

[生物工学会誌 第76巻 第5号 187-193. 1998]

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の高形質転換法の開発

尾関 健二*・石丸 (永益) 陽子・幸田 明生・峰時 俊貴
大淵 和彦・浜地 正昭・熊谷知栄子

大関㈱総合研究所
〒663-8227 兵庫県西宮市今津出在家町4番9号

(平成9年12月17日受付 平成10年2月23日受理)

Development of High-Frequency Transformation Methods in *Aspergillus oryzae*

KENJI OZEKI,* YOKO ISHIMARU (NAGAMASU), AKIO KODA, TOSHITAKA MINETOKI, KAZUHIKO OHBUCHI, MASAOKI HAMACHI, and CHIEKO KUMAGAI (General Research Laboratory, Ozeki Corp., 4-9 Imazu Dezaike-cho, Nishinomiya, Hyogo 663-8227) Seibutsu-kogaku 76: 187-193, 1998.

High transformation efficiency was obtained by an improvement of transformation procedures in *Aspergillus oryzae*. When Yatalase was used as the protoplasting enzyme and the resultant protoplasts were stored at 5°C for 1 d, the efficiency of transformation using integration vectors showed increases of 4.8-fold in *A. oryzae argB⁻* and 11-fold in *A. oryzae niaD⁻*, compared to the usual method (Novozym 234 and CELLULASE R-10 were used as the protoplasting enzymes, and the resultant competent cells were transformed immediately). The efficiency of transformation using plasmid (*AMA1*) vectors showed increases of 5.6-fold in *A. oryzae argB⁻* and 4.2-fold in *A. oryzae niaD⁻*, compared to the usual method.

[Key words: *A. oryzae*, high transformation efficiency, Yatalase]

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は各種有用酵素を多種大量に生産し、発酵産業にとって非常に重要な微生物である。このような産業上の重要性から、麹菌の遺伝子工学的な手法を用いた育種方法が開発された。^{1,2)} これにより麹菌の生産する有用酵素の遺伝子が種々クローニングされ、麹菌に多コピー導入することによって、目的の酵素を大量に生産することが可能となった。³⁻⁷⁾ また、麹菌は菌体外へのタンパク質の分泌能が高いことにより、異種生物由来の有用タンパク質の生産のための宿主としても期待されている。⁸⁻¹¹⁾

麹菌の形質転換法としては通常、プロトプラスト-PEG 法¹²⁾ が用いられているが、*Aspergillus niger*,¹³⁾ *Aspergillus nidulans*¹⁴⁾ では最近、プロトプラストを経由せずに発芽胞子にエレクトロポレーションで直接 DNA を導入する方法が報告された。形質転換効率は従来法と同程度

であり、麹菌においても適用可能であると考えられる。通常の形質転換法では、麹菌の形質転換には組込み型のベクターが用いられ、効率は良くても 1 µgDNA あたり数個と形質転換頻度はかなり低い。しかしながら染色体に組込まれた DNA は体細胞分裂を繰り返しても、脱落することなく形質転換株の性質はきわめて安定で、実用菌株の育種には大きな利点である。

最近、*A. nidulans* から染色体外で自律複製する DNA 断片が単離され、この *AMA1* (Autonomously maintained in *Aspergillus*) 配列を持つベクターは、糸状菌の細胞内でプラスミドの状態で存在できることが明らかとなった。¹⁵⁾ 前報でこのベクターを利用して麹菌の形質転換を行うと、組込み型のベクターに比べて形質転換効率が100倍以上上昇し、細胞内でもプラスミドの状態で存在し得るので、形質転換株からプラスミドベクターを容易に回収できることを報告した。¹⁶⁾ また、この *AMA1* 配列を持つプラスミドを利用して、麹菌内で働く *A. niger*, *A.*

* 連絡先, Corresponding author.

