焼酎用麹菌の分子生物学的解析

伊 藤 清

は じ め に

焼酎用麹菌としては、白麹菌 (*Aspergillus kawachii*あるいは *A. shirousami*) が代表的な菌株として知られ、沖縄では黒麹菌 (*A. awamori*) が泡盛醸造に用いられているが、基本的な性質はほぼ同一である。焼酎麹菌と清酒醸造その他で用いられる黄麹菌 (*A. oryzae*) の大きな違いの一つはクエン酸の生産性にあり、黄麹菌はほとんど酸を生産しないのに対し焼酎麹菌は多量のクエン酸を生産する。クエン酸の生産に関しては、焼酎麹菌に比較的近い *A. niger* で解析が進んでいるので、それを参考にさせていただきたい^{1,2)}。焼酎もろみは焼酎麹菌の作ったクエン酸で低 pH (約 3) となっているが、黄麹菌由来の酵素がこのような低 pH 条件では速やかに失活するのに対し、焼酎麹菌の生産した酵素は失活することなく有効に作用する。また、焼酎麹菌は黄麹菌に比べセルロース、ヘミセルロース分解酵素を多く生産し、アミラーゼの構造にも特徴を有する。このように、焼酎麹菌の生産する酵素を黄麹菌と比較してみることによって、多くの示唆が得られる。黒麹菌は異種タンパク質生産の宿主として注目され、多くの分子生物学的解析がなされているが³⁻⁶⁾、ここでは紙面の関係上、醸造に密接に関連する酵素についての解析結果を中心に紹介する。

醸造用微生物は実験室微生物に比べ有用な形質を獲得していることが多く、さらに醸造微生物の中でも種々の多様性が生じている。同じ *Aspergillus* 属とはいいながら、焼酎麹菌と黄麹菌では大きく異なるし、黄麹菌の中においても清酒用麹菌は、醤油や味噌用麹菌とは驚くほど酵素の生産性が異なっている。最後の項では白麹菌のキシラナーゼに例をとりながら、酵素

の多様性とそれが生まれた意義について解説したい。

(1) α -アミラーゼ

白麹菌も黄麹菌と同様に複数コピーの α -アミラーゼ遺伝子をもつ。しかし、黄麹菌 α -アミラーゼ遺伝子は同一の酵素 (タカアミラーゼ) をコードし 1 種類の酵素が生産されるのに対し、白麹菌は 2 種類の異なった酵素を生産する。中性 α -アミラーゼ⁷⁾ は黄麹菌のタカアミラーゼとほとんど同一の酵素であるが、耐酸性 (pH 3 においても失活しない) をもたないために、焼酎もろみ中では失活し機能しない。また、焼酎麹中で既に白麹菌が生産したクエン酸により失活しており、検出されないことも多い。興味深いことに、本中性 α -アミラーゼ遺伝子は、デンプンやマルトースなどの他に、グリセリンやキシロースあるいは黄麹菌では抑制的に働くグルコースを糖源とした場合でも多くの酵素を生産する。この点が黄麹菌タカアミラーゼとの大きな違いである。

白麹菌 α -アミラーゼの黄麹菌のそれとの最も大きな違いは、pH 3 で失活しない α -アミラーゼ (耐酸性 α -アミラーゼ) を生産することにある。遺伝子クローニングの結果、本酵素は触媒ドメインにデンプン吸着ドメインがリンカーを介して結合していることが明らかにされた⁸⁾。触媒ドメインはタカアミラーゼとホモロジーがあるが、耐酸性を有することが特徴である。デンプン吸着ドメインは、酵素がデンプンに吸着し有効に作用するのを助けるが、併せて生デンプン分解活性も付与する。興味深いことに、耐酸性 α -アミラーゼは液体培養ではほとんど生産されず、固体培養では特異的に生産される。白麹菌の α -アミラーゼ遺伝子を黄麹菌のそれと対比しながら、第 1 図に示す⁹⁾。

