

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6473339号
(P6473339)

(45) 発行日 平成31年2月20日 (2019. 2. 20)

(24) 登録日 平成31年2月1日 (2019. 2. 1)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15 Z N A
C 1 2 N 15/31 (2006. 01)	C 1 2 N 15/31
C 1 2 N 15/57 (2006. 01)	C 1 2 N 15/57
C 1 2 N 15/56 (2006. 01)	C 1 2 N 15/56

請求項の数 6 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2015-21497 (P2015-21497)	(73) 特許権者	000005326
(22) 出願日	平成27年2月5日 (2015. 2. 5)		本田技研工業株式会社
(65) 公開番号	特開2016-140343 (P2016-140343A)		東京都港区南青山二丁目1番1号
(43) 公開日	平成28年8月8日 (2016. 8. 8)	(74) 代理人	110000800
審査請求日	平成29年11月29日 (2017. 11. 29)		特許業務法人創成国際特許事務所
微生物の受託番号	NPMD NITE BP-01750	(72) 発明者	新川 智
微生物の受託番号	NPMD NITE BP-01980		埼玉県和光市中央1丁目4番1号 株式会
			社本田技術研究所内
		(72) 発明者	光澤 茂信
			埼玉県和光市中央1丁目4番1号 株式会
			社本田技術研究所内
		(72) 発明者	田中 麻衣子
			埼玉県和光市中央1丁目4番1号 株式会
			社本田技術研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 麹菌変異株及び形質転換体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アスペルギルス・オリゼH O 2 株（受託番号：N I T E B P - 0 1 7 5 0）の転写因子をコードする p r t R 遺伝子の全長又は一部が欠損していることにより該転写因子の機能が欠損し、菌体外酸性プロテアーゼ遺伝子をコードする p e p A 遺伝子の全長又は一部が欠損していることにより該菌体外酸性プロテアーゼの機能が欠損し、菌体外酸性カルボキシペプチダーゼ遺伝子をコードする c p I 遺伝子の全長又は一部が欠損していることにより該菌体外酸性カルボキシペプチダーゼの機能が欠損していることを特徴とする麹菌変異株。

【請求項2】

請求項1記載の麹菌変異株において、アスペルギルス・オリゼH O 4 株（受託番号：N I T E B P - 0 1 9 8 0）であることを特徴とする麹菌変異株。

【請求項3】

アスペルギルス・オリゼH O 2 株（受託番号：N I T E B P - 0 1 7 5 0）の転写因子をコードする p r t R 遺伝子の全長又は一部が欠損していることにより該転写因子の機能が欠損し、菌体外酸性プロテアーゼ遺伝子をコードする p e p A 遺伝子の全長又は一部が欠損していることにより該菌体外酸性プロテアーゼの機能が欠損し、菌体外酸性カルボキシペプチダーゼ遺伝子をコードする c p I 遺伝子の全長又は一部が欠損していることにより該菌体外酸性カルボキシペプチダーゼの機能が欠損している麹菌変異株に、糖化酵素遺伝子が導入されていることを特徴とする形質転換体。

【請求項 4】

請求項 3 記載の形質転換体において、前記糖化酵素遺伝子は、セロビオハイドロラーゼ遺伝子、 β -グルコシダーゼ遺伝子、エンドキシラナーゼ遺伝子、アラビノフラノシダーゼ遺伝子、グルクロニダーゼ遺伝子、エンドグルカナーゼ遺伝子からなる群から選択される少なくとも 1 種の遺伝子であることを特徴とする形質転換体。

【請求項 5】

請求項 4 記載の形質転換体において、前記糖化酵素遺伝子は、アクレモニウム・セルロリティカス由来のセロビオハイドロラーゼ遺伝子、アクレモニウム・セルロリティカス由来の β -グルコシダーゼ遺伝子、サーモアスカス属菌由来のエンドキシラナーゼ遺伝子、アクレモニウム・セルロリティカス由来のアラビノフラノシダーゼ遺伝子、アクレモニウム・セルロリティカス由来のグルクロニダーゼ遺伝子からなる群から選択される少なくとも 1 種の遺伝子であることを特徴とする形質転換体。

10

【請求項 6】

請求項 3～請求項 5 のいずれか 1 項記載の形質転換体において、前記糖化酵素遺伝子は、染色体中に導入されていることを特徴とする形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、固体培養に好適であり、かつ遺伝子組換えの宿主として好適な麹菌変異株及び、該麹菌変異株から得られた形質転換体に関する。

20

【背景技術】

【0002】

従来、稲わら、コーンストーバ等のリグノセルロース系バイオマスを基質として、該基質を糖化酵素により糖化し、得られた糖を微生物（アルコール発酵菌）により発酵させてエタノール等のアルコールを製造する方法が知られている。

【0003】

また、前記リグノセルロース系バイオマスを糖化酵素により糖化する際に、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) 等の麹菌に糖化酵素遺伝子が導入された形質転換体を用いることが知られている。前記形質転換体は、例えば、前記リグノセルロース系バイオマスを用いて固体培養されることにより糖化酵素を生産し、該糖化酵素により該リグノセルロース系バイオマスが糖化される。

30

【0004】

ところが、前記アスペルギルス・オリゼはプロテアーゼ遺伝子を有しており、プロテアーゼを生産するので、前記形質転換体により生産される異種酵素が該プロテアーゼにより分解されてしまうという問題がある。

