

氏 名	いし だ ひろ き 石 田 博 樹
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2437 号
学位授与の日付	平 成 14 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Studies on the Glucoamylase-encoding Gene Expressed in Solid-state Culture of <i>Aspergillus oryzae</i> . (固体培養で発現する麹菌グルコアミラーゼ遺伝子に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 熊 谷 英 彦 教 授 村 田 幸 作 教 授 加 藤 暢 夫

論 文 内 容 の 要 旨

黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、清酒醸造などわが国の伝統的発酵産業において広く利用されている糸状菌である。清酒の製造に際しては、蒸し米に *A. oryzae* を繁殖させた「麹」と呼ばれる固体培養物を利用する。清酒醸造において最も重要な酵素であるグルコアミラーゼ (GA) は、麹培養では大量に生産されるが、液体培養においてはほとんど生産されない。著者は、*A. oryzae* が固体培養で GA を高生産する機構を分子レベルで解析した。また、実用生産に有利な液体培養で GA を高生産する麹菌株を育種した。その内容は以下のように要約できる。

1) 固体培養特異的に発現するグルコアミラーゼ遺伝子 *glaB* の発見

A. oryzae が液体培養または固体培養で生産する GA を、それぞれ別々に精製し、性質を比較した。その結果、糖含量、分子量、生デンプン吸着性、基質特異性などに大きな差異を認めた。両酵素の部分アミノ酸配列を基に遺伝子を検索したところ、液体培養型 GA には既知の *glaA* を、また、固体培養型 GA には新規な遺伝子を見出した。

固体培養型 GA の遺伝子 *glaB* をクローニングし、*glaB* は、生デンプン吸着ドメインをコードしない新しいタイプの GA 遺伝子であることを明らかにした。この *glaB* を *A. oryzae* に導入した形質転換体において、固体培養で顕著な GA 活性の増加を認めた。また、ノザン解析により、*glaA* は液体培養、固体培養ともにほぼ同量発現するのに対し、*glaB* は、固体培養特異的に大量に発現することを示した。

2) *glaB* の発現条件の検討と *cis* 因子の同定

glaB の 5'-非翻訳領域下流にレポーター遺伝子 GUS を連結し、固体培養における *glaB* の発現誘導因子について検討した。その結果、*glaB* の発現はデンプンにより誘導されるが、それだけでは固体培養レベルの発現に至らず、他の環境因子、すなわち低水分活性、高培養温度、菌糸伸長障害によって誘導されることを明らかにした。さらに、基本培地による培養で菌体を得、それをさらに誘導培養することにより、100倍以上の GUS 発現量の増加を認めた。

このような環境因子に応答する *cis* 因子を同定するために、*glaB* の 5'-非翻訳領域 1.1 kb の各種欠失変異体を作製した。そして、-350から-324領域の欠失が、*glaB* の固体培養高発現能を完全に喪失させることを明らかにした。さらに、この中の *cis* 因子を同定するため、因子と推測される配列を塩基置換した変異体を作成し、それらの固体培養を行った。その結果、*glaB* の固体培養での高発現には、-349から-345領域の熱ショック因子と-335から-324の GC-rich 配列が必須であり、特に GC-rich 配列が誘導発現の *cis* 因子であることを明らかにした。

3) *melO* エンハンサーを利用したグルコアミラーゼの高生産

従来、固体培養で GA を高生産する変異株は、高チロシナーゼ活性を示し、麹を褐変させることが知られていた。そこで、著者は、GA とチロシナーゼの発現調節機構を、レポーターアッセイにより検討した。その結果、固体培養でのチロシナーゼ生産に関わるのは新規なチロシナーゼ遺伝子 *melB* であり、既知のチロシナーゼ遺伝子 *melO* は液体培養特異的に発現する遺伝子であることを明らかにした。しかし、*melO* のエンハンサー活性は、麹菌での工業用組み換え酵素生産に通常利用されるアミラーゼ系のエンハンサーの約 4 倍の強さを示すことも同時に見出した。そこで *melO* エンハンサー支配下で

glaB の液体培養での発現を試み、最終的に培養液中の生産物純度はほぼ99%、3.3 g/L の GA 生産に成功した。

論文審査の結果の要旨

わが国や東南アジア諸国の醸造産業においては、穀物に糸状菌を固体培養した「麹」を、デンプンやタンパク質の高分解活性を示す酵素源として伝統的に用いてきた。しかしながら、このような高い酵素活性が麹で得られる分子生物学的機構については、全く明かではなかった。本論文において、著者は、清酒醸造において最も重要な酵素であるグルコアミラーゼ (GA) が、黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の固体培養で大量に生産されることに着目し、固体培養特異的 GA の性質の解明、その遺伝子のクローニング、さらにその発現調節機構の解析を行った。また、これらの知見を利用して、黄麹菌によるタンパク質の大量分泌発現系の開発にも成功した。その評価すべき主な点は以下のとおりである。

1) 麹菌の液体培養、固体培養から GA をそれぞれ精製し、性質を比較した。その結果、両酵素は異なる酵素であることが判明し、固体培養特異的に発現する GA の存在を初めて示した。さらに、その遺伝子を検索し、固体培養の GA をコードする新規な遺伝子 *glaB* を見出した。*glaB* は、麹菌の固体培養で特異的に誘導発現する初めての遺伝子であった。

2) *glaB* の固体培養での高発現に関わる環境因子を GUS レポーターアッセイにより検討し、*glaB* は、デンプン以外に、低水分活性、高温、菌糸伸長障害などによっても誘導されることを明らかにした。また、これらの環境因子に応答する *cis* 因子として、-335 から -324 bp に存在する GC-rich なモチーフを同定した。以上の研究結果は、固体培養特異的な発現調節機構の分子レベルでのさらに詳しい解析を行っていく上で、基盤となる重要な知見である。

3) GA 高生産変異株が有する褐変性の解析から、既知のチロシナーゼ遺伝子 *melO* が液体培養で強力に発現することを明らかにした。*melO* エンハンサー支配下で *glaB* 遺伝子を高発現させ、GA を良好に菌体外へ分泌生産する菌株を作成した。その GA 分泌生産量は 3.3 g/L に達し、培養液中のタンパク質純度も 99% を示した。この系は他の酵素の生産にも応用が可能であり、麹菌における高純度かつ高生産の新規なタンパク質生産系を確立することに成功した。

以上のように、本論文は、清酒麹の GA について、性質の解明、遺伝子のクローニング、発現調節機構の解析、大量発現系の構築を行ったものであり、分子生物学、発酵醸造学および酵素生産の実際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14年6月13日、論文並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。