

# 食糧

その科学と技術

Shokuryo — food science and technology —

# 53

(独) 農業・食品産業技術総合研究機構

食品総合研究所

NARO Food Research Institute (NFRI)

National Agriculture and

Food Research Organization (NARO)

2015.3

# まえがき

農研機構、食品総合研究所は、豊かな食生活を実現し、我が国の食料問題を解決するために独創的な研究開発に挑戦することを役割としています。この中で、農林水産物や食品の価値を最大限に向上させる技術の開発、多様で安全な食品を支える技術の提供、科学的で正しい食品の情報の発信など、食品に関わる基礎から応用に至る幅広い研究を行っています。

食品総合研究所では、様々な研究のうち、その時々の研究トピックスや今後の研究開発の考え方、技術の普及材料となる研究などを分かり易く解説した「食糧」を、年1回、刊行しています。今回の食糧53号は、「微生物研究分野の最新の成果」をテーマに関連深い研究トピックスを解説いたしました。

当所の微生物に関する研究は、味噌、醤油、納豆などの発酵食品に使われる発酵微生物研究、食中毒の原因となる病原微生物研究、さらに、マイコトキシン（カビ毒）産生菌関連の研究等に大別されます。今回の特集では、これらの微生物研究のうち、納豆菌や麹菌に関する最近の研究成果に加え、細菌性食中毒の防止法や微生物細胞を使ったカビ毒の毒性評価法、微生物の物質生産能を飛躍的に向上させる手法についても解説し、この一冊で当所における微生物研究の最新の進捗状況を把握いただけるものと期待しています。

食品に係る研究者や技術者だけではなく、食に関心をお持ちの多くの方々に活用して頂くとともに、現在の食品総合研究所の活動について少しでもご理解を戴ければ幸いです。

なお、食糧の15号（1972年）以降は、ホームページでも公開しておりますので、ぜひご参照ください。

([http://www.naro.affrc.go.jp/publicity\\_report/publication/laboratory/nfri/index.html](http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/laboratory/nfri/index.html))

平成27年1月

(独)農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所  
所長 大谷 敏郎

# 目 次

I	生野菜およびその加工品による細菌性食中毒とその防止 稲津 康弘	5
II	微生物細胞を用いたマイコトキシンの毒性評価 鈴木 忠宏	15
III	枯草菌の物質生産能を向上させる手法 稲岡 隆史	35
IV	納豆菌の発酵能力をアップグレード 木村 啓太郎	49
V	麹菌のゲノム解析とポストゲノム手法を用いた醸造技術への応用 楠本 憲一	63

# I 生野菜およびその加工品による 細菌性食中毒とその防止

## 1. 生食用野菜およびその加工品による食中毒事件

北米を始めとして世界の至る所で、野菜を媒介とする微生物性食中毒事件が頻発している。腸管系食中毒原因細菌（大腸菌・サルモネラなど）による汚染が加工または調理過程において生じたと推定される場合もあるが、生産・収穫段階において汚染が生じたものと推定される例もある（たとえば2006年にカリフォルニア州サリナス地域産ハウレンソウを原因として起こった大規模食中毒事例は、野生動物による圃場の汚染が原因ではないかと疑われている<sup>1)</sup>）。1996年に大阪府堺市で発生した腸管出血性大腸菌 O157:H7 集団食中毒事件以来、わが国でも「野菜が細菌性食中毒の原因となりえる」という事実は、広く認知されている。厚生労働省「食中毒統計」に基づく、2000～2013年に国内で発生した野菜類を原因食材とする細菌性食中毒事例を表1に示した。ノロウイルスによるものを除くと、米国のような大規模集団食中毒事件はほとんど発生していないが、「浅漬け類」による病原性大腸菌食中毒が散発的に発生している点が特徴的である。2012年8月に発生した白菜浅漬けによる大腸菌 O157 食中毒事件の結果、それまで年15万トン前後で推移していた浅漬け類の製造量が、同年は10万トンまで落ち込んだ<sup>2)</sup>。発症者の喫食調査に基づく疫学的推定と、原因施設に保存されていた検食から分離された大腸菌 O157 株と患者由来株の同一性証明に基づき、この事件は北海道内の業者が製造した「白菜きりづけ」を原因食材とするものであったとされたが、従業員および外部環境から原因菌が持ち込まれた可能性を強く疑わせるような証拠は見いだされておらず、汚染経路は特定されなかった<sup>3)~5)</sup>。また2014年7月には、露天販売の「冷やしキュウリ」（キュウリ浅漬け）を原因食材とする大規模な大腸菌 O157 食中毒事件が発生した（患者数501人）。浅漬け類は日本、韓国の他、ベトナムからミャンマーにかけてのインドシナ半島中～北部でも日常的に食されており、小規模かつ非衛生的な環境で製造が行われていることも珍しくない。韓国では2012年にキムチを原因食材とする腸管毒素原性大腸菌 O169 集団食中毒事件（患者数1,642名）が発生しており<sup>6)</sup>、おそらく他の国でも腸管系食中毒菌による食中毒が発生しているものと思われる。

腸管出血性大腸菌やサルモネラの他、生食用野菜およびその加工品で、安全性上の問題を引き起こす可能性がある細菌として、*Listeria monocytogenes* が挙げられる。これは1981年にカナダで発生した「コールスロー」集団食中毒事件（41人感染、17人死亡）の原因細菌であり、リステリア症のヒッジ糞便による栽培土壌汚染が、原料野菜への原因菌の付着の原因と考えられている。*Listeria* 属細菌は通常の土壌あるいは食品工場から検出されることもあることから、L.

*monocytogenes* が野菜加工食品に混入する機会が存在することは否定できない。この菌は4℃の低温あるいは6%食塩存在下でも増殖可能であるために、特に浅漬け類やカット野菜などの加工野菜食品で注意が必要である。

表1 生野菜(加工品)を原因食材とする細菌性食中毒事件

	原因食品	病因菌	原因施設	摂食者数	患者数	死者数
2000年	カブの浅漬け	腸管出血性大腸菌	事業場・給食施設・老人ホーム	82	7	3
	ホウレンソウの胡麻和え	サルモネラ属菌	病院・その他	139	52	0
	青菜の辛し和え	サルモネラ属菌	病院・給食施設	158	8	0
	ポテトサラダ	サルモネラ属菌	飲食店	27	25	0
2001年	スイートポテト	サルモネラ属菌	その他	53	43	0
	ワラビの酢の物	病原大腸菌	事業場・給食施設・老人ホーム	153	47	0
	トマトしらすのせ	サルモネラ属菌	学校・給食施設・単独調理場・その他	184	90	0
	西瓜、ほうれん草のサラダ	サルモネラ属菌	病院・給食施設	329	52	0
	和風キムチ	腸管出血性大腸菌	製造所	不明	29	0
	とろろ	サルモネラ属菌	病院・給食施設	113	18	0
2002年	山芋の和え物	サルモネラ属菌	飲食店	32	8	0
	ゴーヤーイリチー(ニガウリの炒め物)	サルモネラ属菌	家庭	5	3	0
	もやしの酢のもの	病原大腸菌	飲食店	336	204	0
	キュウリ浅漬け	腸管出血性大腸菌	製造所	不明	112	0
	山芋とろろ	サルモネラ属菌	家庭	1	1	0
	マサドニアサラダ、おかか和え	腸管出血性大腸菌	病院・給食施設	19	7	0
	インゲンのピーナッツ和え	サルモネラ属菌	病院・給食施設	294	67	0
	アンデスメロン	サルモネラ属菌	事業場・給食施設・保育所	123	28	0
	大根サラダ	サルモネラ属菌	事業場・その他	91	5	0
	ポテトサラダ	サルモネラ属菌	事業場・給食施設・保育所	147	55	0
2003年	アサリとネギのぬた	サルモネラ属菌	事業場・給食施設・老人ホーム	92	43	0
	キャベツ(唐揚げ当)	サルモネラ属菌	飲食店	190	96	0
	小松菜の煮浸し、里芋のとも和え	サルモネラ属菌	事業場・給食施設・老人ホーム	92	7	0
2004年	リンゴサラダ	エルシニア	学校・給食施設・単独調理場・その他	175	40	0
	とろろいもおろし	病原大腸菌	事業場・給食施設・事業所等	105	39	0
2005年	とろろ汁	サルモネラ属菌	家庭	5	5	0
	グリーンサラダ	サルモネラ属菌	事業場・給食施設・老人ホーム	98	12	0
	白菜キムチ漬	病原大腸菌	その他	431	401	0
2006年	(なし)					
2007年	キャベツ(推定)	サルモネラ属菌	飲食店	6	5	0
	ポテトサラダ	病原大腸菌	家庭	44	35	0
	生野菜、きざみみかん、きざみごはん	サルモネラ属菌	事業場・給食施設・保育所	119	16	0
2008年	サラダ(推定)	サルモネラ属菌	飲食店	84	62	0
	給食料理(ほうれん草としめじ和え)	サルモネラ属菌	事業場・給食施設・老人ホーム	150	38	0
	給食のスティックきゅうり	サルモネラ属菌	事業場・給食施設・保育所	96	52	0
2009年	かぼちゃ、きゅうり、チーズのサラダ	サルモネラ属菌	その他	32	14	0
	ポテトサラダ	サルモネラ属菌	旅館	43	26	0
2010年	ホウレンソウのごま和え	サルモネラ属菌	事業場・給食施設・保育所	81	42	0
	インゲンツナサラダ	サルモネラ属菌	飲食店	258	34	0
	パパイヤサラダ	サルモネラ属菌	その他	458	71	0
2011年	ブロッコリーサラダ	サルモネラ属菌	学校・給食施設・共同調理場	2758	1522	0
	もやしのナムル	サルモネラ属菌	学校・給食施設・共同調理場	2055	364	0
	カットキャベツ(仕出し弁当)	腸管出血性大腸菌	製造所	不明	18	0
	ナスと大葉のみみ漬	腸管出血性大腸菌	病院・給食施設	323	15	0
	「長ネギ小口切り」が使用された食事	病原大腸菌	製造所不明	362	0	0
2012年	大根おろし大葉	腸管出血性大腸菌	事業場・給食施設・老人ホーム	196	9	0
	漬物(白菜きりつけ)	腸管出血性大腸菌	製造所	不明	169	8
2013年	寮での食事(野菜サラダ)	エルシニア	事業場・寄宿舎	92	52	0

平成12年～平成25年「食中毒統計」(厚生労働省)を元に作成した(明らかに交差汚染のケースは除く)。

## 2. 生食用野菜およびその加工品の糞便汚染指標菌等のサーベイランス結果

1998年より厚生労働省により、国内市場流通食品の大腸菌およびサルモネラ汚染実態調査<sup>7)</sup>が行われており、その野菜類に関する結果をまとめたものを表2に示した。これによると、2013年までに調査した21,655検体のうちサルモネラ陽性検体数は16（レタス1、キュウリ2、かいわれ1、アルファルファ5、もやし2、ミニトマト1、カット野菜1、みつば2、漬け物野菜1）であり、大腸菌O157およびO26は検出されていない。大腸菌陽性率は0.07%（95%信頼区間0.04-0.12%）であり、芽もの野菜、カット野菜、ハウレンソウおよびキュウリに比較的高い大腸菌汚染が認められている。浅漬け1,966検体および浅漬け原料野

表2 国内市場流通野菜食品の糞便汚染指標細菌（大腸菌）汚染実態

品目	検体数	大腸菌陽性	
		数	(%)
カット野菜	2518	161	6.4
かいわれ	2108	260	12.3
もやし	2108	705	33.4
レタス	2009	133	6.6
キュウリ	1815	129	7.1
漬け物野菜	1656	118	7.1
漬物	1966	193	9.8
みつば	1204	375	31.1
トマト	964	27	2.8
ミニトマト	502	10	2.0
ほうれんそう	485	77	15.9
アルファルファ	482	69	14.3
ダイコン	381	32	8.4
（長）ネギ	374	30	8.0
ニンジン	317	14	4.4
キャベツ	296	21	7.1
タマネギ	209	1	0.5
ナス	141	9	6.4
水菜	199	28	14.1
スプラウト	79	10	12.7
サラダ菜	98	13	13.3
ハクサイ	35	2	5.7
ブロッコリースプラウト	54	4	7.4
その他（30検体未満）	1655	159	9.6
合計	21655	2580	11.9

「食中毒菌汚染実態調査」（平成10-25年 厚生労働省）より作成した。大腸菌陽性検体より、腸管出血性大腸菌は検出されていない。

菜 1,656 検体の大腸菌検出率はそれぞれ 9.8% (95%信頼区間は 8.5 ~ 11%) および 7.1% (95%信頼区間は 5.9 ~ 8.5%) である。なお、ここでいう食品衛生法上の「大腸菌 (*E.coli*)」とは、糞便系大腸菌、すなわち「グラム陰性かつ乳糖発酵性を有し、(1.5%胆汁酸塩を含む) EC 液体培地中にて 44.5°C で増殖可能な細菌」の総称であり、これには微生物分類学上の大腸菌 (*Escherichia coli*) 以外の細菌も含まれる。糞便系大腸菌や微生物分類学上の大腸菌 (*E.coli*) が糞便汚染の可能性を示す指標として用いられることもあるが、それが検出されたことを理由として、その製品が危険である (食中毒リスクが無視できない) とまではいえない (ほとんどの糞便系大腸菌は、一般に、健康なヒトに対する病原性を持たない)。

農林水産省が 2007 ~ 2008 年に実施した農場実態調査<sup>8)</sup>では、生食用野菜 (3,407 検体) およびその生産環境 (4,166 検体) からサルモネラおよび大腸菌 O157/O26 は検出されなかった (大腸菌の検出率はそれぞれ 2.0% および 9.8%)。とはいえ、生食用野菜は生産過程における環境からの病原菌移行の可能性が完全には否定できず、その後の加工・調理過程における効果的な殺菌が困難である。それゆえに、「適正農業規範」(GAP) の導入等、原料野菜を生産する段階での適切な一般衛生管理の実施が望まれる。この点に関連して、2003 年 7 月に Codex 委員会 (FAO / WHO 合同食品規格委員会) 総会において「生鮮果実・野菜衛生管理規範」およびその付属書 1「カット野菜・果実」および同 2「スプラウト」が採択されており、さらに 2010 年 7 月の Codex 委員会総会において付属書 3「葉物野菜・ハーブ」が採択された。現在、これらが生食用野菜およびその加工品の食品安全管理に関する国際標準的な文書とみなされており (ただし、国内の事業者に対する直接的な拘束力はない)、ISO/TS 22002-3 “Prerequisite programmes on food safety- Part 3: Farming” もこれと整合するように記載されている。農林水産省生産局は 2010 年 4 月に「農業生産工程管理 (GAP) の共通基盤に関するガイドライン」(2012 年 3 月最終改訂) を、同省消費・安全局は 2011 年 6 月に「生鮮野菜を衛生的に保つために - 栽培から出荷までの野菜の衛生管理指針 -」を、それぞれ作成し、国内における普及を図っているところである。なお同省の調査によれば、2013 年 3 月末の時点で何らかの (上述したもの以外のものも含む) GAP を導入済みの野菜生産産地は、国内 2,621 産地の 60.1% である一方、25.0% が未検討である<sup>9)</sup>。

### 3. 生食用野菜の表面殺菌

生食用野菜の殺菌方法として現実的に使用しうる手段は、食品添加物として使用が認められる殺菌剤の水溶液を用いて、表面を洗浄することである。殺菌剤の効力はその酸化力によるものであり、これは生野菜表面に付着した有機物との反応によって減少する可能性がある。それゆえに表面殺菌に先立って、水あるいは

食品用洗剤による洗浄操作を行っておくことが望ましく、この操作によって対象物に付着している微生物の絶対数を1 log CFU/g (1桁)程度減らすことや、食品表面上に残存する有機物を減少させることで、殺菌後に生き残った微生物の増殖に必要な栄養分を減少させることが期待できる。

ただし水洗のみでは野菜表面に付着している微生物を十分に除去することはできず、また洗浄水を介した他の野菜や調理加工環境への交差汚染の拡大の可能性もありうる。そのために、水洗に引き続き、何らかの殺菌剤による処理が推奨される。カット野菜については「亜塩素酸ナトリウム」(酸性化しないと殺菌力は生じない)または「亜塩素酸水」も使用可能であるが、国内で最も一般的に使用されているものは「次亜塩素酸ナトリウム」水溶液である。また食塩の電気分解によって製造された「電解水」を、食品やその製造ラインの殺菌に使用することも可能である。食品衛生法にもとづく規制では、無隔膜法で製造された弱アルカリ性電解水は「次亜塩素酸ナトリウムを希釈したもの」、隔膜電解法の陽極水である強酸性次亜塩素酸水は「次亜塩素酸水」として扱われ、それぞれの規格基準が適用される。これらのいずれについても、化学的には「pHの異なる次亜塩素酸ナトリウム水」とほぼ同等と考えてよい。なお亜塩素酸水とは「飽和塩化ナトリウム溶液に塩酸を加え、酸性条件下で、無隔膜電解槽内で電解して得られる水溶液に、硫酸を加えて強酸性とし、生成する塩素酸に過酸化水素水または亜塩素酸を加えて反応させて得られる水溶液」と規定されているため、この方法以外で製造したものは(化学的に同一な物質を含む溶液であっても)「亜塩素酸水」として使用することはできない。生野菜の表面殺菌という点では、上述したいずれの殺菌剤を使用しても効果に大きな差はなく、1-2 log CFU/g (1~2桁)程度の生菌数低下が見られることが一般的である(野菜の表面の構造の違いにより、殺菌しやすいものとしにくいものが存在する:表3)<sup>10)</sup>。なお、殺菌剤濃度が2倍になったからといって、洗浄時間が半分になるという実験的な証拠は見当たらず、ある程度以上の濃度および時間以上の殺菌処理を行っても、著しく殺菌効果が上がることは期待できない<sup>11) 12)</sup>。

厚生労働省「大規模食中毒対策等について」(平成9年3月24日、衛食第85号)別添『大量調理施設衛生管理マニュアル』(最終改正:平成25年10月22日食安1022第10号)には、「野菜および果物を加熱せずに供する場合には、飲用適の流水で十分洗浄し、必要に応じて次亜塩素酸ナトリウム(生食用野菜にあっては、亜塩素酸ナトリウムも使用可)の200mg/Lに5分間(100mg/Lの溶液の場合は10分間)またはこれと同等の効果を有するもの(食品添加物として使用できる有機酸等)で殺菌を行った後、十分な流水ですすぎ洗いをを行うこと」という旨の記述がなされており、浅漬け原料野菜の殺菌についても「漬物の衛生規範」(昭和56年9月24日環食第214号別紙、最終改正平成25年12月13日食安1213第2号)にも同様の規定がある(浅漬け原料野菜については「亜塩素酸水」



表3 生野菜表面に接種した大腸菌 O157 の表面殺菌<sup>10)</sup>

	TSA-Rif 生菌数 (log CFU/g)					
	洗浄前	水洗	次亜塩素酸 ナトリウム	オゾンナノ バブル水	オゾン水	オゾンガス
レタス	6.5 ± 0.2 <sup>A</sup>	5.7 ± 0.2 <sup>B</sup>	4.9 ± 0.4 <sup>C</sup>	6.5 ± 0.2 <sup>B</sup>	5.5 ± 0.3 <sup>B</sup>	6.4 ± 0.1 <sup>A</sup>
ハクサイ	6.1 ± 0.3 <sup>A</sup>	5.6 ± 0.3 <sup>B</sup>	5.2 ± 0.3 <sup>CD</sup>	5.3 ± 0.2 <sup>BD</sup>	5.5 ± 0.2 <sup>B</sup>	6.1 ± 0.3 <sup>A</sup>
ハウレンソウ	6.0 ± 0.1 <sup>A</sup>	5.2 ± 0.1 <sup>B</sup>	4.9 ± 0.2 <sup>C</sup>	5.2 ± 0.1 <sup>B</sup>	5.3 ± 0.2 <sup>B</sup>	6.1 ± 0.1 <sup>A</sup>
キャベツ	5.5 ± 0.2 <sup>A</sup>	4.7 ± 0.3 <sup>B</sup>	3.7 ± 0.6 <sup>C</sup>	4.3 ± 0.3 <sup>BD</sup>	4.7 ± 0.3 <sup>B</sup>	5.0 ± 0.3 <sup>BD</sup>

	SMAC 生菌数 (log CFU/g)					
	洗浄前	水洗	次亜塩素酸 ナトリウム	オゾンナノ バブル水	オゾン水	オゾンガス
レタス	5.6 ± 0.2 <sup>A</sup>	4.7 ± 0.3 <sup>B</sup>	4.2 ± 0.6 <sup>C</sup>	4.9 ± 0.5 <sup>B</sup>	4.9 ± 0.5 <sup>B</sup>	5.9 ± 0.1 <sup>A</sup>
ハクサイ	5.1 ± 0.4 <sup>A</sup>	4.4 ± 0.4 <sup>A</sup>	4.1 ± 0.6 <sup>B</sup>	4.7 ± 0.3 <sup>AC</sup>	4.4 ± 0.5 <sup>AB</sup>	5.3 ± 0.6 <sup>AC</sup>
ハウレンソウ	5.5 ± 0.6 <sup>A</sup>	4.5 ± 0.2 <sup>B</sup>	4.4 ± 0.4 <sup>B</sup>	5.0 ± 0.4 <sup>BC</sup>	4.8 ± 0.1 <sup>BC</sup>	5.8 ± 0.2 <sup>A</sup>
キャベツ	4.7 ± 0.2 <sup>A</sup>	4.0 ± 0.5 <sup>B</sup>	2.9 ± 0.3 <sup>C</sup>	3.9 ± 0.5 <sup>B</sup>	3.8 ± 0.3 <sup>B</sup>	4.5 ± 0.5 <sup>AB</sup>

4連3反復 (n=12) で行った実験結果の平均値および標準偏差を示した。処理の異なる同種野菜における、異なる生菌数の肩付き文字は、有意水準5%で有意差があることを示す。

が使用できる（きのこ類を除く）一方、「亜塩素酸ナトリウム」が使用できないという法令解釈がなされている。次亜塩素酸ナトリウム水の酸化力（有効塩素濃度）は、次亜塩素酸などが食品に含まれる窒素化合物と反応することによって減少し、同時にトリハロメタン等の有機塩素化合物が生成する。次亜塩素酸ナトリウムあるいは電解水を食品の表面殺菌目的で使用する場合、殺菌槽の有効塩素濃度をこまめにチェックしておくべきである。

溶液中に存在する細菌に対する殺菌効果に対して、野菜表面上の細菌に対する殺菌効果が極めて低いことが、これまでの多くの研究によって示されてきた。その理由として、気孔内や表面の微細な傷への細菌の進入や、バイオフィルムの存在が指摘されており、このようなことが生じていることを示す顕微鏡写真も存在する<sup>13)</sup>。しかしこれだけでは「野菜表面上の菌数の多寡にかかわらず、殺菌効果に差がみられない」という事実の説明が困難である。食品と殺菌液の界面付近の液体はその粘性のために極めて動きにくく、野菜表面に付着した細菌への殺菌性物質の移動は、濃度勾配に基づく拡散によるものと考え、上述した事実に加え、図1および図2に示した「殺菌時間を長くしても効果に大きな差が出ない」理由も説明できそうである（ただし、この仮説を直接的に証明した研究は見られない）。通常の攪拌操作やバブリングが界面付近の物質移動に対して大きな影響を与えているとは考えにくい。洗浄または殺菌処理中のバブリングあるいは超音波処理は、食品表面から微生物を遊離させるというより、どちらかという食品に付着した大きな塵や有機物の塊を除去することで、食品表面における殺菌剤の失活を減少させる意味の方が大きいようにも思われる。これらの操作がどれくら

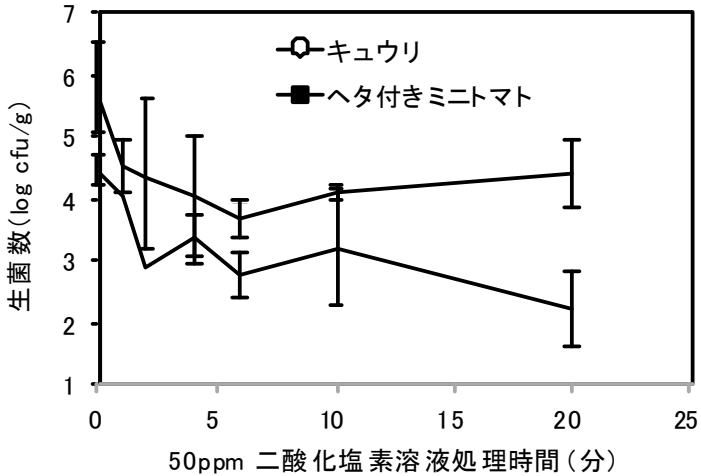


図1 二酸化塩素水による野菜の殺菌に及ぼす処理時間の影響<sup>11)</sup>  
(九州大学大学院 宮本敬久教授作成)

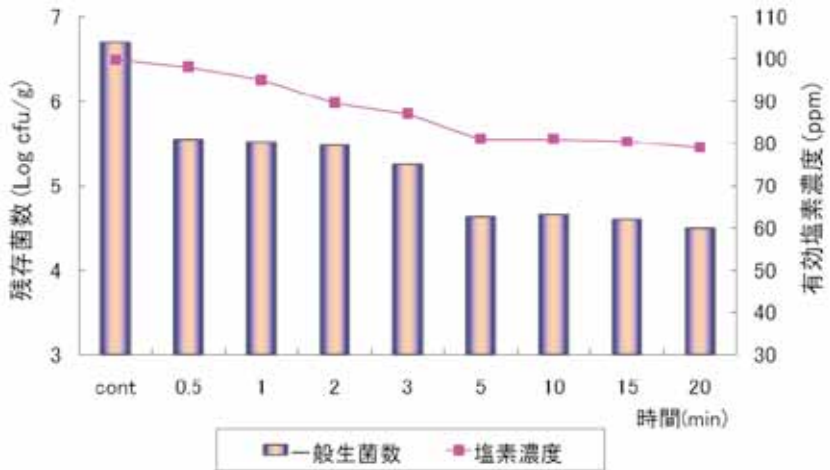


図2 ホウレンソウの殺菌時間と殺菌効果の関係<sup>11)</sup>  
(広島大学大学院 中野宏幸教授作成)

い有効であるかという点については、信頼できる実スケールあるいはパイロットプラントスケールの実験結果が見あらず、個別の工場の現場で、導入後に最適化を図っているのが現状のようである。

