター、*A. oryzae*からNo. 9A0プロモーターを取得し、両プロモーター共に各種炭素源、窒素源の培養で、構成的にGUSを高生産した。次に、*A. oryzae*の*amyB*とプロモーター活性を比較すると、*A. oryzae*の形質転換株のGUS活性の平均で、液体培養で

No. 8ANが3倍、No. 9A0が1.6倍生産量が多くなった。また、No. 8ANと *amyB*プロモーターのノーザン解析で、転写レベルで差があることが認められ、No. 8ANプロモーターは、グルコース培養でも高発現するプロモーターであることが明らかとなった。一方、固体培養である麴培養では、*amyB*よりNo. 8ANが6倍、No. 9A0が1.5倍程度それぞれGUSの生産量が多くなり、ホモロジー検索により、本プロモーターが共に新規で、強力なプロモーターであることが明らかとなった。(第三章)

現在までに報告されている *Aspergillus* 属の形質転換方法は、Yatalaseなどの細胞壁溶解酵素でプロトプラスト化した後、DNAを導入しているが、*A. niger*の発芽したばかりの胞子に、直接エレクトロポレーションによりDNAを導入できることを明らかにした。形質転換株は、従来のプロトプラスト法よりも早く得られ、形質転換頻度は、インテグレート型のベクターで1.2個/ μ gDNA、プラスミド型で100個/ μ gDNAであった。更に薄い濃度のYatalaseで発芽胞子を前処理することにより、両ベクター共に頻度が2倍程度上昇した。(第四章)

本研究の宿主-ベクター系は、マーカー遺伝子として、*A. nidulans*の *argB*を用いており、宿主の *Aspergillus* 属の染色体の挿入位置、およびコピー数については制御するのが困難な系であるので、形質転換株の何株かの平均の比較を行った。*A. niger*のNo. 8ANプロモーターは、*A. oryzae*の *rntB*プロモーターに比べ、300倍以上強力なプロモ-

ーターであることが示唆され、*A. oryzae*の *amyB*プロモーターに比べても、グルコース存在下の液体培養、麴培養においても明らかにNo. 8ANプロモーターの優位性を示している。

また、既存の強力なプロモーターは、特許の問題があり、実生産にはかなりの制約が生じるが、本プロモーターに関しては、実生産の利用が可能となる。一方、*AMA1*ベクターについては、本研究のプロモーターの検索等と *AMA1*ベクターを利用した *Aspergillus* 属の有用遺伝子のショットガンクローニングにと、今後利用分野が広まり、今回 *A. niger*から強力なプロモーターが取得できた。しかし、その他の *Aspergillus* 属にもまだまだ強力な未知のプロモーター、およびエンハンサーの存在が予想され、このような新たなプロモーターの取得などの研究も今後考えられる。更に、新しい形質転換法については、プロトプラスト化の最適条件を決める必要もなく、形質転換株が早く取得でき、簡便な方法であると考えられ、これら一連の本研究が異種タンパク生産の応用面だけでなく、*Aspergillus* 属の基礎的な分子育種全般に渡り、新しい展開をもたらすものと考えられる。

発表論文

- 1.-1 Cloning and nucleotide sequence of the genomic ribonuclease T₂ gene (*rntB*) from *Aspergillus oryzae*

Kenji Ozeki, Katsuhiko Kitamoto, Katsuya Gomi, Chieko Kumagai, Gakuzo Tamura, and Shodo Hara: *Curr. Genet.*, 19, 367-373, 1991

- 1.-2 麹菌 (*A. oryzae*) リボヌクレアーゼ T₂ 遺伝子の発現制御について

尾関健二、五味勝也、北本勝ひこ、熊谷知栄子、田村學造、原昌道：1990年日本農芸化学会大会講演要旨集，p.435

2. A method for the re-isolation of an autonomously replicating plasmid from *Aspergillus* transformants

Kenji Ozeki, Kazuhisa Hizume, Akihiro Kanda, Masaaki Hamachi, and Yataro Nunokawa: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1133-1134, 1995

