焼酎麹菌のグルコアミラーゼ、 α -アミラーゼ遺伝子のクロー ニングと醸造への応用

醸造に関する麹菌や酵母の遺伝子が着々とクローニングされ、これまで不明であったことが解明されてきた。本稿では、焼酎麹菌の α -アミラーゼ、グルコアミラーゼの遺伝子のクローニングとその応用の可能性について解説していただいた。

渋谷 一郎

1. はじめに

近年の遺伝子組換え技術の進歩により、従来までクローニングが困難であった麹菌はじめ糸状菌（カビ）由来の遺伝子が、アミラーゼ、セルラーゼ、プロテアーゼ等の菌体外分解酵素をはじめとして、次々とクローン化されるようになってきた。また、クローン化された遺伝子の多くは産業上重要な酵素をコードしており、学問的な興味以外に、実用面でもその応用が多いに期待されているところである。

特に、麹菌は多種多様の酵素を菌体外に分泌するが、なかでもデンプン分解に重要なグルコアミラーゼ (Glucoamylase [EC 3.2.1.3, α -1,4;1,6-glucan glucohydrolase]) および α -アミラーゼ (α -Amylase [EC 3.2.1.1, α -1,4-glucan-4-glucanohydrolase]) を多量に生産することから、これら遺伝子の分泌発現系に興味がもたれ、現在までに、本実験に用いた焼酎用白麹菌 *Aspergillus shirousamii* (アスペルギルス・シロウサミ)¹⁾、黒麹菌 *Aspergillus niger*^{2,3)}、*Aspergillus awamori*⁴⁾、*Aspergillus kawachi*⁵⁾、清酒用黄麹菌 *Aspergillus oryzae*^{6,7)} からグルコアミラーゼ遺伝子が、同じく *A. shirousamii*⁸⁾、*A. oryzae*^{9~12)}、*A. awamori*¹³⁾ から α -アミラーゼ遺伝子が、それぞれ既にクローン化されている。また麹菌以外では、*Rhizopus* sp.¹⁴⁾ からグルコアミラーゼ遺伝子がクローン化されている。

一方、清酒醸造においてグルコアミラーゼは醸造過程や品質面に与える影響が大きく、特に吟醸酒仕込みでは高グルコアミラーゼ活性をもつ麹菌が求められている。

しかしながら、従来の麹菌育種技術では目的とする麹菌を得ることは非常に難しい。また、一般に使用されている醸造用酵母はデンプンを直接資化できないため、米、麦、麦芽、イモ等の原料は、麹、麦芽等の糖化酵素、もしくは酵素剤を用いて、発酵前にあらかじめ液化・糖化を行っておく必要がある。従って、これら糖化酵素を生産する酵母は、デンプンから直接アルコール発酵が行えることから、産業上極めて利用価値が高い。

そこで我々は、*A. shirousamii* からグルコアミラーゼ、 α -アミラーゼ両酵素遺伝子をクローン化し、清酒用黄麹菌、および酵母にそれぞれ導入、発現させることにより、これらの酵素活性を高めた新しい菌株の育種を試みた。また、得られた菌株を用いて実際の醸造試験を行い、その実用性について検討を行ったので、その結果を紹介したい。

2. *A. shirousamii* (アスペルギルス・シロウサミ) について

今回、グルコアミラーゼ、 α -アミラーゼ両遺伝子の供与菌として用いた *A. shirousamii* は、焼酎用麹菌 *Aspergillus usamii* の白色変異株で¹⁵⁾、その分生子頭（胞子）の色が茶褐色ないしは灰白色を呈することから、一般的には白麹菌と呼ばれることが多い。また、分類学上 *A. niger*、*A. awamori* 等と同じ黒麹菌に分類されることもあるが、これらとはその性質がかなり異なる。本菌の特徴は α -アミラーゼ以外に強力な生デンプン分解活性をもつグルコアミラーゼを生産することで、*A. oryzae* のグルコアミラーゼ¹⁶⁾にはこのような生デンプン分解活性

Application of α -Amylase and Glucoamylase Genes of *Aspergillus shirousamii* for Brewing
Ichiro SHIBUYA (The Nikka Whisky Distilling, Co., Ltd.)

はない。また、同時に強い生酸力を持つことから、アルコール工場における実用株として各地で実地に使用されている。

3. グルコアミラーゼ高生産黄麹菌の育種

吟醸酒の主な香気成分である酢酸イソアミル (Isoamyl acetate) およびカプロン酸エチル (Ethyl caproate) は酵母によって合成されるが、この反応を触媒する酵母菌体内のアセチル CoA アセチルトランスフェラーゼ (Acetyl-CoA acetyltransferase)¹⁷⁾ や、エステラーゼ (Esterase)¹⁸⁾ の活性を高レベルで維持するためには、培地中のグルコース濃度を高く保持する必要がある。また吟醸酒仕込みでは、グルコアミラーゼ活性を高いレベルに維持して発酵させた方が、香気成分の生成が多いことが知られている¹⁹⁾。特に、吟醸酒仕込みのように低温で発酵させる場合、もろみ中の α -アミラーゼ活性が高いと糊性成分が多くなり、もろみのボーメ度も必要以上に高まり、その結果発酵が遅れることになる。従って、吟醸酒用麹菌の性質としてはグルコアミラーゼ活性が高いこと、特にグルコアミラーゼ/ α -アミラーゼ活性比が高いことが望ましい^{19,20)}。これらの理由から、突然変異処理によって、グルコアミラーゼ活性を従来の菌株の3倍以上に高めた吟醸用麹菌が得られているが²⁰⁾、これらの菌株はグルコアミラーゼ/ α -アミラーゼ活性比が低く、また、褐変性を呈する等の点で実用性には問題がある。そこで我々はこれらの問題を解決するため、遺伝子組換えの手法を用いて、*A. shirousamii* よりクローン化したグルコアミラーゼ遺伝子を黄麹菌 *A. oryzae* に導入、発現させることにより、グルコアミラーゼ活性を高めた菌株を取得することを試みた。また、取得した菌株を用いて清酒の試験仕込みを行い、その実用性について検討を行った。