野菜類を殺菌した後に水洗を行うことが多いが、これを10℃で保存すると、1

週間以内に殺菌剤未使用（水洗2回）の場合と変わらない程度まで、一般生菌数および大腸菌群数が増加することが多い。生鮮野菜や果実類の微生物規格は存在しないが、「弁当及びそうざいの衛生規範」（厚生労働省 昭和54年6月29日環食第161号、平成7年10月15日最終改正 衛食第188号・衛乳第211号・衛化第119号）では、「サラダ、生野菜等の未加熱処理のものは、検体1gにつき細菌数（生菌数）が100万以下であること」が望ましいとされている。青果物カット事業協議会が1997年9月に発行した『カット野菜（生食用）衛生管理マニュアル』では、製造時の目標値として「生菌数10万/g未満、大腸菌群数3,000/g未満、大腸菌および黄色ブドウ球菌陰性」が設定されている。ただしこれはその後の流通過程で生じる微生物の増殖を見越したものであって、ユーザーに対する「製品品質の保証基準」でもある「製品基準」よりも厳しく設定されている点に留意が必要である。厚生労働省「漬物の衛生規範」には、浅漬けについて「冷凍食品の規格基準で定められた *E.coli* の試験法により大腸菌が陰性であること」が定められている。ただし、いずれの基準についても「これを満たさないものは危険」または「これを満たしたものは安全」と判断できるだけの、十分に科学的な根拠は見当たらない（「ある検体から *E.coli* が検出された場合、その中に、どの程度の確率でどの程度の量の食中毒菌が混入しているといえるのか」という点がわかっていない）。これらの指標は製造所等において、管理図等を使用して原料、製造過程および製品の異常を発見するために使用する「工程管理のためのツール」であると理解すべきであり、そのためには、ある程度の継続的な検査結果の集積が必要であろう。

（食品安全研究領域 食品衛生ユニット 稲津 康弘）

## 参考文献

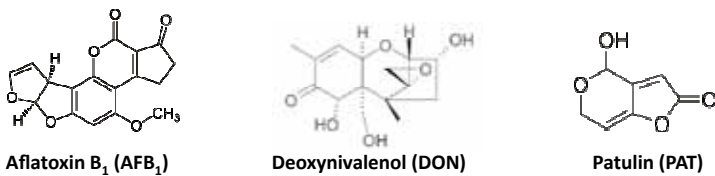
- 1) Jay M. T. et al., *Escherichia coli* O157:H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. *Emerg. Infect. Dis.*, 13, 1908-1911 (2007)
- 2) 農林水産省, 「平成24年度食品産業動態調査（年報）」, <http://www.fmric.or.jp/stat/> (2014年11月14日確認)
- 3) 片岡ほか, 白菜きりつけによる腸管出血性大腸菌 O157 食中毒の概要について, *日食微誌*, 30, 112-115 (2013)
- 4) 東小太郎, 北海道における浅漬け食中毒の概要, *防菌防黴*, 42, 23-32 (2014)
- 5) 坂本ほか, 白菜浅漬による腸管出血性大腸菌 O157 食中毒事例について - 札幌市, *IASR*, 34, 126 (2013)
- 6) Cho S. H. et al., Outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* O169 enteritis in schoolchildren associated with consumption of kimchi, Republic of Korea, 2012., *Epidemiol. Infect.*, 26, 1-8 (2013)

- 7) 厚生労働省, 「食品等事業者の衛生管理に関する情報 (3) 食品中の食中毒菌汚染調査の結果」, <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/01.html> (2014年11月14日確認)
- 8) 農林水産省, 「生食用野菜における腸管出血性大腸菌及びサルモネラの実態調査結果」(平成22年6月8日), <http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/100608.html> (2014年11月14日確認)
- 9) 農林水産省 (編), 「食料・農業・農村白書 平成25年版」(平成26年5月27日公表), [http://www.maff.go.jp/j/wpaper/w\\_maff/h25/](http://www.maff.go.jp/j/wpaper/w_maff/h25/) (2014年11月14日確認)
- 10) Inatsu et al., Effectiveness of stable ozone microbubble water on reducing bacteria on the surface of selected leafy vegetables., *Food Sci. Technol. Res.*, 17, 479-485 (2011)
- 11) 農林水産技術会議事務局, 「生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発 [かび毒・病原微生物 (第2編)]」(プロジェクト研究成果シリーズ522)], 206-215 (2014) <http://agriknowledge.affrc.go.jp/RN/2039017314> (2014年11月14日確認)
- 12) 名塚ほか, レタス, キャベツおよびキュウリに接種した大腸菌 O157:H7 の次亜塩素酸ナトリウム溶液による洗浄殺菌効果, *日食微誌*, 22, 89-94 (2005)
- 13) Golberg et al., *Salmonella* Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs., *Int. J. Food Microbiol.*, 145, 250-257 (2011)

## Ⅱ 微生物細胞を用いたマイコトキシンの毒性評価

### 1. はじめに

我々は様々な微生物に囲まれて生活している。その多くは動物にとって無害であるが、時として影響を及ぼすものも存在する。発酵・醸造に利用される酵母や麹、納豆菌などは食生活に豊かさをもたらす一方で、代謝産物が不快・有害である場合には腐敗・変敗菌と判断される。我々の生活に多大な影響を与えている代謝産物の内、有用な物質としては *Penicillium* の産生する抗生物質ペニシリンが有名であろう。しかし、負の影響を与える物質も存在する。その代表として挙げられるのがカビ毒（以降マイコトキシン）である。マイコトキシンとはカビの二次代謝産物であり、ヒトや家畜等の経済動物、あるいはペットに対する毒性を有する。抗生物質とマイコトキシンの違いは、こうした動物に対する毒性の有無や選択性によって判断されている。その一例として挙げられるのは、ペニシリンと同様に *Penicillium* 属菌が産生するパツリン（Patulin, PAT）である。この物質は抗生物質としての可能性が検討されたが、動物に対する毒性が強いことからマイコトキシんに分類され、現在では規制対象物質となっている。マイコトキシンはこれまで300種以上が報告されており、その構造は実に多様である。しかし、ヒトの暮らしに大きな影響を与える程の汚染が報告されるのは、その中の一部である。ここではそれらの主要なマイコトキシンに関して、過去の知見と我々の実施した研究の結果から推察されるマイコトキシンの毒性メカニズムや毒性の低減について述べる。（図1）



種類(基準値)	代表的な産生菌	検出試料	摂取経路
AFB <sub>1</sub> , G <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>2</sub> (10 μg/kg)	<i>Aspergillus flavus</i>	穀物、香辛料、豆類	生鮮・加工食品、 家畜飼料
DON (1.1 mg/kg)	<i>Fusarium graminearum</i>	麦類、トウモロコシ	加工食品、 家畜飼料
PAT (50 μg/kg)	<i>Penicillium expansum</i>	リンゴ、ブドウ、モモ	ジュース(果汁)

図1. 本稿で取り上げたマイコトキシンの構造およびその由来・特性

## 2. 食品や作物を汚染する主要なマイコトキシン

### <アフラトキシン>

マイコトキシンとして最も注目を浴びているのはアフラトキシン (Aflatoxin; AF) である。このマイコトキシンは肝臓癌を誘発することが知られており、自然界で生み出される最も強い発癌性物質とされる。強いインパクトを与える物質であるため、しばしばニュースにも取り沙汰されている。近年では2008年にAF汚染米(事故米)が食用に加工されて市場に出回るといった事件が報道され、大きな話題となった。このマイコトキシンを産生する *Aspergillus* 属菌 (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* 等) は世界各地に広く分布し、多くの農産物を輸入する日本においては輸入米などの穀物、胡椒などの香辛料、各種ナッツ類でのAF汚染がしばしば報告されている。世界各地の家畜飼料を対象としたマイコトキシンの汚染実態調査では、アジア・オセアニア地域の飼料は日本国内の基準値 (10 $\mu$ g/kg) を上回る濃度で広範な汚染を示す一方、ヨーロッパ地域においては汚染頻度や濃度が低いという報告がなされている<sup>1)</sup>。同報告ではデオキシニバレノール (DON) やフモニシン (FUM), T-2 トキシンなども同様の傾向であることが報告されており、温帯 - 熱帯地域の作物はマイコトキシン汚染リスクが全体的に高いと想定される。実際にインドのコメのAF汚染調査では7割近いサンプルからアフラトキシン B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) が検出されている<sup>2)</sup>。多くの食品を輸入に頼る我が国では、こうしたAF産生菌の混入に関する実態を把握すると共に、AF産生に適さない輸送・貯蔵環境を構築していく必要がある。AFには構造の違いによりAFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub> など複数の構造体が存在するが、毒性評価研究においてAFB<sub>1</sub>は他のAFの10倍以上の毒性を示すことから、最近まで国内における規制対象のAFはAFB<sub>1</sub>のみであった。そのため上述の事故米混入事件で検出対象となっていたのはAFB<sub>1</sub>であったが、2011年からは食品健康影響評価や国際動向等を鑑み、AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>の4種を「総AF類」として一括で規制している。AFM<sub>1</sub>は主に生体内の代謝作用でAFB<sub>1</sub>から変換され、乳牛からミルク中へ移行したものが検出対象となっている。AFM<sub>1</sub>はAFB<sub>1</sub>より低毒性かつ含有量が低いため、今のところ規制の対象ではない。しかし、ミルクやそれを原料とするチーズなどの製品は若年層が摂取する機会も多いため注意を要する。AFの国内におけるリスク評価は2009年に終えているが、その後規制対象物質も増えているため、今後も継続した評価が求められる。

### <トリコテセン系マイコトキシン>

AFよりも更に広範な汚染被害を引き起こすのがトリコテセン系マイコトキシンである。トリコテセン類を産生するのは *Fusarium* 属菌などである。トリコテセン類は構造毎に分類されており、最も毒性の強いグループがタイプA、次がタイプBとなっている。他にもタイプC,Dなどが存在するが、主要な汚染マイ

コトキシンはタイプ A および B である。タイプ A トリコテセンには T-2 トキシン, HT-2 トキシンなどが含まれる。これらのマイコトキシンは非常に毒性が強く重要であるが, 検出量, 頻度が少ないため, 現在のところ日本では規制の対象とはなっていない。タイプ B トリコテセンとしては DON, ニバレノール (NIV) などが含まれる。これらのマイコトキシンは T-2 トキシン, HT-2 トキシンと比べて低毒性であるが, 最も頻繁かつ広範に麦類やトウモロコシなどを汚染することで, 経済的に大きな損失をもたらす。また, これらのマイコトキシンを産生するカビは赤かび病を引き起こす作物病害菌であるため, マイコトキシン産生の有無に関わらず非常に重要な防除対象カビである。この DON, NIV の産生過程では中間生成物として細胞内にアセチル化体が生成する。これはカビ自身の自家毒性を低減させる意味があると考えられているが, 動物等に対して強い毒性を示し, 高頻度な検出率を示す場合もあるため DON, NIV の誘導体も注目されている。これらの誘導体は農林水産省や厚生労働省のモニタリング調査の対象となっているが, 国内における調査では DON, NIV と比べて低レベルの汚染である。現在はタイプ B トリコテセンの中でも DON のみの基準値 (1.1 mg/kg) が設けられている。

### <パツリン>

国内において基準値の定められたマイコトキシンは AF, DON の他にもう一つあり, 主に果実を汚染する *Penicillium* 属菌等の産生する PAT である。PAT は AF やトリコテセン類と比べて検出率も低く, 国内においては基準値 (50 $\mu$ g/kg) を上回る汚染も報告されていない。それにもかかわらずこのマイコトキシンが規制されているのは, 輸入されることも多い果汁飲料 (特にリンゴ果汁) が乳幼児に好まれるため, 曝露の可能性が高くなることに起因している。PAT の国内リスク評価は 2003 年に報告されている。

これら 3 種の主要なマイコトキシンの他にも AF と合成経路が共通するステリグマトシチン (ST) やフモニシン (FUM), 比較的毒性の強いオクラトキシン (OT) 等も食品や作物, 飼料などを汚染している。(図 2)



図 2. マイコトキシン毎に異なる毒性発現メカニズム

### 3. マイコトキシンの毒性

#### <アフラトキシン>

動物に対する曝露試験において、AFの急性毒性は肝細胞の壊死や変質として表れる。また、細胞異常が誘発された結果、ラットでは慢性毒性として肝臓癌が認められる。その他に精子の運動量減少やホルモン異常による生殖異常も報告されている。ヒトにおいても動物と同様の影響が生じると考えられる。AFは体内に取り込まれた後に代謝を受けて血清アルブミンと結合し、トランスポーターを介して血中へと運ばれる。AFB<sub>1</sub>の場合、肝臓および各細胞ではシトクロム P450 (CYP) を介して AFM<sub>1</sub> や AFQ<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>-8,9-epoxide に代謝され、特に AFB<sub>1</sub>-exo 8,9-epoxide は DNA や RNA の付加体となることで毒性を発揮する。DNA, RNA への付加は RNA 合成や RNA ポリメラーゼ活性の阻害を通じてタンパク質合成を抑制する。更に肝臓や腎臓における小胞体の分解や細胞の壊死に繋がる。また、肝臓におけるこの代謝プロセスで活性酸素種が生成され、毒性を示すことも示唆されている。これに関連して、肝臓のグルタチオン濃度の減少は AFB<sub>1</sub> の DNA への共有結合を増加させ、複数の酸化防止剤が AFB<sub>1</sub> の DNA 結合性を抑えることが報告されていることから、AFの毒性に対して抗酸化物質の摂取は有効であると思われる。動物モデルにおける毒性低減に最も寄与しているのがグルタチオン S トランスフェラーゼであり、エポキシド体を抱合して DNA への付加を妨げることで毒性の発現を抑える<sup>3)</sup>。ヒトへの毒性に着目すると、急性毒性として嘔吐、発作、黄疸なども認められる。肝臓癌 (Hepato-cellular carcinoma; HCC) のリスク要因には、AFB<sub>1</sub> 以外に喫煙や B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus; HBV) および C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus; HCV) の感染も挙げられるが、特に HBV 感染と AFB<sub>1</sub> の恒常的な摂取が HCC のリスクを高める<sup>4)</sup>。これらの関連性が完全に明らかとなった訳ではないが、AFを恒常的に摂取している場合、HBV 抗体のキャリアは HCC のリスクが高まるとされている。

#### <デオキシニバレノール>

トリコテセン系マイコトキシンの毒性は ribotoxic stress と呼ばれる。これは RNA 機能を阻害する毒性を指しており、リボソームサブユニットへの結合による翻訳阻害などの特徴が挙げられる。タイプ B トリコテセンとして最も毒性に関する研究が進んでいるのは DON であるため、ここでは DON の情報を基準として話を進める。また、DON はタイプ A トリコテセンである T-2 トキシンよりも毒性が低いとされるが、曝露量が圧倒的に多い場合にはショック性の細胞死を引き起こす<sup>5)</sup>。これが生体では腹痛や不快感、下痢などの急性毒性として表れる。このような背景から、致死性は低い嘔吐や食欲減退の誘発性は T-2 トキシンなどのような強毒性マイコトキシン以上である。下痢や食欲不振といった急性毒性は体重の減少という慢性毒性影響として表れるため、家畜被害が大きいこ



とを鑑みると経済上の大きな脅威である。DONとマイコトキシンの一種であるゼアラレノンによって共汚染された場合、卵母細胞の質を低下させ、肝臓組織の病理的变化を誘発する<sup>6)</sup>。免疫学的には、DONの曝露が転写に関連するサイトカインを誘導する。また、高濃度のトリコテセン曝露は白血球やマクロファージの細胞死を誘発し、免疫抑制を引き起こす<sup>7)</sup>。DONの標的分子の一つは遺伝子の翻訳を担う60Sリボソームサブユニットである<sup>8)</sup>。DON結合による翻訳阻害は普段抑制的な制御を受けているmitogen-activated protein kinases (MAPKs)を誘導し、MAPK経路の誘導によってアポトーシスが引き起こされる。この一連の流れがribotoxic stress responseと呼ばれる<sup>9)</sup>。MAPK経路は細胞死以外にも免疫応答や細胞分裂、生体構成成分合成など、多くの機構を制御している。そのためMAPK経路の制御変化は生体の免疫機構や細胞の維持・増殖に大きく影響することになる。DONの動物に対する感受性はブタ>マウス>ラット>鳥、ウシとなっている<sup>7)</sup>。ブタではDONの細胞への吸収が速いことがその要因のようである。ブタのDON吸収は小腸に至るまでの短時間に進行する<sup>10)</sup>一方、大腸に至るまでには腸内細菌によって脱エポキシ化される<sup>11)</sup>。脱エポキシ化されたDON (de-epoxy DON; DOM-1)はDONよりも毒性が低くなる。生体内に取り込まれたDONの多くは脱エポキシ化された形で糞尿と共に排出されていることから、再びDONに変換される心配は少ない。このため、DONからDOM-1へ効率的に変換される腸内環境がDONの毒性低減に重要である。ブタのように吸収が速いと、胃から十二指腸付近において腸内フローラが効果的な働きをしない場合にはDOM-1への変換が進まないため、DONの毒性が反映されやすいと考えられる。反芻動物において感受性が低いのは、DONが腸内に留まる時間が相対的に長いため、腸内細菌に代謝を受けて脱エポキシ化し易くなることが要因の一つと考えられる。しかし、マウスのDON吸収はブタよりも更に速く<sup>12)</sup>、感受性傾向とは一致しない。このことは、生体ごとのDONに対する毒性影響が完全には同一でないことを示唆している。また、感受性には生物種の他に品種間差、環境差も影響する。これはDONを代謝・抱合しやすい腸内細菌叢や酵素を有しているか否かに大きく左右される。

### <パツリン>

PATの急性毒性はマウスにおいて消化管の出血や潰瘍などであり、慢性毒性や催奇形性は認められていない。発癌性に関してもデータが不十分である。その一方で数々の細胞種に対してDNA合成に障害を及ぼすことが報告されている。PATは細胞膜表層の還元能を持つグルタチオンに結合することで、活性酸素種への抵抗性を失わせる。本来還元されるべき活性酸素種が細胞内に溢れることによってDNA切断などの傷害が誘発され、細胞死を誘発する。一例として、PATはチャイニーズハムスターの線維芽細胞であるV79細胞に対する染色

体異常誘発性を示すことが報告されており<sup>13)</sup>、V79細胞を用いた試験において、PAT曝露は染色体複製開始に係る二本鎖DNA分離の異常により引き起こされる nucleoplasmic bridges (NPB) と呼ばれる症状を引き起こすと同時に、DNAの切断・損傷度を表す Tail DNA 量も増大する<sup>14)</sup>。このほかNPBに近い様態の染色体異常である Micronuclei (MN) もPATによって誘導されるが、アスコルビン酸の添加が症状を緩和すると報告されている<sup>15)</sup>。V79細胞以外の報告としてはヒト結腸癌由来のCaco-2細胞や分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* に対するPATの影響を調査した報告があり、PATが細胞膜を流動化させ透過性を高めている<sup>16), 17)</sup>。これらをまとめると、PATは細胞に対して染色体の異常な切断及び修復異常を引き起こし、細胞の維持やストレス抵抗性に重要な細胞膜の恒常性を失わせることで細胞死を引き起こすものと考えられる。(図3)

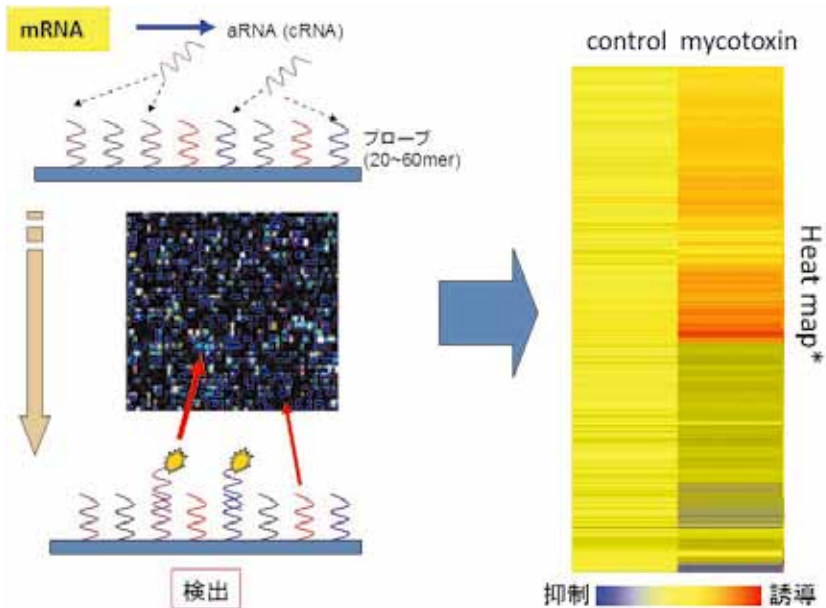


図3. DNA マイクロアレイを用いたマイコトキシン毒性評価の概要

マイコトキシンを曝露した細胞から遺伝子の発現を表す mRNA を抽出し、この mRNA からラベル標識化された合成 RNA (aRNA) を作製して、各遺伝子の相補配列から成るプローブセットを搭載したアレイチップとハイブリダイズさせる。ハイブリダイズされた aRNA はシグナルとして検出され、シグナル強度から aRNA  $\approx$  mRNA 量を計算してコントロール条件と比較を行う。\*Heat map は遺伝子発現量の比較結果であり、線状のイメージとして表された各遺伝子発現の比較結果を積み重ねた図である。

#### 4. DNA マイクロアレイによるマイコトキシンの毒性評価 < AFB<sub>1</sub> の毒性影響 >

AFB<sub>1</sub> の毒性低減試験としてグレープフルーツ果汁の摂取により AFB<sub>1</sub> による肝細胞の DNA 損傷が抑制されたとの報告<sup>18)</sup>があり、この報告では肝臓における AFB<sub>1</sub> の代謝不活性化を通じて毒性発現を抑制している事が示唆されている。しかし、種々の毒性メカニズムに関する報告や同様の毒性緩和に関する報告から、毒性低減には他の要素も貢献している可能性が考えられる。一つの可能性としては、3章で述べたように AFB<sub>1</sub> の毒性が抗酸化物質によって低減されるため、その効果が表れたということである。このような毒性低減に向けたヒントを掴むため、我々は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞を用いた AFB<sub>1</sub> の曝露試験を実施して毒性応答メカニズムの解明に取り組んだ<sup>19)</sup>。この研究では、酵母細胞において細胞壁の  $\beta$  グルカン生合成等に関与している MAPK 経路を抑制的に制御している Ser/Thr フォスファターゼ 2C をコードする *PTCI* 遺伝子を欠失した変異株 ( $\Delta$ *PTCI*) に対し、AFB<sub>1</sub> の曝露試験を実施した。変異株を用いるのは酵母細胞のマイコトキシンの耐性を抑えるためである。酵母細胞には一部のマイコトキシンのトラップにも関与する厚い細胞壁や多剤耐性能を持つ細胞質膜上の排出ポンプが存在するため、動物細胞と比べて抵抗力が強く、野生型株では細胞内の応答反応を捉える事が困難である。これにより、酵母細胞を用いたマイコトキシン毒性評価においては変異株を用いる事が多い。さらに酵母細胞を用いる利点として、酵母細胞が真核細胞の実験系モデルとされていること、全ゲノムが解析されており、遺伝子破壊株のセットが入手可能であるためスクリーニングに適している事等が挙げられる。また動物細胞は各器官に分化した細胞であるため、細胞株毎に異なる応答反応を示す可能性があり、一般性のあるメカニズムを確認するには酵母のような細胞が適している。当該研究では、これに加えてマイコトキシンの細胞内への移行を促進する目的で低濃度のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を培地に添加している。DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析の結果、 $\Delta$ *PTCI* に対し AFB<sub>1</sub> を 2 時間曝露させた細胞では、1200 余りの遺伝子発現が変化した。(表 1)

遺伝子発現の変化を機能遺伝子群毎に分類すると、DNA の構成物質であるプリンの生合成経路遺伝子の発現抑制や DNA 修復関連遺伝子の発現誘導が見られた。これは動物細胞における DNA 損傷と同様の事態が酵母細胞の中で生じていることを示唆している。また、この研究では解糖系や糖新生、TCA サイクル上の遺伝子にもまとまった変化が見られた。(図 4)

これらの系の一連の流れを追うと、遺伝子発現の変化が糖新生を誘導する傾向を示していた。さらに、糖新生と同時にイノシトール合成遺伝子が誘導されていた。イノシトールとは水溶性のビタミン様物質である。動物では肝臓に多く含まれ、LDL コレステロールを放出して脂肪肝を抑制する働きもある。脂肪肝も酸

表 1. アフラトキシン B<sub>1</sub> 曝露による酵母 *ΔPTC1* 細胞の遺伝子発現変化

Ensembl	遺伝子名	遺伝子発現 変化量(倍)	コードタンパク質	機能分類
YGL234W	<i>ADE5,7</i>	0.42	Aminoimidazole ribotide synthetase	プリン 塩基合成
YLR359W	<i>ADE13</i>	0.51	Adenylosuccinate lyase	
YGR061C	<i>ADE6</i>	0.45	Formylglycinamide-ribonucleotide, (FGAM)-synthetase	
YDR226W	<i>ADK1</i>	0.56	Adenylate kinase	
YNL220W	<i>ADE12</i>	0.46	Adenylosuccinate synthase	
YDR454C	<i>GUK1</i>	0.59	Guanylate kinase	
YHR216W	<i>IMD2</i>	0.02	Inosine monophosphate dehydrogenase	
YLR432W	<i>IMD3</i>	0.34	Inosine monophosphate dehydrogenase	
YGR258C	<i>RAD2</i>	1.83	Subunit of Nucleotide Excision Repair Factor 3	DNA 修復
YER162C	<i>RAD4</i>	2.36	Subunit of Nuclear Excision Repair Factor 2 (NEF2)	
YJR052W	<i>RAD7</i>	1.54	Subunit of Nucleotide Excision Repair Factor 4	
YMR201C	<i>RAD14</i>	1.69	Subunit of Nucleotide Excision Repair Factor 1 (NEF1)	
YBR114W	<i>RAD16</i>	2.88	Subunit of Nucleotide Excision Repair Factor 4	
YPL153C	<i>RAD53</i>	1.84	Protein kinase	
YGL058W	<i>RAD6</i>	1.52	Ubiquitin-conjugating enzyme (E2)	
YJR035W	<i>RAD26</i>	1.64	Homolog of human CSB protein	
YDR030C	<i>RAD28</i>	3.42	Homolog of human CSA protein	
YER095W	<i>RAD51</i>	1.57	Strand exchange protein	
YGL163C	<i>RAD54</i>	3.04	DNA-dependent ATPase	
YDL059C	<i>RAD59</i>	1.83	Homolog of Rad52p	

