

学 位 論 文 題 名

細胞融合を用いたフィターゼ生産菌

Aspergillus niger M3の生育と胞子形成能力の向上

学位論文内容の要旨

フィターゼは、穀物中のフィチンを分解し遊離リン酸にする酵素で、家畜飼料に添加すると飼料効率を向上させるうえ、糞便中のリンを減少させ環境汚染を低減できるので農業上、重要な酵素である。フィターゼは、飼料添加物として工業的に大量に生産され、品質と価格の競争が行われており、低価格・高品質のフィターゼ酵素剤を作る技術が求められている。本論文では、フィターゼをより短時間でより高力価で生産するために、細胞融合を用いたフィターゼ生産菌を得ることを目的としている。

近年、変異、DNA 組換えなどによる優れたフィターゼ生産菌株の育種が活発である。本研究では、*A. niger* M3 と *A. niger* AC134 を実験株として両株の細胞融合を試みた。*A. niger* M3 は、親株 *A. niger* AC134 の複数変異株である。変異と選別の繰り返しによりフィターゼ生産量は、親株の約 200 倍と高い。しかし、生育速度が遅く、胞子形成能と発芽率が低くなったので、理想的な種培養を取得しにくく、フィターゼの生産性にも影響した。単孢子分離しても多くのコロニーが胞子を形成せず、胞子形成能が次第に下がるので、菌株の維持も難しい。一方、親株 *A. niger* AC134 は、生育と胞子形成能は良好であるが、フィターゼ活性は低く生産株となり得ない。本論文では、工業生産での問題を解決するために、両株の優れた点を持つ株を造成し、生育速度、胞子形成能力、フィターゼ生産量及び胞子発芽率を向上した *A. niger* F63-297 を取得することに成功した。

1. *A. niger* AC134 由来の *p*-fluoro-L-phenylalanine 耐性株と *A. niger* M3 由来の hygromycin 耐性株の造成

細胞融合には、選択マーカーが不可欠である。*Aspergillus* 属の遺伝子マーカーとしては、arginine, nicotinamide, cysteine, nicotinic acid, biotine, methionine 及び histidine 要求性変異株を用いて融合株を選別することが報告されている。栄養要求株を用いた細胞融合では、最少培地で融合株を選別しなければならない。しかし薬剤耐性株を用いた細胞融合では、最少培地以外の培地でも融合株を選別できる。本研究では、*A. niger* AC134 由来の *p*-fluoro-L-phenylalanine 耐性 *A. niger* ACf 株と *A. niger* M3 由来の hygromycin 耐性 *A. niger* Mh13 株を造成した。*A. niger* M3 は、生育が遅く、胞子形成能と発芽率が低いので、紫外線照射時間を減し、hygromycin 耐性株を取得した。

2. 細胞壁を溶解する適切な酵素の選択

*A. niger*のプロトプラスト調製には、細胞壁を溶解する適切な酵素を選択することが肝要である。溶菌酵素として novozym 234、cellulase CP、chitinase、カタツムリの腸管内液から調製した酵素液、*Trichoderma viride* や *Bacillus circulans* の培養液に出た混合酵素を用いた例が報告されている。本研究では、Lysing enzymes、cellulase と β -glucuronidase の混合液を用いないと *A. niger* Mh13 と *A. niger* ACf のプロトプラストを作ることはできなかった。

3. プロトプラストの再生のために浸透圧調整剤の選択

プロトプラストの再生においては、浸透圧調整剤の選択はきわめて重要である。浸透圧調整剤としては、 NH_4Cl 、 KCl などの無機塩類やソルビット、マンニトールなどの糖類を用いると報告されている。本研究では、ソルビットやショ糖を検討したところ、ショ糖が *A. niger* Mh13 と *A. niger* ACf のプロトプラストの再生に適していた。再生は、ショ糖(0.6M)含有の PDA 培地で可能となったが、その率は低く 1.9%であった。

