

# 醤油着色抑制を目的とした キシラン分解酵素低生産性醤油麹菌の取得

北本則行\*<sup>1</sup> 安田庄子\*<sup>2</sup>

## Repression of the expression of genes encoding xylanolytic enzymes in *Aspergillus oryzae* for production of lighter color soy sauce

Noriyuki KITAMOTO, Shoko YASUDA

Research and Development Division, AITEC<sup>1</sup>, Food Research Center, AITEC<sup>2</sup>

醤油の着色・褐変化の要因のひとつである醤油諸味中のキシロース濃度を減少させるため、キシラン分解酵素低生産性麹菌を取得することを試みた。複数のキシラン分解酵素生産を同時に抑えるためにキシラン分解酵素生産に必要な共通因子のタイトレーション（滴定）の原理を利用した手法を用いた。すなわち醤油麹菌 *Aspergillus oryzae* から単離したキシラナーゼFI遺伝子のプロモーター領域を64コピー含んだプラスミドpXPR64を作製し、醤油麹菌 *A.oryzae* に導入した。その結果キシラン分解活性がもとの約2%に低下した醤油麹菌が得られた。

### 1. はじめに

醤油の色は、味、香りと共にその品質を決定する重要な因子であり、淡口醤油や愛知県特産の白醤油の製造では、特に色が重要視されている。

醤油の着色・褐変化の機構について、これまでに多くの研究がなされており、その主要因は醤油諸味中の糖類とアミノ酸類との間のアミノカルボニル反応によって生成されるメラノイジン色素であることが明らかにされている。糖類の中でもペントース、特にキシロースが最も褐変化しやすいことから、醤油諸味中のキシロース濃度を低下させることが醤油の着色抑制に効果的であると考えられる。

醤油諸味中のキシロースは、主に醤油麹菌が生産するキシラン分解酵素（キシラナーゼ、キシロシダーゼなど）が醤油原料に作用することによって遊離される。従ってこれらの分解酵素を生産させないようにすれば醤油諸味中のキシロース濃度が低下することが予想され、着色抑制が期待できる。醤油麹菌は少なくとも6種類以上のキシラン分解酵素を生産することがわかっており、我々は既にこれらの中で主要な酵素の生産を個々に抑制することに成功した。しかしながら醤油着色抑制に十分な

効果をあげるためには、醤油麹菌のほとんどすべてのキシラン分解酵素生産を一度に抑制する必要があると考えられる。

本研究では種々のキシラン分解酵素生産に必要な共通因子のタイトレーションという手法を用いてキシラン分解酵素低生産性麹菌を取得することを目的とした。

### 2. 実験方法

#### 2.1 PCRによるファミリーFキシラナーゼ遺伝子の増幅

醤油麹菌 *Aspergillus oryzae* のファミリーFキシラナーゼ染色体遺伝子の一部を取得するためにPCRを行った。2つのオリゴヌクレオチドプライマーは *Aspergillus kawachii* XynA<sup>1)</sup> 及び *Penicillium chrysogenum* XylP<sup>2)</sup> のアミノ酸配列に基づいて以下のように設計した。

センスプライマーP1: 5'-CCNGA(A/G)AA(C/T)(A/T)(C/G)NATGAA(A/G)TGG-3'

アンチセンスプライマーP2: 5'-TT(A/G)TA(A/G)TC(A/G/T)AT(A/G)TANA(A/G)(T/C)TT-3'

増幅した遺伝子断片はpUC118にクローニングして塩基

\*1 基盤技術部 \*2 食品工業技術センター応用技術室

配列を決定した。

## 2.2 キシラナーゼF1遺伝子の単離

PCRによって得られた遺伝子断片のうちの1クローンをキシラナーゼF1 (以下xynF1 と記す) と命名し、これをプローブとして醤油麹菌 *A. oryzae* KBN616の染色体遺伝子のcharomid9-28ライブラリーをスクリーニングし、全鎖長遺伝子を取得した。またxynF1 のエキソンとイントロンを決定するために、XP培地 (2%キシラン (カバの木由来), 1%ポリペプトン, 0.5%リン酸1カリウム, 0.5%塩化カリウム, 0.1%硝酸ナトリウム, 0.05%硫酸マグネシウム7水和物) で3日間培養した *A. oryzae* KBN616菌体から全RNAを抽出し、RT-PCR (access RT-PCR system: Promega) によってcDNAを取得した。