化ストレスを亢進する特徴があり、イノシトールはこれを解消することで抗酸化にも寄与していると考えられる。酵母細胞において、イノシトールはスフィンゴ脂質代謝経路へと送られる。スフィンゴ脂質代謝経路ではイノシトールリン酸と phytoceramide から mannosyldiinositol phosphoryl -ceramide (MIP2C) が作られる。MIP2C は細胞膜の主要な構成物質であり膜タンパク質の局在を左右する重要な物質である。ところが、phytoceramide の生合成経路上にある複数の遺伝子は、AFB<sub>1</sub> の曝露により発現が抑制されている。セラミドは膜タンパクの構成成分であると同時にその他の細胞維持機能や細胞死シグナルの役割も持っているため、シグナルの供給異常は細胞修復や分裂に異常を誘発する。先に述べたとおり細胞膜上には多剤耐性トランスポーターが存在するものの、これらの影響により細胞の維持機能が有効に機能しないと推測される。他のマイコトキシンに関する報告として、動物細胞に対するフモニシン B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) の曝露によってセラミド合成阻害が引き起こされ、スフィンゴ脂質代謝経路の異常によって DNA 合成を補助する葉酸を取り込むためのトランスポーターが機能しない例<sup>20)</sup>がある。AFB<sub>1</sub> の毒性評価においても、FB<sub>1</sub> 同様にスフィンゴ脂質代謝経路の観測から細胞の損傷や修復プロセスに関連する情報を取得可能であろう。上述のグレープフルーツはイノシトールを豊富に含んでいる果物であり、スフィンゴ脂質代謝経路

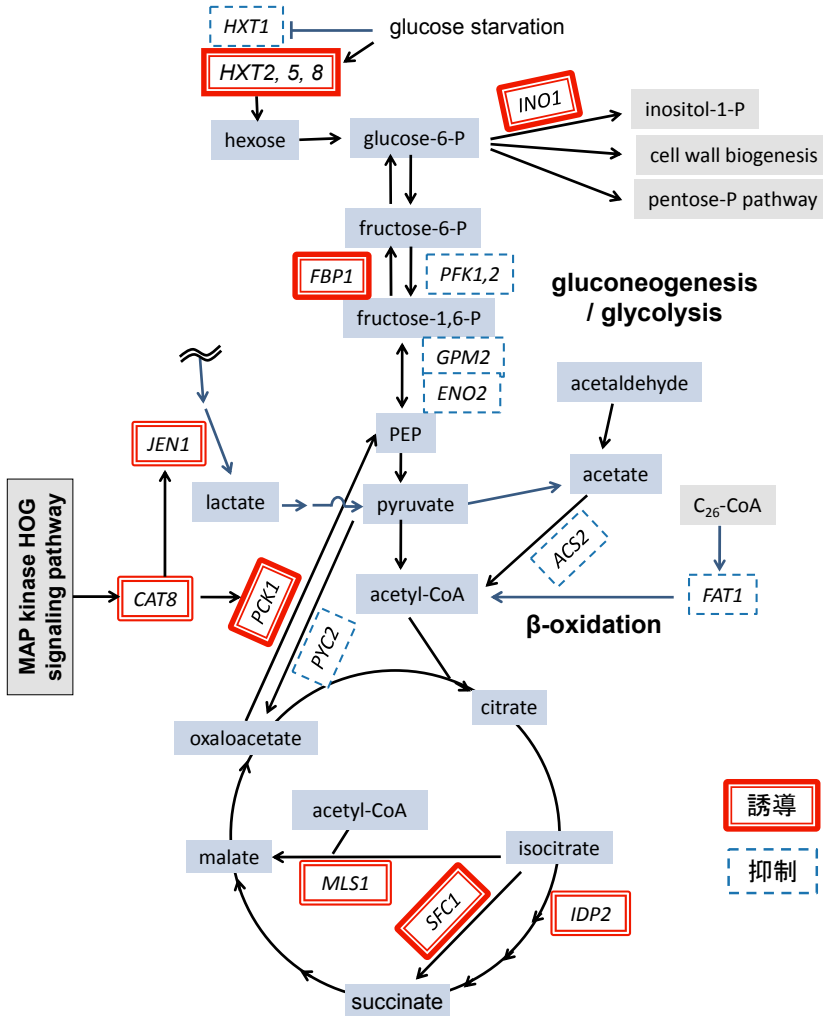


図4. アフラトキシン B<sub>1</sub> の曝露と酵母の糖代謝経路遺伝子の遺伝子発現変化

の正常化に影響することで細胞分裂のシグナル正常化に一役買っているのかもしれない。また、DNA付加体を形成する AFB<sub>1</sub>-exo-8,9-epoxide は CYP3A による代謝を受けることで生成されるが、グレープフルーツの成分であるフラノクマリン類は CYP3A を不活性化する<sup>21)</sup>ことから、アスコルビン酸の抗酸化、スフィンゴ脂質代謝経路の正常化、CYP3A 不活化という複合的な影響が AFB<sub>1</sub> の毒性を低減しているものと思われる。(図5)



タンパク質合成遺伝子群であった。これは翻訳阻害に関連した遺伝子発現の変化と考えられた。その他に特徴的な変化を示したのはトリコテセンの標的ともなり得るリボソームの合成遺伝子群であった。興味深いことに、細胞質に局在するリボソーム合成遺伝子群では DON, 15AcDON, 4AcNIV の曝露によって発現が誘導されている反面、ミトコンドリアのリボソーム合成遺伝子群は発現が抑制された。(図6)

トリコテセン系マイコトキシンのモデルとしてトリコテセンを曝露した酵母細胞においてリボソーム合成遺伝子群が大きく変動することは報告されていたが、我々の研究では遺伝子発現変化の傾向が細胞内局在によって正反対になっていることを示唆した。この特異的な変化との関連を持つと想定されるのが DON 曝露と細胞死の関係である。マイクロアレイ解析ではシステインプロテアーゼをコードする遺伝子 *MCA1* の発現も DON などによって誘導されていた。この遺伝子は細胞周期の G1/S 期を促進する働きがあり、G1/S 期細胞の数は減少し、結果として G2/M 期にあたる産物が集積する。この特徴はトリコテセン系マイコ

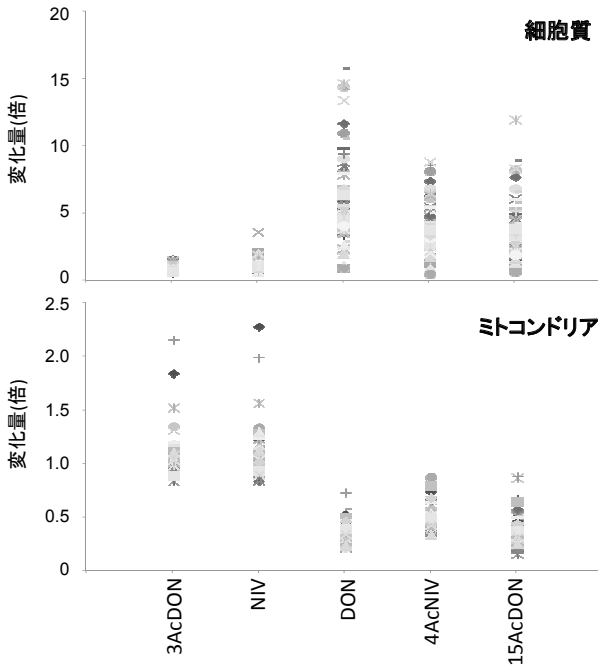


図6. タイプBトリコテセン曝露とリボソーム合成遺伝子群の発現変化

プロットはリボソーム合成遺伝子の各遺伝子がマイコトキシンの曝露によって示した発現量の変化を表す。

キシンの毒性である G2/M arrest に一致する。また、*MCA1* の欠損変異株では短期的に細胞の生存率が上昇する。そのため、この試験で検出された *MCA1* の発現誘導は細胞死（多細胞生物ではアポトーシスに相当）を誘発すると考えられる。細胞死メカニズムの一つとして、ミトコンドリア内で電子伝達に働いているシトクロム C が細胞質へ放出され、これがカスパーゼ 8 のイニシエーターとされる Mca1p の活性を上昇させることで細胞死が誘導される。この結果、細胞質における細胞分解酵素生成やストレス応答遺伝子の活性化が起こる反面、同時期にミトコンドリアの呼吸鎖は断たれ、活性が下がっている可能性が考えられる。DNA マイクロアレイによる遺伝子発現変化の網羅的解析は、個々の遺伝子発現の変化量を測定するツールとしてはノーザンブロット解析やリアルタイム PCR 解析に劣るものの、機能遺伝子群全体の発現傾向を掴むことに長けている。これまでトリコテセン系マイコキシンが G2/M 期停滞を引き起こすことは報告されていたが、その作用機序は深く調べられていなかった。本研究から得られた特徴的な遺伝子発現変化のデータは、そうした毒性症状の作用機序を明らかとするための一助となるであろう。(図 7)

#### < PAT の毒性を抑える抗酸化作用 >

PAT は細胞膜上に存在し、抗酸化機能を担っているグルタチオンに結合し、

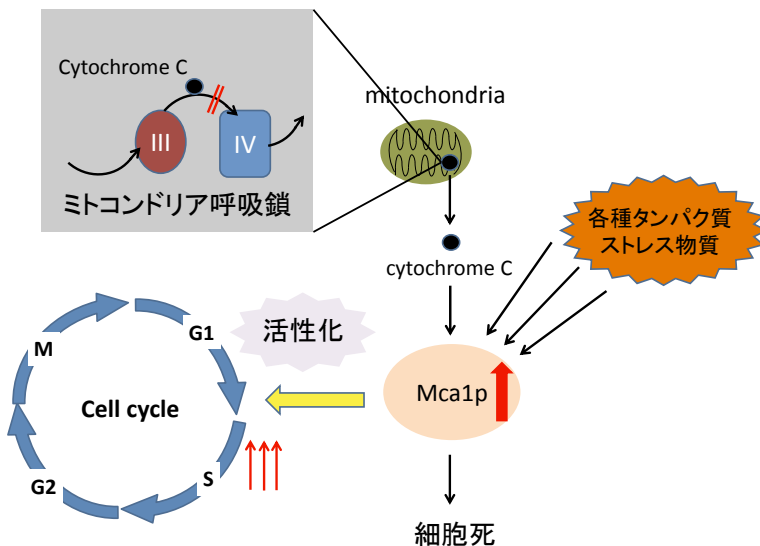


図 7. Mca1p による細胞周期の調節と細胞死の誘導

細胞周期右の赤矢印は G1/S 期の活性化を表し、G1/S 期に留まる細胞数は減少する。



細胞の抗酸化能を低下させる。これにより細胞内の活性酸素種が増加し、DNA に対する傷害やアポトーシスを誘導して細胞を傷つけるとされている。そこで、毒性緩和に関する情報を取得するために、我々は酵母の酸化還元酵素スーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) を欠損した変異株  $\Delta$ SOD1 を用いた試験を実施した。これにより、酵母細胞においても PAT の毒性を確認する事が出来る。当該研究において、我々はカテキンやケイ皮酸メチル、没食子酸、L-システインなどの抗酸化物質を培地に加え、生育遅延の改善効果や DNA 発現量の変化を観察した。この中で顕著な生育改善効果を示したのがアスコルビン酸であった。アスコルビン酸はビタミン C として認知されている一般的な抗酸化物質であり、柑橘類の果汁にも豊富に含まれている。前章で述べたとおり、チャイニーズハムスター V79 細胞の実験系においてもアスコルビン酸が染色体異常を緩和しており、酵母でも同様の結果が得られた。また、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析から、アスコルビン酸を同時に添加した PAT 曝露条件の酵母細胞では、DNA ダメージ応答遺伝子や DNA 修復遺伝子の発現量の変化が PAT のみを曝露した条件と比べて抑えられた<sup>23)</sup>。これはアスコルビン酸の抗酸化作用によって細胞内の活性酸素種が抑えられたために DNA ダメージが抑えられたことを示唆している。また、鉄代謝系の遺伝子が増加し、多くの場合アスコルビン酸の添加によって PAT 曝露由来の遺伝子発現変化が抑えられた。(図 8)

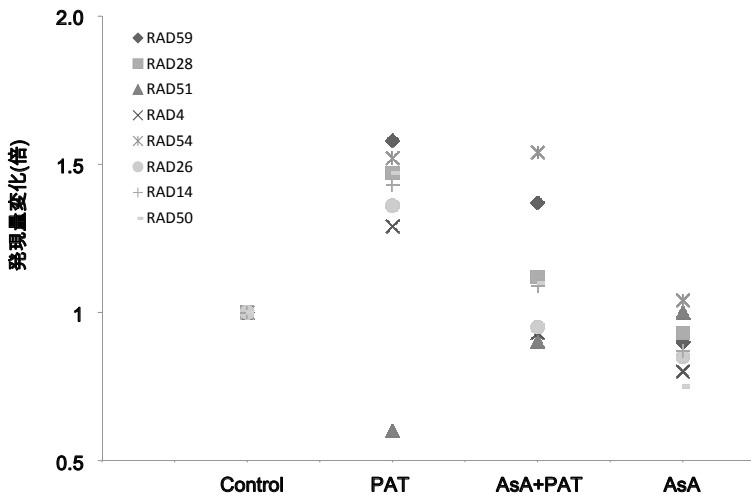


図 8. パツリン (PAT) 曝露及びアスコルビン酸 (AsA) 添加条件における DNA 修復遺伝子群の発現変化

PAT(-), AsA(-) = control=1 倍として、各条件における遺伝子発現変化を表示。

酵母の細胞膜上には3価の鉄イオンを取り込むトランスポーターと2価の鉄イオンを取り込むトランスポーターが存在し、PATの曝露によって2価の鉄イオントランスポーターの発現が抑制されていた。また細胞質内では3価となった鉄イオンが2価に変換されてミトコンドリアに取り込まれ、鉄硫黄クラスターが形成され、再び細胞質に放出されてクラスターを完成させるが、ミトコンドリア内の鉄硫黄クラスター形成遺伝子も発現が抑制されていた。これにより細胞内の酸化還元状態の更なる悪化が引き起こされ、活性酸素種の増加に繋がるのではないかと考えられた。動物細胞において観察されているNPBやMNといった染色体の切断を伴う異常にも、これと同様のメカニズムに起因する酸化還元状態の変化が影響しているものと思われる。では、動物における毒性症状と酵母細胞内の影響はどのようにリンクしているのか？(図9)

ヒトや動物において、鉄は3価のイオンとして摂取されて腸管へと至る。同様にマイコトキシンも十二指腸を始めとする腸管上皮細胞に到達する。動物は3価の鉄イオンを取り込む事が出来ないが、腸管上皮細胞表面には3価の鉄を2価に還元し、細胞内に取り込む仕組みが存在する<sup>24)</sup>。この2価の鉄イオンは更に門脈中へ放出された後、3価の鉄イオンに変換されてトランスフェリンによって各種組織や臓器へと運ばれるのである。しかし、PATの毒性によって腸管上皮における還元力が低下すると、鉄イオンは3価のまま還元されず、鉄欠乏の症状を呈すものと考えられる。酵母細胞における鉄代謝遺伝子の変化もこれと同様に細胞表面の還元力低下に起因する症状であると推測される。一方アスコルビン酸は還元作用を有するため鉄イオンを2価に還元し、細胞内に取り込み易くする効果がある。(図10)

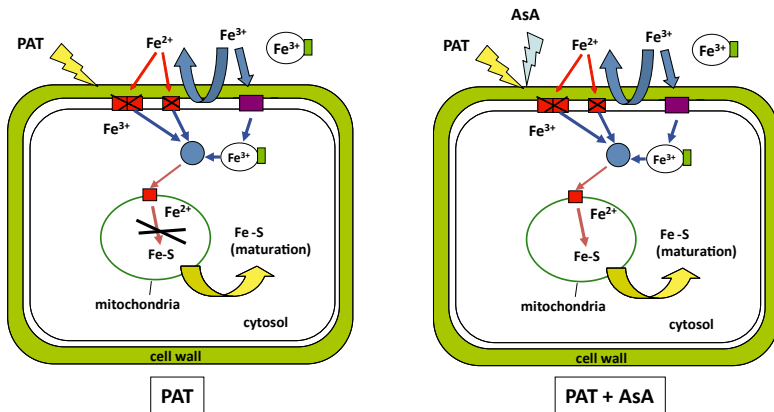


図9. 酵母細胞内における鉄イオン代謝とパツリン (PAT) 及びアスコルビン酸 (AsA) の影響

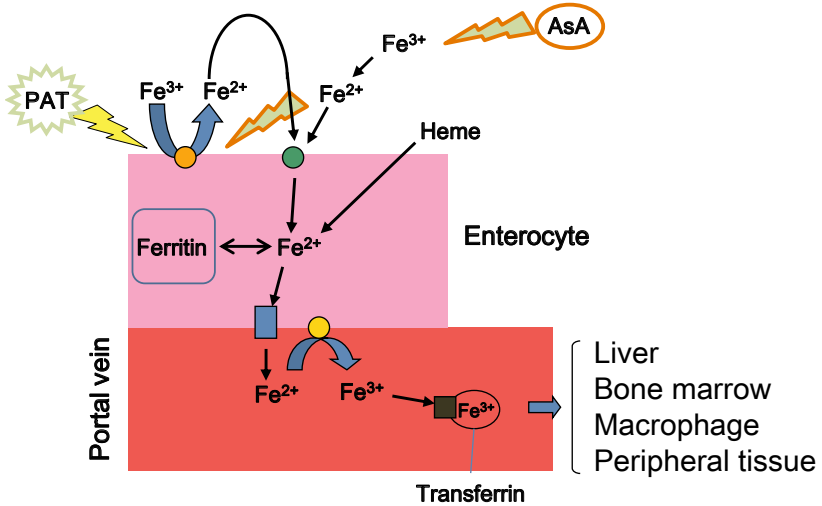


図 10. 生体内鉄イオンの取り込み機構におけるパツリン (PAT) の阻害作用とアスコルビン酸 (AsA) による緩和

実際に、ヒトリンパ球系の培養細胞である U-937 細胞では、アスコルビン酸の添加によって 2 価鉄イオンの取り込みが増加する<sup>25)</sup>。チャイニーズハムスターの V79 細胞におけるアスコルビン酸の添加効果もこうした還元作用が影響しているものと思われ、酵母細胞のみならず動物細胞における鉄代謝異常にも有効性を示す可能性が高い。我々の知見と過去の報告をまとめると、PAT の曝露に起因する鉄代謝異常に関してはアスコルビン酸の存在によって緩和される。しかし、動物細胞および酵母細胞においても、アスコルビン酸の添加のみによる完全な回復は観察されていない。これは V79 細胞の報告でも、我々の遺伝子発現変化のデータからも確認できる。鉄取り込みに関連する遺伝子の発現変化異常もある程度残ったままとっている。PAT の毒性を完全に抑えるため、こうした遺伝子に着目すると毒性メカニズムの解明を進める助けになるだろう。しかし、PAT の研究において、酵母細胞で検出されたミトコンドリアにおける鉄硫黄クラスター形成遺伝子の変化に対して動物における対応したデータが無い。これはマイコトキシンの毒性評価に用いる動物細胞が分化した組織に由来するため、マイコトキシンの直接的な攻撃対象となる腸管上皮細胞や、染色体異常など特定の症状を観察しやすい細胞が研究対象となりやすいことに起因している。動物細胞を用いた試験の場合、鉄代謝異常のような一連の流れは複数の組織を横断的にモニタリングする必要があるが、これは培養細胞試験では再現できず、時として見逃される可能性がある。このような面から、酵母細胞のような基礎的な細胞試験

系を用いる試験でも、動物細胞試験では補いきれない知見を獲得する事が可能と考えられる。

## 5. 藻類を用いたマイコトキシンの毒性評価

マイコトキシンの毒性は主としてヒトや家畜等の経済動物、あるいはペットへの影響を想定して調査されている。しかし、マイコトキシンの動物に対する毒性というものは、カビのライフサイクルに対して必須の存在ではない。その生存・繁栄に必須の生体は寄生対象となる植物である。実際に小麦赤かび病の原因菌も産生する DON が葉片の白化や根の伸長抑制に影響している事が報告されており、一方で、植物体の防御応答に呼応してマイコトキシンの産生が開始するという報告も上がっている。つまり、繁殖に適した環境を整えるためにマイコトキシンが細胞傷害を誘発し、植物の防御応答を無効化している可能性がある。現在までのところ、こうした寄生メカニズムとマイコトキシンの役割に関する研究の情報は限られているが、今後多くのマイコトキシンについてメカニズムが明らかになっていくだろう。では、植物体は為す術もなくカビに寄生されるのかというと、そうではないようだ。植物が体外へ放出する防御応答物質の一種としてグルコシルトランスフェラーゼが挙げられる。この酵素はマイコトキシンにグルコースを結合させる働きがあり、グルコシド化されたマイコトキシンは元のマイコトキシンと比べて大幅に毒性が下がるという報告がなされている<sup>26)</sup>。これまで検出技術が確立していなかったためにグルコシド体の存在は注目されていなかったが、近年複数のマイコトキシンにグルコシド体が存在することが示唆されている。今後動植物に対する影響の評価も進むであろう。

では、こうした防御応答機構以外にマイコトキシンの毒性に作用する要因は存在しないのであろうか？マイコトキシンの挙動は化学構造に左右される面が多いため、基本的には生物種を問わずその毒性メカニズムは共通している。一方で、植物組織として最も特徴的と言えるのは光合成や光感受性に関わるメカニズムであるが、これらの機構は動物細胞に存在しないため、マイコトキシンがどのように影響するのか評価が進んでいない。そこで、我々は光感受性や光合成研究のモデル細胞として用いられている単細胞の微細藻類であるクラミドモナスに対するマイコトキシンの毒性を調査している。これは Alexander ら<sup>27)</sup> が以前クラミドモナスを使用した実験系でトリコテセン系マイコトキシンの毒性評価を実施しており、利用可能と思われたためである。また、モデル生物でもあるため組換え体の入手容易性や近年光合成関連遺伝子群を網羅的に搭載したマイクロアレイチップも報告されたこと、さらには高等植物と異なり藻類であるため、細胞が均質で培養も短期間で済むことが利点である。更にクラミドモナスが藻類の中でも優れているのは、光条件を失っても培地から栄養を取り込み生育する事が出来るヘテロトロフであり、光合成関連の機能を欠損しても細胞の維持が可能な事である。

この特徴は完全暗所条件におけるマイコトキシン曝露試験が実施可能なことを意味しており、光合成経路の働かない植物細胞におけるマイコトキシンの曝露影響を評価可能ということである。実際に光条件の有無を設定してタイプBトリコテセンの曝露試験を実施したところ、光条件の有無によらず感受性の傾向は一致した。(図 11)

次に光の波長について着目した。クラミドモナスはクロロフィル a, b を持っており、一般的な高等植物と同様である。また、これらのクロロフィルは 450-470nm 付近の青色光及び 660nm 付近の赤色光を効率的に利用する。我々はこれらの波長域に対応した LED 光と、コントロールとして白色 LED を準備し、さらに赤：青 = 3：1 のミックス光それぞれを光条件としてマイコトキシンの曝露を実施した<sup>28)</sup>。しかし、波長ごとの増殖効率は異なるものの、マイコトキシンに対する感受性の傾向に大きな変化は見られなかった。光の有無および波長の変化が感受性の傾向に変化を示さなかったことで、マイコトキシンの曝露影響は光合成系にはまったく影響していないものと考えたが、一部のマイコトキシンの感受性が大きく上がっている事を見出した。光の有無や波長帯の違いではなく、光の強さの変化がマイコトキシン感受性に影響するかもしれないということが想定され、光の強さを变化させた曝露試験を実施し、4AcNIV や 15AcDON などは光強度が強まると感受性が高くなる傾向を示した(ここで言う光強度とは光合成光量子束密度と呼ばれるもので、光合成に利用される 400 ~ 700nm の波長帯の放射照度に係数を掛けて波長ごとに算出する数値であり、目視による明るさとは異なる)。これが他の植物細胞でも再現される現象であるならば、作物の栽培環境における光条件の影響がマイコトキシン抵抗性を変化させ、カビの感染を誘発、あるいは抑制するかもしれない。光の強さは植物の生長だけでなくストレスにも関わる重要なファクターである。こうした研究もまた、作物の栽培現場におけるカビ感染の低減に役立てるものと考えている。(図 12)

## 6. おわりに

近年、国内はもとより世界各地で極端な気象現象が頻発しており、農産物の安定的な栽培に悪影響を与えている。また、新興国の消費拡大や農地の劣化によって、安価で良質な農産物の安定供給にも問題が生じ始めている。このような状況

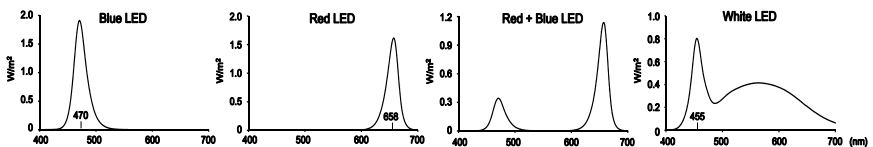


図 11. クラミドモナスの生育に用いた LED 光源の波長特性

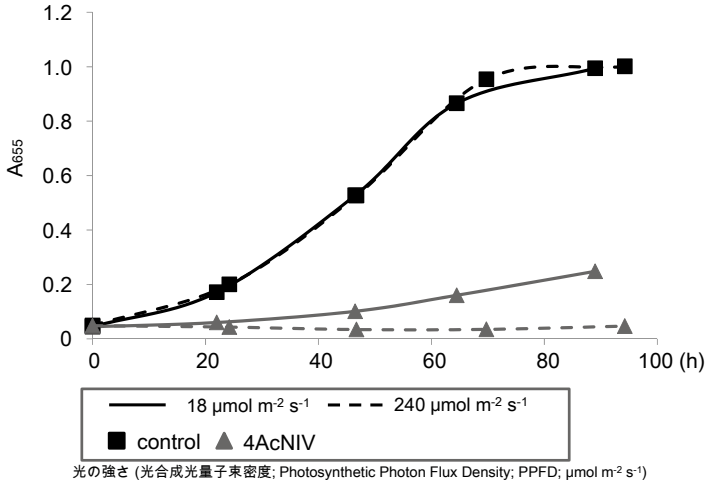


図 12. クラミドモナスの 4AcNIV 感受性に対する光条件の影響

が、国産・輸入を問わずマイコトキシン汚染農産物の流通する可能性を、若干ながら高めつつある。また、地産地消やインターネットの発達によって、メジャーな流通経路を経ないで取引される農産物も増えている。これらはマイコトキシン汚染の実態が調査されていないため、消費者のマイコトキシンの曝露リスクを増加させ、リスクファクターを複雑化させている。これを解決するためには消費者自身が正しい情報を認識した上で、それらのリスクと向き合う必要がある。マイコトキシンの毒性やその低減に関する情報の提供は、今後消費者のリスク管理に資する判断材料になると考えている。

(応用微生物研究領域 微生物評価ユニット 鈴木 忠宏)

