

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^{1) - 4)}。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 (DapA⁵⁾)、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 (PapA⁶⁾)、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 (LapA⁷⁾) 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 (CdpA⁸⁾)、及びリジンアミノペプチダーゼ (ApsA, ApsB⁹⁾) 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)⁵⁾ 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⁵⁾ 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^{10),11)} 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¹²⁾。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¹³⁾。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¹⁴⁾。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¹⁵⁾。

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¹⁶⁾ 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 52×10^3 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

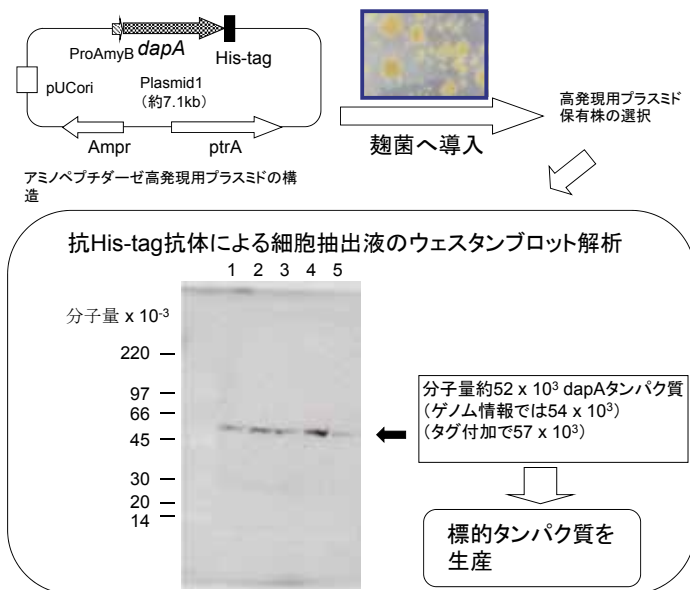


図1 *dapA* 高発現株の作製と高発現株の確認

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¹⁷⁾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する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 520×10^3 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 57×10^3 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

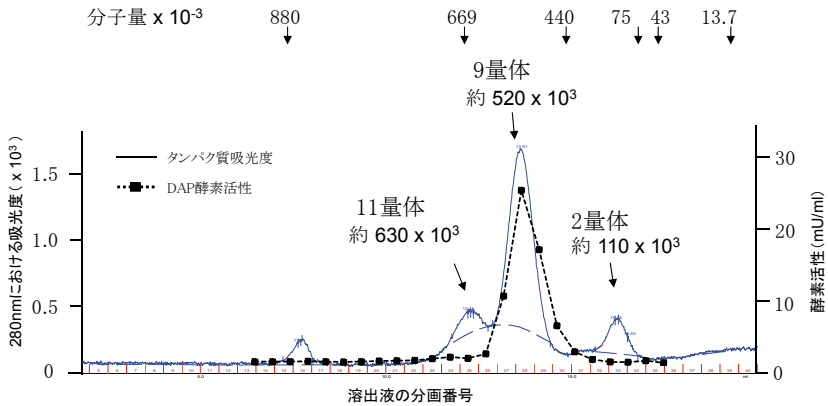


図2 麹菌アスパチルアミノペプチダーゼ活性画分のゲルろ過クロマトグラフィーによる分離

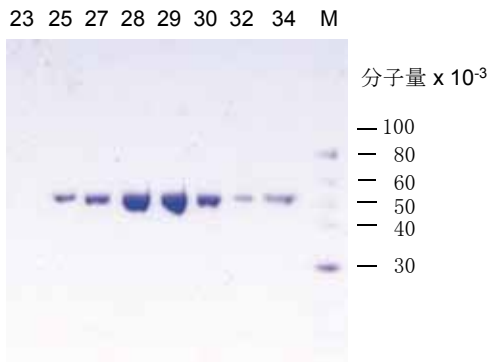


図3 SDS-PAGEによるゲルろ過カラムクロマトグラフィー溶出画分の分析⁵⁾

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、 57×10^3 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 630×10^3 、 110×10^3 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 57×10^3 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-*p*NA 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

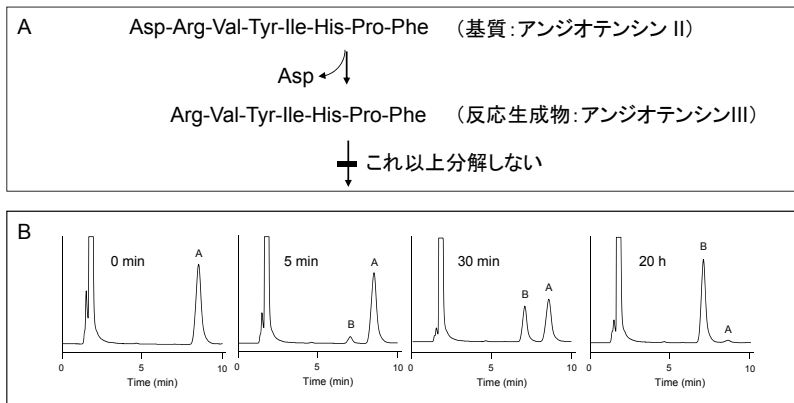


図 4 精製 DAP によるアンジオテンシン II の経時的分解⁵⁾

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¹⁸⁾。そこで本研究はその結果も参考にしながら、麴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* 遺伝子の麴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¹⁰⁾ について、ツァペックドックスーグルコース (CD) 寒天培地またはツァ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* は麴菌の生