黄麹菌 α -アミラーゼ遺伝子の性質

- 複数コピーの α -アミラーゼ遺伝子をもつが、同一の酵素（タカアミラーゼ）をコードする
- 発現に、デンプン等の誘導物質が必須
- グルコースが抑制

白麹菌 α -アミラーゼ遺伝子の性質

- 3種類の α -アミラーゼ遺伝子をもつが、それぞれ異なった酵素をコードする
 - ① タカアミラーゼ類似の α -アミラーゼ（中性 α -アミラーゼ、2コピー）
 - ② 耐酸性 α -アミラーゼ
 - ③ 他の α -アミラーゼ（発現していない）
- 中性 α -アミラーゼはデンプンと同程度に、グリセリン・グルコース等でも発現
- 耐酸性 α -アミラーゼは液体培養では発現せず、固体培養で発現する

第1図 白麹菌と黄麹菌の α -アミラーゼ遺伝子の比較

(2) グルコアミラーゼ

グルコアミラーゼはデンプンからグルコースを生成する作用を有するので、醸造にとっては α -アミラーゼ以上に重要な酵素である。焼酎麹菌からは数種のグルコアミラーゼ遺伝子がクローニングされているが^{10,11)} その特徴は、耐酸性 α -アミラーゼと同様に、C末端にデンプン吸着ドメインを有することである。デンプン吸着ドメインは、酵素がデンプンに吸着し有効に作用するのを助けるが、併せて生デンプン分解活性も付与する。

(3) β -グルコシダーゼ

β -グルコシダーゼはグルコースの配糖体を加水分解する酵素であるが、醸造においては、甘薯中に存在するテルペン等の配糖体を加水分解し、甘薯焼酎の特徴香の発現に寄与している。白麹菌由来の本酵素を精製¹²⁾すると同時に遺伝子クローニングを行い¹³⁾、性質の検討を行った。

β -グルコシダーゼは分泌型の酵素であり培地中に分泌されるが、細胞に結合して存在するものもあることがわかった。興味深いことに、液体培養を行うと結合酵素の割合が増え、固体培養（麹）を行うと遊離型の酵素の割合が増えた。結合酵素も細胞壁溶解酵素で処理すると遊離するので、何らかの形で細胞壁に結合しているものと思われる。遊離酵素と、結合酵素を細

胞壁溶解酵素で可溶化したものを比較すると分子量が異なるが、エンドグリコシダーゼで処理すると同一の分子量となった。従って両者の違いは糖鎖の差によると思われる。白麹菌の生産する多様な β -グルコシダーゼの生成機構をモデルで第2図に示す。

甘藷焼酎の特徴香の発現には白麹菌 β -グルコシダーゼが大きな影響を及ぼすので、発現の増強を行えば特徴香の強い焼酎が、発現の抑制を行えばライトな焼酎の製造が可能になると期待される。

(4) エステラーゼ

黒麹菌 (*A. awamori*) は泡盛醸造に用いられる麹菌であるが、白麹菌同様ヘミセルロースをよく分解する。ヘミセルロースは β -1, 4 結合をしたキシロースの主鎖に、マンノース等の側鎖がつき、さらにマンノースに酢酸、フェルラ酸等がエステル結合した構造をしている。ヘミセルロースを完全分解するためには、酢酸、フェルラ酸等を加水分解して除去しなければならないが、ここで働くのがアセチルエステラーゼとフェルラ酸エステラーゼである。泡盛もろみの中でフェルラ酸エステラーゼは米の細胞壁からフェルラ酸を遊離するが、これは蒸溜・熟成中にバニリンに変化し、泡盛古酒（コース）の特徴香を構成する。黒麹菌からアセチルエステラーゼ¹⁴⁾とフェルラ酸エステラーゼ¹⁵⁾がクローニングされている。

第2図 白麹菌 β グルコシダーゼとその遺伝子 (*bglA*)

白麹菌は菌体外に遊離の状態に2種類 (EX-1, 2)、細胞壁中に1種類 (CB-1) の β グルコシダーゼを生産する。これらすべて一つの遺伝子 *bglA* によってコードされている。本遺伝子産物は、固体培養を行うと遊離型酵素 (EX-1, 2) として菌体外に分泌され、液体培養を行うと結合型酵素 (CB-1) として細胞壁に保持される。

第1表 白麴菌キシラナーゼの性質

	キシラナーゼA	キシラナーゼB	キシラナーゼC
分子量 (Da)*	32,731	20,115	19,888
等電点	6.7	4.4	3.5
至適温度 (°C)	60	55	50
至的 pH	5.5	4.5	2.0
pH 安定性	3~10	3~10	1~9
ファミリー	10	11	11