3. Construction of promoter probe vector autonomously maintained in *Aspergillus* and characterization of the promoter region derived from *A. niger* and *A. oryzae* genomes

Kenji Ozeki, Akihiro Kanda, Masaaki Hamachi, and Yataro Nunokawa: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 審査中

4. Transformation of intact *Aspergillus niger* by electroporation

Kenji Ozeki, Fumiko Kyoya (Fujii), Kazuhisa Hizume, Akihiro Kanda, Masaaki Hamachi, and Yataro Nunokawa: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 2224-2227, 1994

引用文献

Aleksenko, A. Y., *Curr. Genet.*, 26, 352-358(1994)

Anderson, M. A., Cornish, E. C., Mau, S.-L., Williams, E. G., Hoggart, R., Atkinson, A., Bonig, I., Grego, B., Simpson, R., Roche, P. J., Haley, J. D., Penschow, J. D., Niall, H. D., Tregear, G. W., Coghlan, J. P., Crawford, R. J. and Clarke, A. E., *Nature*, 321, 38-44(1986)

Anfinsen, C. B., *Science*, 181, 223-230(1973)

Archer, D. B., Jeenes, D. J., Mackenzie, D. A., Brightwell, G., Lambert, N., Lowe, G., Radford, S. E. and Dobson, C. M., *Bio/Technology*, 8, 741-745(1990)

Ballance, D. J., Buxton, F. P. and Turner, G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112, 284-289(1983)

Ballance, D. J. and Turner, G., *Gene*, 36, 321-331(1985)

Barbesgaard, P., Heldt-Hansen, H. P. and Diderichsen, B., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 569-572(1992)

Boel, E., Hansen, M. T., Hjort, I. and Fill, N. P., *EMBO J.*, 3, 1581-1585(1984)

Boel, E. and Høge-Jensen, I. B., European Patent Application EP0305216(1989)

Bradford, J. F., *Anal. Biochem.*, 72, 248-254(1976)

Buxton, F. P., Gwynne, D. I. and Davies, R. W., *Gene*, 37, 207-214(1985)

Case, M. E., Schweizer, M., Kushner, S. R. and Giles, N. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5259-5263(1979)

Cathala, G., Savouret, J. F., Mendez, B., West, B. L., Karin, M., Martial, J. A. and Baxter, J. D., *DNA*, 2, 329-335 (1983)

Chakraborty, B. N. and Kapoor, M., *Nucl. Acids Res.*, 18, 6737(1990)

Christensen, T., Woeldike, H., Boel, E., Mortensen, S. B., Hjortshoej, K., Thim, L. and Hansen, M. T., *Bio/Technology*, 6, 1419-1422(1988)

Cullen, D., Wilson, L. T., Gray, G. L., Henner, D. J., Turner, G. and Ballance, D. J., *Nucleic Acids Res.*, 15, 9163-9175(1987)

Dhawale, S. S., Paietta, J. V. and Marzluf, G. A., *Curr. Genet.*, 8, 77-79(1984)

Dunn-Coleman, N. S., Bloebaum, P., Berka, R. M., Bodie, E., Robinson, N., Armstrong, G., Ward, M., Pretak, M., Carter, G. L., LaCost, R., Wilson, L. J., Kodama, K. H., Baliu, E. F., Bower, B., Lamusa, M. and Heinsohn, H., *Bio/Technology*, 9, 976-981(1991)

Feinberg, A. P. and Vogelstein, B., *Anal. Biochem.*, 132, 6-13(1983)

Fiedler, S. and Wirth, R., *Anal. Biochem.*, 170, 38-44(1988)

Frishauf, A. M., Lehrach, H., Poustka, A. and Murray, N., *J. Mol. Biol.*, 170, 827-842(1983)

藤井史子、尾関健二、神田晃敬、濱地正昭、布川弥太郎；醸協、87, 757-759(1992)

Fungaro, M. H. P., Rech, E., Muhlen, G. S., Vainstein, M. H., Pascon, R. C., de Queiroz, M. V., Pizzirani-Kleiner, A. A. and de Azevedo, J. L., *FEMS Microbiol. Lett.*, 125, 293-298 (1995)

