

遺伝子組換え真核微生物による酵素生産技術の開発

2021年1月

高木 忍

遺伝子組換え真核微生物による酵素生産技術の開発

筑波大学大学院
理工情報生命学術院
生命地球科学研究群
生命農学学位プログラム
博士(生命農学)学位論文

高木 忍

目次

略語		3
序章	序論	4
	1. 宿主の選択	4
	2. 安全性審査と生産菌の構築	5
	3. 生産技術開発	5
	4. 基礎的研究	6
	5. 本研究の目的および構成	6
第一章	新しい糸状菌宿主の探索	8
	1-1. 序論	8
	1-2. 材料と方法	8
	1-2-1. 使用菌株	8
	1-2-2. 使用プラスミド	9
	1-2-3. 形質転換法	9
	1-2-4. 酵素生産性評価	9
	1-2-5. 酵素活性測定法	10
	1-2-6. サザンブロット解析	10
	1-2-7. BLAST 検索と系統樹	10
	1-3. 結果	10
	1-3-1. 形質転換試験	11
	1-3-2. 酵素生産性試験	11
	1-3-3. アミラーゼ活性とハイブリダイゼーション試験	12
	1-3-4. AmyR とタカアミラーゼのオルソログ	13
	1-4. 考察	13
第二章	食品用酵素の安全性評価に関わる技術と得られた知見	24
	2-1. 序論	24
	2-2. 材料と方法	25
	2-2-1. 使用菌株	25
	2-2-2. ゲノム配列の解読とマッピング	25
	2-2-3. 挿入位置の確認と挿入断片の構造解析	26
	2-3. 結果	26
	2-3-1. ゲノム配列解析法の検討	26
	2-3-2. アスパラギナーゼ生産菌の場合	27
	2-3-3. キシラナーゼ生産菌の場合	27
	2-4. 考察	28
第三章	生産技術の開発と基礎的研究	36
	3-1. 序論	36
	3-2. 転写因子を利用した発現系の改良	42
	3-2-1. 序論	42
	3-2-2. 材料と方法	43
	3-2-2-1. 使用菌株とプラスミド	43
	3-2-2-2. 培養条件	43
	3-2-2-3. 転写因子のクローニングと改変	43
	3-2-2-4. UAS/URS の同定とプロモーターの改変	44
	3-2-3. 結果	44

3-2-3-1. 正の転写因子 KpTRM1 のクローニング	44
3-2-3-2. <i>DASI</i> プロモーターに対する効果	44
3-2-3-3. <i>DASI</i> プロモーターの UAS の探索	45
3-2-4. 考察	45
3-3. 酵素を生産している糸状菌のプロテオーム解析	55
3-3-1. 序論	55
3-3-2. 材料と方法	56
3-3-2-1. 使用菌株と解析用サンプル	56
3-3-2-2. 細胞抽出液の作製と二次元電気泳動	56
3-3-2-3. スポットの定量的解析	56
3-3-3. 結果	57
3-3-3-1. 検出されたタンパク質	57
3-3-3-2. 酵素生産株と非生産株の比較	57
3-3-3-3. 分泌タンパク質の菌体内蓄積と分解	58
3-3-4. 考察	58
総括	64
謝辞	66
参考資料	67

略語

AMFEP	Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products
AOD	Alcohol oxidase
AOX	Alcohol oxidase
AspDB	<i>Aspergillus</i> Genome Database
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAT	Catalase
CDS	Coding sequence
CSAP	Conserved Small Abundant Protein
DAS	Dihydroxyacetone synthase
EFSA	European Food Safety Authority
ERAD	ER-associated protein degradation
FDA	Food and Drug Administration
GAP	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HLL	<i>Humicola lanuginosa</i> lipase
ITS	Internal transcribed spacer
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives
JGI	Joint Genome Institute
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NGS	Next generation sequencer
NHEJ	Non-homologous end-joining
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylene glycol
PDI	Protein disulfide isomerase
pNPB	p-nitrophenyl butyrate
RESS	Repression under secretion stress
SOD	Superoxide dismutase
SRP	Signal recognition particle
TCTP	Translationally Controlled Tumor Protein
TEF	Translation elongation factor
UAS	Upstream Activation Sequence
UPR	Unfolded protein response
URS	Upstream Repression Sequence

序章

序論

産業用酵素は一般的に認識されることは少ないが、実は身近なところで多く利用されている。例えば、かつては家庭用合成洗剤のビルダーとして有機リンが用いられていたが、環境汚染が懸念されるようになり、今は代わりにプロテアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、リパーゼなどの酵素が用いられている。また、食品製造での応用は歴史が古く、紀元前より行われるチーズ製造には仔牛由来レンネット(キモシン)が用いられ、日本の伝統食品の製造に用いられる麴にはアミラーゼやプロテアーゼをはじめとする多くの酵素が含まれる。現在は、ワイン・ジュースや異性化糖などの食品の製造に用いられる酵素に加えて、パンの日持ちを良くする酵素や、健康への影響が懸念される食品中のアクリルアミドやトランス酸を低減させる酵素など、環境や健康を志向した酵素の応用が増えている。この他、皮・繊維加工、紙・パルプ産業、飼料添加物など様々な分野で産業用酵素が利用されている (1)。近年はバイオエタノールを始めとするバイオ燃料用酵素の市場が伸び、今後は汚泥などの廃棄物の減量や資源の再利用に役立つ酵素など循環型社会の建設に向けた応用分野での広がりが期待される。

生体触媒と呼ばれる酵素は再生可能であるほか、穏和な条件で反応することから、地球温暖化ガスの排出量を削減できる環境にやさしいサステナブルな触媒として認知されている。1980年に約2億米ドルだった産業用酵素の世界市場は2018年には推定55億米ドル(約5700億円)となり、2023年には約70億米ドルへの成長が見込まれているが(2)、これらの酵素産業の成長には遺伝子組換え技術が大きく貢献している(3)。すなわち1980年代に遺伝子組換え技術を利用した酵素生産が始まって以来、産業用酵素の製造並びに製品開発は格段に効率化された。AMFEPのリスト(4)によれば、現在240以上の酵素が上市されており、そのうち半数以上が遺伝子組換え微生物によって製造されている。一方、現在用いられている宿主のタンパク質生産性は対象により数mg/Lから10g/L以上と様々で、高い生産性が得られず製品化に至らない酵素も多数存在する。今後、バイオエコノミー社会の実現を目指して益々新しい有用酵素を市場に出すためには、生産技術をさらに向上させることが重要である。

1. 宿主の選択

遺伝子組換え微生物を利用した酵素生産技術の開発は、宿主の選択から始まる。宿主として用いられる微生物には高いタンパク質生産能が要求されるが、それ以前に産業利用のための安全性が求められる。現在、産業用酵素の生産に用いられる主な微生物は、*Bacillus*

属細菌や *Saccharomyces*、*Kluyveromyces*、*Pichia* 属などに分類される酵母，そして *Aspergillus* 属、*Trichoderma* 属 などの糸状菌である。いずれも安全に産業利用されている歴史があり、多くのタンパク質を分泌生産する能力がある。

1980 年代、糸状菌では *Aspergillus niger* (5)、*Aspergillus oryzae* (6)、*Trichoderma reeseii* (7) を宿主とした異種タンパク質生産技術が確立され、様々なタンパク質の発現生産が試みられたが、生産性は必ずしも高くはなかった。一般に同種由来のタンパク質は高い生産性が得られるのに対し、異種タンパク質の生産性は低い傾向がみられた (8,9)。その理由は、宿主が生成する有機酸などの代謝産物によってタンパク質が不安定化される (10)、あるいは宿主のプロテアーゼ活性により生成したタンパク質が分解される (11) 等が考えられるが、その実態や詳細は明らかではない。従って、プロテアーゼ活性や有機酸の生成など代謝が異なる別種の菌を宿主として用意しておくことには意義がある。バイオ医薬として用いられる抗体などのタンパク質の場合、翻訳後修飾としてヒト型糖鎖の付加を必要とするものもある。その場合は、生産させるタンパク質に糖鎖を付加できる真核生物を宿主として用い、且つヒト型糖鎖を付加できるように改変する必要があるが、産業用酵素では、このような要求はみられない。

2. 安全性審査と生産菌の構築

産業用酵素のうち、特に食品製造に用いられる食品用酵素や飼料用酵素は、食品添加物あるいは飼料添加物として各国政府・地域機関によって規制を受ける。通常、上市前に安全性の審査が行われるが、安全性審査の基準や考え方は国や地域によって異なっている (12)。食品添加物の安全性評価については、国連機関の WHO が比較的早い時期に安全性審査の原理を確立し、現在は FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議「Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA)」により安全性審査が行われる。この考え方が踏襲されている国や地域もあるが、欧州や米国、日本では独自の基準を定めて規制を行っている。我が国では、特に遺伝子組換え技術を用いて製造される食品用酵素について独自の安全性の基準が設けられ、厳しい安全性審査が行なわれているが、安全性確保の考え方や審査基準が諸外国と異なるため、国外ですでに認可され流通していても、国内では審査に時間を有し認可が遅れる事例が数多く生じ、海外から原料を輸入する国内メーカーに混乱をもたらした。類似の例としては、抗生物質耐性遺伝子の利用が挙げられる。欧州連合は、製造工程での抗生物質の使用や生産菌の構築に用いられる抗生物質耐性遺伝子の利用について強い懸念を示しており、他の国や地域よりも厳しい規制を設けている。欧州市場を目指した製品開発の際は、この点に配慮する必要がある。

3. 生産技術開発

新しい生産技術を産業利用するためには、国・地域の規制や宗教対応など様々な点を考慮する必要がある。すなわち、産業で用いる技術は安全で実用的かつ生産的でなければならない。

遺伝子組換え技術を利用した酵素生産技術の開発の着眼点については、いくつかの研究グループがまとめているが、酵素の生産性を上げるために重要な項目としては、まず酵素遺伝子の転写・翻訳と菌体外酵素の場合は分泌の効率を上げること、そして生成された酵素の分解を抑えることが挙げられる (13)。転写効率を上げるには、例えば、強力なプロモーターを利用する、遺伝子のコピー数を上げるなどの方法があり、翻訳効率を向上させるには、遺伝子の使用コドンが宿主の使用頻度に合うよう最適化する手法があるが、分泌の効率を向上させる技術については未だ十分な研究がなされていない。分解を抑えるためには、前述のように宿主のプロテアーゼ活性を遺伝子破壊などで不活化するほか、prtT のように複数の菌体外プロテアーゼを制御する転写因子を利用して複数のプロテアーゼ活性を一度に抑える方法 (14) などがある。このほか、培養条件の最適化も生産性向上に有用である。

実用的な技術の例としては、例えば規制される技術や原料を用いない技術のほか、好ましくないタンパク質や有機酸などの副生成物を除去する技術、生産菌の構築を簡略化する技術など、製造や製品開発にかかるコストの削減につながる技術が含まれる。

4. 基礎的研究

酵素の生産技術は常に向上が期待されるが、新たな技術を開発するためには酵素生産をしている細胞の生体活動をよく把握する必要がある。できれば分子レベルで把握するのが望ましく、そのための基礎的研究が重要である。例えば、酵素を高生産する生産菌の解析や、酵素生産中の生体内活動の解析がなされている。長年育種されてきた歴代の生産菌について比較ゲノム解析が行われ、生産性の向上とともに目的の酵素遺伝子を含む領域約 216 kb が最大約 8 コピーまで増幅していることが見出された (15)。生産菌染色体の変異解析による有用な突然変異の同定の試みとしては、Niu ら (2016) が、酸生成能の低下した *A. niger* 変異株で二次代謝産物の生合成に関与するといわれる *laeA* 遺伝子に点変異が生じていることを見出した (16)。生体内活動の解析では、転写解析やプロテオーム解析、メタボローム解析などが行われている。遺伝子の転写や翻訳などは知見が豊富で、効率化のための技術が確立している。一方で、分泌や細胞内でのタンパク質の分解、代謝の動態、形態の変化など、未

だ制御するための技術が確立できていない分野が多数存在する。これらの分野については、今後の基礎研究に期待するところが大きい。新たな知見は新たな技術開発の可能性につながる。

4. 本研究の目的および構成

本研究では、30年の歴史を持ち、今後もさらなる利用が期待される遺伝子組換え微生物を用いた産業用酵素の生産技術のうち、特に真核微生物を用いた技術について、技術開発を行う上で重要となる要素や留意点を考察し、検証することにより、今後の開発に役立てることを目的とした。具体的には、第一章で、新たな宿主を選ぶ際は安全性が重要であるという観点から、安全とみなされる *Aspergillus* 属菌から新規宿主候補の探索を行い、すでに用いられている宿主の近縁種からも従来とは異なる性質を持つ新たな宿主が得られることを示した。また、第二章では製品上市前の安全性審査の基準が国や地域で異なることを示し、わが国で特異的に要求される挿入された外来遺伝子の周辺配列情報を取得する技術の開発を試み、成功した。この際、染色体の組換えによって当該情報の取得が難しくなる例も見られたことから、従来とは異なる生産菌の構築法が望ましいことも示した。さらに第三章では、生産技術の開発における重要要素と着眼点をまとめ、技術開発の目的が生産性の向上、実用性の向上と安全性の強化の3項目に分けられることを示した。具体例としては、転写因子やプロモーターの改良によって、可燃性のメタノールを必要としないメタノール資化性酵母による新たな発現系の開発が可能であることを示した。また、さらなる生産性の向上を図るには基礎的研究により知見を増やすのが重要であることから、酵素生産中の糸状菌のプロテオーム解析を行い、現在の酵素生産の問題点を見出し今後の生産性向上のための改善点を示したほか、酵素生産時に増加する新奇の機能未知因子を発見した。これらの知見は、中長期的視点から、新たな遺伝子組換え酵素の生産技術の開発につながるものとして重要である。

本研究を総括し、産業用酵素の生産技術開発に重要な項目は、生産菌ならびに製品の安全性と生産コストを左右する生産性、規制など実用面での対応や製品開発コストを低減させる実用性の三点を挙げるに至った。さらに、遺伝子組換え酵素の生産菌の構築の際は、安全性審査など製品化のための規制を鑑みた構築法を選ぶことが重要であることと、さらなる生産性の向上のためには、生産菌の基礎的解析が重要であることを示した。これらの知見は、今後の産業用酵素生産技術の発展に貢献できると期待される。

第1章 新しい糸状菌宿主の探索

1-1. 序論

現在、AMFEP のリスト (2015) には 243 の産業用酵素が載っているが、それによれば約半数が遺伝子組換え技術を用いて生産され、その約半数が真核微生物、とくに糸状菌を宿主として生産されている (17)。もっともよく用いられる糸状菌の宿主は、*Aspergillus niger*、*Aspergillus oryzae*、*Trichoderma reeseii* の 3 種 (18) であるが、なかでも清酒や焼酎、味噌・醤油など日本古来の醸造に用いられる麹菌 *A. oryzae*、*A. niger*、*A. sojae* は、アミラーゼやプロテアーゼなど多くの酵素を麹中に分泌生産する能力があることと、700 年以上に渡り我が国で食品製造に用いられてきた歴史を有し安全な微生物とみなされることから、酵素生産の宿主として早くから注目された (19)。これらを用いた遺伝子組換え酵素生産技術が 1980 年代に開発され、多くの酵素やタンパク質遺伝子の発現が試みられてきたが、その生産性は様々であった (20)。その原因はタンパク質の安定性が良くない、あるいは分泌されにくいなどタンパク質側に要因がある場合もあれば、宿主のプロテアーゼによる分解や有機酸生成に伴う pH 低下による分解 (10) など、宿主側に原因がある場合もある。このため、プロテアーゼ活性が低い、あるいは有機酸生成など代謝の異なる宿主を用いることにより高い生産性が得られる可能性がある。そこで、本章では、産業利用性の高い *Aspergillus* 属菌の近縁種から新しい宿主の探索を行った (21)。

Aspergillus 属菌の中には、アフラトキシン、オクラトキシン、フモニシンなど有害な二次代謝産物を生産する種が存在する (18)。宿主選択の基準として、有害な二次代謝産物を生産しないこと、タンパク質生産能が高いこと、生産されたタンパク質を分解するプロテアーゼ活性が低いことの 3 点を選んだ。まず、*Aspergillus* 属と近縁の 163 種から、これまでに有害物質を生産すると報告されていない、またはすでに食品、食品添加物の製造や有機酸製造など産業利用の実績がある種を選別し、これらについてプロテアーゼ活性とタンパク質生産能を評価した。その結果、プロテアーゼ活性が低く、タンパク質生産能が比較的高いとみられる候補種が数種得られ、これらについて形質転換能と異種タンパク質生産能を検討した。

1-2. 材料および方法

1-2-1. 使用菌株

A. foetidus, *A. phoenicis*, *A. aculeatus*, *A. japonicus* の 4 種に属する 12 株 (表 1-1) に

ついて評価試験を行った。生育にはポテトデキストロース寒天培地(PDA)または Czapek-Dox 寒天培地 (CDA)を用い、30-34°Cで1週間培養した。液体培養は YPG 培地(4 g/L Yeast extract, 1 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄/7H₂O, 5 g/L glucose, pH 6.0)を用い、30-34°Cで 3-5 日間振とう培養した。

1-2-2. 使用プラスミド

形質転換の選択マーカーとしては、*A. nidulans* 由来の acetamidase 遺伝子 *amdS* (22) を保持するプラスミド pToC90、pToC186、または *E. coli* 由来のハイグロマイシン B 耐性遺伝子である *hph* (hygromycin B phosphotransferase)(23) を有する pJaL77、pJaL154 を用いた (21)。異種タンパク質の発現試験には *Humicola lanuginosa* (*Thermomyces lanuginosus*) のリパーゼ遺伝子 *HLL* の発現プラスミド pHLL (pMHan37) (24) を使用した。発現プラスミドは *A. oryzae* 由来の タカアミラーゼプロモーターと *A. niger* 由来のグルコアミラーゼ AMG ターミネーターの間に目的の *HLL* 遺伝子が挿入されている(21)。

1-2-3. 形質転換法

形質転換は *A. oryzae* の方法(6)に準じ、プロトプラスト法で行った。宿主候補株の胞子を YPG 培地に植菌し、80-120rpm で 30°C、1~2 日間振とう培養し、得られた菌体から Yelton ら(1984)(25) または Balance ら(1985)(26) の方法でプロトプラストを調製した。溶菌酵素は Novozyme® 234 (SP234, Novozymes A/S) を用いた。得られたプロトプラストを 1-4x 10⁷/ml に調製し、調製液 100 μl に対して選択マーカープラスミドと発現プラスミドを合わせて 10 μg を加え、PEG/Ca²⁺ の存在下で形質転換を行った。形質転換後のプロトプラスト再生には 1M sucrose を含む最少培地 (6) を用い、*amdS* の選択培地としては 10 mM acetamide と 15 mM CsCl を含む COVE-A、*hph* の選択培地としては 10 mM urea, 300 mg/L Hygromycin B を含む COVE-HygB を用いた。

1-2-4. 酵素生産性評価

得られた形質転換体は酵素生産用の M400Da 培地(マルトデキストリン 50 g、MgSO₄.7H₂O 2 g、KH₂PO₄ 2 g、K₂SO₄ 3 g、クエン酸 4 g、酵母エキス 8 g、硫酸アンモニウム 3 g、微量金属液 0.5 ml、50 % 尿素(別滅菌)4 ml、水 1L、pH 6.0)、ASP-M 培地 (マルトデキストリン 50 g、マルトース 50 g、MgSO₄.7H₂O 1 g、KH₂PO₄ 10 g、クエン酸 1 g、酵母エキス 2 g、硫酸アンモニウム 5 g、微量金属液 0.5 ml、50% 尿素(別滅菌)10 ml、水1

L, pH 7.0)、または MB-5Da 培地 (マルトデキストリン 130 g、MgSO₄·7H₂O 3 g、KH₂PO₄ 5 g、K₂SO₄ 6 g、クエン酸 4 g、酵母エキス 5 g、硝酸ナトリウム 3 g、微量金属液 0.5 ml、50 % 尿素(別滅菌) 20 ml、水 1L, pH 4.5) で、30°C、5 日間フラスコで振とう培養し、培養液上清中の酵素活性を測定した。

1-2-5. 酵素活性測定法

プロテアーゼ活性は、スキムミルク 20 g/L、寒天 20 g/L、0.2 M クエン酸—リン酸緩衝液(pH 5 または pH 7)を含むカゼイン寒天平板を作製し、穿孔後培養上清25 μLを添加後、37°Cで一晩反応させ、得られるハローの大きさで測定した。

リパーゼ活性は、精製したリパーゼに対して調製した抗体を利用した平板免疫拡散法 (Mancini法) (27)、または *p*-nitrophenyl butyrate (pNPB) を基質として用いる発色法 (21) で測定した。

アミラーゼ活性は、AZCL-amylose (Megazyme Ltd.) を寒天培地または寒天平板に混釈し、菌の生育あるいは培養上清の添加による青色ハローの形成により測定した。

