麹菌 *Aspergillus oryzae* 酸性プロテアーゼ 遺伝子の固体培養特異的かつ温度依存的発現

清酒麹造りは、有用酵素をバランスよく生産させるために、様々な経験則がノウハウとして蓄積している。一方近年の分子生物学の進歩とともに、麹造りでの酵素生産を遺伝子レベルで解析する研究が数多くなされている。筆者らは、清酒麹造りにおいて培養中期から培養温度を高温にすることでプロテアーゼ力価が低い麹ができることに着目し、プロテアーゼ遺伝子の固体培養での発現状況を検討した。その結果このプロテアーゼ生産の温度依存性は、その遺伝子の転写が高温培養によって抑制されることが原因であることを見いだした。麹造りのノウハウに対して、科学的な証明を付与できた好例である。

北野秀幸・古川恵司

はじめに

清酒製造において、製麹の主たる目的は、 α アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼなどの有用な加水分解酵素を生産することにある。これら酵素により、蒸米の成分が分解・溶出し、もろみ中で酵母によって発酵されて、清酒が造られる。このとき、溶出された多くの成分が、程良く組み合わせられることで、清酒の味や香りが生み出される。したがって、これら諸酵素の働きや生産をバランスよく行えるよう製麹を管理することは、大変重要である。事実、清酒醸造において、「一麹、二酛、三造り」といわれるように、麹造りは昔から重要視されてきた。昨今の分子生物学的手法の進歩により、伝統的な麹を用いた清酒製造の理解をさらに深める環境が整いつつある。

α アミラーゼおよびグルコアミラーゼは、でんぷんの液化および糖化酵素としての役割を担っており、麹菌の増殖の最適温度 37°C 付近で良く生産される。これに対して酸性プロテアーゼは米蛋白質の分解によるペプチドの生成をもたらす、生成酒の呈味性に影響するだけでなく、 α -アミラーゼの米蛋白質への吸着を防ぎ、蒸米溶解作用を高める働きがあり¹⁾、アミラーゼとともに清酒醸造において重要な酵素の 1 つである。本酵素はデンプン分解酵素とは逆に、35°C 以下の低

温でよく生産され、麹菌の増殖適温やそれ以上の温度において活性が低下する²⁻⁴⁾。我々は、このような米麹の酸性プロテアーゼ生産性の特異性に着目しそのメカニズムについて検討を行った。本稿では麹菌 *Aspergillus oryzae* の酸性プロテアーゼ遺伝子が固体培養に特異的で培養温度依存的に発現することを見いだしたので紹介する⁵⁾。

1. 酸性プロテアーゼの熱安定性

35°C 以上の高温環境下で製麹したときに、米麹の酸性プロテアーゼ活性が低くなる原因として、生合成された酸性プロテアーゼが熱に不安定であり、高温下で失活しやすいためであるという可能性が考えられる。この点について検証するために、米麹中の本酵素の熱安定性について検討した。米麹を密閉容器中に入れ、アルカリ性ピロガロールで容器中の酸素を完全に除去することにより、麹菌が増殖しない条件下で、42°C に一定時間放置し、その抽出酵素の酸性プロテアーゼ活性を測定した（第 1 図）。熱処理前の麹の酵素活性を 100 とし、各時間熱処理した麹の酵素活性を相対活性として表した。42°C に 24 時間放置しても酸性プロテアーゼ活性はほとんど変化しなかった。すなわち、酸性プロテアーゼは少なくとも米麹中に存在するかぎり、42°C という高温でも安定であり、高温下で製麹した

Specific Expression and Temperature-Dependent Expression of the Acid Protease-Encoding Gene (*pepA*) in *Aspergillus oryzae* in Solid-State Culture (Rice-Koji)

Hideyuki KITANO, Keiji FURUKAWA (General Research Laboratory of Kiku-masamune Sake Brewing Co. Ltd.)

第1図 酸性プロテアーゼと α アミラーゼの熱安定性

●：酸性プロテアーゼ，○： α アミラーゼ活性
42℃，嫌氣的条件下で，0時間，2時間，5時間，14時間，24時間後，各酵素を抽出し，活性を測定した。

ときに，本酵素が低活性となるのは失活によるものではないと考えられた。

2. 酸性プロテアーゼの固体培養特異的発現について

酸性プロテアーゼが35℃以下でよく生産されることが，高温域における失活のためではないことが明らかとなったので，次に酸性プロテアーゼの遺伝子発現と培養温度との関係について検討することにした。なお麹菌の酸性プロテアーゼ遺伝子 (*pepA*) は米麹抽