oryzae 由来の強力なプロモーターの取得が、ショットガンクローニングにより可能であることを報告した.^{17,18)}

そこで今回、通常のプロトプラスト-PEG法による形質転換において、組込み型、プラスミド型の両ベクターで、麹菌の形質転換頻度の向上を試みた。頻度の改良を行うことにより、宿主としての有用性が高い麹菌における実用株の造成が効率良く行い得ると考えられる。

実験方法

使用菌株および培地 *A. oryzae* の *argB* 変異株 (ATCC 96995) は、前報¹⁶⁾ のものを使用した。

A. oryzae の *niaD* 変異株については、RIB40 由来で、国税庁醸造研究所との共同研究で用いている宿主を使用した.¹⁹⁾

両変異株のプロトプラスト調製用の培養には、Dextrin-Peptone (DP) (2%デキストリン, 1%ポリペプトン, 0.5%リン酸1カリウム, 0.1%硝酸ナトリウム, 0.05%硫酸マグネシウム) を使用した。

形質転換株をスクリーニングする培地は、Czapek-Dox (CD) (2%デキストリン, 0.3%硝酸ナトリウム, 0.2%塩化カリウム, 0.1%リン酸1カリウム, 0.05%硫酸マグネシウム, 0.002%硫酸第1鉄) に1.5%寒天とスタビライザーとして0.8 M 塩化ナトリウムを加えたものを使用した。

プロトプラストの再生率を測定する培地には、0.2%酵母エキス, 0.8 M 塩化ナトリウムと1.5%寒天を含む CD プレートを用い、プロトプラストを接種後、同組成の0.6%寒天培地で重層した。

プラスミド 染色体への組込み型のベクターとして、pBluescript II SK⁻ 由来で *A. nidulans argB* マーカーを持つ 8ANGA (8.7 kb)¹⁸⁾ と、pUC118 由来で *A. oryzae niaD* マーカーを持つ 8ANGN (10.3 kb) を用いた。ただし 8ANGN については *EcoRI* サイトでカットして用いた (Fig. 1)。

AMA1 配列を持つプラスミド型ベクターとして、pUC8 由来で *argB* マーカーを持つ ARp1 (11.5 kb)¹⁵⁾ と pUC118 由来で *niaD* マーカーを持つ ANP (13.3 kb) をそれぞれ同様に用いた (Fig. 1)。

プロトプラスト調製法 上記 DP 培地に麹菌の分生子を接種し、30°C で40時間振とう培養した。菌体を G1 のガラスフィルターで集菌し、滅菌水で洗浄後、菌体中の培地成分を除去するために、滅菌済みのシリンジを利用してベレット状にし、50 ml 容ファルコンチューブに入れた。これに0.45 μm のフィルターを通して滅菌した

