

氏 名(本籍)	とく 徳	おか 岡	まさ 昌	ふみ 文
学位の種類	博 士 ( 農 学 )			
学位記番号	農 博 第 8 6 5 号			
学位授与年月日	平 成 18 年 3 月 24 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	農学研究科生物産業創成科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	麴菌を宿主としたダニアレルゲン Der f7 の生産における コドン最適化効果の解析			
論文審査委員	(主 査)	教 授	五 味 勝 也	
	(副 査)	教 授	勝 亦 瞭 一	
		助教授	阿 部 敬 悦	

# 論文内容要旨

## <序論>

麹菌は、日本酒や味噌、醤油などの製造に不可欠の微生物であり、日本の食文化において、主要な役割を果たしている一方、多種類の加水分解酵素を分泌することから、産業用酵素の供給微生物として重要な地位を担っている。また、遺伝子工学の発展やゲノム解析の成果を生かすことで、麹菌をより高度に利用した新たな産業の創成が期待されており、活発に研究が行われている。本研究室では、安全性とタンパク質分泌能を併せ持つ麹菌の特徴を生かし、ダニアレルギーの経口減感作療法に用いるためのワクチン用タンパク質 Der f7 を麹菌により分泌生産する研究を行ってきた。Der f7 はコナヒョウダニ(*Dermatophagoides farinae*)由来の機能未知の分泌タンパク質であり、ハウスダストアレルギー患者の 50%が、抗 Der f7 IgE 抗体を保持するといわれている。アレルギーの効果的な治療方法として、アレルゲンを治療用抗原(ワクチン)として用いる減感作療法が知られており、生産物および菌体ともに安全であると認識されている麹菌は、経口減感作療法のためのワクチンの有望な生産宿主として期待される。

麹菌における異種タンパク質生産量改善の戦略としては、これまで強力な発現用プロモーターによる高発現と、自己のタンパク質との融合タンパク質として発現させることの 2 点が主としてとられてきている。本研究室でもこれらの手法を用いて麹菌により Der f7 生産したが、生産量は 1 mg/l 以下であり、Der f7 生産の実用化にはまだ大きな障害があると考えられた。そこで本研究では、麹菌をはじめとする糸状菌において基礎的知見が少なく、詳細な解析がなされてこなかった宿主と発現遺伝子の使用コドンの偏りに着目して、Der f7 のコドン使用頻度を麹菌に適合させることによって発現量の改善を試みた。

原核生物から高等真核生物までの多くの異種タンパク質発現系において、コドン最適化の効果については報告されており、大腸菌におけるレアコドンの影響についての基礎的な研究等から、コドン最適化は翻訳過程の効率化により、発現量が改善されるという説明が一般的に受け入れられている。しかし宿主や発現遺伝子によっては、コドン最適化の効果が、翻訳過程以外にも影響を与えることがあることが知られており、本研究では基礎的な観点から、この点について知見を得ることも目的とした。

## 第一章 コドン最適化遺伝子の全合成と分泌生産量への効果

コドン最適化を行うために、まず Der f7 と麴菌の遺伝子のコドン使用頻度を比較した。麴菌のコドン使用頻度は、データベース (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)を参考にして、Der f7 配列中に存在する麴菌における使用頻度の低いコドンを使用頻度の高いものに置き換え、また特定のコドンのみに偏った使用を避け、全体的なコドン使用傾向を合わせて、コドン最適化 Der f7 遺伝子 (Der f7 opt) をデザインした(Table 1)。

Der f7/opt の合成には、合成オリゴヌクレオチドを用いた2回の PCR を組み合わせることによる、recursive PCR による方法を用いた。約 100 nt のオリゴヌクレオチド 8 本は、隣のオリゴヌクレオチドと 20 bp の overlap した領域を持たせることで、PCR 時に相互にプライマーとなるように設計した。1 回目の PCR は 8 本のオリゴヌクレオチドをすべて用いて行い、得られた PCR 産物を 2 回目の PCR の鋳型として用いた。2 回目の PCR では両末端のオリゴヌクレオチドのみを用いた PCR を行うことで、目的とする約 650 bp の PCR 産物が得られた(Fig. 1)。この PCR 産物を TA クローニングし塩基配列を決定することにより、15 クローンの中からデザイン通りの塩基配列を持つ 1 クローンを得ることができた。

麴菌での発現コンストラクトとして、まず Der f7 自身のシグナル配列により分泌するコンストラクトを作製した。麴菌形質転換ベクターとして、麴菌のグルコアミラーゼプロモーターの改変プロモーターである PglA142 の下流にマルチクローニングサイトをもち、硝酸塩資化性を指標とした選抜ができる *niaD* マーカーを持つ pNGA142 を用いた。プロモーターの下流にネイティブなコドンを持つ Der f7 遺伝子、またはコドンを最適化した Der f7 遺伝子を連結した発現ベクターを作製し、NS4 株を親株としてそれぞれについて形質転換体を取得し、これを Der/ntv、Der/opt とした。両コンストラクトを液体培養し培養上清について、Der f7 抗体により Western 解析を行ったところ、Der f7 分泌量は Der/ntv では検出できないほどの低レベルであったが、Der/opt 株においては検出可能なレベルにまで増加しており、コドン最適化が分泌量改善に効果的であることが示された(Fig. 3)。

麴菌における異種タンパク質生産には、目的タンパク質を宿主自身が高分泌するタンパク質との融合タンパク質として発現させることが有効であることから、コドン最適化を行うことでさらに分泌量の改善が可能であるか調べた。本研究では、グルコアミラーゼの触媒ドメインをキャリアタンパク質として、その下流に成熟型 Der f7 を連