* 塩基配列をもとに計算した、成熟タンパク質の分子量を示す。

(5) キシラナーゼ

キシランはセルロースとともに植物の細胞壁を構成する多糖であり、キシロースが β -1,4結合した主鎖にアラビノース等が側鎖を構成した構造を有する。キシラナーゼはこのキシランの主鎖をエンドタイプに分解する酵素であり、微生物界に広く分布している産業上も重要な酵素である。また焼酎醸造においては、キシラナーゼが穀類細胞壁中のヘミセルロースを分解することによって、アミラーゼのデンプン粒への接触を促進し、酒化率の向上に寄与する。キシランとよく似た構造をもつ多糖にセルロースがあり、基質に対する酵素の作用様式及び酵素の構造も酷似すると考えられているので、キシラナーゼはセルラーゼとともに論じられることが多い。各種のキシラナーゼ、セルラーゼはその相同領域の特性から、現在約15のファミリーに分類されているが、キシラナーゼはその中のファミリー10と11に分類されている。キシラナーゼを生産する菌は同時にセルラーゼも生産することが多い。焼酎麴菌も各種のセルラーゼ^{16,17)}やヘミセルラーゼを多量に生産するが、既にクローニングされた遺伝子も多い。

イ) 白麴菌のキシラナーゼ

白麴菌は3種類のキシラナーゼ(XynA, XynB, XynC)を分泌生産するが、その性質を第1表に示す¹⁸⁻²¹⁾。

白麴菌の酵素には耐酸性が求められるが、3種類の

酵素ともに耐酸性酵素であり、特にXynCは至適pHが2であり、pH1でも安定な興味ある酸性キシラナーゼであった。第3図に染色体DNAの構造を示したが、XynAは、比較的短い遺伝子の割には、9個という多数のイントロンを有していた。また対照的に、XynBとXynCは共に1個のイントロンを有するのみであった。

XynAはセルラーゼファミリー10に、XynBとXynCはファミリー11に属し、当然ながらXynBとXynC間には高いホモロジーが認められた。XynCとバクテリア(*Bacillus pumilus*)のキシラナーゼを比較すると、C末端側の2/3の領域(活性中心はこちらの領域にある)では非常に高いホモロジーが認められたが、N末端側の1/3の領域ではほとんどホモロジーが認められなかった。この境界にイントロンの挿入があるので、この部位で遺伝子が組み換わった可能性が考えられる。白麴菌のXynBは両者の中間的な構造であった。バクテリアのキシラナーゼの至適pHは高く、白麴菌のXynCの至適pHは極めて低く、またXynBはこの中間的な性質を示す。クエン酸を多量に生産する白麴菌の中では酸性条件が淘汰圧となって、XynCのような耐酸性が極めて高くまた至適pHも低いキシラナーゼが分子進化の結果生まれたと考えられる。また、XynBはこの分子進化の過程における、遺伝子重複の産物かもしれない。黄麴菌(醤油麴菌)や*Trichoderma*属等の糸状菌もXynAやXynBに類似のキシラナーゼを生産するが、XynCは焼酎麴菌に特有な酵素であ

第3図 白麴菌キシラナーゼ染色体DNAの構造

XynB	STPSSTGENNGYYSFWTDGGGDVTYTNAGSYSVEWSN--VGNFVGGKGNP GS AKDITYSG
XynC	SAGIN Y VQNYNGNLGDFTY-DESAGTFSMYWEDGVSSDFVVLGLGWTGSSNAITYSA
XynB	NFTPSG-NGYLSVYGWTTDPLIEFYI V ESYGDYNPGSGGTTGRNVSSDGSVDIYTATRTNAPS
XynC	EYSASGSSSYLAVYGWVNYEQAEFYI V EDYGDYNPSSATSLGTVYSDGSTYQVCTDTRTNEPS
XynB	IQGTATFSQYWSVRQNKRVGGTVTTSNHFNAWAKLGMNLGTHNQILATEGYQSSGSSSITIQ
XynC	ITGTSTFTQYFSVRESTRTSQTVTVANHFNFWAQHGFGNSDFNYQVMAVEAWSGAGSASVTISS