3-1 グルコアミラーゼ遺伝子のクローニング¹⁾

常法に従い菌体より全 DNA を抽出、これより遺伝子ライブラリーを作成し、*A. niger* のグルコアミラーゼ遺伝子の塩基配列²⁾ を参考にして作成した合成遺伝子をプローブとして、全長 4.7 kb のグルコアミラーゼ遺伝子をクローン化した。次に、デンプンでグルコアミラーゼの誘導を行った菌体より mRNA を抽出、これより cDNA ライブラリーを作成し、本グルコアミラーゼ遺伝子をプローブとして、全長 1.9 kb のグルコアミラーゼ cDNA をクローン化した。これらの遺伝子の塩基配列を決定したところ塩基配列は文献 1) 参照、①グルコアミラーゼは全部で 629 個のアミノ酸から構成され、分泌に必要なシグナル配列 (24 アミノ酸) を除いた成熟グルコアミラーゼの分子量は、糖鎖を除いて約 66,000

ダルトンと予想され、C 末付近に、生デンプン吸着に必要とされるセリン、スレオニンに富んだ 32 個のアミノ酸からなる TS 領域^{16,21)} が存在することがわかった。また、*A. niger* のグルコアミラーゼ^{2,3)} と比較したところ、遺伝子およびアミノ酸レベルでの相同性は、各々約 85 % および約 95 % と高いことがわかった。また、*A. oryzae* のグルコアミラーゼ⁶⁾ との比較では、アミノ酸レベルでの相同性は約 70 % とやや低かった。

3-2 グルコアミラーゼ遺伝子の *A. oryzae* での発現¹⁾

(1) グルコアミラーゼ遺伝子の導入

一般に、ある生物内で異種遺伝子を効率良く発現させるためには、宿主に適した強力な遺伝子発現のためのプロモーターが必要で、また、遺伝子の発現調節が可能であることが望ましい。一方、今回クローン化したグルコアミラーゼ遺伝子 (4.7 kb) を解析したところ、本遺伝子にはタンパクをコードする部分以外に、プロモーターおよび発現調節に必要と思われる領域が含まれていることがわかった。そこで *A. shirousamii* 由来のプロモーターおよび発現調節部位が、同じアスペルギルス属の *A. oryzae* 中でも機能するのではないかと考え、これらの領域を含めた遺伝子を *A. oryzae* に導入し、グルコアミラーゼ遺伝子の発現を試みた。

宿主のアルギニン栄養要求性を相補する *argB* 遺伝子をもつ *A. oryzae* 用ベクター pRBM 1²²⁾ に、クローン化したグルコアミラーゼ遺伝子を連結し、プロトプラスト法²³⁾により宿主 *A. oryzae* M-2-3 (*argB*)²³⁾ 株に導入した。次に、得られたいくつかの形質転換株についてそれぞれ液体培養を行い、培養上清中のグルコアミラーゼ活性が最も強かった株 (TF 2-5 株) を選択し、以後の実験に用いた。

(2) 液体培養における酵素生産

次に、宿主株および形質転換株について液体培養を行い、培地中に生産された α -アミラーゼ、グルコアミラーゼおよび生デンプン分解活性について比較した (第 1 表)。

第 1 表 形質転換麹菌の液体培養における酵素生産

菌 株	炭 素 源	グルコアミラーゼ活性 (U/g 乾燥 菌体)	α -アミラーゼ活性 (U/g 乾燥 菌体)	生デンプン 分解活性 (U/g 乾燥 菌体)
M-2-3 (宿主)	グルコース	10	90	不検出
	マルトース	890	6,060	120
TF 2-5 (形質転換株)	グルコース	20	160	不検出
	マルトース	4,970	5,670	280

各菌株をグルコースまたはマルトースを 2% 含む Czapek-Dox 培地を用いて、30°C、3 日間振とう培養を行った。

第2表 形質転換麹菌を用いた米麴の酵素活性

菌 株	グルコアミラーゼ活性 (U/g)	生デンプン分解活性 (U/g)	α -アミラーゼ活性 (U/g)	酸性プロテアーゼ活性 (U/g)	酸性カルボキシペプチダーゼ活性 (U/g)	グルコアミラーゼ/ α -アミラーゼ活性比
M-2-3 (宿主)	303	1.2	810	2,489	7,597	0.37
TF 2-5 (形質転換株)	808	8.7	800	2,549	8,783	1.01

その結果、グルコースを炭素源に用いると、宿主株、形質転換株ともに α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼはほとんど生産されなかったが、マルトースを炭素源に用いると、これらの生産が認められた。また、マルトースを炭素源に用いたときの α -アミラーゼ活性は、両株とも大差なかったが、グルコアミラーゼ活性および *A. shirousamii* のグルコアミラーゼの特徴である生デンプン分解活性は、形質転換株の方が宿主株を大きく上回り、*A. shirousamii* 由来のグルコアミラーゼの過剰生産が示された。

一方、麴菌のグルコアミラーゼおよび α -アミラーゼは、グルコースにより生産が抑制され、マルトースやデンプンにより生産が誘導されることが知られており^{1,24)}、また、それらを調節する遺伝子の一部もすでに明らかにされているが^{16,25)}、*A. oryzae* 形質転換株中でも、*A. shirousamii* 由来のグルコアミラーゼが同様の制御を受けていることから、*A. shirousamii* のグルコアミラーゼ遺伝子のプロモーターおよび発現調節部位が、*A. oryzae* 中でも正常に機能していることが示唆された。

