

[成 果 情 報 名] ポストゲノム研究で明らかになった新たな麹菌のアミノペプチダーゼ群

[要 約] 我が国の醸造産業で麹菌として用いられている *Aspergillus oryzae* は、醸造食品の呈味性に重要なアミノペプチダーゼを多数生産する。ゲノム情報の活用によりこれまで知られていなかった新たな麹菌酵素群が明らかとなる。

[キーワード] 麹菌、タンパク質・ペプチド分解、アミノペプチダーゼ

[担 当] 食総研・微生物利用研究領域・糸状菌ユニット

[代 表 連絡先] 電話 029-838-8077

[区 分] 食品

[分 類] 研究・参考

[背景・ねらい]

Aspergillus oryzae は日本醸造学会から「国菌」と認定され、我が国の伝統的発酵食品の製造に麹菌として利用されており、産業上重要な糸状菌である。アミノペプチダーゼは、ペプチドのアミノ末端からアミノ酸を遊離する酵素であるが、麹菌の同酵素は味噌や醤油等の呈味性に深く関与していることが知られている。本菌のゲノム情報から、30種類以上のアミノペプチダーゼ様遺伝子が見出されており、醸造工程の最適化のために、これらの遺伝子産物の醸造における役割の解明が望まれている。本研究では、これらの遺伝子産物の酵素活性や基質特異性、酵素化学的性質を明らかにし、麹菌のアミノペプチダーゼ群の全容を解明する。

[成果の内容・特徴]

1. *A. oryzae* ゲノム解析株 (*A. oryzae* RIB40) のアミノペプチダーゼ様遺伝子 34種のうち、大腸菌あるいは麹菌を宿主として発現させた場合、アミノアシルパラニトロアニリド (Aa-pNA) あるいはペプチドを基質としてアミノペプチダーゼ活性を有する酵素は 23種類である。
2. これらの 23種類の酵素を基質特異性に基づいて分類すると、ロイシン等の脂溶性アミノ酸をペプチド等から遊離する活性を有する酵素が半数を占める一方、酸性アミノ酸、プロリン、グリシンを特異的に遊離する酵素は各々 1分子種である。
3. *A. oryzae* で新たに明らかにしたプロリンを特異的に遊離するプロリルアミノペプチダーゼ遺伝子は、過剰発現させると不活性体を形成するが、抑制的な発現条件では、活性な 6量体酵素として生産され、菌体の無細胞抽出液から精製することが可能である。
4. 精製プロリルアミノペプチダーゼは、プロリンをアミノ末端に有するジペプチドに対して最も活性が高く、テトラペプチド以上の長さの基質に対しては活性が低い(表 1)。
5. 同様に *A. oryzae* で新たに明らかにした分泌型ロイシンアミノペプチダーゼ (LapA) は、Aa-pNA 基質のうち Leu-pNA の分解活性が最も高く、次いでその約 40%の活性で Phe-pNA も分解する。本酵素はアルカリ側の pH で活性及び安定性が高い。反応の至適 pH は 8.5 付近であり、pH7.5-11 の間で pH8.5 の場合の 80%以上の活性を示す(図 1)。
6. LapA をコードする *lapA* 遺伝子の逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) によって解析すると、アルカリ条件 (pH10.0) の培養で発現が誘導される(図 2)。

[成果の活用面・留意点]

1. 本成果はゲノム解析株を用いて得られたものであり、今後、実用菌株の当該酵素生産様式を解明していくことが必要である。
2. 遺伝子によっては、*lapA* 遺伝子のように培養条件及び酵素反応条件や安定性を考慮することにより効率的な酵素生産が可能となる。
3. 解明した麹菌の新規アミノペプチダーゼ群について、麹菌を利用した発酵食品の製造工程における熟成や呈味性等への関与を明らかにすることが必要である。

【具体的データ】

表 1 麴菌プロリルアミノペプチダーゼの各種基質に対する比活性

ペプチド基質	比活性 (U/mg)
PA	25.7
AP	N.D.
PLG(NH ₂)	22.2
PPFG(8)	4.5*
PLSR(12)	2.4
Pro- <i>p</i> NA	18.3
Pro- β NA	20.0
hydroxy-Pro- β NA	42.4

PLSR(12): PLSLTLSVAAKK. PPGF(8): PPGFSPFR.