1-2-6. サザンブロット解析

サザンブロット解析はCold Spring Harborによる実験書 (119) に従って行った。すなわち、試験菌株の染色体DNAを制限酵素で消化し、0.7%アガロースゲルで電気泳動を行い、終了後ゲル上のDNAを酸とアルカリで変性させたのち、ニトロセルロース膜に転写、ハイブリダイゼーション試験に供した。プローブは³²Pでラベリングし、ハイブリダイゼーションはストリンジエントな条件で行った。

1-2-7. BLAST 検索と系統樹作成

BLAST 検索は JGI の Genome portal (JGI Genome Portal - Home (doe.gov))から *A. japonicus* CBS114.51 と *A. aculeatus* ATCC16872 のゲノムデータベースを得て、これらを用いて行った。検索に用いた配列は、*A. oryzae* のタカアミラーゼ遺伝子 (GenBank: D00434.1) と *amyR* (GenBank: AJ005258.1) を利用した。相同性の評価には、DDBJ の ClustalW (Help Version 2.1 (Latest version) 1.83 (Modified by Dr. Kirill Kryukov) または GenomeNet (<https://www.genome.jp/>) の ClustalW を用いた。

1-3. 結果

1-3-1. 形質転換試験

Aspergillus 属と近縁の 163 種について、有害性や毒素生産性に関する報告や食品または食品添加物の製造、あるいは有機酸製造など産業利用の経験の有無について調査し、表 1-2 に示した 9 種を含む数種が選ばれた(21)。これらの種に属する複数株を液体培養し、培養液中のプロテアーゼ活性をカゼイン平板法で測定したところ、*A. sojae*、*A. tamarii*、*A. candidus*、*A. terreus* に属する株はいずれも高いプロテアーゼ活性を示し、生成タンパク質を分解することが予測された。このため、これらの種と生育が比較的遅かった *A. melleus* を除外し、*A. foetidus*、*A. phoenicis*、*A. aculeatus*、*A. japonicus* の 4 種を対象として形質転換能と異種タンパク質生産能について評価した。

選抜した 4 種 12 菌株の形質転換能を評価した。プロトプラストの調製は 1.2 M $MgSO_4$ /10mM sodium phosphate を用いる Yelton らの方法 (25)、または 0.6 M KCl を用いる Balance らの方法 (26) で行った。興味深いことに、今回評価した *A. aculeatus*、*A. japonicus*、*A. foetidus* では、*A. oryzae* で用いられる Yelton らの方法よりも、Balance らの方法を用いた方が高いプロトプラスト収量が得られる傾向にあった(表 1-3)。また、*A. japonicus* ではプロトプラストが *A. oryzae* よりも小さく壊れやすい傾向がみられたほか、*A. foetidus* や *A. phoenicis* では用いた溶菌酵素によるプロトプラスト化の効率が悪く、酵素使用量を通常の 2 倍に増やし高めの温度で反応を行ったが、*A. phoenicis* では状況があまり改善されなかったことから、組換え酵素の生産の宿主としての適性が低いと判断した。

選択マーカーとしては *amdS* またはハイグロマイシン B 耐性遺伝子 *hph* を試した。各々の選択培地における宿主候補株の生育を調べたところ、*A. japonicus* と *A. aculeatus* はアセトアミドを唯一の窒素源とする *amdS* の選択培地ではほぼ生育しなかったのに対し、*A. foetidus* では明らかな生育 (background growth) がみられた(表 1-4)。これに対し、ハイグロマイシン B の選択培地ではいずれの候補株でも生育がみられなかった。選択マーカー遺伝子をもつ選択プラスミドのみを用いて形質転換能を調べたところ、いずれの菌も *amdS*、*hph* を用いた場合に形質転換体が得られたが、background growth の低かった *hph* の方が高い形質転換効率を得られる傾向にあった。

1-3-2. 酵素生産性試験

糸状菌由来のリパーゼ遺伝子 *HLL* を用いて、これらの宿主候補株の異種タンパク質生産能を評価した。リパーゼ遺伝子の発現は *A. oryzae* のタカアミラーゼ遺伝子のタカプロモーターを利用し、形質転換には発現プラスミドと選択マーカープラスミドの 2 種類を混合し、同時に導入する共形質転換 (co-transformation) を用いた。

得られた形質転換体は選択培地を用いて純粋分離したのち、酵素生産培地を用いてフラスコ培養し、リパーゼの生産性を評価した。まず、デキストリンを炭素源とする M400Da 培地 (pH6.0) を用い 30°C または 34°C で 3~5 日間培養し、培養液上清中のリパーゼ活性を Mancinii 法による抗原抗体反応、あるいは pNPB を基質とした比色法で測定した。次いで、最も生産性の高かった 1~2 株について、炭素源にマルトースを加えた ASP-M 培地 (pH7.0) と炭素源を高濃度にして初発 pH を酸性にした MB-5Da 培地 (pH4.5) における生産性を検討した (図 1-1)。興味深いことに *A. japonicus*, *A. japonicus* var. *aculeatus*, *A. aculeatus* から得られた形質転換体は ASP-M 培地での生産性が最も高く、*A. oryzae* と同レベルの高生産性を示したのに対し、*A. foetidus* 由来の形質転換体は MB-5Da 培地でのみ高生産性を示し、*A. oryzae* の 2 倍以上の高生産を得た。*A. aculeatus*, *A. japonicus* var. *aculeatus* 由来の形質転換体は MB-5Da 培地でも良好な生産性を示した。以上の結果から、評価に用いた 3 種の宿主候補種はそれぞれ用いる培地によって異なる生産性を示し、*A. foetidus* は *A. oryzae* と異なる培養条件を好むのに対し、*A. japonicus* や *A. aculeatus* は *A. oryzae* と類似の培養条件を好むが、特に *A. aculeatus* は *A. oryzae* と *A. foetidus* 両者の特徴を併せ持つことが分かった。

以上の結果から、*A. japonicus*, *A. aculeatus*, *A. foetidus* の 3 種は、いずれも培養条件を選択することにより *A. oryzae* と同等もしくはそれ以上の異種タンパク質生産能を有することが示された。また、この 3 種が新たな宿主として適していると結論し、以降の実験に用いることとした。

1-3-3. アミラーゼ活性並びにハイブリダイゼーション試験

SDS-PAGE を用いて培養上清中のタンパク質を分析し酵素の生産性を評価する際、*A. foetidus* が明瞭な副産物を生成しているのが観察された。その分子量から *A. oryzae* の α -アミラーゼであるタカアミラーゼのオルソログに由来する酵素であることが推測されたため、宿主候補株について培養上清中の α -アミラーゼ活性を確認したところ、*A. japonicus* と *A. aculeatus* ではほとんどアミラーゼ活性がみられなかったのに対し、*A. foetidus* は明瞭なアミラーゼ活性を示した (表 1-5)。*A. niger* はタカアミラーゼ遺伝子と相同性が高い 2 つのオルソログを持つことが知られているため (28)、これらの種についてサザンブロットハイブリダイゼーションによってタカアミラーゼのオルソログの存在を調べた。タカアミラーゼ遺伝子をプローブとしてストリンジェントな条件でハイブリダイゼーションを行ったところ、対照として用いた *A. oryzae* では 3 本のバンドが検出されたのに対し、*A. niger* では、これらとは分子量が異なる 2 本のバ

ンドが得られた (図 1-2)。興味深いことに、*A. foetidus* の 2 株からはいずれも *A. niger* と同じサイズのバンド 2 本が得られた。その他のいずれの株 (*A. japonicus*, *A. aculeatus*, *A. phoenicis*) では、バンドが検出されなかった。タカプロモーターをプローブとして用い、同様の解析を行ったところ、同様の結果が得られた。これは *A. foetidus* がゲノムレベルで *A. niger* に非常に近いことを示しており、また他の 3 種はタカアミラーゼ遺伝子と相同性の高いオルソログを持たないことを示していた。

1-3-4. ゲノム配列による AmyR とタカアミラーゼの探索

宿主候補として選抜した *A. japonicus* と *A. aculeatus* は、通常の培養条件下においてアミラーゼの生産量が低いにもかかわらず *A. oryzae* 由来のタカプロモーターを用いた異種タンパク質生産が可能であった。そこで、次に、これらの菌種がタカプロモーターの活性化に必須の転写因子である AmyR を有しているかどうかを調査した。JGI が公開している *A. japonicus*, *A. aculeatus* のゲノムデータベースに対して BLAST 検索を行ったところ、いずれの種も *A. oryzae* の AmyR 遺伝子と 70% の相同性をもつ遺伝子が見いだされた (表 1-6)。従って、この AmyR のオルソログが正の制御因子として機能し、*A. oryzae* 由来のタカプロモーターを活性化できたと考えられた。同様に、タカアミラーゼ遺伝子配列を用いて BLAST 検索を行ったところ、興味深いことに、いずれの種も上記の AmyR オルソログの近傍 5.7 kb の位置に各々 61-64 % の相同性を有する遺伝子が存在した (表 1-7, 1-8)。これらの遺伝子は活性の低いアミラーゼ遺伝子で、AmyR のオルソログとクラスターを形成しているものと推定された。

1-4. 考察

すでに産業利用されている *A. oryzae* と同等かそれ以上の高い異種タンパク質生産性をもつ菌が、他の *Aspergillus* 属菌から得られたのは興味深い結果であった。また、得られた菌株は、タンパク質生産に最適な培養条件にそれぞれ特徴があることが示された。これは、菌株の代謝の違いが異種タンパク質の生産性に影響を及ぼすためであると考えられる。例えば、アミラーゼ活性の低い *A. japonicus*, *A. aculeatus* は、炭素源としてデキストリンよりもマルトースを好み、アミラーゼ活性が強く、酸性条件下でも生育する *A. foetidus* は、高濃度のデキストリンを好む傾向があった。この代謝の違いが異種タンパク質の生産に影響を与えている可能性が考えられる。これらの候補種はプロトプラストの生成条件にも特徴があり、*A. foetidus* は用いた酵素で溶菌されにくく高濃度の酵素での処理が必要であったのに対し、*A. japonicus*, *A. aculeatus* はプロトプラストが壊れやすく、使用酵素濃度も低い方がプロトプラスト収量が高い傾向にあった。これはこれらの種の細胞壁や膜の成分組成が異なるためと考えられた。

また、新しい宿主候補の *A. japonicus*, *A. aculeatus* では、アミラーゼ活性が低いにもかかわらず *A. oryzae* 由来タカアミラーゼのプロモーターが良好に発現したことは興味深い結果であったが、これらの宿主候補種のゲノム配列中、タカプロモーターの活性化に必須の正の制御因子 AmyR をコードする遺伝子のオルソログが見つかったことから、これらの宿主候補においては AmyR のオルソログが相補的に働きタカプロモーターを活性化することが推定された。*A. oryzae* の AmyR は、 α -アミラーゼのほか、グルコアミラーゼや α -グルコシダーゼの遺伝子発現も制御することが知られている (29)。本研究によって得られた宿主候補株の AmyR も同様の機能を有する可能性が高いと予想される。これは、今後、これらの株を宿主として組換え酵素は発現させる際の基礎的知見として有用であると考えられる。

Aspergillus 属に限らず糸状菌の分類は、胞子の大きさや表面、胞子柄、頂のう、胞子の形成の仕方等形態の特長や特定の培地上で生育したコロニーの形状、養分の資化性、栄養要求性などによって行われてきたが、このような分類法の限界を示唆する結果が得られた。宿主候補の 4 種 8 株について、*A. oryzae* の α -アミラーゼ遺伝子をプローブとしてサザンブロット解析を行ったところ、評価した *A. foetidus* 2 株がともに *A. niger* と全く同じバンドパターンを示した。これは *A. foetidus* と *A. niger* のゲノム DNA 配列の類似性が高いことを示唆している。*Aspergillus* 属の Nigri セクションにおいては、分類のむずかしさが系統解析の課題となっているが、Varga ら(2007)は、 β チュブリン遺伝子とカルモジュリン遺伝子配列をプローブとして用いることにより、*A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. aculeatus* を含む Nigri セクションの 10 種が完全に区別できるとしている (30)。同様に Parenicova ら(2001)は、*A. japonicus* と *A. aculeatus* はゲノム配列の類似性が高く、ITS1/ITS2 の配列や 5.8S rRNA では区別ができなかったが、代謝産物の情報を加えることにより区別が可能になったとしている (31)。今回評価した種を含む近縁種について β チュブリン遺伝子配列を用いて系統樹を作製したところ (図 1-2)、*A. foetidus* と *A. niger* は分子系統学的に非常に近いことが示された。また、本研究で宿主の候補種として選抜した *A. japonicus* と *A. aculeatus* は比較的近い種であることが分かった。これらの菌種がゲノムの DNA 配列上、どの程度の類似性であれば同種とし、どの程度の差異があるときに別種とするのが妥当なのか、分類学的には大変興味深い課題となると考えている。

以上、本研究では、すでに宿主として用いられる菌の近縁種からも、代謝や酵素活性の異なる新たな宿主候補が得られること、特に近縁種では転写因子など機能性の因子が相補的に機能する利点があることを示したほか、分子系統分類はこれらの性質の差異を予測するのに有効であることを示した。これらの知見は、今後の組換え酵素の生産宿主の選抜のために有用な知見となると期待される。

表 1-1 形質転換試験に用いた菌株

Species	Strain
<i>Aspergillus aculeatus</i>	N1136 (CBS 101.43)
	A1454 (CBS172.66)
	A1455 (CBS 186.67)
<i>Aspergillus foetidus</i>	E1-46
	A37
	N0953 (ATCC 10254、CBS 126.48)
<i>Aspergillus japonicus</i>	A1438 (CBS 568.65)
	A1442 (CBS 114.34)
<i>Aspergillus japonicus var. aculeatus</i>	N0956 (IAM 13871)
<i>Aspergillus phoenicis</i>	A528 (CBS 139.48)
	A530 (CBS 137.52)
	E419 (CBS 137.52)

表 1-2 安全性が高いとみなされた種

Section Nigri	Section Flavus	Section Candidi	Section Circumdati	Section Nidulantes
<i>A. foetidus</i>	<i>A. sojae</i>	<i>A. candidus</i>	<i>A. melleus</i>	<i>A. terreus</i>
<i>A. phoenicis</i>	<i>A. tamaris</i>			
<i>A. aculeatus</i>				
<i>A. japonicus</i>				

表 1-3 プロトプラスト化試験

Strain	Buffer*	SP234 (mg/ml)	Incubation	Yield (protoplast/ml)
<i>A. japonicus</i> A1438	MgP	12	30°C, 90 mins	5x10 ⁵
	KCl	6	34°C, 150 mins	2x10 ⁷
<i>A. japonicus</i> A1442	MgP	6	30°C, 240 mins	5x10 ⁵
	KCl	6	34°C, 80 mins	2x10 ⁷
<i>A. aculatus</i> N1136	MgP	5	34°C, 180 mins	5x10 ⁶
	KCl	5	34°C, 90 mins	7x10 ⁶
<i>A. aculatus</i> A1455	MgP	5	30°C, 180 mins	3x10 ⁶
	MgP	5	34°C, 240 mins	1x10 ⁷
	KCl	5	30°C, 180 mins	3x10 ⁶
<i>A. foetidus</i> E46	MgP	12	34°C, 150 mins	5x10 ⁶
	KCl	12	34°C, 150 mins	1x10 ⁷
<i>A. foetidus</i> N0953	MgP	12	34°C, 80 mins	1x10 ⁶
	KCl	24	34°C, 80 mins	2x10 ⁷

* MgP, 1.2M MgSO₄/10mM sodium phosphate, pH 5.8 (Yelton, 1984); KCl. 0.6M KCl (Balance,1985).

各々形質転換に使用可能なプロトプラスト収量を得た時の条件と収量を示した。

表 1-4. 選択培地での宿主候補株の生育

Selection medium	COVE-A for <i>amdS</i> selection	COVE-HygB for <i>hph</i> selection
<i>A. japonicus</i> A1438	(+)	-
<i>A. japonicus</i> A1442	(+)	-
<i>A. aculatus</i> N1136	(+)	-
<i>A. foetidus</i> E46	+	-
<i>A. foetidus</i> N0953	+	-

+, grow; (+), slightly grow; -, no growth.

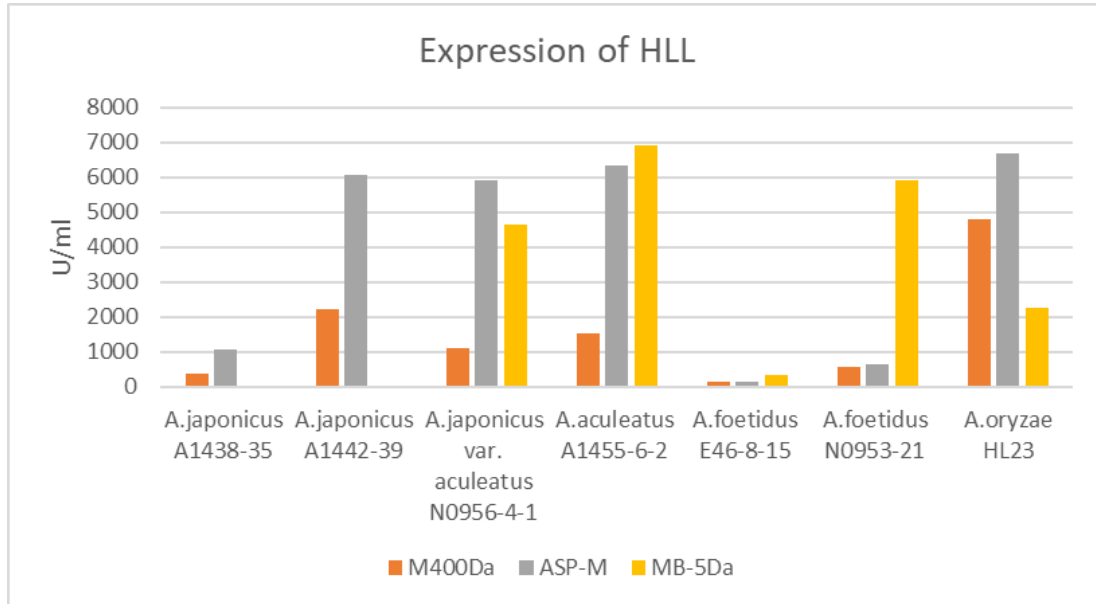


図 1-1. 得られた形質転換体のフラスコ培養における HLL リパーゼの生産性

Each transformants were cultivated in shaking flasks using three different media except for A1438-35, which was not tested in MB-5Da. Cultivation was done at 30° C for 5 days. Lipase activity was measured using pNPB.

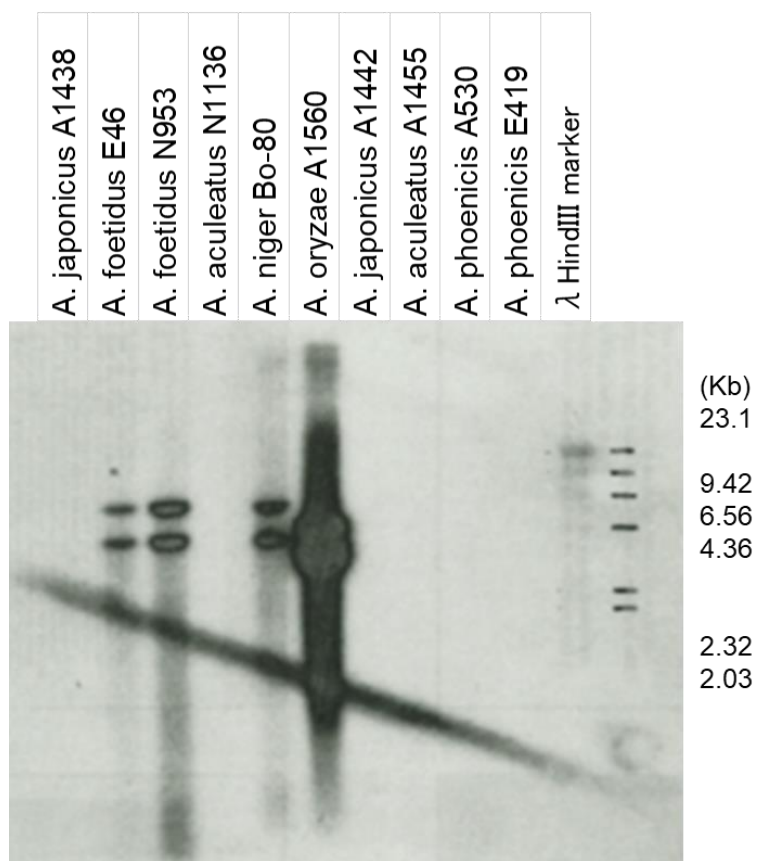


図 1-2. サザンブロットハイブリダイゼーション試験
タカアミラーゼの CDS をプローブとして用いた。

表 1-5. アミラーゼ活性評価

Strain	AZCL-amylose/MM	
	2 days	3 days
<i>A. japonicus</i> A1442	(-)	+
<i>A. japonicus</i> A1438	(-)	++
<i>A. japonicus</i> var. <i>aculeatus</i> N0956	(-)	++
<i>A. aculeatus</i> A1455	(-)	++
<i>A. foetidus</i> A37	+++	++++
<i>A. foetidus</i> N0953	+++	++++
<i>A. oryzae</i> A1560	+++	++++

(-), slightly colored; +~++, blue halo exists; +++~++++, big blue halo exists.