3-3 グルコアミラーゼ高生産麹菌を用いた清酒の試験醸造²⁶⁾

次に、形質転換株を用いて米麴を作成、清酒の試験醸造を行った。また、対照株としては宿主 (M-2-3 株) を用いた。

(1) 米麴の作成

精米歩合 70% の白米 (日本晴) を用いて蒸し米を調整した後、麴菌の分生子 (孢子) を接種、温度 30~40℃、湿度 98~85% にて製麴を行い、常法の品温経過をとり 48 時間目に出麴した。対照株を用いた麴と、形質転換株を用いた麴間に、製麴中の外見には特に差は認められなかったが、出麴時の各酵素活性についてみると、 α -アミラーゼ、酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ活性は、それぞれ両者同程度であったのに対して、グルコアミラーゼおよび生デンプン分解活性は、形質転換株の方がそれぞれ 2.7 および 7.3 倍高かった (第2表)。この結果、形質転換株のグルコアミラーゼ/ α -アミラーゼ活性比は宿主株の約 2.7 倍となり、高グルコアミラーゼ活性と併せて、吟醸用麹菌としての性質を持つことがわかった。

第1図 発酵中の CO₂ 発生量とろみ中のグルコアミラーゼ活性の変化

実線 (—) は CO₂ 発生量を、点線 (---) はグルコアミラーゼ活性を示す。(□), (Δ): M-2-3 株, (■), (▲): TF 2-5 株。

(2) 小仕込試験

次にこれらの麴を用いて、総米 200 g の清酒の小仕込試験²⁷⁾を行った。仕込方法は、汲水歩合 130%、麴歩合 23% の通常 3 段仕込みとし、酵母は協会 9 号を使用した。発酵期間中はろみ品温 15℃ 一定とし、発酵がほぼ終了した 13 日目に遠心分離法により上槽した。

(CO₂ 発生量とグルコアミラーゼ活性)

発酵中の CO₂ 発生量と、ろみ中のグルコアミラーゼ活性の変化を第1図に示す。発酵の指標である CO₂ 発生量は、4 日目までは宿主株および形質転換株を用いたろみ間で、ほとんど差はみられなかったが、それ以降 9 日目まで形質転換株を用いた方がやや高く推移した。それ以降は、両者ほぼ同じ速度で発酵が進んだ。結局、この 4 日目から 9 日目までの発酵速度の差が、最終 CO₂ 発生量の差となった。ろみ中のグルコアミラーゼ活性は、形質転換株を用いた方がろみ初期に非常に高い値を示し、以後発酵が進むに従って急速に低下したが、ろみ期間を通して対照株よりも常に高い活性を示した。一方、対照株を用いたろみでも、発酵の進行とともにグルコアミラーゼ活性は徐々に低下したが、形質転換株の場合にみられたろみ前~中期にかけての急速な低下はみられなかった。この理由については現在不明で

第2図 発酵中のもろみ中の全糖量とグルコース量の変化

実線(—)は全糖量を、点線(---)はグルコース量を示す。(□),(△): M-2-3 株, (■),(▲): TF 2-5 株。

あるが、今後さらに検討を要する興味ある課題である。
(全糖量とグルコース量)

発酵中の米デンプンの溶解をみるため、もろみ中の全糖量とグルコース量の変化を調べた(第2図)。全糖量は両もろみ間で大きな差はなかったが、グルコース量は、形質転換株を用いた方が、発酵期間を通して宿主株を用いた方の約3倍高い値を維持した。また、宿主株では発酵期間を通して全糖分の約30%がグルコースであったのに対して、形質転換株では90%以上がグルコースであった。以上のことから、形質転換株で仕込んだもろみは、その高グルコミラーゼ活性のため蒸米デンプンが一気にグルコースまで分解され、その結果、もろみ期間を通してグルコース濃度が高く維持されたと考えられた。一方、宿主株で仕込んだもろみ中の全糖量とグルコース量との差は、デキストリンなどのオリゴ糖と考えられ、いわゆる糊性成分としてもろみ中に存在するものと推察される。

(香气成分の生成)

清酒の香气成分のうち、特に吟醸香の主要成分である酢酸イソアミル、カプロン酸エチルおよびイソアミルアルコール²⁸⁾の発酵中の変化を調べたところ(第3図)、清酒に果実様の華やかな芳香を与える酢酸イソアミルとカプロン酸エチルの生成量、香りの官能評価と相関が高いとされる酢酸イソアミル/イソアミルアルコール比(E/A比)²⁹⁾、いずれも6日目以降形質転換株を用いたもろみで高い値を示した。

(生成酒の性質)

次に、発酵の終了したもろみを遠心分離し、得られた生成酒について一般成分および香气成分の分析を行った(第3表)。その結果、形質転換株を用いた生成酒の方

第3図 発酵中のもろみ中の香气成分の変化

白抜き記号(△, ○, □)は M-2-3 株を、黒記号(▲, ●, ■)は TF 2-5 株を示す。(△), (▲): 酢酸イソアミル, (○), (●): カプロン酸エチル, (□), (■): イソアミルアルコール。

第3表 生成酒の一般分析値

項 目	単 位	M-2-3(宿主)	TF 2-5 (形質転換株)
アルコール度数	(%)	18.0	18.4
日本酒度	(度)	+2	0
酸 度	(ml)	3.2	3.3
アミノ酸度	(ml)	1.6	1.4
全糖分	(%)	2.5	3.7
グルコース量	(%)	0.8	3.7
原エキス分	(%)	34.1	35.2
収 率			
容 量	(ml)	283	323
粕 歩 合	(%)	66	44
生成アルコール	(l/ton 米)	255	297
香 気 成 分			
イソアミルアルコール	(ppm)	136.9	150.9
酢酸イソアミル	(ppm)	9.5	9.7
カプロン酸エチル	(ppm)	1.7	2.0
E/A 比(×100)		6.4	6.9

が、宿主株を用いた生成酒に比べてアルコール分が0.4%高かったにもかかわらず、日本酒度は2、原エキス分は1.1%低く、前者のもろみの方が米デンプンの溶解率が高かったことを示した。顕著な差が認められたのはグルコース含量で、宿主株が0.8%であったのに対し、形質転換株は3.7%と4.6倍多く、また、宿主株ではエキス分の30%がグルコースであったのに対して、形質転換株ではほぼ全量がグルコースであった。注目すべきは生成酒の収量で、形質転換株を用いた方が米デンプンの溶解が良かったことから、宿主株を用いたものに比べて粕歩合は33%少なく、逆に生成酒の容量は14%多かった。その結果、米1トン当たりのアルコール回収率が16%上昇した。このことは、実際の作業上かなり有