第4図 キシラナーゼ B と C の比較

活性中心残基, C システイン残基, K リジン残基, D 活性中心近傍の変異

る。

ロ) キシラナーゼ C の耐酸性及び好酸性機構

XynB との比較を第4図に示す。XynB にはシステイン残基が全くないのに対して XynC には2個あった。XynB には塩基性アミノ酸が多く酸性アミノ酸が少ないのに対して, XynC では逆の傾向があり, 特にリジン残基は全く含まれなかった。また, 活性中心近傍において, XynB はじめ多くのキシラナーゼで一般的であるアスパラギン残基が XynC ではアスパラギン酸に変異していた。

XynC の立体構造²²⁾ を第5図 a に示す。矢印で示したのが2つのシステイン残基であり, これは S-S 結合を形成していた。S-S 結合の形成が酸性領域での酵素タンパク質の安定性に寄与していると考えられる。また, XynC の酵素タンパク質の表面には酸性アミノ酸

が多く, このことも酸性領域での安定性に関係があると思われた。

活性中心近傍の構造を第5図 b に示すが, XynB では遠く離れているアスパラギン残基が XynC ではアスパラギン酸に変異し, かつ活性中心に近寄っていることがわかった。このことが, 活性中心残基である2つのグルタミン酸残基の解離に影響を与え, pKa を低 pH 側にシフトさせることにより至適 pH が極端に下がると考えている。

ハ) 白麹菌キシラナーゼの発現

白麹菌は3種類のキシラナーゼ遺伝子を持ち, これらからそれぞれ性質の異なるキシラナーゼタンパク質が生産されるが, これらの発現はどのように制御されているのであろうか。白麹菌のキシラナーゼも典型的な誘導酵素であり, キシランの添加によって誘導され

a

b

第5図 キシラナーゼ C の立体構造

a : 全体の構造。矢印で2つのシステイン残基を示している。

b : 活性中心 (2つのグルタミン酸残基) 近傍の構造。XynC と XynB を重ねて書いてある。

ほとんどの部分は重なっているが, XynB のアスパラギン残基 (イタリック体) の位置が XynC のアスパラギン酸残基と大きく異なる。

たが、意外にも分解産物であるキシロースの添加によっても誘導された。興味深いのは発現に対する培地 pH の影響であり、至適 pH の比較的高い XynA と XynB は培地の pH が高いときに、至適 pH の低い XynC は培地の pH が低い時に多く生産された。これらのことは合目的性という面からみても合理的なことである。そこで、ノザン解析や β -グルクロニダーゼ (GUS) をレポーター遺伝子として解析を行ったが、これらの調節は転写レベルで行われていることが示唆された。第 6 図にノザン解析の結果を示す。なお、pH による発現制御という点に関しては、PacC²³⁾ あるいは Pal²⁴⁾ という pH によって制御を受ける調節因子が関わっており、キシランあるいはキシロースによる誘導に関しては XlnR²⁵⁾ という転写調節因子が関わっていると報告されているが、キシラナーゼの発現における誘導及び pH 制御も同様の機構によっていると考えている。いずれにしても、白麴菌は複数のキシラナーゼ遺伝子をもち性質の異なる複数の酵素を生産するが、基質の分解に当たってはこれら酵素の相乗作用によって分解効果を高めているということが考えられる。また、これらの遺伝子群は異なった発現条件をもち、環境に合わせて生産されることがわかったが、これが複数の遺伝子をもつもう一つの意味だと考えられる。このような機構が備わった過程には興味をもたれるところである。

お わ り に

同じ *Aspergillus* 属とは言いながら、焼酎麴菌は黄

麴菌とはかなり性質の異なった酵素を生産することがわかった。焼酎麴菌の生産する酵素には優れた特徴を有するものが多いので、黄麴菌を分子育種する際にも、色々利用できるものが多いと思われる。耐酸性酵素は極限環境に棲むバクテリア等では多く知られているが、身近な麴菌がこれだけ耐酸性のある酵素を生産していたのは意外であった。しかし、焼酎麴菌選抜の際の主要な基準はクエン酸の生産性におかれており、このことが結果的には耐酸性の高い酵素を生産する菌株を選抜したことになるのかもしれない。焼酎麴菌は耐酸性酵素の給源として実用的にも有用な菌株であるが、焼酎麴菌の中で酵素が耐酸化していった過程をさぐることで酵素を耐酸化する方策がつかめるものと期待している。

