

氏名（本籍）	高木 忍
学位の種類	博 士（生命農学）
学位記番号	博 甲 第 10039 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査学術院	理工情報生命学術院
学位論文題目	遺伝子組換え真核微生物による酵素生産技術の開発

主査	筑波大学教授	博士（農学）	高谷 直樹
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	竹下 典男
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	萩原 大祐
副査	筑波大学助教	博士（農学）	梶尾 俊介

## 論 文 の 要 旨

世界の産業用酵素の市場は現在推定46億米ドルであり、更なる成長が見込まれている。現在の産業用酵素の半数以上は遺伝子組換え酵素となっているが、この開発には微生物の遺伝子組換え技術が大きく貢献している。遺伝子組換え酵素の生産性は宿主となる微生物によって大きく異なることから、新たな遺伝子組換え酵素の実用化のためには、真核微生物も含めた生産宿主の検討と生産方法の開発が重要である。本論文では、真核微生物を用いた産業用酵素の新たな生産技術の開発とこの技術の活用のための新たな手法について論じた。

第一章で著者は、遺伝子組換え酵素の宿主の安全性に着目し、安全性が高い真核微生物である *Aspergillus* 属を対象として遺伝子組換え酵素の生産用の新たな宿主を探索した。その結果、*A. japonicus*、*A. aculeatus* および *A. foetidus* の3種が、現在広く利用される *A. oryzae* と匹敵する酵素生産能を有することを見出した。また、培養条件によっては *A. oryzae* よりも高い生産性を示すことも明らかになった。これらの結果は、既存の宿主の近縁種の探索によって、従来とは異なる性質を持つ有用宿主が開発できることを示すものである。

第二章で著者は、我が国において遺伝子組換え酵素の安全性審査に重要な外来遺伝子の染色体への挿入部位周辺の塩基配列情報を得るための新たな手法を開発した。具体的には、次世代シーケンサーを用いた新たな解析手法であるリンキング・リード法を用いて、*A. oryzae* の染色体にランダムに挿入された多コピーの外来遺伝子に対して、その染色体上への挿入部位の塩基配列情報を簡便に取得する技術を開発した。この技術を用い、食品用酵素の実生産に用いられる2株の遺伝子組換え *A. oryzae* の外来遺伝子の染色体への挿入部位を同定することにも成功した。

第三章で著者は、産業用の遺伝子組換え酵素の生産性の向上、実用性の向上、安全性の向上の各課題の解決策を取り上げ、これらの解決に資する研究成果について論じた。第一に、転写因子とその認識部位に着目したメタノール資化性酵母の改良に関する実用性を旨とした研究成果を示した。具体的には、正の転写因子である KpTRM1 の構成的な発現、*DAS1* 遺伝子プロモーター上で転写を負に制御する URS 領域の削除と転写を正に制御する UAS<sub>DAS1</sub> 領域の増幅によって、遺伝子発現の誘導剤であるメタノールを用いずに *DAS1* 遺伝子プロモーターの転写活性を40%増加させることに成功した。メタノール資化性酵母を用いた遺伝子組換え酵素の工業生産においては、特に欧州において、遺伝子発現の誘導剤として可燃性のメタノールを使用する点が解決課題となっていることから、本成果は、メタノール資化性酵母を宿主とした遺伝子組換え酵素の工業生産の新たな手法として有用である。第二に著者は、*A. niger* を宿主とした遺伝子組換え酵素の実生産菌株のプロテオ-

ム解析を行い、遺伝子組換え酵素の高生産の機構を解明した。即ち、遺伝子組換え酵素を生産する細胞内では、解糖系などの糖代謝が抑制されること、タンパク質の折り畳みに関わるタンパク質やシグナル伝達に働くと予想される機能未知タンパク質が高生産されることを見出した。また、高生産させた遺伝子組換え分泌酵素が、細胞外に分泌されずに細胞内に蓄積され、分解されることを発見した。これは、細胞外への分泌が遺伝子組換え酵素の高生産のための律速段階の一つであり、この改善によって当該酵素の生産を増加できる可能性を示すものである。

以上、本論文は、真核微生物による遺伝子組換え酵素の生産に関する新たな技術を開発するとともに、得られた知見をもとにした現在の産業用酵素の生産の課題を明らかにしたものである。著者が提唱する学説は、今後、新たな産業用酵素の生産技術の開発に繋がるものであり、バイオエコノミー社会の構築に貢献するものとして重要である。

## 審 査 の 要 旨

本論文は、産業用酵素の生産に利用可能な新たな糸状菌宿主の開発、外来遺伝子の染色体上での導入部位の決定方法の開発の研究成果を論じたものである。主に、安全性が高く実生産においても重要である *Aspergillus* 属の糸状菌を対象とした研究は先駆的であり、国内外の産業用酵素の開発研究をリードするものである。また、この研究成果によって開発された複数の加水分解酵素が、市販され、日常生活において広く利用されるに至った点は、本論文が基礎・応用微生物学の学問分野において極めて優れていることを示す。本論文の研究成果によって他の遺伝子組換え酵素の国内での許認可件数の増加が導かれたことは、本論文の応用上の波及効果が大きいことを示すものである。さらに、糸状菌と酵母を宿主とした効率的な分泌生産のために、それらの遺伝子発現系の開発の成果を得た点も学術的価値が高い。糸状菌を活用した産業用酵素の生産を高度化するための技術には未開発な部分が多いが、著者はこの開発研究の要点を安全性、生産性、実用性の3つの観点から明瞭に整理した。これは、関連研究者の今後の開発研究の発展に大きく貢献すると判断できる。

令和3年 1月21日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生命農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。