

博士論文

しょうゆのうま味成分であるグルタミン酸生成に寄
与する黄麴菌由来のグルタミナーゼに関する研究

伊藤考太郎

目次

序章

「和食」と発酵食品	1
しょうゆの製造方法としょうゆ醸造微生物	1
しょうゆの味と黄麴菌の酵素	4
しょうゆのうま味成分であるグルタミン酸	5
しょうゆのグルタミン酸と黄麴菌グルタミナーゼの酵素研究	7
黄麴菌グルタミナーゼの遺伝子研究	9

第1章 *Cryptococcus* 属酵母由来の新規なグルタミナーゼ遺伝子の単離

【はじめに】	14
【実験の材料と方法】	16
【結果および考察】	24

第2章 黄麴菌由来の新規なペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼの単離と諸性質の決定

【はじめに】	43
【実験の材料と方法】	45
【結果および考察】	54

第3章 しょうゆ麴で主要なグルタミナーゼ活性を示す黄麴菌グルタミナーゼ遺伝子の同定と解析

【はじめに】	79
【実験の材料と方法】	81
【結果および考察】	89

第4章 しょうゆ醸造におけるグルタミン酸生成に関わる黄麹菌由来グルタミナーゼの同定

【はじめに】 121

【実験の材料と方法】 122

【結果および考察】 131

第5章 総括

総括 151

しょうゆ醸造におけるグルタミン酸生成機構 154

おわりに 156

引用文献 158

関連原著論文 167

謝辞 169

本研究で使用した菌株リスト1

菌株名	由来	遺伝子型
ATCC20293	<i>Cryptococcus albidus</i>	wild type
NISL-3771	<i>Cryptococcus nodaensis</i>	wild type
INVSc1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MATa <i>his3Δ1, leu2, trp1-289, ura3-52</i> MATa <i>his3Δ1, leu2, trp1-289, ura3-52</i>
Sc_pYES2	INVSc1	pYES2[<i>urar3</i>] 酵母自律複製型プラスミド
ScOE_CngahA	INVSc1	pYES2-CngahA [<i>urar3, CngahA</i>] 酵母自律複製型プラスミド
ScOE_CagahA	INVSc1	pYES2-CagahA [<i>urar3, CagahA</i>] 酵母自律複製型プラスミド
ScOE_AogahB	INVSc1	pYES2-AogahB [<i>urar3, AogahB</i>] 酵母自律複製型プラスミド
ScOE_AogahC	INVSc1	pYES2-AogahC [<i>urar3, AogahC</i>] 酵母自律複製型プラスミド
ScOE_AogahC	INVSc1	pYES2-AogahD [<i>urar3, AogahD</i>] 酵母自律複製型プラスミド
TOP10F'	<i>Escherichia coli</i>	F' <i>{lac^q Tn10(Tet^R)}</i> , <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), φ80 <i>lacZΔM15</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara, leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>nupG</i> , <i>rspL</i> (Str ^R)
JM109	<i>Escherichia coli</i>	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk⁺ mk⁺</i>), <i>e14</i> (<i>mcrA</i>), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>)/F' <i>[traD36, proAB⁺, lac^f, lacZΔM15]</i> .
RIB40	<i>Aspergillus oryzae</i>	wild type
RP-1	RIB40	Δ <i>pyrG</i>
Ao_pMAP	RP-1	Δ <i>pyrG</i> , <i>inspMAP</i> , <i>pyrG+</i>
AoOE_AsgahA	RP-1	Δ <i>pyrG</i> , <i>inspMAP_AsgahA</i> , <i>pyrG+</i>
AoOE_AsgahB	RP-1	Δ <i>pyrG</i> , <i>inspMAP_AsgahB</i> , <i>pyrG+</i>
AoXKu70::ptrA	RP-1	Δ <i>pyrG</i> , Δ <i>ku70::ptr1+</i> ,
AoXKu70::ptrA/P	AoXKu70::ptrA	Δ <i>pyrG</i> , Δ <i>ku70::ptr1+</i> , <i>pyrG+</i>
ΔAogahB	AoXKu70::ptrA	Δ <i>pyrG</i> , Δ <i>ku70::ptr1+</i> , Δ <i>gahB::pyrG+</i>
NBRC4241	<i>Aspergillus sojae</i>	wild type
BM-7	NBRC4241	<i>pyrG-</i> , <i>niaD-</i> , Δ <i>ku70::niaD+</i>
AsOE_Asgls	BM-7	<i>pyrG-</i> , <i>niaD-</i> , Δ <i>ku70::niaD+</i> , <i>inspMAP_Asgls</i> , <i>pyrG+</i>
KuP8	NBRC4241	<i>pyrG-</i> , Δ <i>ku70::pyrG+</i>

本研究で使用した菌株リスト2

菌株名	由来	遺伝子型
KGd-T1	BM-7	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta gahA$, $\Delta gahD$, $\Delta gahB::pyrG$ ⁺
KGd-T2	BM-7	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta ggtA$, $\Delta ggtC$, $\Delta ggtD::pyrG$ ⁺
KGd-T3	BM-7	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta gtaA$, $\Delta gtaB$, $\Delta gtaC::pyrG$ ⁺
KGd-T4 (Δgls)	BM-7	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta gls::pyrG$ ⁺
KGd-T12	BM-7	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta gahA$, $\Delta gahB$, $\Delta gahD$, $\Delta ggtA$, $\Delta ggtC$, $\Delta ggtD::pyrG$ ⁺
KGd-T13	BM-7	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta gahA$, $\Delta gahB$, $\Delta gahD$, $\Delta gtaA$, $\Delta gtaB$, $\Delta gtaC::pyrG$ ⁺
KGd-T14	BM-7	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta gahA$, $\Delta gahB$, $\Delta gahD$, $\Delta gls::pyrG$ ⁺
KGd-T123	BM-7	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta gahA$, $\Delta gahB$, $\Delta gahD$, $\Delta ggtA$, $\Delta ggtC$, $\Delta ggtD::pyrG$ ⁺ , $\Delta gtaA$, $\Delta gtaB$, $\Delta gtaC$
KGd-T124	BM-7	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta gahA$, $\Delta gahB$, $\Delta gahD$, $\Delta ggtA$, $\Delta ggtC$, $\Delta ggtD::pyrG$ ⁺ , Δgls
KGd-Tall10	BM-7	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta gahA$, $\Delta gahB$, $\Delta gahD$, $\Delta ggtA$, $\Delta ggtC$, $\Delta ggtD::pyrG$ ⁺ , $\Delta gtaA$, $\Delta gtaB$, $\Delta gtaC$, Δgls
KGd-NT124-4 ($\Delta gahA$ - $\Delta gahB$ - $\Delta ggtA$ - Δgls)	KGd-NT124-3a	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta gahA$, $\Delta gahB::pyrG$ ⁺ , $\Delta ggtA$, Δgls
KGd-NT124-3b ($\Delta gahB$ - $\Delta ggtA$ - Δgls)	KGd-NT23-2	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta gahB::pyrG$ ⁺ , $\Delta ggtA$, Δgls
KGd-NT124-3a ($\Delta gahA$ - $\Delta ggtA$ - Δgls)	KGd-NT23-2	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta gahA::pyrG$ ⁺ , $\Delta ggtA$, Δgls
KGd-NT14-3 ($\Delta gahA$ - $\Delta gahB$ - Δgls)	KGd-N14-2a	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta gahA$, $\Delta gahB::pyrG$ ⁺ , Δgls
KGd-NT12-3 ($\Delta gahA$ - $\Delta gahB$ - $\Delta ggtA$)	KGd-NT12-2a	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta gahA$, $\Delta gahB::pyrG$ ⁺ , $\Delta ggtA$
KGd-NT1-2 ($\Delta gahA$ - $\Delta gahB$)	$\Delta gahA$	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta gahA$, $\Delta gahB::pyrG$ ⁺
KGd-NT12-2a ($\Delta gahA$ - $\Delta ggtA$)	$\Delta gahA$	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta gahA$, $\Delta ggtA::pyrG$ ⁺
KGd-N14-2a ($\Delta gahA$ - Δgls)	$\Delta gahA$	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta gahA$, $\Delta gls::pyrG$ ⁺
KGd-NT12-2b ($\Delta gahB$ - $\Delta ggtA$)	$\Delta gahB$	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta gahB::pyrG$ ⁺ , $\Delta ggtA$
KGd-NT14-2b ($\Delta gahB$ - Δgls)	$\Delta gahB$	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta gahB::pyrG$ ⁺ , $\Delta glsA$
KGd-NT23-2 ($\Delta ggtA$ - Δgls)	$\Delta ggtA$	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , $\Delta ggtA$, $\Delta gls::pyrG$ ⁺
AoOE_Asgls	BM-7	<i>pyrG</i> ⁻ , <i>niaD</i> ⁻ , $\Delta ku70::niaD$ ⁺ , <i>inspMAP_gls</i> , <i>pyrG</i> ⁺