酵素タンパク質は、モジュールと呼ばれる構造単位が組み合わさってできているが、このモジュールの境界にイントロンが存在する(あるいは過去に存在した)と考えられている。分子進化にあたっては、遺伝子重複の後、タンパク質の機能単位に対応しているエクソンを“かき混ぜて (exon shuffling)”いろいろな組み合わせをつくることによって、新しいタンパク質ができる可能性があることが指摘されている。また、当然その間に、モジュール自体も分子進化を行い機能が変化していく。白麴菌のキシラナーゼについてこのような実例が示されている²⁶⁾。麴菌の酵素を眺めただけで、このような進化あるいは多様化の過程が実感できるのは非常に感慨深い。

(国税庁醸造研究所)

第 6 図 発現のノザン解析

G 3 は「グルコースを炭素源とし pH 3 で培養したもの」であり、以下同様に G 6 は「グルコース, pH 6」, X 3 は「キシロース, pH 3」, X 6 は「キシロース, pH 6」である。キシラナーゼ A の発現レベルは極めて低いので、明瞭なバンドが観察されない。

文 献

- 1) Ruijter GJ, Panneman H, Xu D, Visser J. : *FEMS Microbiol. Lett.*, **184**, 35 (2000)
- 2) Kirimura K, Yoda M, Usami S. : *Curr. Genet.*, **34**, 472 (1999)
- 3) Gouka RJ, Punt PJ, van den Hondel CA. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 1 (1997)
- 4) de Groot MJ, Bundock P, Hooykaas PJ, Beijersbergen AG. : *Nat. Biotechnol.*, **16**, 839 (1998)
- 5) Punt PJ, van Gemeren IA, Drint-Kuijvenhoven J, Hessing JG, van Muijlwijk-Harteveld GM, Beijersbergen A, Verrips CT, van den Hondel CA. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 447 (1998)
- 6) Wang H, Ward M. : *Curr. Genet.*, **37**, 57 (2000)
- 7) Shibuya I, Tamura G, Ishikawa T, Hara S. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 174 (1992)
- 8) Kaneko A., Sudo S., Sakamoto Y., Tamura G., Ishikawa T., Ohba T. : *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 292 (1996)
- 9) 杉本ら : 日本農芸化学会講演要旨集, pp 328 (2000)
- 10) Hayashida et al : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 923 (1989)
- 11) Shibuya I, K. Gomi, Y. Iimura, K. Takahashi, Tamura G, Hara S. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **54**, 174 (1990)
- 12) Iwashita K, Todoroki K, Kimura H, Shimoi H, Ito K. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1938 (1998)
- 13) Iwashita K, Nagahara T, Kimura H, Takano M, Shimoi H, Ito K. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 5546 (1999)
- 14) Koseki T, Furuse S, Iwano K, Sakai H, Matsuzawa H. : *Biochem. J.*, **326**, 485 (1997)
- 15) 小関ら : 日本農芸化学会大会講演要旨集, pp 107 (2000)
- 16) Sakamoto S, Tamura G, Ito K, Ishikawa T, Iwano K, Nishiya N. : *Curr. Genet.*, **27**, 435 (1995)
- 17) 桧木ら : 日本生物工学会大会講演要旨集, pp 156 (1999)
- 18) Ito K, Ogasawara H, Sugimoto T, Ishikawa T : *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 547 (1992)
- 19) Ito K, Iwashita K, Iwano K. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1338 (1992)
- 20) Ito K, Ikemasu T, Ishikawa T. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 906 (1992)
- 21) 伊藤清 : 日本農芸化学会誌 : **69**, 362 (1995)
- 22) Fushinobu S, Ito K, Konno M, Wakagi T, Matsuzawa H. : *Protein Eng.*, **11**, 1121 (1998)
- 23) Espeso EA, Roncal T, Diez E, Rainbow L, Bignell E, Alvaro J, Suarez T, Denison SH, Tilburn J, Arst HN Jr, Penalva MA. : *EMBO J.*, **19**, 719 (2000)
- 24) Negrete-Urtasun S, Reiter W, Diez E, Denison SH, Tilburn J, Espeso EA, Penalva MA, Arst HN Jr. : *Mol. Microbiol.*, **33**, 994 (1999)
- 25) van Peij NN, Visser J, de Graaff LH. : *Mol. Microbiol.*, **27**, 131 (1998)
- 26) Sato Y, Niimura Y, Yura K, Go M. : *Gene.*, **238**, 93 (1999)