

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 朱 琳

麹菌 *Aspergillus oryzae* は古くから日本の伝統的発酵食品の製造に利用されてきた微生物である。アミラーゼなどのタンパク質を大量に培地中に分泌する能力をもち、異種タンパク質生産の宿主として世界中で用いられている。しかし、動物や植物など高等生物由来のタンパク質の生産量は、糸状菌由来のものとは一般に低く、麹菌が生産するプロテアーゼによる分解が原因の一つであると考えられている。*A. oryzae* は 134 のプロテアーゼ遺伝子を持つと推定されているが、これまでに分解に関与する 10 種のプロテアーゼ遺伝子を同時に破壊した 10 重遺伝子破壊株が取得されている。

また、*A. oryzae* から異種タンパク質の高生産変異株 AUT1 が取得されている。さらに、液胞タンパク質ソーティング受容体をコードする *Aovps10* 遺伝子を破壊することにより、ウシキモシンやヒトリゾチームの生産量が増加することが知られている。

本論文は、*A. oryzae* の新たなトリペプチジルペプチダーゼ遺伝子 *AosedD* を破壊することによりウシキモシンなどの異種タンパク質生産が向上すること、また、異種タンパク質の生産能力をさらに高めた株を育種するために、高生産変異株 AUT1 において、*AosedD* と *Aovps10* との 2 重遺伝子破壊を行い、その結果について解析したものであり、3 章からなる。

第 1 章では、トリペプチジルペプチダーゼ遺伝子 *AosedD* の破壊による異種タンパク質生産への影響について検討した。DNA マイクロアレイ解析の結果に基づいて、*A. oryzae* がもつ 3 つのトリペプチジルペプチダーゼ遺伝子のうち *AosedD* がもっとも発現レベルが高いことが示された。そこで、*AosedD* 遺伝子破壊株を作製したところ、トリペプチジルペプチダーゼ活性が、野生株と比べて顕著に低下した。次に、異種タンパク質としてウシキモシンとヒトリゾチームをそれぞれ発現するプラスミドを *AosedD* 遺伝子破壊株に導入した。生産実験の結果、*AosedD* 遺伝子破壊により、ウシキモシンでは親株と比べて 2.9 倍、ヒトリゾチームで 1.7 倍の生産量が得られた。この生産量の増加の割合は、単独のプロテアーゼ遺伝子破壊のなかで最も高いことから、*AoSedD* が異種タンパク質の分解に関与するプロテアーゼのなかで最も重要なものの一つであることが示された。

第 2 章では、プロテアーゼ遺伝子多重破壊株における *AosedD* 遺伝子破壊による異種タンパク質生産への影響について検討した。すでに取得されているプロテアーゼ 10 重遺伝子破壊株において、*AosedD* 遺伝子を破壊し、ウシキモシンとヒトリゾチームをそれぞれ発現する株を作製した。*AosedD* 遺伝子を破壊した株では、親株である 10 重遺伝子破壊株と比べて、ウシキモシンでは 1.5 倍、ヒトリゾチームでは 2.0 倍の生産量が認められた。これら

の結果から、プロテアーゼ 10 重遺伝子破壊株においても、*AosedD* 遺伝子破壊が、異種タンパク質の生産能力をさらに向上させるうえで有効であることが示された。

第3章では、高生産変異株 AUT1 における *AosedD Aovps10* 2 重遺伝子破壊による異種タンパク質生産への影響について検討した。まず、高生産変異株 AUT1 において *AosedD* 遺伝子を破壊し、異種タンパク質の生産性をさらに向上させることを試みた。*AosedD* 遺伝子を破壊することにより、ウシキモシンでは AUT1 株と比べ 1.4 倍、ヒトリゾチームでは 1.9 倍まで生産量が増加した。さらに、*AosedD* と *Aovps10* との 2 重遺伝子破壊を行うことで、プロテアーゼ欠損とタンパク質ソーティング経路の改変を組み合わせた効果が得られるか検討した。その結果、ウシキモシンでは AUT1 の 1.6 倍、ヒトリゾチームでは 2.1 倍に生産量が増加した。これは、野生株に比べると約 6 倍の生産量の増加となる。

また、*Aovps10* の破壊により、培地上清のトリペプチジルペプチダーゼ活性が増加していたことから、AoVps10 がトリペプチジルペプチダーゼの細胞内輸送に関与している可能性が考えられた。2 つのトリペプチジルペプチダーゼ AoSedD と TppA をそれぞれ EGFP 融合タンパク質として発現し、*Aovps10* 遺伝子破壊株における局在解析を行った。野生株において蛍光は液胞に見られたのに対し、*Aovps10* 遺伝子破壊株においては、液胞に蛍光は観察されなくなった。この結果から、AoSedD と TppA の液胞への輸送は AoVps10 により制御されていることが示唆された。

以上、本研究は、トリペプチジルペプチダーゼ AoSedD が、*A. oryzae* が生産した異種タンパク質の分解に重要な関与をしていることを明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。