Each strain was grown on a minimum agar plate containing AZCL-amylose. Blue halo appears when the strain produces amylase activity.

表 1-6. *AmyR* オルソログ間の相同性

DNA	Ao AmyR	Aj AmyR	Aa AmyR
Ao AmyR		70	70
Aj AmyR			93
Aa AmyR			

Ao: *A. oryzae* IFO4177, Aj: *A. japonicus* CBS 114.51, Aa: *A. aculeatus* ATCC 16872

表 1-7. タカアミラーゼ遺伝子オルソログ間の相同性

DNA	TAKA amylase	Aj amy1	Aa amy1
TAKA amylase		61	64
Aj amy1			89
Aa amy1			

TAKA amylase: α -amylase from *A. oryzae* RIB40, Aj: *A. japonicus* CBS 114.51, Aa: *A. aculeatus* ATCC 16872

表 1-8. *AmyR* とタカアミラーゼのオルソログのゲノム上での位置

Orthologue	Location	Length (bp)	Distance to Amy1 (bp)
AJ AmyR	Scaffold_5: 449948-451819	1871	5763
AA AmyR	Scaffold_2: 2370730-2372550	1820	5698
AJ amy1	Scaffold_5:442825-444185	1360	
AA amy1	Scaffold_2: 2363687-2365032	1345	

AJ, *A. japonicus* CBS 114.51; AA, *A. aculeatus* ATCC 16872

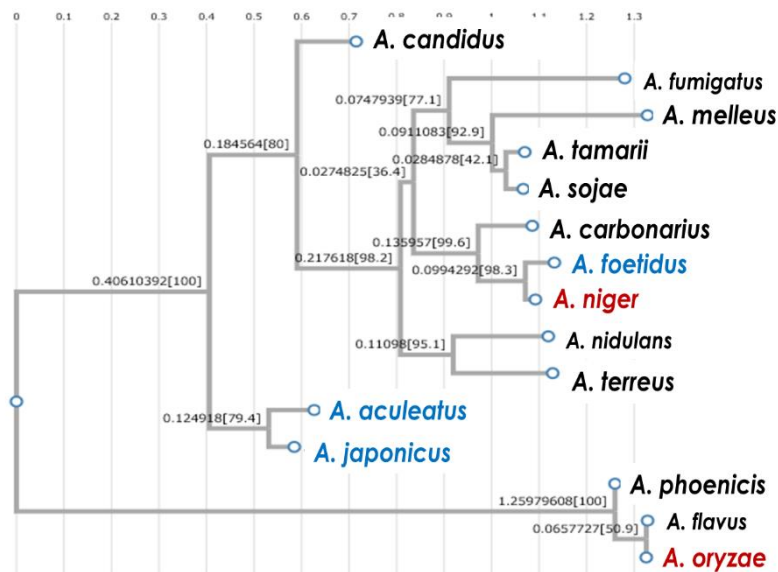


図 1-3. *Aspergillus* 属近縁種の β tubulin gene による分子系統樹

Alignment and phylogenetic reconstructions were performed using the function "build" of ETE3 v3.1.1 (Huerta-Cepas et al., 2016) as implemented on the GenomeNet (<https://www.genome.jp/tools/ete/>). The tree was constructed using fasttree with slow NNI and MLACC=3 (to make the maximum-likelihood NNIs more exhaustive) (Price et al., 2009). Values at nodes are SH-like local support.

Used sequence for the analysis: *A. aculeatus* (FJ629271.1), *A. candidus* (EU076295.1), *A. carbonarius* (KC520551.1), *A. flavus* (KF562216.1), *A. foetidus* (FJ629283.1), *A. fumigatus* (KU714961.1), *A. japonicus* (FJ629286.1), *A. melleus* (AY819967.1), *A. nidulans* (MK749982.1), *A. niger* (GU296691.1), *A. oryzae* (AF036805.1), *A. phoenicis* (FJ608388.1), *A. sojae* (MF167570.1), *A. tamaraii* (MH544272.1), *A. terreus* (MH357352.1)

第2章 食品用酵素の安全性評価に関わる技術と知見

2-1. 序論

食品用酵素は、通常、食品添加物として扱われ、上市前に安全性評価が行われるが、その評価の方法や基準は国や地域で異なる(32)。欧州では欧州食品安全機関(European Food Safety Authority: EFSA)が食品添加物のリスク評価を行うほか、遺伝子組換え微生物を用いて製造される食品添加物の評価に関する指針を定めている(33)。米国ではFDAによって直接食品に用いられる添加物と製造過程で用いられる二次的添加物に区別して規制されるが、このほか一般的に安全とみなされるもの(Generally Recognized As Safe: GRAS)として告示される仕組みがある(34)。GRAS告示システムは比較的短期間で処理されるが、食品用酵素はGRASとして扱われることが多い。国連機関であるJECFAも遺伝子組換え生物から製造される食品添加物の安全性評価について意見を発表し、そこでは、1) 遺伝子組換え生物には意図しない遺伝子材料が導入されていないこと、2) 抗生物質耐性となるタンパク質について考慮すること、3) 遺伝子産物におけるアレルギー性について評価することが留意点として挙げられている(35)。

我が国では、食品添加物の安全性審査は厚生労働省の諮問により食品安全委員会で行われている。食品安全委員会は遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準(36)を定めており、食品安全委員会の専門調査会によって厳しい審査がなされている。我が国の安全性審査の考え方が他国のそれと大きく異なる点として、遺伝子組換え微生物の遺伝子情報を重視している点が挙げられる。すなわち、EFSAやJECFAでは動物実験を含む安全性試験の結果が最終的な安全性の根拠として認められるのに対し、我が国では、あくまでも製造に用いる組換え体の遺伝子情報により安全性を判断する立場をとっている。両者の相違は、海外で既に認可され広く流通している製品が我が国での安全性審査に時間を有し認可されていないという事例を多く生み出し、海外から食品原料・素材を調達している国内メーカーに混乱をもたらした。このような状況を改善すべく、食品安全委員会による審査で要求される遺伝子情報の獲得を検討した。

我が国の安全性審査では、遺伝子組換え技術の利用によって生産菌にあらたな毒性またはアレルギー性物質を生産する可能性が付与されていないかどうかを、生産菌の遺伝子情報をもとに評価される。具体的には、外来遺伝子やDNA断片の導入により、毒性やアレルギー性を持つ新たなタンパク質をコードする遺伝子配列(オープンリーディングフレーム)が生じていないかどうかを検証されるが、そのためにはDNA断片が染色体に挿入される場合、挿入

断片周辺のゲノム配列情報が不可欠となる。従来、遺伝子組換え糸状菌による酵素生産菌の開発では、形質転換の際、目的の酵素遺伝子の発現プラスミドを特に挿入位置を定めことなく菌体内に導入し、宿主の染色体上にランダムに複数コピーが導入される手法を用いてきた(37,38)。得られる形質転換体により生産性が大きく変わることから、無作為に導入された形質転換体を数多く分離し、その中から生産性の高い菌を選択する方法がとられていた。環状の発現プラスミドを *Aspergillus* 菌体内に導入した場合、多くは染色体上の 1~2 箇所に直列に複数コピー挿入されることが報告されている(39,40)(図 2-1)。挿入されるコピー数は多い時には数十コピーにも上る場合があることも知られている。このように、挿入された DNA 断片は繰り返し配列を多く含んでいることから、例えばランダムヘキサマーを利用した PCR や Inverse PCR などによる挿入断片末端領域の増幅は困難であった。そこで、次世代シーケンサーにより低価格で行えるようになった生産菌の全ゲノム配列の解読を行い、目的情報の取得を試みた(41)。

2-2. 材料および方法

2-2-1. 使用菌株

食品用酵素である *A. oryzae* 由来のアスパラギナーゼ(製品名 Acrylaway®, Novozymes A/S)の生産菌 *A. oryzae* pCaHj621/BECh2#10 と *A. aculeatus* 由来のキシラナーゼ(製品名 Shearzyme®, 同上)の生産菌 *A. oryzae* pMT2155/BECh2-Fb-3 を用いた(41)。これらは、いずれも *A. oryzae* BECh2 株を宿主として、それぞれの酵素遺伝子を含む発現プラスミド pCaHj621 あるいは pMT2155 を用いて得られた形質転換体である。発現プラスミドは、酵素遺伝子のほかタカプロモーターと同等である *A. niger* の中性アミラーゼ遺伝子プロモーターと *A. nidulans* の TPI 遺伝子のリーダー配列、*A. niger* のグルコアミラーゼ遺伝子ターミネーター、選択マーカー遺伝子として *A. nidulans* の *amdS* を保持している。キシラナーゼの生産菌 pMT2155/BECh2-Fb-3 株は、形質転換体を紫外線照射して得られた変異株である。これらの菌を YPG 培地(0.5% yeast extract, 1% Bacto peptone, 2% glucose)で 1 日培養し、得られた菌体を凍結後、電動破碎装置オートミル(株式会社トッケン)を用いて破碎、市販のキット(Fast DNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals))を用いてゲノム DNA を抽出した。

2-2-2. ゲノム配列の解読とマッピング

生産菌のゲノム DNA を物理的に断片化し、400-500 bp の長さの断片のライブラリー

を構築、各断片についてイルミナのペアエンド法で塩基配列を解読した。得られた塩基配列は公開されている *A. oryzae* RIB40 のゲノム配列 (<http://www.bio.nite.go.jp/dogan/project/view/AO>) と生産菌の構築に用いられた発現プラスミドを鋳型としてマッピングした。片方が RIB40 のゲノム配列、他方が発現プラスミドの配列をもつリードをリンキング・リード(Linking read)としてプールし、それ以外のリードのプールと区別した上で両プールについてマッピング状況を GiNeS (ジナリス社)で可視化した (41)。

2-2-3. 挿入位置の確認と挿入断片の構造の解析

マッピングで同定された挿入位置は、挿入された発現カセットと挿入部位の境界付近の DNA 断片を PCR で増幅し塩基配列を決定することにより確認した (41)。挿入された発現カセットのコピー数はサザンブロット解析により推定した。すなわち、生産菌のゲノム DNA を発現プラスミド上の酵素遺伝子が切り出せる制限酵素の組み合わせで消化し、段階的に希釈した上でアガロース電気泳動を行い、常法によりナイロンメンブレン Hybond-N に移して、酵素遺伝子をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。発色には DIG DNA detection kit (Roche)を用いた。コピー数の推定は、遺伝子を 1 コピー持つ遺伝子供与株からの DNA 断片強度を基準とし、各サンプルから得られた断片の強度を画像処理で読み取り計算した。

2-3. 結果

2-3-1. ゲノム配列解析法の検討

ゲノム配列解析のための手法として図 2-2 (A) のような予測を立てた。すなわち、生産菌のゲノムDNAから解読されたショートリードを、宿主のゲノム配列ではなく発現プラスミドを鋳型としてマッピングさせると、挿入箇所の境目を含むリードは一部が鋳型に符号するが挿入点を境にマッピングできなくなるため、これを指標に発現プラスミド側の末端が同定でき、同じリード上のマッピングされなかった配列から染色体上の末端が同定できると予測した。これを基に株式会社ジナリスに解析を相談したところ、図 2-2 (B) の提案がもたらされた。すなわち、イルミナ社のペアエンド法でライブラリーを作製し、得られたペアリードのうち片方がゲノム由来、もう片方が発現プラスミド由来となるリードをリンキング・リード(Linking read)と定義し、これを抽出してリードプールを作製する。このリンキング・リードのプールを宿主ゲノムと発現プラスミドにそれぞれマッピングし、プラスミドの挿入箇所の同定を試みるものである。実際のマッピングは、リンキング・リードのプールとそれ以外のリードのプールの両方で行った。

2-3-2. アスパラギナーゼ生産菌の場合

Acrylaway®は、*A. oryzae* 由来のアスパラギナーゼを遺伝子組換え *A. oryzae* を用いて製造される食品用酵素である(42)。クッキーやクラッカーなど澱粉質を含む食材を高温処理して作られる食品中に形成されるアクリルアミドの低減を目的に開発された。

この酵素の生産菌について上記の方法でゲノム解析を行ったところ、リンキング・リードが *A. oryzae* ゲノム上の 5 か所にマッピングされた (41)。そのうち 3 か所が後述するキシラナーゼ生産菌と結果を同じくしたもので、発現プラスミド上のプロモーター配列がゲノム上のアマミラーゼ遺伝子にマッピングされたものであることが判明した。第一章で述べたように、*A. oryzae* にはタカアミラーゼ遺伝子が 3 コピー存在する。このため、3 か所にマッピングされたことになる。その他 1 か所は *A. oryzae* のアスパラギナーゼ遺伝子にマッピングされていた。従って、残りの 1 か所が目的の発現プラスミドの挿入箇所と予測された (図 2-3: 上図)。

この位置にマッピングされたリード配列を精査した結果、リンキング・リードのプールからゲノム上にマッピングされたリード群は一点を境にリードの向きが逆転していることがわかり、この箇所が挿入位置であると考えられた。また、リンキング・リード以外のプールからこの位置にマッピングされたリード配列を精査したところ、同一点を境に一部がゲノム上にマッピングされ、残りが発現プラスミドの配列をもつことが判明した (41)。これらの結果から、発現プラスミド pCaHj621 の挿入位置は Chromosome 1 上にある機能未知遺伝子 AO090005001483 の 5′末端付近であり、挿入に伴い 3 bp の欠損を伴っていることが分かった。また、挿入断片両端の発現プラスミドの配列情報とサザンブロット解析から、発現プラスミドは直鎖上に 8 コピー挿入されていることが明らかとなった (図 2-4: 上図)。染色体上の挿入位置が同定できたので、安全性審査に必要な周辺遺伝子情報を得ることができた。

2-3-3. キシラナーゼ生産菌の場合

2-3-2 と同様の解析を食品用酵素 Shearzyme® の生産菌についても行った。Shearzyme®は *Aspergillus aculeatus* 由来の GH Family10 に属するキシラナーゼで、小麦など穀類のヘミセルロースを分解する働きを持つ (43)。澱粉やグルテンなどの抽出工程で粘性を低下させて収量を向上させる。生産菌 Fb-3 はキシラナーゼ遺伝子の発現プラスミド pMT2155 を *A. oryzae* 宿主株にランダムに導入して得られた形質転換体を突然変異処理をして得られた変異株である。

前述の菌と同様にリンキング・リードはゲノム上の 5 か所にマッピングされ、うち 3 か所はタカアミラーゼ遺伝子の 5′上流部にマッピングされていた。1 か所はマッピングされたゲノム上の

配列と発現プラスミドの配列との関連性が見出されず、詳細の検証は行わなかった。残り1か所は Chromosome 4 に位置していたが、興味深いことに生産菌の染色体に 4kb の欠損を伴い、Soluble epoxide hydrolase 遺伝子である AO090012000395 の全配列と機能未知遺伝子 AO090012000396 の一部が欠失していた (図 2-3: 下図)。欠損領域の末端にマッピングされたリード配列を精査し、この位置が発現プラスミド pMT2155 の挿入位置であることを確認した上で、末端部分を PCR で増幅、配列を確認したところ、両端に位置する発現プラスミドの配列が逆方向となっており、挿入断片内でゲノムの再編成が生じていることが分かった (図 2-4: 下図)。サザンブロット解析結果から、挿入されている発現プラスミドは 30 コピーと推定された。ランダムに導入された環状プラスミドは、通常直列に複数コピー導入されることが知られているので、本菌の場合は、発現プラスミドが多コピー挿入されたのち、突然変異処理を施したことにより挿入箇所周辺のゲノムが再編成され、4 kb 断片の欠損と挿入断片両端の配列が逆転したものと推定された。いずれにしても染色体上の挿入位置が同定できたので、安全性審査で必要な周辺遺伝子情報を得ることができた。

2-4. 考察

リンキング・リードというコンセプトを導入することにより、生産菌の全ゲノム配列からランダムに染色体に挿入された環状プラスミドの挿入位置と末端配列の同定が可能となった。これはイリミナ社が開発した Paired-End Sequencing 法を活用したものだが、本法は繰り返し配列や染色体の組換えや再構築が起こっていても正確にリードをアラインできるように開発された技術で、400-500bp 程度離れた 2 か所のリードをペアリングできるという特徴を持つ。これにより挿入部位周辺の染色体配列情報が得られ、安全性審査で要求される遺伝子配列による検証が可能となった。図 2-5 に示すように、遺伝子組換え技術を利用して製造される食品用酵素の認可件数は、2004 年に食品安全委員会が新しい基準を定めて以降著しく低い状況が続いていたが、次世代シーケンサーの登場により全ゲノム配列決定にかかるコストが低下した 2014 年以降に急増している。令和 2 年 5 月現在で認可された遺伝子組換え技術を利用した食品用酵素は 43 品目あり、12 品目が審査中となっている。食品用酵素の多くは加工助剤として食品の製造工程で利用され、最終製品には残らないため遺伝子組換え技術の利用に関する抵抗感が低下してきたことも、増加の一因であると考えられる。今後、バイオエコノミー社会に向けて、フードロス問題や食品原材料を無駄なく利用するためにも酵素の活用が期待されることから、産業用酵素の生産において遺伝子組換え技術が容認されるのは好ましい方向性

といえよう。

一方で、キシラナーゼ生産菌のように、導入された発現プラスミドの挿入断片の全体像が次世代シーケンス技術で必ずしも明らかにならない例も見られた。この場合は挿入された発現プラスミドのコピー数が 30 と高かったため、一度は直列に挿入されたプラスミド領域が何らかの刺激により再構築されたためであると考えられる (44,25)。塩基配列の解読技術は現在も進歩しており、ロングリードが可能な第三世代シーケンサーが登場している (45)。例えば「一分子リアルタイム法」と言われる PacBio シーケンス法 (46) では1リード平均 10kb、最長 40kb の塩基配列の決定が可能と言われているほか、同じく一分子の DNA を主に電氣的に検出する Nanopore 社の DNA シーケンサー (47) は数十キロ〜数百キロbpの塩基配列の解読が可能で、最長 1 Mb の配列が一度に解読できるといわれている。これらを用いれば、今回解明できなかったキシラナーゼ生産菌のような場合にも挿入断片の全体像が明らかになる可能性もある。しかしながら、予測不能な挿入を継続するよりも、生産菌の構築法を改め特定の位置に発現カセットを導入する位置特異的挿入の技術開発も重要と考えられる。

位置特異的挿入は相同組換えを利用した挿入が一般的であるが、糸状菌の場合、非相同組換え (NHEJ) が起こりやすく、相同組換え効率が低い。KU70/KU80 や LigD (Lig4) など NHEJ に必須な因子を不活化することにより、相同組み換え効率が飛躍的に向上することが知られている (48) が、技術は特許化され使用するにはライセンス取得が必要である。また、高い生産性を得るには目的とする酵素遺伝子の転写量を高める必要があるが、従来のランダム挿入法では 200 コピーの挿入例も知られている。位置特異的挿入で高い生産性を得るには、遺伝子 1 コピー当たりの発現量を高める、あるいはコピー数を増加させる技術が必要となる。

近年、酵母や動物細胞で良く用いられているリコンビナーゼを利用した方法が糸状菌でも利用されるようになった。バクテリオファージ P1 由来の Cre/loxP 系 (49) や、酵母由来の FLP/FRT システム (50) が主に用いられるが、これらのリコンビナーゼはそれぞれ loxP や FRT など特定の塩基配列を認識し相同組み換えを起こす。この認識配列をあらかじめ宿主染色体の特定位置に導入し、同じく認識配列と目的の酵素遺伝子を含む DNA 断片をリコンビナーゼの存在下で形質転換することにより、目的の遺伝子を宿主染色体の特定位置に挿入することができる。Udagawa (2017) は染色体上の複数個所に FRT 配列を挿入することにより、一度に複数コピーを挿入する技術を開発した (17,51)。1 コピー当たりの酵素生産性の向上が今後の課題であろう。