## 7. 参考文献

- 1) Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J., Richard, J., (2007) Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology* **137**, 265-282.
- 2) Reddy, K. R., Reddy, C. S., Muralidharan, K., (2009) Detection of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B1 in rice in India. *Food Microbiol* **26**, 27-31.
- 3) Guengerich, F. P., Johnson, W.W., Ueng, Y.F., Yamazaki, H., Shimada, T., (1996) Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B1 and relevance to risk of human liver cancer. *Environ Health Perspect* **104**, 557-562.
- 4) Moudgil, V., Redhu, D., Dhanda, S., Singh, J., (2013) A review of molecular

- mechanisms in the development of hepatocellular carcinoma by aflatoxin and hepatitis B and C viruses. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **32**, 165-175.
- 5) Forsell, J.H., Jensen, R., Tai, J.H., Witt, M., Lin, W.S., Pestka, J.J., (1987) Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxin) and 15-acetyldeoxynivalenol in the B6C3F1 mouse. *Food Chem Toxicol* **25**, 155-162.
  - 6) Alm, H., Brüssow, K.P., Torner, H., Vanselow, J., Tomek, W., Dänicke, S., Tiemann, U., (2006) Influence of *Fusarium*-toxin contaminated feed on initial quality and meiotic competence of gilt oocytes. *Reprod Toxicol* **22**, 44-50.
  - 7) Pestka, J.J., (2007) Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology* **137**, 283–298.
  - 8) Ueno, Y., (1984) Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. *Fundam Appl Toxicol* **4**, 124-132.
  - 9) Laskin, J.D., Heck, D.E., Laskin, D.L., (2002) The ribotoxic stress response as a potential mechanism for MAP kinase activation in xenobiotic toxicity. *Toxicol Sci* **69**, 289-291.
  - 10) Prelusky, D.B., Hartin, K.E., Trenholm, H.L., Miller, J.D., (1998) Pharmacokinetic fate of 14C-labeled deoxynivalenol in swine. *Fundam Appl Toxicol* **10**, 276-286.
  - 11) Yoshizawa T., Cote L.M., Swanson S.P., Buck W.B., (1986) Confirmation of DOM-1, a Deepoxidation Metabolite of Deoxynivalenol, in Biological Fluids of Lactating Cows. *Agricultural and Biological Chemistry* **50**, 227-229.
  - 12) Azcona-Olivera, J.I., Ouyang, Y.L., Warner, R.L., Linz, J.E., Pestka, J.J., (1995) Effects of vomitoxin (deoxynivalenol) and cycloheximide on IL-2, 4, 5 and 6 secretion and mRNA levels in murine CD4+ cells. *Food Chem Toxicol* **33**, 433-441.
  - 13) Thust, R., Kneist, S., Mendel, J., (1982) Patulin, a further clastogenic mycotoxin, is negative in the SCE assay in Chinese hamster V79-E cells in vitro. *Mutat Res* **103**, 91-97.
  - 14) Glaser, N., Stopper, H., (2012) Patulin: Mechanism of genotoxicity. *Food Chem Toxicol* **50**, 1796-1801.
  - 15) Alves, I., Oliveira, N.G., Laires, A., Rodrigues, A.S., Rueff, J., (2000) Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity. *Mutagenesis* **15**, 229-234.
  - 16) Horváth, E., Papp, G., Belágyi, J., Gazdag, Z., Vágvölgyi, C., Pesti, M., (2010) In vivo direct patulin-induced fluidization of the plasma membrane of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Food Chem Toxicol* **48**, 1898-1904.
  - 17) Mohan, H.M., Collins, D., Maher, S., Walsh, E.G., Winter, D.C., O'Brien, P.J.,

- Brayden, D.J., Baird, A.W., (2012) The mycotoxin patulin increases colonic epithelial permeability *in vitro*. *Food Chem Toxicol* **50**, 4097-4102.
- 18) Miyata, M., Takano, H., Guo, L.Q., Nagata, K., Yamazoe, Y., (2004) Grapefruit juice intake does not enhance but rather protects against aflatoxin B1-induced liver DNA damage through a reduction in hepatic CYP3A activity. *Carcinogenesis* **25**, 203-209.
- 19) Suzuki, T., Iwahashi, Y., (2009) Gene expression profile of MAP kinase PTC1 mutant exposed to Aflatoxin B1: dysfunctions of gene expression in glucose utilization and sphingolipid metabolism. *Chem-Bio Informatics Journal* **9**, 94-107.
- 20) Stevens, V.L., Tang, J., (1997) Fumonisin B1-induced sphingolipid depletion inhibits vitamin uptake via the glycosylphosphatidylinositol-anchored folate receptor. *J Biol Chem* **272**, 18020-18025.
- 21) Lown, K.S., Bailey, D.G., Fontana, R.J., Janardan, S.K., Adair, C.H., Fortlage, L.A., Brown, M.B., Guo, W., Watkins, P.B., (1997) Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J Clin Invest* **99**, 2545-2553.
- 22) Suzuki, T., Iwahashi, Y., (2012) Comprehensive gene expression analysis of type B trichothecenes. *J Agric Food Chem* **60**, 9519-9527.
- 23) Suzuki, T., Iwahashi, Y., (2011) Gene expression profiles of yeast *Saccharomyces cerevisiae* sod1 caused by patulin toxicity and evaluation of recovery potential of ascorbic acid. *J Agric Food Chem* **59**, 7145-7154.
- 24) Muñoz, M., Villar, I., García-Erce, J.A., (2009) An update on iron physiology. *World J Gastroenterol* **15**, 4617-4626.
- 25) May, J.M., Qu, Z.C., Mendiratta, S., (1999) Role of ascorbic acid in transferrin-independent reduction and uptake of iron by U-937 cells. *Biochem Pharmacol* **57**, 1275-1282.
- 26) Nagl, V., Schwartz, H., Krska, R., Moll, W.D., Knasmüller, S., Ritzmann, M., Adam, G., Berthiller, F., (2012) Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in rats. *Toxicol Lett* **213**, 367-373.
- 27) Alexander, N.J., McCormick, S.P., Ziegenhorn, S.L., (1999) Phytotoxicity of selected trichothecenes using *Chlamydomonas reinhardtii* as a model system. *Nat Toxins* **7**, 265-269.
- 28) Suzuki, T., Iwahashi, Y., (2014) Phytotoxicity evaluation of type B trichothecenes using a *Chlamydomonas reinhardtii* model system. *Toxins* **6**, 453-463.



## Ⅲ 枯草菌の物質生産能を向上させる手法

### 1. はじめに

枯草菌 (*Bacillus subtilis*) は自然界に普遍的に存在するグラム陽性の土壌細菌である。その特徴は、内生孢子を形成することによって様々なストレスに対して強い抵抗性を獲得し、極めて厳しい環境下でも生き延びることができることにある。また、外部 DNA を取り込む自然形質転換能を有し、古くから分子遺伝学研究が盛んに行なわれてきた。1997 年には全ゲノム配列が決定され、その後のポストゲノム解析でもグラム陽性細菌のモデル生物として微生物研究の牽引役となってきた。これらモデル生物としての学術的重要性に加え、枯草菌の産業微生物としての重要性も忘れてはならない。一般的に枯草菌は人間に対する病原性が無く、“安全な”菌として認知されており、産業への活用が容易な菌でもある。日本人には馴染みの深い納豆菌 (*Bacillus subtilis natto*) も分類上、枯草菌に分類されている。また、枯草菌は菌体外に種々の分解酵素や抗菌物質を生産することでも知られ、近縁菌がプロテアーゼやアミラーゼなどの有用酵素の生産菌として利用されているほか、枯草菌孢子を有効成分とする微生物農薬としても活用されている。このように枯草菌は基礎及び応用の両面において魅力的な研究材料であると言える。本稿では、枯草菌の抗生物質生産研究から得られた知見とともに、枯草菌の物質生産能力を向上させる手法について紹介する。

### 2. 枯草菌の抗生物質生産について

枯草菌は様々な抗生物質を生産することが知られている。これまでに様々な株から抗生物質が単離、構造決定されており、報告された抗生物質は既に 20 種類以上に上る<sup>1)</sup>。しかしながら、筆者が枯草菌の抗生物質生産の制御機構について研究を始めた頃、枯草菌のポストゲノム解析が着々と進行していたにもかかわらず、枯草菌の抗生物質生産に関する研究はほとんど行なわれていなかった。学会などでは「なぜ枯草菌で抗生物質の研究をするのか」とよく質問されたものである。抗生物質といえば、天然抗菌薬の約 7 割を生産する放線菌に焦点を当てがちであるが、抗生物質の用途は人用医薬品に限ったものではない。前述のように、枯草菌孢子自体は既に微生物農薬として利用されていたが、その効果は病原菌を直接攻撃するものではなく、植物表面上で枯草菌が優先的に増殖することによって病原菌の定着を阻止するというものであった。そこで筆者は抗生物質高生産株を利用すれば更なる防除効果が期待できると考え、枯草菌が生産するジペプチド抗生物質バシリシン (図 1) の研究を開始したのである。バシリシン (図 1) は枯草菌ゲノム解析に用いられた実験標準株 168 が生産する主要な抗生物質であるが、ゲノム配列決定後もバシリシンの生合成遺伝子は同定されていなかった。そ

ここで、筆者は遺伝学的解析により生合成遺伝子を同定し、その転写制御機構を解析してきた<sup>2),3)</sup>。近年になって、このバシリシンが梨やリンゴなどのバラ科植物に発生する火傷病の原因菌 *Erwinia amylovora* の生育を阻害することが報告され<sup>4)</sup>、枯草菌が生産する抗生物質にも徐々に関心が高まりつつある。火傷病は国内では報告例はないものの、一度発生すると防除が困難であり深刻な被害をもたらす伝染病害である。抗生物質ストレプトマイシンは火傷病防除に効果的な薬剤であるが耐性菌の出現が問題となっており、他の防除剤の開発が強く望まれている。火傷病防除におけるバシリシンの有効性は未だ不明であるが、様々な薬剤に抵抗性を有する孢子は他の薬剤との混合・併用も可能であり、バシリシン高生産株を利用した新たな薬剤の開発に繋がる可能性もある。また、火傷病防除剤の目的以外にも、バシリシンの生合成に関与するアミノ酸リガーゼ (図1) がジペプチド合成に活用されている<sup>5),6)</sup>。このように、枯草菌由来の抗生物質だけでなく、それらの生合成に関与する酵素なども注目されるようになっている。

### 3. リファンピシン耐性変異による物質生産能の向上

リファンピシンは細菌のRNAポリメラーゼに作用して転写開始反応を阻害する抗生物質であるが、低い頻度 (約  $10^{-8}$  程度) でリファンピシン耐性変異株が出現する。リファンピシン耐性変異のほとんどは、RNAポリメラーゼの  $\beta$  サブユニットをコードする *rpoB* 遺伝子内の限られた領域内に見出される<sup>7),8)</sup>。これらリファンピシン耐性変異によりRNAポリメラーゼの機能変化が生じ、有用遺伝子の発現を変化させることができる。このリファンピシン耐性を指標としたRNAポリメラーゼの機能改変は様々な微生物の物質生産能を向上させることが確認されている (表1)。この手法の特徴は、リファンピシン耐性変異という限られた変異で効果的に物質生産能を向上させることができる点にある。但し、リファンピシン耐性変異の効果は生物種や目的遺伝子によっても異なるため注意が必要である。

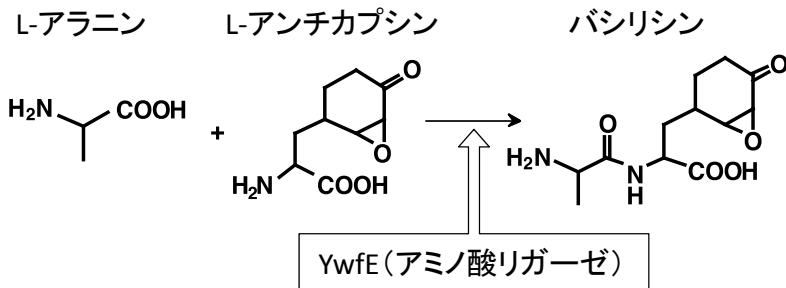


図1 バシリシン生合成の最終段階

### 3.1 枯草菌の潜在的二次代謝経路ネオトレハロサジアミン合成の活性化

枯草菌の実験標準株である 168 株において、 $\beta$  サブユニットの 487 番目のセリンがロイシンに置換されたリファンピシン耐性変異株はアミノ糖抗生物質ネオトレハロサジアミン (3,3'-ジアミノ- $\alpha$ , $\beta$ -トレハロース) を過剰に生産する (図 2)<sup>9)</sup>。この抗生物質は *Bacillus pumilus*<sup>17)</sup> や *Bacillus circulans*<sup>18)</sup> が生産することが

表 1 リファンピシン耐性変異により物質生産が向上した例

生物種	活性化された物質生産能	<i>rpoB</i> 変異	参考文献
<i>B. subtilis</i>	ネオトレハロサジアミン	S487L	9
<i>B. subtilis (natto)</i>	ネオトレハロサジアミン プロテアーゼ セルラーゼ	S487L	10
<i>B. licheniformis</i>	$\alpha$ -アミラーゼ	Q469R A478D A478V H482R R485H S487L	11
<i>B. clausii</i>	プロテアーゼ	A478V	11
<i>S. coelicolor</i>	アクチノロージン	H437Y	12
<i>S. lividans</i>	アクチノロージン	S433L S433P	13
<i>S. erythrae</i>	エリスロマイシン	S444F	14
<i>S. incarnatus</i>	シネフンジン	D447G	15
<i>S. mauvecolor</i>	ピペリダマイシン	H437L	16

下線は本稿に記載の抗生物質

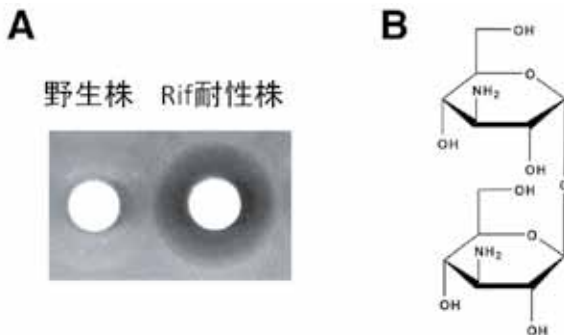


図 2 ネオトレハロサジアミン

A. 枯草菌 168 株 (野生株) 及びリファンピシン耐性変異株 (Rif 耐性株) の培養上清における抗黄色ブドウ球菌活性を示す。B. ネオトレハロサジアミンの構造

報告されていたが、枯草菌 168 株は通常培養条件下では、この抗生物質を生産することはない。即ち、リファンピシン耐性変異によって生じた RNA ポリメラーゼの機能変化が潜在的な抗生物質生産経路であるネオトレハロサジアミン合成経路を活性化したのである。このリファンピシン耐性変異によるネオトレハロサジアミン合成の活性化については納豆菌においても確認されている<sup>10)</sup>。

### 3.2 ネオトレハロサジアミン合成経路の活性化メカニズム

ネオトレハロサジアミン生合成遺伝子 (*ntdABC*) の発現は、最終産物であるネオトレハロサジアミン自身が転写アクチベーター NtdR に作用して生合成遺伝子の発現を誘導するオートインダクション機構によって正に制御されている<sup>9)</sup> (図3)。また、ネオトレハロサジアミン生合成遺伝子下流に存在するグルコーストランスポーター *GlcP* がグルコースの取り込みに連動してネオトレハロサジアミン生合成遺伝子の発現を抑制していることが判明している<sup>19)</sup>。この *GlcP* をコードする遺伝子の発現はネオトレハロサジアミン生合成遺伝子プロモーターに依存しており、ネオトレハロサジアミン生合成遺伝子下流の転写終結シグナルをリードスルーすることによって発現している (図3)。これらの転写制御機構を踏まえ、リファンピシン耐性変異によるネオトレハロサジアミン生合成経路の活性化メカニズムとして、①リファンピシン耐性変異が RNA ポリメラーゼのプロ

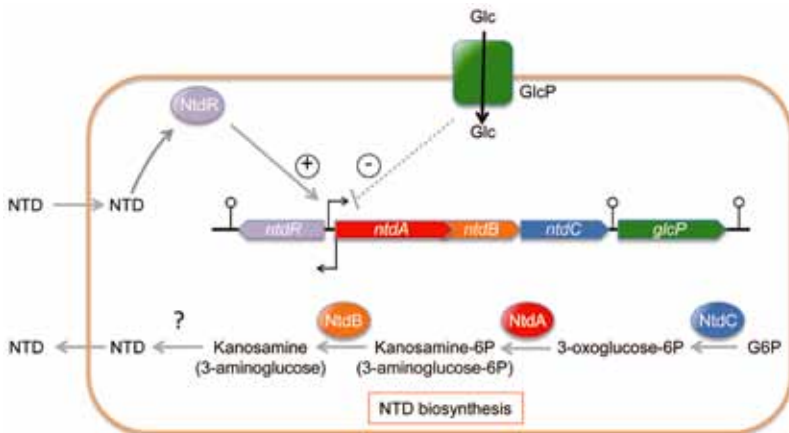


図3 ネオトレハロサジアミン生合成遺伝子の転写制御機構

NtdA, NtdB, NtdC はネオトレハロサジアミン生合成に関わる各酵素, NtdR はネオトレハロサジアミン生合成遺伝子の転写因子, *GlcP* はグルコーストランスポーター, NTD はネオトレハロサジアミン, *Glc* はグルコース, ステム・ループ構造は転写終結シグナルを表している。+ 及び - はネオトレハロサジアミン生合成遺伝子プロモーターにおける転写効果を示している。点線はメカニズムが判明していない制御機構を表す。

モーター認識能を増大させ、ネオトレハロサジアミン生合成遺伝子プロモーターを含む複数のプロモーター活性を増大させていること<sup>9)</sup>、②ネオトレハロサジアミン生合成遺伝子下流の転写終結シグナルでの転写終結効率を向上させることにより、ネオトレハロサジアミン生合成遺伝子の負の転写制御に関与するGlcPの発現を低下させていること<sup>19)</sup>、③ネオトレハロサジアミンによるオートインダクション機構によりネオトレハロサジアミンの過剰生産を引き起こすこと<sup>9)</sup>、などが挙げられる。

#### 4. ストレプトマイシン耐性変異による物質生産能の向上

ストレプトマイシンは細菌のリボソームに作用して翻訳を阻害する抗生物質である。ストレプトマイシン耐性変異は、この抗生物質の発見とほぼ同時期に見出されており、耐性レベルの違いにより高レベル耐性（最小発育阻止濃度の10倍以上）及び低レベル耐性（最小発育阻止濃度の数倍程度）の2種類が存在することが知られていた。1969年には高レベルストレプトマイシン耐性変異はリボソームタンパク質S12の突然変異により起こることが明らかにされたが<sup>20)</sup>、低レベルストレプトマイシン耐性変異は、近年まで同定されていなかった。越智らは、高レベルストレプトマイシン耐性変異であるリボソームタンパク質S12の変異が放線菌の抗生物質生産を活性化することを発見し、新たな微生物育種法として「リボソーム工学」を提唱した<sup>21)</sup>。これを機に、様々なリボソーム変異と抗生物質生産との相関性について検討され、未同定であった低レベルストレプトマイシン耐性変異もリボソームを構成する16S rRNAのメチル化酵素RsmG（rRNA small subunit methyltransferase G）の変異であることが判明した<sup>22), 23)</sup>。この変異では、16S rRNAのストレプトマイシン結合部位でのメチル化が消失することによりストレプトマイシンとの親和性が低下するものと考えられている。S12及びRsmG変異は、いずれも放線菌の抗生物質生産の活性化に有効であることが明らかにされている<sup>21), 24)</sup>。

##### 4.1 枯草菌のバシリシン生産における効果

ストレプトマイシン耐性変異による枯草菌の物質生産における効果については、リボソームタンパク質S12変異の一部で僅かに認められたものの<sup>25)</sup>、芳しい成果は得られていなかった。実際、枯草菌の抗生物質生産能が向上した低レベルストレプトマイシン耐性変異株には、いずれの変異も生じていなかったのである。そこで、枯草菌において抗生物質生産能が向上した低レベルストレプトマイシン耐性変異株を用いてDNAマイクロアレイを利用したCGS（Comparative Genome Sequencing）法により変異を同定することとなった。予期していなかったことに、新たに同定された変異はS-アデノシルホモシステイン（SAH）／メチルチオアデノシン（MTA）ヌクレオシダーゼをコードする*mtmA* 遺伝子

における 11 bp の欠失変異であることが判明した<sup>26)</sup>。この酵素は S-アデノシルメチオニン (SAM) のリサイクル経路の酵素の一つであり (図 4), 同定した *mthA* 変異株では細胞内 SAM レベルが上昇し, バシリシン生合成遺伝子及びネオトレハロサジアミン生合成遺伝子の発現が増大していた。SAM 合成酵素遺伝子 *metK* を枯草菌内で過剰発現させても同様な効果が認められることから, 細胞内の SAM がこれら抗生物質生産の活性化に寄与していると思われる。放線菌においては SAM 合成酵素遺伝子 *metK* の過剰発現だけでなく, 培地への SAM 添加によっても抗生物質生産を誘導することが報告されている<sup>27)</sup>。しかしながら, 枯草菌においては SAM 添加による抗生物質生産の活性化は観察できなかった。これは SAM の取り込み能の差によるのかもしれない。なお, 同定した *mthA* 変異は枯草菌 *rsmG* 変異よりも低いストレプトマイシン耐性を付与するが, ストレプトマイシン耐性に至るメカニズムは不明である。

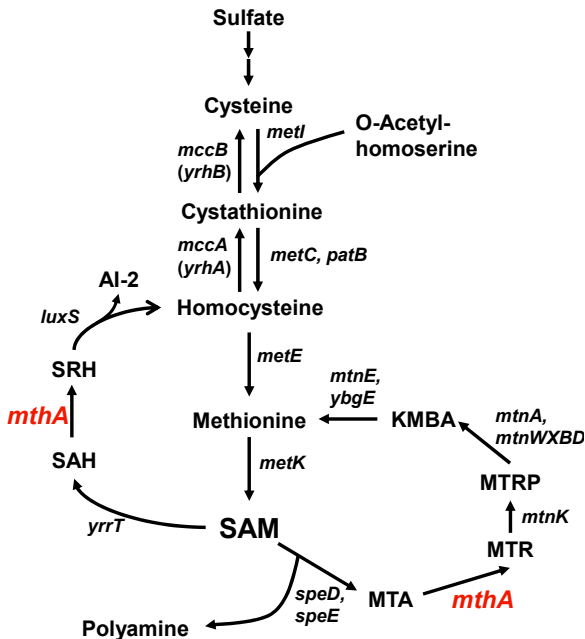


図 4 枯草菌の SAM リサイクリング経路

イタリック文字は各反応に関わる酵素をコードする遺伝子名を示している。SAM: S-アデノシルメチオニン, SAH: S-アデノシルホモシステイン, SRH: リボシルホモシステイン, MTA: メチルチオアデノシン, MTR: メチルチオリボース, MTRP: メチルチオリボース 1-リン酸, KMBA:  $\alpha$ -ケト- $\gamma$ -メチル-チオブチル酸, AI-2 はオートインデュースー 2 を示す。

## 5. 希土類元素スカンジウムの効果

希土類元素はスカンジウム及びイットリウムの2元素とランタンからルテチウムまでの15元素を合わせた17元素の総称である。これら元素は優れた物理化学的特性を持ち、微量で物質の性質を大きく変えることができることから、「産業のビタミン」と称される。地球上での希土類元素の存在量は決して少ないわけではなく、環境中で生物がこれら元素の影響を受けていても些かも不思議ではない。しかしながら、生物における希土類元素の効果については研究が進んでおらず、未だ不明な部分が多いのが実情である。河合らは希土類元素が微生物に与える影響について調査し、スカンジウムが放線菌の抗生物質生産能を向上させることを報告している<sup>28)</sup>。ここでは枯草菌における希土類元素の効果について紹介する。

### 5.1 スカンジウムの添加効果

希土類元素は弱い抗菌活性を有している。特にスカンジウムは、枯草菌に対して希土類元素の中では最も強い抗菌活性を示し、50  $\mu\text{g/mL}$  (193  $\mu\text{M}$ ) 以上の濃度では生育が阻害される。しかしながら、培地に非致死濃度のスカンジウムを添加することによりアミラーゼやプロテアーゼ、抗生物質の生産能が向上することがわかった(図5)<sup>29)</sup>。スカンジウムの添加効果は終濃度10~20  $\mu\text{g/mL}$  (38.5~77  $\mu\text{M}$ ) で最大であり、それ以上の濃度では生育阻害効果が大きく、これらの生産量は低下する。放線菌では他の希土類元素の添加でも抗生物質生産を活性

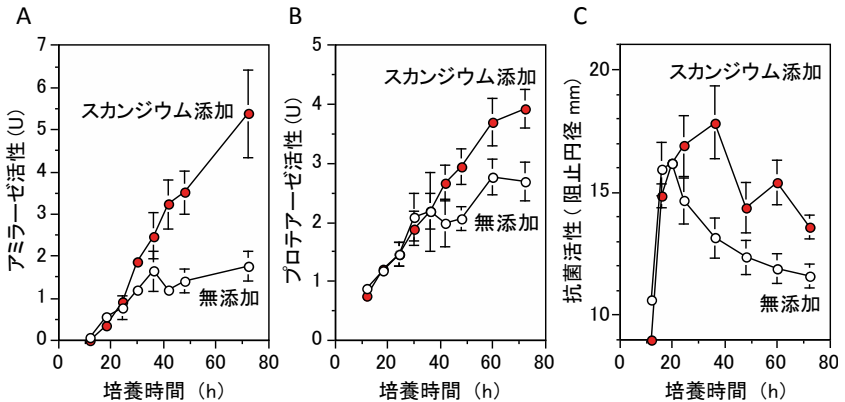


図5 枯草菌の物質生産におけるスカンジウムの添加効果

スカンジウムを10  $\mu\text{g/mL}$  の濃度で添加した培地と無添加の培地で枯草菌を培養し、培養上清におけるアミラーゼ活性(A)及びプロテアーゼ活性(B)、抗菌活性(C)を比較した。赤丸がスカンジウム添加、白丸が無添加時の活性を示す。

化することが報告されているが<sup>30)</sup>、枯草菌においては他の希土類元素に顕著な効果は認められない(図6)。通常、アミラーゼ遺伝子やバシリシン遺伝子の発現量は定常期初期に誘導され、定常期後期(培養開始24時間以降)には低下するが、スカンジウム存在下では、これら遺伝子の発現がより持続しており、物質生産の向上に繋がっていると考えられる。スカンジウムは他の希土類元素よりも、むしろ第1遷移金属元素とよく似た性質を示すことが知られており、枯草菌における効果はスカンジウム特有の現象であるかもしれない。