【0005】

前記問題を解決するために、前記アスペルギルス・オリゼのプロテアーゼ遺伝子を欠損させることにより異種酵素の生産量を向上させることが知られている（例えば、非特許文献 1 参照）。

【先行技術文献】

40

【特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】 Disruption of ten protease genes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* highly improves production of heterologous proteins, *Appl Microbiol Biotechnol*(2011)89:747-759

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかしながら、前記プロテアーゼ遺伝子を欠損させたアスペルギルス・オリゼでは異種酵素の生産量を十分に向上させることができず、さらに改良が望まれる。

50

【0008】

本発明は、かかる事情に鑑み、糖化酵素遺伝子を導入して形質転換することにより異種酵素の生産量を飛躍的に向上させることができる麹菌変異株及び、該麹菌変異株に糖化酵素遺伝子が導入された形質転換体を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

かかる目的を達成するために、本発明の麹菌変異株は、アスペルギルス・オリゼH O 2株（受託番号：N I T E B P - 0 1 7 5 0）の転写因子をコードするp r t R遺伝子、菌体外酸性プロテアーゼ遺伝子をコードするp e p A遺伝子、菌体外酸性カルボキシペプチダーゼ遺伝子をコードするc p I遺伝子の3つの遺伝子のそれぞれの全長又は一部が欠損していることを特徴とする。

10

【0010】

本発明の麹菌変異株によれば、前記p r t R遺伝子の全長又は一部が欠損していることにより、プロテアーゼ遺伝子の発現を正に制御する転写因子を発現することができず、複数のプロテアーゼ遺伝子の発現が抑制される。また、本発明の麹菌変異株によれば、前記p e p A遺伝子の全長又は一部が欠損していることにより、菌体外酸性プロテアーゼ遺伝子の発現が抑制される。さらに、本発明の麹菌変異株によれば、前記c p I遺伝子の全長又は一部が欠損していることにより、菌体外酸性カルボキシペプチダーゼ遺伝子の発現が抑制される。

20

【0011】

この結果、本発明の麹菌変異株に糖化酵素遺伝子を導入して形質転換体としたときに、該形質転換体が生産する糖化酵素（異種酵素）の菌体外酸性プロテアーゼを含む複数のプロテアーゼ及び菌体外酸性カルボキシペプチダーゼによる分解が低減し、該糖化酵素の生産量を飛躍的に向上させることができる。

【0012】

本発明の麹菌変異株は、前記形質転換体とするために、アスペルギルス・オリゼH O 4株（受託番号：N I T E B P - 0 1 9 8 0）であることが適している。

【0013】

本発明の形質転換体は、アスペルギルス・オリゼH O 2株（受託番号：N I T E B P - 0 1 7 5 0）の転写因子をコードするp r t R遺伝子、菌体外酸性プロテアーゼ遺伝子をコードするp e p A遺伝子、菌体外酸性カルボキシペプチダーゼ遺伝子をコードするc p I遺伝子の3つの遺伝子のそれぞれの全長又は一部が欠損している麹菌変異株に、糖化酵素遺伝子が導入されていることを特徴とする。

30

【0014】

本発明の形質転換体によれば、前記p r t R遺伝子、p e p A遺伝子及びc p I遺伝子の全長又は一部が欠損していることにより、菌体外酸性プロテアーゼ遺伝子を含む複数のプロテアーゼ遺伝子及び菌体外酸性カルボキシペプチダーゼ遺伝子の発現が抑制される。そこで、本発明の形質転換体によれば、導入された糖化酵素遺伝子により生産される糖化酵素（異種酵素）の菌体外酸性プロテアーゼを含む複数のプロテアーゼ及び菌体外酸性カルボキシペプチダーゼによる分解が低減し、該糖化酵素の生産量を飛躍的に向上させることができる。

40

【0015】

本発明の形質転換体において、前記糖化酵素遺伝子は、セロビオハイドロラーゼ遺伝子、 β -グルコシダーゼ遺伝子、エンドキシラナーゼ遺伝子、アラビノフラノシダーゼ遺伝子、グルクロニダーゼ遺伝子、エンドグルカナーゼ遺伝子からなる群から選択される少なくとも1種の遺伝子であることが好ましい。

【0016】

前記糖化酵素遺伝子は、より具体的には、アクレモニウム・セルロリティカス由来のセロビオハイドロラーゼ遺伝子、アクレモニウム・セルロリティカス由来の β -グルコシダーゼ遺伝子、サーモアスカス属菌由来のエンドキシラナーゼ遺伝子、アクレモニウム・セ

50

ルロリティカス由来のアラビノフラノシダーゼ遺伝子、アクレモニウム・セルロリティカス由来のグルクロニダーゼ遺伝子からなる群から選択される少なくとも1種の遺伝子であることが好ましい。

【0017】

また、本発明の形質転換体において、前記糖化酵素遺伝子は、染色体中に導入されていることが好ましい。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】本発明の麹菌変異株の形質転換体と、他の麹菌変異株の形質転換体との糖化酵素生産量を示すグラフ。

