

和食のおいしさに関わる微生物— 麹菌のゲノム解析から育種研究への展開



研究ノート

楠 本 憲 一*

koji mold, related with palatability of the Japanese dietary culture,
its genome analysis to breeding

Key Words : koji mold, *Aspergillus oryzae*, genome analysis, breeding

はじめに

我が国には味噌、醤油、清酒、みりん、酢、甘酒、焼酎、泡盛、納豆などの多様な発酵食品や、それらを使用した多くの料理があり、私たちの日々の食事に欠かせない存在となっている。上記の発酵食品のうち、納豆を除いたものは、「麹菌」と呼ばれる糸状菌（カビ）の一種を用いて製造される。たとえば、味噌（米味噌）の製造過程においては、麹菌を蒸した米に生育させて、「米麹」と呼ばれる固体培養物を製造し、これに食塩、蒸した大豆を混合した後、容器に詰めて発酵・熟成を行う。2013年末、「和食とその文化」がユネスコ文化遺産に登録された。麹菌を使用した発酵食品、発酵調味料は、和食の献立を考える上で不可欠であり、麹菌は日本の食文化を支えてきた微生物といえる。一口に麹菌、といっても、発酵食品の種類に適した菌株が選択され、保存株数は数百株にのぼるとされる。多くの菌株は *Aspergillus oryzae* に属しているが、そのうちで、特に実用菌株を麹菌と呼ぶ。麹菌はその特徴として、アミラーゼやプロテアーゼなど、菌体外に多くの種類の酵素を分泌生産することが知られる。それらの酵素は、原料である米や大豆などの多糖類やタンパク質を加水分解し、グルコースなどの単糖類やオリゴ糖類、アミノ酸やペプチドが生成される。これら

の分解成分が味噌などの発酵食品の呈味成分となり、製品の品質に直接寄与する。したがって、麹菌の酵素力価や菌糸の長さ、孢子形成の多少といった性質は、製造したい発酵食品の規格や特徴に応じて異なる性質が必要である。これらの酵素の多くは耐熱性が高く、長期間にわたり安定して加水分解活性を発揮する。

麹菌のゲノム解析と新規酵素群

麹菌が我が国で歴史的に利用され、また食経験の長い微生物であることから、麹菌の新しい酵素や代謝物の探索を進めるため、遺伝子情報を解明しようという機運が生まれた。そこで、我が国の大学、研究所、麹菌を扱う企業から構成される研究コンソーシアムを立ち上げ、麹菌のゲノム解析が実施された。そして、2005年、科学雑誌 *Nature* に麹菌のゲノム解析結果が公表された¹⁾。この麹菌ゲノム情報からは、これまでに知られていない様々な酵素遺伝子が見出されている。たとえば、麹菌が生産するタンパク質分解酵素はそれまで20種類程度が知られていたが、ゲノム情報からは、100種類を超える同酵素の遺伝子を有することがわかった。それらの遺伝子産物を遺伝子組換え技術を利用して取得し基質特異性を調べた結果、いくつかの酵素はこれまで報告のない基質特異性を示した。たとえば、ペプチドのアミノ末端のアミノ酸を遊離していくアミノペプチダーゼについての新規酵素の例としては、酸性アミノ酸であるグルタミン酸、アスパラギン酸をペプチドN末端から特異的に遊離するアスパチルアミノペプチダーゼ (aspartyl aminopeptidase) が見出された²⁾。本酵素遺伝子は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の相同遺伝子の配列に基づいて見出された。上述の酸性アミノ酸は発酵食品の主要な旨味成分である。本酵素は麹菌の固体培養において細胞外に容易に浸



* Ken-Ichi KUSUMOTO

1961年11月生
大阪大学大学院工学研究科発酵工学専攻
博士前期課程修了
現在、国立研究開発法人 農業・食品産業
技術総合研究機構 食品研究部門 食品
生物機能開発研究領域 食品醸造微生物
ユニット ユニット長 工学博士
醸造微生物学
TEL : 029-838-7971
FAX : 029-838-7996
E-mail : kusumoto@affrc.go.jp

出し、酵素活性を発揮するため、味噌や醤油の旨味成分の増強に寄与していると考えている。また、D-アミノ酸を好んでペプチド N 末端から遊離する興味深い基質特異性を示すアミノペプチダーゼも見出された³⁾。

