研究論文

豆味噌のイソフラボンアグリコン生成に寄与する麹菌 β-グルコシダーゼ遺伝子の同定

小野奈津子[*1]、安田(吉野)庄子[*2]、北本則行[*3]

Identification of β-Glucosidases from *Miso Koji* Mold, *Aspergillus oryzae*, Producing Isoflavone Aglycones in Soybean-*Miso*

Natsuko ONO[*1], Shoko YOSHINO-YASUDA[*2] and Noriyuki KITAMOTO[*3]

Food Research Center[*1*2*3]

味噌用麹の遺伝子発現量データを取得し、麹菌ゲノム情報から推定した 26 個の β-グルコシダーゼ関連遺伝子のうち、イソフラボンアグリコン生成に寄与する遺伝子候補を 10 個推定し、遺伝子破壊株を作製した。*AoCel3A* 遺伝子(AO090009000356)の破壊株で調製した豆麹では、β-グルコシダーゼ活性が 80%以上低下し、イソフラボンアグリコンが 30%以上減少した。この結果から *AoCel3A* 遺伝子は豆味噌のイソフラボンアグリコンの生成に寄与する遺伝子のひとつであることが示唆された。

1. はじめに

大豆や大豆加工食品に含まれるイソフラボン類は、エストロゲン様作用[1)]、骨粗しょう症予防作用[2)]、抗酸化作用[3)]および抗ガン作用[4)]などの生理活性を示す成分として注目されている。味噌・醤油・テンペ等の大豆発酵食品においては、原料大豆のイソフラボン配糖体(グリコシド)の一部または全部が β-グルコシダーゼによって糖が外され、ダイゼインやゲニステインなどのアグリコンに変換されている。変換されたアグリコンは元のグリコシドよりも顕著に高い生理活性を示す[5)]。愛知県を中心に生産されている豆味噌(八丁みそ・三州みそ・名古屋みそ等)では原料大豆由来のイソフラボングリコシドのほぼ 100%がアグリコンに変換されているとの報告がある[6),7)]。当センターでも**表 1** のように、県内 A 社の豆味噌と米味噌に含まれるイソフラボンを分析し、豆味噌からは配糖体であるダイジンとゲニスチンは検出されず、それぞれのアグリコンであるダイゼインとゲニステインが多く検出されることを確認している。一方、米味噌からは配糖体型とアグリコン型の両方が検出されている。また**表 2** のように、豆麹(豆味噌用の大豆麹)および米麹(米味噌用の米麹)に含まれる β-グルコシダーゼ活性を測定したところ、豆麹中の活性は米麹中の活性の 150 倍以上も高かった。これらのことから、豆味噌におけるイソフラボンのアグリコン変換率の高さは、麹菌 *Aspergillus oryzae* が大豆を基質として培養された際に産生する β-グルコシダーゼ群の働きに起因すると考えられるが、その詳細は明らかでない。そこで本研究では、分子生物学的手法を用いて、豆味噌のイソフラボンアグリコン生成に寄与する麹菌 β-グルコシダーゼ遺伝子の同定を試みた。

表 1　県内 A 社で製造された豆味噌と米味噌のイソフラボン分析値

	Isoflavone content (mg/100g wet)			
	Glucosides		Aglycones	
	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein
soybean-*miso*	ND	ND	29.2	29.3
rice-*miso*	7.6	9.8	8.5	9.7

ND, not detected.

表 2　豆麹と米麹の β-グルコシダーゼ活性

	β-Glucosidase activity (mU /g *koji* culture)
soybean-*koji*	616 ± 18
rice-*koji*	4 ± 1

Activity of two independent experiments is presented as average ± standard deviation.

2. 実験方法

2.1 使用菌株および使用培地

遺伝子供与菌として味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株((株)ビオック)を使用した。形質転換用宿主として *A. oryzae* KBN630-P17L90 株(*ligD*⁻, *pyrG*⁻)[8)]を使用した。*E.coli* DH5α を DNA 断片のクローニングに使用した。

*1 食品工業技術センター　発酵バイオ技術室　*2 食品工業技術センター　保蔵包装技術室　*3 食品工業技術センター　保蔵包装技術室(現 至学館大学健康科学部)

