

研究論文

麹菌 *Aspergillus oryzae* のホスファターゼ遺伝子 に関する研究

安田（吉野）庄子*¹、小野奈津子*²、長谷川撰*²、間野博信*²

Studies on Acid Phosphatase Genes from *Koji* Mold, *Aspergillus oryzae*

Shoko YOSHINO-YASUDA*¹, Natsuko ONO*², Osamu HASEGAWA*²
and Hironobu MANO*²

Food Research Center*^{1*2}

筆者らは麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノム情報上に、黒かび *Aspergillus niger* 由来フィターゼと相同性のある 8 個の推定酸性ホスファターゼ遺伝子 (*aphA* ~ *aphH* 遺伝子) を見出し、これまでに *aphA* 遺伝子および *aphC* 遺伝子についてその酵素の性質を解明した。今回、残り 6 個の未解明 *aph* 遺伝子を、*A. oryzae* において最も強いプロモーターの一つである *taaG2* 遺伝子プロモーターの制御下で発現させたところ、AphG (酸性ホスファターゼ G) が培養液中に大量分泌された。AphG は α -グリセロリン酸を始めとする各種リン酸化合物を分解したが、フィチン酸には作用しなかった。

1. はじめに

醤油や料理酒などの液体発酵調味料において、「清澄さ」は品質を表す重要な指標の一つである。しかし、清澄な製品を供給するための生産技術やコストの諸問題は、今なお業界で話題に上る未解決の課題である。

醤油醸造において原料大豆由来フィチンが未分解のまま醤油諸味中に残存した場合、加熱時に激しい混濁(フィチン^{おろ}垢)が発生する。フィチン垢の発生防止には麹菌の酸性ホスファターゼ (Acid phosphatase : Aph) の一種であるフィターゼが重要な役割を担うと考えられているが、麹菌のフィターゼは分子レベルで十分に解明されていない。麹菌 *A. oryzae* のゲノム情報上には、産業的に重要な *A. niger* 由来フィターゼと相同性のある 8 個の推定 *aph* 遺伝子 (*aphA* ~ *aphH* 遺伝子) が見出されている (表 1)。このうち *aphA* 遺伝子および *aphC* 遺伝子については既にその酵素の性質を解明し、AphA はフィチン酸を分解するが、AphC はフィチン酸を分解しないことを明らかにしている¹⁾²⁾。本研究では、残り 6 個の未解明 *aph* 遺伝子の機能解明を目的として、*A. oryzae* においてこれらの遺伝子の高発現を試みた。

2. 実験方法

2.1 使用菌株および使用培地

株式会社ビオックから分譲された *A. oryzae* KBN630 株を遺伝子供与菌として使用した。醤油用麹菌 *A. oryzae*

KBN616 株を親株として作出した、*alp* 遺伝子および *pyrG* 遺伝子の二重破壊株 *A. oryzae* PDE1 株³⁾ を形質転換用宿主として使用した。*Escherichia coli* DH5 α を種々の DNA 断片のクローニングに使用した。*A. oryzae* の培養は Czapeck 培地を基本培地とし、*A. oryzae* PDE1 株の培養には 0.2% のウリジンを添加した。染色体 DNA の調製には GP 培地¹⁾ を用いた。*A. oryzae* の形質転換株のスクリーニングには SP 寒天培地 (1% Polypeptone、0.1% KH₂PO₄、1% NaNO₃、0.05% MgSO₄·7H₂O、0.2% KCl、2% Soluble Starch、1.5% Agar、0.25% TritonX-100) を使用し、タンパク質分泌生産には RS 培地 (米でんぷん培地)²⁾ を使用した。

表 1 *A. oryzae* ゲノム上の 8 個の推定 *aph* 遺伝子

	Gene ID	GenBank accession number
<i>aphA</i>	AO090023000692	AP007157 / AB042805
<i>aphB</i>	AO090120000167	AP007166
<i>aphC</i>	AO090010000202	AP007175 / AB775132
<i>aphD</i>	AO090011000174	AP007171
<i>aphE</i>	AO090023000448	AP007157
<i>aphF</i>	AO090023000481	AP007157
<i>aphG</i>	AO090124000063	AP007165
<i>aphH</i>	AO090005000912	AP007151

*¹ 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 (現 保蔵包装技術室)