10

【発明を実施するための形態】

【0019】

次に、添付の図面を参照しながら本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。

【0020】

本実施形態の麹菌変異株は、アスペルギルス・オリゼH O 2株の転写因子をコードするp r t R遺伝子、菌体外酸性プロテアーゼ遺伝子をコードするp e p A遺伝子、菌体外酸性カルボキシペプチダーゼ遺伝子をコードするc p I遺伝子の3つの遺伝子のそれぞれの全長又は一部が欠損しているものである。

【0021】

アスペルギルス・オリゼH O 2株は、アスペルギルス・オリゼA O K 2 7 L株（株式会社秋田今野商店より入手可能）のp y r G遺伝子の全長又は一部が欠損したウリジン要求性変異株であるアスペルギルス・オリゼH O 1株に対し、さらにl i g D遺伝子を欠損させた変異株である。

20

【0022】

アスペルギルス・オリゼH O 1株、アスペルギルス・オリゼH O 2株は、本出願人により、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に寄託されている（寄託日：平成25年11月12日）。受託番号は、アスペルギルス・オリゼH O 1株がN I T E B P-01749であり、アスペルギルス・オリゼH O 2株がN I T E B P-01750である。

【0023】

30

アスペルギルス・オリゼH O 2株のp r t R遺伝子、p e p A遺伝子、c p I遺伝子の3つの遺伝子のそれぞれの全長又は一部を欠損する方法は、プロトプラスト-PEG法、自然変異法等の微生物の遺伝子組み換えにおいて用いられる公知の技術の中から適宜選択して用いることができる。

【0024】

本出願人は、アスペルギルス・オリゼH O 2株のp r t R遺伝子、p e p A遺伝子、c p I遺伝子の3つの遺伝子のそれぞれの全長又は一部が欠損している麹菌変異株を、アスペルギルス・オリゼH O 4株と命名し、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に寄託した（寄託日：平成26年12月9日、受託番号：N I T E B P-01980）。

40

【0025】

また、本実施形態の形質転換体は、アスペルギルス・オリゼH O 4株の染色体に、糖化酵素遺伝子が導入されている。

【0026】

前記糖化酵素遺伝子は、例えば、セロビオハイドロラーゼ遺伝子、β-グルコシダーゼ遺伝子、エンドキシラナーゼ遺伝子、アラビノフラノシダーゼ遺伝子、グルクロニダーゼ遺伝子、エンドグルカナーゼ遺伝子からなる群から選択される少なくとも1種の遺伝子である。

【0027】

また、前記糖化酵素遺伝子は、より具体的には、アクレモニウム・セルロリティカス由

50

来のセロビオハイドロラーゼ遺伝子、アクレモニウム・セルロリティカス由来の β -グルコシダーゼ遺伝子、サーモアスカス属菌由来のエンドキシラーゼ遺伝子、アクレモニウム・セルロリティカス由来のアラビノフラノシダーゼ遺伝子、アクレモニウム・セルロリティカス由来のグルクロニダーゼ遺伝子からなる群から選択される少なくとも1種の遺伝子である。

【0028】

前記形質転換体は、前記糖化酵素遺伝子を発現させるための発現カセットを組み込んだ発現ベクターをアスペルギルス・オリゼH O 4株の染色体に導入することにより得ることができる。ここで、前記発現カセットとは、構造遺伝子を発現させるために必要なDNAの組合せであり、構造遺伝子と宿主細胞内で機能するプロモーター及びターミネーターを含む。前記発現カセットには、さらに、5'-非翻訳領域、3'-非翻訳領域のいずれか1つ以上が含まれていてもよい。

10

【0029】

また、前記発現カセットを組み込む発現ベクターとしては、アスペルギルス・オリゼを初めとする麹菌に対する形質転換に使用可能な公知のベクターの中から適宜選択して、必要に応じて適宜改変したものをを用いることができる。

【0030】

発現ベクターをアスペルギルス・オリゼH O 4株の染色体に導入する形質転換方法は、特に限定されるものではなく、アスペルギルス・オリゼを初めとする麹菌に対する遺伝子導入を行う際に使用される各種方法により行うことができる。前記形質転換方法としては、例えば、プロトプラスト-PEG法、PEG-カルシウム法(Mol.Gen.Genet., vol.218, p.99-104(1989))、エレクトロポレーション法、アグロバクテリウム法等をあげることができる。

20

【0031】

本実施形態の形質転換体によれば、prtR遺伝子、pepA遺伝子、cpI遺伝子の3つの遺伝子のそれぞれの全長又は一部が欠損していることにより、菌体外酸性プロテアーゼ遺伝子を含む複数のプロテアーゼ遺伝子及び菌体外酸性カルボキシペプチダーゼ遺伝子の発現が抑制される。そこで、本実施形態の形質転換体によれば、導入された糖化酵素遺伝子により生産される糖化酵素(異種酵素)の菌体外酸性プロテアーゼを含む複数のプロテアーゼ及び菌体外酸性カルボキシペプチダーゼによる分解が低減し、該糖化酵素の生産量を飛躍的に向上させることができる。

30

【0032】

次に、本発明の実施例及び比較例を示す。

【実施例】

【0033】

〔実施例1〕

本実施例では、アスペルギルス・オリゼH O 2株から、次のようにしてprtR遺伝子、pepA遺伝子、cpI遺伝子の3つの遺伝子が欠損している麹菌変異株であるアスペルギルス・オリゼH O 4株を構築した。