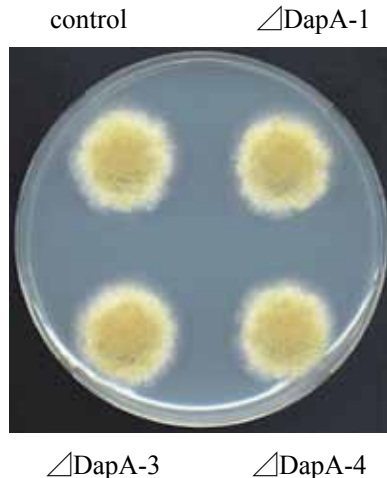


図 5 *dapA* 遺伝子破壊株のツァペックドックス (CD) 寒天培地におけるコロニー形態¹⁰⁾

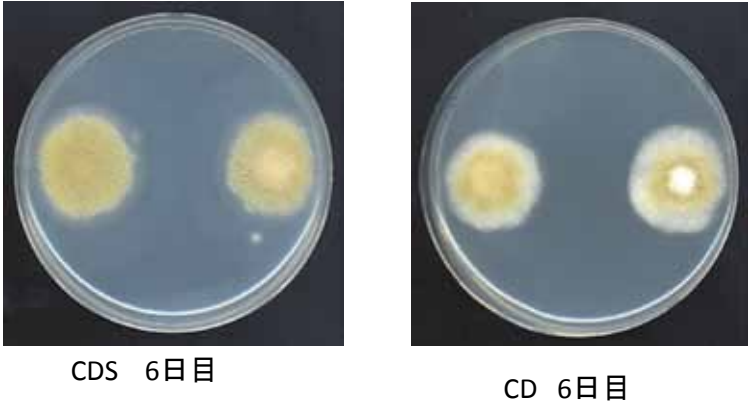


図6 *dapA* 遺伝子高発現株のツアベックドクスーデンペン (CDS) 及び CD 寒天培地におけるコロニー形態¹⁰⁾

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)¹⁰⁾。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¹⁸⁾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¹⁸⁾。

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。グラム陰性バクテリアの *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。^{19),20)} また、この DAP はメチ

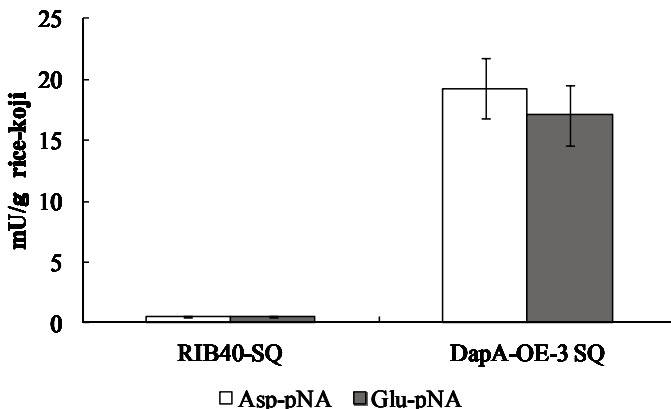


図 7 *dapA* 高発現株と対照株の米麴浸出液の合成基質分解活性¹⁰⁾

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^{21), 22)}。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、 β -ラクタマーゼ (β -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²³⁾は、*O. anthropi*のDAPと β -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 β -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 は麴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

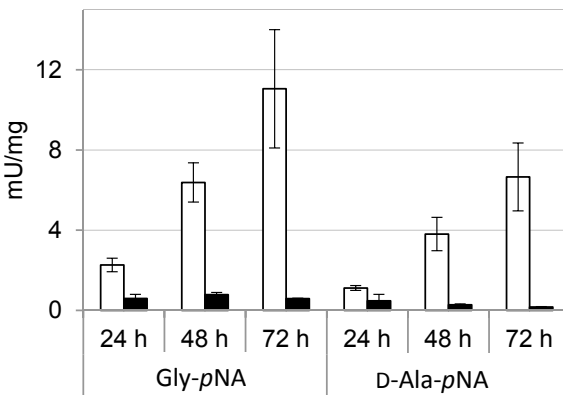


図 8 遺伝子破壊株と対照株のグリシン及び D-アラニンアミノペプチダーゼ活性の培養時間に伴う変化²¹⁾

は、ゲルろ過カラムによる分子量の標準曲線から 126×10^3 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 59×10^3 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℃ であり、熱安定性も 40℃、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-アラニン有する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²¹⁾

| 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²¹⁾

| 基質 | 反応液中の遊離グリシン濃度 (μM) |
|---------------|---------------------------------|
| 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²¹⁾

| 基質 | 反応液中の遊離 D-アラニン濃度 (μM) |
|---------------|------------------------------------|
| 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 (2×10^6 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

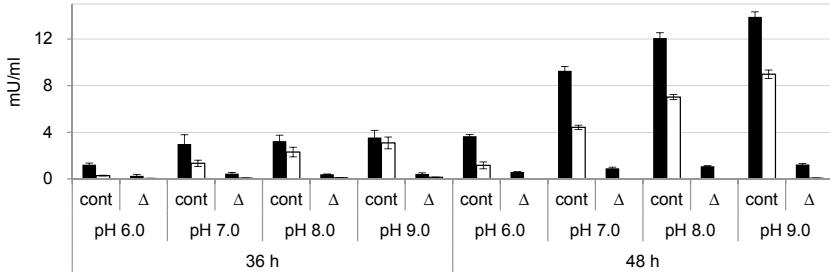


図9 米麴における GdaA 活性²¹⁾

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 (DamA²³⁾) 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).