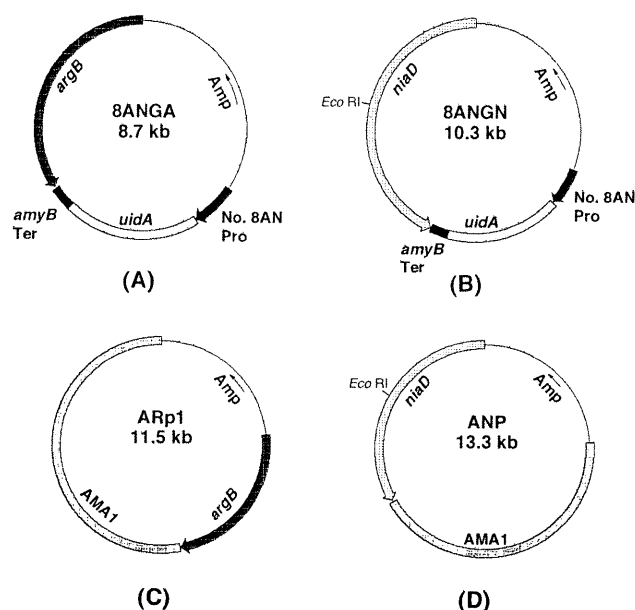


Fig. 1. Plasmids used for *A. oryzae* transformation. Plasmid 8ANGA (A) was constructed by insertion of a 3-kb *A. nidulans argB*, a 0.6-kb *A. niger* No. 8AN promoter,¹⁸⁾ a 1.8-kb *E. coli uidA*, and a 0.3-kb *A. oryzae amyB* terminator into pBluescript II SK⁻. Plasmid 8ANGN (B) was constructed by insertion of a 4.4-kb *A. oryzae niaD*, a 0.6-kb *A. niger* No. 8AN promoter, a 1.8-kb *E. coli uidA*, and a 0.3 kb *A. oryzae amyB* terminator into pUC118. Plasmid ARp1 (C) was reported previously.¹⁵⁾ Plasmid ANP (D) was constructed by insertion of a 4.4-kb *A. oryzae niaD* and a 5.7-kb *A. nidulans AMA1* into pUC118.

プロトプラスト化酵素溶液 [0.5% Yatalase (宝酒造) または 0.5% Novozym 234 (和光純薬) または 0.2% Novozym+0.5% CELLULASE R-10 (ヤクルト薬品), 0.8 M NaCl, 10 mM リン酸緩衝液, pH 6] を菌体に比べ10倍量加えて、30°C で3時間ゆっくり振とうした。反応液を30 μm のナイロンメッシュでろ過して、700 g で5分間遠心してプロトプラストを集めた。

形質転換方法 報告されている一般的な形質転換方法は、^{12,20,21)} プロトプラスト-PEG法で以下に説明する。

上記プロトプラストを0.8 M NaCl で2回洗浄し、さらに溶液1 (0.8 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM トリス塩酸緩衝液, pH 7.5) で1回洗浄し、700 g で5分間遠心してプロトプラストを集めた。プロトプラストを0.625~2.5×10⁸/ml になるように溶液1で懸濁し、1/4 量の溶液2 (40% PEG4000, 50 mM トリス塩酸緩衝液, pH 7.5) を加えた。15 ml 容量のファルコンチューブに、このプロトプラスト溶液0.2 ml を分注し、20 μg (20 μl) までのDNAを加え、氷中で30分間静置した。1 ml の溶液2を加え、室温で20分間静置した後、10 ml の溶液1を加え、700 g で5分間遠心してプロトプラストを集めた。上記

形質転換用プレートを中心に懸濁液を接種し、周りから0.6%の同組成の軟寒天(45°C)を穏やかに入れて重層した。プレートを逆さにし、30°Cで形質転換体の生育を待った(～2週間)。

再生率の測定 上記培地でプロトプラスト500個に対する、30°Cで1週間後に生育してくる麹菌の個数の百分率を測定した。

各種酵素活性 市販酵素剤中に含まれる各種酵素活性を以下のように測定した。

キチナーゼ活性は、Tominagaらの方法²²⁾に従い測定し、1分間に1 μ molのN-アセチルグルコサミンを遊離する酵素活性を1 unitとした。キトビアーゼ活性は、Ohtakaraらの方法²³⁾に従い測定し、1分間に1 μ molのp-ニトロフェノールを遊離する酵素活性を1 unitとした。 β -1,3-グルカナーゼ活性は、五味らの方法²⁴⁾に従い測定し、1分間に1 μ molのグルコースに相当する糖を生成する活性を1 unitとした。細胞壁溶解活性は、前法²⁵⁾に従い測定し、反応後の660 nmにおける濁度を1時間につき1%減少させる酵素活性を1 unitとした。中性プロテアーゼ活性は、中台らの方法²⁶⁾に従い測定し、1分間に1 μ molのクロシンを生成する酵素活性を1 unitとした。

実験結果および考察

各種プロトプラスト化酵素剤の酵素活性 一般的に麹菌のプロトプラスト化には、NovozymとCELLULASE R-10が組み合わせて使用されている。^{12,20,21)}