*² 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室

2.2 *A. oryzae* 染色体 DNA の調製、PCR および DNA シークエンス

A. oryzae の染色体 DNA は、*A. oryzae* の菌体を凍結乾燥した後粉砕し、フェノール-クロロホルム法で調製した。PCR 用酵素は、Pfu Ultra II Fusion HS DNA polymerase (Stratagene) および SapphireAmp Fast PCR Master Mix (Takara Bio) を使用し、プロトコルに従って反応を行った。使用したオリゴヌクレオチドプライマーを表 2 に示した。主なクローニングステップでは DNA シークエンシングにより生成物を確認した。

2.3 *A. oryzae* *taaG2* 遺伝子プロモーターの制御下における *aph* 遺伝子の発現

aphB 遺伝子を *A. oryzae* *taaG2* 遺伝子プロモーターの制御下で発現させるために、*aphB* 遺伝子高発現用ベクターを構築した (図 1)。*pyrG* 遺伝子 1.8-kb 断片を *A. oryzae* KBN630 株の染色体 DNA とプライマーペア *fupyrGN* / *pyrGC*²⁾ を用いて PCR 増幅した。*A. oryzae* *taaG2* 遺伝子のプロモーター 0.6-kb 断片はプライマーペア *pyrGtaa* / *taaPrev* を用い、*aphB* 遺伝子 2.0-kb 断片はプライマーペア *taaaphB* / *aphBSal* を用いて同様に PCR 増幅した。増幅した 3 つの DNA 断片と、*Bam*HI / *Sa*II で消化したベクター pUC18 (2.7-kb 断片) の合計 4 種類の DNA 断片を混合し、In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit (Takara Bio) を用いて In-Fusion 反応を行った。*E. coli* コロニー PCR とシークエンシングにより得たプラスミド pTA_AphB を制限酵素 *Bam*HI で直鎖状にし、*A. oryzae* PDE1 株をプロトプラスト-PEG 法により形質転換した。*aphD* 遺伝子、*aphE* 遺伝子、*aphF* 遺伝子、*aphG* 遺伝子、*aphH* および陽性コントロールとしての *aphA* 遺伝子についても、*aphB* 遺伝子と同様に発現ベクターを構築した。発現ベクターの制限酵素消化は、*aphE* 遺伝子の場合は *Sa*II、*aphG* 遺伝子および *aphH* 遺伝子の場合は *Kpn*I を使用し、それ以外は *Bam*HI を使用した。

2.4 酵素活性の測定

酸性ホスファターゼ活性測定は *p*-ニトロフェニルリン酸ナトリウムを基質とし、大池らの方法⁴⁾を若干変更して行った¹⁾。

形質転換株の酸性ホスファターゼ活性スクリーニングは、Czapeck 寒天培地上で単コロニー化した形質転換株を SP 寒天培地上に移して 30°C、4 日間培養した後、ナフチルリン酸寒天 (0.05% 1-ナフチルリン酸ナトリウム水和物、0.05% Fast Blue B salt、1.5% Agar、50 mM 酢酸バッファー (pH 4.0) 中に溶解) を重層して 30°C でインキュベートした。約 10~20 分後にコロニー周辺の色の変化 (黄色から赤褐色への変化) を観察し、

表 2 本研究で使用したオリゴヌクレオチドプライマー

プライマー名	配列(5'→3')
taaaphB	CAGAAGGCATTTATGCTGAATGTGACATCACCATG
aphBSal	ATGCCTGCAGGTGACATTTCCGAACGGCCATTACAAA
taaaphD	CAGAAGGCATTTATGCTGAGTCTTACCCGTCGCCCTAC
aphDsal	ATGCCTGCAGGTGACACTGAGATGATCATGATCGGAT
taaaphE	CAGAAGGCATTTATGCTGCACTTATTCAGCCCCAAA
aphEsal	ATGCCTGCAGGTGACCCGGTCGGAGGAAGAGGATATTC
taaaphF	CAGAAGGCATTTATGGGCGTGACACTAAGAACCTTGT
aphFsal	ATGCCTGCAGGTGACCATGTGCTCACGTGGGTGCTGA
taaaphG	CAGAAGGCATTTATGAAGAACCCTTACCTTTGGCGTAT
aphGsal	ATGCCTGCAGGTGACATCACTGCTAGCTTCCCTAATTC
taaaphH	CAGAAGGCATTTATGCAGGACATGGTTTTTGCCTCC
aphHsal	ATGCCTGCAGGTGACAATACGGAGTAGAACAACGCATG
M13Forward(-38)/IRD800	IRD800-TTCCCAGTCACGACGTTG
TAApromoter/IRD800	IRD800-TTGGAGGATAGCAACCGACAAC