【0034】

40

まず、アスペルギルス・オリゼH O 2株から、次のようにしてprtR遺伝子が欠損している第1の麹菌変異株を構築した。

【0035】

アスペルギルス・オリゼH O 2株のゲノムDNA遺伝子を鋳型に、プライマー1、2にてprtR遺伝子上流配列、プライマー3、4にて下流配列、プライマー5、6にてマーカースライクリング用配列、アスペルギルス・アワモリHA1株(受託番号:NITE BP-01751)のゲノムDNA遺伝子を鋳型に、プライマー7、8にてpyrG遺伝子発現カセットを、それぞれDNAポリメラーゼ(東洋紡績株式会社製、商品名:KOD FX neo)にてPCR増幅し、精製キット(QIAGEN社製、商品名:QIAquick PCR purification kit)にて精製して、計4つの遺伝子断片を取得した。

50

【0036】

次に、プラスミド pRI910（タカラバイオ株式会社製）を制限酵素 Sma I（タカラバイオ株式会社製）にて 30℃ で処理し、前記精製キットにて精製してプラスミドを線状化したもの（以下、「第1の線状化プラスミド」と略記する）を取得した。

【0037】

次に、前記上流配列、pyrG 遺伝子発現カセット、線状化プラスミド配列の3つの遺伝子断片をクローニングキット（タカラバイオ株式会社製、商品名：In-Fusion（登録商標）HD Cloning kit）にて処理し、E. coli HST08 株（タカラバイオ株式会社より入手）に形質転換し、プラスミド pRI910 の Sma I サイト部分に、前記上流配列と pyrG 遺伝子発現カセットとを導入したプラスミド pRI-AoΔprtR1::pyrG を取得した。

10

【0038】

次に、プラスミド pRI-AoΔprtR1::pyrG を制限酵素 Not I（タカラバイオ株式会社製）にて 37℃ で処理し、前記精製キットにて精製して、プラスミド pRI-AoΔprtR1::pyrG を線状化したもの（以下、「第2の線状化プラスミド」と略記する）を取得した。

【0039】

次に、前記マーカースライクリング用配列、前記下流配列、第2の線状化プラスミド配列の3つの遺伝子断片を、前記クローニングキットにて処理して E. coli HST08 株に形質転換し、プラスミド pRI-AoΔprtR1::pyrG の pyrG 遺伝子発現カセットの下流に前記マーカースライクリング用配列、前記下流配列を導入したプラスミド pRI-AoΔprtR::pyrGR を取得した。

20

【0040】

次に、プラスミド pRI-AoΔprtR::pyrGR を鋳型に、プライマー 9、10 を用い、前記 DNA ポリメラーゼにて PCR 増幅し、前記精製キットにて精製して麹菌形質転換用の遺伝子断片を取得した。

【0041】

次に、PEG-カルシウム法により定法に従って、前記麹菌形質転換用の遺伝子断片を用い、アスペルギルス・オリゼ H02 株を形質転換した。

【0042】

30

次に、前記形質転換したアスペルギルス・オリゼ H02 株から、CD 培地にて生育できる株を選択し、prtR 遺伝子欠損株を取得した。

【0043】

次に、得られた prtR 遺伝子欠損株の孢子懸濁液を、CD 培地に終濃度 1 mg / 1 mL の 5-フルオロオロチン酸一水和物（和光純薬工業株式会社製）と終濃度 20 mM のウリジン（シグマアルドリッチ社製）とを加えたプレート培地に、 1×10^6 個 / プレートになるように植菌し、生育できる株を選択して、アスペルギルス・オリゼ H02 株の prtR 遺伝子欠損株であり、ウリジン要求性を備える第1の麹菌変異株を取得した。

【0044】

プライマー 1～10 の塩基配列を表 1 に示す。

40

【0045】

【表 1】

プライマー 番号	塩基配列 5'→3'	配列 番号	備 考
1	tcgagctcgg tacccgcgcc ttgttcctta aagggtctaa tg	1	prtR 遺伝子上流配列
2	gatgctcgag ctgtcggaata atcggcgagtg agaacaagct gag	2	prtR 遺伝子上流配列
3	tttacatggt ctggcgcgtg attg	3	prtR 遺伝子下流配列
4	aggatccccg cggcctcaac gacggaatcc ccatcatcta c	4	prtR 遺伝子下流配列
5	gatgattagg cggccgggta tgcccgatca caatcttcaa c	5	マーカースライキング用配列
6	gccagaccat gtaaagcggc cgcgaataat cggcgagtag aacaagctga g	6	マーカースライキング用配列
7	gcaagctcga gcatccaact aaactag	7	pyrG 遺伝子発現施設
8	ctctagagga tccccgcggc cgcctaata tctgcagct ccgtcattg	8	pyrG 遺伝子発現施設
9	ctcatgatcc tggcagaca g	9	麹菌形質転換用遺伝子断片
10	cgggaaacga caatctgata ctg	10	麹菌形質転換用遺伝子断片