麹菌のプロトプラスト化に用いる市販の酵素剤中の主な酵素活性を測定した結果をTable 1に示す。

麹菌の細胞壁は、主としてキチンと β -1,3-グルカンから構成されており、細胞壁成分を効率よく溶解するには、キチナーゼ、 β -1,3-グルカナーゼなどの細胞壁溶解酵素のバランスが重要である。Yatalaseの主要な酵素はキチナーゼ、Novozymの主要な酵素は β -1,3-グルカナーゼと、それぞれの酵素剤により特徴が見られた。

プロトプラスト形成効率の比較 市販酵素剤での*A. oryzae argB*変異株と*A. oryzae niaD*変異株に対するプロ

Table 2. Comparison of *A. oryzae* protoplast formation frequencies.

	<i>A. oryzae argB</i> ⁻	<i>A. oryzae niaD</i> ⁻
Yatalase 5 mg/ml	2.6 $\times 10^8$	1.4 $\times 10^8$
Novozym 5 mg/ml	1.2 $\times 10^8$	1.3 $\times 10^8$
N, 2 mg/ml+R-10; 5 mg/ml*	0.76 $\times 10^8$	0.66 $\times 10^8$

* N, 2 mg/ml+R-10; 5 mg/ml: Novozym, 2 mg/ml+CELLULASE R-10, 5 mg/ml.

Condition: protoplast/1 g wet *A. oryzae*/10 ml protoplasting solution.

トプラスト形成効率をTable 2に示す。

麹菌は、0.5% Yatalase 単独でプロトプラスト化できた。一般的に用いられているNovozymとセルラーゼの組み合わせに比べ、キチナーゼ活性が12.5倍高くなっていること、あるいは細胞壁溶解関連の酵素バランスが良いことなどが原因として推測される。Yatalase 単独に比べ、通常用いられているNovozymとセルラーゼの組み合わせでは、プロトプラスト形成率が2.1から3.4倍低くなった。またNovozym 単独でも、*argB*変異株で2倍以上プロトプラスト形成率が低下した。

酵素剤の各種酵素活性の中で、T.R.R. (Turbidity reduction rate)は麹菌の細胞壁溶解活性であるが、活性はNovozym 単独、Novozymとセルラーゼの組み合わせ、Yatalaseの順であり、活性の強さと得られるプロトプラスト数とは比例しなかった。今回測定していない酵素が起因している可能性もあるが、むしろ各種溶解酵素のバランスが重要と推測できる(未発表データも含めて)。

また培養温度、培養時間、振とう培養か静置培養かなどの違いにより、麹菌の細胞壁組成も多少異なることが予想され、麹菌の種類によって最適のプロトプラスト化の条件を決定するべきであると思われる。

A. oryzae argB 変異株における形質転換効率と再生率

1) 組込み型ベクターでの形質転換 麹菌をYatalaseでプロトプラスト化し、冷蔵庫(5°C)で貯蔵して形質転換すると、当日形質転換するよりも効率が高くなる現象が認められた。

そこでこの現象がYatalaseだけの効果なのか、あるいは一般的に用いられるNovozymとセルラーゼの組み

Table 1. Main enzyme activities in protoplasting enzymes.

	Chitinase	Chitobiase	β -1,3-Glucanase	T.R.R.*	Neutral protease
Yatalase	50	500	300	10000	1300 $\times 10^3$
Novozym 234	8	541	2551	35050	3400 $\times 10^3$
CELLULASE R-10	0.5	182	124	1070	130 $\times 10^3$

* T.R.R., Turbidity reduction rate.
Enzyme activities: units/g-enzyme.

Table 3. Transformation frequencies using integration vector and regeneration rates on *A. oryzae argB*⁻.

5°C Storage		0 d	1 d	3 d
Yatalase (5 mg/ml)	Transformation frequency*	0.6	1.9	1.0
"	Regeneration rate (%)	5.4	5.8	1.7
Novozym + R-10	Transformation frequency*	0.4	0.9	0.9
(2 mg/ml) + (5 mg/ml)	Regeneration rate (%)	5.3	6.3	1.5

* Transformants/ μ gDNA (10 μ gDNA was used).

