

技術解説「醤油用麹菌 *Aspergillus sojae* の α -アミラーゼ遺伝子について」

1. はじめに

糸状菌の *Aspergillus sojae* と *Aspergillus oryzae* は、麹菌として日本の伝統的発酵調味料である醤油の製造に使用されています。蒸した大豆と炒り小麦にこれらの麹菌孢子（種麹）を加えて培養したものが醤油麹です。*A. sojae* や *A. oryzae* は醤油麹中で様々な糖質加水分解酵素およびたんぱく質分解酵素を分泌生産します。これらの酵素は大豆や小麦の組織を軟化させ、効率的に加水分解を行うという重要な働きを担っています。

2. *A. sojae* と *A. oryzae* の違い

A. sojae と *A. oryzae* は近縁種であり、形態分類学上は孢子表面の形状が違くとされていますが、外観での区別は困難です。しかし性質は異なるため、醤油の味や香りに違いをもたらすと考えられます。

A. sojae と *A. oryzae* の大きな性質の違いとして知られているのは酵素活性の特徴です。菌株にもよりますが、*A. oryzae* は α -アミラーゼ活性（デンプン分解活性の一種）が *A. sojae* の約 16 倍強く、*A. sojae* はポリガラクトクトロナーゼ活性（ペクチン分解活性の一種）が *A. oryzae* の約 50 倍強いと報告されています（文献 1）。

A. oryzae の α -アミラーゼはタカアミラーゼ A (TAA) として有名で、これまでに遺伝子レベルでの詳細な研究が行われています。*A. oryzae* 菌株には通常 2~3 コピーの TAA 遺伝子があり、これらは TAA 遺伝子近傍に存在の確認されたトランスポゾンによる倍加ではないかと推定されています。さらに転写レベルの活性化や抑制のメカニズムに関する多くの知見が蓄積されています。

一方、*A. sojae* の α -アミラーゼについては、2011 年に公開された *A. sojae* NBRC4239 株のドラフトゲノム情報によると（文献 2）、 α -アミラーゼ遺伝子 (*amy1*) が 1 コピー存在しますが、あまり知見は得られていません。

そこで当センターでは、(1) *A. sojae* 実用株にも α -アミラーゼ遺伝子は 1 コピーしか存在しないのか、(2) *A. sojae* 実用株の α -アミラーゼ遺伝子の構造は *A. oryzae* のそれと比較してどうか、(3) *A. sojae* の α -アミラーゼ遺伝子のプロモーター活性は *A. oryzae* のそれより弱いのか、について調べました（文献 3）。

3. 7 株の *A. sojae* 実用株における α -アミラーゼ遺伝子のコピー数測定

種麹メーカーから分与された 7 株の醤油用麹菌 *A. sojae* から染色体 DNA を調製し、サザン解析という手法で α -アミラーゼ遺伝子のコピー数を測定しました。その結果、7 株の *A. sojae* はいずれも α -アミラーゼ遺伝子を 1 コピー有していました（図 1）。

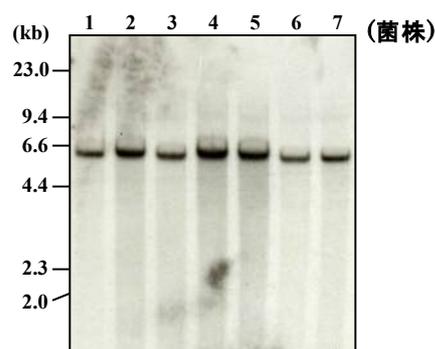


図 1 7 株の *A. sojae* のサザン解析（プロモーター：*taaG2* 遺伝子、菌株 1：KBN1340）

4. *Aspergillus sojae* KBN1340 株由来 α -アミラーゼ遺伝子の解析

次に、代表的な醤油用菌株 *A. sojae* KBN1340 由来の α -アミラーゼ *AstaaG1* 遺伝子を解析しました（アクセッション番号 AB733130）。*AstaaG1* 遺伝子は 8 個のイントロンを含む 2,063 bp から構成されており、498 個のアミノ酸配列からなる AsTaaG1 タンパク質は *Aspergillus* 属糸状菌由来の α -アミラーゼと高い相同性を有していました。プロモーター領域には *A. oryzae* *taaG2* 遺伝子のものと類似した、遺伝子発現に重要な TATA ボックス様配列や CCAAT 様配列、転写活性化因子 AmyR の結合配列や抑制因子 CreA の結合配列が存在しました。しかし、トランスポゾン様配列は近傍に存在しませんでした。