結した融合タンパク質を作製した。融合タンパク質は、分泌される際にキャリアタンパク質から成熟型 Der f7 が分離されるように、キャリアタンパク質と Der f7 を連結するリンカー領域の直後に、ゴルジ体のプロセシングプロテアーゼである KEX2 の切断配列を導入した(Fig. 2)。このようにして構築した GlaDer/ntv と GlaDer/op を麹菌宿主に導入し、取得した形質転換体の Der f7 分泌量を Western 解析により調べたところ、両株においてキャリアタンパク質と成熟型 Der f7 が分泌されていたが、コドン最適化をしたコンストラクトでは Der f7 分泌量が 3 倍以上に増加していた。また、濃縮した培養上清の SDS-PAGE の CBB 染色により、コドン最適化したものでは 25 kDa 付近に Der f7 に相当するバンドが確認されたことから、融合タンパク質として発現させることによる効果とあわせることで、高い生産性が得られることが分かった(Fig. 3)。

非融合型、融合型発現コンストラクトにおいて、コドン最適化が分泌量改善に効果をもたらした理由を調べるために、転写産物量を Real-time PCR により解析したところ、Der f7 mRNA 量に差が生じていた(Fig. 4)。以上の結果から、麹菌における Der f7 生産において、コドンの最適化は、転写産物量の増加をもたらすことによって目的の Der f7 分泌量の増加につながったものと考えられた。

## 第二章 転写産物量の比較と部分的コドン最適化の効果

翻訳過程に関与するコドンを最適化することが、転写産物量に影響するという現象はこれまでもいくつか報告されているものの、その理由はまだ分かっていない。そこで第二章では、コドンの最適化により、転写産物量が増加する理由を解明することを目的として研究を進めた。

コドン最適化に関する研究が進んでいる大腸菌において、遺伝子の 5'側にあるレアコドンがその遺伝子の発現量に大きく影響するということが報告されていることから、Der f7 において、遺伝子の前半のみのコドンを最適化したコンストラクト (Der/opt-ntv) と、遺伝子の後半部分のみのコドンを最適化したコンストラクト (Der/ntv-opt) を作製して(Fig. 5)、その分泌量および転写産物量に及ぼす効果を調べた。培養上清のウェスタン解析の結果、大腸菌で報告されている結果とは逆に、遺伝子後半部分のコドン最適化が全体の最適化と同様の分泌量の改善をもたらすことが分かった(Fig. 6)。また、転写産物量にも差が生じていたことから(Fig. 7)、全体のコドン最適化と同様の効果が遺伝子の後半部分のコドン最適化で得られたことが示唆された。mRNA の二次

構造予測からは各 mRNA の間に熱力学的な安定性や特徴的な構造などの差が見出せなかったことから、ネイティブなコドンをもつ配列の後半部分の配列にが、転写産物量の減少をもたらす配列が存在する可能性が示唆された。

そこで、さらに部分的なコドン最適化を試みた。全合成に用いたプライマーを利用し、部分配列のコドン最適化コンストラクト(Fig. 8)を作成したが、すべてのコンストラクトにおいて培養上清中に Der f7 は分泌されず、またノーザン解析を行ったところ、いずれのコンストラクトも Der/ntv-opt と比較すると mRNA レベルは低かった (Fig. 9)。しかし、一部のクローンで、低分子のシグナルが検出されたことから、正常な転写産物が合成されているか調べるために、3'-RACE を行い、RT-PCR 産物の断片長を比較した(Fig. 10)。その結果、mRNA 量が多いコンストラクトでは、転写産物の断片の長さが均一であったのに対し、mRNA 量が少ないコンストラクトでは、断片の長さにはばらつきがあった。そこで一部のクローンの配列を調べたところ、Der/opt においては終止コドンから約 60 bp 下流のターミネーター領域で poly(A)が付加されているのに対して、Der/ntv では ORF 内で poly(A)付加が起きているクローンが数多く見出された(Fig. 11)。この poly(A)付加は Der/ntv 配列の後半全体で生じていた。終止コドンを含まない nonstop mRNA を異常転写産物として積極的に分解する機構として、nonstop mRNA degradation 経路の存在が最近見出され(Fig. 12)、nonstop mRNA は半減期が非常に短くなることが知られている。そこで、Der/ntv 配列の mRNA 量の減少は、ORF 内での poly(A)付加による nonstop mRNA 分解が原因であると考え、これを裏付けるための実験を行った。まず、nonstop mRNA の分解過程は翻訳と共役しており、poly(A)付加配列の上流に終止コドンを導入することで、nonstop mRNA 分解は抑制されることが知られていることから、融合型コンストラクトの GlaDer/ntv の変異体で、フレームシフトにより Der f7 配列の 5'側末端 8 アミノ酸目に終止コドンが現れるコンストラクトにおける mRNA 量を GlaDer/ntv と比較した。ノーザン解析の結果、mRNA 量は終止コドンが導入されることで、3 倍程度増加した(Fig. 13)。したがって、Der/ntv においては ORF 内で poly(A)付加を受けた mRNA 分子が nonstop mRNA 分解経路による分解を受けていることが示唆された。

以上から、Der/ntv の Der f7 配列には poly(A)付加シグナルとして機能し得る複数の配列が存在することで、nonstop mRNA が合成され、mRNA が蓄積しにくいのに対し、Der/opt では、コドン最適化により結果的にそれらの潜在的配列が除去された