本研究で使用した菌株リスト3

菌株名	由来	遺伝子型
<i>ΔgahA</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔgahA::pyrG⁺</i>
<i>ΔgahB</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔgahB::pyrG⁺</i>
<i>ΔgahD</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔgahD::pyrG⁺</i>
<i>ΔggtA</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔggtA::pyrG⁺</i>
<i>ΔggtC</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔggtC::pyrG⁺</i>
<i>ΔggtD</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔggtD::pyrG⁺</i>
<i>ΔgtaA</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔgtaA::pyrG⁺</i>
<i>ΔgtaB</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔgtaB::pyrG⁺</i>
<i>ΔgtaC</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔgtaC::pyrG⁺</i>
<i>ΔasnA</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔAsnA::pyrG⁺</i>
<i>ΔasnB</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔAsnB::pyrG⁺</i>
<i>ΔasnC</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔAsnC::pyrG⁺</i>
<i>ΔasnD</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔAsnD::pyrG⁺</i>
<i>ΔasnE</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔAsnE::pyrG⁺</i>
<i>ΔgfaA</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔGfaA::pyrG⁺</i>
<i>ΔgfaB</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔGfaB::pyrG⁺</i>
<i>ΔgltA</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔGltA::pyrG⁺</i>
<i>ΔntaA</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔNtaA::pyrG⁺</i>
<i>ΔgdhA</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔGdhA::pyrG⁺</i>
<i>ΔgdhB</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔGdhB::pyrG⁺</i>
<i>ΔglnA</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔGlnA::pyrG⁺</i>
<i>ΔglnB</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔGlnB::pyrG⁺</i>
<i>ΔglnE</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔGlnE::pyrG⁺</i>
<i>ΔgatA</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔGatA::pyrG⁺</i>
<i>ΔgatB</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔGatB::pyrG⁺</i>
<i>ΔgatE</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔGatE::pyrG⁺</i>
<i>ΔamidA</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔAmidA::pyrG⁺</i>
<i>ΔamidB</i>	BM-7	<i>pyrG⁻, niaD⁻, Δku70::niaD⁺, ΔAmidB::pyrG⁺</i>
<i>ΔalpA</i>	AoXKu70::ptrA	<i>ΔpyrG, ΔalpA::pyrG⁺, Δku70::ptr1⁺</i>
<i>ΔalpB</i>	AoXKu70::ptrA	<i>ΔpyrG, ΔalpB::pyrG⁺, Δku70::ptr1⁺</i>
<i>Δaor I</i>	AoXKu70::ptrA	<i>ΔpyrG, Δaor I::pyrG⁺, Δku70::ptr1⁺</i>
<i>Δaor II</i>	AoXKu70::ptrA	<i>ΔpyrG, Δaor II::pyrG⁺, Δku70::ptr1⁺</i>

本研究で用いた黄麹菌遺伝子リスト

Gene name	Gene ID Number of orthologous gene in <i>A. oryzae</i> RIB40	Description (AspGD)
<i>pyrG</i>	AO090011000868	Orotidine-5'-phosphate decarboxylase
<i>argB</i>	AO090023000856	Ornithine carbamoyltransferase
<i>niaD</i>	AO090012001035	Nitrate reductase (NADPH)
<i>ku70</i>	AO090701000921	ATP-dependent DNA helicase II subunit involved in non-homologous end joining DNA repair
<i>ptrA</i>	AO090003000090	Thiamine biosynthetic enzyme, dominant mutation confers pyrithiamine resistance
<i>creA</i>	AO090026000464	Transcription regulatory region DNA binding transcription factor
<i>areA</i>	AO090009000502	Sequence-specific DNA binding transcription regulatory protein
<i>gahA</i>	AO090003001406	Peptidoglutaminase-asparaginase
<i>gahB</i>	AO090011000310	Peptidoglutaminase-asparaginase
<i>gahC</i>	AO090011000138	Uncharacterized protein (Has domain(s) with predicted carbon-nitrogen ligase activity, with glutamine as amido-N-donor activity)
<i>gahD</i>	AO090701000634	Uncharacterized protein (Has domain(s) with predicted carbon-nitrogen ligase activity, with glutamine as amido-N-donor activity)
<i>ggtA</i>	AO090005000169	γ -glutamyltransferase
<i>ggtB</i>	AO090023000537	Uncharacterized protein (Ortholog(s) have gamma-glutamyltransferase activity)
<i>ggtC</i>	AO090113000029	Uncharacterized protein (Ortholog(s) have gamma-glutamyltransferase activity)
<i>ggtD</i>	AO090009000211	Uncharacterized protein (Has domain(s) with predicted gamma-glutamyltransferase)
<i>gtaA</i>	AO09002000289	Glutaminase
<i>gtaB</i>	AO090003000638	Uncharacterized protein
<i>gtaC</i>	AO090001000625	Uncharacterized protein
<i>gls</i>	AO090010000571	Glutaminase
<i>asnA</i>	AO090005000816	Uncharacterized protein (Ortholog(s) have asparaginase activity)
<i>asnB</i>	AO090102000492	Uncharacterized protein (Has domain(s) with predicted role in cellular amino acid metabolic process)
<i>asnC</i>	AO090003000216	Uncharacterized protein (Has domain(s) with predicted hydrolase activity)
<i>asnD</i>	AO090010000214	Uncharacterized protein
<i>asnE</i>	AO090701000273	Uncharacterized protein
<i>gfaA</i>	AO090003001475	Uncharacterized protein (Has domain(s) with predicted carbohydrate binding activity)
<i>gfaB</i>	AO090003000003	Uncharacterized protein (Ortholog(s) have glutamine-fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing) activity)
<i>gltA</i>	AO090012000988	Uncharacterized protein (Ortholog(s) have glutamate synthase (NADH) activity)
<i>ntaA</i>	AO090701000715	Uncharacterized protein (Ortholog(s) have protein-N-terminal asparagine/ glutamine amidohydrolase activity)
<i>gdhA</i>	AO090023000923	Uncharacterized protein (Glutamate dehydrogenase; glutamate/leucine/phenylalanine/valine dehydrogenase)
<i>gdhB</i>	AO090001000717	Uncharacterized protein (Ortholog(s) have glutamate dehydrogenase (NAD+) activity)
<i>glnA</i>	AO090009000269	Uncharacterized protein (Ortholog(s) have glutamate-ammonia ligase activity)
<i>glnB</i>	AO090009000558	Uncharacterized protein (Has domain(s) with predicted catalytic activity, glutamate-ammonia ligase activity)
<i>glnE</i>	AO090011000308	Uncharacterized protein (Has domain(s) with predicted catalytic activity)
<i>gataA</i>	AO090005001005	Uncharacterized protein (Ortholog(s) have fibrinogen binding activity)
<i>gataB</i>	AO090003001400	Uncharacterized protein (Has domain(s) with predicted carbon-nitrogen ligase activity)
<i>gataE</i>	AO090003000495	Uncharacterized protein (Has domain(s) with predicted carbon-nitrogen ligase activity)
<i>amidA</i>	AO090206000080	Uncharacterized protein (Ortholog(s) have cytosol, nucleus localization)
<i>amidB</i>	AO090701000035	Uncharacterized protein (Has domain(s) with predicted carbon-nitrogen ligase activity)
<i>alpA</i>	AO090003001036	Oryzin (alkaline protease)
<i>alpB</i>	AO090020000517	Uncharacterized protein (serine-type endopeptidase)
<i>aor I</i>	AO090026000083	Aorsin
<i>aor II</i>	AO090023000263	Uncharacterized protein (alkaline serine protease)

