

(論文内容の要旨)

麹菌 *Aspergillus oryzae* はアミラーゼやプロテアーゼなどの多くの加水分解酵素を生産し、清酒や醤油などの醸造食品の製造に利用されている。一方、麹菌のゲノム研究が進むにつれ、麹菌は醸造用酵素以外にも様々な有用タンパク質を生産することが明らかになってきた。また、麹菌はタンパク質分泌能が高いため、タンパク質生産の宿主としても優れている。したがって、麹菌から単離した有用タンパク質の遺伝子を麹菌で過剰発現させることにより、目的タンパク質の大量生産が期待できる。しかし、休眠している遺伝子や発現量が低い遺伝子、発現に特殊な誘導操作が必要な遺伝子も多く存在する。本研究では産業上の有用性が期待されるタンパク質の遺伝子探索を麹菌で行い、数種の新規遺伝子を単離した。さらに、これらの遺伝子を麹菌で大量発現させ、目的タンパク質の機能を酵素化学および細胞生物学の手法を用いて解析した。その主な内容は以下の通りである。

1. 麹菌  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ (ARF) 遺伝子の単離とその遺伝子産物の機能解析： 麹菌の発現配列タグ (Expressed Sequence Tag, EST) ライブラリーを用い、新規な ARF 遺伝子を単離した。本遺伝子がコードする ARF は麹菌に近縁の *Aspergillus niger* の ARF とほとんど相同性を示さなかった (アミノ酸配列で 1-4%) が、耐熱性細菌 *Thermotoga maritima* の ARF とは高い相同性 (同 39%) を示した。本遺伝子を麹菌で大量発現させ、本酵素の諸性質を検討した。本酵素は 55 kDa のサブユニットからなるホモ四量体であった。その比活性は 62.4 U/mg であり、従来広く研究されてきた *Aureobasidium pullulans* 由来 ARF の比活性 (21.5 U/mg) に比べて有意に高かった。基質特異性の検討から、本酵素は  $\alpha$ -L-アラビノフラノシド結合のみを選択的に分解することが示された。本酵素は、キシラン主鎖からのアラビノース側鎖の切断など糖質研究に広く利用できることが期待された。

2. 麹菌アミノキシダーゼ (AOX) 遺伝子の単離とその遺伝子産物の機能解析： 麹菌の EST ライブラリーを用いて新規 AOX 遺伝子を単離し、麹菌で大量発現させた。その遺伝子産物は 75 kDa のサブユニットからなるホモ二量体であり、各種アミン類に対し AOX 活性を有することが示された。本酵素活性は芳香族アミンやジアミンに対して低く、直鎖状モノアミンやアセチル化アミン、ヒスタミンに対して高かった。このことから食品

中のヒスタミンやガンマーカーである尿中アセチル化ジアミンの定量への応用が期待された。本遺伝子の発現は培地へのアミン類の添加により顕著に誘導されることが示され、特別な誘導法によることなく、目的タンパク質を大量に取得することができた。

3. 麹菌フコース特異的レクチン (AOL) の機能解析とガン細胞の糖鎖バイオマーカー検出への応用： フコース含有糖鎖は生体中で様々な生理機能を持つ。肝臓ガンでは、フコースが糖鎖に  $\alpha$ -1,6結合した  $\alpha$ フェトプロテインが診断マーカーとして利用されている。AOLを大量生産し、 $\alpha$ -1,2、 $\alpha$ -1,3、 $\alpha$ -1,4、 $\alpha$ -1,6結合したフコシル基を含むピリジルアミノ化 (PA) 糖鎖へのAOLの結合性を表面プラズモン共鳴法で解析ところ、 $\alpha$ -1,6結合性フコシル化糖鎖と最も強く結合することが示された。従来  $\alpha$ -1,6結合性フコシル基の検出に用いられてきたヒドロチャワンタケレクチン (AAL) に比べて、AOLは  $\alpha$ -1,2結合性フコシル基への結合が弱く、 $\alpha$ -1,6結合性フコシル基への結合が強かった。 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (Fut8) ノックアウトマウスの組織を用いてレクチンブロットと免疫染色を行ったところ、AALはAOLに比べると、マウス胚繊維芽細胞 (MEF) や血清に含まれる $\alpha$ -1,6結合性フコシル基以外の糖鎖にも強く結合することが認められた。 $\alpha$ -1,6結合性フコシル基を標的としたバイオマーカーの検出や肝臓ガン診断において、AOLの有効性が示された。また、AOLはすでに研究用試薬としても商品化されている。

