セルラーゼ高生産性遺伝子組換え麴菌の利用

醤油粕量の低減化と濾過速度の効率化はともに醤油業界が待ち望んでいた技術である。

筆者らは先人達が示唆した酵素群の中で目的とする酵素の役割を解析出来る組換え DNA 技術の有用性を示した好例である。大いに参考になると思われる。

北 本 則 行

はじめに

醤油製造の副産物である醤油粕は、年間約 10 万トン排出されており¹⁾、そのほとんどが産業廃棄物として処理されている。醤油粕を水で充分洗浄し、醤油分を除いて得られる不溶性物質の約 55%は醤油原料として使用されている大豆と小麦に由来する多糖類であり、その約 6 割がセルロースであることが報告されている²⁾。大豆多糖類の醤油醸造における挙動に関する研究から大豆由来のセルロースはほとんど分解されずに醤油粕に移行し、大豆由来のペクチンはその約 3 割が醤油粕に移行すると考えられている。したがって、醤油粕の少ない醤油を製造する方法の 1 つとして、植物組織分解酵素（セルラーゼ及びペクチナーゼ）の強力な醤油麹菌の使用が有効であることが考えられる。著者らは、醤油粕を低減化することを目的として、醤油麹菌よりセルラーゼ遺伝子やペクチナーゼ遺伝子をクローニングし、それらを高生産する遺伝子組換え麴菌を作出している³⁻⁷⁾。ここでは、醤油麹菌(*Aspergillus oryzae*)のエンドグルカナーゼ遺伝子の解析、醤油麹菌(*A. oryzae*)での高発現⁴⁾及びセルラーゼ高生産遺伝子組換え麴菌の醤油醸造への利用⁸⁾について述べる。

1. 醤油麹菌のエンドグルカナーゼ遺伝子の解析

セルロースはグルコースのみが、 β -1, 4 結合した多糖類で結晶性領域 (Crystalline region) と非結晶性領域 (Amorphous region) を持つ。セルロースの酵素による分解にはエンドグルカナーゼによる非結晶領域の分解とそれに続くエキソセロビオヒドロラーゼによる

分解が起こり、さらにこれらの相乗作用により、セルロースはセロビオースにまで分解される。生成されたセロビオースは β -グルコシダーゼによってさらに分

第 1 図 セルラーゼによるセルロース分解

Application of a High Cellulase-Producing Recombinant *Aspergillus oryzae* Strain
Noriyuki KITAMOTO (Food Research Institute, Aichi Prefectural Government)

解されてグルコースになる(第1図)。したがって、セルロースを低分子化するためにはセルラーゼの中でもエンドグルカナーゼが重要となる。そこで、醤油麹菌のエンドグルカナーゼ遺伝子のクローニングをまず行った。

セルラーゼ高生産菌株の主要なエンドグルカナーゼと相同性の高い醤油麹菌のエンドグルカナーゼ遺伝子断片をPCR法を用いて最初に増幅した。得られた遺伝子断片をプローブとして醤油麹菌の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることにより2種類のエンドグルカナーゼ遺伝子(セルラーゼA遺伝子, セルラーゼB遺伝子)をクローニングした。クローニングされたエンドグルカナーゼ遺伝子の塩基配列を解析した結果, セルラーゼA遺伝子は877塩基から構成され, 2個のイントロンを含んでいた。セルラーゼA遺伝子には239個のアミノ酸がコードされ, セルラーゼAたんぱくの推定分子量は26,096 Daであった。セルラーゼAはセルラーゼ高生産菌 *Aspergillus aculeatus* の主要なエンドグルカナーゼである FI-CMCase⁹⁾ 及び

Aspergillus kawachii CMCase¹⁰⁾ と比較するとアミノ酸レベルでそれぞれ63%及び77%の相同性が認められた。一方, セルラーゼB遺伝子は1,248塩基から構成され, イントロンは存在していなかった(第2図)。セルラーゼB遺伝子には416個のアミノ酸がコードされ, セルラーゼBたんぱくの推定分子量は42,623 Daであった。セルラーゼBはセルラーゼ高生産菌 *Trichoderma reesei* の主要なエンドグルカナーゼである EGI¹¹⁾ 及び *Fusarium oxysporum* Cfam1¹²⁾ と比較するとアミノ酸レベルでそれぞれ50%及び47%の相同性が認められた。