略語一覽

Ao	<i>Aspergillus oryzae</i>	
As	<i>Aspergillus sojae</i>	
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Cn	<i>Cryptococcus nodaensis</i>	
Ca	<i>Cryptococcus albidus</i>	
Gah	Peptidoglutaminase-asparaginase, glutaminase	(Type I)
Ggt	γ -Glutamyltranspeptidase	(Type II)
Gta	Glutaminase	(Type III)
Gls	Glutaminase	(Type IV)
GatA	Asp-tRNA ^{Asn} /Glu-tRNA ^{Gln} amidotransferase A	
Asn	Asparaginase	
Gfa	Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase	
Glt	Glutamate synthase	
Nta	N-terminal Amidase	
Gdh	Glutamate dehydrogenase	
Gln	Glutamine synthetase	
Amid	Amidase	
Alp	Oryzin, Alkaline protease	
Aor	Aorsin	
Np	Neutral protease	
Lap	Leucine aminopeptidase	
Ap	Acid protease	
Acp	Acid carboxypeptidase	
Pamy	Amylase promoter	
Tamy	Amylase terminator	
5FOA	5-Fluoroorotic acid	
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride	
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	
UTR	Untranslated region	
ORF	Open Reading Frame	
RACE	Rapid Amplification of cDNA End	
PVDF	Polyvinylidene difluoride	
CBB	Coomassie Brilliant Blue	
PCR	Polymerase chain reaction	
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis	

序章

「和食」と発酵食品

2013年12月4日、「和食：日本人の伝統的な食文化」がユネスコの無形文化遺産に登録された。無形文化遺産に登録される「和食」の内容は、「料理」そのものではなく、「自然を尊ぶ」という日本人の気質に基づいた「食」に関する「習わし」と位置付けてある。

農林水産省のリーフレット「和食」¹⁾によれば、①「多様で新鮮な食材と素材の味わいを活用」②「バランスがよく、健康的な食生活」③「自然の美しさの表現」④「年中行事との関わり」と4つの特徴が記されている。その特徴の一つ、「多様で新鮮な食材と素材の味わいを活用」の意図することは、「日本の国土は南北に長く、海、山、里と表情豊かな自然が広がっているため、各地で地域に根差した多様な食材が用いられ、素材の味わいを活かす調理技術・調理道具が発達している」とある。多様で新鮮な食材の味わいは、発酵調味料であるしょうゆ、味噌、食酢等によって活かされ、これら発酵食品に含まれる複雑なうま味は、昆布、鰹節、椎茸等の出汁のうま味成分と相乗的な効果を発揮する。これらのうま味成分は、過剰な油脂の摂取を軽減させ、「健康的な食生活」へと繋がる。「自然の美しさの表現」では、料理に合った器の使用や盛り付けなどの技術もさることながら、自然の色や香りの美しさを損なわずに、素材の持ち味を引き出し、引き立てる味付けが土台にある。また、正月をはじめとした年中行事を思い浮かべると、日本酒や味噌・しょうゆを使った日本料理が並んだ風景が目浮かぶ。このように、日本の発酵食品は「日本人の伝統的な食文化」と一体であり、「和食」に欠くことができない。健康志向から「和食」への関心は高まり、世界中に「和食(=日本料理)」が浸透し始めている。

しょうゆの製造方法としょうゆ醸造微生物

しょうゆは、「和食」の味の土台を形づくる調味料であり、今では万能調味料(All-purpose seasoning)として世界各国100カ国以上に普及している。その起源は、7世紀頃に遡り、中国から伝えられたと言われている²⁾。当時の中国しょうゆは、大豆のみ、もしくは大豆に極少量の小麦を混ぜて作られていた。大豆と小麦を等量混ぜてつくるなどの日本人の創意工夫が加わって、現在の味わい深い風味豊かなしょうゆになったとされる³⁾。

しょうゆは、大豆、小麦、食塩を原料に、主に3種類の微生物(麴菌、しょうゆ乳酸菌およびしょうゆ酵母)の働きによって作られる。その製造方法(本醸造方式)は、(1)麴製造工程、(2)諸味発酵工程、(3)圧搾製成工程の大きく3つに分けられる(図0-1)。昔から良質なしょうゆをつくる上で重要な技術要素を表した「一麴、二擗、三火入れ」という言葉がある。これは、麴の良否が製品しょうゆの品質に及ぼす影響が大きく、原料処理を含めた麴製造工程が最も重要であることを意味する。ここで言う麴とは、蒸した大豆と炒った小麦に麴菌を生育させたものでしょうゆ麴とも呼ぶ。麴は、「酵素の宝庫」とも呼ばれ、麴製造工程で麴菌が生育すると共に蛋白質分解酵素や糖質分解酵素など様々な酵素を生産

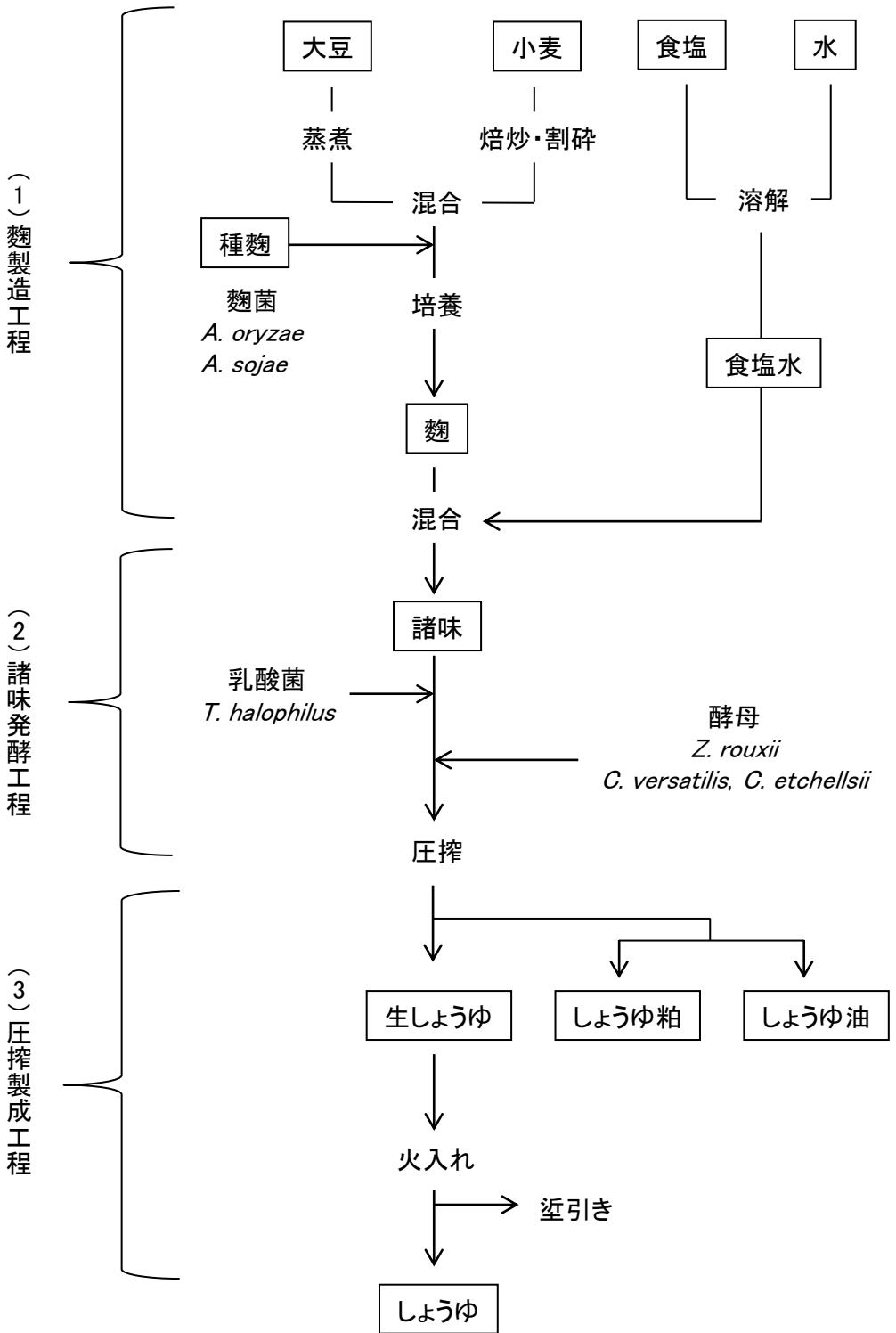


図0-1 しょうゆの製造工程(本醸造方式)

する。

しょうゆ醸造に用いられる麴菌は、*Aspergillus* 属に属する糸状菌で、*Aspergillus oryzae* と *Aspergillus sojae* とがある。製麴すると分生子が黄色や黄緑色に着色することから黄麴菌とも呼ばれる。共に発癌性物質であるアフラトキシンを生産しない安全な菌である⁴⁾。*A. oryzae* は、明治初期、ドイツ人 Ahlburg により、甘酒麴から分離された⁵⁾。一方、*A. sojae* は、坂口らによって全国の醸造場や種麴メーカーから分離された黄麴菌の中に、分生子表面に小突起を有し、分生子柄壁が平滑である菌群として発見され、1944 年に新種として発表された⁶⁾。