出物から得られた精製酵素のアミノ酸部分配列をもとにすでにクローニングされている⁶⁾。

Aspergillus oryzae RIB 128 を pH 5, 7, 9 の DPY 液体培地で振とう培養した菌体から mRNA を調製し，ノーザン解析をおこなったところ，*pepA* の発現は全く検出されなかった。黄麹菌と同じ *Aspergillus* 属である *niger* においては，2種類の主要な酸性プロテアーゼが同定されており，これら遺伝子の発現は，液体培養下，窒素源や炭素源，酸性条件により調節を受けるという報告¹⁰⁻¹²⁾がある。本菌においては pH 5, 7, 9 のいずれの培養条件下においても液体培養での *pepA* の発現はみられなかった。(第2図1, 2, 3)。一方，米麹においては *pepA* の強い発現がみられたことから(第2図4)，*pepA* はグルコアミラーゼ遺伝子，*glbA*⁷⁻⁹⁾と同様，固体培養で特異的に発現する遺伝子であると考えられた。

したがって以下の検討はすべて米麹を試料として行った。

3. 製麹工程における *pepA* 遺伝子の発現

米麹において，酸性プロテアーゼが高温環境下で生産されない原因を明らかにするため，その発現レベルでの解析をおこなった。RIB 128 を用いて，恒温恒湿機で製麹をおこない，酸性プロテアーゼ (*pepA*)， α アミラーゼ (*amyB*) mRNA 量をアクチン遺伝子をコントロールとしたノーザン解析により経時的变化を

第2図 酸性プロテアーゼ遺伝子 (*pepA*) 発現のノーザン解析

pH 5.0, pH 7.0 および pH 9.0 に調整した DPY 液体培地で，30℃，30時間培養後の菌体(それぞれ lane 1, 2 および 3) および 35℃で30時間製麹した米麹 (lane 4) から全 RNA を抽出した。

第3図 製麴過程における各遺伝子発現のノーザン解析

A. 麴品温の経時変化

B. 各培養時間における *pepA*, *amyB*, *actin* 遺伝子発現量。

見た (第3図)。

実際の製麴条件をモデルとして、後半に最高品温 42°C まで温度上昇させて製麴をおこなった (第3図の A)。第3図の B は、各遺伝子の経時的なノーザン解析の結果を示している。*pepA* の mRNA 量は 40 時間目には減少し始め、45 時間後、50 時間後には、ほとんど発現がみられなかった。一方、*amyB* および *actin* 遺伝子は製麴末期まで発現の低下を示さなかった。このことから、*pepA* の mRNA 量の製麴末期における低下は、高温環境によるものか、あるいは麹菌の増殖が定常期に達して *pepA* の発現が特異的に低下したことによるものと考えられた。そこでこの現象について解析するために、より単純な条件下で製麴を行った。

簡単な製麴モデルとして、35°C、27 時間培養後、30°C、35°C、38°C、40°C、42°C にそれぞれ 3 時間おき、米麴から total RNA を抽出し、ノーザン解析を行った (第4図)。*pepA* mRNA 量は 38°C、40°C、42°C と高温にシフトした場合ほど減少した。これに対して、*amyB* および *actin* の mRNA 量は、温度上昇の影響を受けなかった。

以上のことから、高温で製麴したときの酸性プロテアーゼ活性の低下は *pepA* mRNA 量の低下によると

結論した。

4. 高温下における *pepA* 転写量の低下

——プロモーターの温度依存的調節——

以上、示したような高温下における *pepA* mRNA 量の低下に対しては 2 つの原因が考えられる。すなわ

第4図 モデル製麴における各遺伝子発現のノーザン解析

ち

① *pepA* 遺伝子の転写 (mRNA 生成量) が高温で抑制を受ける。

② 高温下では *pepA* mRNA 自体が不安定であり、分解を受けやすくなる。

①の原因, すなわち高温で *pepA* 転写が抑制を受けるかどうかを検討した。温度上昇によって *pepA* mRNA 量が減少するのは, 遺伝子上流のプロモーター活性が弱くなり, 転写量自体が減少すると仮定し, 検討をすすめた。これを検証するために, レポーター遺伝子である GUS 遺伝子 (*uidA*) 上流に *pepA* promoter, *amyB* promoter をそれぞれ連結して, プロモーターの違いで温度による発現が変わるかどうかについて調べた。GUS 遺伝子 (*uidA*) を用いたのは, *pepA* および *amyB* mRNA の熱安定性の違いを排除するためである。また, このときマーカーとして, タイトレーションの影響が最も少ないようシングルコピーで locus に入る *niaD* をマーカーとして用い, RIB 40 由来の *A. oryzae* *niaD* 300 株¹³⁾ に導入した。なお各ベクターが, シングルコピーで *niaD* locus に導入されたことはサザン解析で確認した。(データ省略)。最終的に, GUS 遺伝子を *pepA* プロモーター支配下においた P1 株, GUS 遺伝子を *amyB* プロモーター支配下においた A1 株を得た。P1 および A1 株を用いて, モデル製麹条件として 35°C, 27 時間培養後, 35°C, 38°C, 40°C, 42°C にそれぞれ 3 時間おいたものについて, total RNA を抽出し, ノーザン解析を行った (第 5 図)。