## 2.3 キシラナーゼF1遺伝子プロモーターを64コピー含んだプラスミドpXPR64の作製

*A. oryzae* にxynF1のプロモーター領域を複数導入するために、以下の方法でプラスミドpXPR64を作製した (図1)。

はじめにxynF1 翻訳開始コドンの-117から-499 bp上流の393 bp断片をPCRで増幅した。その際用いたセンスプライマーP3の5'末端にはSalI制限酵素切断部位、ア

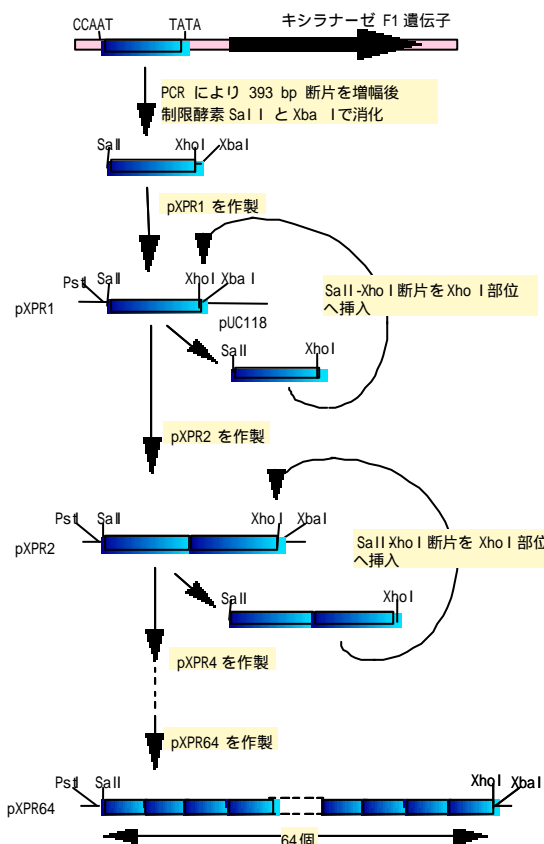


図1 pXPR64の作製

ンチセンスプライマーP4の5'末端にはXhoIとXbaI切断部位を持つように設計した。増幅した遺伝子断片をSalI/XbaIで消化し、pUC118のSalIとXbaI切断部位に導入したプラスミドをpXPR1とした。次にpXPR1からSalI/XhoIで393 bp断片を切り出し、pXPR1のXhoI部位に順向きに挿入したものをpXPR2とした。この切り出しと挿入の操作を5回繰り返して、xynF1のプロモーター領域である393 bp断片が64コピー順向きにつながったプラスミドpXPR64を作製した。pXPR64とpND300 (*A. oryzae* のniaD 遺伝子をpUC119にクローニングしたもの) を用いてniaD 欠損株である *A. oryzae* KBN616-39を形質転換したところ<sup>3)</sup> 約200株の形質転換体が得られ、そのうち100株の形質転換体について単胞子分離した後、解析した。

## 2.4 酵素活性測定

キシラナーゼ活性は Biely らの方法<sup>4)</sup> に従った。50mM 酢酸緩衝液 (pH 5.4) 中において Remazolbrilliant blue-modified xylan (RBB-Xylan; Sigma, 5.75mg/ml) を基質として 30℃ で反応後、2倍量の96%エタノールを加えて反応を停止させた。この液の595nmの吸光度の増加がキシラナーゼ活性を表す。活性1ユニットは培養液1ミリリットル1分間当たり吸光度1.0を増加させる酵素量と定義した。

キシロシダーゼ活性はOoiらの方法<sup>5)</sup> に従って測定した。10mM *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside (Sigma) の50mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 溶液100  $\mu$ lと、適宜希釈した酵素液100  $\mu$ lを40℃ で10分間反応させた後、1Mの炭酸ナトリウム溶液1mlを加えて反応を停止させ、遊離した *p*-nitrophenol を400nmの吸光度により測定した。活性1ユニットは1分間に1  $\mu$ molの *p*-nitrophenol を遊離する酵素量と定義した。