利な点と考えられる。なお、総酸、アミノ酸度およびアミノ酸組成は両者ほぼ同程度で、褐変性もそれぞれ認められなかった。また香氣成分は、もろみ経過時と同様、形質転換株を用いた方が高かった。以上のことから、形質転換株を用いた清酒は、官能的に「華やかな芳香を有する適度の甘口酒」になることが予想された。

以上、形質転換株を用いた米麴で清酒仕込みを行ったところ、終始グルコース濃度の高いもろみ経過をとり、その結果発酵が促進し、最終的にグルコース濃度の高い酒をつくることができた。しかも、粕歩合をかなり低くすることができ、褐変性も特に認められなかったことから、形質転換によってグルコアミラーゼ活性を強化した麴菌の有用性が高いことがわかった。今後、グルコアミラーゼ活性を更に高めることにより、より香味に特長のある、新しいタイプの清酒が醸造されることが期待される。

4. グルコアミラーゼ・ α -アミラーゼ生産酵母の育種

醸造用酵母として一般に使用される *Saccharomyces cerevisiae* は、グルコアミラーゼ、 α -アミラーゼ等のデンプン分解酵素を菌体外に生産しないため、デンプンを直接資化することができない。また、デンプン資化性酵母として *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomycopsis fibuligera* 等が知られているが、デンプン分解力、エタノール発酵力が不十分なことから、実用性には問題がある。

一方、清酒、ビール、焼酎、ウイスキー等の醸造原料である、米、麦、麦芽、イモ等は成分的にデンプンが大部分を占めるため、酵母による発酵を行う前に、麴、麦芽等の糖化酵素、もしくは酵素剤を用いて、これらのデンプンをあらかじめ液化・糖化しておく必要がある。従って、グルコアミラーゼ、 α -アミラーゼ等のデンプン分解酵素を生産する酵母は、液化・糖化工程の短縮、原料利用率の向上、酵素剤使用量の低減化等が図れることから、産業上その利用価値は非常に高い。そこで、遺伝子組換え技術を用いて、酵母にデンプン分解酵素を生産させる試みがなされており、糸状菌遺伝子を用いた例としては、*A. niger* のグルコアミラーゼ遺伝子を用いてデンプン資化能や発酵能を酵母にもたせたり^{30,31)}、*Rhizopus* sp. の生デンプン分解活性の強いグルコアミラーゼ遺伝子を用いて生デンプンから直接アルコールを生産させる試みが行われている³²⁾。また、糸状菌以外では、*S. diastaticus* のグルコアミラーゼ遺伝子をビール酵母に導入することにより、デキストリン成分の少ない新しいタイプのビールを醸造する試みも行われている³³⁾。

一方、グルコアミラーゼ、 α -アミラーゼ両酵素を用いてデンプンを分解しようとする場合、各酵素を各々単独で作用させるよりも両酵素を同時に作用させた方が、その相乗効果により、効率良く分解が行われる。そこで我々は、*A. shirousamii* 由来のグルコアミラーゼおよび α -アミラーゼ両遺伝子を各々単独で酵母に導入する以外に、両遺伝子を同時に酵母に導入することにより、両酵素を同時に生産する酵母の育種を試みた。また、得られた各種菌株のデンプン培地における増殖能およびアルコール発酵能について検討を行うと同時に、清酒の試験醸造を行いその実用性について検討を行った。

4-1 α -アミラーゼ cDNA のクローニング⁸⁾

酵母中で他の真核生物由来の遺伝子の発現を試みる場合、導入する遺伝子にイントロンが含まれていると、イントロンの切り出しがうまくいかないため、分泌発現に至らないことが多い¹⁴⁾。そこで、イントロンのないグルコアミラーゼ、 α -アミラーゼ両 cDNA をクローン化し、酵母に導入することを試みた。グルコアミラーゼ cDNA はすでにクローン化してあることから (3-1 参照)、今回新たに α -アミラーゼ cDNA のクローン化を行った。グルコアミラーゼ cDNA の場合と同様、デンプンで α -アミラーゼの誘導を行った cDNA ライブラリーより、その諸性質が *A. shirousamii* の α -アミラーゼと近似している *A. oryzae* 由来のタカアミラーゼ A 遺伝子をプローブとして、全長 1.7 kb の α -アミラーゼ cDNA をクローン化した。全塩基配列の決定を行ったところ〈塩基配列は文献 8) 参照〉、 α -アミラーゼは全部で 499 個のアミノ酸から構成され、分泌に必要なシグナル配列 (21 アミノ酸) を除いた成熟 α -アミラーゼの分子量は、糖鎖を除いて約 52,000 ダルトンと予想された。また、タカアミラーゼ A 遺伝子との比較では、アミノ酸配列は両者全く同一で、塩基配列も 5' 側上流および 3' 下流側の非翻訳領域を含め、数カ所を除きほぼ完全に一致していることがわかった。種の異なる *A. shirousamii* および *A. oryzae* 間で、グルコアミラーゼのアミノ酸レベルでの相同性が約 70%^{8,16)} とさほどでもないにもかかわらず、本 α -アミラーゼ遺伝子の相同性が極めて高く、一方、他の麴菌にもこれらと相同性の高い共通の遺伝子が広く分布していることから^{8,13)}、麴菌の進化の過程で本 α -アミラーゼに対する外部からの選択圧が存在したことが考えられ、非常に興味深く思われる。

4-2 グルコアミラーゼ、 α -アミラーゼ cDNA の酵母への導入⁹⁾

次に、グルコアミラーゼ、 α -アミラーゼ両 cDNA をそれぞれ酵母に導入、分泌発現を試みた。酵母由来の *ADH 1* プロモーターおよび *CYC 1* ターミネーターをも