ことで、RNA 量の増加と生産量の改善につながったものと推定された。

### 第三章 コドン最適化遺伝子を用いた高発現株およびプロテアーゼ遺伝子破壊株による Der f7 の分泌生産

第一章の結果、GlaDer/opt の Der f7 生産性が最も高いことが判明したことから、融合型コンストラクトを多コピー導入した Der f7 高生産株を作製して、高分泌生産を試みた。選択マーカーを *niaD* から多コピー導入が可能な硫酸塩資化関連遺伝子 *sC* に置き換えた形質転換ベクター (Fig. 14) を作製して、麹菌 NS4 株の形質転換を行った。得られた高発現株 SGlaDer 株では、高発現用ベクター中のプロモーターに多コピー挿入されているシスエレメントの titration 効果により、麹菌で最も分泌量の多いタンパク質である  $\alpha$ -アミラーゼの生産量が著しく低下し、目的のタンパク質の割合が高くなっていった (Fig. 15)。また、分泌された Derf7 の N 末端解析を行ったところ、Der f7 がデザインどおりに KEX2 の断配列でグルコアミラーゼと切り離されて成熟型タンパク質として培養上清に分泌されていた (Fig. 16)。麹菌の分泌タンパク質は等電点が酸性のものが多く知られており、pH 5.0 での陽イオン交換カラム (Resource S) を用いたイオン交換クロマトグラフィーを行うことにより、培養上清から一段階の精製により部分精製 Der f7 が取得できた。この部分精製 Der f7 を用いて、取得した各 Der f7 発現株の Der f7 生産量を定量したところ、高発現株では約 30 mg/l の生産量を示すことがわかった (Fig. 17)。この生産量は、*Aspergillus* 属糸状菌の野生株を宿主とした異種タンパク質生産量として報告されているものの中では最高レベルであった。しかし、培地中の Der f7 及びキャリアタンパク質であるグルコアミラーゼの経時変化を調べたところ、グルコアミラーゼは安定に存在するにもかかわらず、Der f7 は減少していくことが観察された (Fig. 18)。したがって、Der f7 は KEX2 によってキャリアタンパク質と切断された以降の過程で、麹菌のプロテアーゼにより分解を受けるものと考えられた。そこで、ゲノム解析情報をもとに最近明らかにされた菌体外プロテアーゼ遺伝子の転写因子と考えられる *prtR*、および出芽酵母において異種タンパク質の分解にかかわっていることが報告されている液胞プロテアーゼ遺伝子である *PEP4* の相同遺伝子である *pepE* を破壊した宿主を用いて、Der f7 高発現を試みたが、それぞれ単独の破壊株では顕著な生産量の増加は見られなかった (Fig. 19)。そこで、さらに *pepE*

及び *priR* の 2 重遺伝子破壊株を宿主とした Der f7 生産を試みたところ、野生株を宿主とした発現株と比較し、培養 24 時間において Der f7 生産量が約 2 倍増加していた (Fig. 20)。これらの株はサザン解析により Der f7 発現カセットを 1 コピー導入されていることを確認していることから、*pepE* と *priR* の両遺伝子の破壊は Der f7 の生産量改善に効果があることが示唆された。

## 総括

(1) 麹菌においてコドン最適化は異種タンパク質生産量の改善に効果的であり、融合タンパク質としての発現と組み合わせることで高生産が可能になることを示した。

(2) コドン最適化効果は転写量の増加を介した分泌量の改善であった。

(3) コドンを最適化しない Der f7 配列には、poly(A)付加シグナルとして機能し得る配列が複数存在する可能性があり、コドン最適化効果は、それらの配列が除かれたことによる効果であると考えられた。

(4) ORF 内での poly(A)付加は、nonstop mRNA 分解経路による積極的な分解とそれに伴う転写産物量の減少を引き起こすものと考えられ、異種タンパク質発現においては、潜在的な poly(A)付加シグナルによりストップコドンのない不完全な mRNA が合成されることによる転写産物の分解を回避することが重要であると考えられた。

(5) コドン最適化 Der f7 遺伝子とキャリアタンパク質との融合遺伝子を高発現用プロモーターにより高発現させ、さらに多コピー化することによって、*Aspergillus* 属糸状菌の野生株を宿主とした異種タンパク質生産量として、これまで報告されている中で最も高い生産量を達成することができた。

(6) プロテアーゼ生産に関与する転写因子と液胞プロテアーゼの遺伝子破壊が、異種タンパク質生産量の改善に効果的であることを示した。

原著論文

Tokuoka M., Ono K., Takagi S., Gomi K. Codon optimization improves mite allergen Der f7 production in *Aspergillus oryzae*.

(*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 投稿予定)

Tokuoka M., Ono K., Takagi S., Gomi K. High-level secretion of codon-optimized mite allergen Der f7 in *Aspergillus oryzae*.

(Manuscript in preparation)

参考文献

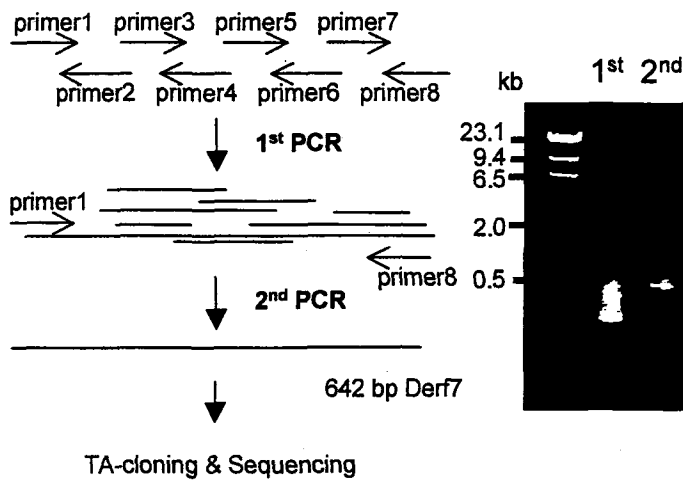
幸田明生、徳岡昌文、五味勝也：転写後過程の改良による異種タンパク質生産の効率化ーカビのバイオテクノロジーの新展開⑤，バイオサイエンスとインダストリー，**63**，543-546 (2005)