なお酵素液は *A. oryzae* 形質転換体をXP培地で30℃、3日間培養した培養液を濾過したものを用いた。

酵素液のたんぱく質濃度の測定はMicro BCA protein assay kit (Pierce) を用いて行った。

## 2.5 サザン解析

*A. oryzae* KBN616 及び形質転換体の染色体DNA 約5  $\mu$ gをHindIII消化した後、0.7%アガロースゲルで電気泳動を行い、Hybond-N (Amersham Biosciences) ナイロン膜に転写した。プローブとしてxynF1のプロモーター領域の393bp断片を用い、AlkPhos Direct system (Amersham Biosciences) を用いてハイブリダイゼーションを行った。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 *A. oryzae* キシラナーゼ遺伝子(xynF1)の単離と同定

プライマーP1、P2を用いたPCRによって約600 bpの遺

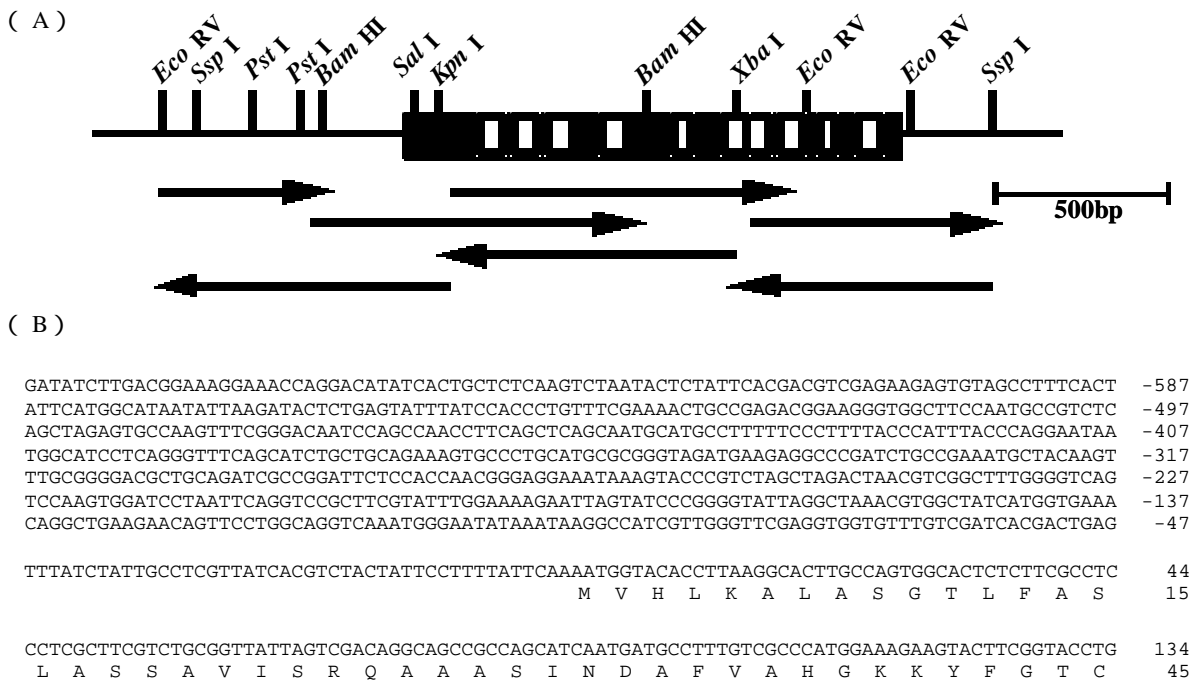


図2 xynFI 遺伝子の制限酵素地図 (A) と塩基配列の一部 (B)