【0046】

次に、前記第1の麹菌変異株から、次のようにしてさらに p e p A 遺伝子が欠損している第2の麹菌変異株を構築した。

【0047】

まず、アスペルギルス・オリゼ H O 2 株のゲノム DNA 遺伝子を鋳型に、プライマー 11、12 にて p e p A 遺伝子上流配列、プライマー 13、14 にて下流配列、プライマー 15、16 にてマーカースライキング用配列、アスペルギルス・アワモリ H A 1 株（受託番号：N I T E B P - 0 1 7 5 1）のゲノム DNA 遺伝子を鋳型に、プライマー 7、8 にて p y r G 遺伝子発現カセットを、それぞれ DNA ポリメラーゼ（東洋紡績株式会社製、商品名：KOD -plus- neo）にて PCR 増幅し、精製キット（QIAGEN 社製、商品名：QIAquick PCR purification kit）にて精製して、計 4 つの遺伝子断片を取得した。

【0048】

次に、前記 4 つの遺伝子断片を用いた以外は、前記アスペルギルス・オリゼ H O 2 株の形質転換と全く同一にして、該第1の麹菌変異株を形質転換した。

【0049】

次に、前記形質転換した第1の麹菌変異株から、C D 培地にて生育できる株を選択し、p e p A 遺伝子欠損株を取得した。

【0050】

次に、得られた p e p A 遺伝子欠損株の孢子懸濁液を用いた以外は、前記アスペルギルス・オリゼ H O 2 株から前記第1の麹菌変異株を取得した場合と全く同一にして、アスペルギルス・オリゼ H O 2 株の p r t R 遺伝子と p e p A 遺伝子との 2 遺伝子欠損株であり、ウリジン要求性を備える第2の麹菌変異株を取得した。

【0051】

プライマー 11～16 の塩基配列を表 2 に示す。

【0052】

10

20

30

40

【表 2】

プライマー 番号	塩基配列 5' → 3'	配列 番号	備 考
1 1	tcgagctcgg tacccgctaa gtggagagcg accaaaatca g	1 1	pepA 遺伝子上流配列
1 2	gatgctcgag cttgcagtga ttgctctcta gacgaaatgt ggag	1 2	pepA 遺伝子上流配列
1 3	ctgatgcacg gcctaagtct aatgaac	1 3	pepA 遺伝子下流配列
1 4	aggatccccc cgccccgcca tccgtgtacc acaactac	1 4	pepA 遺伝子下流配列
1 5	gatgattagg cggcctgata tggagggtgga gatcagcaga ac	1 5	マーカースイクリング用配列
1 6	taggccgtgc atcaggcggc cgcaagtatt gctctctaga cgaaatgtgg ag	1 6	マーカースイクリング用配列

10

【0053】

次に、前記第2の麹菌変異株から、次のようにしてさらにc p I 遺伝子が欠損している麹菌変異株であるアスペルギルス・オリゼH O 4株を構築した。

【0054】

まず、アスペルギルス・オリゼH O 2株のゲノムDNA 遺伝子を鋳型に、プライマー17、18にてc p I 遺伝子上流配列、プライマー19、20にて下流配列、プライマー21、22にてマーカースイクリング用配列、アスペルギルス・アワモリH A 1株（受託番号：N I T E B P - 0 1 7 5 1）のゲノムDNA 遺伝子を鋳型に、プライマー7、8にてp y r G 遺伝子発現カセットを、それぞれDNA ポリメラーゼ（東洋紡績株式会社製、商品名：KOD -plus- neo）にてP C R 増幅し、精製キット（QIAGEN社製、商品名：QI Aquick PCR purification kit）にて精製して、計4つの遺伝子断片を取得した。

20

【0055】

次に、前記4つの遺伝子断片を用いた以外は、前記アスペルギルス・オリゼH O 2株の形質転換と全く同一にして、前記第2の麹菌変異株を形質転換した。

【0056】

30

次に、前記形質転換した第2の麹菌変異株から、C D培地にて生育できる株を選択し、c p I 遺伝子欠損株を取得した。

【0057】

次に、得られたc p I 遺伝子欠損株の胞子懸濁液を用いた以外は、前記アスペルギルス・オリゼH O 2株から前記第1の麹菌変異株を取得した場合と全く同一にして、アスペルギルス・オリゼH O 2株のp r t R 遺伝子と、p e p A 遺伝子と、c p I 遺伝子との3遺伝子欠損株であり、ウリジン要求性を備える麹菌変異株として、アスペルギルス・オリゼH O 4株を取得した。

【0058】

プライマー17～22の塩基配列を表3に示す。

40

【0059】

【表 3】

プライマー 番号	塩基配列 5' → 3'	配列 番号	備 考
17	tgcagctcgg taccggtat gtacaggatg gcgcacatg	17	cpl 遺伝子上流配列
18	gatgctcgag cttgcgttta caagtgcagt ccacttctgg ttc	18	cpl 遺伝子上流配列
19	cacatgacga gacgggtgaa acaatatgac	19	cpl 遺伝子下流配列
20	aggatccccg cggccggacc gttcacgtgt cattgtcatg	20	cpl 遺伝子下流配列
21	gatgattagg cggcctcatc ttgccgatcc tctccattct g	21	マーカサイクリンク用配列
22	ccgtctcgtc atgtggcggc cgcgtttaca agtgcagtcc acttctggtt c	22	マーカサイクリンク用配列

10

【0060】

〔比較例1〕

本比較例では、アスペルギルス・オリゼHO2株から、次のようにしてp r t R遺伝子、p e p A遺伝子、t p p A遺伝子の3つの遺伝子が欠損している第3の麹菌変異株を構築した。