第4図 酵母発現用プラスミドの構造

A: pYEX-G (グルコアミラーゼ用), B: pYEX-A (α -アミラーゼ用)。白抜き部分は α -アミラーゼ, グルコアミラーゼ各 cDNA を示す。斜線部分はそれぞれ, 酵母由来の *ADH1* プロモーター, *CYC1* ターミネーターを, 矢印の向きは転写方向を示す。灰色部分はそれぞれ, 大腸菌由来の *Ori*, *Amp*, 酵母由来の *TRP1*, 2μ m DNA (2μ) 遺伝子を示す。実線部分は pBR 322 由来の遺伝子を示す。

つ発現ベクター pYcDE 1³⁴⁾ に両遺伝子を各々組み込み (プラスミド pYEX-G および pYEX-A) (第4図), 酵母 YNN 27 (a *trp1 ura3 gal2*)³⁵⁾ 株にそれぞれ導入した。得られた各形質転換株 (グルコアミラーゼ: TG 株, α -アミラーゼ: TA 株) について, ヨウソ・デンプン反応を用いたプレートアッセイを行ったところ, 両形質転換株はそれぞれ分泌されたグルコアミラーゼおよび α -アミラーゼによるハローを形成した (第5図)。

また, 両形質転換株を用いて液体培養を行い, 培養上清中の酵素活性を調べたところ, 培地 1 l 当たり 20~38 mg の酵素タンパクが分泌されていることがわかった (第4表)。現在までにクローン化された糸状菌の分泌酵素遺伝子の多くは, 酵母中でも効率良く分泌発現されることが報告されているが^{36~38)}, 本実験での分泌量もこれらと同程度であった。また, 酵母菌体内外の酵素存在比から, 酵母内で発現された酵素タンパクは速やかに培地中に分泌されていることがわかり, 分泌されたグルコアミラーゼおよび α -アミラーゼのN末付近のアミノ酸配列が麹菌由来のものとそれぞれ一致していたことから, 酵母中でも麹菌と同様のシグナル配列の認識とプロセシ

ングが行われていることが示された。

以上, グルコアミラーゼおよび α -アミラーゼ cDNA を導入した各形質転換株は, 両酵素をそれぞれ効率良く

YNN27

TA

TG

第5図 各種形質転換酵母のデンプンプレート上でのハロー形成

グルコースおよびデンプンを含む合成培地を用いて30°Cにて4日間培養後, ヨウソ・デンプン反応によるハロー形成を調べた。(上): YNN 27 (宿主), (中): TA (α -アミラーゼ形質転換株), (下): TG (グルコアミラーゼ形質転換株)。

第4表 各種酵母形質転換株の液体培地中の酵素活性

菌 株	プラスミド	プラスミド型	組み込んだ遺伝子	グルコアミラーゼ活性 (U/ml)	α -アミラーゼ活性 (U/ml)	分泌タンパク量* (mg/l)
YNN 27 (宿主)	—	—	—	0	0	—
TG	pYEX-G	YEp 型	グルコアミラーゼ	5.1	0	20
TA	pYEX-A	YEp 型	α -アミラーゼ	0	45.0	38
G-14	pIG	YIp 型	グルコアミラーゼ	3.9	0	15
A-5	pIA	YIp 型	α -アミラーゼ	0	14.8	13
AG-11	pIAG	YIp 型	グルコアミラーゼ + α -アミラーゼ	3.0	13.5	24

* 分泌タンパク量は, 比活性をグルコアミラーゼは 250 U/mg, α -アミラーゼは 1,200 U/mg として算出した。

分泌することがわかったが、これらの実験に用いたプラスミド (pYEX-G および pYEX-A) は $2\mu\text{mDNA}$ に由来の YEp 型であるため、酵母宿主内での安定性については問題がある。そこで、YIp 型プラスミドを用いて、遺伝子を直接酵母染色体に組み込むことにより、長期間にわたる発酵や継代培養に耐えられる安定な菌株を得ることを試みた³⁹⁾。また同時に、グルコアミラーゼ、 α -アミラーゼ両 cDNA を同一のプラスミド上に組み込んだものも作成した。

プラスミド pYEX-G および pYEX-A より、遺伝子発現に必要な部分をプラスミド YIp 5⁴⁰⁾ (YIp 型) に連結し、酵母 YNN 27 株に導入した。得られた各種形質転換株について培養上清中の酵素活性を調べたところ、組み込まれた遺伝子のコピー数の違いから、各形質転換株でかなりのバラツキがみられたため、グルコアミラーゼ・ α -アミラーゼ同時発現株からは両酵素活性の強い株 (AG-11 株) (以下、同時発現株と略す) を、各単独発現株については、これと活性がほぼ同程度の株 (グルコアミラーゼ: G-14 株, α -アミラーゼ: A-5 株) (以下、それぞれグルコアミラーゼ発現株, α -アミラーゼ発現株と略す) を各々選択し以後の実験に用いた (第 4 表)。

(1) デンブンプ地での増殖

次に、各種形質転換株のデンプン培地における増殖能について検討を行った。各形質転換株を、炭素源としてデンプンを 2% 含む培地に 1×10^6 cells/ml の菌濃度で植菌し、 30°C にて振とう培養を行い、生菌数を測定した (第 6 図)。その結果、宿主株および α -アミラーゼ発現株はほとんど増殖が認められなかったのに対して、グルコアミラーゼ発現株および同時発現株はゆるやかな増殖を示し、最終的には炭素源としてグルコースを用いた対照株とほぼ同じ菌濃度に達した (2×10^8 cells/ml)。また、同時発現株は、グルコアミラーゼ発現株に比べて増殖が速くなることがわかった。

(2) デンブンプ地でのアルコール発酵

次に、各種形質転換株のデンプン培地でのアルコール発酵能について検討を行った。各形質転換株を、炭素源としてデンプンを 7% 含む培地に 1×10^8 cells/ml の菌濃度で植菌し、 30°C にて静置培養を行い、培地中のアルコール濃度を測定した (第 7 図)。その結果、宿主株および α -アミラーゼ発現株はほとんどアルコールを生成しなかったのに対して、グルコアミラーゼ発現株および同時発現株は、炭素源としてグルコースを用いた対照株に比べて発酵が遅れるものの、順調にアルコールを生成することがわかった。また、同時発現株は、グルコアミラーゼ発現株に比べて発酵が速いことがわかった。