GUS 遺伝子を *pepA* プロモーター支配下においた P1 株では, 温度上昇とともに, GUS 遺伝子と *pepA* 遺伝子の転写量が減少した。一方, GUS 遺伝子を *amyB* プロモーター支配下においた A1 株では, GUS 遺伝子の転写量は *amyB* と同様, 温度上昇の影響を受けず, *pepA* 遺伝子の転写量のみが高温で減少した。このように共通の GUS 遺伝子を *pepA* あるいは *amyB* プロモーター支配下に発現させたときにそれぞれの GUS 発現量が高温下において異なった挙動を示したことから, 高温下で *pepA* mRNA 量が低下するのは *pepA* mRNA が分解されやすいためではなく, *pepA* プロモーター活性が低下することに起因するためであると考えられた。

以上の結果から, 高温で製麹したときに酸性プロテ

ーゼ活性が低下するのは, 温度上昇による *pepA* 遺伝子の転写量の減少によることが明らかとなった。

5. まとめ

本研究において黄麹菌 *A. oryzae* の酸性プロテアーゼをコードする遺伝子, *pepA* が 35°C 以上の高温環境下において発現抑制されることをあきらかにした。すなわちこれまでに製麹温度と麹の酵素活性との関係については多くの研究がみられ, 高温製麹を行うと酸性プロテアーゼ活性の低い麹が得られることが経験的に知られているが²⁻⁴⁾, これはその遺伝子の転写抑制によるものであった。麹の酵素のうち酸性プロテアーゼだけでなく, 酸性カルボキシペプチダーゼ (ACPase) 活性も同様に, 高温製麹によって活性が低下することが知られているが²⁻³⁾, ACPase をコードする遺伝子の転写も *pepA* と同様に高温で抑制を受ける可能性が考えられる。さらに製麹温度と麹の品質との関係について, 焼酎麹の製麹においては低温経過をとると酸度の高い麹が得られること¹⁴⁾ が知られている。

A. oryzae と近縁な種である *A. nidulans* や *A. niger* においては窒素源代謝に関わる酵素遺伝子群の転写を抑制する AREA¹⁵⁻¹⁹⁾ や菌体外の環境の pH を感知して, 遺伝子群の転写活性化をおこなう PacC²⁰⁻²¹⁾ などの結合する *cis*-element の存在があきらかとなっている。今回, *pepA* 遺伝子についてそのプロモーター活性が温度依存的であることを述べてきたが, 低温において発現が増大する遺伝子の報告はこれまでにみられない。麹菌の酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼおよび生酸性など一連の麹の品質に影響する形質がどのような機構で温度によって制御を受けるのか, さらなる解析が待たれるところである。

また酸性プロテアーゼ遺伝子 (*pepA*) は, 固体培養特異的な発現を示した。グルコアミラーゼ遺伝子 (*glbA*⁷⁻⁹⁾) や *melB*²²⁾ 遺伝子が固体培養特異的な発現を示すことがすでに報告されているが, *pepA* 遺伝子も含めてそれらの遺伝子に共通の *cis*-あるいは *trans*-element が存在するのかなど, 麹菌の遺伝子の発現を特徴づける上でさらなる研究が期待される。

最後になりましたが, 本研究を行うにあたり, *niaD* 300 株, ベクター等をいただいた東北大学大学院農学研究所, 五味勝也教授, 酒類総合研究所, 山田

第5図 モデル製麹における形質転換体

P 1 株 (pepA プロモーター支配下に GUS 遺伝子を発現) および A 1 株 (amyB プロモーター支配下に GUS 遺伝子を発現) の各遺伝子発現の温度による変化

修先生に感謝いたします。また、菊正宗酒造株式会社の原昌道常務をはじめとする関係各位に御礼申し上げます。

< 菊正宗酒造 (株) >

参考文献

- 1) Nunokawa, Y., Umiya, S. and Iwano, K. : J. Ferment. Technol., **56**, 380-388 (1978).
- 2) 家村芳次, 加藤祐樹, 片岡浩平, 吉永和彦, 原昌道 : 醸協, **91**, 439-445 (1996).
- 3) 岡崎直人, 竹内啓修, 菅間誠之助 : 醸協, **74**, 683-686 (1979).
- 4) 鈴木明治, 布川弥太郎, 今宿市郎, 照内 豊, 漆間正夫 : 醸協, **51**, 318-322 (1956).
- 5) Kitano, H., Kataoka, K., Furukawa, K., and Hara, S. : J. Biosci. Bioeng. **93**, 563-567 (2002)
- 6) Gomi, K., Arikawa, K., Kamiya, N., Kitamoto, K., and Kumagai, C. : Biosci. Biotech. Biochem., **57**, 1095-1100 (1993).
- 7) Hata, Y., Ishida, H., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K., and Imayasu, S. : Gene, **207**, 127-134 (1998).
- 8) Ishida, H., Hata, Y., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K., and Imayasu, S. : J. Fer-

ment. Bioeng., **86**, 301-307 (1998).