合わせによっても見られるかどうか、またどの程度まで貯蔵の可能性があるかを検討するために、*A. oryzae argB* 変異株を細胞壁溶解酵素でプロトプラスト化し、当日と5°Cで1日、3日貯蔵して形質転換効率と再生率を測定した (Table 3).

Yatalase でプロトプラストを調製することにより、当日形質転換するよりも、5°Cで1日貯蔵して形質転換する方が、効率が3倍以上上昇した。一般的な Novozym とセルラーゼの組み合わせのプロトプラスト化酵素で、当日形質転換する方法 (従来法) よりも4倍以上効率が高くなった。Yatalase ではプロトプラストを5°Cで3日貯蔵しても従来法以上の効率が得られることが分かった。また、Novozym とセルラーゼの組み合わせにおいても、プロトプラストの5°Cで1日貯蔵により2倍以上形質転換効率が高くなった。

この原因は、プロトプラストの低温貯蔵により DNA を取り込みやすくしているのかあるいは取り込んだ後の安定性が上がることが推測できる。また再生率は両酵素共にほとんど同じ傾向を示しており、効率の違いは再生率の違いではないことも明らかとなった。

2) プラスミド型ベクターでの形質転換 著者ら¹⁶⁾ は、*A. oryzae argB* 変異株の形質転換で、プラスミド型ベクター (*AMA1*) では、染色体への組込み型のベクターに比べて、形質転換効率が100倍以上高いことを報告した。

そこでプラスミド型ベクターにおいても Yatalase と

Novozym で差が認められるのか、またプロトプラストを5°Cで貯蔵することにより、形質転換効率の上昇が見られるのかを調べた。今回 Yatalase と同濃度の Novozym 単独についても検討を加えた (Table 4).

A. oryzae argB 変異株のプラスミド型ベクターでの形質転換においても、プロトプラストの調製に Yatalase を用いる方が明らかに形質転換効率が高かった。これは、従来法である Novozym とセルラーゼの組み合わせで当日形質転換する方法に比べ、5倍以上の形質転換効率であった。また Novozym 単独に対して1.5倍程度の効率の上昇が認められた。

プラスミド型ベクターの場合は、プロトプラストの5°C、1日貯蔵の効果は、Yatalase でわずかに認められる程度であり、組込み型ベクターのような大幅な上昇は起こらなかった。これは、低温貯蔵による効率の上昇が限界に近いとも考えられ、さらに効率を上げるためには、たとえばプロトプラストの形成効率の良い酵素バランスの検討であるとか、再生率が上がるような酵素の組み合わせの検討が必要であると考えられる。

従来法で *AMA1* プラスミドを簡単に回収できることを報告¹⁸⁾ しているが、麹菌を宿主としての *AMA1* プラスミドを用いた有用遺伝子のショットガンクローニングを効率良く行うためには、Yatalase でプロトプラスト化し、コンピテントセルの状態、1日低温貯蔵を行う方法がより効果的ではないかと思われる。

Table 4. Transformation efficiencies using plasmid vector and regeneration rates on *A. oryzae argB*⁻.

5°C Storage		0 d	1 d	3 d
Yatalase (5 mg/ml)	Transformation frequency*	453	467	297
"	Regeneration rate (%)	2.6	1.3	0.6
Novozym (5 mg/ml)	Transformation frequency*	283	207	210
"	Regeneration rate (%)	3.0	1.4	0.9
Novozym + R-10	Transformation frequency*	83	53	113
(2 mg/ml) + (5 mg/ml)	Regeneration rate (%)	3.1	1.4	0.7

* Transformants/ μ gDNA (3 μ gDNA was used).

Table 5. Transformation efficiencies using integration vector and regeneration rates on *A. oryzae niaD*⁻.