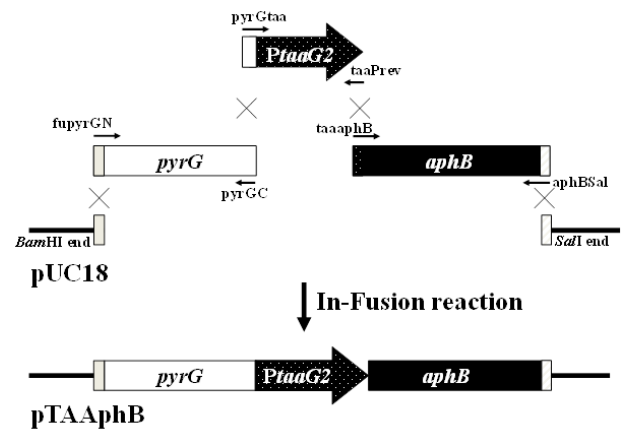


図 1 遺伝子高発現用ベクター pTA_AphB の構築

形質転換株の酸性ホスファターゼ活性の強さを判定した。

基質特異性は、100 mM 酢酸バッファー (pH 4.0) に溶解した 2 mM の基質溶液中で酵素液を 40°C、10 分インキュベートし、遊離した無機リン酸量を Phosphor C Test Kit (Wako) を用いて測定した。

フィチンプレートによるフィターゼ活性の検出は、フィチンプレート (0.5% フィチン酸ナトリウム、0.1% 塩化カルシウム、1.5% Agar、pH6.2) を作製し、その上に抗生物質検定用ペーパーディスクを置いて培養ろ液 50 μ l をアプライした。37°C で 2 日間インキュベートした後、ディスクの周りのハローを観察した。

2.5 タンパク質の解析

培養液を 15,000 \times g で 5 分間遠心分離後、上清 10 μ l を SDS-12.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。

3. 実験結果および考察

3.1 *A. oryzae* *taaG2* 遺伝子プロモーターの制御下にお

ける *aph* 遺伝子の発現

A. oryzae ゲノム上の 6 個の未解明 *aph* 遺伝子について、各遺伝子がコードするタンパク質が分泌生産されるか、また分泌生産されたタンパク質が酸性ホスファターゼ活性およびフィターゼ活性を有するかを明らかにするために、*A. oryzae* において最も強いプロモーターの一つである *taaG2* 遺伝子プロモーターの制御下で、これらの遺伝子を発現させることを試みた。

遺伝子高発現用ベクター (pTAAphB、pTAAphD、pTAAphE、pTAAphF、pTAAphG、pTAAphH および pTAAphA) は各 3 クローンずつシーケンシングし、ミスマッチ塩基導入のないクローンを選択した。コード領域の塩基配列を *A. oryzae* RIB40 株のゲノム配列と比較した結果、*aphB* 遺伝子は 24 bp 異なっており、*aphD* 遺伝子は 14bp、*aphE* 遺伝子は 3 bp、*aphF* 遺伝子は 6 bp、*aphG* 遺伝子は 1 bp、*aphH* 遺伝子は 1 bp 異なっていた。既に解析した *aphA* 遺伝子配列については、RIB40 株と KBN630 株間で 100%一致したが、*aphC* 遺伝子配列については 25bp 異なっていた。このことから、推定 *aph* 遺伝子の塩基配列は株間によって異なっており、アミノ酸配列にも違いがある場合は酵素学的性質にもいくらかの差異が生じると考えられた。また、*aph* 遺伝子の塩基配列の差異を利用して株間を区別することも可能と考えられた。

構築した 7 種類の *aph* 遺伝子高発現用ベクターを制限酵素消化により直鎖状にし、これらを用いて組換えタンパク質生産用の宿主 *A. oryzae* PDE1 株を形質転換した。

3.2 形質転換株の酸性ホスファターゼ活性とタンパク質の解析

多数の形質転換株が得られ、そのうち各 20 株を単一コロニー化後、液体培養した。陰性対照として、*A. oryzae* PDE1 株に *pyrG* 遺伝子を導入した control-1、control-2 および control-3 株を培養した。培養液中の酸性ホスファターゼ活性を測定し、それぞれ上位 3 株の活性を表 3 に示した。pTAAphG 導入株である *aphG-2* 株、*aphG-1* 株および *aphG-3* 株の活性が約 200 unit / ml と他の遺伝子ベクター導入株に比べて非常に高い値を示した。次いで陽性コントロールである *aphA-6* 株 (pTAAphA 導入株) の活性が 28.5 unit / ml と高い値を示した。