伝子断片が得られた。クローニングの結果、それらは異なる配列4種類の断片に分けられたが、*A. kawachii* XynAと比較したところ、すべてに高い相同性があった。従って*A. oryzae* は少なくとも4種類のファミリーキシラナーゼ遺伝子を持つことがわかった。4種類の断片のうち最も存在割合の高かったxynFIの全鎖長染色体遺伝子及びcDNAを取得し、図2Aの矢印の向きに塩基配列を決定した。

xynFIの構造領域は1484bpで10個のイントロン(44bp~63bpの長さ)に分断されていた。構造領域の配列は327アミノ酸をコードしており推定分子量は35,402 Daであった。ヒガシマル醤油(株)の中田らによって*A. oryzae* HL15株から精製された主要なキシラナーゼXyn1のN末端アミノ酸配列(15個)は、図2BのようにXynFIの26番目から40番目に見られる配列と一致したため、XynFIはXyn1と同一である可能性が高いと考えられる。またXynFIは既知の糸状菌由来キシラナーゼとアミノ酸レベルで高い相同性があり、*A. nidulans* XInC<sup>6)</sup>、*A. kawachii* XynA、*P. chrysogenum* XyIPとそれぞれ71%、68%、63%であった。

xynFIの5'-非翻訳領域には-99にTATA配列が、-509にCCAAT配列が存在した。*A. nidulans*におけるカタボライト抑制因子CreAの結合配列が-173と-314に存在し、グルコースの存在下では遺伝子発現が抑制されることが推定された。また最近明らかになった*A. niger*におけるキシ

ラン分解システムの転写活性化因子XInR<sup>7)</sup>の結合配列である“GGCTAAA”が-162に存在した。図には示さなかったが、3'-非翻訳領域に典型的なポリアデニレーションシグナルは存在せず、転写終結配列(TAG...TAGT...TTT)は見られた。

### 3.2 *A. oryzae* におけるキシラン分解酵素遺伝子の発現抑制

*A. oryzae*において、プロテアーゼ、ペクチナーゼ、セルラーゼなど醤油醸造上重要な酵素に望ましくない変異を起こすことなく、キシラン分解酵素のみを従来の突然変異法で低下させることは非常に困難で、ほとんど不可能である。