4. *A. niger* ACf と *A. niger* Mh13 と間のプロトプラスト融合

細胞融合では、融合率を向上するために適切な融合剤が必要である。融合剤として PEG 6000 (30~20%)、 CaCl_2 (50~10 mM) の例やさらにグリシン (50 mM) を混合した例が報告されている。本研究では、種々検討を重ねた結果 40% PEG 4000、50 mM tris-HCl (pH 7.5) および 50 mM CaCl_2 が、最適な融合剤であった。*A. niger* ACf と *A. niger* Mh13 のプロトプラスト融合を行い、YNB 培地を用いた重層方法で 66 融合株を取得した。融合率は、 2.2×10^{-4} %であった。*A. niger* USDB 0827 と *A. niger* USDB 0828 のプロトプラスト融合の報告では、融合率が最も高く $6.2 \sim 9.1 \times 10^{-2}$ %であった。それと比べて約 300 分の 1 であり、融合率としては低かった。

5. 生育と孢子形成能力を向上した融合株の選別

融合株は、heterokaryon であることも原因して不安定である。薬剤の処理により安定な diploids と haploids の取得を目指した。処理の例としては、融合株を紫外線処理と D-camphor 処理により安定な heterodiploids を得られたことが知られており、他にも benlate、*p*-fluorophenylalanine、6-N-hydroxylaminopurine 及び bleomycin などの処理で diploids を haploids にした例が報告されている。本研究では、融合株の孢子形成が少なかったのも、菌糸に D-camphor と benlate の処理を用い優良株を選別した。生育、孢子形成能が良く、かつ十分なフィターゼ生産量を示した株は、非常に少なかったが、安定的に孢子形成できる株を分離することができた。Diploids と haploids を判定するために、DAPI で核を染色したが、融合株は、なぜか染色性が悪く、倍数性の確認は出来なかった。

核の数を減らした多数の株から、フィターゼ活性が、より高い株を選ぶことはとても繁雑である。そこで中間的スクリーニング法を導入した。即ちモリブデン酸アンモニウム及びフィチン酸 12 ナトリウム含有選別培地を用い、選別率を向上させた。この様な長い行程を経て生育速度、孢子形成能力、フィターゼ生産量及び孢子発芽率の向上した融合株 *A. niger* F63-297 を取得した。*A. niger* F63-297 は、hygromycin 耐性で、孢子形成能力は *A. niger* M3 の 3.6 倍、孢子発芽率は 13 倍、生育速度も *A. niger* M3 よりも速かった。*A. niger* F63-297 の液体培地でのフィターゼ活性は *A. niger* M3 の 2.2 倍であり、固体培養では *A. niger* M3 より 38 U/g wheat bran 増加した。以上のようにプロトプラスト融合によって生育、孢子形成能力及びフィターゼ生産を改善した *A. niger* F63-297 を取得することができた。

以上のように本論文では、フィターゼ生産株である *A. niger* M3 の生育、胞子形成能力及びフィターゼ生産量を向上することができ、農業に貢献できる技術開発を達成することが出来た。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男

副 査 教 授 横 田 篤

副 査 助 教 授 浅 野 行 蔵

学 位 論 文 題 名

細胞融合を用いたフィターゼ生産菌

Aspergillus niger M3の生育と胞子形成能力の向上

本論文は8章からなり、図24、表7、引用文献124を含む総頁数104の和文論文である。別に参考論文2編が付されている。

フィターゼは、穀物中のフィチンを分解し遊離リン酸にする酵素である。家畜飼料に添加すると飼料効率を向上させ、糞便中のリンを減少させ環境汚染を低減できるので農業上、重要な酵素である。本研究では、フィターゼ生産菌 *A. niger* M3 の生育と胞子形成を向上させ、酵素生産時間を短縮して生産性の向上を目的としている。本株は、その親株で野生株 *A. niger* AC134 からの変異と選別の繰り返しによりフィターゼ生産量は、親株の約200倍と高い。しかし、生育速度が遅く、胞子形成能力と発芽率も低くなり、種培養を取得しにくく、フィターゼの生産性にも影響し、菌株の維持も難しい。本株は、多数の変異を抱えており、しかもその位置と機能が不明なため、遺伝子組み換えでの改良は困難であった。