スカンジウムは高価であるため、研究室で使用される微生物用培地に添加することはほとんどない。近年、スカンジウムは照明や機能性素材などの分野で用途が拡大し、生産量も増えたことから価格は以前よりも下落している。また最近になって、スカンジウムを回収する技術も開発されており、価格がさらに下落することも予想される。今後、スカンジウムを多く含む土壌などから分離した微生物を研究室で培養する際には、スカンジウムの効果を検討する必要があるだろう。

## 5.2 スカンジウム耐性変異の同定

前述したように、スカンジウムは希土類元素の中では最も強い抗菌活性を有しており、その耐性変異株を取得することが可能である。筆者は、枯草菌のスカンジウム耐性変異株を取得し、CGS法により変異を同定することに成功した<sup>31)</sup>。この耐性変異はウンデカプレニル2リン酸(UPP)合成酵素に1アミノ酸置換

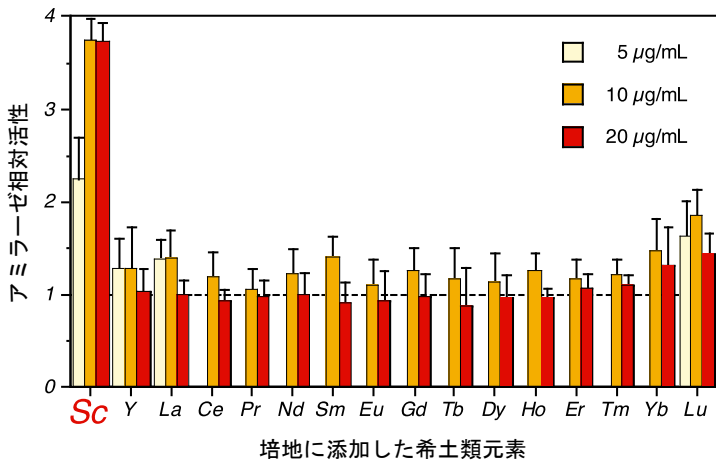


図6 枯草菌のアミラーゼ生産における希土類元素の添加効果

希土類元素を各濃度で添加した培地で枯草菌を48時間培養し、培養上清におけるアミラーゼ活性を比較した。無添加の時のアミラーゼ活性を1として各希土類元素の効果をアミラーゼ相対活性で示している。5 µg/mLの実験はScおよびY, La, Luのみ行なった。



をもたらす変異であった。UPPの脱リン酸化反応で生じるウンデカプレニルリン酸は細胞壁合成の際にグリコシル基を輸送する担体として働く必須分子である<sup>32)</sup>。細胞壁合成阻害剤であるバシトラシンはUPPに結合して、その脱リン酸化反応を阻害する抗生物質であるが<sup>33),34)</sup>、この変異株はバシトラシンに対しても耐性を示す<sup>31)</sup>。また、UPP合成酵素をコードする*uppS*遺伝子を強力なプロモーターにより過剰に発現させると、スカンジウムやバシトラシンに対して感受性を示すことから、UPPの蓄積がスカンジウム及びバシトラシンに対する感受性を決定する因子となっていると推察される。高橋らは細菌細胞表面のリン酸基に希土類元素が吸着することを報告している<sup>35)</sup>。UPPは細胞膜に局在しており、3価陽イオンであるスカンジウムが細胞表面にあるUPPのリン酸基と結合し、細胞壁合成を阻害している可能性がある。また、スカンジウムが細胞内に取り込まれているかどうかは未だ不明であり、今後の研究で明らかにする必要がある。もし、細胞内に取り込まれているのであれば、スカンジウムがDNAなどに直接作用する可能性もある。

### 5.3 スカンジウム耐性変異によるアミラーゼ生産の向上

前述したスカンジウム耐性変異株 (*uppS86*) はアミラーゼの生産量が約2倍に増大していた (図7)。一方、プロテアーゼや抗生物質の生産には影響は見られなかった。この変異株でのアミラーゼ遺伝子の発現量は野生株と同程度であ

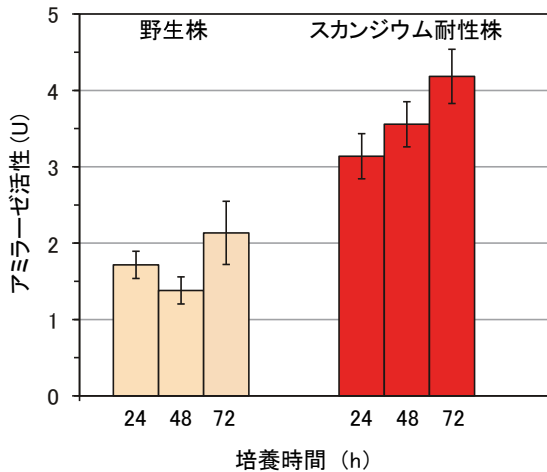


図7 枯草菌のアミラーゼ生産におけるスカンジウム耐性変異の効果

枯草菌野生株とスカンジウム耐性変異株 (*uppS86* 株) を培養し、各培養時間における培養上清中のアミラーゼ活性を測定した。

り、この変異が転写後段階でアミラーゼ生産を向上させていると考えられる。アミラーゼの分泌には細胞表面の電荷が影響するという報告もあり、細胞表面のUPP量が増加したことによってアミラーゼ分泌に影響を及ぼしているのかもしれない。このようにスカンジウム耐性変異によるアミラーゼ生産の向上メカニズムは、スカンジウム添加による効果とは明らかに異なっている。この変異の効果については更なる解析が必要である。

## 6. おわりに

本稿では、枯草菌において物質生産を向上させる手法を紹介した。これら手法の特徴は、薬剤の耐性変異に基づいていることにある。従来用いられてきた変異剤などによる突然変異誘発法とは異なり、薬剤耐性変異による活性化法では生物間で保存されている必須分子の変異を利用するため、様々な生物種に適用できるという大きな利点がある。リファンピシン耐性変異やストレプトマイシン耐性変異は既に様々な微生物において、その有用性が確認されている<sup>21), 24)</sup>。また、本稿では紹介しなかったが、これら薬剤の他にゲンタミシンやジェネティシン、パロモマイシン、リンコマイシン、フシジン酸、チオストレプトンなども放線菌の抗生物質生産を活性化することが示されている。さらに、これら薬剤耐性変異による活性化法のもう一つの利点は、通常の培養条件では発現しない“休眠”状態の遺伝子をも活性化しうることである<sup>9), 16)</sup>。本来、生産菌の生育には必要でない二次代謝産物の場合、培養条件によっては二次代謝産物を生産しないということも珍しいことではない。このような休眠状態の遺伝子を活性化する手法は新規化合物の探索において強力なツールとなるであろう。実際、保坂らはこの手法により、放線菌から新規抗生物質ピペリダマイシンの発見に至っている<sup>16)</sup>。

一方、スカンジウムについては、様々な生物種に対して未知の効果を発揮する可能性があるものの、現時点ではスカンジウム添加による発酵生産にはコスト面での問題がある。しかしながら、生物におけるスカンジウムの研究は始まったばかりである。今後、スカンジウムによる物質生産向上メカニズムが明らかになれば、同等もしくはそれ以上の効果を発揮する代替物質や変異等による別法の開発も不可能ではない。本研究を契機に、生物における希土類元素の影響に関する研究が活発化することを望む。

(食品バイオテクノロジー研究領域 生物機能解析ユニット 稲岡 隆史)

## 引用文献

- 1) Stein, T. (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* **56**: 845-857.
- 2) Inaoka, T., Takahashi, K., Kameyama, M.-O., Yoshida, M., and Ochi, K. (2003)

- Guanine nucleotides guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate and GTP cooperatively regulate the production of an antibiotic bacilysin in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **278**: 2169-2176.
- 3) Inaoka, T., Wang, G., and Ochi, K. (2009) ScoC regulates bacilysin production at the transcription level in *Bacillus subtilis*. *J Bacterio* **191**: 7367-7371.
  - 4) Chen, X. H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S., and Borriss, R. (2009) Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J Biotechnol* **140**: 38-44.
  - 5) Tabata, K., Ikeda, H., and Hashimoto, S. (2005) *ywfE* in *Bacillus subtilis* codes for a novel enzyme, L-amino acid ligase. *J Bacteriol* **187**: 5195-5202.
  - 6) Tsuda, T., Asami, M., Koguchi, Y., and Kojima, S. (2014) Single mutation alters the substrate specificity of L-amino acid ligase. *Biochem* **53**: 2650-2660.
  - 7) Garcia, L., Alonso-Sanz, M., Rebollo, M. J., Tercero, J. C., and Chaves, F. (2001) Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Spain and their rapid detection by PCR-enzyme linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* **39**: 1813-1818.
  - 8) Nicholson, W. L., and Maughan, H. (2002) The Spectrum of spontaneous rifampin resistance mutations in the *rpoB* gene of *Bacillus subtilis* 168 spores differs from that of vegetative cells and resembles that of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **184**: 4936-4940.
  - 9) Inaoka, T., Takahashi, K., Yada, H., Yoshida, M., and Ochi, K. (2004) RNA polymerase mutation activates the production of a dormant antibiotic 3, 3' -neotrehalosdiamine via an autoinduction mechanism in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **279**: 3885-3892.
  - 10) Kubo, Y., Inaoka, T., Hachiya, T., Miyake, M., Hase, S., Nakagawa, R., Hasegawa, H., Funane, K., Sakakibara, Y., and Kimura, K. (2013) Development of a rifampicin-resistant *Bacillus subtilis* strain for natto-fermentation showing enhanced exoenzyme production. *J Biosci Bioeng* **115**: 654-657.
  - 11) Andersen, J. T., and Jörgensen, S. T. (2003) Yield improvements of *Bacillus* strains by introduction of point mutations in the *rpoB* gene. *12<sup>th</sup> International Conference on Bacilli Abstract book*. P101.
  - 12) Hu, H., and Ochi, K. (2001) Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by inducing combined resistant mutations. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1885-1892.
  - 13) Hu, H., Zhang, Q., and Ochi, K. (2002) Activation of antibiotic biosynthesis by specified mutations in the *rpoB* gene (encoding the RNA polymerase

- $\beta$ -subunit) of *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **184**: 3984-3991.
- 14) Carata, E., Peano, C., Tredici, S. M., Ferrari, F., Tala, A., Corti, G., Bicciato, S., De Bellis, G., and Alifano, P. (2009) Phenotypes and gene expression profiles of *Saccharopolyspora erythraea* rifampicin-resistant (*rif*) mutants affected in erythromycin production. *Microb Cell Fact* **8**: 18-32.
  - 15) Fukuda, K., Tamura, T., Ito, H., Yamamoto, S., Ochi, K., and Inagaki, K. (2010) Production improvement of antifungal, antitrypanosomal nucleoside sinefungin by *rpoB* mutation and optimization of resting cell system of *Streptomyces incarnates* NRRL 8089. *J Biosci Bioeng* **109**: 459-465.
  - 16) Hosaka, T., Ohnishi-Kameyama, M., Muramatsu, H., Murakami, K., Tsurumi, Y., Kodani, S., Yoshida, M., Fujie, A., and Ochi, K. (2009) Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12. *Nat Biotechnol* **27**: 462-464.
  - 17) Tsuno, T., Ikeda, C., Numata, K., Tomita, K., Konishi, M., and Kawaguchi, H. (1986) 3,3'-Neotrehalosadiazine (BMY-28251), a new aminosugar antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* **39**: 1001-1003.
  - 18) Numata, K., Satoh, F., Hatori, M., Miyaki, T., and Kawaguchi, H. (1986) Isolation of 3,3'-neotrehalosadiazine (BMY-28251) from a butirosin-producing organism. *J Antibiot (Tokyo)* **39**: 1346-1348.
  - 19) Inaoka, T., and Ochi, K. (2007) Glucose uptake pathway-specific regulation of synthesis of neotrehalosadiazine, a novel autoinducer produced in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **189**: 65-75.
  - 20) Ozaki, M., Mizushima, S., and Nomura, M. (1969) Identification and functional characterization of the protein controlled by the streptomycin-resistant locus in *Escherichia coli*. *Nature* **222**: 333-339.
  - 21) Ochi, K., Okamoto, S., Tozawa, Y., Inaoka, T., Hosaka, T., Xu, J., and Kurosawa, K. (2004) Ribosome engineering and secondary metabolite production. *Adv Appl Microbiol* **56**: 155-184.
  - 22) Okamoto, S., Tamaru, A., Nakajima, C., Nishimura, K., Tanaka, Y., Tokuyama, S., Suzuki, Y., and Ochi, K. (2007) Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Mol Microbiol* **63**: 1096-1106.
  - 23) Nishimura, K., Johansen, S. K., Inaoka, T., Hosaka, T., Tokuyama, S., Tahara, Y., Okamoto, S., Kawamura, F., Douthwaite, S., and Ochi, K. (2007) Identification of the RsmG methyltransferase target as 16S rRNA nucleotide G527 and characterization of *Bacillus subtilis* *rsmG* mutants. *J Bacteriol* **189**: 6068-6073.
  - 24) Ochi, K., and Hosaka, T., (2013) New strategies for drug discovery: activation

- of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 87-98.
- 25) Kurosawa, K., Hosaka, T., Tamehiro, N., Inaoka, T., and Ochi, K. (2006) Improvement of  $\alpha$ -amylase production by modulation of ribosomal component protein S12 in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 71-77.
  - 26) Tojo, S., Kim, J. Y., Tanaka, Y., Inaoka, T., Hiraga, Y., and Ochi, K. (2014) The *mthA* mutation conferring low-level resistance to streptomycin enhances antibiotic production in *Bacillus subtilis* by increasing the S-adenosylmethionine pool size. *J Bacteriol* **196**: 1514-1524.
  - 27) Okamoto, S., Lezhava, A., Hosaka, T., Okamoto-Hosoya, Y., and Ochi, K. (2003) Enhanced expression of S-adenosylmethionine synthetase causes overproduction of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **185**: 601-609.
  - 28) Kawai, K., Wang, G., Okamoto, S., and Ochi, K. (2007) The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in *Streptomyces* spp. *FEMS Microbiol Lett* **274**: 311-315.
  - 29) Inaoka, T., and Ochi, K. (2011) Scandium stimulates the production of amylase and bacilysin in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **77**: 8181-8183.
  - 30) Ochi, K., Tanaka, Y., and Tojo, S. (2014) Activating the expression of bacterial cryptic genes by *rpoB* mutations in RNA polymerase or by rare earth elements. *J Ind Microbiol Biotechnol* **41**: 403-414.
  - 31) Inaoka, T., and Ochi, K. (2012) Undecaprenyl pyrophosphate involvement in susceptibility of *Bacillus subtilis* to rare earth elements. *J Bacteriol* **194**: 5632-5637.
  - 32) Bouhss, A., Trunkfield, A. E., Bugg, T. D., and Mengin-Lecreulx, D. (2008) The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 208-233.
  - 33) Stone, K. J., and Strominger, J. L. (1971) Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C55-isoprenyl pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 3223-3227.
  - 34) Storm, D. R., and Strominger, J. L. (1973) Complex formation between bacitracin peptides and isoprenyl pyrophosphates. The specificity of lipid-peptide interactions. *J Biol Chem* **248**: 3940-3945.
  - 35) Takahashi, Y., Yamamoto, M., Yamamoto, Y., and Tanaka, K. (2010) EXAFS study on the cause of enrichment of heavy REEs on bacterial cell surfaces. *Geochim Cosmochim Acta* **74**: 5443-5462.

## Ⅳ 納豆菌の発酵能力をアップグレード

### 1. はじめに

納豆菌 [*Bacillus subtilis* (natto)] は納豆製造および食品添加物としてのポリ- $\gamma$ -グルタミン酸（いわゆる納豆のネバネバ物質，以下  $\gamma$ PGA とする）生産に利用されている。最近，筆者らは異なる2つのアプローチから納豆菌の発酵能力増強に取り組んだ<sup>1)-3)</sup>。その目的は，種皮の硬い黒大豆など有色大豆を用いた納豆製造に適した種菌の開発と  $\gamma$ PGA の収量向上である。

市販されている納豆の多くは黄大豆納豆である。黄大豆と比して有色大豆は種皮が硬い。そのため，糸引きが充分で且つ柔らかい納豆に仕上げるには，大豆蒸煮圧を上げる又は蒸煮時間を長くするなどの工夫が必要である<sup>4),5)</sup>。しかし，蒸煮条件を厳しくすれば皮むけが生じやすく発酵ムラの原因となる。そこで，蒸煮条件は変えずに，納豆菌の菌体外分解酵素（プロテアーゼ，セルラーゼなど）生産能力を増強して種皮の酵素的分解を促進することを目論んだ。新たな納豆種菌を育種し<sup>1)</sup> ポリフェノール類を多く含むことから潜在需要が大きいと考えられた黒大豆を用いてその評価を行った<sup>3)</sup>。

$\gamma$ PGA の収量向上に関しては，分子遺伝学的な手法で研究を進めた。納豆菌は膜タンパク質複合体 PgsBCA によって ATP 分解を伴うグルタミン酸重合反応を行い，菌体外へ  $\gamma$ PGA を放出する<sup>6),7)</sup>。この PgsBCA による  $\gamma$ PGA 合成は細胞密度による制御（クォーラムセンシング，quorum sensing）を受ける<sup>8),9)</sup>。つまり，細胞密度の低い対数増殖期には PgsBCA は発現せず，増殖が定常期に達してからのみ発現する。著者らは，細胞密度情報を伝達する細胞内鍵因子の働きを明らかにした<sup>2)</sup>。その研究過程で，細胞密度情報伝達系に依存せずに  $\gamma$ PGA を合成できる変異株を得ることが出来た<sup>2)</sup>。この変異株では  $\gamma$ PGA と同様に細胞密度制御下にある菌体外分解酵素群の発現も亢進した。

### 2. 黒大豆発酵に適した納豆菌

#### (1) 納豆種菌の探索

やみくもに菌体外分解酵素活性が高い株を探しても，その株で納豆が作れる保証はない。何故ならば，煮豆成分の消化性を向上させる菌体外分解酵素生産は納豆発酵の必要条件の一つに過ぎないからである。分解酵素生産以外の必要条件として納豆の品質評価基準の一つでもある“被り”の形成が挙げられる。“被り”は発酵後に煮豆上に形成される白っぽい菌膜のことで，納豆菌が作る樹状構造をもつコロニー（菌の集団）（図1）に由来する。英語文献ではこの構造は fruiting body と呼ばれることもある。被りを形成しない株は納豆発酵適性がない。また， $\gamma$ PGA は菌体と一体となって存在するのが良く，例え量が多くても水飴状に垂

れるのは好ましくないとされる。納豆発酵適性は細胞の運動性とも密接に関係することも報告されている<sup>10)–13)</sup>。そこで、筆者らは納豆発酵適性株の系統的な特徴の解明、つまり納豆菌の分類上の位置づけを明確にすることから研究に着手し<sup>14)</sup>、その過程で納豆発酵適性を有する多くの *Bacillus subtilis* 株を稲わらから分離することに成功した。当初、得られた株の中から高い菌体外分解酵素活性を示すものを探した。しかし、現在使われている主要な納豆種菌（宮城野株）を上回る株はなかった。

## (2) *rpoB* 変異

環境中から種菌候補を探すことは諦め、別の方法を採用ことにした。文献調査をしたところ、*Bacillus subtilis* や近縁の *Bacillus licheniformis* において RNA ポリメラーゼ  $\beta$ -サブユニット遺伝子 *rpoB*（細菌の遺伝子名は *abcX* のように表記する）変異によるリファンピシン耐性獲得に伴って2次代謝産物やアミラーゼの生産量が向上する報告があった<sup>15)–18)</sup>。特に、*Bacillus subtilis* 実験室株 (*Bacillus subtilis* 168) のリファンピシン耐性に関する情報が大変参考になった<sup>17),18)</sup>。しかしながら、実験室株は  $\gamma$ PGA を生産しない株であり“被り”も形成しない。加えて、実験室株の菌体外分解酵素生産量は納豆菌より遙かに低いので、納豆製造には全く適さない。実験室株のリファンピシン耐性株はNTD (neotrehalosadiamine, 2次代謝産物でアミノ糖抗生物質の一種) の生産量を増大させるが、プロテアーゼ生産は影響を受けなかった。そのため、実験室株の知見をそのまま納豆菌に当てはめることが出来るか不明であった。この点、納豆菌のゲノム情報が公開されたこと<sup>19)</sup>により実験室株との比較検討が遺伝子レベルで可能になったことが研究推進の一助となった。例えば、NTD 合成オペロンが

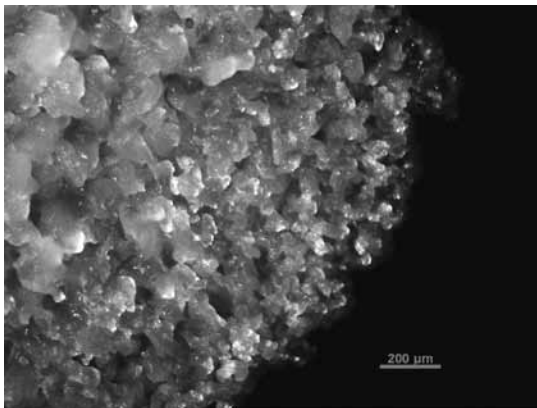


図1. 納豆菌が作る樹状構造をもつコロニー形態 (fruiting body)

撮影協力：今場司朗博士

納豆菌にも存在することが容易に判断できたので、リファンピシン耐性獲得の影響評価を行うことができたのである。菌体外分解酵素生産に関しては、実験室株では細胞密度情報伝達に必要な *degQ* 遺伝子（後述）の発現調節領域内一塩基変異が原因でそもそも非常に低いレベルに発現量が抑えられていること<sup>20), 21)</sup> や、主要なプロテアーゼ遺伝子が実験室株と納豆菌の間で保存されていることなどが既に明らかであった。

上述の新たに稲わらから採取した納豆発酵適性株をリファンピシン含有寒天培地に塗布すると、自然変異による耐性株がいくつか得られた。次世代シーケンサーで全ゲノム塩基配列を比較し変異箇所を *rpoB* 遺伝子内に同定した。リファンピシン耐性を獲得した株はすべて *rpoB* に変異があったが、その中で同時に菌体外分解酵素生産が増えたものは *rpoB* 遺伝子の 1460 番目の C が T に置換した変異株 (*rpoB5* 変異株) だけだった。他の耐性変異 (1406A → G, 1444C → T) では菌体外分解酵素生産への影響はなかった<sup>1)</sup>。

### (3) *rpoB5* 変異と遺伝子発現制御

*rpoB5* 変異株の菌体外分解酵素活性を表 1 に示した。プロテアーゼ活性の上昇が顕著で約 3.5 倍となった。セルラーゼ (Azo-CMC 分解酵素) や  $\gamma$ -グルタミルペプチダーゼ活性も有意に上昇し、実験室株同様 NTD の生産も増えた。一方、納豆の粘性に関わる多糖であるレバンの合成酵素 (levansucrase) 活性は逆に低下して検出限界以下となった (表 1)。

*rpoB5* 変異が遺伝子発現へ及ぼす影響は実験室株を用いて詳細に研究され、2 つの作用機作 (メカニズム) が提唱されている<sup>18)</sup>。1 つは RNA ポリメラーゼと結合して DNA 配列認識を司る  $\sigma$  因子 A を介した転写の促進であり、もう一つは、転写終結シグナルの認識強化による転写終結シグナルのリードスルー (読み飛ばし) 減少である。NTD 生産が増えたことから、納豆菌細胞内においても *rpoB5* 変異は実験室株と同様の作用機作で遺伝子発現に影響していると考えられた。実験室株ではレバン合成酵素の発現が見られなかったため両菌株を直接比較することはできないが、レバン合成酵素の発現量低下は転写終結シグナル認識

表 1 *rpoB5* 変異株 (Miyagi-4100) とその親株 (Miyagi-4) の菌体外分解酵素と NTD の生産

菌株名	プロテアーゼ (U/ml)	セルラーゼ (U/ml)	$\gamma$ -グルタミルペプチダーゼ (mU/ml)	レバンシュークララーゼ (mU/ml)	NTD ( $\mu$ g/ml)
<i>B. subtilis</i> Miyagi-4	22.2	0.14	0.7	73	<5
<i>B. subtilis</i> Miyagi-4100	78.0	0.21	1.9	<2	40

文献 1 の表 1 を改変。



強化から合理的な説明が可能であった（図2）。すなわち、レバン合成酵素遺伝子（*sacB*）の転写開始点と翻訳領域（ORF）の間に転写終結シグナルが存在する。*sacB*はシヨ糖で発現誘導される遺伝子である。シヨ糖存在下では転写終結シグナルのすぐ隣にあるアンチターミネーション配列にSacYタンパク質（遺伝子*abcX*がコードするタンパク質はAbcXと表記する）が結合することによってmRNAの構造が変化し、転写終結シグナルのリードスルーが促進される<sup>22)</sup>。おそらく、*rpoB5*変異を有するRNAポリメラーゼの転写終結シグナル認識が強いためSacYが存在してもリードスルーが起こらないのであろう。

#### (4) 黒大豆納豆の試作と評価

実際に納豆を試作してみた<sup>3)</sup>。

原料大豆として黒大豆（品種名：黒大豆小粒）を用いた。スターター株として、*rpoB5*変異を有する納豆菌Miyagi-4100株とその親株（Miyagi-4）、比較検討のため現在広く使用されている宮城野株の3株を用いた。

独立に3回試作を行い（ $n = 3$ ）出来た納豆について硬さ試験などの評価を行った（表2, 3）。Miyagi-4100株ではレバン合成酵素活性が検出限界以下まで低下していたので、レバン量にも着目して納豆の評価を行った。その結果、親株および宮城野株と比べ、Miyagi-4100株で作った黒大豆納豆では有意に $\gamma$ PGAが増え、発酵状態が改善されたことがわかった。意外なことにレバン量はMiyagi-4100株で顕著に増大した（表2）。納豆切断用のアダプターとピークホールD型の重量計を用いて硬さ試験を行ったところ、P値はやや高かったもののMiyagi-4100株でより柔らかく仕上がる傾向があった（切断強度が約8グラム低下）（表3）。柔らかさについては官能検査でも良い成績が得られている（久保ら、未発表データ）。

予想に反してレバン量が増えた理由は定かでない。レバン合成酵素活性は液体培地にシヨ糖（1% w/v）を添加し発現誘導される条件で測定した。大豆にはシヨ

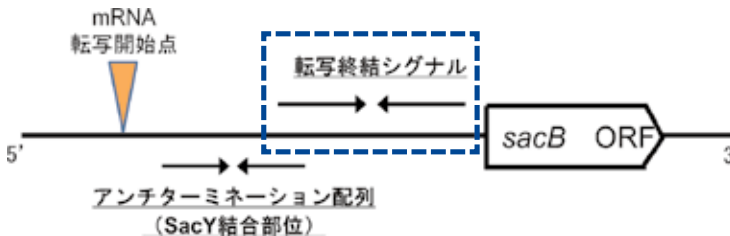


図2. レバンシュクララーゼ遺伝子の発現制御（模式図）

レバンシュクララーゼ遺伝子（*sacB*）とその上流の発現調節領域を模式的に表した。矢印は逆向き反復配列を示す。*sacB* ORFは*sacB*遺伝子の翻訳領域を示す。

表2 黒大豆納豆のレバンと $\gamma$  PGAの含量

使用種菌名	成分量(mg/g 納豆)		
	レバン	$\gamma$ PGA	全糖量
Miyagino	0.73 ± 0.02 <sup>A</sup>	13.33 ± 0.04 <sup>A</sup>	1.65 ± 0.04 <sup>A</sup>
Miyagi-4	0.53 ± 0.03 <sup>A</sup>	13.08 ± 0.02 <sup>A</sup>	1.37 ± 0.02 <sup>A</sup>
Miyagi-4100	4.52 ± 0.16 <sup>B</sup>	16.16 ± 0.42 <sup>B</sup>	6.60 ± 0.42 <sup>B</sup>

含量の数値は平均値 ± 標準偏差 (n=3).