A. oryzae はしょうゆ、味噌、清酒製造、酵素生産の宿主など幅広く用いられる。一方で、*A. sojae* はしょうゆ、味噌製造に限定的に使用される。*A. sojae* は、*A. oryzae* に比べて、エンドポリガラクトナーゼおよびグルタミナーゼ活性が有意に高く、 α -アミラーゼ、酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ活性が有意に低いなどしょうゆ麴での酵素生産性に違いがある⁷⁾。また、*A. sojae* で製造したしょうゆは、*A. oryzae* で製造したものと比べて、グルタミン酸、還元糖、乳酸の含量が多く、ピログルタミン酸量が少ないなど品質に差が生じ、官能的にも識別される^{7,8)}。

しょうゆ醸造に利用されている黄麴菌は、醸造に適した菌株として選抜・育種されてきた背景があるが、その起源は自然界から混入されたものと推定されている。選抜された特徴ある黄麴菌は種麴として販売されているが、大手メーカーでは独自の黄麴菌を保有している。

続く諸味発酵工程では、麴に食塩水が混ぜられる。この操作を仕込みといい、食塩水と混じり合った麴を諸味と呼ぶ。諸味発酵工程では、黄麴菌酵素による原料分解としょうゆ乳酸菌およびしょうゆ酵母による発酵が起こる。原料が分解されて生じるアミノ酸や糖類等はしょうゆに呈味を与えると共に、しょうゆ乳酸菌やしょうゆ酵母の栄養源ともなる。諸味になると食塩濃度（17%–18%）が高いため、非耐塩性の微生物は生育できず、仕込み後短時間で、黄麴菌は死滅し、代わって、耐塩性または好塩性の微生物が生育する。仕込み後、最初に生育するのが、好塩性のしょうゆ乳酸菌である。

しょうゆ乳酸菌は、1907 年に斎藤らによってしょうゆ諸味から分離された⁹⁾。当初は、*Pediococcus* 属に分類されたが、1993 年に *Tetragenococcus halophilus* とされた¹⁰⁾。*T. halophilus* は、グラム染色陽性の 0.6–0.9 μm の球菌で 4 連球菌の場合が多く、培地条件にもよるが 5–10% 食塩存在下で最も生育が良好な好塩性の細菌である。菌株ごとの多様性に富み、アミノ酸分解能、糖類発酵性、還元能、有機酸代謝などの性質に違いが見られる^{11,12)}。しょうゆ乳酸菌は、黄麴菌由来の糖質分解酵素類により小麦のでんぷん質が分解されて生成したグルコースを乳酸に、大豆中に存在するクエン酸を酢酸に代謝する。その結果、諸味の pH が低下し、しょうゆにわずかな酸味と味ののびを与える。

しょうゆ乳酸菌の後に、生育してくるのが耐塩性酵母であり、主発酵酵母と熟成酵母とがある¹³⁾。前者は、*Zygosaccharomyces rouxii* に分類され、しょうゆの香味に極めて重要

な影響を与える。後者は、諸味の後熟期まで活躍する酵母で、耐塩性の *Candida* 属酵母に分類され、*C. versatilis* と *C. etchellsii* の 2 種がある。*Z. rouxii* は、グルコースを資化して 2-4%のエタノールと少量のグリセリンを生成すると同時に、しょうゆの特徴香である 4-Hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2H)-furanone (HEMF) やメチオノール、その他の多種類の香気成分を生成する¹⁴⁾。一方、熟成酵母である *C. versatilis* は、小麦リグニン由来のフェノール化合物から 4-Ethylguaiacol (4EG) などの特徴ある香気成分を生成する¹⁵⁾。

Z. rouxii は、高濃度食塩存在下 (18%) では、生育 pH 域が 4.0-5.0 と狭くなるため、しょうゆ乳酸菌による乳酸発酵により、諸味 pH が低下することで旺盛に生育することが可能となる。それゆえに、しょうゆ醸造では 3 種の微生物が段階的に働き、並行複発酵が起こり、しょうゆの風味が形成される。しょうゆ乳酸菌やしょうゆ酵母は、主として、麴、仕込み容器や仕込み室の環境中に生息して、諸味に混入したものであるが、近年では、目的に合った優れた性質を持つ菌株を純粋培養して諸味に添加する方法が広く普及している。

酵母発酵終了後は、一定期間、諸味を熟成させる。その間に諸味中に含まれる各種成分間で、様々な化学反応が起こる。例えば、黄麴菌酵素による原料の分解によって生じたグルコースなどの糖類とアミノ酸とがメイラード反応によって結合してアマドリ化合物が生成する。これは、しょうゆの色やまろやかなコク、うま味を付与する^{16,17)}。

発酵熟成が終了した諸味は、「濾布」と呼ばれる風呂敷タイプの布に包み、圧力を少しずつかけながら加重し、液体分と固形分に分離させる。この作業を「压榨」という。ここで生じる液体分が生しょうゆであり、生しょうゆは微生物殺菌、酵素の失活を目的とした「火入れ」という最終工程を経て製品化される。この火入れ工程で、生しょうゆが加熱されることにより、しょうゆ独特の華やかな香りである「火香」が生まれる。しょうゆ醸造は、麴製造から製品になるまで約半年間の期間を要する。

しょうゆの味と黄麴菌の酵素

しょうゆのおいしさは、「味」「香り」「色」の三位一体から生まれる。その一つであるしょうゆの「味」は、「甘味」「塩味」「酸味」「苦味」「うま味」の基本 5 味が全て含まれ、渾然一体となり形成される¹⁷⁾。これがどんな素材や料理にも合う万能調味料と言われる所以である。「甘味」は、ブドウ糖などの糖類、「塩味」は、原材料である食塩、「酸味」は乳酸や酢酸といった有機酸が主体であるが、「甘味」、「苦味」、「うま味」には、アミノ酸やペプチドといった原料タンパク質の分解物が少なからず関わっている。「甘味」は、グリシンなどの甘味アミノ酸、「苦味」は、ロイシンなどの分岐鎖アミノ酸やペプチド、そして「うま味」には、約 20 種類のアミノ酸自体、その中でもグルタミン酸、アスパラギン酸といった酸性アミノ酸やリジン、アラニンなどが大きく働く。このようにアミノ酸やペプチドは、しょうゆの呈味に深く関わることから、不溶性の原料タンパク質の分解・可溶化は、しょうゆ醸造で特に重要視されている。

大豆や小麦の不溶性のタンパク質は、諸味の中で黄麹菌のタンパク質分解酵素によってペプチドを経て、各種アミノ酸にまで分解され可溶化する(しょうゆ業界では可溶化したアミノ酸類を全窒素成分(Total Nitrogen; TN)と呼ぶ)。このタンパク質分解酵素は、国際酵素委員会によって、タンパク質やペプチドの内部のペプチド結合を加水分解するエンドペプチダーゼ(以降プロテアーゼとよぶ)と、タンパク質やペプチドの末端に存在するペプチド結合を加水分解するエキソペプチダーゼ(以降ペプチダーゼとよぶ)に分類され、前者により大きなペプチドに、後者によって、ジペプチド、トリペプチドといった小さいペプチドやアミノ酸にまで分解される。

プロテアーゼは、さらに活性中心の構造から、セリン、システイン、アスパラギン、金属、スレオニン、未分類の6種類に、ペプチダーゼはN末端もしくはC末端のどちらから作用するかという作用様式で分類される¹⁸⁾。また、それぞれ分類された中にも酵素学的な諸性質の違いも知られている。ゲノム配列が解読された黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 株には、プロテアーゼ遺伝子が69個、ペプチダーゼ遺伝子が64個存在する¹⁹⁾。

しょうゆ中の主なタンパク質源である大豆タンパク質分解がしょうゆの品質(味)に影響するため、黄麹菌タンパク質分解酵素については詳細に研究され、数多くの酵素が黄麹菌培養物から単離精製されている。精製酵素を用いた大豆タンパク質のモデル分解試験において、その寄与率を算出し、プロテアーゼ3種(アルカリプロテアーゼ、中性プロテアーゼIとII)、ペプチダーゼ4種(ロイシンアミノペプチダーゼIとII、酸性カルボキシペプチダーゼIVとII)がしょうゆ醸造における原料タンパク質分解に寄与していることが明らかにされている²⁰⁾。