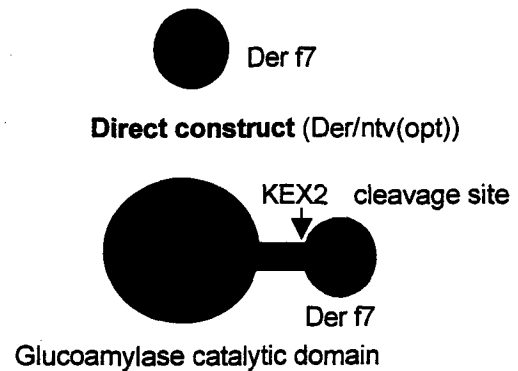
amino acid	codon	<i>A. oryzae</i> (%)	Der f7(%)			<i>A. oryzae</i> (%)	Der f7(%)	
			Native	Optimized			Native	Optimized
Ala	GCT	26.2	4.7	4.7		CTT	13.2	1.4
	GCA	14.7	1.9	0		TTA	2.9	1.4
	GCC	35.5	2.8	4.7		TTG	14.8	5.1
	GCG	14.0	0	0		AAA	10.8	6.5
Arg	AGA	3.6	0	0	Lys	AAG	38	0.5
	AGG	3.1	0	0		AAT	19.1	3.7
	CGA	5.4	1.4	0	Met	ATG	26.2	1.9
	CGC	13.3	0	1.4	Phe	TTC	9	2.8
	CGG	5.9	0	0		TTT	10.3	2.3
	CGT	10.2	1.9	1.9	Pro	CCA	18.1	0
Asn	AAC	12.9	1.4	1.4		CCC	10.6	0
	AAT	31.9	1.9	1.9		CCG	15.1	0.5
Asp	GAT	27.8	8.4	3.2	Ser	CCT	16.4	0
	GAC	32.8	0.5	5.6		AGC	7.9	0
Cys	TGC	5.2	0	0		AGT	7.1	0.5
	TGT	6.8	0	0		TCA	23	0.9
Gln	CAA	13.2	2.8	0.9		TCC	13.2	1.4
	CAG	25.8	0	1.9		TCG	16	1.4
Glu	GAA	19.8	6.5	2.8	Thr	TCT	10.2	1.4
	GAG	33.4	0.9	4.7		ACA	29.7	2.3
Gly	GGA	15.3	0.5	0		ACC	10.2	0
	GGC	29.6	0.5	1.4		ACG	16.9	0.4
	GGG	7.3	0	0	Trp	ACT	15.1	0
	GGT	27.2	4.7	4.2	Tyr	TGG	24.6	0.4
His	CAC	12.9	0.9	2.8		TAC	12.6	0.9
	CAT	9.5	2.8	0.9	Val	TAT	4.6	2.3
Ile	ATA	2.5	0.9	0		GTA	28.6	2.3
	ATC	30.6	2.3	7.0		GTC	15.5	0.9
	ATT	17.1	6.5	2.8		GTG	17	3.7
Leu	CTA	5.5	0	0	STOP	GTT	1	0.4
	CTC	23.1	0	2.8		TAA	0.4	0
	CTG	19.1	0	2.3		TAG	0.7	0
						TGA	0	0

Table 1 コドン使用頻度の比較

麹菌のコドン使用頻度はかずさDNA研究所のデータベース(<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)を参考にした。



TA-cloning & Sequencing



Glucoamylase catalytic domain

Fusion construct (GlaDer/ntv(opt))

Fig. 1 recursive-PCRによるDer f7 cDNAの全合成

PCR反応は1回目は各オリゴヌクレオチドを100 pmol含む反応系で94℃ 30秒、60℃30秒、72℃30秒で30サイクル行った。2回目のPCRは鋳型として1回目のPCR産物1 μl用いて末端のプライマーを100 pmol含む反応系で行った。電気泳動は各PCR産物を1 μl泳動した。

Fig. 2 非融合型と融合型によるDer f7発現コンストラクト

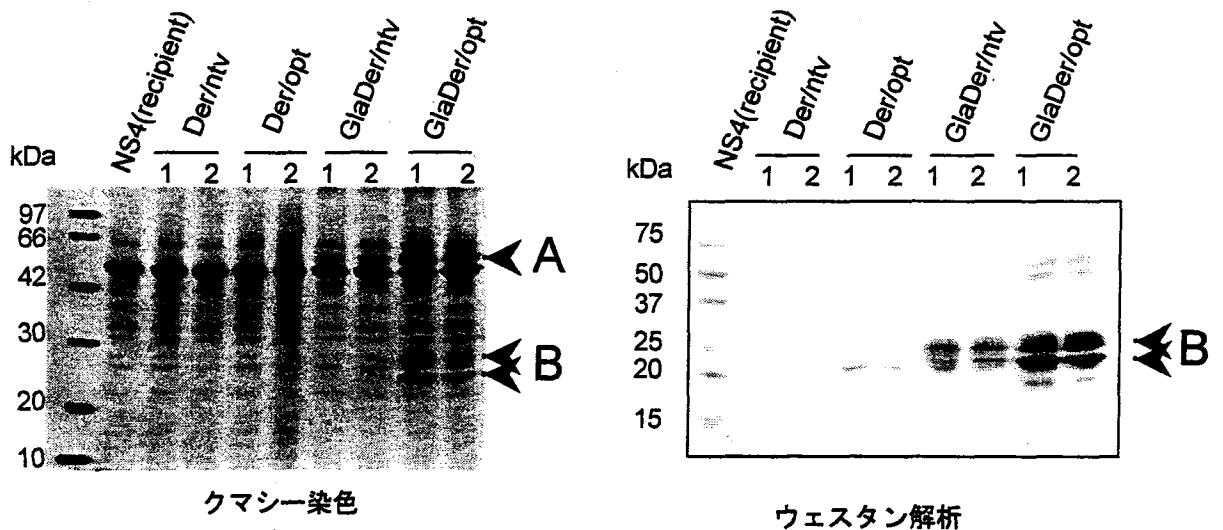


Fig. 3 各形質転換体の培養上清のSDS-PAGE解析

各株をYPM培地(yeast extract 1%, peptone 2%, maltose 2%)で24時間培養した培養上清をTCA沈殿により5倍濃縮し15 $\mu$ を泳動し、12.5%のSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。ウェスタン解析は抗Der f7抗体を用いた。矢印A;キャリアタンパク質、B; Der f7