2. タカアミラーゼA遺伝子プロモーターを用いたエンドグルカナーゼ遺伝子の高発現

醤油麹菌はセルラーゼを生産するが, その生産能はあまり高くない。そこで, 麹菌の強力なプロモーターを利用してクローニングした2種類のエンドグルカナーゼ遺伝子を高発現させることとした。すなわち, 麹菌の強力なプロモーターの一つであるタカアミラーゼ

```

AAGCTTCTCCACATTGCGGTAGTGATATACTTACTTGGCATGCAGTGAACAAAAAGACACTTCTTAAGGAGGTCTTTGGCATTAAATC -709
GCATATGGAGCTGTGAGCACTGTACTCTATACTCGACTGTATCTATATCATCATTTTGATAAAATTTGCGATCTTATTACCTTGGAAATTATC -618
TTCACCCGCCCTTTAAATTAAGGGCCCTGTGGCTGCGCACTGCAATTGACTTTAGCGCGCGACAGAATAGGTATTGTCTATGCTACAAAGA -528
GTTTGGGGCAACGGGAATTTCTTCAGCTGGACGGGATAGCATCTACCTTGGCAGCGGGGGTTCCTGATCTAAAGCAATCTGCGACGGGCTA -438
AATCCGGAGATCCACTCCGACCCCGTTACGGCGCTCAAGCACCAGCAACATACGACTTTTGCAGAGTTGACGACAAATGTGTTCTGTTT -348
ATCCTCTACCACTCTCAGTTTGAAGCTACTGTGCCATTGGAAGCGGTTGATCAGTCCCTTCATGTCTTAAAGTCCGGCAACATCGCGG -258
ACGCGCATCTCTCGTGCCTGATCTTAATAAACTAAAACGGGATCATATTGGAGATGAAACGTCGGGAAAAAGTGCCTGAATCAG -168
ATCGGACTGTCCGGCCGGAATGTTTGCAGTCCCATATCTGGCACTCTGAAGATTCCACAAGCCTTGATCCGCTGTGTACGTGATGCAT -78
AAATAACAGCTACTTCCCGGTGGAGAGTGCAGAGCACACATACATCTTTATACACTCTAGTAGCAAGAGGACCTCGTATGATCTGGACAC 13
M I W T L 5
TCGCTCCCTTTGTGGCACTCTGCCACTGGTAAGTCCGACAGGTGGGAATACAGCGGACGCCCATCCAGACTCACCACTGATATAAT 103
A P F V A L L P L V T A Q Q V G T T A D A H P R L T T Y K C 35
GTACTTCACAGAAGCGTTGCACGAGGCGAAGACCTCACTCGTCTTGTATGCAGCAACCCATTTTATCCACAAGAAAGGAACACAAACAT 193
T S Q N G C C T T R Q N T S L V L D A A T H F I H K K G T Q T S 65
CCTGCACCAACAGCAACGGCTTAGACACTGCCATTTGTCGGGACAACAGACCTGCGCGGACAACTGTGTCTGATGGGATCACGGACT 283
C T N S N G L D T A I C P D K Q T C A D N C V V D G I T D Y 95
ACGCTAGCTACGGCGTCCAGACGAAGAATGACAGCTTGACCTTCAACAATACCTGCAAACTGGGAATGCCACAAAGTCCCTGTCAACCCG 373
A S Y G V Q T K N D T L T L Q Q Y L Q T G N A T K S L S P R 125
GCGTCTACCTCCTCGTGAAGACGGAGAGAACTATTCATGCTGAAACTCCTGAATCAGGAATTCACCTTCGATGTGACGCCCTCCACCC 463
V Y L L A E D G E N Y S M L K L L N Q E F T F D V D A S T L 155
TCGCTGCGGATGAATGGTGTCTATATCTCTGTAAGTGGAGGCTTTCGGGAAAGAGTTCCTTAAATCAAGCGGAGGCCAAATACC 553
V C G M N G A L Y L S E M E A S G G K S S L Q A G A K Y G 185
GAACCGGTTACTGTGATGCCCAATGCTACACACGCGCTTGGATCAACGGCGAAGGCAACACCGAGAGTGTGCGTTCCTGTGAGGAAA 643
T G Y C G A Q C Y T T P W I N G E G N T E S V S C C Q E M 215
TGGATATTGGGAAGCCACGCGGAGCAACAGGGCTTACACACACCCCTTGAACACAAACCGGTCTGTACGAGTGCACGCGCTCAGGAT 733
D I W E A N A R A T G L T P H P C N T T G L Y E C S G S G C 245
GCGGAGACTCCGGGCTGTGACAAAGCGGCTGTGGATTCAATCCATATGGCCTAGGCGCAAGGACTACTACGGTTACGGTCTCAAGG 823
G D S G V C D K A G C G F N P Y G L G A K D Y Y G Y G L K V 275
TCAACCAACAGAGACATCACTGTGCTAAGTACCTTCCACAAACGATAACACAACTTCGGGCGGACGTCAGCGAAATCCGCGCTCTCT 913
N T N E T F T V V T Q P L T N D N T T S G Q L S E I R R L Y 305
ATATCCAGAAACGGCGGCTTCAATGCTGCGGTACCTCTGGAGGAAAACTGCTGACTCAATCACAAGGACTTCTGACGCGGCG 1003
I Q N G Q V I Q N A A V T S G G K T V D S I T K D F C S G E 335
AAGGAAGTGCCTTCAACCGACTTGGCGGCTCGAGGAAATGGGCCAGCGCTTGGCGCGGCGCATGGTCTTTCGCTCAGTATCTGGAAC 1093
G S A F M R L G L E M G H A L G R G M V L A S I W N D 365
ATCAGGCTCAATTTATGCAATGGCTGTATGGTGGCACTGCGGACCGTCAACGCAACGGAGGGAACCCCGGCTGTATCGAGAAAGTGT 1183
A G S F M W L D G S A G P C N A T E G N P A I E K L Y 395
ATCCGATACCTATGTGAAGTTTCCAAAGATTCGGTGGGAGATATTGGATCTACCTACAGGCATTAGAATGTGGGATGAATCATCTACG 1273
P D T H V K F S K I R W G D I G S T Y R H *** 416
GTTGTGTGTGATTATATCTGCACTGAATGTTATGTTTTCGGGATTGTAGTGAGGTTGTTCCATAAATATACATCCGACTCTTTC 1363
ATACATATCTTCAATAGGTTCCATCTATACGCAAGAAAGTAAATATAGAGCCACAGCAATACCTCTACTTCTGCGGCACTCAAGA 1453
TCCCTCCATGCGCTCCGCTGCACTGCTGCAAGACTTCCACTTCCAAACCGGCTCCCGG 1526