A. oryzae の培養は Czapek 培地を基本とし、染色体 DNA 調製時には GP 培地を用いた。

2.2 味噌用豆麹および米麹の遺伝子発現量解析

A. oryzae KBN630 株を用いてフラスコスケールで味噌用豆麹および米麹を調製し、液体窒素冷却下で粉砕して RNA 調製に供した。豆麹 RNA の調製には TRIzol Reagent(Thermo Fisher Scientific)を、米麹 RNA の調製には RNAiso Plus および High-Salt Solution for Precipitation(Plant)(Takara Bio)を使用し、PureLink RNA Mini Kit(Thermo Fisher Scientific)で各 RNA を精製した。独立行政法人酒類総合研究所において cDNA 調製と断片化処理後、麹菌 DNA マイクロアレイ解析(Affimetrix)に供した。

2.3 *A.oryzae* 染色体 DNA の調製および PCR

A. oryzae の染色体 DNA は、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 (Agilent) および SapphireAmp Fast PCR Master Mix(Takara Bio)を使用した。使用したオリゴヌクレオチドプライマーを**表 3** に示した。

2.4 遺伝子破壊株の作製

遺伝子破壊用ベクターは次のように構築した。*A. oryzae* RIB40 株のゲノム情報 [9]から、表 3 の 5'-隣接領域 1.0kb 増幅用プライマーP1/P2 および 3'-隣接領域 1.0kb 増幅用プライマーP3/ P4 を合成した。形質転換マーカー *pyrG* 遺伝子断片増幅用のプライマーは、pyrGN2/pyrGC2 を使用した [8]。*A. oryzae* KBN630 株の染色体 DNA を鋳型とする PCR により得られた 3 つの増幅断片を、In-Fusion HD Cloning Kit(Clontech)を用いて pUC18 の *Bam*HI /*Sal* I 制限サイトに組込んだ。このプラスミドを鋳型として、プライマーP1/P4 を用いた PCR により遺伝子破壊用 DNA 断片を増幅し、*A. oryzae* KBN630-P17L90 株をプロトプラスト-PEG 法により形質転換した。遺伝子破壊の確認は、形質転換体の染色体 DNA をテンプレートとしてプライマーP1/P4 を用いた PCR を行った。