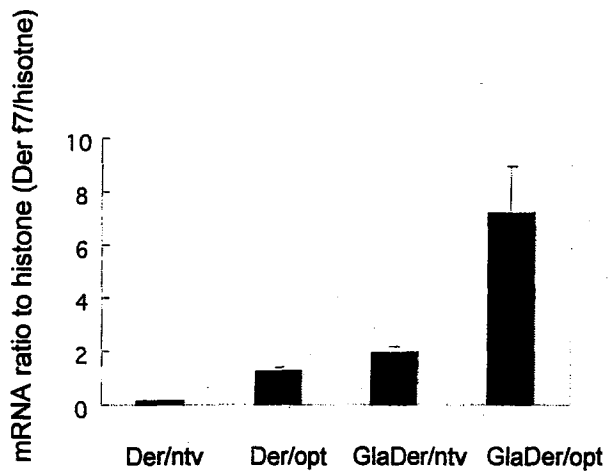


Fig. 4 Real-time PCR 解析によるDer f7 mRNA量の比較  
各形質転換体をYPM培地にて20時間培養し菌体よりRNAを抽出しReverse transcriptaseにより逆転写を行い合成したcDNAに対し特異的プライマーを用いた定量PCRを行った。

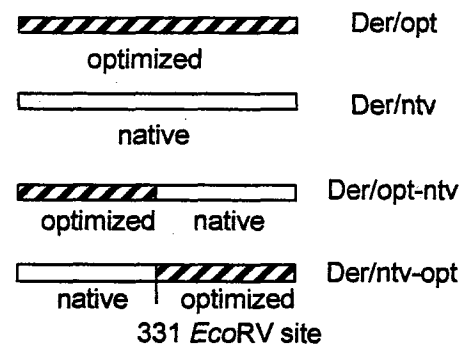


Fig. 5 部分最適化Derf7遺伝子の構造

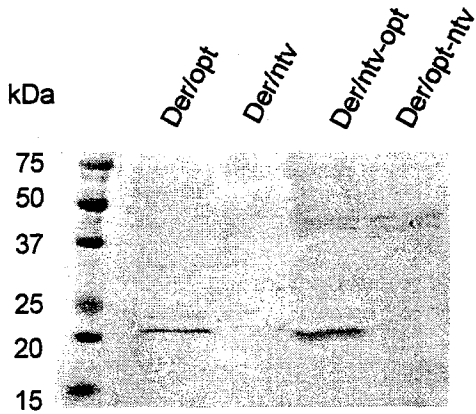


Fig. 6 形質転換体のウェスタン解析

各株をYPM培地(yeast extract 1%, peptone 2%, maltose 2%)で24時間培養した培養上清をTCA沈殿により5倍濃縮し15  $\mu$ を泳動し、12.5%のSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。ウェスタン解析は抗Der f7抗体を用いた。

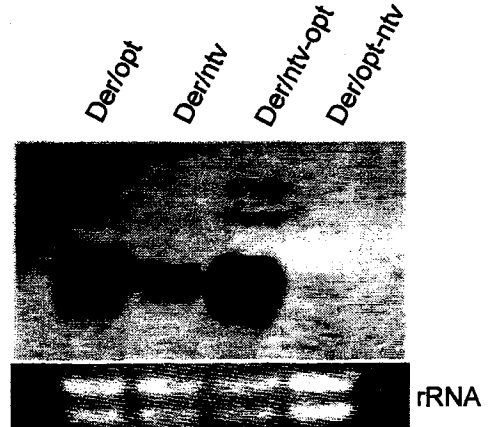


Fig. 7 部分最適化株のノーザン解析

各形質転換体をYPM培地にて20時間培養した菌体よりRNAを抽出し、10  $\mu$ gをホルムアミド-アガロースゲル(1.2%)で泳動した。プローブはDer/ntv-optを鋳型として作成した。