5°C Storage		0 d	1 d	3 d
Yatalase (5 mg/ml)	Transformation frequency*	0.3	1.1	0.2
	Regeneration rate (%)	4.6	1.6	0.2
Novozym + R-10 (2 mg/ml) + (5 mg/ml)	Transformation frequency*	0.1	0	0
	Regeneration rate (%)	4.6	2.7	0.1

* Transformants/ μ gDNA (10 μ g *Eco*RI digested DNA was used).

この低温貯蔵の温度として、5°C かあるいは氷温の方が効率が良いかについては今後検討を加えたい。

A. oryzae niaD 変異株における形質転換効率と再生率

1) 組込み型ベクターでの形質転換 これまでは、*A. oryzae argB* 変異株での結果である。同じ麹菌の *niaD* 変異株においても、Yatalase の使用とプロトプラストの低温貯蔵が、組込み型のベクターを用いた場合の形質転換効率を向上させるかどうかについて検討した (Table 5)。

麹菌の *argB* 変異株の場合と同様に、Yatalase を用いる方が明らかに形質転換効率が高く、Novozym とセルラーゼの組み合わせでは、低温貯蔵の効果はまったく認められなかった。Yatalase の場合、プロトプラストを 5°C、1 日貯蔵することにより効率が 3 倍以上に上昇した。従来法の当日形質転換に比べると、効率で 11 倍高くなることが分かった。

niaD 変異株の場合、従来法ではプロトプラストの低温貯蔵の効果はまったく見られず、Yatalase だけにおける効果であることが分かった。*argB* 変異株の場合よりも、*niaD* 変異株の方がプロトプラストを 5°C、1 日貯蔵することにより再生率が低下しているが、形質転換効率は、共に 3 倍以上の上昇が認められ、再生率のある程度の低下は低温貯蔵による効率の上昇にはあまり影響していないことが分かった。

染色体への組込み型のベクターを用いた場合、*argB* 株では非相同時的組換えにより多コピー組込まれると報

告²⁾されているが、*niaD* 株の場合は半分程度の確率で相同組換えが起こり、1 コピー組込まれると報告¹⁹⁾されている。組込み型のベクターの種類によっても形質転換効率に差が出てきており、さらにベクターの大きさも *niaD* マーカーが 1.7 kb (ベクターとしては 1.6 kb) 大きいことも関係して、*argB* 系よりも全体的に効率が低下している。今回は、*niaD* 系はマーカー遺伝子を 1 ヶ所切断してプラスミドを直鎖状にして形質転換しているが、環状のベクターの場合はさらに形質転換効率が低下した。また環状のベクターでも Yatalase のプロトプラスト化による低温貯蔵の効果は認められた (未発表データ)。

2) プラスミド型ベクターでの形質転換 *AMA1* ベクターはこれまで *argB* マーカーだけでしか試験されていない。*niaD* マーカーにおいても形質転換効率が上昇するかを検討した (Table 6)。ただし今回のベクターは環状のものを使用した。

Yatalase は Novozym とセルラーゼの組み合わせ、Novozym 単独に比べて、当日形質転換でそれぞれ 2 倍以上形質転換効率を上昇させた。さらに 5°C、1 日貯蔵すると、Yatalase を用いた場合では、従来法に比べ効率が 4 倍以上に上昇し、今回使用した両麹菌株共に Yatalase でプロトプラスト化し、5°C で 1 日貯蔵することにより、染色体への組込み型のベクターでもプラスミド型のベクターでも、プロトプラストの再生率はやや減少す

Table 6. Transformation efficiencies using plasmid vector and regeneration rates on *A. oryzae niaD*⁻.

5°C Storage		0 d	1 d	3 d
Yatalase (5 mg/ml)	Transformation frequency*	6.5	11.7	1.7
	Regeneration rate (%)	4.9	2.4	0.2
Novozym (5 mg/ml)	Transformation frequency*	2.3	1.2	0
	Regeneration rate (%)	6.8	3.2	0.1
Novozym + R-10 (2 mg/ml) + (5 mg/ml)	Transformation frequency*	2.8	0.7	0
	Regeneration rate (%)	6.8	3.1	0.3

* Transformants/ μ gDNA (5 μ gDNA was used).

