

*Aspergillus niger*におけるフィターゼ遺伝子 (*PhyA*) プロモーターの解析

生命分子化学講座 応用菌学分野
手島沙織

(背景と目的) フィターゼはフィチン酸 (myo-inositol-hexakisphosphate) を加水分解する酵素であり, 植物や微生物によって生産される. 家畜生産効率の向上, 環境汚染防止等に有効な酵素として近年世界中でフィターゼの需要は高まっており, その高生産系の確立が求められている. *Aspergillus niger* M3 株は, 野生株 AC134 株に NTG による変異誘起を繰り返し得られた, 野生株の $10^{\sim}20$ 倍のフィターゼを生産する高生産株である. 一方で M3 株は蓄積した突然変異のために生育や孢子形成が野生株に比べて大きく劣っており, 実生産における問題となる. M3 株におけるフィターゼ高生産の機構を明らかにすることで生育, 孢子形成が正常なフィターゼ高生産株の構築が可能になると考えられる. そこでフィターゼの構造遺伝子 *PhyA* 遺伝子の転写量を Northern blotting により調べたところ, M3 株で顕著に増大していたことから, M3 株のフィターゼ生産の増大が転写レベルで起こっていることが示された. AC134 株と M3 株の *PhyA* 遺伝子のコピー数, *PhyA* とその推定プロモーターである上流約 1 kbp (*PhyA* promoter) の塩基配列の違いは認められなかったことから, M3 株における *PhyA* 転写量増大は *PhyA* promoter における転写制御の変化によるものと考えられた. そこで, 本研究では *PhyA* promoter をさらに解析し, 転写制御因子 (シスエレメント) の同定を目的とした.

(方法) *PhyA* promoter に GUS 遺伝子を連結し, さらに *PhyA* terminator 領域をつなげた GUS レポーター発現系を構築した. M3 株および AC134 株は形質転換が困難であったため, *A. niger* A732 株に上記レポーター系を導入し, その活性を解析した. さらに 5'-末端を 100 bp ずつ欠損させる, もしくは *PhyA* promoter 領域における推定転写制御因子結合サイトのみを欠損させた各 *PhyA* promoter を作成し, GUS 遺伝子の発現を酵素活性測定または qRT-PCR によって比較した.

(結果) プロトプラスト REMI 法による形質転換を行い, PCR および Southern blotting によって目的遺伝子の導入を確認し, 各種形質転換体をそれぞれ複数株獲得することができた. 液体培養においてリン酸濃度の違いによるフィターゼ活性と GUS 活性の間に相関がみられ, レポーター系が機能していることが示唆された. 5'-末端を 100 bp ずつ欠損させたインサートをもつ形質転換体の活性を測定したところ, 5'-末端から 700 bp 欠損させた形質転換体の GUS 活性が未欠損のインサートを持つ形質転換体の GUS 活性よりも高くなったが, 5 倍程度と完全な転写制御解除を明らかに示す結果は得られなかった. また, プロモーターの長さが短くなると, 挿入される位置によって GUS 活性が大きくばらつく傾向も見られた. そこでタンパク質結合配列検索サイト (TESS) によって転写制御因子結合配列候補を 3 ヶ所見出し, その領域およびその前後 200bp を欠損させたインサートを持つ形質転換体の活性を測定した結果, 5'-末端から 300 bp-500 bp を欠損させた株で非欠損株と比べて約 20 倍の高い GUS 活性と mRNA の転写量が示され, この領域に *PhyA* 転写制御に関わるシスエレメント結合サイトの存在が示唆された.