遺伝子ごとに最も活性の高い株の培養液を用いて SDS-PAGE 解析を行った (図 2)。陽性コントロールとしての *aphA-6* 株の培養液では分子量約 58 ~ 69 kDa のブロードな濃いバンドが認められ (図 2、レーン 2)、AphA (酸性ホスファターゼ A) が大量に分泌生産されたことが示唆された。この AphA の分子量は、以前に *A. oryzae* *TEF1* 遺伝子プロモーターを用いて分泌生産

表 3 形質転換株の培養液中の Aph 活性

形質転換株	Aph活性 (unit / ml)	形質転換株	Aph活性 (unit / ml)
<i>aphA-6</i>	28.5	<i>aphF-4</i>	1.5
<i>aphA-18</i>	3.5	<i>aphF-13</i>	1.2
<i>aphA-11</i>	3.0	<i>aphF-5</i>	0.9
<i>aphB-1</i>	0.3	<i>aphG-2</i>	205.2
<i>aphB-18</i>	0.3	<i>aphG-1</i>	178.7
<i>aphB-14</i>	0.2	<i>aphG-3</i>	177.1
<i>aphD-17</i>	0.5	<i>aphH-7</i>	2.3
<i>aphD-18</i>	0.2	<i>aphH-1</i>	2.3
<i>aphD-19</i>	0.4	<i>aphH-20</i>	1.7
<i>aphE-1</i>	0.4	control-1	0.0
<i>aphE-4</i>	0.0	control-2	0.0
<i>aphE-15</i>	0.0	control-3	0.0

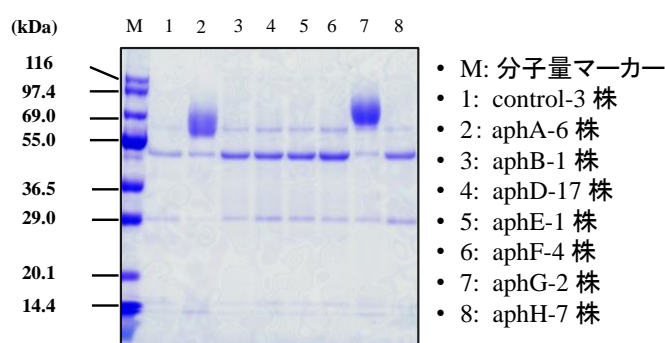


図 2 培養液の SDS-PAGE

させた時のもの¹⁾とほぼ一致した。また、*aphG-2* 株の培養液では約 65 ~ 80 kDa のブロードな濃いバンドが認められた (図 2、レーン 7)。タンパク質の N 末端アミノ酸配列解析等で確認する必要があるが、*aphG-2* 株の培養液には AphG (酸性ホスファターゼ G) が大量に分泌生産されたことが示唆された。一方、*aphB-1* 株、*aphD-17* 株、*aphE-1* 株、*aphF-4* 株および *aphH-7* 株の培養液中には、陰性コントロール株の control-3 株の培養液と比較して、新たに増加したタンパク質バンドは認められなかった (図 2、レーン 1、3、4、5、6、8)。したがって、*aphB-1* 株、*aphD-17* 株、*aphE-1* 株、*aphF-4* 株および *aphH-7* 株では、それぞれ AphB、AphD、AphE、AphF、AphH は大量には分泌生産されなかったことが示唆された。

そこで新たに形質転換を行い、追加取得した形質転換株各 100 株を単一コロニー化した後、酸性ホスファターゼ活性をプレートアッセイ法によりスクリーニングした。しかし、赤褐色ハローが形成された株、すなわち顕著に活性の上昇した株は 1 株も認められなかった。したがって、*aphB*、*aphD*、*aphE*、*aphF*、*aphH* 遺伝子の産物 (AphB、AphD、AphE、AphF、AphH の各タンパク質) は酸性ホスファターゼとしての機能を持たないか、ある

いは機能を持っていても麹菌における分泌生産効率は低いと考えられた。この結果は、以前に行った *A. oryzae* KBN630 株の *aphB*、*aphD*、*aphE*、*aphF*、*aphH* 遺伝子破壊の豆麹における解析結果²⁾とほぼ一致した。

3.3 AphG の基質特異性

aphG-2 株の培養透析液を用いて AphG の基質特異性を試験した (表 4)。基質は *p*-ニトロフェニルリン酸、フィチン酸、 α -グリセロリン酸、ピロリン酸、グルコース 6 リン酸、グアニル酸およびイノシン酸を使用した。*p*-ニトロフェニルリン酸に対する分解活性 (脱リン酸活性) を 100% として各基質に対する相対分解活性を調べたところ、 α -グリセロリン酸に対して 56.9%、ピロリン酸に対して 23.6% と高い分解活性を示し、グルコース 6 リン酸に対して 4.1%、グアニル酸に対して 4.4%、イノシン酸に対して 1.3% のように、AphG は広い基質特異性を示した。しかし、フィチン酸に対しては 0.0% であり、分解活性を示さなかった。つまり、AphG はフィターゼ活性を持たない酸性ホスファターゼであることが示唆された。AphG の基質特異性は、AphC や AphA のそれとは異なっていた。