しょうゆのうま味成分であるグルタミン酸

1931年に有働氏により、昆布のうま味成分であるグルタミン酸がしょうゆ中から見出され、しょうゆの「うま味」の主体がグルタミン酸であることが明らかにされた²¹⁾。

しょうゆ中のグルタミン酸は、原料タンパク質に含まれるグルタミン酸が、タンパク質分解酵素による分解過程で直接遊離する(図0-2-①)だけでなく、同じく分解によって生じたグルタミンがグルタミン酸へと変換されて生成すると考えられている(図0-2-②)。このグルタミンの変換に関わるのがグルタミナーゼである。グルタミナーゼはグルタミンをグルタミン酸とアンモニアに加水分解する酵素である。大豆タンパク質中に含まれるグルタミンとグルタミン酸の割合はおおよそ等量であり²²⁾、グルタミンは比較的速やかに非酵素的に分子内で自発的環化し²³⁾、「うま味」のないピログルタミン酸へと変換される(図0-2)。一方、グルタミン酸は、しょうゆ中ではグルタミンに比べて安定に存在し、非酵素的なピログルタミン酸への変換速度は極めて遅い。そのため、グルタミン酸を多く含んだうま味の強いしょうゆを得るには、グルタミンがグルタミン酸へ変換されることが重要である。そのため、グルタミナーゼはしょうゆ醸造にとって重要な役割を果たす。

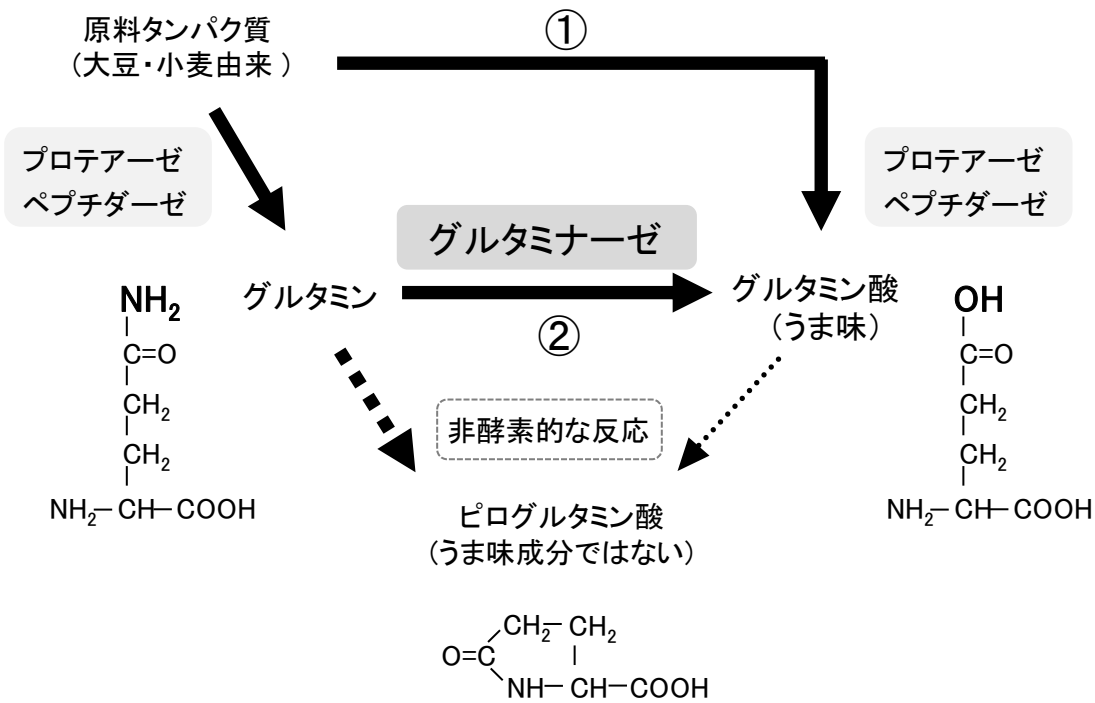


図0-2 しょうゆ醸造におけるグルタミン酸の生成モデル

① 原料タンパク質が麹菌の生産するタンパク質分解酵素によってアミノ酸にまで分解され、原料タンパク質中に含まれるグルタミン酸が直接遊離してくる経路

② 原料タンパク質の分解によって生じたグルタミンがグルタミナーゼにより加水分解されグルタミン酸へ変換される経路。

グルタミンやグルタミン酸は、非酵素的に分子内で自発的環化し、うま味成分ではないピログルタミン酸へと変換される。グルタミン酸よりグルタミンの方がかなり容易にピログルタミン酸へ変換する。

しょうゆのグルタミン酸と黄麹菌グルタミナーゼ酵素の研究

しょうゆ中のグルタミン酸とグルタミナーゼに関する報告は、1969年の黒島らの研究に遡る²⁴⁾。黒島らは、諸味 pH と仕込み温度に着目し、熟成期間中のグルタミン酸は、酸性条件 (pH 4.5) 下で生成が少なく、かつ仕込み温度が高いほど消失し、仕込み後 30 日でピークに達して、その後減少すると報告している。一方、ピログルタミン酸はそのような酸性かつ高温条件下ほど多く生成し、仕込み期間を通じて増加した。仕込み初期の諸味にグルタミンを添加すると、グルタミンの消失に相関して、中性 (pH 7.0) 下では、グルタミン酸が、酸性下ではピログルタミン酸が増加した。これは、しょうゆ麹 (または諸味) のグルタミナーゼ活性の性質、すなわち中性域では活性が高いが酸性域では低く、かつ仕込み後 30 日で活性が検出できなくなることに一致する。このことから、しょうゆ中のグルタミン酸量を高めるには仕込み初期にグルタミナーゼを十分に作用させることが重要と結論付けている。

1974年、Yamamoto らは *A. sojae* の変異株ライブラリーから、それらの液体培養物を用いたグルテン分解で、グルタミン酸/可溶性全窒素成分 (Glu/TN) の高い株を選抜し、液体培養におけるグルタミナーゼ生産について検討を行うと共にしょうゆ諸味でのグルタミン酸生成について調べた²⁵⁾。その結果、可溶性全窒素の量に差はなかったが、グルタミナーゼ高生産変異株では親株に比べグルタミン酸量が増えることを明らかにし、しょうゆ諸味中におけるグルタミン酸の生成に黄麹菌グルタミナーゼが関与している可能性を示した。

黄麹菌の酵素は、菌体外に分泌生産される菌体外酵素と菌体の内部に留まる菌体内酵素とに大別される。しょうゆ醸造に寄与すると同定されたタンパク質分解酵素は、しょうゆ麹 (固体培養) で菌体外に分泌される遊離型の酵素である²⁰⁾。

四方らはしょうゆ麹に緩衝液とガラスビーズを加えてホモジナイズし、抽出できる可溶性 (遊離型) グルタミナーゼと洗浄しても残渣に残る不溶性 (菌体結合型) グルタミナーゼに分画した。それぞれの酵素の性質を調べたところ、不溶性グルタミナーゼは pH 安定性、耐熱性、食塩阻害に対する耐性 (塩阻害耐性)、プロテアーゼ耐性が高いことを明らかにした²⁶⁾。この知見に基づき、それぞれのグルタミナーゼ活性と諸味中のグルタミン酸の溶出の関係を調べたところ、可溶性グルタミナーゼ活性はグルタミン酸の溶出と相関を示さなかったが、不溶性グルタミナーゼと相関を示すことが明らかになった²⁷⁾。さらに安井らは高グルタミナーゼ活性の *A. oryzae* を突然変異により育種し、それを用いてしょうゆを仕込むと、グルタミン酸量が増加することを報告している²⁸⁾。以上の結果から、しょうゆ醸造では、黄麹菌由来の不溶性グルタミナーゼがグルタミン酸生成に関わることが示された。

黄麹菌のグルタミナーゼは、しょうゆ麹の不溶性画分にその多くが存在することが示唆されたが、菌体における局在は明らかでなかった。そこで、1985年、古屋ら²⁹⁾、寺本ら³⁰⁾ は、*A. oryzae* のグルタミナーゼの細胞内分布をホモジナイズ法とプロトプラスト法の両方を用いて、詳細に調べた。*A. oryzae* を液体培養し、培養液 (菌体外分泌型画分) と菌体に分離し、回収した菌体に水とガラスビーズを加えて粉碎した。遠心により、固くて壊れにく

い細胞壁を含む沈殿部(菌体結合型画分)とそれ以外の上澄部(菌体内遊離型画分)に分別した。それぞれの画分のグルタミナーゼ活性を測定した結果、*A. oryzae*のグルタミナーゼは、菌体外分泌型画分に約4%、菌体内遊離型が約27%、菌体結合型が約73%であることを示した。