```

第2図 A. *oryzae* のセルラーゼB遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列

第3図 セルラーゼA遺伝子及びセルラーゼB遺伝子高発現用ベクター

第1表 遺伝子組換え麹菌のセルラーゼ生産性

A. oryzae strain	Activity (mU/ml)
TA-31 (pTACA200)	281
TA-33 (pTACA200)	116
TA-40 (pTACA200)	113
TA-41 (pTACA200)	276
TA-43 (pTACA200)	112
TB-1 (pTACB100)	2052
TB-5 (pTACB100)	157
TB-20 (pTACB100)	74
TB-21 (pTACB100)	192

第2表 麹菌エンド型セルラーゼの諸性質

	CELA	CELB
分子量 (kDa)	31	53-66
至適pH	5.0	4.0
pH安定性	3.0-7.0	3.0-7.0
至適温度 (℃)	55	45
熱安定性 (℃)	<55	<50

A 遺伝子¹³⁾ プロモーターの下流にセルラーゼA 遺伝子あるいはセルラーゼB 遺伝子をつないだ融合遺伝子を作製した(第3図)。この2種類の融合遺伝子を選択マーカーに硝酸還元酵素遺伝子¹⁴⁾を用いて醤油麹菌 *A. oryzae* KBN 616-39 (醤油麹菌 *A. oryzae* KBN 616 株より分離した硝酸塩窒化能を失った変異株)へ導入した。得られた形質転換株をデンプンを炭素源として培養し、その培養液中のエンドグルカナーゼ活性を測定した。第1表に示すようにセルラーゼA 遺伝子高発現株では112~281 mU/mlのエンドグルカナーゼ活性、セルラーゼB 遺伝子高発現株では74~2,052 mU/mlのエンドグルカナーゼ活性がそれぞれ確認された。TB-1株のエンドグルカナーゼ活性は非常に高く宿主株の約500倍のエンドグルカナーゼ活性が認められた。TB-1株でこのように非常に高いエンドグルカナーゼ活性が認められた理由は、cotransformationによりセルラーゼB 遺伝子高発現ベクター pTACB 100を導入しているため多コピーのpTACB 100が染色体DNA上に組み込まれた結果であると考えられる。