フィチンプレートを用いて培養液中のフィターゼ活性の検出を試みた (図 3)。フィチンプレートはフィチン酸カルシウムにより白濁している。AphA はフィターゼ活性を持つことが分かっており¹⁾、AphA を含む *aphA*-6 株の培養液では透明なハローと白いリングが形成された。一方、AphG が大量に含まれる *aphG*-2 株の培養液では、全く変化がなかった。この方法によっても AphG はフィターゼ活性を持たないことが示唆された。

以上のように *aphG* 遺伝子は強力なプロモーターの制御下で高発現し AphG が大量に分泌生産された。そして AphG はフィターゼ活性を持たない酸性ホスファターゼであることが明らかになった。一方、以前行った *A. oryzae* KBN630 株の遺伝子破壊解析では、豆麹中では *aphG* 遺伝子は機能していないと考えられた²⁾。麹における *aphG* 遺伝子の役割を明らかにするためには、複数の *A. oryzae* 菌株を用いてさらに解析する必要がある。

4. 結び

醤油醸造において大豆や小麦のフィチンは早い段階で諸味中に溶出する⁵⁾との報告から、フィチン分解において溶出過程は律速でなく、フィターゼによる分解過程が重要であると考えられる。今後 *aphA* 遺伝子破壊株のフィターゼ活性を調べる必要はあるが、これまでの研究結果¹⁾²⁾⁵⁾と本研究結果から、麹菌 *A. oryzae* のフィターゼの本体は AphA であると推定される。したがって、フィチンを効率的に分解するためには、*aphA* 遺伝子の発

表 4 AphG の基質特異性および AphC、AphA との比較

基質	各基質に対する脱リン酸活性 (%)		
	AphG	AphC	AphA
<i>p</i> -ニトロフェニルリン酸	100.0	100.0	100.0
フィチン酸	0.0	0.0	54.0
α -グリセロリン酸	56.9	12.1	49.2
ピロリン酸	23.6	16.2	33.3
グルコース 6 リン酸	4.1	6.5	43.4
グアニル酸	4.4	19.2	8.1
イノシン酸	1.3	37.3	6.9

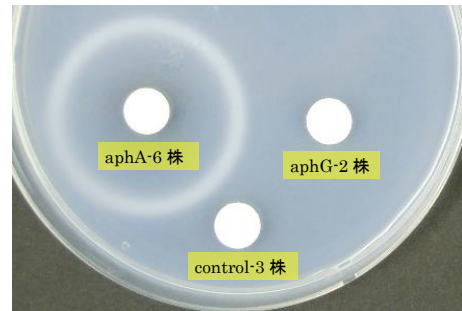


図 3 培養液中のフィターゼ活性の検出

現⁶⁾⁷⁾や分泌生産のメカニズム解明により AphA が十分に生産される製麹条件を見出すとともに、諸味中で AphA が失活しにくい条件を見出すことが重要である。

現時点でフィチン防止に有効な具体的方法は、①製麹後 (仕込直前) の麹のフィターゼ活性を測定し、活性の明らかに低い麹を用いて仕込まないこと、②AphA の温度安定性 (活性を保持できる温度) は緩衝液中の場合で 35°C 以下と低い¹⁾ため、フィチン分解が進行する諸味前期には温度を低めに保つこと、が考えられる。

謝辞

本研究の実験にご協力を頂いた相山女学園大学卒業生の庄司亜沙美氏に感謝の意を表します。

文献

- 1) S. Yoshino-Yasuda *et al.* : *Food Sci. Technol. Res.*, **18**, 59(2012)
- 2) S. Yoshino-Yasuda *et al.* : *Food Sci. Technol. Res.*, **20**, 367(2014)
- 3) N. Kitamoto *et al.* : *Food Sci. Technol. Res.*, **21**, 297(2015)
- 4) 大池ら : 味噌の科学と技術, **32**, 22 (1984)
- 5) 大友ら : 日本醤油研究所雑誌, **20**, 85 (1994)
- 6) J. Marui *et al.* : *Food Sci. Technol. Res.*, **18**, 83(2012)
- 7) J. Marui *et al.* : *International Journal of Food Microbiol.*, **166**, 238(2013)