各列数値の上付き文字の違いは、Tukey-Kramer 法により有意に (P<0.05) 異なることを示す。

文献3の表1を改変。

表3 黒大豆納豆の硬さ試験

試料名	使用菌株	切断強度 (g)	P 値
黒大豆煮豆		225.7 ± 12.5	
黒大豆納豆	(Miyagino)	163.3 ± 12.9	] 0.236
黒大豆納豆	(Miyagi-4100)	155.8 ± 11.9	

サンプルの納豆については、括弧内に使用した納豆菌を示した。

納豆 50 粒を測定し、中間 30 粒分のデータを用いて算出した。

文献3の表2を改変。

糖が約5% (乾物重量当たり) 含まれる。納豆発酵過程で *sacB* 遺伝子発現が誘導され得るか調べていないが、少なくとも Miyagi-4100 株では誘導なしの基礎的レベルの合成酵素発現量でレバンが生産されたと考えられる。納豆菌は SacC (エキソ型レバンナーゼ) と LevB (エンド型レバンナーゼ) の2つのレバン分解酵素を菌体外に生産することがゲノム情報から予想される。*rpoB5* 変異によって分解系が抑制されたためにレバンが蓄積したのかも知れない。あるいは、液体培地で得られた実験結果をそのまま納豆に当てはめられない可能性も考えられた。煮豆上でコロニーを形成しながら生育する納豆菌と液体培地中の納豆菌では違った遺伝子発現制御があるのかも知れない。尚、レバンにはプレバイオティクスとしての機能性報告がある<sup>23),24)</sup>。本株を利用した黒大豆納豆の生産が2013年末に始まった。

### 3. 細胞密度応答制御系の改変と $\gamma$ PGA生産

#### (1) 納豆菌の $\gamma$ PGA合成制御機構

発酵法による $\gamma$  PGAの工業生産はすでに数社が行っている。発酵生産プロセスにはいくつかの重要点 (シード培養, 培地組成, 連続培養, 通気, 培養液の粘性制御, 生産物の回収・精製, 残存孢子除去など) があるが, 納豆菌自身の $\gamma$

PGA 生産性が収量に最も影響するであろう。筆者らは変異株による  $\gamma$  PGA 高生産を目指し、納豆菌の  $\gamma$  PGA 合成制御機構、特に細胞密度応答による制御について研究を進めてきた<sup>8), 9), 25)</sup>。

納豆菌自身が菌体外へ分泌する低分子ペプチド ComX の濃度を指標とした細胞密度情報はその受容体膜タンパク質である ComP-ComA 二成分制御系を介して細胞内へ伝達される (図3)。*degQ* 遺伝子は細胞密度情報の直接の受け手である ComP-ComA 二成分制御系依存的に発現誘導される。つまり、細胞内で細胞密度情報の2次的伝達 (あるいは増幅) の役割を担う。DegQ は  $\gamma$  PGA 生産に必須であるだけでなくプロテアーゼなどの菌体外分解酵素生産や鞭毛の形成にも必要で、尚且つ細胞のコンピテンス (competence, 細胞増殖の定常期において外部から DNA を取り込んで形質転換する能力) を負に制御する働きが知られている<sup>2), 13), 20), 21), 26)</sup>。つまり、DegQ は細胞表層にある ComP が感知した細胞密度情報の伝達を担う定常期の細胞生理を多面的に制御する鍵因子なのである。

$\gamma$  PGA 合成は PgsBCA 膜タンパク質複合体が担う (遺伝子 *abcX*, *abcY*, *abcZ* がオペロンを構成する場合は *abcXYZ* と表記する)。*pgsBCA* 遺伝子上流の遺伝子間領域は約 700 bp あり、細菌の遺伝子間領域としては非常に長い。*pgsBCA* 遺伝子の発現調節にはこの 700 bp のほぼ全長が必要で<sup>8)</sup> その中に DNA 結合タンパク質の一つである DegU の結合部位が含まれる<sup>27)</sup>。 $\gamma$  PGA 合成遺伝子 *pgsBCA* の転写を直接制御するのがこの DegU である<sup>27)</sup>。DegU は細胞内でリン酸化された状態あるいは脱リン酸化された状態で存在し、リン酸化の有無に

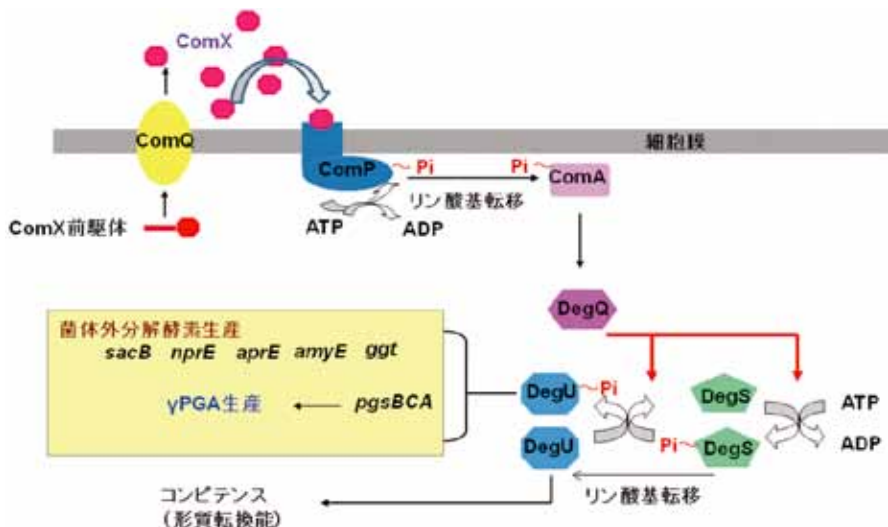


図3.  $\gamma$  PGA 生産を制御する細胞密度情報の伝達経路 (模式図)

よって結合できる DNA 配列が異なる性質を持つ。言い換えれば、DegU のリン酸化状態によって発現する遺伝子が変わるのである<sup>28)</sup>。筆者らは、*degQ* 遺伝子破壊株を用いた遺伝学的な実験および精製したタンパク質を用いた *in vitro* のリン酸基転移実験によって、DegQ による細胞密度情報伝達と DegU リン酸化の関係の詳細を明らかにした<sup>2)</sup>。

## (2) *degQ* 遺伝子破壊株を用いた遺伝学的な実験 — *degQ* 遺伝子破壊株の表現型—

DegQ はアミノ酸 46 個からなるとても小さなタンパク質である。*degQ* 遺伝子を破壊すると細胞密度情報伝達が滞り、その結果、 $\gamma$ PGA は生産されなくなる (図 3)。 $\gamma$ PGA 生産の他にもプロテアーゼなど定常的に誘導される菌体外分解酵素の生産量も激減する (表 4)。一方、コンピテンス (形質転換能) は逆の影響を受け、*degQ* 遺伝子破壊によって向上する (表 4)。ComP-ComA 二成分制御系の名称 Com がコンピテンス (*competence*) に由来することが示すように、元々、外部から DNA を自己ゲノムに取り込んで形質転換する現象の解析から *Bacillus subtilis* の細胞密度応答機構は見つかった。納豆菌のコンピテンスは実験室株に比べてかなり低いのであるが、*degQ* 遺伝子を破壊すると改善される (表 4)。実験室株には *degQ* 遺伝子の転写開始点から約 10 塩基上流に一塩基変異 (T → C) がある。この変異によって実験室株では *degQ* 遺伝子の発現量が約 50 分の 1 に低下している<sup>21)</sup>。そのため、実験室株のコンピテンスは高いのである (逆に言えば、形質転換実験し易い株が実験室株として選ばれたことになる)。納豆菌の場合、*degQ* 遺伝子破壊株であっても実験室株と比べればまだコンピテンスは低い。納豆菌の形質転換効率の低さ (実験室株の高さ) は *degQ* 遺伝子の発現量の違いに加え、その他の遺伝的多型 (例えば *comS* 遺伝子の多型<sup>29)</sup> など) との相乗効果の結果であると考えられる。

表 4 *degQ* 破壊株とその抑制変異株の  $\gamma$ PGA 生産、菌体外分解酵素生産およびコンピテンス

菌株名	GGT*	アミラーゼ	アルカリ プロテアーゼ	$\gamma$ PGA	レバン シュークラーゼ (形質転換能)	コンピテンス ( $\times 10^6$ )
	(mU/ml)	(U/ml)	(U/ml)	(mg/ml)	(mU/ml)	
BS168 実験室株	<0.01	2400	8.2	<0.01	<2	1218
NAFM5 納豆菌 (野生型)	0.5	218.0	50.2	11.2	173.1	11
NAFM73 <i>degQ</i> 遺伝子破壊株	0.1	<10	3.0	<0.01	4.9	116
NAFM735 グループ I 抑制変異株	2.0	2696.2	60.4	14.0	324.7	27
NAFM736 グループ II 抑制変異株	0.2	<10	14.8	0.7	111.9	135

\*  $\gamma$ -グルタミルペプチダーゼ  
文献 2 の表 2 を改変。

### (3) *degQ* 遺伝子破壊株を用いた遺伝学的な実験 — *degQ* 遺伝子破壊の抑制変異—

筆者らは *degQ* 遺伝子破壊の抑制変異（サプレッサー変異, suppressor mutation）をスクリーニングし、細胞密度応答の制御を受けない  $\gamma$ PGA 生産が可能となる変異株の育種を行った<sup>2)</sup>。この研究では、抑制変異箇所の同定・解析を通じて細胞密度情報伝達に関わる新たな因子が見つかる可能性にも期待できた。具体的には、*degQ* 遺伝子破壊株を変異原処理し  $\gamma$ PGA 生産が回復した株を寒天培地上のコロニーを1つ1つ目視で観察して探す、という地道な作業を行った。 $\gamma$ PGA 生産が回復したと思われる表面が盛り上がったコロニーを爪楊枝でつついて粘性物質生産を確認し、最終的には液体培地で培養してHPLC法、電気泳動法等で  $\gamma$ PGA 生産量を求めた。観察した約4万のコロニー中、9つに  $\gamma$ PGA 生産を認めた。

この9株についてより詳細な分析を行ったところ、9株はその表現型から2つのグループに分かれた。即ち、グループI抑制変異株（6株）では  $\gamma$ PGA 生産が野生型並に回復しておりコンピテンスも野生型並に戻ったのに対し、グループII（3株）では  $\gamma$ PGA 生産の回復は部分的でコンピテンスは変化せずに野生型よりも高いままであった（表4）<sup>2)</sup>。詳細は省略するが、グループI変異は連鎖解析が可能であったので変異箇所を同定することができた。グループI変異は全て *degS* 遺伝子内にあった（図4）。*DegS* と *DegU* は二成分制御系を構成し、*DegS* タンパク質によって *DegU* タンパク質がリン酸化される（図3）（正確に言うと、*DegS* は189番目のヒスチジン残基を自己リン酸化し、次いでそのリン酸基を *DegU* に転移する）。6つのグループI変異は、*DegS* 内の異なるアミノ酸変異：M195I（アミノ酸残基195番目のメチオニンがイソロイシンに変わった変異）、R208Q（208番目のアルギニン→グルタミン）、P245S（245番目のプロリン→セリン）、L248F（248番目のロイシン→フェニルアラニン）、D249G（249番目のアスパラギン酸→グリシン）、およびD250N（250番目のアスパラギン酸→アスパラギン）であった。これらは全て *DegS* の自己リン酸化部位とその周辺

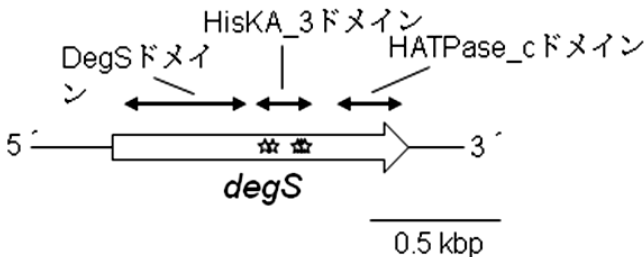


図4. *DegS* 変異箇所の模式図

星印は6つのグループI抑制変異箇所を示す。

のアミノ酸配列からなる HisKA\_3 ドメイン内にあった (図4)。グループ II 変異に関しては、納豆菌で遺伝的マーカーが整備されていないこともあり連鎖解析による変異箇所同定に苦慮した。しかし、ようやく最近になって、変異株の全ゲノム配列を解読することにより原因変異を推定できた (木村ら, 未発表データ)。次世代シーケンサーの解析コストが低下し、食品微生物分野でも利用できるようになったのである。

#### (4) 精製したタンパク質を用いた *in vitro* でのリン酸基転移実験 – DegQ による DegS- DegU 二成分制御系のリン酸化制御 –

次にアイソトープ ( $^{32}\text{P}$ ) 標識した ATP を基質とした *in vitro* でのリン酸基転移実験に取り組むことにした。Kobayashi の先行研究<sup>28)</sup>で、DegS から DegU へのリン酸基転移反応が DegQ 存在下で促進されることが報告されていた。そこで、変異型の DegS を精製して DegQ, DegS, DegU の 3 者共存下でのリン酸化反応を確かめることにした。しかし、ここで問題が生じた。*in vitro* 実験に必要な DegS を大腸菌細胞内で発現すると、その全てが不溶性画分 (インクルージョンボディ) に回収されたのである。不溶性のままではタンパク質は適正な立体構造を失っているため実験に使うことはできない。Kobayashi の先行研究では、不溶性画分を界面活性剤で溶解し、その後徐々に界面活性剤を除去して適正な構造を回復させた (リホルディングさせた) DegS が使われた。リホルディング法では全ての分子の立体構造が適正に回復しているわけではなく、タンパク質分子は <不溶性⇄中間構造体⇄適正構造> の間で平衡状態にある。そのため、複数の変異体タンパク質と元の野生型タンパク質との比較検討にはリホルディング化効率は勿論のこと、残存する不溶性や中間構造状態にある分子種の影響を見極める必要がある (との、厳しい指摘を論文査読レフェリーから受けた)。そこで、様々な手法 (低温発現, 分子シャペロンとの共発現, 枯草菌細胞内での発現, 融合タンパク質として発現, DegS と DegU の共発現…… $\times$   $\times$ ) を試したが、なかなか上手くいかなかった。研究を登山に例えれば、正に胸突き八丁の上り坂にさしかかったのである。この間、“ネガティブではあるが重要なデータ” を粘り強く出していただいた共同研究先の修士課程院生に感謝いたします。幸い努力は報われた。可溶性 DegS の発現に成功し、いよいよ変異体 DegS の解析を行う段になって院生は希望企業へ就職。その後のアイソトープ実験は私自身で行った。数週間夜遅くまで、時には夢の中でも実験した。

*in vitro* でのリン酸基転移実験結果をまとめると、DegQ は DegS と DegS-Pi (自己リン酸化した DegS) 間の平衡を右側に保つ機能を持つこと、および DegQ と DegS-DegU 二成分制御系の 3 者会合状態で DegU-Pi が安定的に存在できることが明らかとなった<sup>2)</sup>。加えて、DegQ 非存在下であっても、抑制変異を持つ DegS があたかも DegQ が存在するかの様に振る舞う (リン酸化を促進し、脱リ

ン酸化を抑える)ことがわかった(図5)<sup>2)</sup>。おそらく変異アミノ酸残基は DegS と DegQ との会合部位に位置し, DegQ と同様な影響をもたらすのであろう。これらはリホールディング法ではわからなかった新規な知見であったので, 研究論文は海外の有力研究者にも引用されている<sup>11), 12)</sup>。

DegU の *pgsBCA* 遺伝子上流の発現調節領域への結合にそのリン酸化が必須であることは Ogura らの研究<sup>27)</sup> で明らかであり, ComP から始まる  $\gamma$ PGA 生産制御に関わる一連のリン酸化反応リレーは終点へ到達した。DegS 変異株は活発に  $\gamma$ PGA を生産する。次の課題は, 変異株を用いた  $\gamma$ PGA 生産のスケールアップである。

#### 4. おわりに

納豆発酵適性株の系統解析では, 多数の異なる納豆発酵菌を得ることができた。これらは遺伝資源として貴重である。バクテリオファージ耐性や香気成分の改良等の課題に取り組むための研究材料となるであろう。また, 得られた多くの納豆発酵菌をまとめてゲノム解析することによって, 納豆発酵とピオチン要求性や運動性との関連性<sup>10)-12), 14)</sup> をより明確に議論できるようになる可能性もある。

全く触れなかったが,  $\gamma$ PGA の生産コストには生産物の回収・精製過程の寄与が大きく, 克服すべき課題として残されている。グループ II 抑制変異の研究を通じた更なる納豆菌アップグレードが生産性向上に繋がると考え, 現在研究を鋭意進めている。

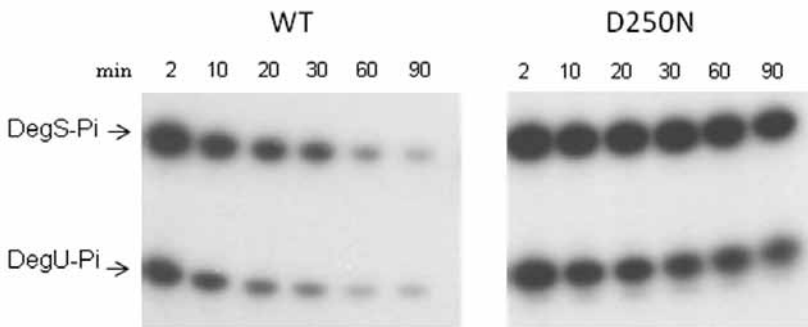


図 5. DegS から DegU への <sup>32</sup>P で標識したリン酸基の転移反応  
(文献 2 の図 4 を改変)

DegS タンパク質を [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP を用いて自己リン酸化した後に DegU と大過剰の非標識 ATP を加え, 経時的にサンプリングしてポリアクリルアミド電気泳動に供した。野生型 DegS (左, WT) と比べ抑制変異を持つ DegS (右, D250N) では脱リン酸化反応が遅くなり, リン酸化した状態で安定化している。

## 謝辞

納豆発酵適性株の系統解析および黒大豆用納豆菌の開発に関する研究は、茨城県工業技術センターとの共同研究であり、久保雄司博士がその多くに貢献しました。USDA の Rooney 博士には MLST 系統解析を手伝って頂きました。東北大学の金子淳先生、阿部直樹先生、大学院生の鈴木由貴さんには可溶性 DegS タンパク質の発現でご支援を頂きました。舟根和美ユニット長と斉藤勝一主任研究員から糖分析に関する多くのご助言を頂きました。発酵細菌ユニットの皆様のご協力・ご支援に感謝いたします。

(応用微生物研究領域 発酵細菌ユニット 木村 啓太郎)

## 引用文献

- 1) Kubo Y, Inaoka T, Hachiya T, Miyake M, Hase S, Nakagawa R, Hasegawa H, Funane K, Sakakibara Y, Kimura K. 2013. Development of a rifampicin-resistant *Bacillus subtilis* strain for natto-fermentation showing enhanced exoenzyme production. *J. Biosci. Bioeng.* **115**: 654-657.
- 2) Do T-H, Suzuki Y, Abe N, Kaneko J, Itoh Y, Kimura K. 2011. Mutations suppressing the loss of DegQ function in *Bacillus subtilis* (natto) poly-glutamate synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 8249-8258.
- 3) 久保雄司, 斉藤勝一, ダニエル ホルヴェック, 舟根和美, 中川力夫, 木村啓太郎. 菌体外分解酵素が増強された納豆菌 *rpoB* 変異株による黒大豆納豆の製造. *日本食品科学工学会誌* **60**: 557-581.
- 4) Hu Y, Ge C, Yuan W, Zhu R, Zhang W, Du L, Xue J. 2010. Characterization of fermented black soybean natto inoculated with *Bacillus natto* during fermentation. *J. Sci. Food Agric.* **90**: 1194-1202.
- 5) Juan M-Y, Wu C-H, Chou C-C. 2010. Fermentation with *Bacillus* spp. as a bioprocess to enhance anthocyanin content, the angiotensin converting enzyme inhibitory effect, and the reducing activity of black soybeans. *Food Microbiol.* **27**: 918-923.
- 6) Ashiuchi M, Misono H. 2002. Biochemistry and molecular genetics of poly-gamma-glutamate synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 9-14.
- 7) Candela T, Fouet A. 2006. Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Mol. Microbiol.* **60**: 1091-1098.
- 8) Kimura K, Tran L-SP, Do T-H, Itoh Y. 2009. Expression of the *pgsB* encoding the poly-gamma-DL-glutamate synthetase of *Bacillus subtilis* (natto). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**: 1149-1155.
- 9) Tran L-SP, Nagai T, Itoh Y. 2000. Divergent structure of the ComQXPA



- quorum-sensing components: molecular basis of strain-specific communication mechanism in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **37**: 1159-1171.
- 10) Kimura K, Tran L-SP, Funane K. 2011. Loss of poly-gamma-glutamic acid synthesis of *Bacillus subtilis* (*natto*) Due to IS*ABsu1* translocation to *swrA* gene. *Food Sci. Technol. Res.* **17**: 447-451.
  - 11) Chan JM, Guttenplan SB, Kearns DB. 2014. Defects in the flagellar motor increase synthesis of poly- $\gamma$ -Glutamate in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **196**: 740-753.
  - 12) Cairns LS, Marlow VL, Bissett E, Ostrowski A, Stanley-Wall NR. 2013. A mechanical signal transmitted by the flagellum controls signalling in *Bacillus subtilis*: Flagella-mediated signal transduction. *Mol. Microbiol.* **90**: 6-21.
  - 13) Stanley NR, Lazazzera BA. 2005. Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly-gamma-dl-glutamic acid production and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **57**: 1143-1158.
  - 14) Kubo Y, Rooney AP, Tsukakoshi Y, Nakagawa R, Hasegawa H, Kimura K. 2011. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* strains applicable to Natto (Fermented Soybean) production. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 6463-6469.
  - 15) Adrio JL, Demain AL. 2006. Genetic improvement of processes yielding microbial products. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**: 187-214.
  - 16) Inaoka T, Ochi K. 2011. Activation of dormant secondary metabolism neotrehalosadiamine synthesis by an RNA polymerase mutation in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**: 618-623.
  - 17) Inaoka T, Takahashi K, Yada H, Yoshida M, Ochi K. 2004. RNA polymerase mutation activates the production of a dormant antibiotic 3,3'-Neotrehalpsadiamine via an autoinduction mechanism in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **278**: 3885-3892.
  - 18) Inaoka T and Ochi K. 2007. Glucose uptake pathway-specific regulation of synthesis of Neotrehalosadiamine, a novel autoinducer production in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **189**: 65-75.
  - 19) Nishito Y, Osana Y, Hachiya T, Pependorf K, Toyoda A, Fujiyama A, Itaya M, Sakakibara Y. 2010. Whole genome assembly of a natto production strain *Bacillus subtilis* natto from very short read data. *BMC Genomics* **11**: 243.
  - 20) Msadek T, Kunst F, Henner D, Klier A, Rapoport G, Dedonder R. 1990. Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis*: expression of the regulatory genes and analysis of mutations in *degS* and *degU*. *J. Bacteriol.* **172**: 824-834.
  - 21) Msadek T, Kunst F, Klier A, Rapoport G. 1991. DegS-DegU and ComP-ComA

- modulator-effector pairs control expression of the *Bacillus subtilis* pleiotropic regulatory gene *degQ*. J. Bacteriol. **173**: 2366-2377.
- 22) Shimotsu H and Henner DJ. 1986. Modulation of *Bacillus subtilis* levansucrase gene expression by sucrose and regulation of the steady-state mRNA level by *sacU* and *sacQ* genes. J. Bacteriol. **168**: 380-388.
  - 23) Yamamoto Y, Takahashi Y, Kawano M, Iizuka M, Matsumoto T, Saeki S, Yamaguchi H. 1999. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. J. Nutr. Biochem. **10**: 13-18.
  - 24) Marx SP, Winkler S, Hartmeier W. 2000. Metabolization of beta-(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. FEMS Microbiol. Lett. **182**: 163-169.
  - 25) Nagai T, Tran L-SP, Inatsu Y, Itoh Y. 2000. A new IS4 family insertion sequence, *IS4Bsu1*, responsible for genetic instability of poly-gamma-glutamic acid production in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **182**: 2387-2392.
  - 26) Murray EJ, Kiley TB, Stanley-Wall NR. 2009. A pivotal role for the response regulator DegU in controlling multicellular behaviour. Microbiology **155**: 1-8.
  - 27) Ohsawa T, Tsukahara K, Ogura M. 2009. *Bacillus subtilis* response regulator DegU is a direct activator of *pgsB* transcription involved in gamma-polyglutamic acid synthesis. Biosci. Biotechnol. Biochem. **73**: 2096-2102.
  - 28) Kobayashi K. 2007. Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **66**: 395-409.
  - 29) Ashikaga S, Nanamiya H, Ohashi Y, Kawamura F. 2000. Natural genetic competence in *Bacillus subtilis* natto OK2. J. Bacteriol. **182**: 2411-2415.