醤油麹菌のエンドグルカナーゼの性質を調べるため

に、セルラーゼA 遺伝子高発現株 TA 31 株及びセルラーゼB 遺伝子高発現株 TB-1 株の培養液からセルラーゼA 及びセルラーゼBをそれぞれ精製した。デンプンを炭素源としてこれらの形質転換株を培養すれば、他のエンドグルカナーゼが生産されないの、イオン交換カラムクロマトにより非常に簡単に精製酵素を得ることができた。第2表に示すようにいずれの酵素も酸性側に至適pHを持ち、幅広いpH領域で安定であった。アミノ酸配列から推定される分子量とSDS-PAGEの結果から算出される分子量の差からこれらのセルラーゼには糖鎖の付加が考えられた。特にセルラーゼBはSDS-PAGEではシャープなたんぱくバンドではなく、スミアータンぱくバンドであったことから、不均一な糖鎖が付加しているようであった。

3. セルラーゼ高生産遺伝子組換え麹菌の醤油醸造への利用

醤油麹菌が生産するエンドグルカナーゼの醤油粕量に及ぼす影響について検討するために、非常に強いエンドグルカナーゼ活性持つTB-1株を用いて醤油麹を調製した。TB-1株のエンドグルカナーゼ活性は液

第3表 TB-1株の醤油麴における酵素活性

	TP	AA	GA	LAP	EG	PL	PG
TB-1	544	2094	148	3889	68.7	7.7	35
616-39	589	2941	271	3313	1.4	7.2	38

TP:Total protease (pH7.0), AA: α -amylase, GA:Glucoamylase, LAP:Leucin-aminopeptidase, EG:Endoglucanase, PL:Pectin lyase PG:Polygalacturonase

第4表 消化後の液量，残渣及び消化液の成分

	TB-1	616-39	TB-1/616-39 (%)
液量 (ml)	89.3	85.8	104
残渣 (g)	30.8	32.7	94
F. N(%)	0.825	0.806	102
T. N(%)	1.861	1.783	104
グルタミン酸 (mg/ml)	92.0	90.0	102
全糖 (mg/ml)	98.5	92.0	107
還元糖 (mg/ml)	11.0	11.0	100

第5表 小仕込み試験における諸味成分

	TB-1	616-39	TB-1/616-39 (%)
液量 (ml)	36.6	32.6	112
濾過残渣 (g)	7.5	9.3	81
T. N(%)	1.533	1.555	99
F. N(%)	0.924	0.896	103
グルタミン酸 (mg/ml)	12.0	11.6	103
全糖 (mg/ml)	24.3	24.3	100
還元糖 (mg/ml)	18.8	19.2	98
OD550	0.963	1.045	92
ΔA	0.48	0.54	89

体培養時のような大きな上昇は認められなかったが、醤油麴(固体培養)では宿主株の約50倍に上昇していた(第3表)。TB-1株にはタカアミラーゼA遺伝子プロモーターの下流にセルラーゼB遺伝子をつないだ融合遺伝子が多コピー導入されているため、麴菌のアミラーゼ遺伝子群の誘導発現を正に調節する因子AmyR¹⁵⁾のタイトレーションにより α -アミラーゼ活性およびグルコアミラーゼ活性はそれぞれ宿主株の70%及び50%へと低下していた。しかし、醤油醸造に使用されている*Aspergillus sojae*の α -アミラーゼ活性及びグルコアミラーゼ活性はこれらの値よりも低く実際の醤油製造には影響がないと考えられた。また、醤油醸造に重要な役割を果たすプロテアーゼやペプチダーゼなどの酵素活性は宿主株とほぼ同程度であり、大きな変化は認められなかった。

TB-1株を用いて調製した醤油麴の有塩条件下での消化試験の結果、宿主株に比べて消化後の濾液量が4%多く、消化残渣の重量は6%少なくなっていた(第4表)。また、ホルモール窒素、総窒素、グルタミン酸量及び全糖量においても宿主株に比べて高くなっており、TB-1株の使用により醤油粕の減少ばかりでなく、濾過性や窒素利用率なども向上する可能性が示唆された。