第 6 図 各種形質転換酵母のデンプン培地での増殖

イーストエキス 0.5%, およびデンプン (またはグルコース) を 2% を含む培地を用いて、 30°C にて振とう培養を行った。初発菌濃度: 1×10^6 cells/ml。実線 (—): デンプン培地, 点線 (---): グルコース培地。 (X): 対照株 (宿主 YNN 27 株), (□) A-5: α -アミラーゼ形質転換株, (Δ) G-14: グルコアミラーゼ形質転換株, (O) AG-11: グルコアミラーゼ・ α -アミラーゼ同時形質転換株。

第 7 図 各種形質転換酵母のデンプン培地でのアルコール発酵

イーストエキス 0.3%, モルトエキス 0.3%, ポリペプトン 0.5%, およびデンプン (またはグルコース) を 7% を含む培地を用いて、 30°C にて静置培養を行った。初発菌濃度: 1×10^8 cells/ml。実線 (—): デンプン培地, 点線 (---): グルコース培地。 (X): 対照株 (宿主 YNN 27 株), (□) A-5: α -アミラーゼ形質転換株, (Δ) G-14: グルコアミラーゼ形質転換株, (O) AG-11: グルコアミラーゼ・ α -アミラーゼ同時形質転換株。

以上、同時発現株は、デンプン培地での増殖能およびアルコール発酵能、いずれもグルコアミラーゼ発現株より優れていることがわかったが、この理由としてグルコアミラーゼおよび α -アミラーゼの相乗効果が考えられた。一方、 α -アミラーゼ発現株は、デンプン培地での増殖能およびアルコール発酵能、いずれも認められなかったが、この理由としては、本 α -アミラーゼをデンプン

に作用させたときの最終分解産物は、大部分マルトースであり、宿主として用いた YNN 27 株にはマルトース資化能がなかったためと考えられる。しかしながら、醸造用酵母にはビール酵母のようにマルトース資化能をもつものも多数あることから、これらの酵母に α -アミラーゼ生産性をもたせることにより、デンプン培地での増殖能およびアルコール発酵能が高まることが期待される。

4-3 各種形質転換酵母を用いた清酒の試験醸造⁴¹⁾

次に、これら各種形質転換株を用いて清酒の試験仕込みを行った。また、各形質転換株は、それぞれグルコアミラーゼおよび α -アミラーゼを生産することから、麴の一部を代用することが可能ではないかと考え、麴歩合をそれぞれ 5、10、20% の 3 種類として、その代用効果についても調べた。

その結果、麴歩合を 20% としたものでは発酵経過にさほど差は認められなかったが、麴歩合を 5% および 10% としたものでは、同時発現株、グルコアミラーゼ発現株、 α -アミラーゼ発現株の順で発酵が進み、いずれも対照株を上回った (第 8 図)。

次に、発酵終了後、各もろみを遠心分離法にて上槽し、得られた生成酒の容量、アルコール度数および粕歩合についてそれぞれ比較した (第 9 図)。その結果、麴歩合の多少にかかわらず、同時発現株は酒容量およびアルコール回収量ともに最も多く、逆に粕歩合は最も少なかった。また、グルコアミラーゼ発現株がこれに次ぎ、 α -アミラーゼ発現株は対照株をやや上回った。以上のことから、各発現株はそれぞれの酵母が生産したグルコアミラーゼ、または α -アミラーゼにより米デンプンの溶解が促進し、その結果、発酵が促進され粕歩合も減少したと考えられた。3-3 の結果と同様、清酒仕込みにおいてグルコアミラーゼ活性を高めた効果が確認されたのと同時に、 α -アミラーゼ活性を高めた効果が今回新たに認められた。

また、麴歩合の影響についてみると、高麴歩合では、麴の生産したグルコアミラーゼおよび α -アミラーゼが、形質転換酵母の生産したものよりも過剰にもろみ中に存在するため、形質転換酵母の効果が少なかったが、麴歩合が低くなるに従って、形質転換酵母の生産する酵素の割合が高くなり、その影響も大きくなることがわかった。酵素の生産性を更に高めることにより、高麴歩合でもその効果が顕著なるものと考えられる。一方、品質面でも形質転換酵母で仕込んだもろみは、成分的に従来のものとかなり異なることから、香味の異なった新しいタイプの清酒が醸造できることが期待される。

なお、各種形質転換酵母による麴の代用効果について

第 8 図 形質転換酵母を用いた清酒もろみの発酵経過 (麴歩合: 10%)

(x): 対照株 (宿主 YNN 27 株), (□): α -アミラーゼ形質転換株 (A-5 株), (■): グルコアミラーゼ形質転換株 (G-14 株), (○): グルコアミラーゼ・ α -アミラーゼ同時形質転換株 (AG-11 株)。

第 9 図 上槽後の酒粕量、酒容量およびアルコール回収量 (麴歩合: 10%)

(▨): 対照株 (宿主 YNN 27 株), (□): α -アミラーゼ形質転換株 (A-5 株), (▨): グルコアミラーゼ形質転換株 (G-14 株), (■): α -アミラーゼ・グルコアミラーゼ同時形質転換株 (AG-11 株)。

みると、グルコアミラーゼおよび α -アミラーゼ各単独発現株ではさほど効果はみられなかったが、同時発現株では、麴歩合を 5% に低下させたものでも、対照株を用いて仕込んだ麴歩合が 20% のものに近いもろみ経過および収率を示したことから⁴²⁾、今後更に酵素生産量を高めることにより、低麴歩合仕込みも十分実用可能であることが示された。