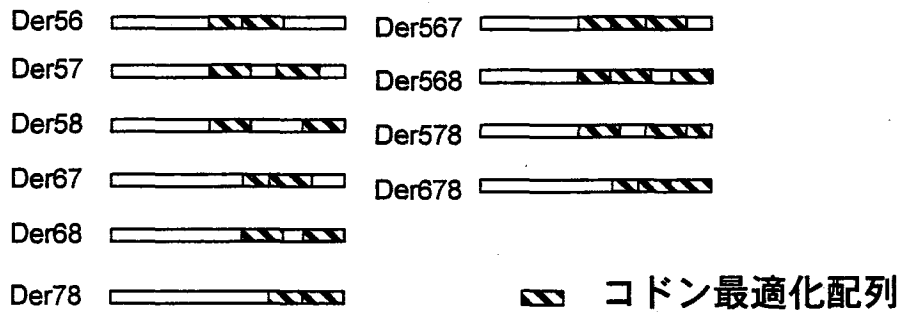


Fig. 8 部分最適化Der f7遺伝子の構造

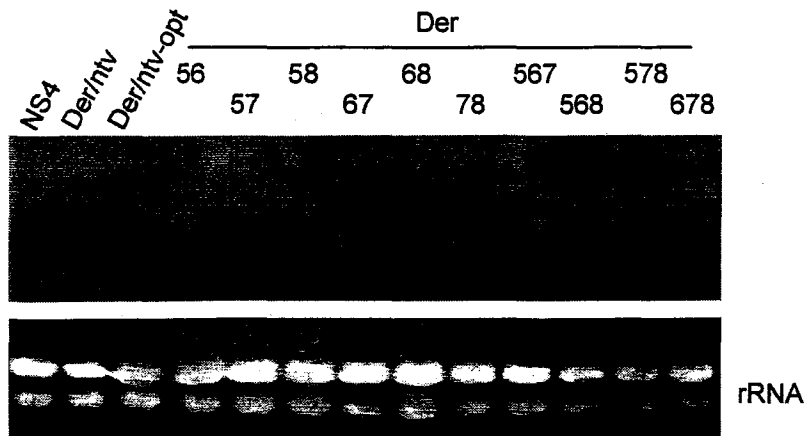


Fig. 9 部分最適化株のノーザン解析

各形質転換体をYPM培地で20時間培養し菌体よりRNAを抽出し約20  $\mu$ gを泳動した。プローブはDer/ntvの5'側半分を鋳型として作成した。

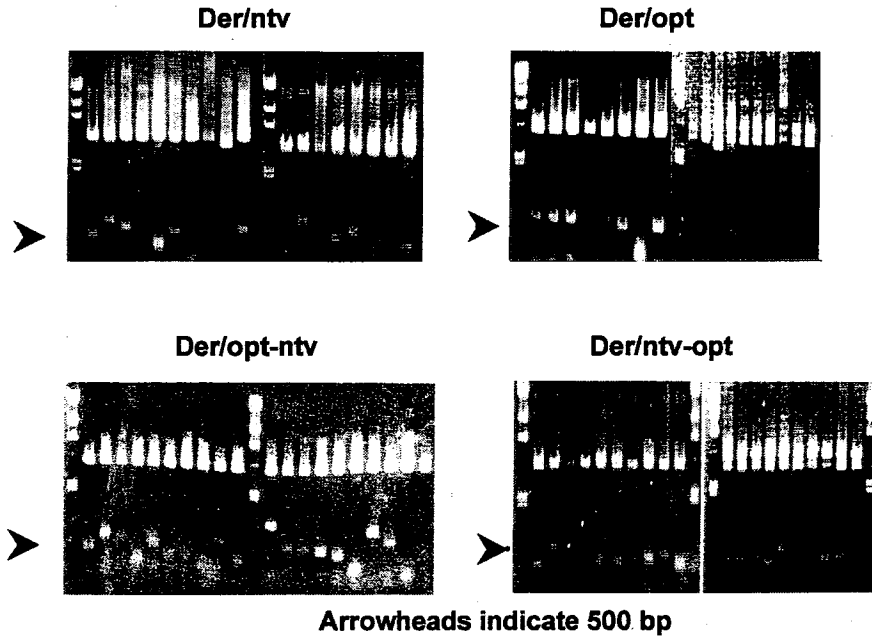


Fig. 10 3'-RACE クローンの挿入断片長の比較  
TA-cloningした3'-RACEのPCR産物をEcoRIで消化して電気泳動した。

```

251 TG AAA CGT CAA GGT GAT GCT AAT GTC AAA GGT GAA GAG GGT ATT GTT AAA 300
251 TG AAG CGT CAG GGT GAC GCT AAT GTC AAG GGT GAA GAG GGT ATT GTT AAG 300

301 GCT CAT TTG TTG ATC GGT GTT CAC GAT GAT ATC GTC TCG ATG GAA TAT GA 350
301 GCT CAT TTG CTC ATC GGT GTT CAC GAT GAT ATC GTG TCG ATG GAG TAC GA 350

351 T TTA GCA TAC AAA TTG GGT GAT CTT CAT CCA ACC ACT CAT GTC ATT TCG G 400
351 T CTC GCC TAC AAG CTG GGT GAC CTT CAT CCC ACC ACT CAC GTC ATC TCG G 400

401 AT ATT CAA GAT TTT GTT GTT GCC TTG TCC CTT GAA ATT TCT GAT GAA GGT 450
401 AT ATT CAG GAC TTC GTT GTT GCC CTC TCC CTT GAG ATT TCT GAC GAA GGT 450

451 AAC ATA ACA ATG ACA TCT TTT GAA GTA CGA CAA TTC GCT AAT GTT GTC AA 500
451 AAC ATC ACC ATG ACC TCT TTC GAG GTC CGC CAA TTC GCT AAT GTT GTC AA 500

501 C CAT ATT GGT GGT CTT TCA ATC TTG GAT CCA ATT TTT GGC GTT TTA TCT G 550
501 C CAC ATC GGT GGC CTT TCC ATC CTC GAC CCC ATT TTC GGC GTT CTC TCT G 550

551 AT GTA TTG ACC GCT ATT TTC CAA GAC ACC GTA CGT AAG GAA ATG ACC AAA 600
551 AT GTC CTG ACC GCT ATC TTC CAA GAC ACC GTC CGT AAG GAA ATG ACC AAG 600

601 GTA TTG GCA CCA GCA TTT AAA CGT GAA TTG GAA AAA AAT TAA tctagagcgtgta
601 GTC CTG GCC CCC GCC TTC AAG CGT GAG CTG GAA AAG AAT TAA
acaggatagcctagaccacatactatctgtatacaactccgcaatatgaagtgatgaatgcaact