以上、産業利用を目的とした生産菌を構築する際は、製品化にあたり必要となる各国の

規制を把握し、それに準じた生産菌の構築、すなわち出口を見据えた開発が大切であることが再認識されるべきである。

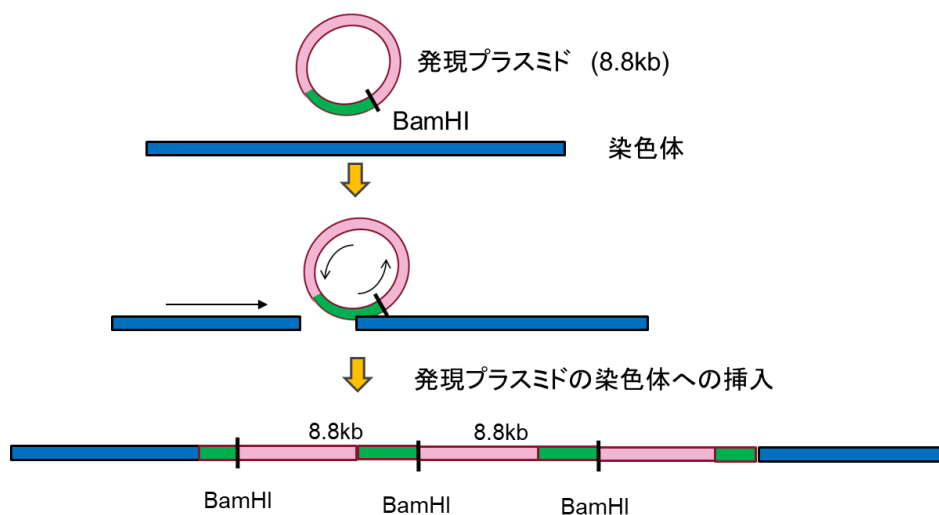


図 2-1. 発現プラスミドの染色体ランダム挿入模式図

宿主菌体内に導入された環状プラスミドは、宿主染色体の不特定の位置に、直列に複数コピー挿入される。

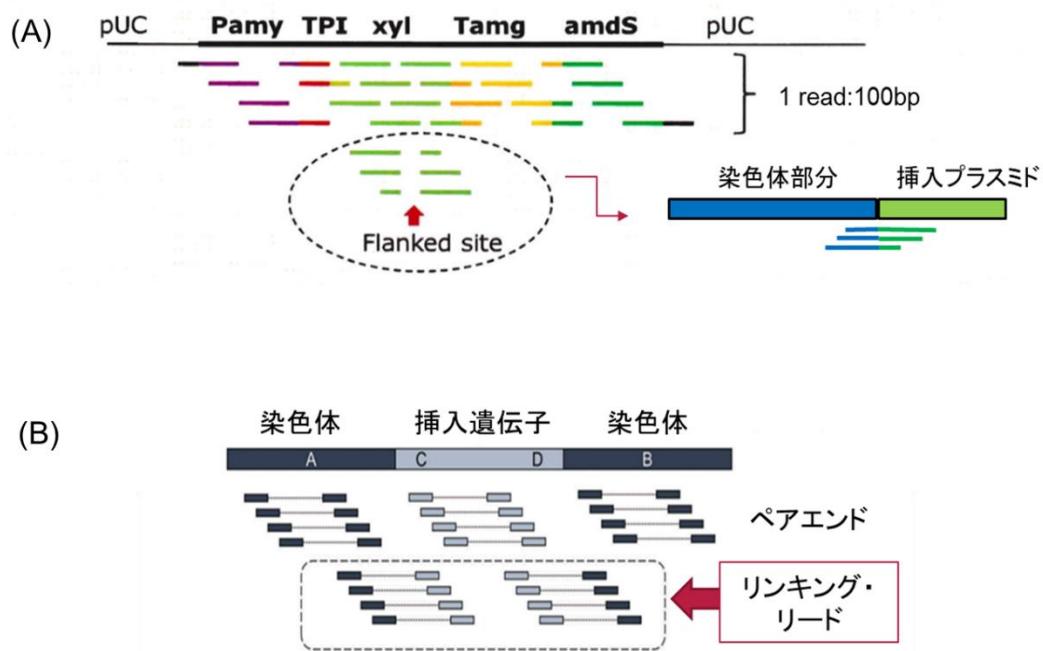


図 2-2. シークエンス解析の戦略（一部、文献 41 から改変）

(A) 戦略1: 生産菌の染色体から読んだリードを発現プラスミド配列に対してマッピングする。境界を挟んだリードは、宿主染色体部分の配列がマッピングされない。

(B) 戦略2: イルミナのペアエンド法で生産菌のゲノム配列を解読し、片方のリードが宿主染色体由来で、もう一方が発現プラスミド由来の配列を持っているものを「リンキング・リード」とし、他のリードと分けてプールする。両プールを公開されている宿主微生物の Reference ゲノム配列にマッピングする。

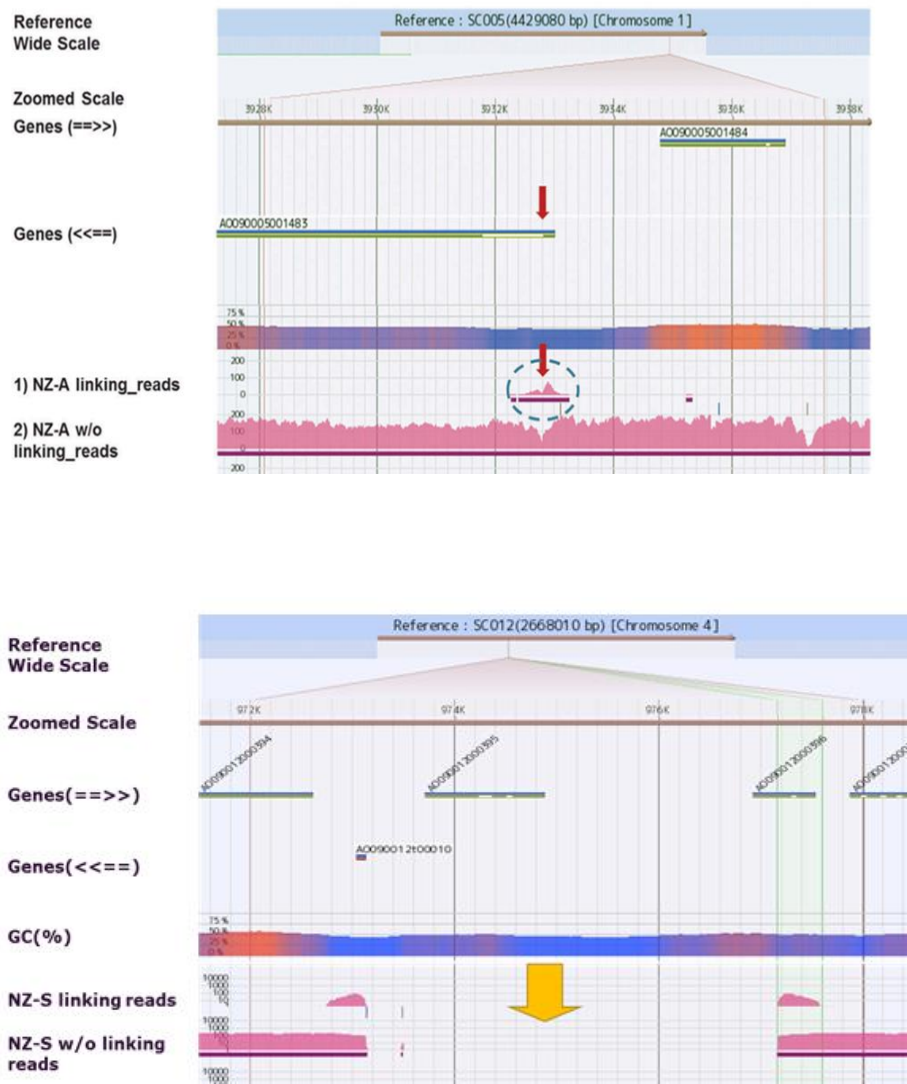


図 2-3. *A. oryzae* ゲノム配列に対するリードのマッピング (文献 41 から)

ピンク色で示されたカラムは、マッピングされたリードの厚みを示す。Linking reads プールからマッピングされた領域が、発現プラスミドの挿入部位となる。

上図:アスパラギナーゼ生産菌の結果。矢印で示したのが発現プラスミドの挿入位置。

下図:キシラナーゼ生産菌の結果。発現プラスミドの挿入位置(矢印)に 4kb の欠失がみられた。

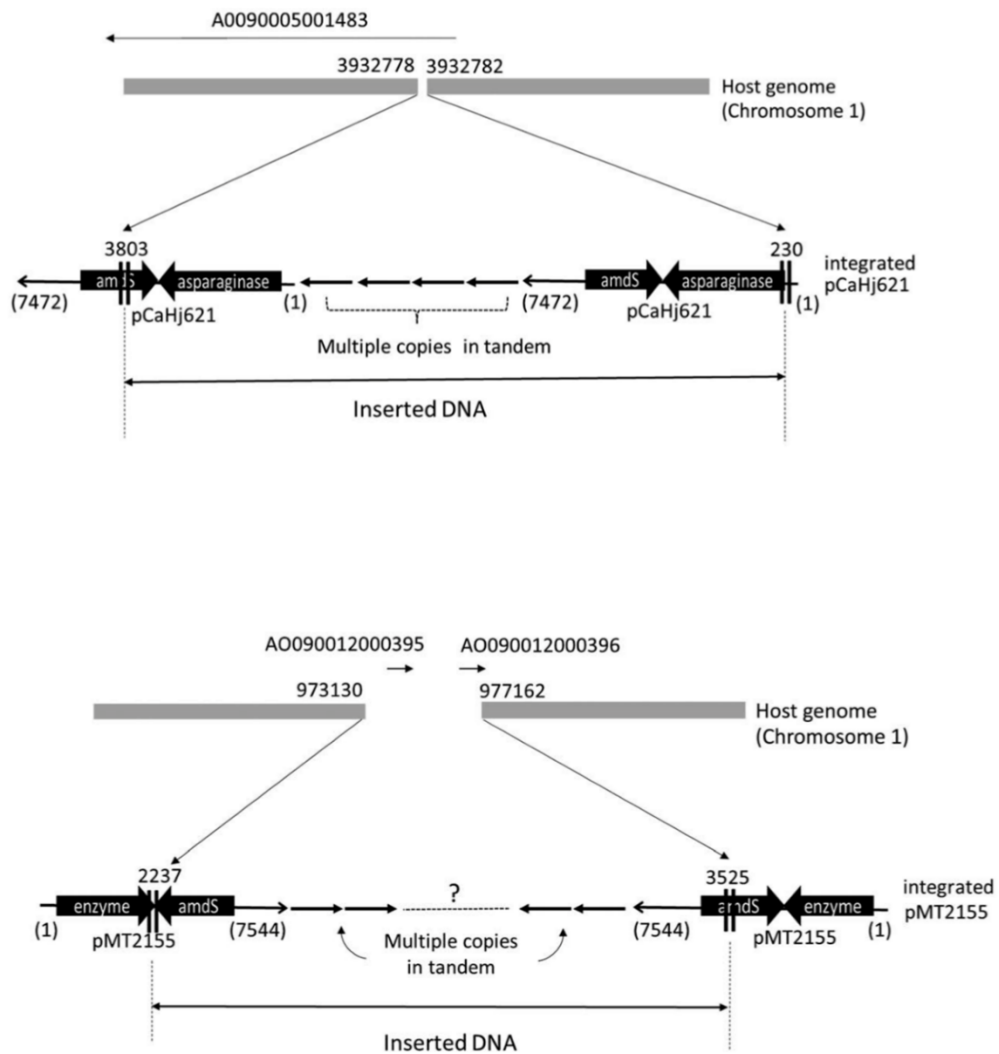


図 2-4.染色体上における発現プラスミドの挿入位置と挿入断片の模式図(文献 41 から)

上図:アスパラギナーゼ生産菌の挿入断片図。サザンブロット解析により、挿入された発現プラスミドは 8 コピーと判明した。

下図:キシラナーゼ生産菌の挿入断片図。発現プラスミドのコピー数は 30 と推定された。挿入断片の両端に位置する発現プラスミドは挿入の向きが逆向きで、挿入断片が再構築されていることが判明した。挿入断片の両端で挟まれた中間の構造は推定できなかった。

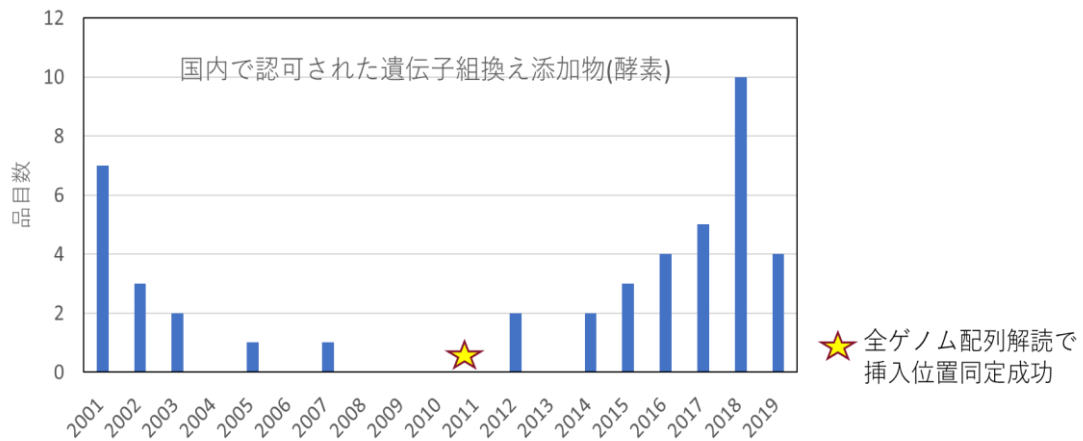


図 2-5. 遺伝子組換え技術を利用した食品添加物(酵素)の認可件数(令和 2 年 5 月 26 日現在)

2003 年に食品安全委員会が発足し、2004 年に遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準が決定されて以来、認可件数が減っている。2011 年以降、次世代シーケンサーの登場によりゲノム配列解析コストが大幅に低減し、時期を同じくして認可件数が上昇している。

第3章 生産技術の開発と基礎的研究

3-1. 序論

前章までに述べたように、産業で利用する酵素の生産技術は、安全で且つ規制や宗教などの観点から実用的でなければならないが、さらに重要な点として経済的に利益を生むものでなければならない。生産コストを抑えて有用な産業用酵素を安価に供給するためには、高い生産性が要求される。探索や改良によって優れた酵素が開発されても、利益を生むに必要な生産性が得られなければ製品化には至らない。酵素の生産技術は製品開発の中で重要な位置を占めている。

酵素の生産性、すなわち単位培養液(培養槽)当たりの酵素収量は、生産コストを大きく左右する要因の一つである。生産コストと損益の関係に関しては、成書に詳細に述べられている。新製品に期待される生産性は、応用現場で使われる酵素量と期待される価格によって決まる。すなわち、応用ごとに用いられる酵素添加量が高い、換言すると単位タンパク質当たりの酵素活性(比活性)が低い、または年間の酵素使用量が多い場合には、非常に高い生産性が要求される。また、生産コストが顧客から期待される製品価格すなわち利用者側が酵素に払うことができるコストに見合わない場合は、生産性を高めることができなければ製品化を断念することになる。既存の製品についても売り上げが伸びると供給量を増やす必要があり、設備を増設して生産量を増やすか、培養槽当たりの生産性を向上させるかの二者択一となる。一般的に後者が望まれるのは言うまでもない。

酵素の生産性向上に有効な技術に関しては、これまでにいくつか総説が書かれている(13,52)が、概ね以下のような点が挙げられる。

酵素タンパク質の生合成は、遺伝子であるDNAからmRNAが転写され、そのmRNAがタンパク質に翻訳されることにより成されるというセントラルドグマに従う。これを遺伝子の発現と呼ぶ。高い酵素生産性を得るためには、まず目的とする酵素遺伝子の転写量(mRNA量)を高めこれを効率よく翻訳する必要がある。遺伝子の転写、すなわちDNAを鋳型としたmRNAの合成はRNAポリメラーゼによって行われ、この働きは正や負の転写因子や共役因子によって制御される。転写を開始するにあたりRNAポリメラーゼや転写因子が結合するDNA領域を含む構造遺伝子の5'上流域をプロモーターと呼び、遺伝子発現には重要な要素となるが、高い生産性を得るためには高い転写活性を持つプロモーターが必要となる。糸状菌・酵母での発現試験には構成的に高発現する *TEFI* (Translation elongation factor) プロモーターや

GAP (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) プロモーターが良く利用されるが、産業用酵素の生産にはアミラーゼ遺伝子やセルラーゼ遺伝子など基質で誘導される遺伝子のプロモーターが多く用いられる (13)。

基質誘導型プロモーターの転写活性を向上させる手段としては、転写因子やプロモーター内に存在する転写因子の結合部位 (シスエレメント) を利用した方法が挙げられる (53)。例えば、正の転写因子のシスエレメントを含む UAS 領域を増幅する、あるいは負の転写因子の結合部位を含む URS 領域を削除する、またはプロモーターを直列につなげるなどが効果的である (54)。真核微生物では構造遺伝子の 3' 領域のターミネーターも重要な働きを示す。この領域には転写が終結した mRNA の 3' 末端をポリアデニル化する認識配列が含まれ、このポリアデニル化により mRNA は初めて核外に移行し翻訳を受ける。目的の酵素をコードする構造遺伝子や cDNA クローンを、選択したプロモーターとターミネーターの間に挿入して構築した人工の遺伝子を発現カセットと呼ぶが、生産菌内における発現カセットのコピー数を増加させることにより転写活性を向上させることもできる。遺伝子のコピー数と発現量は、必ずしも相関関係にないことが知られているが (6)、育種された歴代の生産株について比較ゲノム解析を行ったところ、目的の酵素遺伝子を含む約 200kb の領域が増減を繰り返しており、概ね生産性が上がるほど遺伝子のコピー数が高くなる傾向がみられた (15)。

本章第一節で転写因子を利用した転写制御の改変とプロモーター活性化に関する試みを述べる。

タンパク質は mRNA を鋳型としてリボゾームによる翻訳で生合成されるが、翻訳の効率を飛躍的に高める技術はあまり多く知られていない。数少ない例として、mRNA の非翻訳領域に存在し、リボゾームや翻訳開始に関わる因子が作用するリーダー配列を置換すると、遺伝子の発現量に影響を及ぼすことが知られている (55,56)。また、発現したい異種遺伝子の使用コドンが宿主の使用頻度にそぐわない場合に有効な手段として、コドンの最適化が挙げられる。アミノ酸をコードする遺伝子のコドンは、生物種によって使用頻度が異なる。例えば、糸状菌は一般的に第 3 塩基が G/C であるコドンを好み (57)、糸状菌同志では使用コドンが類似しているのに対し、酵母 *S. cerevisiae* は A/T を好む傾向がある。また糸状菌で使用される A/CGG (Arg) や CCC (Pro) は、大腸菌では使用頻度の低いレアコドンとなっている。このような場合は、使用コドンを宿主で汎用されるコドンに合わせて遺伝子を合成し、これを用いることにより生産性の向上がみられることがある (58)。特に遺伝子の 5' 末端側領域でのコドン最適化が有効であることが報告されているが (59)、現在は全遺伝子を合成する手法が主流とみられる。異種遺伝子を発現する際、翻訳終結後に付加されるはずのポリ A 付加が終結手前の

ORF 内で付加され、不安定な mRNA が生成する現象がみられたが、コドンの最適化によってこの現象が抑えられ、mRNA が安定化された (60)。このように、コドン最適化は mRNA の安定性にも寄与する (61)。コドン最適化は汎用性が高く、これによりグラム陰性菌由来の酵素 (17, 62) や植物由来の酵素 (63) が糸状菌内で発現生産できるようになった。

産業用酵素を安価に大量生産したい場合には、酵素を菌体内に生成させるよりは、むしろ菌体外に分泌生産させた方が生産コストを抑えられる。真核微生物において、遺伝子の翻訳は核外の細胞質で行われるが、菌体外に分泌されるタンパク質は粗面小胞体上のリボゾームで合成され、ただちに小胞体内部に取り込まれて折りたたまれる。その後、糖鎖付加などの翻訳後修飾を受けた上で輸送小胞によってゴルジ体に移行、さらに糖鎖修飾され輸送小胞に包まれて細胞壁に輸送され、エキソサイトーシスで分泌経される。核外に移行した mRNA が細胞質のリボゾームで翻訳を受け、最初の N 末端にシグナル配列があらわれるとシグナル配列認識粒子 SRP が結合し、粗面小胞体に運ばれる。このシグナル配列がタンパク質の発現生産に影響を及ぼすことが知られている (64) が、その機構は解明されていない。上記のように分泌には種々の因子が関与するが、分泌効率を有意に高める技術は未だ多くない。一例として、後述するように、分泌タンパク質を高発現させると小胞体が分泌ストレス反応 Unfolded protein response (UPR) を引き起こし、タンパク質の折り畳みに関与する因子群を高発現することが知られているが、この反応を制御する転写因子 HacA を活性型に変換し高発現させることによって分泌効率が高められた例が報告されている (65)。また、例えば GPI アンカー型タンパク質などの細胞膜に局在するタンパク質を分泌させたい場合、GPI アンカー認識配列などの膜局在に関与するアミノ酸配列部分を欠損させることにより分泌効率が向上した例もある (66)。