5. おわりに

以上、グルコアミラーゼ、 α -アミラーゼ両遺伝子の醸造分野での応用例について紹介してきたが、これらはいずれも実験室レベルの小仕込試験の結果であり、大スケ

ールでこれらと同様の仕込試験を行っても必ずしも同じ結果が得られるわけではないが、おおよその傾向は示されたと考えられる。今後、これらの育種した菌株を用いて工業規模で生産を行うにあたって、検討すべき課題は多く残されているが、特に重要な点として以下のことがあげられる。まず第一に、現在の酵素生産量では実用的に十分とはいえないため、分泌量を更に増やす必要がある。そのためには、プロモーターの強化、分泌シグナルの改良、遺伝子のコピー数の増大化、また宿主についても高分泌変異株等の取得が必要となってくる。二番目として、一般に使用される実用酵母は、栄養要求性等の形質転換マーカーをもたないため、目的の遺伝子を安定に導入し保持させるための手段が必要である。現在、実用株への形質転換方法として、薬剤耐性マーカーを用いる方法等がいくつか開発されているが、十分とはいえず改良の余地がある。三番目として、組換え体の安全性をより高めるには、大腸菌由来の遺伝子等の余分な遺伝子を取り除き、目的遺伝子のみを麹菌および酵母に導入することが必要であるが、現在のところその手法等はまだ開発途上である。将来、これらの技術開発が極めて重要になってくるものと思われる。

また、今回はグルコアミラーゼ、 α -アミラーゼ遺伝子の応用という観点で研究を進めてきたが、これらのデンプン分解酵素以外にも、セルラーゼ、キシラナーゼ等のセルロース分解系酵素遺伝子が、糸状菌からいくつかクローン化されていることから、これらの遺伝子を麹菌、酵母等に導入することにより、米、麦、トウモロコシ等のセルロース成分を直接利用することが可能になることが予想される。稲ワラ、麦粕等のバイオマスの有効利用という点からも、これらは非常に利用価値が高いものと考えられる。

元来、日本酒、焼酎、ビール等はそれぞれ何百年という長い歴史をもつ伝統食品ではあるが、遺伝子組換え等の最新のテクノロジーを用いることにより、醸造工程の改良、品質の向上がなされ、更には全く新しいタイプの酒類が産み出されることが現在おおいに期待されているところである。今後は、種々の社会情勢を考慮しながら、実用化に向けて更に検討を行っていく予定である。

なお、本研究は筆者が(株)醸造資源研究所に出向中に、国税庁醸造試験所との共同研究として行われたものである。本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻をいただいた(株)醸造資源研究所長田村學造先生、前国税庁醸造試験所長原昌道先生をはじめとする関係各位に深く感謝申し上げます。

<ニッカウキスキー(株)>

文 献

- 1) I. SHIBUYA, K. GOMI, Y. IIMURA, K. TAKAHASHI, G. TAMURA and S. HARA : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1905 (1990)
- 2) E. BOEL, I. HJORT, B. SVENSSON, F. NORRIS, K. E. NORRIS and N. P. FILL : *EMBO J.*, **3**, 1097 (1984)
- 3) E. BOEL, M. T. HANSEN, I. HJORT, I. HOEGH and N. P. FILL : *EMBO J.*, **3**, 1581 (1984)
- 4) J. H. NUNBERG, J. H. MEADE, G. COLE, F. C. LAWYER, P. MACABE, V. SCHWERCKART, R. TAL, V. P. WITTMAN, J. E. FLATGAARD and M. A. INNIS : *Molec. Cell. Biol.*, **4**, 2306 (1984)
- 5) S. HAYASHIDA, K. KURODA, K. OHTA, S. KUHARA, K. FUKUDA and Y. SAKAKI : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 923 (1989)
- 6) Y. HATA, K. KITAMOTO, K. GOMI, C. KUMAGAI, G. TAMURA and S. HARA : *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 941 (1991)
- 7) Y. HATA, K. TSUCHIYA, K. KITAMOTO, K. GOMI, C. KUMAGAI, G. TAMURA and S. HARA : *Gene*, **108**, 145 (1991)
- 8) I. SHIBUYA, G. TAMURA, T. ISHIKAWA and S. HARA : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 174 (1992)
- 9) S. TADA, Y. IIMURA, K. GOMI, K. TAKAHASHI, S. HARA and K. YOSHIZAWA : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 593 (1989)
- 10) S. WIRSEL, A. LACHMUND, G. WILDHARDT and E. RUTTKOWSKI : *Mol. Microbiol.*, **3**, 3 (1989)
- 11) M. J. GINES, M. J. DOVE and V. L. SELIGY : *Gene*, **79**, 107 (1989)
- 12) N. TSUKAGOSHI, M. FURUKAWA, H. NAGABA, N. KIRITA, A. TSUBOI and S. UDAKA : *Gene*, **84**, 319 (1989)
- 13) D. R. KORMAN, F. T. BAYLISS, C. C. BARNETT, C. L. CARMONA, K. H. KODAMA, T. J. ROYER, S. A. THOMPSON, M. WARD, L. J. WILSON and R. M. BERKA : *Curr. Genet.*, **17**, 203 (1990)
- 14) Y. TANAKA, T. ASHIKARI, N. NAKAMAURA, N. KIUCHI, Y. SHIBANO, T. AMACHI and H. YOSHIZUMI : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1737 (1986)
- 15) 飯塚 廣, 山口辰良 : 農化, **28**, 972 (1954)
- 16) 秦 洋二 : 醸協, **86**, (11) 829 (1991)
- 17) 石川雄章, 百瀬洋夫, 吉沢 淑 : 醸協, **79**, (1) 62 (1984)
- 18) 栗山一秀, 芦田晋三, 斉藤義幸, 秦 洋二, 杉並孝二, 今安 聰 : 醸酵工学, **64**, 253 (1986)
- 19) 杉並孝二 : 麹研究会年次報告, **17**, 31 (1981)
- 20) 五味勝也, 飯村 穰, 辻 敏, 井上 博, 原昌道 : 醸協, **82**, (6) 425 (1987)
- 21) S. HAYASHIDA, K. NAKAHARA, W. KANLAYAKRIT, T. HARA and Y. TERAMOTO : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 143 (1989)
- 22) K. GOMI, Y. IIMURA and S. HARA : *Agric.*