## V 麹菌のゲノム解析とポストゲノム手法を用いた醸造技術への応用

### 1. はじめに

近年、我が国の伝統的発酵食品が海外に注目され、輸出が増加傾向にある。さらに、2013年末、和食が「日本人の伝統的な食文化」としてユネスコ無形文化遺産に登録された。和食の世界的な認知により、味噌等の伝統的発酵食品の国際的な需要が高まると期待される。また、和食とこれに伴う文化を今後も継承し、その情報を世界に発信する際、日本独自の伝統的発酵食品は極めて重要な位置を占める。和食の献立を考えるとときに欠かせない味噌、醤油、みりん、食酢等の調味料、また清酒等の酒類は、麹菌等の醸造微生物を使って製造される。そのため、これら有用微生物の生物学的特性あるいはその醸造における働きを科学的に解明しておくことはたいへん重要である。

麹菌は糸状菌（カビ）の仲間であるが、特定の糸状菌を指すのではなく、我が国の醸造食品に使用される実用糸状菌全般を意味している。味噌の他、清酒、醤油、みりん等、我が国の伝統的発酵食品の醸造に使用されており（表1）、日本醸造学会により我が国の「国菌」と認定されている。この麹菌の一種 *Aspergillus oryzae*（以降、本稿では *A. oryzae* を便宜的に麹菌と呼ぶ）は、工業用酵素の生産菌としても利用され、植物由来のデンプンを分解するアミラーゼやタンパク質を分解するプロテアーゼ等の細胞外分泌酵素の生産性が高いことが知られている。またこの高い酵素生産性と毒性物質を生産しないことが、発酵食品の醸造に麹菌が利用されるようになった理由ではないかと考えられる。そこで、本稿では発酵食品のおいしさに関わる麹菌とこの菌が生産する酵素の解明研究について、麹菌のゲノム解析とその情報を利用したポストゲノム研究の進展を交えて解説するとともに、発酵食品の旨味生成に関わると考えられる新しい麹菌酵素について紹介したい。

表1 各種醸造食品製造に使用される麹菌の種類

醸造食品	生物種
清酒	<i>Aspergillus oryzae</i>
味噌	<i>Aspergillus oryzae</i>
醤油	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus sojae</i>
甘酒	<i>Aspergillus oryzae</i>
味醂	<i>Aspergillus oryzae</i>
焼酎	<i>Aspergillus kawachii</i> , <i>Aspergillus awamori</i>

## 2. 麹菌酵素とゲノム解析

麹菌は多様な分泌酵素を生産するが、とりわけタンパク質分解酵素は発酵食品の特徴的な味である「旨味」に関与するアミノ酸生成に必須な働きをする酵素である。タンパク質分解酵素は、ペプチドの内側を切断するエンド型、ペプチドの末端からアミノ酸を1分子ずつ遊離するエキソ型に分けられる。このうちアミノペプチダーゼは、ペプチドのN末端側からアミノ酸を加水分解により遊離するエキソ型酵素である。本酵素はその種類によって、アミノ酸認識の特異性（N末端のアミノ酸の種類を選択して遊離）が異なる。従って、アミノペプチダーゼは、醸造食品の味を決めている重要な酵素の一つであり、同酵素の作用による遊離アミノ酸の生成バランスは、食品の呈味性に大きく影響する。

多様な能力を有する産業微生物である麹菌の機能をさらに解明して引き出すことにより、その機能を新産業の開拓に利用できる可能性が考えられる。また学術的には、伝統的発酵食品の醸造において、麹菌の酵素が担う機能の解明が望まれている。このような要望を受けて、麹菌ゲノム解析コンソーシアムが組織され、2005年に麹菌のゲノム情報が解明された。そのゲノム情報から麹菌のプロテアーゼ遺伝子群を抽出した結果、100種類以上の遺伝子が発見され、その中にはアミノペプチダーゼ様遺伝子がして30種類以上含まれていた。

これまでに報告された麹菌アミノペプチダーゼは、実用菌株から生化学的な実験手法により精製されたタンパク質である。例を挙げると、細胞外に分泌される4種類のロイシニアミノペプチダーゼが培養上清より精製され、特性が解明された<sup>1) - 4)</sup>。ゲノム情報から抽出したアミノペプチダーゼ様遺伝子のうち、著者らは糸状菌で報告例のない酵素、真核生物で報告例の無い酵素の遺伝子を解析してきた。これらは生産量が微量であり、精製困難なタンパク質と推測された。そこで遺伝子レベルで見出した新規アミノペプチダーゼを遺伝子組換え技術を利用して強制的に高生産させた。その結果、精製可能な量の酵素タンパク質を確保することができた。この手法で酵素化学的性質を決定したアミノペプチダーゼとして、グルタミン酸やアスパラギン酸といった旨味を示すアミノ酸をペプチドから特異的に遊離するアスパチルアミノペプチダーゼ (DapA<sup>5)</sup>)、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 (PapA<sup>6)</sup>)、ロイシンを中心に疎水性アミノ酸を遊離するロイシニアミノペプチダーゼ (LapA<sup>7)</sup>) がある。LapAは培養上清に高生産させて精製したが、その他の酵素は細胞内に蓄積されたため、細胞破碎後の無細胞抽出液から精製した。一方、cDNAを大腸菌で過剰発現させたのち、付加されたHis-tagを指標に精製を行うことにより特性を解明したアミノペプチダーゼとして、システイニルジペプチダーゼ (CdpA<sup>8)</sup>)、及びリジンアミノペプチダーゼ (ApsA, ApsB<sup>9)</sup>) がある。

### 3. 麹菌アスパチルアミノペプチダーゼの精製と酵素の特徴

上述の酵素のうち、アスパチルアミノペプチダーゼ (DapA)<sup>5)</sup> は、酸性アミノ酸であり重要な呈味成分であるグルタミン酸及びアスパラギン酸に高い特異性を示し、これらのアミノ酸をペプチドのアミノ末端から遊離する酵素である。したがって、本酵素は味噌醸造中において、もろみ中で生成するペプチドのアミノ末端のアスパラギン酸やグルタミン酸を遊離し、味噌における旨味アミノ酸生成への寄与が考えられる。そこで、アスパチルアミノペプチダーゼの詳細な酵素化学的性質<sup>5)</sup> や麹菌細胞内における生理的機能の解明、細胞内の本酵素が細胞外に放出される現象等、味噌等の醸造工程における機能解明につながる知見を得た<sup>10),11)</sup> ので、紹介する。

酸性アミノ酸であるグルタミン酸及びアスパラギン酸をペプチドのアミノ末端から特異的に遊離するアミノペプチダーゼは1961年に初めて報告された<sup>12)</sup>。この酵素は哺乳類(ラット)の腎臓組織に見出された膜結合型タンパク質であり、グルタミルアミノペプチダーゼと呼ばれた。本酵素が注目を浴びたのは、哺乳類の血圧上昇に関与するペプチドホルモンであるアンジオテンシンIとアンジオテンシンIIのアミノ末端のアスパラギン酸を遊離する活性を示したためである。また本酵素はカルシウムイオンにより活性が促進された。一方、犬の腎臓組織に見出された可溶性アミノペプチダーゼは、合成基質のアスパラギン酸2-ナフチルアミド分解活性がグルタミン酸2-ナフチルアミド分解活性を上回ることから、アスパチルアミノペプチダーゼと命名された。同酵素はマンガンイオンにより活性化された<sup>13)</sup>。その後ネズミからも同様の酵素が粗精製されたが、こちらのほうはペプチドのみを基質とし、合成基質の分解は見られなかった<sup>14)</sup>。これらの酵素は安定性が悪いため、単一タンパク質にまでは精製されていなかったが、その後、やはりアンジオテンシンの脳内機能解明の一環として、ウサギの脳からアスパチルアミノペプチダーゼが高度に精製され、同様に合成基質の分解能力が見られなかった<sup>15)</sup>。

一方、微生物におけるアスパチルアミノペプチダーゼに関する情報は全く得られていなかったが、横浜市立大学のYokoyamaら<sup>16)</sup>は出芽酵母細胞内の高分子タンパク質の機能解明を進めている際、未解明のタンパク質Yhr113wを発見し、アミノ酸配列から哺乳類のアスパチルアミノペプチダーゼに類似する構造を有することを見出した。同酵素の基質特異性や活性のpH依存性は哺乳類のアスパチルアミノペプチダーゼと同様であったが、いくつかの違いが見られた。すなわち、サブユニット構成数が哺乳類では8量体に対して、出芽酵母では12量体であったこと、および金属イオンキレート剤であるEDTAは哺乳類酵素を阻害しないが、出芽酵母酵素を阻害することがわかった。また、真核生物や原核生物にアスパチルアミノペプチダーゼが広く存在することが各種生物ゲノム情報から示唆された。

著者らの研究室では、東京農工大学、東北大学、株式会社月桂冠、天野エンザイム株式会社との共同研究により、麹菌の全タンパク質分解酵素の解明を目指して網羅的な遺伝子機能の解明を進めた。その中で、上述の出芽酵母 Yhr113w タンパク質にアミノ酸配列で53%の同一性を示すタンパク質が麹菌ゲノム内にコードされていることを見出した。そこで、そのタンパク質を DapA、遺伝子を *dapA* と命名し、タンパク質機能の解明を目指すこととした。研究戦略として、標的タンパク質の精製を容易にするため、同タンパク質のアミノ末端あるいはカルボキシル末端にタグと呼ばれるペプチドが付加された融合タンパク質の形で、麹菌自身の細胞内で強制的に発現させる方法を採用した。そこで、ヒスチジンが6分子連続して連結した His タグが DapA のカルボキシル末端に付加された DapA-His タグタンパク質を、麹菌の高発現プロモータであるタカアミラーゼ遺伝子 *amyB* プロモータの制御下で発現するように発現用プラスミドを構築し、麹菌に導入した (図1)。この His タグペプチドを有したタンパク質は、ニッケルイオンが結合した樹脂に吸着する性質があり、目的のタンパク質をその他のタンパク質と分離する目的で利用されている。得られた形質転換体はデンプンを炭素源として培養後、無細胞抽出液を調製し、抗 His タグ抗体を用いたウェスタンブロット解析により、免疫学的に His タグを有する約  $52 \times 10^3$  のタンパク質が形質転換体の細胞内に検出された (図1)。このことから、麹菌のアスパチルアミ

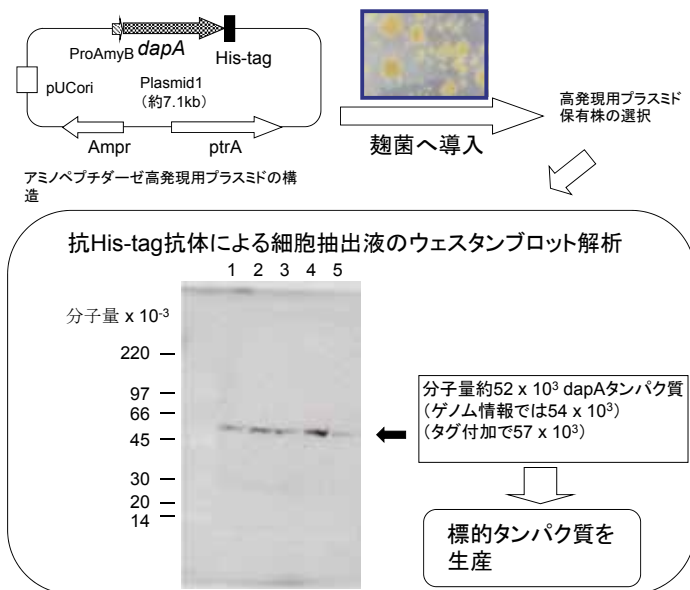


図1 *dapA* 高発現株の作製と高発現株の確認

ノペプチダーゼも他の生物同様、細胞内酵素であることが確認できた。

次に予備試験として、対象タンパク質である DapA-His タグの生産が確認された形質転換株を高発現株とし、ツァベックドクスーデンブンプ地（炭素源としてデンブンを添加）にて培養後、ニッケルイオンが結合したタンパク質精製用担体を使用して、His タグ付加タンパク質を粗精製した。その結果、免疫学的に検出されたタンパク質と同等の分子量を有するタンパク質が主要なタンパク質として精製された。そこで、合成基質のアスパラギン酸-パラニトロアニリド（以下、Asp-pNA）を用いて、粗精製酵素と混合して 30℃にて保温した結果、Asp-pNA が加水分解され、遊離された pNA による黄色の発色が確認できた。哺乳類のアスパチルアミノペプチダーゼが基質としない合成基質を用いることができるならば、分光光度計等を用いて活性を測定できるため、酵素精製作業は簡便となる。しかし、この加水分解反応の比活性は極めて低く、やはり合成基質は基質としては適していない可能性、または麹菌で強制発現したために、活性発現に必要なタンパク質のフォールディング（折りたたみ）が正しく行われていない可能性等が考えられた。そこで、タンパク質の構造上、本酵素が金属イオンを活性発現に必要とする金属ペプチダーゼに属するというを考慮し、粗精製画分あるいは菌体抽出液に亜鉛イオン、カルシウムイオン、コバルトイオンを塩化物の形で 10 mM になるよう添加したところ、コバルトイオン添加では Asp-pNA 分解活性が約 2 倍となった。その他のイオンでは同様に、低下するのみであった。そこで、今度は効果のあった塩化コバルトを 0.3 ~ 1 mM になるよう添加した液体培地で、形質転換体を最初から培養したところ、今度はその無細胞抽出液の Asp-pNA 分解反応の比活性が塩化コバルト無添加の場合の 20 倍以上となった。塩化コバルトを 2 mM となるよう添加した培養では、菌体の生育が阻害された。また、塩化亜鉛や塩化カルシウムを培養時に添加しても無細胞抽出液における酵素比活性には影響しなかった。ニッケルイオン結合担体からの溶出液に 1 mM となるよう塩化コバルトを添加したところ、無添加の場合の約 3 倍の活性回収率であった。以上の結果から、コバルトイオンにより培養中の酵素比活性及び精製中の同比活性が飛躍的に向上させることが明らかになった。また、このことから培養中に大量に翻訳合成される DapA-His タグタンパク質にコバルトイオンが組み込まれることで正常なフォールディングとなった可能性が考えられるが、これについては別途検証が必要である。また、Hoshida ら<sup>17)</sup>は、麹菌で担子菌由来ラッカーゼを高発現させる際に銅イオンを培地に添加して高活性酵素の取得に成功しており、このような金属酵素研究の先行例を参考にしたことも比活性の飛躍的上昇につながった。

上記の予備的な実験を受け、本精製ではツァベックドクスーデンブンプ地（CDS）培地に 1 mM となるよう塩化コバルトを添加して、高発現株の振とう培養を行った。無細胞抽出液を調製後、Asp-pNA 分解活性を指標に活性画分を精製す

ることとした。ニッケルイオン結合担体にて結合、洗浄後に溶出させた活性タンパク質画分について、主要タンパク質の内部アミノ酸配列を決定した結果、目的のDapAの部分配列と一致したため、精製を進めているタンパク質がDapAであると確認した。そこで、次に、この活性画分をさらにゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより、分離し(図2)、各画分のタンパク質をSDS-PAGEに供した(図3)。その結果、活性画分は約 $520 \times 10^3$ の巨大なタンパク質であった(図2)。その単量体タンパク質の分子量はSDS-PAGEの結果(図3)から $57 \times 10^3$ であり、計算上のDapA-Hisタグタンパク質の分子量と一致した。これらの結果から、活

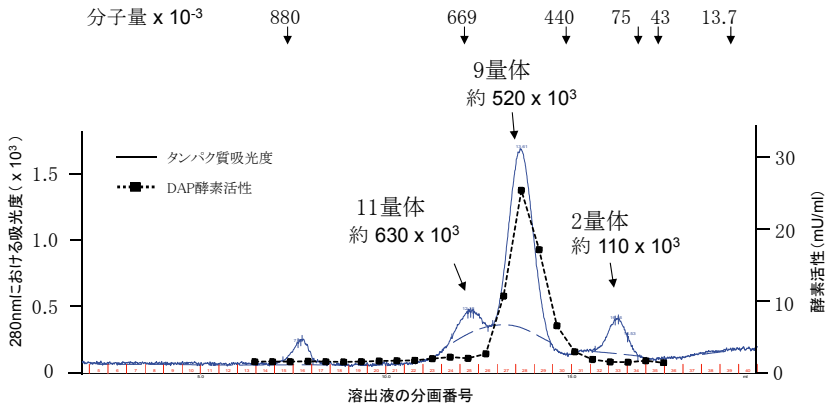


図2 麹菌アスパチルアミノペプチダーゼ活性画分のゲルろ過クロマトグラフィーによる分離

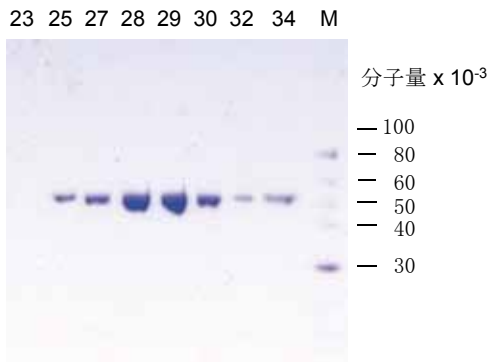


図3 SDS-PAGEによるゲルろ過カラムクロマトグラフィー溶出画分の分析<sup>5)</sup>



性を有する DapA-His タグタンパク質は同一タンパク質をサブユニットとする 9 量体で構成されると考えられた。また、 $57 \times 10^3$  以外にタンパク質は検出されず、目的タンパク質は極めて精製度が高いことが示された。一方、図 2 に示すとおり、活性ピーク以外にも約  $630 \times 10^3$ 、 $110 \times 10^3$  の位置にタンパク質のピークが見られ、それらの SDS-PAGE 分析でも  $57 \times 10^3$  の DapA-His タグタンパク質が検出された (図 3, 25 レーン, 34 レーン)。このことから、DapA-His タグタンパク質は活性を示す 9 量体以外に、不活性な多量体 (それぞれ 11 量体, 2 量体) を形成することが明らかになった。データは示さないが、麴菌高発現株の培養液に塩化コバルトを添加せずに培養した場合、同様に精製したタンパク質のゲルろ過カラムクロマトグラフィー溶出パターンは、9 量体のタンパク質ピークがほとんど見られず、11 量体, 2 量体のタンパク質ピークが主要な構成ピークとなった。この結果からも、コバルトイオンの添加の有無が高発現 DapA-His タグタンパク質の構造に影響を与え、多量体化プロセスを変えている可能性が考えられる。

ゲルろ過カラムクロマトグラフィー後の精製酵素について、基質特異性を確認した。10 種類のアミノ酸-pNA 基質との反応では、アスパラギン酸が最も高い特異性を示し、次いでグルタミン酸であった。しかし、他のアミノ酸化合物は全く反応性を示さなかった。次に、ペプチドを基質とすることを確かめるため、上述したペプチドホルモン、アンジオテンシン II を基質として、酵素反応を行った。図 4-A に示したように、アンジオテンシン II はアミノ末端にアスパラギン酸残基を有する。アンジオテンシン II のアスパラギン酸残基が酵素反応により遊離すると、反応生成物であるアンジオテンシン III が生成する。これらのペプチド基質と産物は液体クロマトグラフィーにより分離・定量することが可能である。精製酵素によりアンジオテンシン II が経時的に分解を受け、アンジオテン

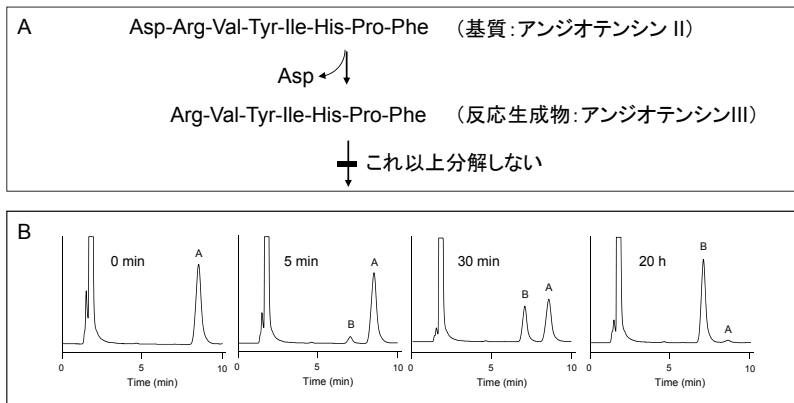


図 4 精製 DAP によるアンジオテンシン II の経時的分解<sup>5)</sup>

シン III が生成する様子を図 4B に示した。反応 20 時間を経ても、生成するアンジオテンシン III とわずかに残存するアンジオテンシン II のピーク以外に生成物のピークは検出されず、本酵素は酸性アミノ酸に極めて特異的なアミノペプチダーゼであることが確かめられた。なお、ヤマサ醤油株式会社の渡部らは、本研究に先んじて大腸菌を宿主とした DapA の生産と精製を行い、特性解析結果を公表した<sup>18)</sup>。そこで本研究はその結果も参考にしながら、麹菌で比活性の高いアスパチルアミノペプチダーゼを生産するための研究を行い、塩化コバルトの培養液中等の添加という選択が酵素機能解析に極めて有効であった。

#### 4. *dapA* の人為的改変株の性質及び *dapA* 転写様式

次に *dapA* 遺伝子の麹菌における生理機能について解明することとした。作製した *dapA* 遺伝子破壊株及び高発現株<sup>10)</sup> について、ツアペックドックスーグルコース (CD) 寒天培地またはツアペックドックスーデンブレン (CDS) 寒天培地におけるコロニーの生育速度、コロニー形態及び胞子形成をそれぞれの対照株 (宿主株) と比較した。なお、デンブレン含有培地では当該遺伝子が高発現するようにあらかじめ菌株を改変した。その結果、遺伝子破壊株 (図 5)、高発現株 (図 6) のいずれも対照株と同等のコロニー形態及び生育速度を示した。また、遺伝子破壊株について窒素源濃度を CD 寒天培地の 100 分の 1 及び 1000 分の 1 に制限した寒天培地上に接種し、コロニーの形態等を観察したところ、上述と同様に対照株と同等の性質を示した (データ省略)。この結果から、*dapA* は麹菌の生

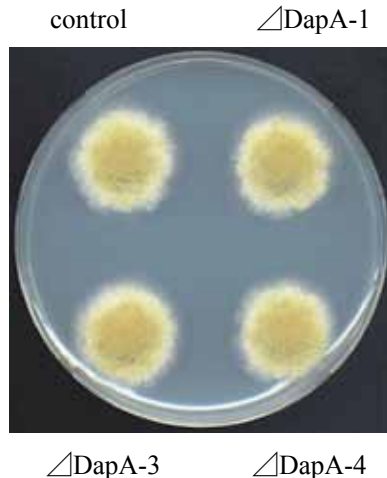


図 5 *dapA* 遺伝子破壊株のツアペックドックス (CD) 寒天培地におけるコロニー形態<sup>10)</sup>

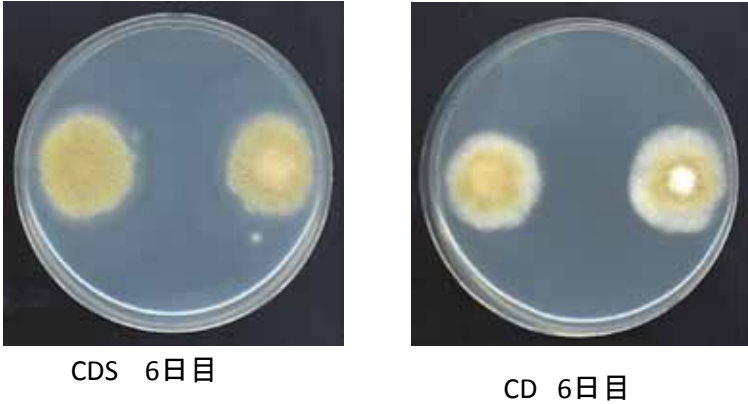


図6 *dapA* 遺伝子高発現株のツアベックドクスーデンペン (CDS) 及び CD 寒天培地におけるコロニー形態<sup>10)</sup>

育に必須ではない遺伝子であることが明らかになった。

*dapA* 遺伝子発現の培養環境による違いを検討するため、一晚培養後の菌体を塩濃度、熱、アルカリの各ストレス条件下で2時間処理した後、RT-PCR法にて転写量を準定量的に測定した。その結果、各ストレス条件と対照条件で転写量は同等であった(データ省略)。そのため、本遺伝子は供試ストレス条件のいずれにおいても転写制御を受けないと考えられた。

次に、DapAの活性発現に金属塩が与える影響を検討するため、高発現株とその対照株のCDS液体培地培養後に、無細胞抽出液を調製した。Hisタグの付加は場合によりタンパク質の可溶性や立体構造に影響を与えることが考えられるため、ここでは、高発現株はHisタグの影響を回避するために、同タグを付加せずに高発現するように改変した。そして、無細胞抽出液に金属塩を1 mMとなるよう添加した後、DapAの活性測定用合成基質であるAsp-pNA及びGlu-pNAを用いて抽出液中のDapA活性を測定した。その結果、塩化コバルト塩の添加により高発現株抽出液における当該酵素活性は塩無添加の場合の約4-5倍となった。また、遺伝子破壊株は、対照株と比較して、Asp-pNA及びGlu-pNA分解活性が有意に低下していた。

## 5. DapA高発現株を用いた米麴の酵素活性

次に、DapA高発現株を対照株とともに実験室で小ロットの米麴培養を行い、4℃において抽出用緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH 7.5)中でスターラーを用いてゆるやかに1時間攪拌を行ったのちの遠心上清を酵素液とした。そして、上述の合成基質を用いた酵素反応後、活性測定を行った。その結果、DapA高発現株

の米麴抽出液中の DapA 活性は、対照株に比べて極めて高い活性を示し、Asp-pNA 基質の分解活性で対象区の約 39 倍の活性を示した(図 7)<sup>10)</sup>。このことから、DapA は細胞内酵素ながら細胞外に容易に抽出可能な酵素であり、醸造過程において米麴に由来する本酵素が旨味アミノ酸であるグルタミン酸やアスパラギン酸の増加に寄与している可能性が示唆された。

渡部ら<sup>18)</sup>は麴菌のアスパチルアミノペプチダーゼを遺伝子組み換え技術により大腸菌を用いて生産し、同酵素が耐塩性を示すとともに、本酵素を脱脂大豆部分分解物と反応させると、グルタミン酸の遊離量が増加することを報告している。本研究においては、穏やかな条件で米麴から容易にアスパチルアミノペプチダーゼ活性が調製可能であることが判明した。発酵食品である味噌は、種類によって塩分が 5～13% (w/w) 程度含まれる。DapA は内在酵素であるが耐塩性が高い酵素であることから、このような塩分の高い味噌の醸造工程中で大豆や米に由来するペプチドから本酵素が旨味アミノ酸を遊離することは十分に考えられる。また、醤油もろみ中でも同様に旨味アミノ酸の生成に機能すると考えられている<sup>18)</sup>。