20

【0061】

まず、実施例1と全く同一にして、アスペルギルス・オリゼHO2株のp r t R遺伝子、p e p A遺伝子の2つの遺伝子が欠損している前記第2の麹菌変異株を取得した。次に、前記第2の麹菌変異株から、次のようにしてさらにt p p A遺伝子が欠損している第3の麹菌変異株を構築した。

【0062】

まず、アスペルギルス・オリゼHO2株のゲノムDNA遺伝子を鋳型に、プライマー23、24にてt p p A遺伝子上流配列、プライマー25、26にて下流配列、プライマー27、28にてマーカサイクリンク用配列、アスペルギルス・アワモリHA1株（受託番号：N I T E B P - 0 1 7 5 1）のゲノムDNA遺伝子を鋳型に、プライマー7、8にてp y r G遺伝子発現カセットを、それぞれDNAポリメラーゼ（東洋紡績株式会社製、商品名：KOD -plus- neo）にてPCR増幅し、精製キット（QIAGEN社製、商品名：QIAquick PCR purification kit）にて精製して、計4つの遺伝子断片を取得した。

30

【0063】

次に、前記4つの遺伝子断片を用いた以外は、アスペルギルス・オリゼHO2株から前記第1の麹菌変異株を取得した場合と全く同一にして、前記第2の麹菌変異株を形質転換した。

【0064】

次に、前記形質転換した第2の麹菌変異株から、CD培地にて生育できる株を選択し、t p p A遺伝子欠損株を取得した。

40

【0065】

次に、得られたt p p A遺伝子欠損株の孢子懸濁液を用いた以外は、前記アスペルギルス・オリゼHO2株から前記第1の麹菌変異株を取得した場合と全く同一にして、アスペルギルス・オリゼHO2株のp r t R遺伝子と、p e p A遺伝子と、t p p A遺伝子との3遺伝子欠損株であり、ウリジン要求性を備える第3の麹菌変異株を取得した。

【0066】

プライマー23～28の塩基配列を表4に示す。

【0067】

【表 4】

プライマー 番号	塩基配列 5' → 3'	配列 番号	備 考
2 3	tcgagctcgg tacccctgga ccaaccgcca aggttag	2 3	tppA 遺伝子上流配列
2 4	gatgctcgag ctgacctga attgcaatta atggcggaca atg	2 4	tppA 遺伝子上流配列
2 5	gtgtcttaga tgcgactcaa tacaactggt c	2 5	tppA 遺伝子下流配列
2 6	aggatccccg cggccttgag gctgaagact taaatacgac attgc	2 6	tppA 遺伝子下流配列
2 7	gatgattagg cggcccgtgc aaaccaagca aacaagcatc	2 7	マーカーサイクリング用配列
2 8	tcgcatctaa gacacgcggc cgcactgaat tgcaattaat ggcggacaat g	2 8	マーカーサイクリング用配列

【0068】

〔比較例 2〕

本比較例では、アスペルギルス・オリゼHO2株から、次のようにしてp r t R遺伝子、c p I遺伝子、t p p A遺伝子の3つの遺伝子が欠損している第4の麹菌変異株を構築した。

【0069】

まず、実施例1と全く同一にして、アスペルギルス・オリゼHO2株からp r t R遺伝子が欠損している前記第1の麹菌変異株を取得した。次に、前記第2の麹菌変異株に代えて前記第1の麹菌変異株を用いた以外は実施例1と全く同一にして、該第1の麹菌変異株からさらにc p I遺伝子が欠損している第5の麹菌変異株を取得した。

【0070】

次に、前記第2の麹菌変異株に代えて前記第5の麹菌変異株を用いた以外は比較例1と全く同一にして、該第5の麹菌変異株からさらにt p p A遺伝子が欠損している第4の麹菌変異株を取得した。

【0071】

前記第4の麹菌変異株は、アスペルギルス・オリゼHO2株のp r t R遺伝子と、c p I遺伝子と、t p p A遺伝子との3遺伝子欠損株であり、ウリジン要求性を備える麹菌変異株である。

【0072】

〔比較例 3〕

本比較例では、アスペルギルス・オリゼHO2株から、次のようにしてp r t R遺伝子、p e p A遺伝子、c p I遺伝子、t p p A遺伝子の4つの遺伝子が欠損している第6の麹菌変異株を構築した。

【0073】

まず、実施例1と全く同一にして、アスペルギルス・オリゼHO2株のp r t R遺伝子、p e p A遺伝子、c p I遺伝子の3つの遺伝子が欠損している麹菌変異株としてアスペルギルス・オリゼHO4株を取得した。

【0074】

次に、前記第2の麹菌変異株に代えてアスペルギルス・オリゼHO4株を用いた以外は比較例1と全く同一にして、アスペルギルス・オリゼHO4株からさらにt p p A遺伝子が欠損している第6の麹菌変異株を取得した。

【0075】

前記第6の麹菌変異株は、アスペルギルス・オリゼHO2株のp r t R遺伝子と、p e p A遺伝子と、c p I遺伝子と、t p p A遺伝子との4遺伝子欠損株であり、ウリジン要求性を備える麹菌変異株である。