```



Fig. 11 Der/ntv株とDer/opt株におけるポリ(A)付加部位

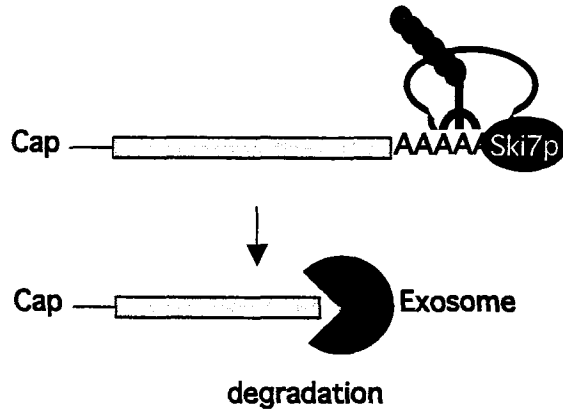


Fig. 12 nonstop mRNA分解経路のモデル図

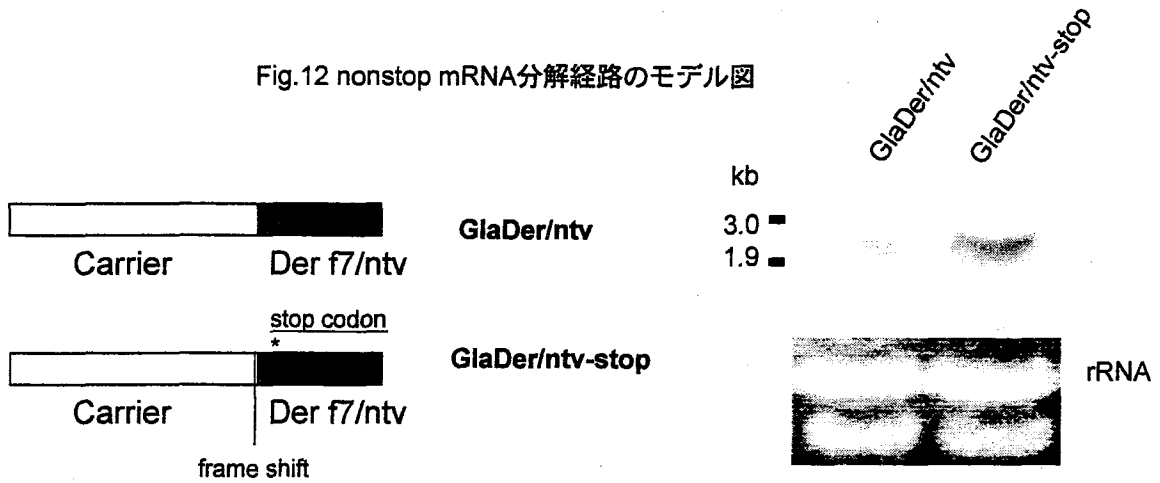


Fig. 13 Der f7 上流配列のストップコドンによるmRNA量の変化

GlaDer/ntv-stopはGlaDer/ntvにおいてKexBによる切断サイトの上流で2塩基の欠失が生じることでDer f7の8アミノ酸目がストップコドンとなった変異クローン。両株をYPM培地で20時間培養した菌体よりRNAを抽出し20  $\mu$ gを泳動した。プローブはDer/ntvを鋳型に作成した。