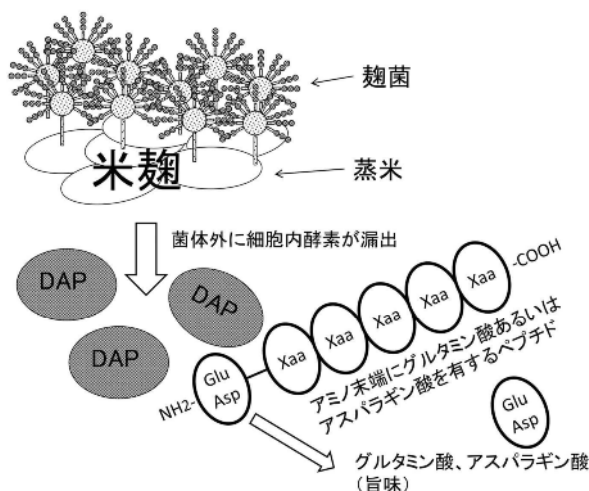


図1 DapAの米麴からの浸出

麹菌ゲノム情報を利用した醸造食品加工技術

麹菌は最初に述べたとおり、我が国の醸造産業で利用される微生物であり、そのゲノム情報を積極的に活用することにより、醸造工程の改良が期待される。このような研究例を紹介したい。味噌汁を作る際、あらかじめだしが添加されただし入り味噌を使うと、だしをひく時間が不要になる、あるいは調味料を添加する必要がなくなるため、便利である。このような消費者の嗜好と利便志向に伴い、だし入り

味噌の流通量は味噌全体の4分の1を占めるようになってきた。だし入り味噌の製造においては、だし成分として核酸系調味料（イノシン酸等を含む）を添加した調味味噌が製造されている。核酸系調味料の旨味成分の分解防止のため、現状では80℃15分間以上の高温加熱処理による、味噌中の麴菌酸性ホスファターゼの失活が必要である。各味噌メーカーでは条件は多少異なるが加熱設備を工場内に導入して、加熱処理を行っている。一方で、加熱設備を用いた味噌の処理においては、加熱臭による風味低下や着色が問題となっている。このような問題を解決するため、麴菌のホスファターゼ生産量を低減化することはできないかと考えた。すなわち、ホスファターゼ低生産麴菌株を育種することである。そこで麴菌のホスファターゼ生産機構を解明し、ホスファターゼ低生産麴菌の育種可能となれば、その菌株の使用により味噌の高温加熱処理工程を回避することが可能となり、高品質なだし入り味噌が開発され、且つ低コスト省エネルギー型の新規な製造技術となる。そこで、企業や公設研究機関と共同研究を実施し、上記の課題を解決することにした。

この共同研究においては、参画企業である種麴メーカー保有の503株の味噌用麴菌株のうちで米麴および豆麴（蒸煮大豆を玉状に成形した上に麴菌を培養した固形培養物。豆味噌の原料）におけるホスファターゼ活性が最も低いKBN8048株が選抜された。本株からは、核酸調味料を添加する豆味噌醸造に適した変異株が取得された。一方、我が国の味噌生産量の約8割は米味噌が占める。したがって、新たに米麴で低ホスファターゼ活性を示す株が望まれた。そこで、あらかじめKBN8048株におけるホスファ

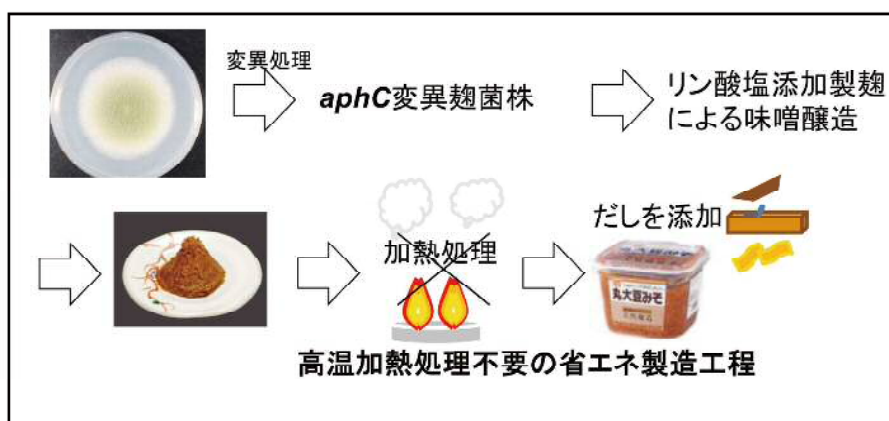


図2 酸性ホスファターゼ遺伝子変異株によるダシ入り味噌の省エネルギー製造工程の提案

ターゼの生産様式を解明した上で取得法を検討することとした。同酵素の生産様式を考慮するうえで、KBN8048株の米麴は豆麴の約20倍の酵素活性を示したことが生産様式解明の端緒となった。一方、豆麴のリン酸濃度は米麴の約5倍含有していた。すなわち、リン酸が少なくなると、麴菌はホスファターゼを生産してリン酸化合物からリン酸獲得を図ると考えられた。