酵素の高い生産性を確保するには、生成した酵素の分解を抑えることも重要である。第一章でも述べたように、生成した酵素が宿主のプロテアーゼによって分解される例が多くみられたが、遺伝子破壊によって宿主のプロテアーゼ活性を低減させることにより、生産性が改善した例が多く知られている (67,11)。生物は通常、複数のプロテアーゼ遺伝子を保有しているため、菌体外プロテアーゼ遺伝子の転写を網羅的に制御する PrtT (14) などの転写因子の遺伝子を遺伝子破壊することにより、複数のプロテアーゼに由来する活性を一度に低減することもできる。第一章の戦略のように、内在性のプロテアーゼ活性が低い微生物を宿主として利用する方法もある。

規制対応以外の実用性の向上には、以下のような例がある。

生産コストを低減するには、酵素発酵生産後の精製工程の簡略化も有効である。遺伝子組換え技術で可能な精製工程の簡略化としては、遺伝子破壊などによる副産物の低減が挙げられる。アミラーゼやセルラーゼのように宿主微生物が本来生成するタンパク質は主要な副産物となり、最終製品で望まれない場合は精製で除去する必要がある。これを宿主内であらかじめ遺伝子破壊などで低減させることにより精製を簡略化することができる。また、生産菌や培養条件によってはクエン酸やシュウ酸などの有機酸が生産され酵素収量を低下させる場合があるが、これらの生合成にかかわる遺伝子を不活化することにより、望まれない有機酸の生成を抑えることができる。また、近年のゲノム解析により多くの糸状菌が二次代謝産物の生合成遺伝子を有していることが明らかとなったが(18)、特に毒性が疑われる二次代謝産物の生合成遺伝子を破壊することにより、万が一のリスクを抑えることができる。これは、安全性の向上にも寄与する。この他、第二章で述べたようにリコンビナーゼを利用した発現カセットの位置特異的挿入は、同時に多コピー挿入することが可能になるため新しい酵素の生産菌構築が簡略化され、コスト低減につながる。

酵素生産に用いる生産菌や使用原料については、製造国内の法規制やコーシャ・ハラールなどの宗教対応に考慮する必要がある。一例として、欧州では抗生物質耐性の病原菌の出現を憂慮し、製造現場での抗生物質の使用を制限しているほか、生産菌の構築に抗生物質耐性遺伝子を使用することに対して強い懸念を示している(68,69)。そのため、欧州向けの製品開発の際はこの点に留意し、生産菌に抗生物質耐性遺伝子を残存させない構築技術の利用が望ましい。また、メタノール資化性酵母においてはメタノールを利用した強力な発現系が開発されているが、欧州では可燃性原料の扱いに規制があるため、メタノール非依存性の発現系の開発が試みられている。この一例を本章の第一節で述べる。遺伝子組換え技術で宗教対応を解決する例はこれまでのところ知られていないが、技術の広がりによって今後の解決課題になる可能性はある。

製品の生産技術は常に改良が必要となるが、生物による物質生産は生体反応の理解なしには制御や改良は難しい。このため生体反応の理解を深めるための基礎的研究が欠かせない。多くの企業では基礎的研究に費やす費用と時間が限られるため、アカデミアの活躍に期待するところが大きい。

近年はポストゲノム時代となり、多くの生物のゲノム情報が公開されているが、これらの情報を利用した比較ゲノム解析や転写解析(トランスクリプトーム)、タンパク質解析(プロテオーム)、代謝産物解析(メタボローム)などのオミクス解析が盛んになった。オミクス解析は細胞内

の生体活動を知る上で非常に有用であり、オミクスを統合的に解析するシステムバイオロジーの研究も盛んに行われている。

プロテオームは菌体内外のタンパク質を網羅的に解析する手法であるが、ゲノム配列の解読によって生体内にある推定タンパク質の同定が進み、プロテオームで検出された遺伝子産物であるタンパク質の同定が可能になった。トランスクリプトームが遺伝子の転写産物しか捉えられないのに対してプロテオームは細胞内に存在するタンパク質を検出できることから、生体内活動をより詳細に理解する上で有用である。プロテオームには技術的な課題 (70) が山積しているが、その有用性から今後は益々技術開発がなされるものと考えられる。本章の第二節でプロテオーム解析を用いた成果を述べる。

表 3-1. 酵素生産技術の開発分野と要素

目的分野	開発項目	検討要素・着眼点
生産性	転写・翻訳の強化	プロモーター/ リーダー配列/ ターミネーターの検討、コピー数増加、コドン最適化
	分泌能の向上	シグナル配列、膜アンカー領域の除去、UPR 転写因子の利用
	タンパク質分解阻止	プロテアーゼ活性の低減、ERAD 回避
	代謝制御	有機酸生成制御
	形態制御	細胞形態制御、胞子形成制御
実用性	タンパク質の純化	副生成物の除去
	可燃性原料非依存	メタノール非依存性発現系の開発
	構築法簡略化	リコンビナーゼによる遺伝子挿入
安全性	二次代謝産物除去	二次代謝産物生合成遺伝子クラスター遺伝子破壊

3-2. 転写因子を利用した発現系の改良

3-2-1. 序論

Komagataella phaffii (旧 *Pichia pastoris*), *Ogataea methanolica* (旧 *P. methanolica*), *O. polymorpha* (旧 *Hansenula polymorpha*), *Candida boidinii* などのメタノール資化性酵母は高いタンパク質分泌能を有し、メタノールで強く誘導される *AOX1* や *DAS1* などのメタノール代謝関連酵素遺伝子 (図3-2-1) のプロモーターを利用したタンパク質の高生産技術が開発されている (71)。これまでに 200 種以上の異種タンパク質が発現されているが (72)、高密度培養が可能のためにタンパク質の生産量が多く、植物由来の hydroxynitrile lyase は 20 g/L (73)、ラット由来のゼラチンは 10 数 g/L (74) の生産性が得られている。これは *S. cerevisiae* に比べると格段に高い生産性であり、ワクチン製造への応用も期待されている (75)。しかしながら、地域によっては可燃性化合物の保管や取り扱いに規制があり、メタノールを製造原料として利用しにくい (76)。このため、強力なメタノール誘導活性を維持しながらメタノール非依存的に高生産性を得る技術が望まれている。

基質誘導型のプロモーターは正や負の転写因子によって制御される。例えば *A. oryzae* のタカアミラーゼのプロモーターは AmyR (77,78) という正の転写因子と CreA (79) という負の転写因子で制御されている。CreA はグルコースの存在下で転写活性を抑える負の転写因子であり、AmyR はタカアミラーゼのほかグルコアミラーゼ GlaA や α -グルコシダーゼ AgdA のプロモーターの活性化に必須な正の転写因子である (78)。AmyR はタカプロモーター内のタカアミラーゼ遺伝子上流-267 塩基付近に位置する配列 CGGAAATTTAA に結合し転写を活性化する (77)が、この転写因子の結合認識部位、すなわちシスエレメントを増幅することによって転写活性が向上することが知られている。例えば、*AgdA* 遺伝子プロモーター内のシスエレメントを含む 55 塩基の領域 Region III を 12 コピー増幅したところ、転写活性が野生型 *AgdA* 遺伝子プロモーターの 18 倍にまで増加した (80)。このように、転写因子やその認識部位を利用することにより、プロモーターの改良が可能である。

これまでに *AOX* (alcohol oxidase) や *DAS* (dihydroxyacetone synthase) などのメタノール資化性酵素遺伝子プロモーター制御因子はあまり多く知られていないが、*Candida boidinii* の *AOD* (alcohol oxidase) プロモーターを制御する転写因子として、メタノールの誘導に働く正の転写因子 Trm1 とグルコース枯渇時に脱抑制に働く正の転写因子 Trm2 が知られている (18)。*Pichia pastoris* の *AOX1* プロモーターの正の転写因子としては Trm2 のオルソログにあたる Mxr1 (82) が知られているほか、負の制御因子としてグルコース抑制に関わる

Nrg1p (83) Mig1p、Mig2p (84) が知られている。本研究では *Pichia pastoris* から正の転写因子のホモログを単離し、メタノール資化性プロモーターのエンジニアリングを試みた (85)。

3-2-2. 材料および方法

3-2-2-1. 使用菌株とプラスミド

K. phaffii (*Pichia pastoris*) GS115 株 (his4, Mut+, Invitrogen 社) を発現の宿主や *DASI* プロモーター、転写因子のクローニングに用いた。遺伝子の発現や転写因子の改変には pPIC9K (*HIS4*; P_{AOX1}-based expression vector) と pGAPZ α A (Zeocin®; P_{GAP}-based expression vector) (Invitrogen 社) を用いた。プラスミド pPIC9K 上の *AOX1* プロモーター P_{AOX1} に代わるメタノール誘導性プロモーターとして、*DASI* 遺伝子上流 1kb の DNA 断片をクローニングし、これを *DASI* プロモーター P_{DASI} として用いた。発現試験のモデル酵素遺伝子としては、コドン最適化した *Citrobacter braakii* 由来のフィターゼ遺伝子 (85) を用いた。

3-2-2-2. 培養条件

フラスコ培養には YPD 培地 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) を用い、30°C、3 日間培養した。メタノールで発現を誘導する場合は、培養 2 日後にメタノールを 0.5-2% になるように添加し、培養を継続した。培養槽を用いた高密度培養は、Invitrogen 社のプロトコール (*Pichia* Fermentation Process Guidelines, version B 05 3002, 2002 Invitrogen Corporation) に従った。メタノール誘導を行う培養は、初期培地と流加培地の炭素源にグリセロールを用いて、培養 40 時間後にメタノールの流加を開始し、培地中のメタノール濃度が約 0.8% になり、かつ溶存酸素濃度が 20% 前後になるように流加した。グルコースで培養する際は炭素源にグルコースを用い、溶存酸素濃度が 10-30% となるように流加した。

3-2-2-3. 転写因子のクローニングと改変

C. boidinii *TRM1* 遺伝子のオルソログ *KpTRM1* を *P. pastoris* GS115 株からクローニングし配列を決定した (GenBank GZ456640) (86)。構造遺伝子を pGAPZ α A にサブクローニングし pGPrm を構築した。同様に *P. pastoris* の *MXR1* 遺伝子 (82) をクローニングし、構造遺伝子を pGAPZ α A にサブクローニングし pGMxr を構築した。

3-2-2-4. *DASI* プロモーター中の UAS/URS の同定とプロモーターの改変

DASI プロモーターの欠失変異体ライブラリーを作製し、各々下流にフィターゼ遺伝子をつないだ発現カセットを構築し、これを GS115 株の *HIS4* 遺伝子座に各 1 コピー挿入した (87)。これらの菌株をフラスコ培養し、メタノールを添加することによって発現誘導させ、培養上清中のフィターゼ活性を測定することによって、メタノール誘導に必要な領域 UAS_{DASI} と発現を抑制する領域 *URS* を同定した。*URS* を削除した *DASI* プロモーターの上流に UAS_{DASI} を 3 コピーまで増幅させ、同様にフィターゼ発現カセットを構築し *HIS4* 遺伝子座に 1 コピー挿入、フラスコ培養によりフィターゼ発現量を評価した。

3-2-3. 結果

3-2-3-1. 正の転写因子 *KpTRM1* のクローニングと構成的発現プラスミドの作成

K. phaffii (*P. pastoris*) のゲノム配列から *C. boidinii TRM1* 遺伝子のオルソログと推定される *KpTRM1* 遺伝子を見出し GS115 株からクローニングした。この遺伝子の遺伝子破壊株を作製したところ、メタノールを唯一の炭素源とする培地上での生育能を失い、*KpTRM1* がメタノールでの生育に必須であることが確認された (85)。同様に *C. boidinii TRM2* 遺伝子のオルソログで既に報告されている正の転写因子 *MXR1* 遺伝子のクローニングを行った。これらが *P. pastoris* のメタノール誘導性プロモーターの正の制御因子であるならば、これを構成的に発現させることによりメタノール誘導性プロモーターを構成的に活性化できると予測し (図 3-2-2)、*KpTRM1* 遺伝子と *MXR1* 遺伝子のプロモーター領域を構成的に発現する *GAP* プロモーターに置き換えたプラスミド *pGPrm*、*pGMxr* を構築し、各々 *AOX1* プロモーターでフィターゼ遺伝子を発現している形質転換体 *P. pastoris* *AOX94* 株に導入した。得られた形質転換体をグルコースを炭素源とした培地で培養すると、いずれも *AOX94* 株と比較して有意に高いフィターゼ生産性を示し、特に *pGMxr* を共発現させた場合に *pGPrm* の共発現株よりも 3 倍高い生産性を示した (図 3-2-3)。従って *AOX1* プロモーターでは *KpTRM1* よりも *Mxr1* の方が高い制御活性をもつことが示された。しかしながら、得られた生産性はメタノール誘導時の生産性に比べると 50 分の 1 程度であった。

3-2-3-2. *DASI* プロモーターに対する評価

次に *DASI* プロモーターを用いて同様の評価を行った。*DASI* は *AOX1* と同様にメタノール代謝に関わる主要な酵素の遺伝子である (図 3-2-1)。*C. boidinii* の *DASI* 遺伝子のオルソログを *P. pastoris* のゲノム配列から同定し、この遺伝子の 5' 上流領域 1kb を *DASI* プ

ロモーターとしてクローニングした。この *DASI* プロモーターの制御下でフィターゼ遺伝子を発現する DAS40 株に、先の pGPrm, pGMxr を共発現させ、グルコース培地でのフィターゼ生産性を評価した。その結果、DAS40 株はグルコース培地でフィターゼを生産しなかったのに対し、pGPrm を共発現させると、先に得られた AOX94 株の pGMxr 共発現株よりも 3 倍高いフィターゼの生産を示した (図 3-2-3)。一方、pGMxr の共発現株はフィターゼの生産に効果を示さなかった。このことから、*DASI* プロモーターは KpTRM1 単独で強く活性化されるのに対し、Mxr1 では活性化されないことが分かった。このように、*AOX1* プロモーターと *DASI* プロモーターでは KpTrm1 や Mxr1 による転写制御の様式が異なることが明らかとなった。

3-2-3-3. *DASI* プロモーターの UAS の探索

UAS を増幅することによる *DASI* プロモーターの活性の強化 (図 3-2-4) を目的として、メタノールによる転写活性化に必要なシスエレメントを含む UAS の同定を試みた。*DASI* プロモーターを 100 bp ずつ欠失させた変異ライブラリーを作製し、メタノール誘導時のモデル酵素フィターゼの発現量を調べたところ、*DASI* 遺伝子上流 -255~355 bp の領域を欠失させるとメタノール誘導活性が著しく低下することが観察され、この領域に目的のシスエレメントが存在すると結論し、UAS_{DASI} と名付けた (図 3-2-5)。また、*DASI* プロモーターの最上流域に欠失させると誘導活性が 50% 上昇する領域がみられ、この領域が転写活性を抑える URS であることが分かった。この URS を欠失させた短い *DASI* プロモーターの 5' 末端に UAS_{DASI} を 1 コピーから 3 コピーまで増幅した改良型 *DASI* プロモーターを作成したところ、UAS_{DASI} のコピー数が上がるほどメタノール誘導活性が上昇した (図 3-2-5)。3 コピー増やした UAS_{DASI} をもつ 28-2 株を培養槽における高密度培養で評価した結果、野生型 *DASI* プロモーターを持つ DAS40 株の 1.4 倍、*AOX1* プロモーターをもつ AOX94 株の 1.8 倍のフィターゼ生産性を得た。しかしながら、28-2 株に pGPrm を共発現させグルコース培地で培養したところ、UAS_{DASI} の増幅効果がみられなかった (表 3-2-1)。これは UAS_{DASI} が KpTRM1 の認識部位 (シスエレメント) を含まず、この領域には KpTRM1 以外の別の転写因子が関与することを示していた。データを見直したところ、KpTRM1 には上流 -355~455 塩基の領域がより重要であることが分かり ESP_{DASI} と名付けた (図 3-2-5)。この領域に KpTRM1 の結合認識部位が存在すると考えられた。

3-2-4. 考察

プロモーターの転写活性は、基礎転写因子を含め複数の転写因子や共役因子によ

って制御されるため、今回のように単独の因子を技術改変することにより転写の誘導条件を改変できるのは驚くべきことであった (89)。メタノール誘導性 *AOX1* プロモーターにはグルコース抑制時にはたらく負の転写因子 Mig1 と Mig2 の存在が知られているため、グルコース培地ではメタノール誘導性プロモーターは抑制され発現しないと予測された。本研究に於いて、構成的 KpTRM1 の共発現によりグルコース培地でも *DASI* プロモーターが活性化された理由としては、① *DASI* プロモーターが Mig1 と Mig2 による制御を受けない、または受けにくい、② 用いた評価条件下では培地中のグルコースが培養途中で消費され、グルコースによる転写抑制が解除されて *DASI* プロモーターが活性化された、の 2 点が考えられる。実際、フラスコ培養ではグルコース培地中のグルコースは培養 3 日後までに枯渇するほか、高密度培養では培養槽中のグルコース濃度を 0.2g/L 以下になるように培養したので、グルコース抑制がかからなかった可能性がある。

本研究で新しく得られた知見として、同じメタノール誘導性プロモーターでも *AOX1* プロモーターと *DASI* プロモーターでは制御に関わる転写因子が異なることが明らかとなった (図 3-2-6)。特に、*AOX1* プロモーターは脱抑制時 (グルコース枯渇時) に働く正の制御因子 Mxr1 で活性化されるのに対し、*DASI* プロモーターは Mxr1 で活性化されなかった。一方 *DASI* プロモーターを十分活性化させる KpTRM1 が *AOX1* プロモーターを強く活性化しなかったのも興味深い。Wang ら (2017) は、新しい *AOX1* プロモーターの正の制御因子として Mit1 (90) を見出したが、この Mit1 は KpTrm1 の下流に存在する制御因子であり、KpTrm1 がメタノールで最初に誘導される転写因子であることを明らかにした。従って、*AOX1* プロモーターは間接的に KpTRM1 の制御下にあり、*AOX1* プロモーターを直接活性化する正の制御因子は Mit1 であると考えられる。*DASI* プロモーターと Mit1 の関係は明らかではない。このように、ともにメタノール代謝に働く *AOX1* と *DASI* の発現制御が異なる理由としては、毒性の高いメタノールや代謝産物を速やかに分解するために、まず代謝経路の下流に位置する *DAS* をメタノールで誘導し、下流の準備ができた後に *AOX* を発現させメタノールの分解を開始する、また、グルコース枯渇時はグルコースに代わる炭素源としてのメタノールの代謝を速やかに進めるために、まず *AOX* を活性化し続いて *DAS* を発現するのではないかと考えられる。なお、現在までにグルコース枯渇時の *DASI* 遺伝子の発現機構は明らかとなっていない。

メタノール非依存的な発現系については、他の研究グループから *AOX1* プロモーターをメタノール非依存的に発現させる技術が報告されている (84,91-92)。例えば、Mit1 や Mxr1 のプロモーターを炭素源の枯渇時にメタノールの添加なしで働く *CAT* プロモーター (91) や *AOX2* プロモーター (92) に置き換え、メタノールの利用無しに発現させた例や、

Mig1/Mig2/Nrg1 を不活化させたうえで Mit1 のプロモーターを *GAP* プロモーターに置換し、培養の炭素源をグルコースからグリセロールに変えて培養した例 (84) が報告されているが、いずれもメタノール誘導時ほどの高生産は得られていない。

本研究で示したように、正の転写因子のシスエレメントを含む UAS を増幅させることにより転写活性を向上できることが知られているが、その機構は明らかとなっていない。考えられる機構の一つには UAS の増幅により転写因子が多数リクルートされ、転写開始に関わる基本転写因子との相互作用が増強されて転写活性を高める可能性が挙げられる。あるいは、転写因子や転写共役因子にはヒストンのアセチル化活性をもつものが知られていることから、UAS の増幅により転写因子や共役因子が多数リクルートされ、プロモーター周辺のヌクレオソームのヒストンがアセチル化されることによりクロマチン構造が緩み、転写しやすい形になって転写活性が高められるのではないかと考えている。

本研究では *DAS1* プロモーターのメタノール誘導時に働く UAS_{DAS1} が見出され、これを増幅することによりメタノール誘導活性を向上することができた。当初の予想とは異なり、UAS_{DAS1} には KpTrm1 のシスエレメントが含まれておらず、その代わりに、KpTRM1 のシスエレメントを含むと考えられる ESP_{DAS1} が見出された。このことは、UAS_{DAS1} と同様に ESP_{DAS1} を増幅することにより、*DAS1* プロモーターのメタノール非依存的な発現を向上できることを意味する。また、本研究の成果を受け、その後、他のグループによって *AOX1* プロモーターに働く正の転写因子 Mit1 が発見された。今後、本研究で用いた戦略と同様、Mit1 のシスエレメントを含む UAS を同定し、これを増幅することにより *AOX1* プロモーターのメタノール誘導活性をさらに向上できることが期待されるほか、Mit1 の構成的な発現と組み合わせることにより、メタノール非依存的な *AOX1* プロモーターの発現系の開発が期待できる。このように、本研究で得られた知見は、広くメタノール資化性酵母の発現系の改良に役立つものである。