Gems, D. H., Johnstone, L. and Clutterbuck, A. J., *Gene*, 98, 61-67(1991)

Gems, D.H. and Clutterbuck, A.J., *Curr. Genet.*, 24, 520-524 (1993)

Germann, U. A., Muller, G., Hunziker, P. E. and Lerch, K., *J. Biol. Chem.*, 263, 885-896(1988)

Gines, M. J., Dove, M. J. and Seligy, V. L., *Gene*, 79, 107-117(1989)

Gleich, G. J., Loegering, D. A., Bell, M. P., Checkel, J. L., Ackerman, S. J. and McKean, D. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 3146-3150(1986)

Gomi, K., Iimura, Y. and Hara, S., *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2549-2555(1987)

五味勝也、多田節三、北本勝ひこ、高橋康次郎；日本発酵工学会 1989年度大会講演要旨集p.164

Gomi, K., Arikawa, K., Kamiya, N., Kitamoto, K. and Kumagai, C., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1095-1100(1993)

Gurr, S. J., Unkles, S. E. and Kinghorn, J. R., "The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In: Kinghorn, J. R. (ed) Gene structure in eukaryotic miroges ", IRL Press, Oxford, p.93-139, 1987

Gwynne, D. I., Buxton, F. P., Williams, S. A., Garven, S. and Davies, R. W., *Bio/Technology*, 5, 713-719(1987)

Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166, 577-580(1983)

Harrison, B. and Zimmerman, S. B., *Anal. Biochem.*, 158, 307-315(1986)

- Hashimoto, H., Morikawa, H., Yamada, T. and Kimura, A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 326-339(1985)
- Hata, Y., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C., Tamura, G. and Hara, S., *Agric. Biol. Chem.*, 55, 941-949(1991a)
- Hata, Y., Tsuchiya, K., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C. and Tamura, G., *Gene*, 108, 145-150(1991b)
- Hata, Y., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C. and Tamura, G., *Curr. Genet.*, 22, 85-91(1992)
- von Heijne, G., *Eur. J. Biochem.*, 133, 17-21(1983)
- Horiuchi, H., Yanai, K., Takagi, M., Yano, K., Wakabayashi, E., Sanda, A., Mine, S., Ohgi, K. and Irie, M., *J. Biochem.*, 103, 408-418(1988)
- Iimura, Y., Gomi, K., Uzu, H. and Hara, S., *Agric. Biol. Chem.*, 51, 323-328(1987)
- 石川芳明; 実験医学, 5, 1053-1060(1987)
- Jeenes, D. J., Marczinke, B., MacKenzie, D. A. and Archer, D. B., *FEMS Microbio. Lett.*, 107, 267-272(1993)
- Jefferson, R. A., Burgess, S. M. and Hirsh, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 8447-8451(1986)
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W., *EMBO J.*, 6, 3901-3907(1987)
- Johnstone, I. L., *Microbiol. Sci.*, 2, 307-311(1985)
- Kawata, Y., Sakiyama, F. and Tamaoki, H., *Eur. J. Biochem.*, 176, 683-697(1988)
- Kawata, Y., Sakiyama, F., Hayashi, F. and Kyogoku, Y., *Eur. J. Biochem.*, 187, 255-262(1990)