次に、KBN8048株を利用して、低ホスファターゼ活性となるような麴培養を分子遺伝学レベルで解明することとした。そこで、糸状菌ゲノム情報データベースのひとつである、*Aspergillus Comparative Database*で「酸性ホスファターゼ (acid phosphatase)」を検索した。その結果、13種の遺伝子がヒットした。これら13種類のホスファターゼ全てのアミノ末端側に分泌シグナル配列が見られたため、全てのタンパク質は細胞外酵素と考えられた。その13種類の遺伝子は米麴と豆麴で発現量が異なり、米麴で発現量の高い8遺伝子、豆麴で発現量の高い5遺伝子をそれぞれR型、S型と命名した(Rは米麴のRiceのR、Sは豆麴のSoybeanのS)⁴⁾。R型遺伝子は糸状菌のリン酸抑制型酸性ホスファターゼに相同な遺伝子であった。R型遺伝子群はプロモータ領域に、出芽酵母におけるリン酸獲得関連遺伝子群の転写制御タンパク質Pho4pの結合配列を有していた。したがって、米麴におけるホスファターゼ活性はリン酸を添加することで抑制される可能性が考えられた。そこで、KBN8048株の米麴培養の際、培養基質のアルファ化米に各種濃度でリン酸を添加した。そして、接種後40時間目における各酸性ホスファターゼ遺伝子の転写量を分析した。その結果、予想どおり、R型遺伝子群のほとんどは、リン酸濃度の増加に応じて転写量が減少していた。一方、S型遺伝子群はリン酸添加に応じて転写量が増大するものが複数見られ、その中でも顕著に転写量が増加した*aphC*に注目した。本遺伝子は、他のS型ホスファターゼ遺伝子と比較してリン酸添加による転写量増加量が大きく、また転写量自体も多い。この遺伝子の変異株を取得し、米麴にリン酸塩を添加することで、核酸系調味料の分解力が低い麴が得られると期待された。そして、予想のとおり、同遺伝子のセルフクロニングによる破壊株を用いて作った米麴はイノシン酸加水分解活性がリン酸無添加の場合の

20%程度に低下していた⁵⁾。今後、*aphC*に標的とした変異株を取得し、だし入り味噌製造に適した実用株を開発していきたいと考えている。

おわりに

麴菌ゲノム情報を有効に活用し、醸造産業で活用可能な技術開発につなげる道ができつつある。麴菌は多くの伝統発酵食品や酵素生産工業で利用されているため、その基礎的な研究が直接食品加工や医薬品製造の現場に応用可能な技術となることが期待される。上記のような、だし入り味噌用麴菌が開発されると、加熱設備を持たないメーカーもだし入り味噌を製造できるようになり、地方特産物をだしに使った味噌の生産も可能となるため、地方独特の特産味噌も製造できる。波及効果は大きいと期待しつつ、さらに研究を推進している。

謝辞

紹介した研究のうち、麴菌ゲノム情報を活用した新規プロテアーゼの解明については、東京農工大学、天野エンザイム株式会社、月桂冠株式会社との共同研究による生研センター基礎研究推進事業(イノベーション創出基礎的研究推進事業)、だし入り味噌製造に適した麴菌の開発については、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、株式会社ビオック、ナカモ株式会社との共同研究による「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」の一環として実施した。本研究の推進に際してご協力をいただいた関係各位に深謝する。

参考文献

- 1) Machida, M. et al.: *Nature*, 438, 1157-1161 (2005)
- 2) Kusumoto, K. et al.: *J. Appl. Microbiol.* 105, 1711-1719 (2008)
- 3) M. Matsushita-Morita et al. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171:145-164, 2013
- 4) Marui J. et al.: *Food Sci. Technol. Res.* **18**, 83-90 (2012)
- 5) Marui J. et al.: *Int. J. Food Microbiol.* **166**, 238-243 (2013)