【0076】

〔形質転換体の構築〕

次に、セロビオハイドロラーゼ（c b h 1）遺伝子を導入する場合を例として、形質転換体の構築方法について説明する。

【0077】

まず、アスペルギルス・オリゼH O 2株のゲノムDNA遺伝子を鋳型に、プライマー29、30にてp y r G遺伝子上流配列、プライマー31、32にて下流配列、プライマー33、34にてt e f lプロモーター遺伝子、プライマー35、36にてa g d Aターミネーター遺伝子、アクレモニウム・セルロリィティカスH 1株（受託番号：N I T E B P - 1 1 5 0 8）のゲノムDNAを鋳型に、プライマー37、38にてセロビオハイドロラーゼ（c b h 1）遺伝子、アスペルギルス・アワモリH A 1株（受託番号：N I T E B P - 0 1 7 5 1）のゲノムDNA遺伝子を鋳型に、プライマー39、40にてp y r G遺伝子発現カセットを、それぞれDNAポリメラーゼ（東洋紡績株式会社製、商品名：KOD -plus- neo）にてPCR増幅し、精製キット（QIAGEN社製、商品名：QIAquick PCR purification kit）にて精製して、計6つの遺伝子断片を取得した。

10

【0078】

次に、プラスミドp M D 2 0（タカラバイオ株式会社製）を制限酵素S m a I（タカラバイオ株式会社製）にて30℃で処理し、前記精製キットにて精製してプラスミドの制限処理物（遺伝子断片）を取得した。

【0079】

前述のようにして得られた各遺伝子断片を、順次クローニングキット（タカラバイオ株式会社製、商品名：In-Fusion（登録商標）HD Cloning kit）にて処理し、E. c o l i H S T 0 8株（タカラバイオ株式会社製）に形質転換し、プラスミドp P P T 1 - C B H 1を取得した。

20

【0080】

次に、得られたプラスミドp P P T 1 - C B H 1を鋳型として、プライマー41、42にて、前記DNAポリメラーゼにてPCR増幅し、前記精製キットにて精製して麹菌形質転換用の遺伝子断片（p y r G - C B H 1断片）を取得した。

【0081】

次に、P E G - カルシウム法の定法に従って、前記麹菌形質転換用の遺伝子断片（p y r G - C B H 1断片）を用い、アスペルギルス・オリゼH O 2株（参考例）、アスペルギルス・オリゼH O 4株（実施例1）、第3の麹菌変異株（比較例1）、第4の麹菌変異株（比較例2）、第6の麹菌変異株（比較例3）をそれぞれ形質転換し、形質転換体を得た。

30

【0082】

次に、得られた形質転換体からC Dプレート培地で生育できる株を選択し、参考例、実施例1、比較例1～3の麹菌変異株にそれぞれ対応する形質転換体を得た。前記形質転換体は、いずれも染色体にセロビオハイドロラーゼ（c b h 1）遺伝子が導入されており、セロビオハイドロラーゼを生産することができる。以下、セロビオハイドロラーゼ（c b h 1）遺伝子が導入されて、セロビオハイドロラーゼを生産することができる形質転換体を「C B H 1生産株」と記載する。

40

【0083】

プライマー29～42の塩基配列を表5に示す。

【0084】

【表 5】

プライマー 番号	塩基配列 5' → 3'	配列 番号	備 考
2 9	ggatatacgga tccccccaga ggtgacttta tccaagattc cttc	2 9	pyrG 遺伝子上流配列
3 0	caattgccgc gaaaaattaa attgaatcta tg	3 0	pyrG 遺伝子上流配列
3 1	ttttcgcggc aattgcccg gtagtggtg gatacgtact ccttttatgg	3 1	pyrG 遺伝子下流配列
3 2	tcgagctcgg tacccttcag gtcacgttct aagcttatca gctg	3 2	pyrG 遺伝子下流配列
3 3	ctaatacatcc tgcagctccg tcattg	3 3	tef1 プロモーター遺伝子
3 4	tcgcggcaat tgcccgcaag ctcgagcatc caactaaact ag	3 4	tef1 プロモーター遺伝子
3 5	ccaccactac cccgggaagc gtaacaggat agcctagacc	3 5	agdA ケースナー遺伝子
3 6	ctgcaggatg attagagtaa ccattcccc gttctctagc tg	3 6	agdA ケースナー遺伝子
3 7	atgtctgcct tgaactcttt caatatgtac aag	3 7	ヒパチン酸代謝経路遺伝子
3 8	atcctgttac gcttctaca aacattgaga gtagtaaggg ttcacg	3 8	ヒパチン酸代謝経路遺伝子
3 9	atccaccact acccgtaag gtccgagaca gtaagggatt g	3 9	pyrG 遺伝子発現部位
4 0	gttcaaggca gacattttga aggtggtgcg aactttgtag ttc	4 0	pyrG 遺伝子発現部位
4 1	cagtgcgcg aacgcaatta atgtgagtta g	4 1	麹菌形質転換用遺伝子断片
4 2	gggatgtgct gcaaggcgat taagttg	4 2	麹菌形質転換用遺伝子断片

【0085】

〔セロビオヒドロラーゼ生産量の測定〕

次に、参考例、実施例 1、比較例 1～3 の麹菌変異株にそれぞれ対応する C B H 1 生産株によるセロビオヒドロラーゼ生産量の測定方法について説明する。

【0086】

前記各 C B H 1 生産株によるセロビオヒドロラーゼ生産量を測定するために、まず、前記各 C B H 1 生産株を、C D プレート培地にて 1 週間培養して胞子を形成させ、0. 0 1 % P O L Y S O R B A T E 2 0 (和光純薬工業社製) を用いて回収し、胞子懸濁液を取得した。