表 3 本研究で使用したオリゴヌクレオチドプライマー

Gene name	Primers	Sequence (5' to 3')	Direction
AoCel1A	AoCel1A-1	CGGTACCCGGGGATCGAGCTACATGTTGGTGCCTAAG	Forward
	AoCel1A-2	TTCCAGCAGGCCTTGCTGCGACGAACTCTTCCTTATTG	Reverse
	AoCel1A-3	ATTGATCAGGCCTTTCGCAAAAGATGTCTCGCAAG	Forward
	AoCel1A-4	ATGCCTGCAGGTCGACAAACGGCCATAGCTTCACTTAG	Reverse
AoCel3A	AoCel3A-1	CGGTACCCGGGGATCGAGACAGCAAGCAAGGAATACATC	Forward
	AoCel3A-2	TTCCAGCAGGCCTTGCGCAAAAAGTACACCGGTG	Reverse
	AoCel3A-3	ATTGATCAGGCCTTTCCGACTCAGGAGAAGGCTATC	Forward
	AoCel3A-4	ATGCCTGCAGGTCGACCAGTTTGCAAGGTCACGAC	Reverse
AoCel3D	AoCel3D-1	CGGTACCCGGGGATCCGTGGTGGTGTAGGTAGTTG	Forward
	AoCel3D-2	TTCCAGCAGGCCTTGCTGTAGGTACCGAACCAATCACTC	Reverse
	AoCel3D-3	ATTGATCAGGCCTTTATGGGAAACCGAGGGCTAC	Forward
	AoCel3D-4	ATGCCTGCAGGTCGATCCGCTGCGAAGAGTCTTAG	Reverse
AoCel3E	AoCel3E-1	CGGTACCCGGGGATCGGGAGTATCACCCAGATAGGAATG	Forward
	AoCel3E-2	TTCCAGCAGGCCTTGCGTTGATCTTGTTGTAGGACGTATC	Reverse
	AoCel3E-3	ATTGATCAGGCCTTTGTACACTTTGGTGGCGGTG	Forward
	AoCel3E-4	ATGCCTGCAGGTCGACCCCCACAGCATTAAGCTAAAG	Reverse
AoCel3F	AoCel3F-1	CGGTACCCGGGGATCAGGAAGCTCTGCTGAATCCAG	Forward
	AoCel3F-2	TTCCAGCAGGCCTTGAGAATCCCACAAAGTGCTTGAC	Reverse
	AoCel3F-3	ATTGATCAGGCCTTTGCTGGAGCAACGACCAATC	Forward
	AoCel3F-4	ATGCCTGCAGGTCGACCAAGGCTAACTCCTCAATCAC	Reverse
AoCel3G	AoCel3G-1	CGGTACCCGGGGATCTGGCCTGACTAATGGACTGATG	Forward
	AoCel3G-2	TTCCAGCAGGCCTTGCATGCCATCGTAGTTCATATCCTTC	Reverse
	AoCel3G-3	ATTGATCAGGCCTTTAGCTACCCGGAGTCCAAAGTC	Forward
	AoCel3G-4	ATGCCTGCAGGTCGACCTTTATATACGTTGGTTCCTGGAG	Reverse
AoCel3I	AoCel3I-1	CGGTACCCGGGGATCGTTGGTCACGACACTGGTGTG	Forward
	AoCel3I-2	TTCCAGCAGGCCTTGTAGACTTCATGCAATACCGCCTC	Reverse
	AoCel3I-3	ATTGATCAGGCCTTTGTAGTGAAGGTGGGCATGGTC	Forward
	AoCel3I-4	ATGCCTGCAGGTCGATCGTATACGCGGTACTCGAATC	Reverse
AoCel3L	AoCel3L-1	CGGTACCCGGGGATCTGCCCATGGTGGATGATAC	Forward
	AoCel3L-2	TTCCAGCAGGCCTTGAGGATTCCATTGATGAGCTTG	Reverse
	AoCel3L-3	ATTGATCAGGCCTTTATCTGCCTTACACAATCCCTCAC	Forward
	AoCel3L-4	ATGCCTGCAGGTCGATTGAAGATGGCGCGATTC	Reverse
AoCel3N	AoCel3N-1	CGGTACCCGGGGATCCTTCCATGCATTATCATTCGTC	Forward
	AoCel3N-2	TTCCAGCAGGCCTTGACTCAGGCAAGCATGCATC	Reverse
	AoCel3N-3	ATTGATCAGGCCTTTGGTGGAGAATTGGAACGAAG	Forward
	AoCel3N-4	ATGCCTGCAGGTCGACCATTGGACATGTGCTCGTATATG	Reverse
AoCel3O	AoCel3O-1	CGGTACCCGGGGATCGATTGGCTCATCCAGGGTC	Forward
	AoCel3O-2	TTCCAGCAGGCCTTGAAACACCTCATGCAAGGCAC	Reverse
	AoCel3O-3	ATTGATCAGGCCTTTGATTGATCTCCCAGGCGTG	Forward
	AoCel3O-4	ATGCCTGCAGGTCGACATGGTGACCTCGCTAGTGTTG	Reverse

2.5 遺伝子破壊株評価用の豆麹の調製

2.4 で作製した遺伝子破壊株及び対照として親株の *A. oryzae* KBN630 株を Czapek 寒天培地一面に植菌し胞子を形成させた。北海道産大豆を約 1.7 倍の重量になるまで水に浸漬し、オートクレーブを用いて蒸煮(100℃ 30 分間、その後に 121℃5 分間)した。蒸煮大豆を直径 10mm、長さ 30mm の玉型に成形し、フラスコに入れ、121℃5 分間滅菌した。玉型の蒸煮大豆 30g、乾熱滅菌した香煎 0.3g、麹菌胞子(寒天培地 1cm 角相当)を混合し 67 時間製麹した。

2.6 豆麹の酵素活性測定

豆麹を凍結乾燥し、粉砕した粉末に 0.01%Tween80-0.5%NaCl 溶液を加え、20℃で 2 時間振とう抽出し、遠心分離して得られた上清を酵素液として分析に供した。β-グルコシダーゼ活性は Esaki ら [10]の方法を若干変更し、*p*-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシドを基質として 40℃で 30 分間反応させて行った。α-アミラーゼ活性は、α-アミラーゼ測定キット(キッコーマンバイオケミファ(株))を用い測定した。