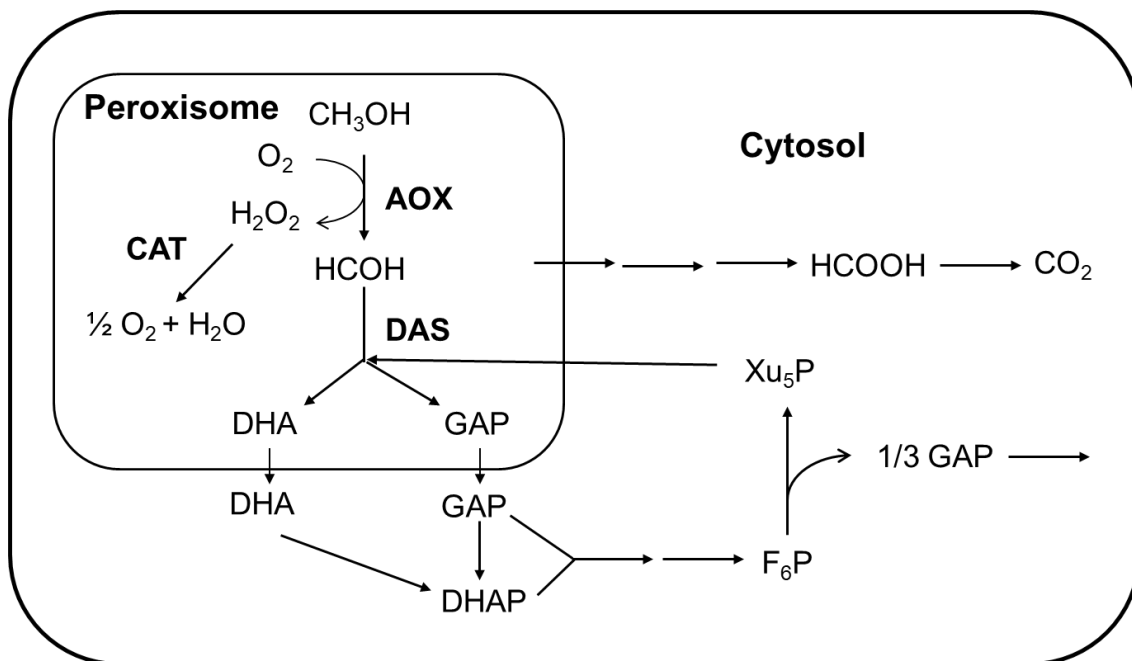
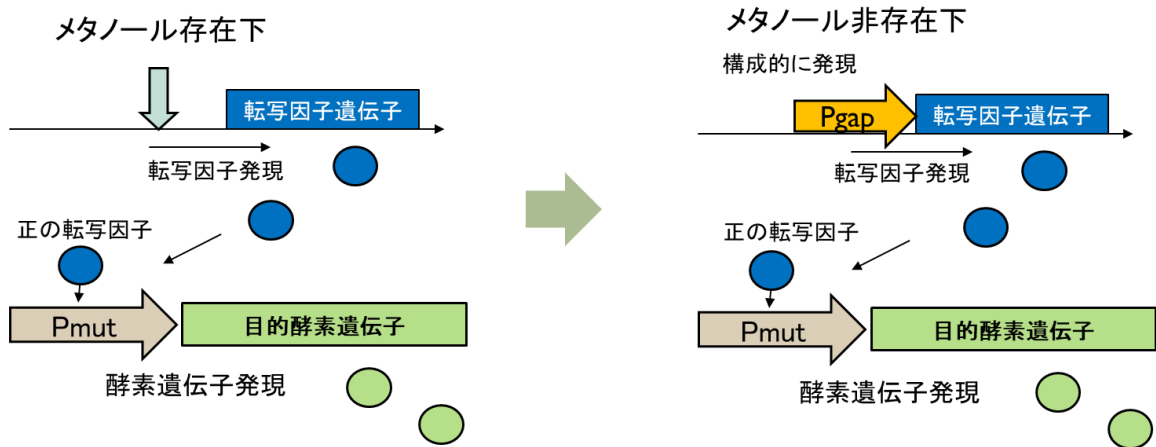


図 3-2-1. メタノール資化性酵母のメタノール代謝経路 (文献 88 参照)

AOX: alcohol oxidase, DAS: dihydroxyacetone synthase, CAT; catalase



Pmut: メタノール資化性酵素遺伝子プロモーター

図 3-2-2. 正の転写因子の発現制御によるメタノール非依存的発現系の開発戦略

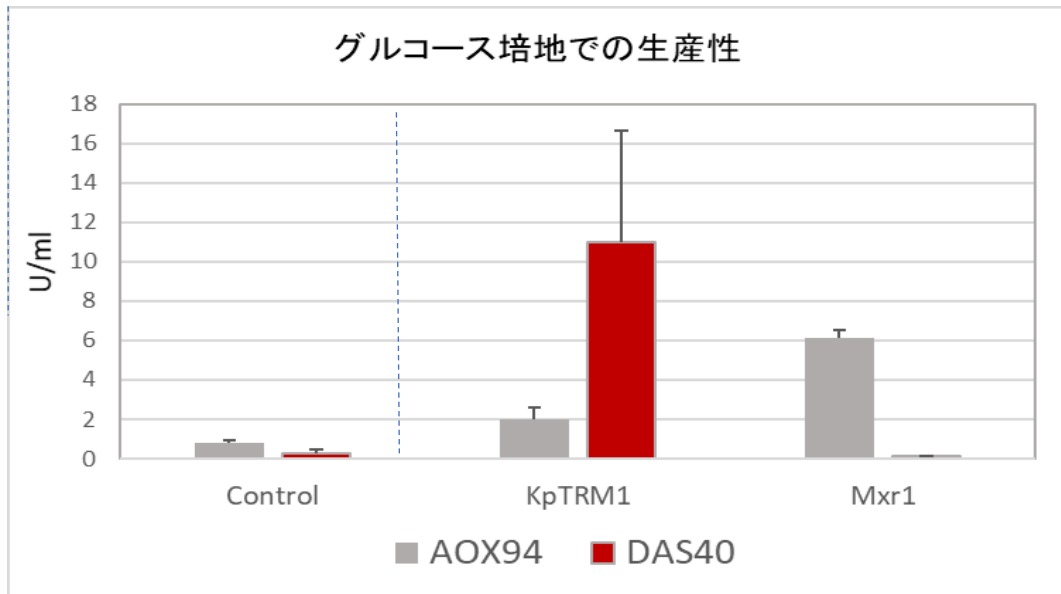


図 3-2-3. 構成的に発現する正の転写因子の共発現によるグルコース培地での生産性

AOX1 プロモーターでフィターゼを発現する AOX94 株と、*DAS1* プロモーターでフィターゼを発現する DAS40 株に、正の転写因子 KpTrm1 または Mxr1 をそれぞれ *GAP*プロモーターを用いて構成的に共発現させた。Control は転写因子の共発現のない AOX94 株と DAS40 株。

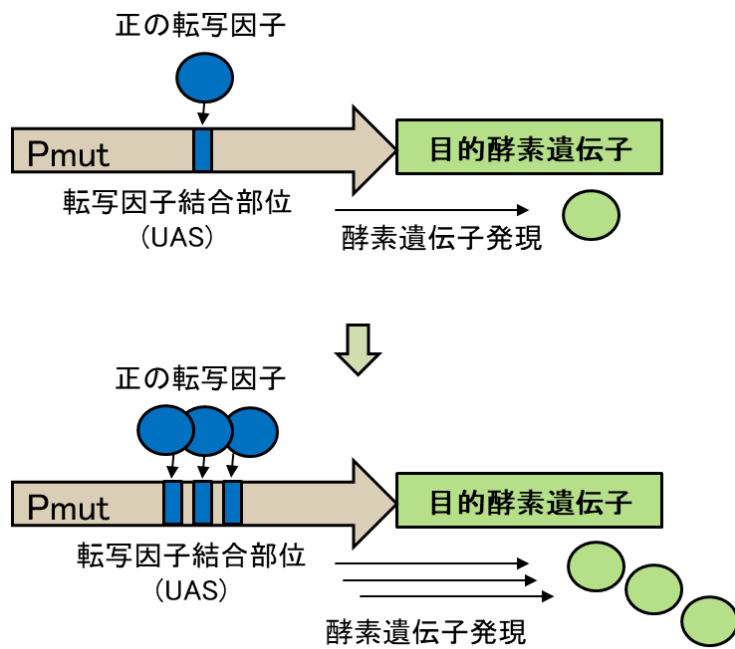


図 3-2-4. UAS の増幅による転写活性の向上の概念図

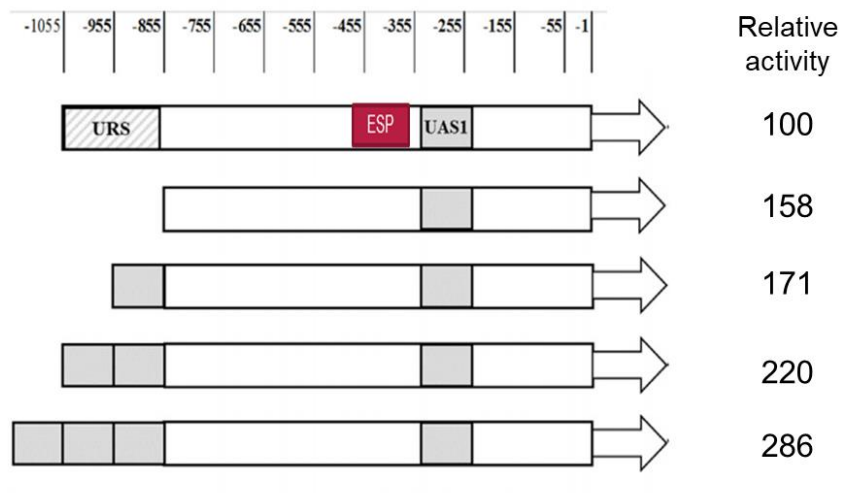


図 3-2-5. 改変型 *DASI* プロモーターのメタノール誘導による転写活性 (文献 85 から改変)
 活性は野生型 *DASI* プロモーターの活性を 100 とした相対活性で表している。

URS, Upstream Restriction Sequence; UAS, Upstream Activation Sequence.

UAS1= UAS_{DASI}; ESP = ESP_{DASI}

ESP_{DASI} は構成的 KpTrm1 が働くために必要な領域。

表 3-2-1. 高密度培養によるフィターゼ生産量

	菌株	プロモーター*	共発現	U/ml
メタノール培養	AOX94	<i>AOX1</i>	なし	4000
	DAS40	<i>DAS1</i>	なし	5140
	#28-2	改変型 <i>DAS1-x3</i>	なし	7290
グルコース培養	GAP48H	<i>GAP</i>	なし	4000
	DPrm11	<i>DAS1</i>	pGPrm	1600
	2P-4	改変型 <i>DAS1-t</i>	pGPrm	4960
	28P-14	改変型 <i>DAS1-x3</i>	pGPrm	4800

*改変型 *DAS1-x3* は URS を除去し UAS_{DAS1} を 3 コピー増やした改変 *DAS1* プロモーター。
 改変型 *DAS1-t* は URS を除去した改変 *DAS1* プロモーター。

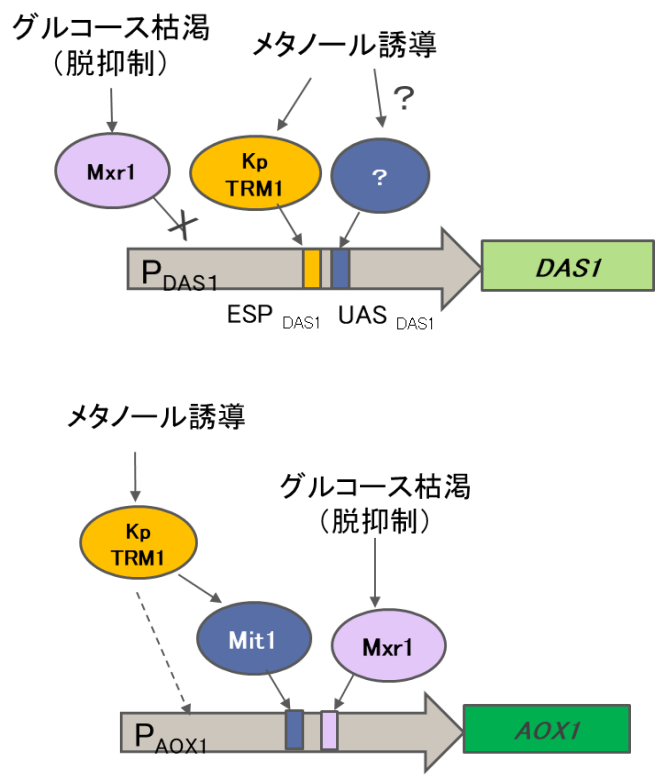


図 3-2-6. メタノール酸化性酵素遺伝子 *AOX1* と *DAS1* における転写制御

KpTrm1, メタノール誘導時に働く正の転写因子; *Mxr1*, グルコース枯渇時(脱抑制時)に働く正の転写因子; *Mit1*, *AOX1* 遺伝子の正の転写因子(文献 90)。

3-3. 酵素を生産している糸状菌のプロテオーム解析

3-3-1. 序論

2003年にヒトゲノムの解読が完了して以来、次世代シーケンサー(NGS)の登場によって様々な生物のゲノムが解読され、生物が保有する遺伝子の解析が行われた。これを基に活動している生体内での遺伝子の転写や翻訳の状況を網羅的に解析し、生体活動を分子レベルで解明するオミクス解析が盛んになった。転写産物を解析するトランスクリプトーム、翻訳産物であるタンパク質を解析するプロテオーム、代謝産物を解析するメタボロームが主に行われるが、生体活動をより正しく把握するためには、これらを統合的に解析するシステムバイオロジーが必要となる(93)。

トランスクリプトームがタンパク質の鋳型となる転写産物を解析するのに対し、プロテオームは細胞内に存在するタンパク質を直接とらえることができる。糸状菌のプロテオーム解析としては、低酸素下におかれた *Aspergillus nidulans* の挙動の解析(94)や胞子の発芽時の生体内活動の解析(95)、同じく低酸素下に置かれた *Aspergillus fumigatus* の抗生物質生産に関する解析(96)や Heat shock response により反応する因子の解析(97)などが行われている。

酵素生産をしている *Aspergillus niger* のプロテオーム解析も複数行われている(98-101)。いずれも2次元電気泳動法を用いたプロテオミクスである。Miguelら(2010)は、D-キシロースを用いてセルラーゼやヘミセルラーゼを誘導した細胞内では、エキソサイトーシスやエンドサイトーシスの関与が知られている低分子量Gタンパク質が増加することを観測した(98)ほか、小胞体の品質管理(ER-associated degradation, ERAD)に関わるシャペロンである Cdc48 や 20S プロテアソームの全構成タンパク質を検出した(99)。同様に、Lu(2010)は、キシロースまたはマルトースを用いて培養した *A. niger* の菌体内外のプロテオーム解析を行い、菌体内では TCA 回路のリンゴ酸脱水素酵素(Mdh)や解糖系のフルクトースビスリン酸アルドラーゼ(FbaA)、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素(Gpd)は、いずれの炭素源を用いても高濃度で存在するが、活性酸素の除去に働く SOD やペルオキシレドキシンはマルトース培養のみで多く存在することを示した(100)。また、興味深いことに、フラスコ培養した細胞とリアクター培養した細胞では、観測されるタンパク質に違いがみられることを示した。Jacob(2009)は、3種の異なる酵素を過剰生産する *A. niger* 形質転換体について、トランスクリプトームとプロテオームを合わせた統合的解析を行い、いずれの解析でも高い値を示すタンパク質として、炭素源・窒素源の代謝に関わる酵素群、酸化ストレスに対応するタンパク質、タンパク質の折り畳みと ERAD に関与する因子を同定した(101)。

また、Jacob (2009) は細胞からタンパク質抽出液を調製する際に 3 種類の方法を評価し、プロテオームで検出されるタンパク質は抽出法で違いがあることを示した (101) が、これはプロテオミクスには技術的な課題が存在することを示す (102)。この課題はタンパク質の抽出方法に限らず、現在までに、例えば特定のオルガネラに絞った解析法や定量性を高める技術開発など、様々な技術改良が行われているところである。プロテオーム解析はコストと手間がかかることから、トランスクリプトームに比べると未だ解析の例が少ない。このような状況下で、プロテオームの解析例を共有することには大きな科学的意義がある。そこで、本研究では産業用酵素の製造に利用される *A. niger* の系統株を用いて、酵素生産中の細胞内反応を探る目的でプロテオーム解析を行った (103)。

3-3-2. 材料および方法

3-3-2-1. 使用菌株と解析用サンプル

酵素生産菌株として担子菌 *Trametes cingulate* のグルコアミラーゼを高生産する *A. niger* C1100 株、比較対照として当該酵素を生産しない同系統の C1844 株を用いた (103)。両株は内在性のグルコアミラーゼとアミラーゼを遺伝子破壊により不活化している。両菌を 5L の培養槽で、酵素の実生産を模倣した方法で培養し、48 時間、72 時間、120 時間後の培養液を採取、プロテオーム解析用のサンプルとした。しかし、72 時間、120 時間後のサンプルは細胞抽出液の作製が困難だったため、解析は主に培養 48 時間後のサンプルを用いて行った。

3-3-2-2. 細胞抽出液の作製と二次元電気泳動

採取した培養液サンプルから吸引ろ過で菌体を収集し、多量の水で洗浄後脱水、液体窒素により凍結させた。これを液体窒素下で乳鉢を用いて粉碎し、Toda らの方法 (http://proteome.tmig.or.jp/2D/2DE_method.html) により細胞抽出液を調製した。得られた抽出液のタンパク質濃度をそろえて、再び Toda らの方法に従って二次元電気泳動を行った。各スポットのタンパク質は Xcise (島津製作所) を用いてゲルから抽出後、トリブシンにより消化し得られたペプチド断片のアミノ酸配列を MALDI-TOF_MS (AXIMA CFR Plus、島津製作所) により決定し、NCBI のデータベースからタンパク質を同定した。タンパク質の機能については *Aspergillus* Genome Database (AspDB、<http://aspgd.org/>) (104) を参照した。

3-3-2-3. スポットの定量的解析

培養 48 時間後のサンプルを用いて二次元電気泳動を行い、得られたスポットをクマシーブリアントブルーで染色したのち、各スポットの強度を画像処理（Xcise、島津製作所）により測定した。これを用いて内在タンパク質のスポット全体の強度に対する各スポットの強度比を%で表した。複数のスポットとして検出されたタンパク質は各スポットの合計をタンパク質の強度とした。

3-3-3. 結果

3-3-3-1. 検出されたタンパク質

合計 14 枚の二次元電気泳動ゲル上の 1824 スポットから 343 のタンパク質を同定した。図 3-2-1 に内訳を示したが、最も多かったのは炭素や窒素化合物の代謝に関わる酵素群で全体の 39% を占めた。続いて多かったのはタンパク質の分泌や細胞内タンパク質の品質管理 (ERAD) 並びにシグナル伝達などに関する機能性因子群で、全体の約 20%を占めた。この他、転写・翻訳に関わる因子が 17%を占めていた。一方で、染色体の主要タンパク質であるヒストンや膜タンパク質、転写因子など、存在しているにもかかわらず検出されないタンパク質もあった。ヒストンは強い塩基性のため、本研究で用いた等電点電気泳動では検出されなかった可能性がある。また、膜タンパク質は用いた抽出法では十分抽出されなかった可能性が挙げられる。転写因子はタンパク質が不安定なため検出されなかった可能性が考えられた。

3-3-3-2. 酵素生産株と非生産株の比較

培養 48 時間後のプロテオームを用いて、外来のグルコアミラーゼを除いた内在性のタンパク質について、酵素生産菌と非生産菌における各蛋白質の出現量を比較した。各タンパク質のスポット強度を全体に占める%で表し、出現比として酵素生産株と非生産株について比較した。上位 30 のタンパク質を図 3-2-2 に示した。対照株では解糖系など炭素源の代謝に関する酵素群の強度が高かったのに対し、酵素生産株ではタンパク質の折り畳みに関わる小胞体シャペロン BipA やカルネキシン (ClxA)、タンパク質の S-S 結合を付け替える酵素である protein disulfide isomerase (PDI) の強度が高かった。また、ERAD においてタンパク質の分解に関わる因子である Cdc48 も酵素生産株で高濃度だった。このほか、細胞質やミトコンドリアで働く HSP70 ファミリーのシャペロン Ssa、Ssb、Ssc や、WWドメインを有する CSAP や PHドメインを有する Aph1 などシグナル伝達に関わると考えられる機能性タンパク質が酵素生産株で高まっていたほか、真核生物によく保存されている TCTP (Translationally Controlled Tumor