本研究では、生育と胞子形成が良好な野生株である *A. niger* AC134 と本株を細胞融合することによって、両株の優れた点を持つ株を造成し、生育速度、胞子形成能力、フィターゼ生産量及び胞子発芽率を向上した *A. niger* F63-297 を取得することに成功した。

1. 選択マーカーの付与

細胞融合には、選択マーカーが不可欠である。野生株 *A. niger* AC134 には、*p*-fluoro-L-phenylalanine 耐性（以降、pFP 耐性と称する）を付与し、生産株 *A. niger* M3 には、hygromycin 耐性（以降、Hy 耐性と称する）を付与し、それぞれ選択マーカーとした。*A. niger* AC134 由来 pFP 耐性 *A. niger* ACf 株と *A. niger* M3 由来 Hy 耐性 *A. niger* Mh13 株を造成した。

2. 細胞壁溶解酵素の選択

A. niger のプロトプラスト調製には、細胞壁を溶解する適切な酵素および反応条件を選択することが肝要である。溶菌酵素として novozym 234、cellulase CP、chitinase、カタツムリの腸管内液から調製した酵素液、*Trichoderma viride* や *Bacillus circulans* の培養液に

出た混合酵素を用いた例が報告されているが、文献通りには溶解できなかった。種々検討の結果、Lysing enzymes, cellulase と β -glucuronidase の混合液を用いないと *A. niger* Mh13 と *A. niger* ACf の細胞壁の溶解は達成できなかった。

3. プロトプラスト再生用浸透圧調整剤の選択

プロトプラストの再生においては、浸透圧調整剤は重要である。そのためにソルビットがしばしば用いられているが、本株には適応できなかった。種々検討したところ、ショ糖でプロトプラスト再生が可能となった。具体的には、ショ糖(0.6M)含有の PDA 培地でおこなったが、それでも、その率は低く 1.9% であった。

4. *A. niger* ACf と *A. niger* Mh13 のプロトプラスト融合

細胞融合では、融合率を向上するために適切な融合剤が必要である。本研究では、種々検討を重ねた結果 40% PEG 4000, 50 mM tris-HCl (pH 7.5) および 50 mM CaCl_2 が、最適な融合剤であった。両株を融合し、ショ糖(0.6M)含有の YNB 培地で再生させ、さらに *p*-fluoro-L-phenylalanine (2 mg/ml) と hygromycin (0.3 mg/ml) 含有の YNB 培地を重層して 66 融合株を取得した。融合率は、 2.2×10^{-4} % であった。

5. 生育と孢子形成能が向上した融合株の選別

融合株は、heterokaryon であることも原因して不安定である。核の数を少なくし、不安定な多倍数性を減少して安定化するために diploids そして haploids の取得を目指した。融合によって取得できた株は、いずれも孢子形成が少なかった。菌糸に D-camphor と benlate の処理を用い優良株を選別した。

核の数を減らした多数の株から、フィターゼ活性が、より高い株を選ぶことはとても繁雑である。そこでフィターゼ活性によって培地に黄色を生成する仕掛け、すなわちモリブデン酸アンモニウム及びフィチン酸 12 ナトリウム含有選別培地を用い選択を進めた。この様な長い行程を経て生育速度、孢子形成能力、フィターゼ生産量及び孢子発芽率の向上した融合株 *A. niger* F63-297 を取得した。

A. niger F63-297 を基株のフィターゼ生産株 *A. niger* M3 と比較すると、孢子形成能力 3.6 倍、孢子発芽率 13 倍、生育速度も速かった。フィターゼ活性は、液体培地で 2.2 倍であり、固体培養で 38 U/g wheat bran 増加した。

以上のように本論文では、フィターゼ生産株である *A. niger* M3 の生育、孢子形成能力及びフィターゼ生産量を向上することができ、畜産業に貢献できる技術開発を達成することが出来た。

よって審査員一同は、王琦が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。