また、*A. sojae* において *AstaaG1* 遺伝子を破壊するとアミラーゼ活性が検出されなくなったため、本遺伝子が α -アミラーゼの生産を担っていることが確認されました。

5. *A. sojae* *AstaaG1* 遺伝子プロモーター活性の評価

A. oryzae のアミラーゼ活性が強い原因の一つは、*taaG2* 遺伝子のプロモーター活性の強さです。

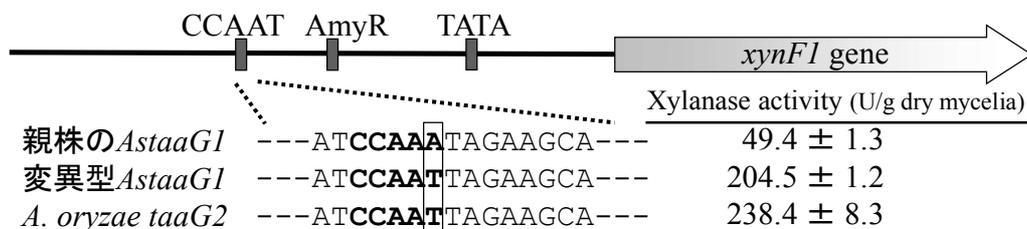


図2 *AstaaG1* 遺伝子プロモーターの CCAAT 様配列の変異解析

このプロモーターに存在する「CCAAT」という塩基配列が重要で、Hap 複合体というタンパク質がこの配列に結合することによって *taaG2* 遺伝子が高発現します。「CCAAT」を「CGTAA」に変えると結合能が消失し、遺伝子発現レベルが30%に低下したと報告されています(文献4)。

A. sojae AstaaG1 遺伝子プロモーターを見ると、「CCAAT」ではなく「CCAAA」が存在します。この違いに着目して、*A. sojae AstaaG1* 遺伝子プロモーター活性を評価しました。キシラナーゼ *xynF1* 遺伝子との融合遺伝子を作製して *A. oryzae* に導入し、デンプン培養時のキシラナーゼ活性を測定することによってプロモーター活性を評価しました(図2)。その結果、対照の *A. oryzae taaG2* 遺伝子プロモーター活性は238ユニットであるのに対し、親株の *A. sojae AstaaG1* 遺伝子プロモーター活性は約5分の1の49ユニットと低く、「CCAAA」を「CCAAT」に置換した変異型 *AstaaG1* プロモーターでは、活性が親株の約4倍(204ユニット)に大きく上昇しました。

6. まとめ

以上の結果から、*A. oryzae* に比べて *A. sojae* の α -アミラーゼ活性(でんぷん分解活性)が弱い原因として、(1) α -アミラーゼ遺伝子の数が少ないこと (2) 同遺伝子プロモーター活性が弱いこと(Hap 複合体の結合能が弱いこと)が明らかになりました。

当センターでは、今後も醸造微生物が関連する課題への取り組みを継続して行いたいと考えています。

文献1 : 寺田ら: 日本醤油研究所雑誌 **6**, 75-81 (1980)

文献2 : Sato, A. et al.: *DNA Res.*, **18**, 165-176 (2011)

文献3 : Yoshino-Yasuda, S. et al.: *Food Sci. Technol. Res.*, **19**, 255-261 (2013)

文献4 : Kato, M. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **254**, 119-126 (1997)

発酵バイオ技術室 : 安田庄子

研究テーマ : 味噌・醤油用麹菌の解析と育種、有用微生物の食品への利用

担当分野 : 発酵調味食品の製造技術、バイオテクノロジー

編集・発行

あいち産業科学技術総合センター食品工業技術センター 平成26年1月16日発行

〒451-0083 名古屋市西区新福寺町2-1-1 TEL 052-521-9316 FAX 052-532-5791

URL : <http://www.aichi-inst.jp/shokuhin/> E-mail: shokuhin@aichi-inst.jp