TB-1株の有効性を確認するために醤油の小仕込み試験を行い、成分変化と濾過性についてさらに検討を加えた。諸味の成分分析を行った結果、TB-1株を使用することによって宿主株に比べて濾液量が12%多く、濾過残渣の重量は20%少なくなっていた(第5表)。総窒素量は宿主株に比べてやや低く、ホルモール窒素、グルタミン酸量はやや高い結果であった。総窒素量が低い値を示したのは、液量が増加したことにより見か

第4図 小仕込み試験における濾過速度

け上の窒素濃度が低下したためであり、濾液中の総窒素量はTB-1株の方が実際には11%高くなっていた。色の濃淡を示す指標として使用した550 nm吸光度と色調の指標となる ΔA の値は、TB-1株の方が低い値を示し、TB-1株を使用した諸味液汁の色が薄く、赤みが強い傾向を示した。

諸味の経時的な濾過速度の変化を調べた結果、諸味の濾液量は、濾過開始から30分間で1ヶ月諸味で37%、6ヶ月諸味で16%多くなり、3時間濾過後もその差は維持されていた(第4図)。中台は醤油諸味の压榨における自然垂れに対する麴菌酵素の系統的解析を行い、CMC液化酵素が自然垂れに対して最も寄与率が高いことを報告している¹⁶⁾。エンドグルカナーゼはCMC液化酵素であり、TB-1株の非常に強いエンドグルカナーゼ活性が醤油粕の減少ばかりでなく、濾過効率の改善にも効果があることが判明した。

今後、醤油麴菌が生産する他のエンドグルカナーゼや多糖類分解酵素の醤油粕量や醤油諸味の濾過性への影響について遺伝子組換え麴菌を用いて解析していきたいと考えている。

(愛知県食品工業技術センター)

参考文献

- 1) 日本醤油協会, 全国醤油工業協同組合連合会: 「しょうゆ粕」の処理方法についての実態調査(1991)
- 2) 菊地忠明: 醬研, **3**, 154 (1977)
- 3) N. Kitamoto, T. Kimura, Y. Kito, K. Ohmiya and N. Tsukagoshi: FEMS Microbiol. Lett., **111**, 37 (1993)
- 4) N. Kitamoto, M. Go, T. Shibayama, T. Kimura, Y. Kito, K. Ohmiya and N. Tsukagoshi: Appl. Microbiol. Biotechnol., **46**, 538 (1996)
- 5) N. Kitamoto, J. Matsui, Y. Kawai, A. Kato, K. Ohmiya and N. Tsukagoshi: Appl. Microbiol. Biotechnol., **50**, 85 (1996)
- 6) N. Kitamoto, H. Okada, S. Yoshino, K. Ohmiya and N. Tsukagoshi: Biosci. Biotechnol. Biochem., **63**, 120 (1999)
- 7) 北本則行, 吉野庄子: 1997年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 63 (1997)
- 8) 北本則行, 吉野庄子, 和久豊: 醬研, **25**, 55 (1999)
- 9) T. Ooi, A. Shinmyo, H. Okada, S. Murao, T. Kawaguchi and M. Arai: Nucleic. Acids Res., **18**, 5884 (1990)
- 10) S. Sakamoto, G. Tamura, K. Ito, T. Ishikawa, K. Iwano and N. Nishiya: Curr. Genet., **27**: 435 (1995)
- 11) M. Penttilä, P. Lehtovaara, H. Nevalainen, R. Bhikhabhai and J. Knowles: Gene, **45**, 253 (1986)
- 12) P.O. Sheppard, F.J. Grant, P.J. Oort, C.A. Sprecher, D.C. Foster, F.S. Hagen, A.U. Upshall, G.L. McKnight and P.J. O'Hara: Gene, **150**, 163 (1994)
- 13) N. Tsukagoshi, M. Furukawa, H. Nagaba, N. Kirita, A. Tsuboi and S. Udaka: Gene, **84**, 319 (1989)
- 14) N. Kitamoto, T. Kimura, Y. Kito, K. Ohmiya and N. Tsukagoshi: Biosci. Biotechnol. Biochem., **59**, 1795 (1995)
- 15) K.L. Petersen, J. Lehmbeck and T. Christensen: Mol. Gen. Genet., **262**, 668 (1999)
- 16) 中台忠信: 醬研, **10**, 43 (1984)