- 9) Ishida, H., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., Suginami, K., and Imayasu, S. : Curr. Genet., **37**, 373-379 (2000).
- 10) Jarai, G. and Buxton, F. : Curr. Genet., **26**, 238-244 (1994).
- 11) Jarai, G., van den Hombergh, H., and Buxton, F. : Gene, **145**, 171-178 (1994).
- 12) Yanagita, T. and Nomachi, Y. : J. Gen. Appl. Microbiol., **13**, 227-235 (1967).
- 13) Yamada, O., Lee, B. R., and Gomi, K. : Biosci. Biotech. Biochem., **61**, 1367-1369 (1997).
- 14) 日本醸造協会編 : しょうちゅう醸造技術, p 23 (1983)
- 15) Wilson, R. A. and Arst, H. N., Jr. : Microbiol. Mol. Biol. Rev., **62**, 586-596 (1998).
- 16) Marzluf, G. A. : Microbiol. Mol. Biol. Rev., **61**, 17-32 (1997).
- 17) Pan, H. G., Feng, B., and Marzluf, G. A. : Mol. Microbiol., **26**, 721-729 (1997).
- 18) Andrianopoulos, A., Kourambas, S., Sharp, J. A., Davies, M. A., and Hynes, M. J. : J. Bacteriol., **180**, 1973-1977 (1998).
- 19) Platt, A., Langdon, T., Arst, H. N., Jr., Kirk, D., Tollervey, D., Sanchez, J. M. M., and Caddick, M. X : EMBO J., **15**, 2791-2801

- (1996).
- 20) Espeso, E. A., Roncal, T., Diez, E., Rainbow, L., Bignell, E., Alvaro, J., Suarez, T., Denison, S. H., Tilburn, J., Arst, H. N., Jr., and Penalva, M. A.: EMBO J., **19**, 719-728 (2000).
- 21) Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Penalva, M. A., and Arst, H. N., Jr.: EMBO J., **14**, 779-790 (1995).
- 22) 小畑浩, 石田博樹, 秦洋二, 川戸章嗣, 阿部康久, 赤尾健, 秋田修, 一島英治: 平成 12 年生物工学会大会講演要旨集, 19 (2000)

執筆者紹介 (順不同・敬称略)

北野秀幸 <Hideyuki KITANO>

昭和 49 年 6 月 8 日生れ<勤務先とその所在地>菊正宗酒造株式会社, 総合研究所, 〒658-0026 兵庫県神戸市東灘区魚崎西町 1-8-6<略歴>平成 9 年大阪大学工学部応用生物工学科卒, 11 年大阪大学大学院理学研究科生物科学修士課程修了, 同年菊正宗酒造株式会社入社, 現在に至る。<抱負>清酒醸造における麹菌の有用性を科学的に明らかにしたい<趣味>夏は山登り, 冬はスキー, オールシーズンでテニス

川崎恭嗣 <Yasutsugu KAWASAKI>

昭和 26 年 4 月 18 日生れ<勤務先とその所在地>サントリー株式会社 酒類研究所, 〒618-8503 大阪府三島郡島本町若山台 1 丁目 1 番 1 号<略歴>昭和 49 年東京大学農学部農芸化学科卒, サントリー株式会社入社, ビール工場, 生産本部技術管理, 中国江蘇サン

トリー等を経て, 平成 9 年商品開発研究所部長, 平成 14 年酒類研究所長, 現在に至る。<抱負>年令に応じた酒の楽しみ方を極めたい<趣味>学生時代は器械体操の運動部で日々過ごしていたが, 最近は, 仲間との「飲酒談笑」に暮れている

山下 勝 <Masaru YAMASHITA>

大正 15 年 1 月 15 日生れ<勤務先とその所在地>(株) ビオック, 〒441-8087 豊橋市牟呂町内田 111-1<略歴>昭和 29 年東京大学農学部農芸化学科卒, 昭和 32 年愛知県食品工業試験所清酒科技師, 昭和 52 年名城大学農学部農芸化学科教授, 平成 10 年同定年退職, 同年名城大学名誉教授, 平成 10 年(株) ビオック 技術顧問, 現在に至る。<抱負>古代から現代まで一貫した穀物酒・酒造技術史を作りたい<趣味>クラシック音楽の鑑賞