【0087】

次に、1 0 0 m L 三角フラスコに P D 液体培地 (2 質量/容量%デキストリン、1 質量/容量%ポリペプトン、0. 1 質量/容量%カザミノ酸、0. 5 質量/容量%リン酸 2 水素カリウム、0. 0 5 質量/容量%硫酸マグネシウム、0. 1 質量/容量%硝酸ナトリウム) 3 0 m L を取り、これに前記胞子を最終胞子濃度 1×10^4 /m L となるように植菌し、3 0 °C で 6 日間の液体培養を行い、目的酵素であるセロビオヒドロラーゼ (C B H 1) が培地中に分泌発現された C B H 1 生産株の培養液を得た。

【0088】

次に、各培養液中の C B H 1 濃度を、S D S - P A G E 解析により確認した。タンパク質濃度の基準とするために、0. 2 5 μ g、0. 5 μ g 及び 2 μ g の B S A を同時に泳動し、酵素サンプル 1 0 μ L 中の C B H 1 濃度を ChemiDoc (登録商標) XRS+ システムを用いた画像解析により算出した。

【0089】

結果を図 1 及び表 6 に示す。

【0090】

【表 6】

	C B H 1 生産量 (mg / L)	相対値
参考例	19.54	1.0
実施例 1	24.23	1.24
比較例 1	21.30	1.09
比較例 2	22.08	1.13
比較例 3	19.93	1.02

10

【0091】

図 1 及び表 1 から、アスペルギルス・オリゼ H O 2 株（参考例）の形質転換体のセロビオハイドロラーゼ（C B H 1）生産量の相対値を 1.0 とすると、アスペルギルス・オリゼ H O 2 株の転写因子をコードする p r t R 遺伝子、菌体外酸性プロテアーゼ遺伝子をコードする p e p A 遺伝子、菌体外酸性カルボキシペプチダーゼ遺伝子をコードする c p I 遺伝子の 3 つの遺伝子を欠損させたアスペルギルス・オリゼ H O 4 株（実施例 1）の形質転換体の C B H 1 生産量の相対値は 1.24 となり、参考例の形質転換体を大きく上回ることがわかる。

20

【0092】

また、図 1 及び表 1 から、アスペルギルス・オリゼ H O 2 株の p r t R 遺伝子、p e p A 遺伝子、t p p A 遺伝子を欠損させた第 3 の麹菌変異株（比較例 1）、p r t R 遺伝子、c p I 遺伝子、t p p A 遺伝子を欠損させた第 4 の麹菌変異株（比較例 2）、p r t R 遺伝子、p e p A 遺伝子、c p I 遺伝子、t p p A 遺伝子を欠損させた第 6 の麹菌変異株（比較例 3）の形質転換体の C B H 1 生産量の相対値は 1.02 ～ 1.13 であり、いずれも実施例 1 の形質転換体に及ばないことがわかる。

【0093】

従って、実施例 1 のアスペルギルス・オリゼ H O 4 株の形質転換体によれば、糖化酵素である C B H 1 の生産量を飛躍的に向上させることができることが明らかである。

30

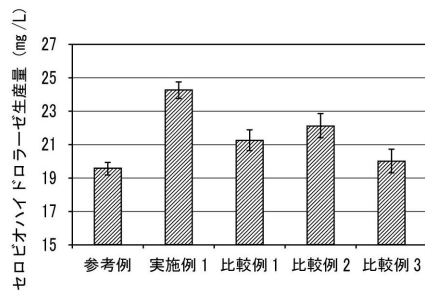
【符号の説明】

【0094】

符号なし

【図 1】

FIG.1



【配列表】

0006473339000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 今井 友裕

埼玉県和光市中央1丁目4番1号 株式会社本田技術研究所内

審査官 西 賢二

(56)参考文献 特公昭35-015435 (JP, B1)

特表2012-533312 (JP, A)

特表2003-526374 (JP, A)

Yoon, J. et al., "Disruption of ten protease genes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* highly improves production of heterologous proteins", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011年, Vol. 89, pp. 747-759

五味勝也、「ゲノム情報から探るコウジカビの有用物質生産機構の分子基盤」、科学研究費補助金研究成果報告書 [online]、平成22年5月28日、インターネット、URL, <https://aken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-17019001/17019001seika.pdf>

五味勝也、「2. 麹菌のポストゲノム研究—転写因子の網羅的機能解析を中心に—」、第28回関東医真菌懇話会プログラム/抄録集 [online]、平成19年6月2日、インターネット、URL, http://www.jsmm.org/symposium/28th_kanto-symposium.pdf

小野崎保道 ほか、麹菌の転写因子 *PrtR* のプロテアーゼ及び異種タンパク生産への関与、第60回日本生物工学会大会講演要旨集、2008年, p. 119; 2Da05

Sharon, H. et al., "Transcription factor *PrtT* controls expression of multiple secreted proteases in the human pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*", *Infect. Immun.*, 2009年, Vol. 77, pp. 4051-4060

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00-7/08

C12N 15/00-15/90

C12N 9/00-9/99

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)