2.7 豆麹中のイソフラボン組成の分析

江崎ら [11]の方法を若干変更して、豆麹を凍結乾燥し、粉砕した粉末に 70%エタノールを加え、20℃で 16 時間振とう抽出し、遠心分離して得られた上清を HPLC によるイソフラボン組成の分析に供した。HPLC による分析は厚生労働省の食安発第 0823001 号別紙の食品中の大豆イソフラボンアグリコン(アグリコン当量)の試験方法 [12]に従って行った。

3. 実験結果及び考察

3.1 味噌用豆麹および米麹の遺伝子発現量解析

2.2 に示した方法で、味噌用豆麹および米麹における麹菌の遺伝子発現量を網羅的に解析した。得られた遺伝子発現量データを活用することにより、目的の遺伝子が各麹中でどの程度働いているかを推定できる。**表 4** に示すように、麹菌ゲノム情報から 26 個の β-グルコシダーゼ関連遺伝子を推定し、豆麹中の発現量(シグナル強度)の大きい順に並べた。「豆味噌のイソフラボンアグリコ

表 4　麹菌が有する 26 個の推定 β-グルコシダーゼ関連遺伝子の発現量

Gene name	Gene ID (AspGD[9])	Signal intensity	
		Soybean-*koji*	Rice-*koji*
AoCel1A	AO090003000497	8760	628
AoCel3A	AO090009000356	7215	1065
AoCel3B	AO090103000120	6374	14
AoCel1B	AO090113000148	5559	14
AoCel3C	AO090012000135	4467	14
AoCel3D	AO090701000244	3661	398
AoCel3E	AO090166000090	3640	157
AoCel3F	AO090701000274	3490	246
AoCel3G	AO090003000741	1841	1158
AoCel3H	AO090011000140	1424	26
AoCel1C	AO090120000075	951	48
AoCel3I	AO090005000337	832	251
AoCel3J	AO090701000841	725	1
AoCel3K	AO090038000223	559	22
AoCel3L	AO090001000544	523	185
AoCel3M	AO090026000123	261	2
AoCel3N	AO090103000019	255	433
AoCel3O	AO090009000554	242	381
AoCel3P	AO090003001511	69	10
AoCel3Q	AO090010000034	25	26
AoCel3S	AO080521000341*	15	20
AoCel3T	AO090001000266	9	99
AoCel3U	AO090103000127	9	6
AoCel3V	AO090166000048	6	6
AoCel3W	AO090012000003	5	2
AoCel3X	AO090038000425	5	26

AoCel1 group；Glycoside Hydrolase Family 1
AoCel3 group；Glycoside Hydrolase Family 3
*CAoGD[13]による

ン生成に寄与する遺伝子は、豆麹で発現量が高く、米麹でも一定の発現量が見られるもの」と仮定し、網掛けで示した 10 個の遺伝子(*AoCel1A*、*AoCel3A*、*AoCel3D*、*AoCel3E*、*AoCel3F*、*AoCel3G*、*AoCel3I*、*AoCel3L*、*AoCel3N*、*AoCel3O*)を次の試験候補として選定した。

3.2 遺伝子破壊株の作製

3.1 で選定した 10 個の β-グルコシダーゼ関連遺伝子について、**2.4** の方法で破壊株を作製した。PCR による確認を行った結果(**図 1**)、ΔAoCel3A(ΔAoCel3A は *AoCel3A* 遺伝子破壊株)から ΔAoCel3O の 10 株ではいずれも目的遺伝子のバンドのみがシフトしており、目的の遺伝子破壊株であることが示された。P1 プライマーの更に上流で作製した P5 プライマーと P4 プライマーの PCR によっても確認した(データ省略)。

3.3 遺伝子破壊株を用いたフラスコ豆麹の酵素活性

3.2 で得られた 10 株の遺伝子破壊株および親株を用いてフラスコスケールで豆麹を調製し、β-グルコシダーゼ活性および α-アミラーゼ活性を測定した(**表 5**)。β-グルコシダーゼ活性は、ΔAoCel3A で親株の 16%と大きく低下し、その他の 9 株の遺伝子破壊株ではほとんど低下しなかった。この結果から、*AoCel3A* 遺伝子は豆麹中の主要な「*p*-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシドを基質とする β-グルコシダーゼ活性」を担う遺伝子であることが示唆された。α-アミラーゼ活性は、10 株の遺伝子破壊株と親株でほとんど差がなかったことから、選定した遺伝子の破壊は豆麹の α-アミラーゼ活性にほとんど影響を与えないことが示唆された。