- Kelly, J. M. and Hynes, M. J., *EMBO J.*, 4, 475-479(1985)
- Knight, D. P., *Anal. Biochem.*, 185, 84-89(1990)
- Kreil, G., *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 317-348(1981)
- Kupper, U., Niedermann, D. M., Travaglini, G. and Lerch, K., *J. Biol. Chem.*, 264, 17250-17258(1989)
- Kurachi, K., Davie, E. W., Strydom, D. J., Riordan, J. F. and Vallee, B. L., *Biochemistry*, 24, 5494-5499(1985)
- Laemmli, U. K., *Nature*, 227, 680-685(1970)
- Lerner, M. R., Boyle, J. A., Mount, S. M., Wolin, S. L. and Steitz, J. A., *Nature*, 283, 220-224(1980)
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982
- McClure, B. A., Haring, V., Ebert, P. R., Anderson, M. A., Simpson, R. J., Sakiyama, F. and Clarke, A. E., *Nature*, 321, 38-44(1989)
- Miller, J. F., Dower, W. J. and Tompkins, L. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 856-860(1988)
- 峰時俊貴、布川弥太郎、五味勝也、北本勝ひこ、熊谷知栄子、田村學造; 日本農芸化学会1994年度大会講演要旨集p. 262
- Mount, S. M., *Nucleic Acids Res.*, 10, 459-472(1982)
- 村上英也、"麴学" 日本醸造協会 1986
- Murakami, K., Aikawa, J., Horinouchi, S. and Beppu, T., *Mol. Gen. Genet.*, 241, 312-318(1993)

- Naoi-Tada, M., Sato-Asano, K. and Egami, F., *J. Biochem.*, 46, 757-764(1959)
- 岡崎直人、竹内啓修、菅間誠之助；醸協, 74, 683-686(1979)
- Paietta, J. V. and Marzluf, G. A., *Mol. Cell. Biol.*, 5, 1554-1557(1985)
- Price, J. A. R., Pethig, R., Lai, C.-N., Becker, F. F., Gascoyne, P. R. C. and Szent-Gyorgi, A., *Biochem. Biophys. Acta*, 98, 129-136(1987)
- Rambosek, J. and Leach, J., *Crit. Rev. Biotechnol.*, 6, 357-393(1987)
- Richey, M. G., Marek, E. T., Schardl, C. L. and Smith, D. A., *Phytopathology*, 79, 844-847(1989)
- Rushizky, G. W. and Sober, H. A., *J. Biol. Chem.*, 238, 371-376(1963)
- Sato, K. and Egami, F., *J. Biochem.*, 44, 753-767(1957)
- Sato, S., Uchida, T. and Egami, F., *Arch. Biochem. Biophys.*, 115, 48-52(1966)
- Saunders, G., Picknett, T. M., Tuite, M. F. and Ward, M., *Trends Biotechnol.*, 7, 283-287(1989)
- Strydom, D. J., Fett, J. W., Logg, R. R., Alderman, E. M., Bethune, J. L., Riordan, J. F. and Vallee, B. L., *Biochemistry*, 24, 5486-5494(1985)
- Tada, S., Iimura, Y., Gomi, K., Takahashi, K., Hara, S. and Yoshizawa, K., *Agric. Biol. Chem.*, 53, 593-599(1989)
- Tada, S., Gomi, K., Kitamoto, K., Takahashi, K., Tamura, G. and Hara, S., *Mol. Gen. Genet.*, 229, 301-306(1991a)
- Tada, S., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C., Tamura, G. and Hara, S., *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1939-1941(1991b)
- Takara, "Cell Technology", 124-127(1994-1995)
- Tatsumi, H., Ogawa, Y., Murakami, S., Ishida, Y., Murakami, K., Masaki, A., Kawabe, H., Arimura, H., Nakano, E. and Motai, H., *Mol. Gen. Genet.*, 219, 33-38(1989)
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Tailor, G. G., Zabicky-Zissman, J. H., Lockington, R. A. and Davies, R. W., *Gene*, 26, 205-221(1983)
- Toneguzzo, F., Hayday, A. C. and Keating, A., *Mol. Cell. Biol.*, 6, 703-708(1986)
- Tsuchiya, K., Tada, S., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C. and Tamura, G., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 1849-1853(1992a)
- Tsuchiya, K., Tada, S., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., Jigami, Y. and Tamura, G., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 109-114(1992b)
- Tsuchiya, K., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C. and Tamura, G., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 327-332(1993)
- Tsuchiya, K., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C. and Tamura, G., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 895-899(1994)
- Tsukagoshi, N., Furukawa, M., Nagaba, H., Kirita, N., Tsuboi, A. and Udaka, S., *Gene*, 84, 319-327(1989)
- Uchida, T., *J. Biochem.*, 60, 115-132(1966)
- Uchida, T. and Egami, F., *J. Biochem.*, 61, 44-53(1967)