次に、回収した菌体を0.6 Mリン酸カリウム緩衝液に懸濁後、カタツムリ酵素(細胞壁溶解酵素)を作用させた後にガラスフィルターでろ過した。ガラスフィルター上には残渣として、細胞壁に結合したままのグルタミナーゼが残る(49.5%)。得られたろ液を遠心分離して、上澄部(細胞壁画分)と沈殿部(プロトプラスト画分)に分別した。その結果、プロトプラスト画分(細胞質と細胞膜, 0.1%)に存在せず、ほとんどが細胞壁画分(50.4%)に局在することを明らかにした。

続いて、局在の違いによる酵素の諸性質の差異を調べた。菌体をホモジナイズして得られる菌体結合型画分を再度、リン酸カリウム緩衝液に懸濁し、カタツムリ酵素を加えて、細胞壁を溶解させ、遠心分離した。得られる上澄部を可溶性菌体結合画分、沈殿部を不溶性菌体結合画分とし、先に得られた菌体内遊離型画分も合わせて酵素の性質を比較した。尚、不溶性菌体結合画分には、先の残渣画分が含まれるため、細胞壁に結合したままのグルタミナーゼが存在する。その結果、至適温度、至適pHに相違は見られなかったが、プロテアーゼ耐性、食塩阻害に対する耐性、金属塩の影響などに若干の相違があった。特にプロテアーゼ耐性については、不溶性菌体結合画分が最も耐性が高く、四方らの報告²⁶⁾と一致した。

一方、食塩阻害に対する耐性では、菌体内遊離型画分が最も耐性を示した。しかし、18%NaCl存在下で5%しか活性を示さなかった。この結果は、しょうゆ麴の不溶性グルタミナーゼ(ここでいう菌体結合型画分)は、可溶性グルタミナーゼ(菌体外分泌画分と菌体内遊離型画分)よりも食塩阻害に対する耐性が高く、かつ18%NaCl存在下でも20%の活性を示す²⁶⁾という四方らの結果と一致していない。これについては、グルタミナーゼの調製法(液体培養または固体培養からの粗酵素液の調製)の相違が一因と考察されている。

黄麴菌のグルタミナーゼ生産は、その培養状態によっても異なることが知られている。*A. oryzae*および*A. sojae*は、固体培養に比べて液体培養のグルタミナーゼ活性が著しく低い³¹⁾。中台らは、*A. oryzae*の液体培養物(ジャーファーメンターによる液体培養)を用いてしょうゆ醸造を行った結果、通常のしょうゆ麴(固体培養)を用いたしょうゆと比べてグルタミン酸含量が顕著に低く、グルタミナーゼが欠乏していることに起因すると考察している³²⁾。

岡村は、*A. oryzae*の液体培養における培地検討で、ブドウ糖、ショ糖などの多くの炭素源ではグルタミナーゼ活性が低く、乳糖、マンニトールなどを用いると高いグルタミナーゼ活性を示し、さらに、ブドウ糖を初期培地に一括添加すると、顕著にグルタミナーゼ活性は低下するが、培養中期から少量ずつ連続添加することで飛躍的に向上すると報告している³³⁾。すなわち、*A. oryzae*のグルタミナーゼは、炭素源によるカタボライト抑制を受けることが明らかになった。このように黄麴菌のグルタミナーゼは、固体培養に比べて液体

培養では著しく活性が低く、また、液体培養で活性を高めるには、培地成分や培養方法の制御を必要とする。

黄麴菌のグルタミナーゼの大半は菌体(細胞壁)に結合していること、黄麴菌自体がタンパク質分解酵素を多量に生産すること、培養条件によって生産性が異なることなどから、グルタミナーゼを精製することは困難を極めた。

1988年、Yanoらにより、初めて黄麴菌 *A. oryzae* の菌体内遊離型および菌体外分泌型のグルタミナーゼがそれぞれ単一バンドになるまで精製され、両者の酵素学的性質が報告された³⁴⁾。その結果、分子量、pH や温度に対する性質、金属塩の活性に対する影響、食塩阻害に対する耐性、基質特異性が両者ともほぼ同じであった。このことから、菌体内遊離型と菌体外分泌型のグルタミナーゼは同一であると考察している。尚、このグルタミナーゼは γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) 活性を持つという特徴を示す。

Tomitaらは、黄麴菌を培養した麴フスマ抽出液を用いて pH 8.5 下で、大豆タンパク質を消化すると γ -グルタミル化合物が生成し、この時に上記の精製した黄麴菌グルタミナーゼを添加すると、グルタミン酸の増加およびピログルタミン酸の減少と共に、 γ -グルタミル化合物も一時的に増加、その後、減少に転じることを示した³⁵⁾。この γ -グルタミル化合物の増減は、GGT による転移反応とグルタミン酸への水解反応と報告している。さらに仕込み後 120 日のしょうゆ諸味中にも GGT 活性が残存し、かつ、 γ -グルタミル化合物の存在も明らかにした。このことから、Tomitaらは、しょうゆ諸味中ではグルタミンからグルタミン酸への加水分解反応だけでなく、GGT による γ -グルタミル化合物を介したグルタミン酸の生成モデルを提唱している(図 0-3)。

黄麴菌グルタミナーゼの遺伝子研究

1990年代になると黄麴菌の遺伝子操作が可能となった。

黄麴菌グルタミナーゼ遺伝子に関する遺伝子操作は、1999年に Koibuchiらにより初めて報告された^{36,37)}。Koibuchiらは Yanoらの結果から、菌体結合型グルタミナーゼは培養後期になると Self-digestion(自己消化)により細胞壁から切り離され遊離してくる考えた。すなわち、菌体結合型グルタミナーゼと菌体外分泌型グルタミナーゼは同一のものであると考え、フスマ麴抽出液から菌体外分泌型グルタミナーゼを精製した。その結果、分子量が約 82,000 (Yanoらの報告では分子量約 113,000) の単量体の酵素で、Yanoらが精製した酵素と同様に γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ活性を持っていた。さらに Koibuchiらは部分アミノ酸配列を決定し、それを基にグルタミナーゼ遺伝子をクローニングした(*gtaA* 遺伝子)。この遺伝子を *A. oryzae* を宿主に用いて発現させたところ、グルタミナーゼ活性は親株の 2.6 倍に向上したと報告している。その後、北本ら³⁸⁾、Thammarongthamら³⁹⁾が同様にグルタミナーゼ遺伝子を単離したが、これらは *gtaA* 遺伝子と同一であった。

一方、北本ら⁴⁰⁾は、*gtaA* 遺伝子とは別に、分子量や酵素の諸性質の異なるグルタミナーゼを単離精製し、その部分アミノ酸配列を基に遺伝子をクローニングした(これを筆者らが

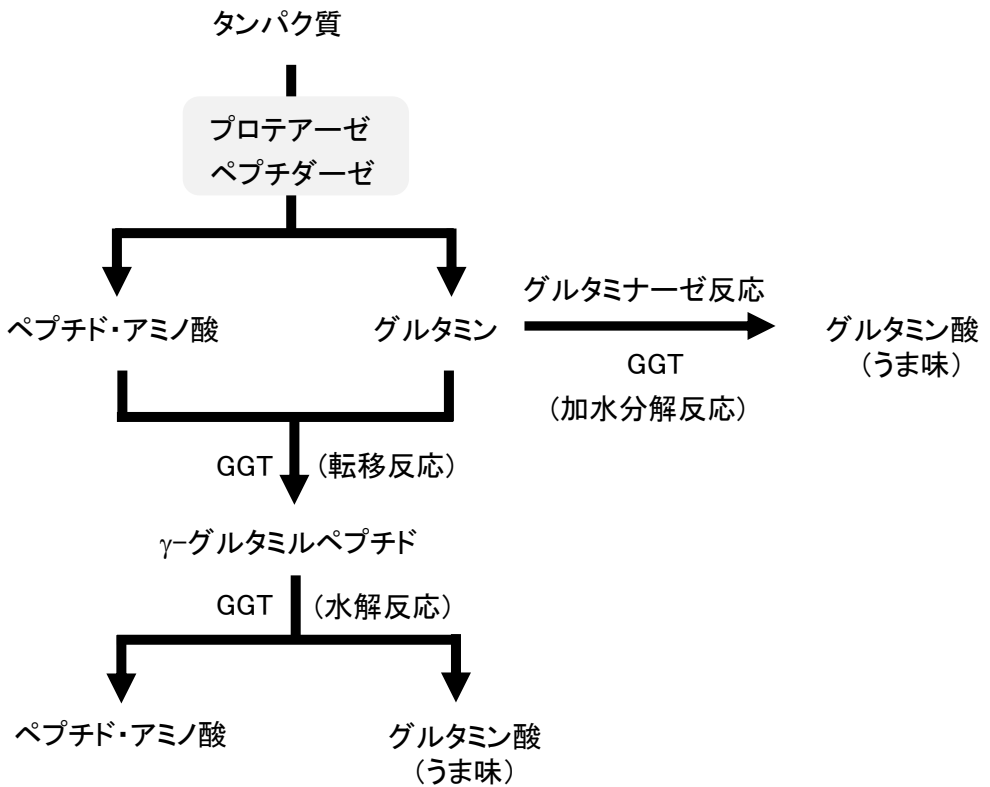


図0-3 しょうゆ醸造における麹菌 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(GGT)によるグルタミン酸の生成モデル
 原料タンパク質の分解によって生じるグルタミンと他のアミノ酸やペプチドとの間で、GGTによる転移反応が起こり、 γ -グルタミルペプチドを生成する。続いて、この γ -グルタミル化合物が、GGTの加水分解反応により、グルタミン酸とペプチド、アミノ酸に分解される。GGTは、グルタミンと水との間で転移反応を起こすと、グルタミンの加水分解反応(グルタミナーゼ反応)となり、グルタミンはグルタミン酸へ変換される。