## 6. 麴菌由来グリシン-D-アラニンアミノペプチダーゼ

上述した酵素は、L 型のアミノ酸を遊離するものであった。L-アミノ酸はよく知られているようにタンパク質あるいはペプチドの構成要素である。一方、D 型アミノ酸を認識するアミノペプチダーゼが近年になり報告された。グラム陰性細菌の *Ochrobacterium anthropi* が有する D-アミノ酸特異的アミノペプチダーゼ (D-stereospecific aminopeptidase, DAP) は、基質から N 末端の D-アラニンを極めて特異的に遊離することが報告された。<sup>19),20)</sup> また、この DAP はメチ

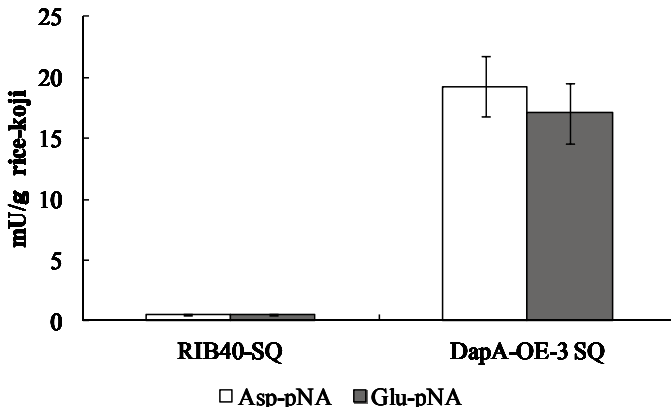


図 7 *dapA* 高発現株と対照株の米麴浸出液の合成基質分解活性<sup>10)</sup>

ル化あるいはアミド化されたグリシンに対しても高い活性を示した。

一方、D-アミノ酸に特異的なアミノペプチダーゼは、真核生物では情報がほとんどない。著者らのグループは、麴菌ゲノム上から抽出されたアミノペプチダーゼの中に、上述のDAPの相同遺伝子を見出した<sup>21), 22)</sup>。本遺伝子機能解明の概略を以下に紹介する。*O. anthropi*のDAPに相同性を有するDNA領域が、限られた種類の糸状菌ゲノムに見出された。これらの遺伝子または遺伝子産物に関する先行研究情報は見られない。そのうち、麴菌から見出された当該遺伝子について、後ほど明らかにした基質特異性を考慮し、グリシン-D-アラニンアミノペプチダーゼ (glycine-D-Alanine aminopeptidase, *gdaA*) と命名した。*gdaA* は、*O. anthropi*のDAPとアミノ酸配列で43%の同一性を示した。

タンパク質が有する機能領域を検索することができるデータベース (Pfam) を利用してGdaAタンパク質の機能領域を調べた。その結果、*O. anthropi*のDAPと同様、 $\beta$ -ラクタマーゼ ( $\beta$ -ラクタム環を有する抗生物質の分解酵素) に類似性の高い領域と、D-アミノペプチダーゼに類似性の高い2つの領域の合計3領域が想定された。Asanoら<sup>23)</sup>は、*O. anthropi*のDAPと $\beta$ -ラクタマーゼの間に、一次配列上の高い類似性が認められ、同時にセリンタイプ $\beta$ -ラクタマーゼの活性部位におけるアミノ酸配列モチーフ (セリン-Xaa-Xaa-リジン, Xaaは任意のアミノ酸) の重要性について報告している。GdaAタンパク質は、このセリン-Xaa-Xaa-リジンモチーフを第58 - 61番目のアミノ酸残基に有していた。PSORTIIプログラムを用いた局在性解析ではGdaAは分泌シグナル配列、あるいは細胞小器官への移行配列はなく、本タンパク質は*O. anthropi*のDAPと同様、細胞質で機能すると考えられた。

## 7. *GdaA* の精製と生化学的特性の解明

そこで、GdaAタンパク質を効率的に精製するため、遺伝子操作技術により*gdaA*遺伝子を過剰発現させて、同タンパク質を麴菌細胞内に蓄積させる戦略を取った。前述した*amyB*プロモータの他に麴菌の遺伝子過剰発現では、ポリペプチド鎖伸長因子遺伝子*tef1*のプロモータ領域がよく利用される。*gdaA*遺伝子コーディング領域を*tef1*遺伝子のプロモータ領域と連結し、遺伝子マーカーを利用して麴菌に導入した。一方、麴菌における*gdaA*遺伝子の機能、役割を解明するため、高発現株と同時に、*gdaA*遺伝子の破壊株も作製した。

*gdaA*遺伝子高発現株、同破壊株、そして対照株を最少寒天培地、完全寒天培地に接種、培養したところ、3株の間には生育の速さや胞子形成についての違いは観察されず、少なくとも*gdaA*遺伝子は麴菌の生育にとって必須の遺伝子ではないと考えられた。*gdaA*遺伝子産物、すなわちGdaAの酵素としての機能を解明していく上で、*O. anthropi*のDAPがD-アラニンアミド、D-アラニン含有ペプチド、グリシンメチルエステルの加水分解に対して高い特異性を示すことを考

慮し、グリシン-パラニトロアニリド (Gly-*p*NA) 及び D-アラニン-パラニトロアニリド (D-Ala-*p*NA) を GdaA のアミノペプチダーゼ活性を測定するための基質として選択した。

得られた *gdaA* 高発現株を、対照株、遺伝子破壊株も併せて、液体完全培地において 24 時間、30℃ で振とう培養した。その菌体から RNA を調製し、定量的リアルタイム PCR 解析により *gdaA* 遺伝子の発現量を調べた。その結果、高発現株は、対照株の約 5,000 倍の転写レベルであった。一方、遺伝子破壊株は想定どおり転写が検出されないことを確認した。また、遺伝子破壊株と対照株を液体完全培地で培養し、回収した菌体から調製した無細胞抽出液 (粗酵素液) における上述のアミノペプチダーゼ活性を測定した (図 8)。その結果、Gly-*p*NA、D-Ala-*p*NA のいずれを基質とした場合も、対照株では培養時間の増加に伴い比活性が増加したのに対して、*gdaA* 遺伝子破壊株ではいずれの基質分解活性も低レベルに終始した。このことから、GdaA は麹菌細胞内におけるグリシン及び D-アラニンを遊離するアミノペプチダーゼ活性を担う主要な酵素として機能することが明らかになった。

転写レベルが高いことと相関して、高発現株の菌体内における Gly-*p*NA 及び D-Ala-*p*NA の加水分解活性の比活性も極めて高く、酵素精製を進める上で問題ないと判断した。*gdaA* 高発現株を液体完全培地で振とう培養し、菌体を凍結破碎し、緩衝液を添加して攪拌後、遠心分離して得られた上清を粗酵素液とした。粗酵素液からの GdaA タンパク質の精製は、硫酸アンモニウムによる沈殿分画、疎水カラムクロマトグラフィー、透析、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて進めた。精製酵素の分子量

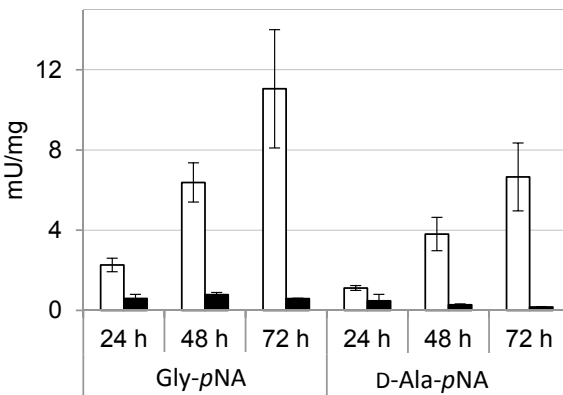


図 8 遺伝子破壊株と対照株のグリシン及び D-アラニンアミノペプチダーゼ活性の培養時間に伴う変化<sup>21)</sup>

は、ゲルろ過カラムによる分子量の標準曲線から  $126 \times 10^3$  と算出した。遺伝子情報及び SDS-PAGE 解析の結果から、GdaA タンパク質単量体の分子量は  $59 \times 10^3$  であり、本酵素は麹菌細胞内では 2 量体で機能すると考えられた。

精製酵素の基質特異性について、まず、各種アミノ酸のパラニトロアニリド化合物を基質として調べた結果、これらの合成基質のうちで基質となったのは、反応性の高い順に Gly-*p*NA, D-Ala-*p*NA, L-Ala-*p*NA であった。Gly-*p*NA は D-Ala-*p*NA よりも少しだけ相対活性が高く、一方で L-Ala-*p*NA に対しては弱い活性を示すのみであった (表 2)。酵素の反応効率を表すパラメータの比較からも、GdaA は D-体のアミノ酸に特異的なアミノペプチダーゼであることが明らかになった。

GdaA はグリシンに対する反応性が最も高いことから、本酵素の生化学的特性を Gly-*p*NA を基質として試験を実施した。その結果、本酵素は、弱アルカリの pH 領域 (pH8 ~ 9) で最も反応性が高く、pH 8.5 が最適であった。また、pH 8 から 11 において最適活性の 80% 以上の活性を示すとともに、酸性側の pH 5 から 7 においても 60% 以上の活性を示し、広範な pH 範囲の反応性を有していた。反応の最適温度は 40°C であり、熱安定性も 40°C、1 時間の熱処理では 80% 以上の残存活性を示した。これらの結果から、GdaA は細胞内在酵素でありながら、比較的安定であり、弱アルカリ領域で活性が高いという特徴を有することがわかった。一方、弱酸性領域でも比較的安定であるため、本酵素は麹菌の細胞質中で機能し、グリシンをペプチドから遊離する活性を有すると考えられる。また本酵素の活性がキレート剤、セリンプロテアーゼ阻害剤で強く阻害されることから、本酵素はセリン型のアミノペプチダーゼであり、金属イオンも活性発現に重要な役割を示すと考えられた。

合成基質の分解性に加えて、N 末端にグリシンあるいは D-アラニンを含むペプチドを基質として、GdaA のアミノペプチダーゼ活性を検討した (表 3, 表 4)。まず、グリシン含有ペプチドを基質とした場合では、合成基質の分解性から予測されたように、グリシンを N 末端に有するジペプチド及びトリペプチドから

表 2 GdaA のアミノ酸パラニトロアニリド基質に対する特異性<sup>21)</sup>

Substrate	Relative activity (%)*
Gly- <i>p</i> NA	100 ± 1.6
D-Ala- <i>p</i> NA	93.1 ± 1.5
L-Ala- <i>p</i> NA	12.2 ± 0.3
β-Ala- <i>p</i> NA, L-Leu- <i>p</i> NA, D-Leu- <i>p</i> NA, L-Met- <i>p</i> NA, L-Pro- <i>p</i> NA, L-Val- <i>p</i> NA, L-Ile- <i>p</i> NA, L-Phe- <i>p</i> NA, D-Phe- <i>p</i> NA, L-Lys- <i>p</i> NA, L-Arg- <i>p</i> NA, L-His- <i>p</i> NA, L-Asp- <i>p</i> NA, L-Glu- <i>p</i> NA	< 0.5

相対活性は、Gly-*p*NA を 100% として算出した。

表3 ペプチド基質からの GdaA による N 末端グリシンの遊離<sup>21)</sup>

基質	反応液中の遊離グリシン濃度 ( $\mu\text{M}$ )
Gly-L-Ala	51.6 $\pm$ 1.9
L-Ala-Gly	極微量
Gly-L-Cys	21.7 $\pm$ 1.2
L-Cys-Gly	極微量
Gly-Gly	682.8 $\pm$ 54.5
Gly-L-Cys-Gly	277.9 $\pm$ 2.3
Gly-Gly-Gly	1007.2 $\pm$ 12.6
L-Cys-Gly-Gly	不検出

表4 ペプチド基質からの GdaA による N 末端 D-アラニンの遊離<sup>21)</sup>

基質	反応液中の遊離 D-アラニン濃度 ( $\mu\text{M}$ )
D-Ala-D-Ala	141.8 $\pm$ 26.9
D-Ala-L-Ala	232.4 $\pm$ 7.5
L-Ala-D-Ala	不検出
D-Ala-Gly	947.6 $\pm$ 19.8
D-Ala-Gly-Gly	852.8 $\pm$ 14.9

グリシンを遊離する活性を示した。一方、グリシンを2番目の位置に有する供試ペプチドに対する分解活性は示さなかった。(表3)次に、D-アラニン含有ペプチドを基質とした場合では、N末端にD-アラニンを有するペプチドからD-アラニンを遊離し、その中でもグリシンを2番目の位置に有するペプチドからのD-アラニン遊離活性が、D-アラニンやL-アラニンを2番目の位置に有するペプチドからの遊離活性よりも顕著に高かった。一方、L-アラニンをN末端に有するペプチドからは、L-アラニンの遊離活性が検出されなかった。(表4)すなわち、GdaAはN末端にグリシンまたはD-アラニンを有するペプチドからこれらのアミノ酸を遊離するアミノペプチダーゼ活性を示し、特にアラニンに対してはD体を特異的に認識する厳密な光学異性体の選択性が見られた。このように、産業微生物である麹菌から見出されたペプチダーゼとしては、初めてグリシンとD-アラニンを特異的に認識するアミノペプチダーゼの特性を解明することができた。

## 8. GdaA の麹菌における生理的機能の解明

GdaAの細胞内における生理的な機能解明の一端として、菌体を最少培地で前培養した後、栄養源として窒素源あるいは炭素源を制限した培地に移し替えて培養を行い、そのような栄養源制限下における菌体内のGly-pNA, D-Ala-pNA分



解活性を、*gdaA* 破壊株及び対照株で比較した。その結果、窒素源制限下において、両株のグリシンアミノペプチダーゼ活性は急増し、窒素源制限開始 24 時間後には対照株で開始時の 46 倍、破壊株では 75 倍に増加した。一方、同条件における D-アラニンアミノペプチダーゼ活性は両株ともに増加するが、遺伝子破壊株では対照株よりも増加率は低く抑えられた。このことは、GdaA が同条件下において D-アラニンを遊離する主要な酵素であるが、他にも同遊離活性を示す酵素の存在が推測された。他方、グリシンアミノペプチダーゼ活性は GdaA 以外の酵素の関与が大きいと考えられた。次に、炭素源制限下における同様の試験の結果では、GdaA 以外の酵素が主要なグリシンアミノペプチダーゼとして働く一方、D-アラニンアミノペプチダーゼ活性のほとんどは GdaA が担うことが明らかになった。このことは、これらの栄養源制限下においては、GdaA と他の酵素が協調的に細胞内のアミノ酸遊離に寄与していることを示しており、GdaA のアミノ酸獲得機能の一端が解明できた。

## 9. *GdaA* の醸造における役割について

我が国の発酵食品製造においては、蒸し米を培養基とした麹菌の固体培養を行い、得られた米麹を蒸煮大豆等の原料と混合して味噌を醸造する。あるいは蒸し米や水と混合して甘酒を製造する。これらの発酵食品の製造過程において、米麹は原料中の糖質やタンパク質、脂質等を加水分解する各種酵素群を供給している。そこで、このような米麹において、*GdaA* も原料からのアミノ酸遊離の一端を担う可能性が考えられた。*GdaA* の麹使用発酵食品における機能の可能性を検討するため、簡易な攪拌操作により米麹から *GdaA* のグリシン-D-アラニンアミノペプチダーゼ活性が抽出可能であるかを試験的に確認することとした。フラスコに 4 g のアルファ化米を入れてオートクレーブ滅菌し、2 ml ( $2 \times 10^6$  cfu/ml) の孢子懸濁液を添加して、30℃、90% 湿度の条件で固体培養を 36 時間または 48 時間行い、モデル的な米麹を調製した。そして、12 ml の滅菌水を添加して 4℃ で 1 時間攪拌して抽出を行った。このような米麹からのゆるやかな抽出により、*GdaA* 活性が検出された (図 9)。すなわち、pH が高くなるにつれて、また培養時間が長くなるにつれて、対照株米麹由来のグリシン及び D-アラニンアミノペプチダーゼ活性が上昇するのに対して、*gdaA* 破壊株では両酵素活性は極めて低いままであり、特に D-アラニンアミノペプチダーゼ活性についてはほとんど検出されないレベルであった。このことから、米麹において、特にグリシンアミノペプチダーゼ活性は *GdaA* がそのほとんどを担っていると考えられた。グリシンは甘味を呈することが知られており、麹を用いた発酵食品における遊離グリシンの生成に *GdaA* が関与している可能性が示唆された。また、*GdaA* は食塩の存在で活性は低下するが、もともと比活性が極めて高い酵素 (最終精製標品で 115U / mg タンパク質) であるため、食塩濃度の高い味噌や醤油等の醸造に

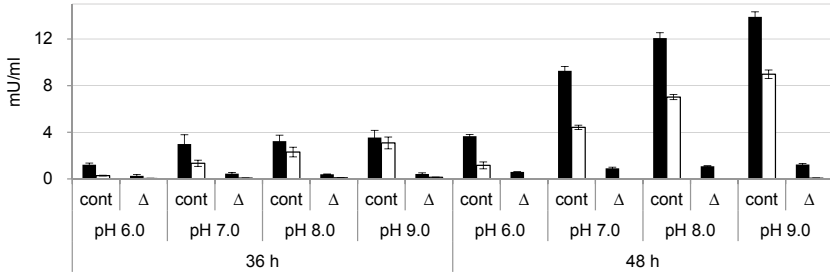


図9 米麴における GdaA 活性<sup>21)</sup>

においても呈味性を示すグリシンの遊離に寄与することが考えられる。

## 10. GdaA と D-アラニンについて

GdaA は上述したように明確な D-アラニンアミノペプチダーゼ活性を有するが、その基質となる D-アラニン含有ペプチドは麹菌細胞内に存在するのであろうか。細胞内の D-アラニン、あるいは D-アラニンを有するペプチドの存在については、細菌の細胞壁に存在するペプチドグリカンのペプチド部分に D-アラニンが構成要素として知られている。一方、真核生物においては、D-アラニン、あるいは D 体アミノ酸の存在については、糸状菌が生産する一部のペプチド性抗生物質の構成要素として知られているのみであった。しかし、近年の精力的な研究から、量的には低いが細菌や真核生物のペプチド中に D 体アミノ酸が含まれることが解明されてきた。例えば、ジャポニカ米には D-Ala-Gly や D-Ala-D-Ala 等の GdaA が好んで基質とするペプチドが含まれることが知られる。これらのペプチドの米中の存在は、麹菌と米の密接な関係を意味しており、GdaA がこれらのペプチド分解に寄与することが考えられる。

近年、発酵食品に D-アラニンやその他の D 体アミノ酸が豊富に含まれ、その生成は主として同食品の製造過程で増殖する乳酸菌が有するアミノ酸ラセマーゼを介した L 体アミノ酸からの変換によるものであることが示された。また、野菜や果物等にも含まれることが明らかにされ、一部の化合物にのみ含まれると考えられていた D 体アミノ酸は、広く存在し、我々が摂取していることが知られるようになった。現在、D 体アミノ酸を機軸として第二次機能としての呈味性を追求する食品や、第三次機能としての健康機能を追及する食品への応用研究が進められている。そのような状況の中、醸造食品の加工に利用されてきた麹菌の D 体アミノ酸関連酵素が見出されたことにより、今後の新規食品の開発にも麹菌とその酵素が利用されることを期待したい。なお、著者らのグループは別途、基質特異性が GdaA と異なる D-アミノ酸特異的アミノペプチダーゼを麹菌ゲノム情報中に発見した。この酵素 (DamA<sup>23)</sup>) は、麹菌の生育にとって必須の遺伝

子ではないが、一方で、反応条件によってはD体アミノ酸をアミノ末端に有するペプチドの合成が可能であるため、今後醸造以外の分野における利用が考えられる。

## 11. おわりに

味噌の熟成にはアミラーゼと中性プロテアーゼの働きが重要であり、醤油ではアルカリプロテアーゼが重要とされている。一方、麹菌株を変更すると、味噌や醤油の味が変わるとも言われている。また、麹菌酵素の作用が弱いと、醤油では窒素利用率が低くなり、味噌では味が乗らず色調が悪くなる。著者は全国味噌鑑評会において審査員を務めているが、上位品質の味噌は香り高い上に旨味と甘味のバランスの調和が取れており、このようなすぐれた品質と麹菌の酵素バランスの間にはどのような関係があるのか、ぜひとも追求してみたいと考えている。菌株の違いと呈味性も含めた品質との関係を研究することにより、麹菌酵素の食品から見た機能が解明されると期待される。本研究の結果から、これまでに注目されていないアミノペプチダーゼの味噌醸造工程における機能がさらに解明され、この酵素の生産性が異なる麹菌株を醸造で用いることにより、アミノ酸組成が従来から変化した新規な呈味性を有する発酵製品が開発される可能性がある。従来の醸造用麹菌株からプロテアーゼ生産に関する新たな特性が解明されることにより、今後、新たな地場発酵食品の開発や、種麹産業における菌株の新規用途開拓が期待される。

## 謝辞

本研究の一部は生研センター基礎研究推進事業、平成24年度一般社団法人中央味噌研究所研究助成により実施されたものである。

(応用微生物研究領域 糸状菌ユニット 楠本 憲一)

## 参考文献

- 1) Nakadai, T., Nasuno, S., Iguchi, N. : Purification and properties of leucine aminopeptidase II from *Aspergillus oryzae*. *Agr Biol Chem* **37**, 767-774 (1973)
- 2) Nakadai, T., Nasuno, S. : Purification and properties of leucine aminopeptidase IV from *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.* **41**, 1657-1666 (1977)
- 3) Nakadai, T., Nasuno, S., Iguchi, N. : Purification and properties of leucine aminopeptidase I from *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.* **37**, 757-765. (1973)
- 4) Nakadai, T., Nasuno, S., Iguchi, N. : Purification and properties of leucine aminopeptidase III from *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol. Chem.* **37**, 775-782

(1973)

- 5) Kusumoto, K., Matsushita-Morita, M., Furukawa, I., Suzuki, S., Yamagata, Y., Koide, Y., Ishida, H., Takeuchi, M., Kashiwagi, Y. : Efficient production and partial characterization of aspartyl aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 1711-1719 (2008)
- 6) Matsushita-Morita, M., Furukawa, I., Suzuki, S., Yamagata, Y., Koide, Y., Ishida, H., Takeuchi, M., Kashiwagi, Y., Kusumoto, K. : Characterization of recombinant prolyl aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Appl. Microbiol.* **109**, 156-165 (2010)
- 7) Matsushita-Morita, M., Tada, S., Suzuki, S., Hattori, R., Marui, J., Furukawa, I., Yamagata, Y., Amano, H., Ishida, H., Takeuchi, M., Kashiwagi, Y., Kusumoto, K. : Overexpression and characterization of an extracellular leucine aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*. *Curr. Microbiol.* **62**, 557-564 (2011)
- 8) Hattori, R., Matsushita-Morita, M., Marui, J., Tada, S., Suzuki, S., Furukawa, I., Yamagata, Y., Amano, H., Ishida, H., Takeuchi, M., Kusumoto, K. : Characterization of an *Aspergillus oryzae* cysteinyl dipeptidase expressed in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 159-161. (2011)
- 9) Marui, J., Matsushita-Morita, M., Tada, S., Hattori, R., Suzuki, S., Amano, H., Ishida, H., Yamagata, Y., Takeuchi, M., Kusumoto, K.-I. : Comparison of expression and enzymatic properties of *Aspergillus oryzae* lysine aminopeptidases ApsA and ApsB. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 2643-2650 (2012)
- 10) 楠本憲一：麹菌新規細胞内在ペプチダーゼの生理的機能の解明と味噌加工における役割，中央味噌研究所研究報告， **35**, 98-104 (2014)
- 11) 楠本憲一：麹菌新規ペプチダーゼの機能と味噌等の醸造工程における役割について，日本醸造協会誌（印刷中）
- 12) Glenner, G. G., and Folk, J. E.: Glutamyl peptidases in rat and guinea pig kidney slices. *Nature* **192**, 338-340 (1961)
- 13) Cheung, H. S., and Cushman, D. W.: A soluble aspartate aminopeptidase from dog kidney. *Biochim. Biophys. Acta* **242**, 190-193 (1971)
- 14) Kelly, J. A., Neidle, E. L., and Neidle, A.: An aminopeptidase from mouse brain cytosol that cleaves N-terminal acidic amino acid residues. *J. Neurochem.* **40**, 1727-1734 (1983)
- 15) Wilk, S., Wilk, E., and Magnusson, R.P.: Purification, characterization, and cloning of a cytosolic aspartyl aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* **273**, 15961-15970 (1998)
- 16) Yokoyama, R., Kawasaki, H., and Hirano, H.: Identification of yeast aspartyl

- aminopeptidase gene by purifying and characterizing its product from yeast cells. *FEBS J.* **273**, 192-198 (2005)
- 17) Hoshida, H., Fujita, T., Murata, K., Kubo, K. and Akada, R.: Copper-dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1090-1097 (2005)
  - 18) Watanabe, J., Tanaka, H., Akagawa, T., Mogi, Y., and Yamazaki, T. : Characterization of *Aspergillus oryzae* aspartyl aminopeptidase expressed in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 2557-2560 (2007)
  - 19) Asano Y, Mori T, Hanamoto S, Kato Y Nakazawa A (1989a) A new D-stereospecific amino acid amidase from *Ochrobactrum anthropi*. *Biochem Biophys Res Commun* **162**: 470-474
  - 20) Asano, Y., A. Nakazawa, Y. Kato & K. Kondo, (1989b) Properties of a novel D-stereospecific aminopeptidase from *Ochrobactrum anthropi*. *J. Biol. Chem.* **264**: 14233-14239
  - 21) Marui, J., Matsushita-Morita, M., Tada, S., Hattori, R., Suzuki, S., Amano, H., Ishida, H., Yamagata, Y., Takeuchi, M. Ken-Ichi Kusumoto : Enzymatic properties of the glycine D-alanine aminopeptidase of *Aspergillus oryzae* and its activity profiles in liquid-cultured mycelia and solid-state rice culture (rice-koji). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 655-669 (2012)
  - 22) 楠本憲一：ペプチドからグリシンと D-アラニンを遊離する新規な麹菌アミノペプチダーゼ。日本醸造協会誌, **108 (2)**, 68-75 (2012)
  - 23) Matsushita-Morita, M., Nakagawa, H., Tada, S., Marui, J., Hattori, R., Suzuki, S., Yamagata, Y., Amano, H., Ishida, H., Takeuchi, M. and Kusumoto, K. : Characterization of a D-stereoselective aminopeptidase (DamA) exhibiting aminolytic activity and halophilicity from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Biochem. Biotech.*, **171**, 145-164 (2013).

食糧 —その科学と技術—  
第53号

平成27年3月27日 印刷  
(非売品)  
平成27年3月27日 発行

〒305-8642  
茨城県つくば市観音台2-1-12  
独立行政法人  
農業・食品産業技術総合研究機構  
食品総合研究所  
所長 大谷 敏郎

URL : <http://www.naro.affrc.go.jp/nfri/>

印刷所 牛久印刷株式会社  
〒300-1236  
茨城県牛久市田宮町531-27