Unkles, S. E., Cambell, E. I., Carrez, D., Grieve, C.,
Contreas, R., Fiers, W., van den Hondel, C. A. M. J. J. and
Kinghorn, J. R., *Gene*, 78, 157-166(1989)

Upshall, A., Kumar, A. A., Bailey, M. C., Parker, M. D.,
Faureau, M. A., Lewison, K. P., Joseph, M. L., Maraganore, M.
J. and McKingt, G. L., *Bio/Technology*, 5, 1301-1304(1987)

牛場義人、五味勝也、北本勝ひこ、熊谷知栄子；日本農芸化学会19
92年度大会講演要旨集p.360

Verdoes, J. C., Punt, P. J., van der Berg, P., Debets, F.,
Stouthamer, A. H. and van den Hondel, C. A. M. J. J., *Gene*,
146, 159-165(1994)

Vieira, J. and Messing, J., *Methods Enzymol.*, 153, 3-11(1987)

Ward, M., Wilson, L. J., Carmona, C. L. and Turner, G.,
Curr. Genet., 14, 37-42(1988)

Ward, M., Kodama, N. H. and Wilson, L. J., *Exp. Mycol.*, 13,
289-293(1989)

Ward, M., Wilson, L. J., Kodama, K. H., Rey, M. W. and Berka,
M. R., *Bio/Technology*, 8, 435(1990)

Ward, P. P., Duke, J. L. M., May, G. S., Headon, D. R. and
Conneely, O. M., *Bio/Technology*, 10, 784-789(1992)

Watanabe, H., Naitoh, A., Suyama, Y., Inokuchi, N., Shimada,
H., Koyama, T., Ohgi, K. and Irie, M., *J. Biochem.*, 108,
303-310(1990)

Wirsel, S., Lachmund, A., Wildhardt, G. and Ruttkowski, E.,
Mol. Microbiol., 3, 3-14(1989)

山田修、北本勝ひこ、熊谷知栄子；日本生物工学会1994年度大会講
演要旨集p.186

山口庄太郎、黒川明美、橋本三千子、竹内一之、梶裕之、鯨島達也
；日本農芸化学会1993年度大会講演要旨集p.136

山岡洋、藤井力、五味勝也、北本勝ひこ、熊谷知栄子；日本発酵工
学会1991年度大会講演要旨集p.95

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J., *Gene*, 33,
103-119(1985)

謝辞

本論文を作成するに当たり、終始御指導と御高配を賜りました東京大学教授 山崎真狩博士、元国税庁醸造試験所第四研究室主任研究員、東京大学助教授 北本勝ひこ博士に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行において御懇篤なる御指導を賜りました東京大学名誉教授、元醸造資源研究所所長 田村學造博士に心より感謝致します。また、多大なる御指導、御助言を賜りました醸造試験所第四研究室室長 高橋康次郎博士、元同室長、大関株式会社総合研究所所長 熊谷知栄子博士、元同研究員、生物系特定産業技術研究推進機構 五味勝也博士に感謝致します。数々の御援助、御協力を頂きました元醸造資源研究所 多田節三博士、水津哲義氏、渋谷一郎氏、秦洋二博士、土屋幸三博士、小川雅裕氏に心より感謝致します。

また終始、研究の遂行に格別の御理解と御高配を賜りました大関株式会社 長部文治郎社長、長部二郎副社長、堀江雅博常務取締役、並びに御理解と御助言を頂きました常務取締役、元総合研究所所長 布川弥太郎博士に謹んで御礼申し上げます。更に御助言、御協力を頂きました総合研究所副所長 濱地正昭氏、同第四研究室室長 神田晃敬氏、同研究員 京屋（藤井）史子氏、樋詰和久氏、永益陽子氏に感謝致します。また、総合研究所の方々には御援助を頂きましたことに感謝致します。