Table 7. Comparison of Yatalase-protoplasting transformation frequencies.

Host	Vector	0 d	1 d	3 d
<i>A. oryzae argB</i> ⁻	Integration	1.5	4.8	2.5
"	Plasmid	5.5	5.6	3.6
<i>A. oryzae niaD</i> ⁻	Integration	3.0	11	2.0
"	Plasmid	2.3	4.2	0.6

Transformation frequency = 1: (Novozym 234 and CELLULASE R-10 were used as the protoplasting enzymes, and the resultant competent cells were transformed on the day).

る傾向であるが、逆に形質転換効率の上昇が認められた。

ただし *niaD* マーカーを持つ *AMA1* プラスミドにおいては、形質転換効率が非常に低く、*AMA1* がどの程度機能しているのか、プラスミドとしてどの程度存在しているのか、あるいは染色体に組込まれるのかなどのプラスミドとしての安定性についての検討は行っておらず、今後の検討課題であると思われる。

従来法との形質転換効率の比較 *A. oryzae argB* 変異株と *niaD* 変異株の組込み型、プラスミド型ベクターを用いた形質転換で、従来法と Yatalase を用い、低温貯蔵する方法との比較を行った。Novozym とセルラーゼの組み合わせで、当日形質転換する方法の形質転換効率を 1 とした (Table 7)。

両麹菌株において、従来法に比べて Yatalase を用いた方法では、当日の形質転換で効率が 1.5-3 倍、プロトプラストの 5°C、1 日貯蔵で効率が 4.2-11 倍、5°C、3 日貯蔵では 0.6-3.6 倍の効率であった。したがって、*niaD* 系のプラスミドでの形質転換における 5°C、3 日貯蔵を除いたすべての区分で、従来法よりも効率が良くなることが分かり、特に 5°C、1 日貯蔵することにより効率の上昇が大きくなった。

プロトプラストを貯蔵する場合、dimethyl sulfoxide (DMSO) を入れて、-80°C、1 ヶ月保存可能であるという報告^{20,21)}があるが、Yatalase 単独、Novozym とセルラーゼの組み合わせ、Novozym 単独のすべてにおいて、DMSO を入れたプロトプラストを -80°C、1 ヶ月貯蔵した結果、再生率が大幅に低下し、組込み型のベクターの場合、両麹菌共に形質転換株が得られなかった。したがって、今回は -80°C 貯蔵との直接の比較は行っていない。

Yatalase 単独、Novozym とセルラーゼの組み合わせ、Novozym 単独で、プロトプラストの再生率には大きな違いはないが、Table 2 の結果で Yatalase を用いることにより、両麹菌株共にプロトプラストを数多く調製でき

る。麹菌のプロトプラスト化には、スタビライザーも含めて最適の条件を決定しなければならないが、Yatalase はある程度幅広く麹菌のプロトプラスト化に利用できることが分かった。実際に実用麹菌十数種においてもプロトプラストが大量に得られた (未発表データ)。

これらのことにより、今回開発した Yatalase を用いてプロトプラスト化し、5°C で 1 日貯蔵することにより、より DNA を取り込みやすい状態になるものと予想され、形質転換効率の改良ができることが明らかとなった。有用遺伝子の多コピー導入、ショットガンクローニング、あるいは不要な遺伝子の遺伝子破壊には、より効率良く目的株をスクリーニングでき有効であると思われる。

今後は、電子顕微鏡で低温貯蔵前後でのプロトプラストの表面に差違が見られるかどうか、あるいはコピー数が上げられるような形質転換法の改良などに発展させて行きたいと考えている。