Protein) のホモログ AngA や 14-3-3 のオルソログ ArtA, ArtB は両株で高濃度に存在していたが、特に酵素生産株の方がより高強度に観察された。興味深い結果として、酵素生産株では解糖系など炭素化合物の代謝に関わる酵素群の濃度が相対的に低下しており、生体活動が酵素タンパク質の生合成や分泌にシフトしていることが予測された。

酵素生産の有無にかかわらず高濃度で観察されたタンパク質としては、前述の代謝に関わる酵素群のほか子囊菌類に特徴的な Woronin body を形成する HexA やアクチンに結合するトロポミオシン Tpm1 が挙げられ、これらが培養中の菌糸生長に関わっていることが示唆された。これらの酵素生産株における濃度は対照株と同程度であったことから、酵素の高生産には大きく関与しないと考えられた。

3-3-3-4. 分泌タンパク質の菌体内での蓄積と分解

酵素生産株である C1100 株は担子菌グルコアミラーゼを効率よく分泌生産するが、驚いたことに、培養初期の培養開始 48 時間後から一部が菌体内に蓄積されており、72 時間後、120 時間後になるとさらに蓄積量が増加し、且つ細胞内で分解されている様子が観察された(図3-3-3)。これは生合成されたグルコアミラーゼのすべてが分泌されておらず、一部が細胞内で分解されていることを示唆する結果であった。

3-3-4. 考察

前述のようにプロテオミクスには技術的な課題が数多くあり、例えば分子量が極端に大きいまたは小さいタンパク質や極端に疎水性なタンパク質、等電点が極めて高いまたは低いタンパク質は2次元電気泳動法で検出されにくい。また、細胞からの抽出方法によって検出されるタンパク質が異なることが知られている。本研究で用いた抽出法は親水性の細胞質タンパク質の抽出に適した方法であったため、核などのオルガネラに局在するタンパク質や膜タンパク質が検出されにくかった可能性がある。結果の考察にはこの点に留意する必要があるが、最も多く検出されたのは炭素や窒素化合物の代謝に関わる酵素群で、これまでに報告されていた結果と一致する。これは生産菌が培地中の炭素源や窒素源を摂取しながらエネルギーを得て増殖し、酵素生産を行っていることを示している。今回得られた知見としては、特に解糖系の酵素群が対照に比べて酵素生産株で低濃度になっていた。このことから、酵素生産時には糖の代謝よりも酵素タンパク質の生合成や分泌に生体活動がシフトしていると考えられた。後述するように、特定のタンパク質を高分泌させると他の分泌酵素の発現が抑えられる RESS 現象(105)が知られているが、解糖系酵素は分泌酵素ではないため、観察された現象は RESS とは

異なる。

続いて濃度が高かったのは、小胞体でタンパク質の折り畳みに関わるシャペロン類と小胞体品質管理 ERAD に関わる因子で、特に酵素生産株で多くみられたことからタンパク質を分泌生産している菌体の特徴といえる。これは分泌タンパク質を高発現させたときに小胞体を感じるストレス反応 UPR で見られる現象と一致する。

このほかシグナル伝達に関与すると考えられる機能性因子が多く観測されたが、これは生産菌が培養中に絶えず変化する培地成分の濃度や温度、pH、溶存酸素濃度など菌体を取り巻く環境の変化に対応しながら増殖し物質生産を行っている様子を反映しているものと考えられる。酵母で良く観察される HSP70 シャペロン Ssa、Ssb、Ssc (107)をはじめ、真核生物に共通の機能性因子 TCTP (108)や 14-3-3 (109)のホモログが高濃度で検出された。また本研究では新しく、WWドメイン (110)を有する CSAP や PHドメイン (111)を有する Aph1 などの機能未知タンパク質を見出した。これらの因子は酵母には存在せず糸状菌に特徴的な機能因子であることから、糸状菌を特徴づける形態や代謝などに寄与している可能性が考えられる。加えて cAMP 依存性プロテインキナーゼ PkaR が特に酵素生産株で濃度が高く検出され、これらの因子によるシグナル伝達が酵素生産時に重要な働きをしている可能性が示唆された。

形態に関わる因子としては、Woronin body のコアタンパク質 HexA やアクチンに結合するトロポミオシンが多く検出され、液体培養中の菌糸生長に関わっていることが示唆された。Woronin body (112)は損傷を受けた菌糸の溶解を防ぐ働きをもつことが知られ、セルラーゼ生産をしている *Trichoderma reesei* のプロテオーム (113)でも高濃度の HexA が検出されていることから、例えば培養槽中で糸状菌が攪拌翼により損傷を受け、これによる溶菌を防ぐために HexA が要求される可能性が考えられる。一方、発酵中の *N. crassa* (114)において菌糸の先端で HexA が盛んに生合成されることが報告されていることから、HexA は培養中の菌糸の先端伸長に寄与している可能性も考えられる。酵素生産株と対照株で濃度に差異がみられないことから、酵素生産には直接関与しないと考えられる。また、アクチンは分泌小胞の輸送を担っている (115、116) ことから酵素の分泌生産に重要な働きを持つと考えられるが、直接両者の関連を調べた研究は多くない。Torralba (1998) は、*A. nidulans* においてアクチンの重合を妨げるサイトカラシン A の酵素分泌に対する影響を調べたところ、サイトカラシン A の添加で α -ガラクトシダーゼの分泌が低減されたのを観察した (117)。トロポミオシンはアクチン重合のマスタータンパク質 (118) と言われておりアクチンの機能を支える役割を果たしているものと推定されるが、こちらも酵素生産株と対照株では差がみられず、酵素生産には直接関与して

いないものと考えられた。

興味深い結果として、良好に分泌生産されるグルコアミラーゼが菌体内に蓄積され、分解されている様子が観察された。これはグルコアミラーゼ遺伝子の高発現によって酵素タンパク質が多量に生合成されたにもかかわらず、一部が分泌されずに細胞内にとどまり、分解されたものと考えられるが、分解が ERAD によるものかオートファジーなどの別の機構によるものかは、本研究では明らかでない。分泌の過程には小胞体内でのタンパク質の折り畳みのほか、小胞体内での糖鎖の付加、ゴルジ体内での糖鎖修飾、さらには小胞体やゴルジ体から輸送小胞を介した細胞膜までの小胞輸送と多くの工程があり、各工程で複数の因子が関与している。Jacob (2009) は ERAD に関わる *doa* を不活化し、糖鎖の合成に関わる *scc* を過剰発現させることにより、分泌能がわずかながらに向上したと報告している (101)。また、Valkonen ら (2003) は、分泌によって引き起こされるストレス反応 UPR の正の制御因子 HacA を活性型にして高発現させることにより、異種タンパク質であるラッカーゼや牛キモシンの分泌量が向上したと報告している (65)。今回の酵素生産に於いて分泌工程のどこに律速段階があったのかを究明し、これを解決することによりさらなる生産性の向上が期待される。

本研究では酵素生産時には糖代謝経路が抑制されているのがみられ、生体活動が他にシフトしていることが分かったが、これは酵素生産の培養プロセスをデザインする際に有用な知見である。また、分泌生産されている酵素の一部が菌体内に蓄積し分解されていることが明らかとなり、分泌活性を改善することによりさらなる生産性の向上が期待できると考えられた。さらに、シグナル伝達に関わると予想される機能未知因子が複数見出され、酵素生産との関連が示唆された。液体培養中の菌糸生長については知見が少なく不明なところが多いが、本研究に於いて HexA やトロポミオシンが高濃度で見いだされ、液体培養における菌糸生長との関連が示唆された。以上、本研究で見いだされた知見は、今後、酵素生産における生体活動の理解をより深め、新たな生産技術開発の足掛かりとして有用である。

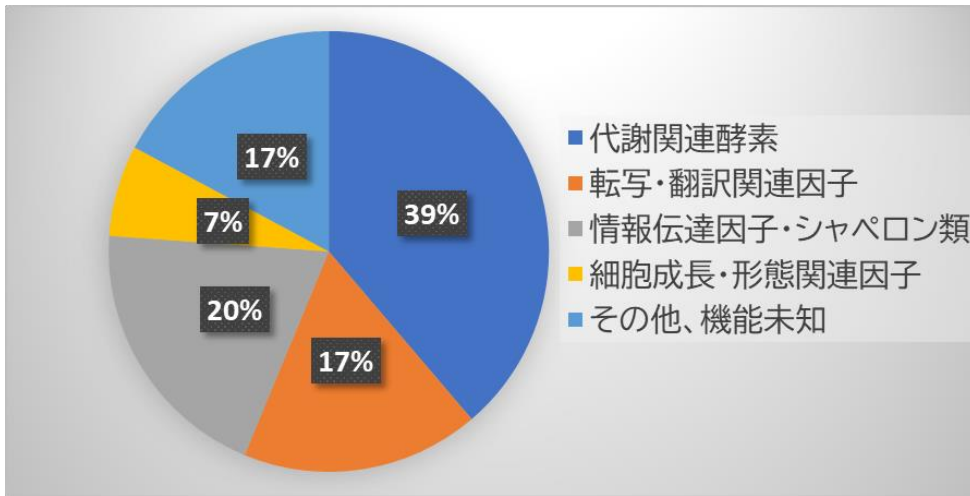


図 3-3-1. 検出されたタンパク質の機能性による分布

合計 1824 スポットから 343 種のタンパク質が同定された。

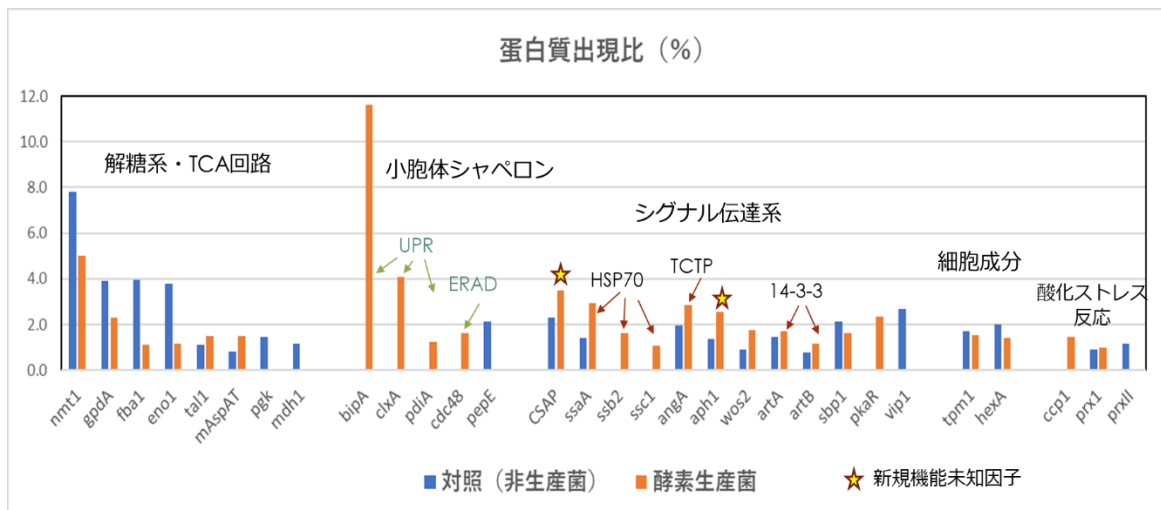


図 3-3-2. 酵素生産株と対照株における蛋白質の出現比の比較 (48 時間後のサンプル)
 酵素生産菌では、UPR (Unfolded protein response) や ERAD (ER-associated protein degradation) に関わる因子が高濃度で検出された。

CSAP と aph1 は新奇の機能未知因子で、それぞれ WWドメイン、PHドメインを有する。

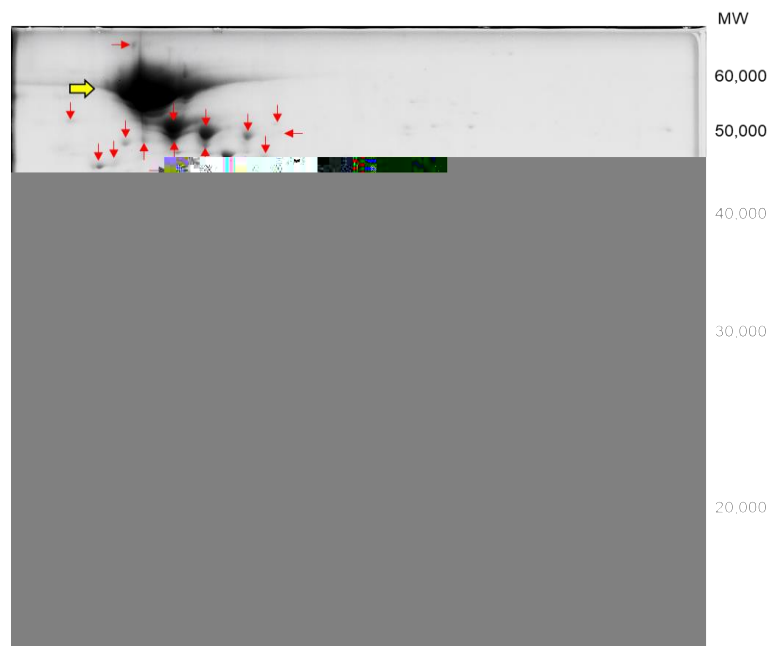


図 3-3-3. 分泌酵素の菌体内蓄積と分解（文献 103 より、一部修飾）

黄色矢印で示したスポットは分解前のグルコアミラーゼ、赤矢印で示したスポットはグルコアミラーゼの分解産物を示す。分子量が大きい赤矢印のスポットは、糖鎖付加によるものと考えられる。

総括

産業用酵素は、社会の持続的発展に貢献できる触媒として認知されている。本研究では、今後、遺伝子組換え真核微生物を利用した酵素生産技術の活用を加速させ、新たな有用酵素を世に送り続けるために技術開発に重要となる要素や着眼点を示し、これらを実証・検証することを目的とした。

第一章では、技術の出発点となる宿主の選択について具体的に検討した。まず、産業利用の観点から最も重要なのは安全性であることを述べ、9万種ともいわれる真核微生物のうち安全性に関する知見のある種は限られていることから、まずはすでに産業利用されている菌の近縁種から探索を始めるのが有用であることを示した。現在産業利用されている *A. oryzae*, *A. niger* の近縁種から、特に安全とみなされる種についてプロテアーゼ活性や形質転換能、異種タンパク質の生産能を評価し、*A. japonicus*, *A. aculeatus*, *A. foetidus* の3種を宿主候補として見出だした。各々最適な培養条件が異なり、条件によっては既存の *A. oryzae* よりも高い生産性を有することを示した。また、これらの菌種では転写因子 AmyR など機能性因子が相補的に働き、*A. oryzae* に由来する汎用プロモーターであるタカプロモーターなどのツールの利用が可能であることを示した。

第二章では、酵素の生産菌を開発するにあたり、製品化したい国や地域の規制をよく理解した上で戦略的に構築を始めるのが良いことを示した。具体的には、食品用酵素の安全性審査の手法が国や地域により異なることと、従来のランダム挿入による生産菌の構築では我が国の安全性審査で要求される挿入遺伝子の周辺配列情報を得にくい背景から、必要情報の取得に役立つ技術の開発を行った。その結果、NGSによるゲノム解読を利用して目的とする周辺配列情報を得る手法を確立できたが、その一方でランダム挿入された遺伝子断片と周辺領域で染色体の再構築が生じている例を見出した。このように必要情報の取得には手間やコストがかかる上、目的の情報が得られない可能性もあることから、必要情報が得やすい位置特異的挿入法で生産菌を構築するのが望ましいことを示した。そのためには、例えばコンビナーゼを利用した新しい技術の開発や、1コピー当たりの転写量を上げる技術が必要となってくる。

第三章では、生産技術の開発における重要要素と着眼点をまとめ、技術開発の目的が生産性の向上、実用性の向上と安全性の強化の3項目に分けられることを示した。生産性を高める技術としては、転写・翻訳・分泌の効率化や生成物の分解阻止の技術が挙げられる

が、中でも転写量の制御が最も重要であることから、転写因子やシスエレメントを利用した転写制御の改変や転写活性の増強を実証した。具体的には、メタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) における強力なメタノール誘導性の *DASI* プロモーターを利用して、メタノール非依存的な発現系の開発を行った。その結果、正の転写因子 KpTrm1 を構成的に発現させ、また、プロモーター内で抑制的に働く URS を除去、活性化する UAS_{DASI} を増幅することにより、従来法と遜色のないメタノール非依存的発現系が開発できた。さらに、新たなシスエレメント ESP_{DASI} を見出したほか、他の研究グループから新しい正の転写因子 Mit1 が報告されたことから、これらを利用してさらに高い生産性を得られる技術の開発が期待できるほか、汎用の *AOXI* プロモーター を利用したメタノール非依存的発現系の開発も可能となる。

転写制御のように、すでに知見が豊富にあり技術開発しやすい分野がある一方で、分泌や細胞内におけるタンパク質の分解、液体培養中での細胞生長と酵素生産の関連性など、未だ研究が進んでいない分野が多く存在する。今後、さらに生産性を高めていくには、これらの未解明な分野の知見を増やす基礎研究が重要となる。具体的な例として、酵素生産をしている *A. niger* の細胞内プロテオーム解析を行い、いくつかの新しい知見を得た。一例として分泌酵素が一部菌体内に蓄積・分解されていることを見出し、分泌効率の改善により生産性の向上が期待できることを示した。また、酵素生産時に高濃度に発現する機能未知の因子を複数見出し、保有ドメインからシグナル伝達に関わると予想されること、酵母には見られない糸状菌に特徴的な因子と推定されることを示した。これらの因子と酵素生産性との関与に関する研究は興味深い。

以上、本研究で得られた知見は、バイオ産業の活性化と、近年その必要性が重要視されているバイオエコノミー社会の構築に向けて、新しい遺伝子組換え酵素の生産を目指す研究者や事業者にとって有用なものとなると考えている。本研究が、これらの開発の参考となれば幸いである。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、多くの方々にご協力いただきました。

本研究を進めるにあたりご指導賜りました、筑波大学生命環境科学研究科教授 高谷直樹先生をはじめ、ご助言いただきました筑波大学生命環境科学研究科准教授 竹下典男先生、筑波大学生命環境科学研究科准教授 萩原大祐先生、筑波大学生命環境科学研究科助教 榊尾俊介先生の諸先生方に心より感謝致します。また、本研究の発表を許可して下さった、Novozymes A/S, Chief Science Officer, Executive Vice President の Claus Crone Fuglsang, 元上司の Novozymes A/S, Vice President, Production Strain Technology の Carsten Hjort の両氏に深謝いたします。

本研究の遂行にあたっては、Novozymes Inc. の Dr. Randy Berka (現 Archer Daniels Midland Company), Dr. Wendy Yoder (現 Perfect Day Foods Inc.)、ノボザイムズ ジャパン株式会社の研究員 宇田川裕晃氏、堤紀子氏、照井祐治氏、小島海平博士 (現みらかフォールディングス株式会社)、Novozymes China の研究員 孔祥雨女史、ほか多くの方々にご協力いただきました。ここに感謝いたします。また、共同研究を進めるにあたり、京都大学大学院農学研究科教授 阪井康能先生、同准教授 由里本博也先生、金沢工業大学ゲノム生物工学研究所前所長 大箸信一先生には、多大なご指導を賜りました。ここに深く感謝いたします。また、株式会社ジナリスの竹田綾博士 (現株式会社サイキンソー)、上村泰央博士 (現株式会社ジーンベイ) の両氏からも多大なご協力を頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。