4. AOLとAALとの糖鎖特異性の解析： レクチンアフィニティークロマトグラフィーにより、113種のPA糖鎖とAOLおよびAALとの結合性を解析し、結合定数 $K_a$ を求め、AOLとAALの糖鎖特異性を比較した。両者は以下の3点で共通の特性を示した： $\alpha$ -1,6結合性フコシル化糖鎖と強く結合する；サイズの小さい糖鎖とより強く結合する；還元末端がフコシル化された糖鎖とより強く結合する。一方、AOLの $\alpha$ -1,6結合性フコシル化糖鎖に対する $K_a$ 値は、AALの $K_a$ 値に比べて3ないし6倍大きかった。また、AOLは糖鎖の還元末端の $\alpha$ -1,3結合性フコシル基に対して結合性を示さなかったのに対し、AALは結合性を示した。糖鎖に対するAOLとAALの結合特異性の違いを定量的に評価した。これらの知見から、AOLはガン診断に対し有効に応用できることが示された。

(論文審査の結果の要旨)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は多様な酵素を生産し、清酒や醤油などの醸造食品の製造に利用されている。一方、麹菌は醸造用酵素以外にも種々の有用タンパク質を生産することが明らかとなってきた。本研究は、麹菌から産業上有用性の高いタンパク質の遺伝子を探索し、目的タンパク質の大量生産法を確立するとともに、取得したタンパク質の機能を酵素化学および細胞生物学の手法を用いて解析し、さらに実用化を検討したものである。成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. 麹菌から新規のアラビノフラノシダーゼ (ARF) 遺伝子を単離し、麹菌で大量発現させた。本ARFは、耐熱性細菌のARFとアミノ酸配列において高い相同性を有していた。その酵素活性は、従来報告されているARFの活性に比べて有意に高かった。本成果は、遺伝子が発現していない有用タンパク質をも大量に取得することができることを示したものである。また、本酵素の糖質研究用ツールとしての有用性が示された。

2. 麹菌の新規アミノキシダーゼ (AOX) 遺伝子を単離し、麹菌で大量発現させた。本遺伝子の発現には培地へのアミン類添加が必要であったが、特別な誘導操作を用いることなく目的タンパク質を大量に生産することができた。本酵素は、食品中のヒスタミンやガンマーカーである尿中アセチル化ジアミンの定量分析に利用できることが示された。

3. 麹菌のフコース特異的レクチン (AOL) を大量生産した。表面プラズモン共鳴法

および  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (Fut8) ノックアウトマウスを用いて、AOLの各種糖タンパク質との相互作用を解析した。AOLの $\alpha$ -1,6結合性フコシル基に対する特異性は、従来 $\alpha$ -1,6結合性フコシル基の検出に利用されてきたヒドロチャワンタケレクチン (AAL) の特異性よりも著しく高いことが示された。AOLはすでに研究用試薬として商品化されており、麴菌の新規機能開発に成功したものだといえる。

4. レクチンアフィニティークロマトグラフィーにより、113種の糖鎖とAOLおよびAALとの結合を解析し、糖鎖特異性を検討した。AOLの $\alpha$ -1,6結合性フコシル基に対する結合性は、AALのそれに比べて著しく高かった。一方、AALは $\alpha$ -1,3結合性フコシル基とも強く結合したが、AOLは結合しなかった。以上の結果から、AOLはAALに比較して、 $\alpha$ -1,6結合性フコシル基に対して高い特異性を有することが明らかになり、AOLが肝臓がんの高感度診断に利用できることが示された。

以上のように本論文は、遺伝子源としての麴菌に着目し、そのゲノム情報を用いて種々の酵素やタンパク質の遺伝子を単離し、目的タンパク質の大量調製法を確立したものである。さらに、これらのタンパク質の機能を実用性の観点から解析したものであり、酵素化学、細胞生物学および応用微生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成21年5月15日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。