- Biol. Chem.*, 51, 2549 (1987)
- 23) Y. IMURA, K. GOMI, H. UZU and S. HARA : *Agric. Biol. Chem.*, 51, 323 (1987)
- 24) 林田晋策 : 澱粉科学, 32, 177 (1985)
- 25) S. TADA, K. GOMI, K. KITAMOTO, K. TAKAHASHI, G. TAMURA and S. HARA : *Mol. Gen. Genet.*, 229, 301 (1991)
- 26) I. SHIBUYA, G. TAMURA, E. GOTO, T. ISHIKAWA and S. HARA : *J. Ferment. Bioengineering*, 73, 415 (1992)
- 27) 難波康之祐, 小幡孝之, 萱島 進, 山崎与四良, 村上光彦, 下田高久 : 醸協, 73, (4) 295 (1978)
- 28) 吉沢 淑 : 醸協, 61, (6) 481 (1966)
- 29) 吉沢 淑, 秋山裕一 : 国税庁 醸造 試験所報告, 144, 38 (1972)
- 30) M. A. INNIS, M. J. HOLLAND, P. C. MCCABE, G. E. COLE, V. P. WITTMAN, R. TAL, K. W. K. WATT, D. H. GELFAND, J. P. HOLLAND and J. H. MEADE : *Science*, 228, 21 (1985)
- 31) G. E. COLE, P. C. MCCABE, D. INLOW, D. H. GELFAND, A. BEN-BASSAT and M. A. INNIS : *BioTechnology*, 6, 417 (1988)
- 32) 吉栖 肇 : 発酵と工業, 45, (6) 579 (1987)
- 33) 坂井和久 : 発酵と工業, 45, (6) 569 (1987)
- 34) G. L. MCKNIGHT and B. L. MCCONAUGHY : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 4412 (1983)
- 35) D. T. STINCHCOMB, K. STRUHL and R. W. DAVIS : *Nature*, 282, 39 (1979)
- 36) H. YOSHIZUMI and T. ASHIKARI : *TIBTECH*, 5, 277 (1987)
- 37) T. YAMASHITA, N. TONOUCHI, T. UOZUMI and T. BEPPU : *Mol. Gen. Genet.*, 210, 462 (1987)
- 38) H. HORIUCHI, T. ASHIKARI, T. AMACHI, H. YOSHIZUMI, M. TAKAGI and K. YANO : *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1771 (1990)
- 39) 渋谷一郎, 田村學造, 石川雄章, 原 昌道 : 1990 年度農芸化学会大会講演要旨集, p. 423 (1990)
- 40) D. BOTSTEIN, S. C. FALCO, S. E. STEWART, M. BRENNAN, S. SCHERER, D. T. STINCHCOMB, K. STRUHL and R. W. DAVIS : *Gene*, 8, 17 (1979)
- 41) 渋谷一郎, 田村學造, 島 治正, 石川雄章, 原昌道 : 1990 年度醸酵工学会大会講演要旨集, p. 28 (1990)
- 42) 渋谷一郎ら : 未発表データ
- その他, 麹菌の遺伝子に関する知見をより深めるため, 以下の文献を参照されることをお勧めします。
- 多田節三 : 醸協, 84, (12) 841 (1989)
- 五味勝也 : 化学と生物, 28, (2) 91 (1990)
- 北本勝ひこ : 化学と生物, 29, (1) 25 (1991)
- 田村学造ら : カビの生物学とバイオテクノロジー (1991)

●執筆者紹介(順不同・敬称略)

渋谷 一郎<Ichiro SHIBUYA>

昭和25年10月7日生れ<勤務先とその所在地>ニッカウキスキー(株)生産技術研究所, 〒277 千葉県柏市増尾字松山 967<略歴>昭和48年京都大学農学部農芸化学科卒, 同年ニッカウキスキー(株)入社, 北海道工場等を経て現在生産技術研究所勤務, 昭和62年より平成2年まで(株)醸造資源研究所に出向<抱負>二日酔の特効薬<趣味>食事(+仕事?)の時間を減らしてでもやる, 人から誘われれば絶対に断らない, 我流ワンバターンテニス。

高山 卓美<Takumi TAKAYAMA>

昭和10年4月18日生れ<勤務先とその所在地>宝酒造(株)酒類研究所, 〒520-21 大津市瀬田3-4-1<略歴>昭和34年, 広島大学工学部醸酵工学科卒, 同年宝酒造(株)入社, 62年新製品開発室室長代理, 63年白河工場工場長, 平成元年酒類研究所所長, 現在に至る<抱負>基礎研究と応用開発のバランスをとりながら, 研究者が創造的研究ができるようにしたい<趣味>付き合い程度のゴルフ, 観賞植物の栽培。

畑 富士夫<Fujio HATA>

第87巻 第12号 768 頁参照。

久保 真吉<Shinkichi KUBO>

大正12年8月27日生れ<勤務先とその所在地>アグリバイオ久保, 〒215 川崎市麻生区王禅寺663-102<略歴>昭和21年東京大学農学部農芸化学科卒, 副手を経て, キリンビール(株)入社, 以後約30年間研究所, ホップ管理センター(山形, 山梨)で主にホップの化学, 栽培, 育種, 植物生理などの研究, 51年原料部長, 56年常務, 60年専務, 62年顧問を経て退職, この間原料, 企画, 資材, 研究開発などを担当, 特に植物, 医薬の開発, バイオ技術の導入, 研究所の開設など。農学博士, 経団連食品工業部会長, 農政審議会専門委員, 日中医薬経済技術懇談会常務理事等<抱負>植物バイオや農業, 環境などに強い関心, 日中医薬交流にもボランティアを含め, お役に立てればバイオコンサルタントみたいな仕事を楽しみながら続けたいものです<趣味>ゴルフ, 園芸(庭仕事), 最近はランにも, ただしこれは紺屋の白袴。

佐藤 和夫<Kazuo SATO>

第87巻 第8号 552 頁参照。