要 約

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の形質転換効率を高められる方法を検討した。その結果、プロトプラスト化酵素に Yatalase を用い、プロトプラストをそのまま 5°C で 1 日貯蔵することにより、従来法 (Novozym 234+CELLULASE R-10 の酵素で、当日形質転換する方法) に比べ、組込み型ベクターを用い *A. oryzae argB* 変異株、*niaD* 変異株の形質転換で、効率がそれぞれ 4.8 倍、11 倍に上昇できることが分かった。一方、プラスミド型ベクター (*AMA1*) では、両変異株で 5°C、1 日貯蔵で、従来法に比較すると同様にそれぞれ 5.6 倍、4.2 倍に効率の上昇が認められ、麹菌での形質転換効率が改良できた。

文 献

- 1) Iimura, Y., Gomi, K., Uzu, H., and Hara, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 323-328 (1987).
- 2) Gomi, K., Iimura, Y., and Hara, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2549-2555 (1987).
- 3) Tada, S., Iimura, Y., Gomi, K., Takahashi, K., Hara, S., and Yoshizawa, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 593-599 (1989).
- 4) Hata, Y., Tsuchiya, K., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C., Tamura, G., and Hara, S.: *Gene*, **108**, 145-150 (1991).
- 5) Minetoki, T., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., and Tamura, G.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1516-1521 (1995).
- 6) Gomi, K., Arikawa, K., Kamiya, N., Kitamoto, K., and Kumagai, C.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1095-1100 (1993).

- 7) Ozeki, K., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C., Tamura, G., and Hara, S.: *Curr. Genet.*, **19**, 367-373 (1991).
- 8) Christensen, T., Woeldike, H., Boel, E., Mortensen, S. B., Hjortshøj, K., Thim, L., and Hansen, M. T.: *Bio/Technology*, **6**, 1419-1422 (1988).
- 9) Boel, E. and Høge-Jensen, I. B.: European Patent Application EP0305216 (1989).
- 10) Tsuchiya, K., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., and Tamura, G.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 895-899 (1994).
- 11) 永益陽子, 尾関健二, 神田晃敬, 浜地正昭, 熊谷知栄子, 布川弥太郎: 生物工程, **74**, 1-6 (1996).
- 12) 五味勝也: 農化, **71**, 1013-1017 (1997).
- 13) Ozeki, K., Kyoya, F., Hizume, K., Kanda, A., Hamachi, M., and Nunokawa, Y.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2224-2227 (1994).
- 14) Sanchez, O. and Aguirre, J.: *Fungal Genetics Newsletter*, **43**, 48-51 (1996).
- 15) Gems, D. H., Johnstone, L., and Clutterbuck, A. J.: *Gene*, **98**, 61-67 (1991).
- 16) Ozeki, K., Hizume, K., Kanda, A., Hamachi, M., and Nunokawa, Y.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1133-1134 (1995).
- 17) 尾関健二: 生物工程, **73**, 428 (1995).
- 18) Ozeki, K., Kanda, A., Hamachi, M., and Nunokawa, Y.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 383-389 (1996).
- 19) Minetoki, T., Nunokawa, Y., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., and Tamura, G.: *Curr. Genet.*, **30**, 432-438 (1996).
- 20) 五味勝也, 原 昌道: 蛋白質・核酸・酵素, **35**, 2552-2566 (1990).
- 21) 五味勝也, 北本勝ひこ: *Cell Science*, **7**, 229-239 (1991).
- 22) Tominaga, Y. and Tsujisaka, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 2325-2333 (1976).
- 23) Ohtakara, A., Yoshida, M., Murakami, M., and Izumi, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 239-247 (1981).
- 24) 五味勝也, 保坂大二郎, 岡崎直人, 田中利雄, 熊谷知栄子, 飯村 穰, 原 昌道: 醸酵工学, **64**, 479-485 (1986).
- 25) 藤井史子, 尾関健二, 神田晃敬, 浜地正昭, 布川弥太郎: 醸協, **87**, 757-759 (1992).
- 26) 中台忠信, 那須野精一, 井口信義: 調味科学, **18**, 437-441 (1971).