N.D.: no activity detected.

*は 2 残基のプロリンの加水分解による相加的な活性

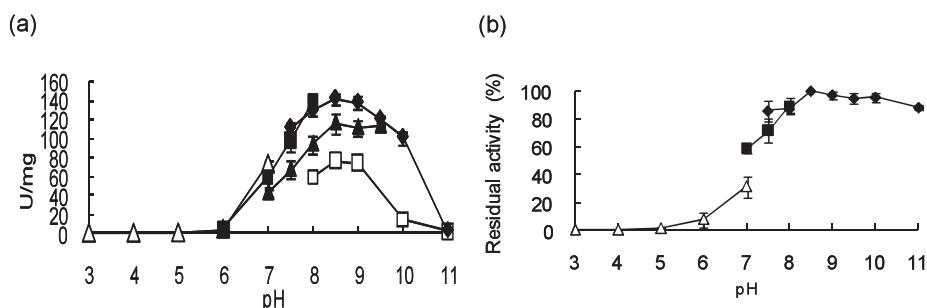


図 1 ロイシンアミノペプチダーゼ (LapA) の活性に与える pH の影響 (a) 及び安定性に与える影響 (b)

(a) 50 mM 各種緩衝液 50°Cでの比活性を示した。△, citrate-phosphate (pH 3-7) ; ■, postassium phosphate (pH 6-8); ▲, Tris-HCl (pH 7-9); □, glycine-NaOH (pH 8-11); ◆, HEPES (pH 7.5-11) (b) pH 安定性は、各 pH の緩衝液で精製酵素を 30°C 30 分間保持後の残存活性を、50 mM HEPES 緩衝液 (pH 8.5) 中での比活性を 100%として示した。

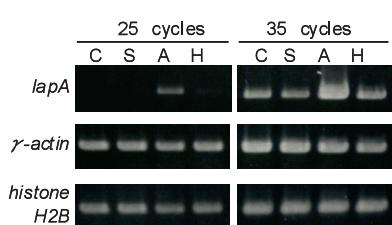


図 2 RT-PCR による *lapA* 遺伝子の培養条件による発現量の比較

A. oryzae RIB40 株を YPD 培地で 30°C 20 時間培養後、以下の条件でさらに 2 時間培養した。
C ; YPD 培地 30°C、S ; 1M NaCl 含有 YPD 培地 30°C、A ; pH10.0 調整 YPD 培地 30°C、H ; YPD 培地 40°C。 γ -アクチン及びヒストン H2B 遺伝子の発現量を比較対照とした。

(楠本憲一、服部領太、鈴木聰)

【その他】

研究課題名 : 麴菌プロテアーゼ等の網羅的機能解析

中課題整理番号 : 313e

予算区分 : 基盤、新技術・新分野

研究期間 : 2006~2010 年度

研究担当者 : 楠本憲一、鈴木聰、服部領太、松下（森田）真由美、多田功生、丸井淳一朗、古川育代、天野仁（天野エンザイム）、石田博樹（月桂冠）、山形洋平（東京農工大）、竹内道雄（東京農工大）、柏木豊（東京農大）

発表論文等 : 1) Matsushita-Morita M. et al. (2010) J. Appl. Microbiol. 109(1):156-165

2) Matsushita-Morita M. et al. (2010) Curr. Microbiol.. 62(2):557-564

3) Morita H. et al. (2010) Biosci Biotechnol Biochem. 74(5):1000-1006