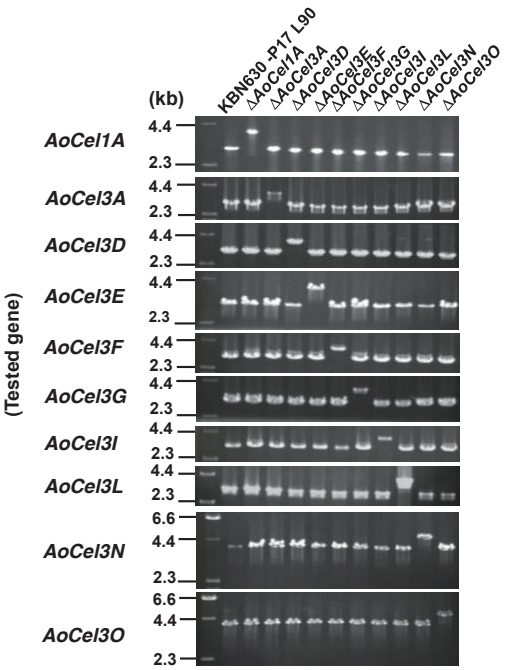

図 1　PCR による遺伝子破壊の確認

表 5　遺伝子破壊株を用いたフラスコ豆麹の酵素活性

Strain	Enzyme activity (units/g *koji*) (% of control)	
	β-Glucosidase	α-Amylase
ΔAoCel1A	2.6 ± 0.1 (113)	1,180 ± 111 (109)
ΔAoCel3A	0.4 ± 0.0 (16)	1,250 ± 48 (115)
ΔAoCel3D	3.7 ± 0.0 (164)	1,020 ± 8 (94)
ΔAoCel3E	2.5 ± 0.0 (111)	1,050 ± 32 (96)
ΔAoCel3F	2.6 ± 0.4 (114)	1,050 ± 105 (97)
ΔAoCel3G	2.4 ± 0.1 (105)	1,170 ± 66 (107)
ΔAoCel3I	2.6 ± 0.3 (112)	1,040 ± 108 (96)
ΔAoCel3L	3.0 ± 0.8 (133)	1,040 ± 177 (96)
ΔAoCel3N	2.1 ± 0.1 (91)	1,060 ± 90 (97)
ΔAoCel3O	2.3 ± 0.0 (101)	987 ± 92 (91)
KBN630	2.3 ± 0.1 (100)	1,090 ± 35 (100)

3.4 遺伝子破壊株を用いた豆麹のイソフラボン組成

次に各豆麹のイソフラボン組成を分析した(**表 6**)。ΔAoCel3A において、配糖体であるダイジンが親株に対して 196%、同じく配糖体であるゲニスチンが 181%と増加した。更に、アグリコンであるダイゼインが 72%、同じくアグリコンであるゲニステインが 60%に減少した。ΔAoCel3N では配糖体型イソフラボンが約 140%に増加したがアグリコン型イソフラボンは減少しなかった。その他の 8 株の遺伝子破壊株においては、いずれも大きな変化は認められなかった。この結果から、豆麹中では

表 6　遺伝子破壊株を用いた豆麹のイソフラボン組成

Strain	Isoflavone content (mg/100g *koji*) (% of control)			
	Glucosides		Aglycones	
	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein
ΔAoCel1A	32 ± 5 (87)	43 ± 6 (106)	23 ± 1 (108)	12 ± 1 (115)
ΔAoCel3A	71 ± 0 (196)	70 ± 0 (181)	15 ± 1 (72)	6 ± 1 (60)
ΔAoCel3D	23 ± 1 (62)	32 ± 2 (83)	23 ± 0 (108)	12 ± 0 (116)
ΔAoCel3E	29 ± 2 (79)	39 ± 3 (102)	19 ± 0 (90)	10 ± 0 (96)
ΔAoCel3F	34 ± 8 (93)	46 ± 8 (118)	24 ± 1 (111)	11 ± 0 (110)
ΔAoCel3G	37 ± 6 (103)	46 ± 5 (120)	23 ± 1 (108)	11 ± 0 (108)
ΔAoCel3I	30 ± 1 (83)	41 ± 4 (106)	22 ± 0 (104)	11 ± 0 (109)
ΔAoCel3L	32 ± 8 (87)	36 ± 8 (93)	22 ± 2 (105)	10 ± 1 (102)
ΔAoCel3N	53 ± 4 (145)	53 ± 4 (138)	21 ± 2 (101)	11 ± 0 (107)
ΔAoCel3O	37 ± 9 (101)	41 ±10 (106)	23 ± 0 (110)	12 ± 1 (114)
KBN630	37 ± 6 (100)	39 ± 4 (100)	21 ± 2 (100)	10 ± 0 (100)

Activity of two independent experiments is presented as average ± standard deviation.