ggtA 遺伝子と命名した)。このグルタミナーゼは、分子量や至適 pH、至適温度等の諸性質は既知の黄麴菌グルタミナーゼとは異なるものの、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性を持ち、極めて弱く D-グルタミンに反応する、合成基質 γ -グルタミル-*p*-ニトロアニリドへの反応性が L-グルタミンより高いなどの性質は、Yano らの報告に近い。

本研究を開始する前までに明らかにされている黄麴菌由来のグルタミナーゼについて、表 0-1 にまとめる。黄麴菌由来のグルタミナーゼに共通した性質は、(1) 至適 pH がややアルカリ側である、(2) 食塩阻害に対する耐性が低いことが挙げられ、しょうゆ醸造 (pH 5 弱、食塩含量 16-18%) に適した性質とは言い難い。黄麴菌には複数のグルタミナーゼが存在するが、その大半は菌体結合型の局在性を示す。一方で、菌体内遊離型酵素と菌体外分泌型酵素 (菌体結合型も含む) は性質が類似している点も多く、同一の可能性が指摘されている。以上のように黄麴菌には複数のグルタミナーゼが存在するということが明らかになったが、どのグルタミナーゼがしょうゆ醸造で機能しているかは不明のままである。

火入れ工程で生しょうゆを加熱すると生しょうゆ中で可溶化していた酵素やタンパク質が変性する。この時、しょうゆ中に含まれる多糖類や金属などを巻き込みながら複合的に凝集して、不溶性の塊を形成する⁴¹⁻⁴³⁾。これを淀(おり)と呼ぶ。淀は自然沈降もしくは、淀下げ剤などを添加して嵩を低くする。淀を含まない清澄な部分(上清)のみをしょうゆとして回収するため、淀量が多いと収量が減少する。

黄麴菌の酵素はしょうゆの淀と密接な関係がある。例えば、黄麴菌由来のアルカリプロテアーゼやアミラーゼを生しょうゆに添加して火入れを行うと、しょうゆ中の淀形成が促進し、淀量が増加する^{41,43)}。このことから黄麴菌由来の酵素が淀の核となり淀が形成されると考えられている。そのため、むやみに酵素を大量に生産する黄麴菌を用いると淀量が増加し、しょうゆの歩留まりが低下する。従って、しょうゆ醸造で機能する酵素を必要量生産する黄麴菌が理想である。先のペプチダーゼの研究から、しょうゆ醸造におけるグルタミン酸の溶出については、ロイシニアミノペプチダーゼ II とカルボキシペプチダーゼ IV が大きく寄与していることが明らかにされている²⁰⁾。このペプチダーゼの研究のようにしょうゆ醸造で機能するグルタミナーゼを特定し、その酵素を強化する黄麴菌の育種が望まれる。

本研究の目的は、しょうゆ醸造に寄与する黄麴菌由来のグルタミナーゼを同定することにある。黄麴菌由来のグルタミナーゼは、タンパク質分解酵素に比べて生産量が低い、菌体(細胞壁)に結合している、プロテアーゼによる分解を受けやすい性質から酵素を精製することが困難であり、タンパク質分解酵素のように酵素を精製して、しょうゆ醸造に寄与するグルタミナーゼを特定することは極めて難しかった。黄麴菌のゲノム解析が行われ、黄麴菌の遺伝子配列情報が明らかになったことから、本研究では、その遺伝子配列情報を基に遺伝子側からのアプローチで特定を試みた。

第 1 章では、*Cryptococcus* 属酵母由来の耐塩性および耐熱性に優れるグルタミナーゼ遺伝子の単離を行った。このタンパク質は、Amidase モチーフを持つという特徴を有するが、

表0-1 黄麹菌グルタミナーゼの比較

	Yamamoto ²⁵⁾	四方 ²⁶⁾		古屋 ²⁹⁾ , 寺本 ³⁰⁾			Yano ³⁴⁾		Koibuchi ³⁷⁾	北本 ³⁸⁾	北本 ⁴⁰⁾
由来	<i>A. sojae</i> 262	しょうゆ麹		<i>A. oryzae</i> No.27			<i>A. oryzae</i> MA-27-IM		<i>A. oryzae</i> AJ117281	<i>A. sojae</i> BA-104	<i>A. sojae</i> BA-104
局在	菌体内	麹ホモジネート 上清 (可溶性) (菌体外分泌型)	麹ホモジネート 洗浄残渣 (不溶性) (菌体結合型)	菌体内 遊離型	可溶型 菌体結合	不溶型 菌体結合	菌体内 (遊離型)	菌体外 (分泌型)	菌体外 (分泌型)	菌体外 (分泌型)	菌体外 (分泌型)
分子量	123,000	-	-	-	-	-	113,000	113,000	82,091	83,000	71,000
至適pH	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	9.0	9.0	9.0	8.5	8.0
pH安定性 (80%以上の残 存活性)	8.0	-	-	-	-	-	9.0	9.0	7.0	3-11 (40°C)	5-10 (40°C)
至適温度(°C)	-	-	-	40	40	40	45	45	37-45	50	45
温度安定性 (80%以上の残 存活性)	40°C以下 (pH8.0, 10min)	50°C以下 (pH7.0, 20min)	60°C以下 (pH7.0, 20min)	-	-	-	37°C以下 (pH7.2, 10min)	37°C以下 (pH7.2, 10min)	45°C以下 (10min)	45°C以下 (pH8.0, 30min)	40°C以下 (pH8.0, 30min)
食塩阻害に 対する耐性	-	20%(5%NaCl) 5%(20%NaCl)	40%(5%NaCl) 20%(20%NaCl)	50%(5%NaCl) 5%(18%NaCl)	15%(5%NaCl) 1%(18%NaCl)	12%(5%NaCl) 1%(18%NaCl)	50%(5%NaCl) 10%(18%NaCl)	50%(5%NaCl) 10%(18%NaCl)	50%(5%NaCl) 18%(20%NaCl)	-	-
K _m 値	3.3 × 10 ⁻⁴ M	-	-	-	-	-	9.1 × 10 ⁻⁵ M	9.6 × 10 ⁻⁵ M	1.2 × 10 ⁻³ M	-	-

- ・ -は、測定されていないため引用文献に記載されていない項目を表す
- ・ 食塩阻害に対する耐性は、括弧内の食塩濃度が反応系に含まれる時の活性値を示し、食塩を含まない反応系で得られる活性値を100%とした時の相対活性(%)を示す

既知タンパク質に類似したものがなく新規のグルタミナーゼであった。さらに、Amidaseモチーフを持つ Amidase signature (AS) enzymes family の中で独立したサブファミリーを形成し、この中には *Aspergillus* 属糸状菌由来の機能未知タンパク質も含まれていた。尚、この章の内容は関連原著論文 1. にまとめた。

第 2 章では、第 1 章で同定した *Cryptococcus* 属酵母由来のグルタミナーゼ遺伝子と相同性のある遺伝子を *A. oryzae* RIB40 株の EST (Expressed sequence tag) 解析情報を利用して同定し、その酵素学的諸性質を決定した。この酵素は遊離のグルタミンだけでなく、ペプチドの C 末端に位置するグルタミンやアスパラギンをグルタミン酸やアスパラギン酸に脱アミド化するペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼであることが分かり、世界で初めてこの酵素活性をもつタンパク質遺伝子を同定した。尚、この章の内容は、関連原著論文 2. にまとめた。

