

論文内容の要旨

申請者氏名 幸田 明生

本論文は、申請者らがこれまで強力な発現用プロモーターを構築し工業的に利用可能な宿主・ベクター系として開発してきた *Aspergillus* 属糸状菌において、目的タンパク質をさらに高いレベルで発現させるために、転写後過程を改良することにより、より効率よく異種タンパク質を生産させる技術を確立した結果をとりまとめたものである。

まず、目的遺伝子のコード領域に着目し、ポテト由来 α -glucan phosphorylase (GP) の *Aspergillus niger* における発現系をモデルとして AT 含量及びコドン使用頻度の改変効果を比較検討した。その結果、野生型遺伝子導入株では目的の GP タンパク質、mRNA とも検出できなかったのに対し、AT 含量、コドン使用頻度を *A. niger* に最適化した合成遺伝子導入株では、GP タンパク質が主バンドとして確認され、また、対応する mRNA が検出された。この結果、*Aspergillus* 属宿主系において DNA 配列の再設計が異種遺伝子の発現に極めて有効であることが明らかとなった。

ついで、翻訳過程の効率化のために、*A. oryzae* の発現系における mRNA の 5'-非翻訳領域 (5' UTR) の改変効果について検討した。同一プロモーターに異なる 5' UTR を連結しレポーター遺伝子産物 (β -glucuronidase; GUS) の活性により評価した結果、5' UTR の種類により GUS 活性に最大で 8 倍の差異が認められた。それぞれの形質転換体の mRNA 量には違いが見られないことから、得られた GUS 活性の上昇は、転写量の増大や mRNA の安定性の向上などによるものではなく、翻訳段階に起因したものであり、単位 mRNA あたりの翻訳効率の上昇によるものであることが示された。また、最も高い翻訳効率を示した発現コンストラクトの多コピー導入株の中には、蓄積した GUS タンパク質が菌体内全可溶性タンパク質の 50% 以上を占めるものがあつた。これは糸状菌における GUS 生産性としてこれまでで最も高い値である。

さらに、*A. oryzae* 由来の一部の熱ショックタンパク質 (Hsp) 遺伝子の 5' UTR がより高い翻訳効率を示すことを見いだした。さらに、さまざまな 5' UTR コンストラクトについて比較した結果、同一の 5' UTR であっても温度に依存して翻訳効率に差異が見られた。すなわち、*Hsp12* 遺伝子や *Hsp30* 遺伝子の 5' UTR は 37°C において 30°C の約 2 倍の翻訳効率を示し、37°C の条件下で GUS タンパク質の生産性がさらに増大することを見いだすことにより、*A. oryzae* の遺伝子発現において、外的刺激に応答して翻訳レベルで調節される機構の存在を示唆した。

論文審査結果の要旨

申請者 幸田 明生

遺伝子組換え技術による有用タンパク質の生産は、微生物や動植物細胞を宿主としたさまざまな発現系が開発され、工業的な利用が進められている。*Aspergillus* 属糸状菌は、わが国において千年を超える長い年月にわたって酒類や醸造食品の製造に使用されており、菌体とその生産物の安全性がきわめて高いこと、また、菌体外に多量の酵素タンパク質を分泌生産する能力を有していることから、異種タンパク質生産の有望な宿主として期待されている。申請者らは、これまで目的遺伝子の転写量を高めることを目的に強力な発現用プロモーターを構築し種々の *Aspergillus* 属における宿主・ベクター系を開発してきた。本論文は、目的のタンパク質をさらに高いレベルで発現させるためにはプロモーターの転写活性のみではなく、転写(開始)後の過程におけるタンパク質発現の効率を改良することも重要であるとの認識から行った研究成果を取りまとめたものである。

まず、ポテト由来 α -glucan phosphorylase (GP) の *Aspergillus niger* における発現系をモデルとして検討し、目的遺伝子のコード領域の AT 含量及びコドン使用頻度を最適化した合成遺伝子導入株において、野生型遺伝子導入株では検出できなかった GP タンパク質が主バンドとしてまた対応する mRNA が検出されたことより、導入遺伝子の特徴(塩基配列)が発現に大きく影響すること、すなわち DNA 配列の再設計が有効であることを *Aspergillus* 属宿主系で初めて明らかにした。

ついで、翻訳過程の効率化を目指し、mRNA の 5'-非翻訳領域(5' UTR)に注目し、その改変効果について検討した。同一プロモーターに異なる 5' UTR を連結しレポーター遺伝子産物 β -glucuronidase (GUS) 翻訳効率を比較したところ最大で 8 倍の上昇を認めた。これは、糸状菌発現系において 5' UTR の改変により翻訳効率を高めることで異種タンパク質生産の効率化を図れることを示した最初の例である。

さらに、同一の 5' UTR であっても外的条件によって翻訳効率に差異が見られることを見いだした。すなわち、*A. oryzae* の *Hsp12* 遺伝子や *Hsp30* 遺伝子の 5' UTR は 37°C において 30°C の約 2 倍の翻訳効率を示し、37°C の条件下で GUS タンパク質の生産性がさらに増大することを明らかにした。これは、*A. oryzae* の遺伝子発現において外的刺激に応答して翻訳レベルで調節される機構が存在する可能性を示しており、糸状菌の遺伝子発現機構の解明にも貢献できるものと期待される。

以上のように、本論文は *Aspergillus* 属糸状菌発現系においてコード領域 DNA 配列の再設計及び 5' UTR の改変により転写後過程における異種タンパク質の発現量を大幅に改良する新規な技術を開発したものであり、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(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。