AoCel3A 遺伝子産物が配糖体であるダイジンおよびゲスチンに作用し、アグリコンであるダイゼインおよびゲニステインに変換する働きを担っていることが示唆された。ただし、アグリコンの減少は約 30~40%に留まっていたことから、*AoCel3A* 遺伝子以外にも他の遺伝子産物が両イソフラボンのアグリコン化に寄与する可能性が示された。すなわち ΔAoCel3A において他の β-グルコシダーゼ関連遺伝子の発現量が上がり補完的に働いている可能性、あるいは 8 遺伝子以外の別の遺伝子が別途働いている可能性の両方が考えられる。

4. 結び

本研究の結果は、以下のとおりである。

(1) 味噌用豆麹および米麹の遺伝子発現量データを取得し、麹菌ゲノム情報から推定した 26 個の β-グルコシダーゼ関連遺伝子のうち、イソフラボンアグリコン生成に寄与する遺伝子候補を 10 個推定した。

(2) (1)で選定した遺伝子の破壊株を作製し、 PCR による遺伝子破壊の確認を行った。

(3) *AoCel3A* 遺伝子(AO090009000356)の破壊株で調製した豆麹では、β-グルコシダーゼ活性が 80%以上低下し、イソフラボンアグリコン(ダイゼインおよびゲニテイン)が 30%以上減少した。この結果から *AoCel3A* 遺伝子は豆味噌のイソフラボンアグリコンの生成に寄与する遺伝子のひとつであることが示唆された。

謝辞

本研究の実施に当たって、麹菌 DNA マイクロアレイ解析にご協力頂いた独立行政法人酒類総合研究所の岩下和裕博士および研究所の皆様にお礼申し上げます。味噌用麹の作製方法をご教示下さった(株)ビオックの和久豊博士と社員の皆様に感謝します。

付記

本研究は、公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団の平成 28 年度研究助成を受けて実施した。

文献

1) Potter, SM., Baum, JA., Teng, H., Stillman, RJ., Shay, NF., Erdman Jr, JW: *Am J Clin Nutr.*, **68**(6), 1375S(1998)

2) Uesugi, S., Watanabe, S., Ishiwata, N., Uehara, M., Ouchi, K: *Biofactors.*, **22**(1-4), 221(2004)

3) 池田稜子, 太田直一, 渡辺忠雄: 日本食品科学工学会誌, **42**(5), 322(1995)

4) 清澤功:日本醸造協会誌, **94**(8), 620(1999)

5) Izumi, T., Piskula, MK., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y., Kikuchi, M: *J Nutr.*, **130**(7), 1695(2000)

6) 畑中咲子, 毛利哲, 高橋清, 山田勝男: 日本醸造協会誌, **103**(12), 922(2008)

7) 前河裕一, 熊取厚志, 長村洋一: 生物試料分析, **35**(4), 316(2012)

8) 安田(吉野)庄子, 増田裕一郎, 加藤雅士, 小野奈津子, 長谷川摂, 北本則行: あいち産業科学技術総合センター研究報告, **2**, 88(2013)

9) The Aspergillus Genome Database (AspGD): http://www.aspergillusgenome.org/(2021/06/10)

10) Esaki, H., Watanebe, R., Onozaki, H., Kawakishi, S., Osawa, T: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**(5), 851(1999)

11) 江崎秀男, 川岸舜朗, 井上昴, 大澤俊彦: 日本食品科学工学会誌, **48**(1), 51(2001)

12) 厚生労働省: 食安発第 0823001 号(2006)

13) NRIB: Comprehensive Aspergillus oryzae Genome Database(CAoGD):https://nribf21.nrib.go.jp/CAoGD/prj.cgi?prj=02201(2021/06/14)