

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	渡 嘉 敷 直 杏
審査委員	主査 琉球 大学 教授 外 山 博 英
	副査 琉球 大学 准教授 水 谷 治
	副査 鹿児島大学 准教授 二 神 泰 基
	副査 佐賀 大学 教授 後 藤 正 利
	副査 琉球 大学 教授 平 良 東 紀
審査協力者	印
題 目	黒麹菌の形質転換系の構築と新規薬剤耐性マーカー遺伝子の開発 (Construction of protoplast-PEG transformation system for <i>Aspergillus luchuensis</i> and development of novel drug resistance marker gene)
<p>麹菌は糸状菌の一種であり、我が国において、清酒、醤油、味噌などの伝統食品など様々な発酵食品の製造に古くから用いられてきた。本研究で扱う <i>Aspergillus luchuensis</i> は黒麹菌と呼ばれ、沖縄を中心とする泡盛醸造に伝統的に用いられる他、近年九州の一部の焼酎醸造の現場でも用いられている。分子生物学的な観点から <i>A. luchuensis</i> の状況を見ると、ゲノム解析が 2016 年に完了したものの、形質転換系が確立されておらず十分な研究が行えていなかった。<i>Aspergillus</i> 属糸状菌の形質転換は一般に菌体の細胞壁を溶解した後 DNA を導入するプロトプラスト・PEG 法によって行われる。しかしながら、一般的な市販の細胞壁溶解酵素を用いて <i>A. luchuensis</i> のプロトプラストを調製することが出来ない為、この方法を用いた形質転換体の取得が行えなかった。そこで本研究では、まず始めに <i>A. luchuensis</i> のプロトプラスト化法の確立を目指して研究を行った。様々な溶解酵素の検討を行ったところ <math>\alpha</math>-1,3-glucanase を利用すると黒麹菌のプロトプラストが調製可能であることが発見された。また、黒麹菌自体が持つ <math>\alpha</math>-1,3-glucan 合成遺</p>	

伝子候補の一つを破壊した株 ( $\Delta$ agsE) を造成すると  $\alpha$ -1,3-glucanase を利用せずに市販の細胞壁溶解酵素単独でプロトプラストを生成させることができた。 $\Delta$ agsE 株の造成には黒麹菌で利用可能な薬剤耐性マーカー2種が既に利用されており、この株を宿主として、さらなる形質転換を行うのは困難であったため、新規薬剤耐性マーカーの開発を行った。麹菌は一般に強い薬剤耐性を持っており、酵母等で用いられる一般的な抗生物質は効かない。そこで抗真菌薬として利用実績のある化合物の中からアゾール化合物を検討した。アゾール化合物の1つであるイトラコナゾールは、真菌に特異な経路であるエルゴステロール合成経路上に位置する Cyp51A の酵素反応を阻害する。本研究では黒麹菌由来の Cyp51A へ変異を導入し、更に高発現プロモーターへの置換を行うことでイトラコナゾール耐性を付与することのできるマーカーとして利用可能になるか検討した。このマーカー遺伝子を準備し、遺伝子導入が黒麹菌より簡便な黄麹菌において、その有効性の確認を行った。その結果、野生株はイトラコナゾール含有培地上で生育できないのに対して、マーカー遺伝子を導入した黄麹菌株ではイトラコナゾール耐性を有することが明らかとなった。黄麹菌へのイトラコナゾール耐性の付与が可能である事が分かった為、次に同じマーカー遺伝子を黒麹菌へ導入し、耐性付与が可能かどうか調べた。その結果、黒麹菌においてもイトラコナゾール耐性マーカーとして使用できる事が分かった。これにより、黒麹菌と黄麹菌両方でイトラコナゾール耐性を付与するマーカー遺伝子の開発に成功した。以上から、黒麹菌におけるこれらの研究開発は、今後の黒麹菌分子生物学的研究の発展に大きく寄与できると思われる。

以上の実験結果は2報の学術論文として出版され、さらにもう1報の学術論文として発表する予定である。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値を十分に満たしていると判断された。