近年 *A. nidulans* や *A. niger* において、*A. tubigenis*

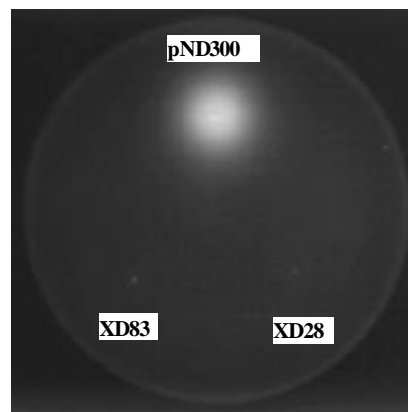


図3 形質転換体XD28、XD83株のキシロシダーゼプレートアッセイ

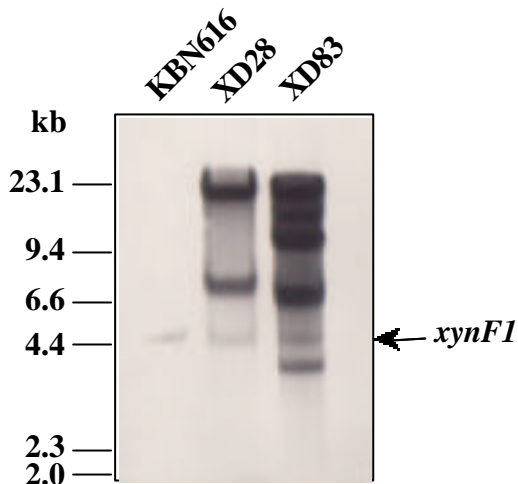


図4 形質転換体XD28、XD83株のサザン解析

*xlnA* の発現が特異的な制御因子によって転写レベルで制御されることがde Graaffらによって示された。その後、転写活性化因子をコードする遺伝子 $xlnR$ が *A. niger* から単離され、これが *A. niger* におけるキシラナーゼ遺伝子の誘導的発現を媒介することが示された。*A. oryzae* においてもこれと同様のキシラン分解酵素遺伝子制御システムが働くと仮定し、転写活性化因子 $XlnR$ の結合配列が *A. oryzae xynFI* 遺伝子のプロモーター領域にも存在するであろうと考えた。そこで、*xynFI* プロモーターを多数導入し、転写活性化因子のタイトレーションによってキシラン分解酵素遺伝子の発現を抑制することを試みた。すなわち図1のように作製した *xynFI* プロモーターを64個含むプラスミドpXPR64をpND300と共に *A. oryzae* KBN616-39に導入し、得られた形質転換体を0.5mM 4-methylumbelliferyl -D-xyloside(4MUX)と1%キシラン(カバの木由来)を入れたプレート(固体培地)で24時間培養した結果、100株中 -キシロシダーゼ活性が著しく低下した株が2株、XD28株とXD83株が得られた(図3)。それらのキシランプレート上での生育は非常に悪かったが、グルコースプレート上での生育は良好であった。サザン解析の結果、XD28株とXD83株には150コピー以上の *xynFI* プロモーターが染色体に組み込まれていた(図4)。XD28株とXD83株をXP培地で培養したところ、その培養液のキシラナーゼ活性は親株と比較して21.5%、0.2%であった。 -キシロシダーゼ活性についてもそれぞれ0.2%、2.1%まで低下していた(表1)。この結果から、*xynFI* プロモーター領域の複数コピーの導入が1個以上の活性化因子のタイトレーションを起こし、キシラン分解酵素遺伝子の発現を減少させたと考えられる。この現象は *A. nidulans* における *amdS* 遺伝子<sup>9)</sup>、*A. nidulans* における *alcA* プロモーターに関連する遺伝

表1 pXPR64導入株のキシラナーゼ活性及びキシロシダーゼ活性(U/ml)

株	キシラナーゼ	キシロシダーゼ
KBN616-39	247.1(100)	1.078(100)
XD28	53.1 (21.5)	0.296 (27.5)
XD83	0.496(0.2)	0.023 (2.1)

KBN616-39 株の活性を100%とした場合の相対値を括弧内に示す。

子群<sup>10)</sup>及び *A. niger* における *glaA* 遺伝子<sup>11)</sup> で見られた現象と類似している。

## 4. 結 び

醤油麹菌 *A. oryzae* から単離したキシラナーゼFI遺伝子のプロモーター領域を64コピー含んだプラスミドpXPR64を作製し、醤油麹菌に導入した。その結果キシラン分解活性が親株の約2%まで低下した醤油麹菌 *A. oryzae* XD83株が得られた。この醤油麹菌を用いて醤油を製造した場合、実際に醤油の着色抑制に効果的であるかどうかを明らかにするために、今後実験室レベルの小仕込み試験を行う予定である。

## 文 献

- 1) Ito K, Ikemasu T, Ishikawa T : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1338 (1992).
- 2) Haas H, Friedlin E, Stoffler G, Redl B : *Gene.*, **126**, 237 (1993).
- 3) 北本則行 : 愛知県食品工業技術センター年報, **42**, 32 (2001).
- 4) Biely P, Mislovicova D, Toman R : *Anal Biochem.*, **144**, 142 (1985).
- 5) Ooi T, Fujimoto H, Wang S-L, Takizawa T, Hidaka H, Ogura S, Murao S, Arai M : *Oyo Toshitsu Kagaku.*, **42**, 45 (1995).
- 6) MacCabe AP, Fernandez-Espinar MT, de Graaff LH, Visser J, Ramon D : *Gene.*, **175**, 29 (1996).
- 7) van Peji, NNME, Visser J, de Graaff LH : *Mol Microbiol.*, **27**, 131 (1998).
- 8) de Graaff LH, vanden Broeck HC, van Ooijen AJJ, Visser J : *Mol Microbiol.*, **12**, 479 (1994).
- 9) Kelly JM, Hynes MJ : *Curr Genet.*, **12**, 21 (1987).
- 10) Davis RW : *Molecular industrial mycology: systems and applications for filamentous fungi*. Dekker, New York 45 (1991).
- 11) Verdoes JC, Punt PJ, Stouthamer AH, vanden Hondel Ca MJJ : *Gene.*, **145**, 179 (1994).