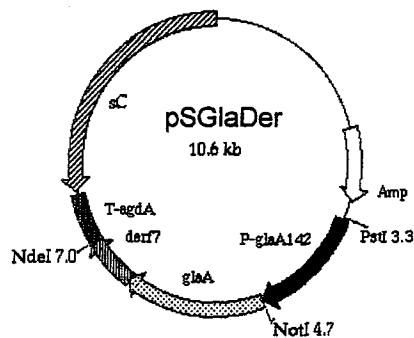


Fig. 14 多コピー導入型ベクター

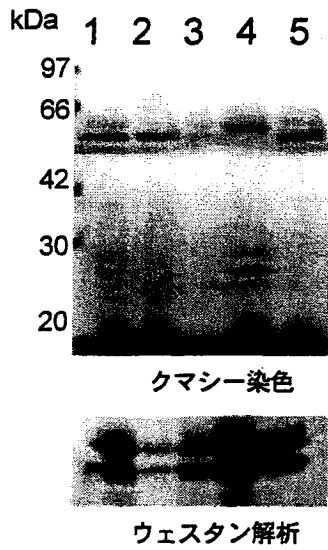


Fig. 15 取得した形質転換体5株の培養上清の SDS-PAGE解析

各株をYPM培地において24時間培養し培養上清15 μlを泳動した。

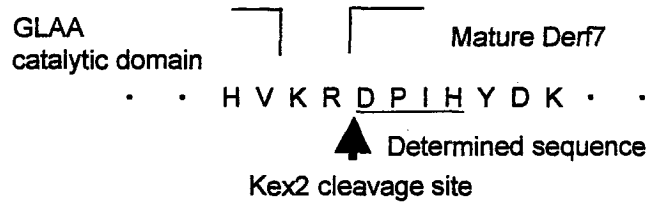


Fig. 16 融合型発現株の分泌Der f7のN末端解析

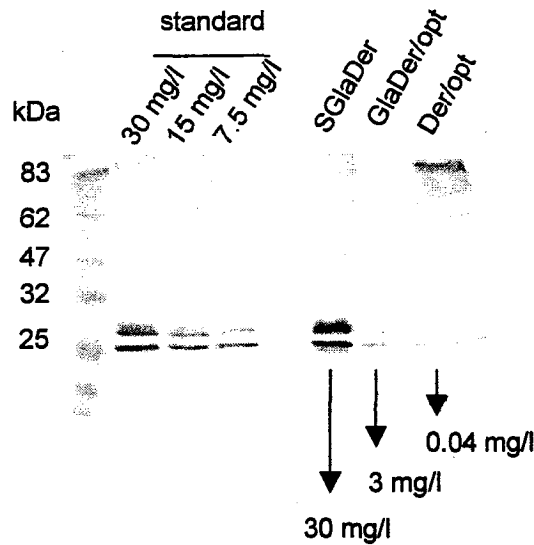


Fig. 17 部分精製Der f7を用いた各発現株のDer f7生産量の定量

部分精製Der f7を希釈してスタンダード溶液を作成しシグナル強度をNIH imageにより数値化し定量した。

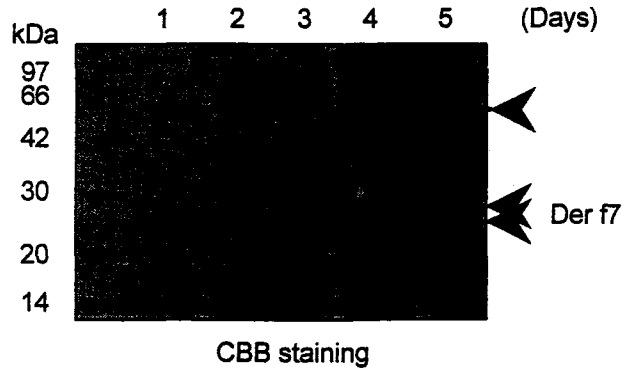


Fig. 18 高発現株培養上清中のキャリアタンパク質とDer f7の蓄積量の時間推移

高発現株SGlaDerをYPMN培地で培養し24時間おきにサンプリングした培養上清15  $\mu$ についてSDS-PAGE解析を行った。

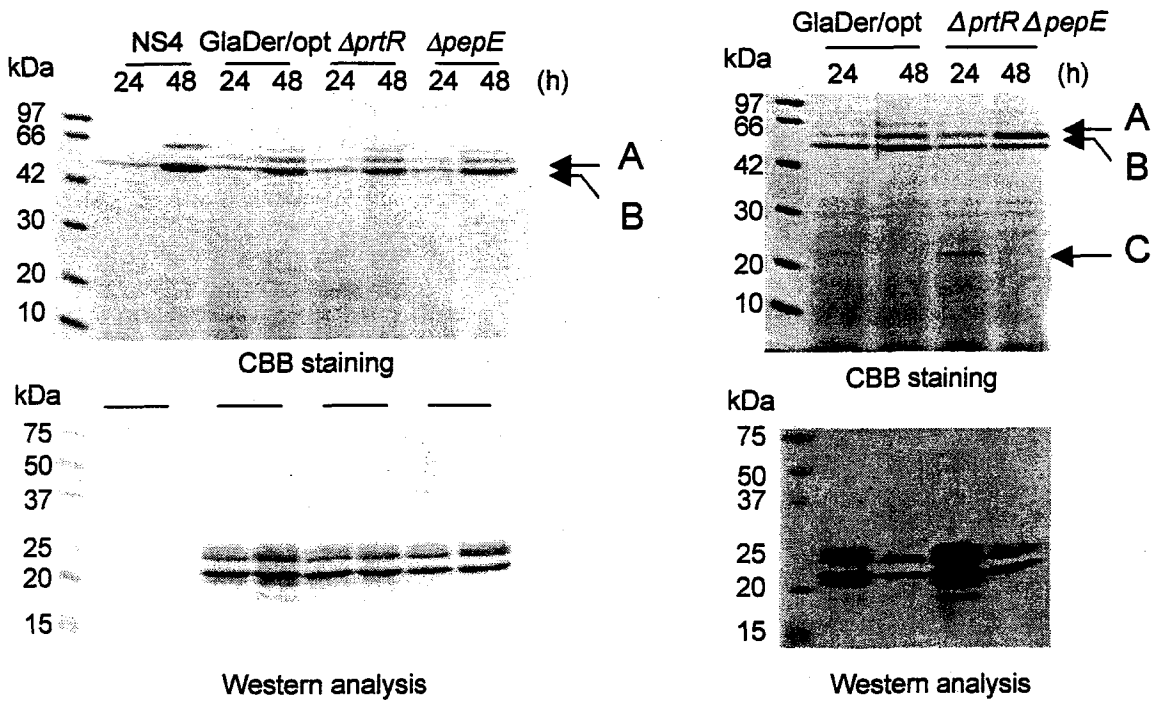


Fig. 19 プロテアーゼ遺伝子破壊株によるDer f7生産

各株をYPM培地で培養し、24時間と48時間での培養上清15  $\mu$ についてSDS-PAGE解析を行った。  
 A; Carrier protein B;  $\alpha$ -amylase C; Der f7

## 論文審査結果要旨

麹菌は長年にわたり醸造食品の製造に用いられてきた微生物であるが、ヒトへの安全性と高いタンパク質分泌能を生かし、近年は異種タンパク質生産の生産宿主として利用することが期待されている。しかし、自己のタンパク質と比較して異種タンパク質の生産量は著しく低く、発現量低下の原因の解明が望まれている。本研究では、ハウスダストアレルギーの原因物質であり、減感作療法のための治療用抗原として生産が望まれているダニアレルゲンタンパク質 Der f7 をモデルとして、糸状菌で詳細な解析が行われていない宿主へのコドン最適化による生産量改善効果を調べた。

はじめに、合成オリゴヌクレオチドを用いたコドン最適化 Der f7 遺伝子の全合成を行い、コドン最適化 Der f7 とネイティブコドンの Der f7 について麹菌での発現量を比較することで、コドン最適化により Der f7 分泌量が増加することを認め、コドン最適化が異種タンパク質生産量の改善に効果的であることを明らかにした。また、分泌生産されたタンパク質と mRNA 量には相関が認められ、コドン最適化は mRNA の転写効率または安定性に効果を及ぼすものと考えられた。そこで、最適化コドンとネイティブコドンのキメラ遺伝子を用いた解析を行った結果、Der f7 の後半部分のコドン最適化により全体を最適化した場合と同様の効果が得られたが、さらに部分的なコドン最適化による効果は見出せなかった。一方、後半部にネイティブなコドンを持つコンストラクトの Der f7 mRNA では、転写産物の長さが不均一になっており、3'-RACE によるシーケンスの結果から、ORF 後半の複数の箇所でも poly (A) 付加が生じていることが分かった。また、ORF 上流にストップコドンを導入することで、Der f7 mRNA 量が増加したことから、ネイティブなコドンの Der f7 においては、ORF 内での poly (A) 付加により生じるストップコドンを持たない mRNA が、nonstop mRNA 分解経路により mRNA 分解されていることが示唆された。したがって、コドン最適化により潜在的な poly (A) 付加シグナルが除去されることで、mRNA 量が増加したものと考えられた。

コドン最適化の効果を生かし、麹菌を宿主とした Der f7 を高生産株の作製を試みた。発現遺伝子の多コピー導入により高発現株を取得したところ、約 30mg/l の生産量を示し、*Aspergillus* 属糸状菌の野生株を宿主とした異種タンパク質生産において最高レベルの生産量を達成することができた。さらに、プロテアーゼ遺伝子破壊株を宿主とすることで、Der f7 生産量を改善できることを明らかにし、今後の Der f7 の実用的な生産への可能性を示すことができた。

本研究では、麹菌を宿主とした異種タンパク質生産において、コドン最適化により生産量の向上を図ることができることを示しただけでなく、これまで明らかにされていなかった真核微生物におけるコドン最適化効果の要因の一端をはじめて解明した。また、本研究は異種タンパク質生産の改良に資するのみならず、真核微生物の転写終結に伴う poly (A) 付加の分子機構解明にも道を開くものである。以上の研究成果にもとづいて、審査員一同は本論文が博士（農学）の学位を授与するに値する内容であると判定した。