また、本研究の推進を応援してくださいました、東北大学大学院農学研究科教授 五味勝也先生、東北大学大学院農学研究科教授 阿部敬悦先生に感謝いたします。

最後に、常に心の支えであった両親や家族に心より感謝いたしますとともに、励まし続けてくれながら、完成を待たずに昨年他界した父、高木健治に本研究を捧げます。

参考文献

1. 上島孝之 (1993) 産業用酵素、丸善株式会社出版
2. BCC Research, (2018) Global Markets for Enzymes in Industrial applications. http://researchstation.jp/report/BCC/0/Industrial_Enzyme_2023_BCC053.html
3. Falch EA. (1991) Industrial enzymes — Developments in production and application. *Biotechnology Advances*. 9: 643-658
4. Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products (2015) List of enzymes, updated May 2015. https://amfep.org/_library/_files/Amfep_List_of_Enzymes_update_May_2015.pdf
5. Gwynne DI and Devchand M. (1992) Expression of Foreign Proteins in the Genus *Aspergillus*. In: Bennett JW and Klich MA (eds), *Aspergillus -Biology and Industrial Applications*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp203-216
6. Christensen T, Woeldike H, Boel E, Mortensen SB, Hjortshøj K, Thim L, Hansen MT (1988) High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae*. *Bio/Technology* 6: 1419- 1422
7. Harkki A, Uusitalo J, Bailey M, Penttilä M, Knowles JKC. (1989) A novel fungal expression system: secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology*, 7: 596-603
8. Verdoes JC, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ. (1995) Molecular genetic strain improvement for the overproduction of fungal proteins by Filamentous fungi. *Appl. Microbiol Biotechnol* 43: 195-205
9. Gouka RJ, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ. (1997) Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 47, 1-11 ...
10. de Vries RP, Burgers K, van de Vondervoort PJI, Frisvad JC, Samson RA, Visser J. (2004) A new black *Aspergillus* species, *A. vadensis*, is a promising host for homologous and heterologous protein production. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3954-3959
11. Berka RM, Kodama KH, Rey MW, Wilson LJ, Ward M. (1991) The development of *Aspergillus niger* var. *awamori* as a host for the expression and secretion of heterologous gene products. *Food Biotechnology*, 19, 681-685
12. Spök A. (2006) Safety regulations of food enzymes. *Food Technol Biotechnol*. 44: 197–209.
13. Fleissner A, Dersch P (2010) Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:1255–1270.
14. Punt PJ, Schuren FHJ, Lehmbeck J, Christensen T, Hjort C, van den Hondel CAMJJ. (2008) Characterization of the *Aspergillus niger prtT*, a unique regulator of extracellular protease encoding genes. *Fungal Genetics and Biology* 45: 1591-1599
15. Cherry B, Bashkirova E, de Leon AL, Jin Q, Udagawa H, Takano H, Takagi S, Berka RM (2010) Analysis of an *Aspergillus niger* glucoamylase strain pedigree using comparative genome hybridization and real-time quantitative polymerase chain reaction. *Ind Biotechnol* 5:237–244

16. Niu J, Arentshorst M, Nair PDS, Dai Z, Baker SE, Frisvad JC, Nielsen KF, Punt PJ, Ram AFJ. (2016) Identification of a Classical Mutant in the Industrial Host *Aspergillus niger* by Systems Genetics: LaeA Is Required for Citric Acid Production and Regulates the Formation of Some Secondary Metabolites. *G3 (Bethesda)*. 6: 193–204.
17. Arnau J, Yaver D, Hjort CM. (2020) Strategies and Challenges for the Development of Industrial Enzymes Using Fungal Cell Factories. H. Nevalainen (ed.), *Grand Challenges in Fungal Biotechnology, Grand Challenges in Biology and Biotechnology*. © Springer Nature Switzerland AG 2020, pp179-210
18. Frisvad JC, Møller LLH, Larsen TO, Kumar R, Arnau J. (2018) Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 9481–9515
19. Sakaguchi K, Gomi K, Takagi M, Horiuchi H (1992). Fungal enzymes used in oriental food and beverage industries. In Kinghorn JR and Turner G (eds), *Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi*, Blackie Academic & Professional, Glasgow, pp54~99
20. 塚越規弘 (2001) V. 糸状菌, pp 79-102, 生物化学実験法 45 組換えタンパク質生産法、塚越規弘 編著、学会出版センター、東京
21. Berka RM, Yoder W, Takagi S. Boominathan KC. (1995) *Aspergillus* expression system. US5667990
22. Hynes MJ, Corrick CM, King JA (1983) Isolation of genomic clones containing the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* and their use in the analysis of structural and regulatory mutations. *Molecular and Cellular Biology*. 3: 1430-1439
23. Gritz L, Davis J (1983) Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 25: 179-188
24. Boel E, Høge-Jensen IB. (1988) Recombinant *Humicola* lipase and process for the production of recombinant *Humicola* lipases. EP0305216
25. Yelton MM, Hamer JE, Timberlake WE. (1984) Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81: 1470–1474.
26. Ballance DJ, Buxton FP, Turner G. (1983) Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochem Biophys Res Commun*. 112: 284–289.
27. Nowotny A. (1979) Quantitative Radial Immunodiffusion. In: *Basic Exercises in Immunochemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp251-254
28. Korman DR, Bayliss FT, Barnett CC, Carmona CL, Kodama KH, Royer TJ, Thompson SA, Ward M, Wilson LJ, Berka RM. (1990) Cloning, characterization, and expression of two alpha-amylase genes from *Aspergillus niger* var. *awamori*. *Curr Genet*. 17: 203-12.
29. Gomi K (2019) Regulatory mechanisms for amylolytic gene expression in the koji mold

- Aspergillus oryzae*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2019, VOL. 83, NO. 8, 1385–1401
30. Varga J, Kocsube' S, To'th B, Frisvad JC, Perrone G, Susca A, Meijer M, Samson RA. (2007) *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriolate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 1925–1932
 31. Parenicová L, Skouboe P, Frisvad J, Samson RA, Rossen L, ten Hoor-Suykerbuyk M, Visser J. (2001) Combined Molecular and Biochemical Approach Identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as Two Species. Appl Environ Microbiol. 67: 521-7.
 32. Magnuson B, Munro I, Abbot P, et al. (2013) Review of the regulation and safety assessment of food substances in various countries and jurisdictions. Food Additives & Contaminants: Part A. 30: 1147–1220.
 33. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). (2011) Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use. EFSA Journal. 2011; 9:2193.
 34. Olempska-Beer ZS, Merker RI, Ditto MD, DiNovi MJ. (2006) Food-processing enzymes from recombinant microorganisms – a review. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 45: 144-158.
 35. JECFA. (2001) General specifications and considerations for enzyme preparations used in food processing.: http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/docs/enzymes_en.htm
 36. 食品安全委員会 (2004) 遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準 http://www.fsc.go.jp/senmon/ideni/gm_tenkabutukijun.pdf
 37. Esser K, Mohr G. (1986) Integrative transformation of filamentous fungi with respect to biotechnological application. Process Biochemistry, October, 1986, 153-159
 38. Fincham JRS, (1989) Transformation in Fungi. Microbiological Reviews. 53: 148-170.
 39. Mohr G, Wilmanska D, Esser K. (1989) Analysis of *Aspergillus niger* transformants for single site integration and vector recombination. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32, 160-166
 40. Verdoes JC, Punt PJ, Schrickx JM, van Verseveld HW, Stouthamer AH, van den Hondel CAMJJ. (1993) Glucoamylase overexpression in *Aspergillus niger*: molecular genetic analysis of strains containing multiple copies of the glaA gene. Tansgenic Research 2, 84-92
 41. Takeda AK, Udagawa H, Uemura Y, Takagi S. (2018) Identifying the inserted locus of randomly integrated expression plasmids by whole-genome sequencing of *Aspergillus* strains. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 82: 1880-1888
 42. Hanne V Hendriksen NV, Kornbrust BA, Østergaard PR, Stringer MA. (2009) Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae* J Agric Food Chem. 57: 4168-76.
 43. Bergman A. Broadmeadow A. (1997) An overview of the safety evaluation of the *Thermomyces lanuginosus* xylanase enzyme (SP 628) and the *Aspergillus aculeatus* xylanase enzyme (SP 578). Food Addit Contam. 14: 389-98.

44. Verdoes JC, van Diepeningen AD, Punt PJ, Debets AJM, Stouthamer AH, van den Hondel CAMJJ. (1994) Evaluation of molecular and genetic approaches to generate glucoamylase overproducing strains of *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology* 36: 165-175 ... chromosome one site, high copy strain rearranged.
45. 磯部祥子、小柳 亮、大崎 研. (2017) ついに来た！ゲノム解析第 3 世代の波. *育種学研究* 19: 30–34
46. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, Peluso P, Rank D, Baybayan P, Brad (2009) Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*, 323 (5910), 133–138.
47. Deamer D, Akeson M, Branton D. (2016) Three decades of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol.* 34: 518–524.
48. Ninomiya Y, Suzuki K, Ishii C, Inoue H. (2004) Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 12248-12253
49. Zhang S, Ban A, Ebara N, Mizutani O, Tanaka M, Shinani T, Gomi K. (2017) Self-excising Cre/mutant lox marker recycling system for multiple gene integrations and consecutive gene deletions in *Aspergillus oryzae*. *J. Biosci. Bioengi.* 123: 403-411
50. Buchholz F, Angrand PO, Stewart AF. (1998) Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nature Biotechnology.* 16: 657-662
51. Udagawa H (2017) Simultaneous site-specific integrations of multiple gene-copies. US9850501
52. Nevalainen H, Peterson R (2014) Making recombinant proteins in filamentous fungi-are we expecting too much? *Front Microbiol* 5:75.
53. Mojzita D, Rantasalo A, Jääntti J. (2019) Gene expression engineering in fungi. *Current Opinion in Biotechnology.* 59:141–149
54. Yaver D, Nham P. (2003) Promoter variants for expressing genes in a fungal cell. US20020427314
55. Koda A, Bogaki T, Minetoki T, Hirotsune M. (2006) 5' Untranslated region of the Hsp12 gene contributes to efficient translation in *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 70: 333-336
56. Udagawa H, Taira R, Takagi S (2011) Polynucleotides having leader sequence function. WO2011161206
57. Lloyd AT, Sharp PM (1991) Codon usage in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 230: 288-294
58. Tokuoka M, Tanaka M, Ono K, Takagi S, Shintani T, Gomi K. (2008) Codon optimization increases steady-state mRNA level in *Aspergillus oryzae* heterologous gene expression. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 6538-6546
59. Vervoort EB, van Ravestein A, van Peij NNME, Heikoop JC, van Haastert PJM, Verheijden GF, Linskens MHK. (2000) Optimizing heterologous expression in *Dictyostelium*: importance of 5' codon adaptation. *Nucleic Acids Research* 28: 2069-2074
60. Tanaka M, Tokuoka M, Gomi K. (2014) Effects of codon optimization on the mRNA levels of heterologous genes in filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 3859–

61. Presnyak V, Alhusaini N, Chen YH, Martin S, Morris N, Kline N, Olson S, Weinberg D, Baker KE, Graveley BR, Collier J. (2015) Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell*. 160: 1111–1124
62. Matsui T, Johannesen PF, Takagi S, Poulsen TA, Tsutsumi N, Liu Z, Kong X (2007) Expression of genes from gram negative bacteria in fungi. WO2008017646
63. Taira R, Tsutsumi N, Terui Y, Takagi S (2003) Plant polypeptide production. WO03070957
64. Matsui T, Draborg H, Danielsen S (2005) Signal peptide for producing a polypeptide. WO2005121333
65. Valkonen M, Ward M, Wang H, Penttila M, Saloheimo M. (2003) Improvement of Foreign-Protein Production in *Aspergillus niger* var. *awamori* by Constitutive Induction of the Unfolded-Protein Response. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6979–6986
66. Udagawa H, Frandsen TP, Nielsen TAB. (2001) Lysophospholipase from *Aspergillus*. WO01/27251
67. Lehmbeck J (1998) Novel host cells and methods of producing proteins WO9812300
68. EFSA, GMO and BIOHAZ Units. (2009) Consolidated presentation of the joint Scientific Opinion of the GMO and BIOHAZ Panels on the “Use of Antibiotic Resistance Genes as Marker Genes in Genetically Modified Plants” and the Scientific Opinion of the GMO Panel on “Consequences of the Opinion on the Use of Antibiotic Resistance Genes as Marker Genes in Genetically Modified Plants on Previous EFSA Assessments of Individual GM Plants. *The EFSA Journal* (2009) 1108, 1-8
69. Aguilera J, Gomes AR, Olaru I. (2013) Principles for the risk assessment of genetically modified microorganisms and their food products in the European Union. *International Journal of Food Microbiology* 167: 2-7
70. de Oliveira JMPF, de Graaff LH. (2011) Proteomics of industrial fungi: trends and insights for biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 225-237
71. Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98:5301–5317
72. Cereghino JL, Cregg JM. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*. 24: 45–66
73. Hasslacher M, Schall M, Hayn M, Bona R, Rumbold K, Luckl J, Griengl H, Kohlwein SD, Schwab H (1997) High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expr Purif* 11:61-71
74. Werten MWT, van den Bosch TJ, Wind RD, Mooibroek H, de Wolf FA. (1999) High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast*. 15: 1087-1096
75. Karbalaei M, Rezaee SA, Farsiani H. (2020) *Pichia pastoris*: A highly successful expression

system for optimal synthesis of heterologous proteins. *J Cell Physiol.* 235: 5867-5881

76. Gellissen G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. (1999) *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 741–50
77. Peterson KL, Lehmebeck J, Christensen T. (1999) A new transcriptional activator for amylase genes in *Aspergillus*. *Mol Gen Genet* 262: 668-676
78. Gomi K, Akeno T, Minetoki T, Ozeki K, Kumagai C, Okazaki N, Iumura Y. (2000) Molecular Cloning and Characterization of a Transcriptional Activator Gene, amyR, Involved in the Amylytic Gene Expression in *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 64: 816-827
79. Ichinose S, Tanaka M, Shintani T, Gomi K. (2014) Improved α -amylase production by *Aspergillus oryzae* after a double deletion of genes involved in carbon catabolite repression. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98: 335-43.
80. Minetoki T, Kumagai C, Gomi K, Kitamoto K, Takahashi K. (1998) Improvement of promoter activity by the introduction of multiple copies of the conserved region III sequence, involved in the efficient expression of *Aspergillus oryzae* amylase-encoding genes. *Appl. Microbiol Biotechnol* 50:459-467
81. Yurimoto H, Sakai Y. (2009) Minireview: Methanol-inducible gene expression and heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Biotechnol Appl. Biochem* 53:85-92
82. Lin-Cereghino GP, Godfrey L, de la Cruz BJ et al. (2006) Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol* 26: 883–97.
83. Wang X, Cai M, Shi L et al. (2016) PpNrg1 is a transcriptional repressor for glucose and glycerol repression of *AOX1* promoter in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* 38: 291–8.
84. Wang J, Wang X, Shi L, Qi F, Zhang P, Zhang Y, Zhou X, Song Z, Cai M. (2017) Methanol-independent protein expression by *AOX1* promoter with trans-acting elements engineering and glucose-glycerol-shift induction in *Pichia pastoris*. *Scientific Reports.* 7:41850.
85. Takagi S, Tsutsumi N, Terui Y, Kong XY, Yurimoto H, Sakai Y (2019) Engineering the expression system for *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*): an attempt to develop a methanol-free expression system. *FEMS Yeast Research*, 19: foz059
86. Takagi S, Tsutsumi N, Terui Y, Kong XY. (2012) Method for methanol independent induction from methanol inducible promoters in *Pichia*. US Patent 8236528B2
87. Tsutsumi N, Takagi S. (2009) *Pichia pastoris* DAS promoter variants. WO2010004042
88. Hartner FS, Glieder A. (2006) Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microbial Cell Factories.* 5: 39–59.
89. Vogl T, Glieder A. (2013) Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New Biotechnology.* 30: 385-404

90. Wang X, Wang Q, Wang J, Bai P, Shi L, Shen W, Zhou M, Zhou X, Zhang Y, Cai M. (2016). Mit1 transcription factor mediates methanol signaling and regulates alcohol oxidase 1 (*AOX1*) promoter in *Pichia pastoris*. *J Biol Chem* ;91: 6245–61.
91. Vogl T, Sturmberger L, Fauland PC, Hyden P, Fischer JE, Schmid C, Thallinger GG, Geier M, Glieder A (2018) Methanol independent induction of *Pichia pastoris* by simple derepressed overexpression of single transcription factors. *Biotechnology and Bioengineering* 115:1037–50.
92. Chang C, Hsiung H, Hong K, Huang CT. (2018) Enhancing the efficiency of the *Pichia pastoris* *AOX1* promoter via the synthetic positive feedback circuit of transcription factor Mxr1. *BMC Biotechnol.* 18: 81–90
93. Andersen MR, Nielsen J. (2009) Current status of systems biology in Aspergilli. *Fungal Genet Biol.* 46: 180–190
94. Shimizu M, Fujii T, Masuo S, Fujita K, Takaya N. (2009) Proteomic analysis of *Aspergillus nidulans* cultured under hypoxic conditions. *Proteomics.* 9: 7-19.
95. Oh YT, Ahn CS, Kim JG, Ro HS, Lee CW, Kim JW. (2010) Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 47: 246-253
96. Vödösch M, Scherlach K, Winkler R, Hertweck C, Braun HP, Roth M, Haas H, Werner ER, Brakhage AA, Kniemeyer O. (2011) Analysis of the *Aspergillus fumigatus* Proteome Reveals Metabolic Changes and the Activation of the Pseurotin A Biosynthesis Gene Cluster in Response to Hypoxia. *J. Proteome Res.* 10: 2508–2524
97. Albrecht D, Guthke R, Brakhage AA, Kniemeyer O. (2010) Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*. *BMC Genomics*, 11: 32
98. Miguel J, de Oliveira PF, van Passel MWJ, et al. (2010) Shotgun proteomics of *Aspergillus niger* microsomes upon D-Xylose induction. *Appl Environ Microbiol.* 76: 4421–4429.
99. Miguel J, de Oliveira PF, van Passel MWJ, et al. (2011) Proteomic analysis of the secretory response of *Aspergillus niger* to D-Maltose and D-Xylose. *PLoS ONE.* 6: e20865
100. Lu X, Sun J, Nimtz M, et al. (2010) The intra- and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. *Microb Cell Fact.* 9: 23.
101. Jacobs DI, Olsthoorn MM, Maillet I, et al. (2009) Effective lead selection for improved protein production in *Aspergillus niger* based on integrated genomics. *Fungal Genet Biol.* 46: 141–152.
102. de Oliveira JMPF, de Graaff LH. (2011) Proteomics of industrial fungi: trends and insights for biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 225-237
103. Takagi S, Kojima K, Ohashi S. (2020) Proteomic analysis on *Aspergillus* strains that are useful for industrial enzyme production. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 84: 2241-2252
104. Cerqueira GC, Arnaud MB, Inglis DO, Skrzypek MS, Binkley G, Simison M, Miyasato SR, Binkley J, Orvis J, Shah P, Wymore F, Sherlock G, Wortman JR (2014). The *Aspergillus* Genome

Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nucleic Acids Res* **42** (1); D705-10.

105. Pakula TM, Laxell M, Huuskonen A, et al. (2003) The Effects of drugs inhibiting protein secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem.* 278: 45011–45020.
106. Guillemette T, van Peij NNME, Goosen T, Lanthaler K., Robson GD, van den Hondel CAMJJ, Stam H, Archer DB. (2007) Genomic analysis of the secretion stress response in the enzyme-producing cell factory *Aspergillus niger*. *BMC Genomics*, 8: 158
107. Peisker K, Chiabudini M, Rospert S. (2010) The ribosome-bound Hsp70 homolog Ssb of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1803: 662–672
108. Oh YT, Ahn CS, Jeong YJ, et al. (2013) *Aspergillus nidulans* translationally controlled tumor protein has a role in the balance between asexual and sexual differentiation and normal hyphal branching. *FEMS Microbiol Lett.* 343: 20–25
109. Kraus PR, Hofmann AF, Harris SD. (2002) Characterization of the *Aspergillus nidulans* 14-3-3 homologue, ArtA. *FEMS Microbiol Lett.* 210: 61–66
110. Hesselberth JR, Miller JP, Golob A, et al. (2006) Comparative analysis of *saccharomyces cerevisiae* WW domains and their interacting proteins. *Genome Biol.* 7: R30.
111. Musacchio A, Gibson T, Rice P, et al. (1993) The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signaling proteins. *Trends Biochem Sci.* 18: 343–348
112. Dhavale T, Jedd G. (2007) The fungal Woronin body. In: Howard RJ, Gow NAR, editors. *Biology of the fungal cell.* 2nd ed. Berlin: Springer; p. 87–94.
113. Lim D, Hains P, Walsh B, et al. (2001) Proteins associated with the cell envelope of *Trichoderma reesei*: a proteomic approach. *Proteomics.* 1: 899–910
114. Tey WK, North AJ, Peyes JL, et al. (2005) Polarized gene expression determines Woronin body formation at the leading edge of the fungal colony. *Mol Biol Cell.* 16: 2651–2659.
115. Bergs A, Ishitsuka Y, Evangelinosa M, et al. (2016) Dynamics of actin cables in polarized growth of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Front Microbiol.* 7: 682
116. Taheri-Talesh N, Horio T, Araujo-Baza'n L, et al. (2008) The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell.* 19: 1439–1449.
117. Torralba S, Raudaskoski M, Pedregosa AM, Laborda F. (1998) Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, 144, 45-53
118. Gunning PW, Hardeman EC, Lappalainen P, et al. (2015) Tropomyosin - master regulator of actin filament function in the cytoskeleton. *J Cell Sci.* 128: 2965–2974.
119. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press