第 3 章では、黄麹菌 *A. oryzae* および *A. sojae* のゲノム配列情報を活用し、既知のグルタミナーゼと相同性のあるグルタミナーゼ遺伝子を明らかにし、各遺伝子の単独遺伝子破壊株を作製して、しょうゆ麹(固体麹)で主要なグルタミナーゼ活性を示す遺伝子を特定した。この遺伝子由来のタンパク質もペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼであった。また、*Cryptococcus* 属酵母由来のグルタミナーゼについても基質特異性を再解析した結果、ペプチドグルタミナーゼ活性を有しており、第 1 章で明らかにした AS enzymes family の独立したサブファミリーが、ペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼファミリーであることを明らかにした。尚、この章は、関連原著論文 3. と 5. にまとめた内容である。

第 4 章では、グルタミナーゼ遺伝子単独破壊株および複数の遺伝子を同時に破壊した多重遺伝子破壊株を用いてしょうゆの試験醸造を行い、しょうゆ醸造で真に機能するグルタミナーゼの特定を行った。基質特異性の異なる 4 つのグルタミナーゼを特定し、菌体結合型の酵素だけでなく菌体内酵素も関与すること、グルタミナーゼ活性を持つタンパク質が必ずしもしょうゆ醸造で機能するわけではないこと、しょうゆ中のグルタミン酸含量を高めるためには、ペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼ活性が重要であることを明らかにした。尚、この章の内容は関連原著論文 4. にまとめた。

最終章では、本研究を総括し、本研究で得られた結果を踏まえて、現在考えられるしょうゆ醸造におけるグルタミン酸の生成機構を提唱した。

本研究は、序章を含めた全 6 章構成で、しょうゆのうま味成分であるグルタミン酸生成に寄与する黄麹菌由来のグルタミナーゼに関する研究をまとめたものである。

第1章 *Cryptococcus* 属酵母由来の新規なグルタミンナーゼ遺伝子の単離

【はじめに】

グルタミンナーゼは、うま味成分であるL-グルタミン酸を生成する酵素であり、しょうゆやタンパク質を酵素的に分解して得られる調味食品を製造する際に、その品質を向上させる効果を持つため大変重要視される。しょうゆなどのタンパク質を酵素的に分解して得られる調味食品は、防黴性の面から多量の食塩が用いられることが多い。また、酵素分解を促進するために、高温で作用させることがあるため、特に耐塩性および耐熱性に優れたグルタミンナーゼが求められている。分子生物学的手法の技術進歩に伴い、グルタミンナーゼは種々の生物種から単離され、その酵素学的性質およびその遺伝子について報告されている⁴⁴⁻⁴⁶⁾。

耐塩性・耐熱性に優れたグルタミンナーゼの研究は古くから行われている。横塚らは、様々な微生物種から耐塩性グルタミンナーゼをスクリーニングし、*Cryptococcus* 属酵母 (*C. albidus*) にその活性を見出した⁴⁷⁾。この酵素は、洗浄菌体懸濁液に活性が見出されたことから菌体表面に局在性を示すと考えられる。岩浅らは、菌体破碎液から菌体内酵素を精製し、酵素の諸性質を決定した⁴⁸⁾。至適 pH が 5.5-8.5 と広く、60°C で 10 分間、熱処理しても 80% 以上の残存活性を示すほど耐熱性に優れていた。さらに、18% NaCl 存在下でも 53% の活性を有し、食塩阻害に対しても耐性を示した(表 1-1)。これらの性質は、しょうゆ醸造に適した性質と言える。さらに、小規模試験ではあるが、仕込み時にこの酵素を添加するとしょうゆのグルタミン酸含量が増加することが報告されている^{47, 49)}。

Sato らによって、*C. albidus* 由来のグルタミンナーゼよりも耐塩性・耐熱性に優れたグルタミンナーゼが *C. nodaensis* より見出された⁵⁰⁾。Sato らは、菌体に植物細胞壁溶解酵素である Cellulase ONOZUKA R-10 を作用させた粗酵素液から酵素を精製し、酵素の諸性質を決定した。その結果、至適 pH が 5.8-8.0 と広く、65°C で 30 分間熱処理しても 90% 以上の残存活性を示した。さらに、18% NaCl 存在下でも 85% の活性を有し、*C. albidus* 由来のグルタミンナーゼよりも耐熱性、耐塩性に優れたグルタミンナーゼであることを報告している(表 1-1)。

耐熱性、耐塩性に優れた酵母由来のグルタミンナーゼとして、上記 *Cryptococcus* 属以外にも *Bulleromyces albus*⁵¹⁾、*Candida famata*⁵²⁾、*Hannaella oryzae*⁵³⁾ に見出されているが、これまでにそれらの遺伝子は単離されていない。耐塩性・耐熱性に優れたグルタミンナーゼ遺伝子を単離できれば、分子育種に応用することが可能となる。

本章では、精製酵素の N 末端および内部部分アミノ酸配列を同定し逆遺伝学的な手法を用いて、しょうゆ醸造に適した *Cryptococcus* 属酵母由来のグルタミンナーゼ遺伝子を単離解析することを目的とした。尚、本章で行っている実験のうち、酵素の精製、N 末端および内部のペプチド配列の同定、ペプチド配列から核酸 DNA を合成し、部分遺伝子断片をクローニングした実験については、共同研究者が行ったものであるが、本章の構成上、本論文に記載する。

表1-1. *Cryptococcus*属酵母由来のグルタミナーゼの比較

	CaGahA ⁴⁸⁾	CnGahA ⁵⁰⁾
起源	<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Cryptococcus nodaensis</i>
分子量	187,000 (3-4量体)	270,000 (3-4量体)
至適pH	5.5-8.5	5.8-8.0
安定pH	4.0-8.0	5.0-7.5
至適温度	70°C	70°C
耐熱性	80% (60°C, 10min)	90% (65°C, 30min)
食塩阻害に対する耐性 (18%NaCl)	53%	85%
Km (L-グルタミン)	0.08mM	n.d.
D-グルタミン	+	+
L-アスパラギン	- 注1)	+
Cbz-Gln	+	- 注2)
L-Gly-Gln	- 注3)	- 注2)

*Cryptococcus albidus*由来のGlutamine amidohydrolaseからこのグルタミナーゼをCaGahAと命名した。同様に*Cryptococcus nodaensis*由来のグルタミナーゼをCnGahAと命名した。

注1) : 引用文献では反応性はないとある。第3章での再解析結果でも極めて反応性は低い。

注2) : 引用文献ではペプチドへの反応性がないと記載されている。

注3) : 引用文献では反応性はないとある。第3章での再解析結果では反応性を示した。

n.d. : 測定未実施

【実験の材料と方法】

(1) 実験に使用した株

グルタミナーゼの精製および遺伝子の単離には、*Cryptococcus albidus* ATCC20293 および *Cryptococcus nodaensis* NISL-3771 を使用した。遺伝子の発現解析には、*Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 (インビトロジェン) を使用した。

(2) 酵素の精製

C. nodaensis 由来のグルタミナーゼ (以下 CnGahA (*Cryptococcus nodaensis* 由来の Glutamine amidohydrolase A) タンパク質と記す。) の精製酵素は、当研究所に冷凍保存されていたものを使用した。

C. albidus 由来のグルタミナーゼ (以下 CaGahA (*Cryptococcus albidus* 由来の Glutamine amidohydrolase A) タンパク質と記す) の精製は、以下のように行った。グルコース 6.0%、コーンステープリカー 4.0%、 KH_2PO_4 0.1%、 MgSO_4 0.1%、pH 5.5 からなる培地に *C. albidus* を接種し、25°C で 2 日間振盪培養し、種培養液を得た。この種培養液を同培地 2 L に 100 ml 接種し、ミニジャーを用いて攪拌速度 450 rpm、通気 1 vvm の条件下で 25°C、3 日間培養した。

次に培養液を遠心分離 (8000 rpm、20 分間) し、得られたペースト状の菌体 50 g に 0.2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を 500 ml 加え、菌をよく分散させた。続いて細胞壁溶解酵素として Cellulase ONOZUKA R-10 (ヤクルト) 4.0 g を加え、42°C で 18 時間攪拌し、その後、遠心分離 (8000 rpm、20 分間) して上澄液を得た。この上澄液を 60°C で 1 時間加熱し、0.2 M KH_2PO_4 で pH を 6.8 に調整後、さらに 60°C で 1 時間加熱して夾雑タンパク質を変性させ、遠心分離 (8000 rpm、20 分間) にて、変性したタンパク質を除いた。

得られた上澄液に、終濃度 1.2 M となるように硫酸アンモニウムを加え、室温で約 1 時間静置した。その後、遠心分離 (8000 rpm、20 分間) し、不溶性タンパク質を除去した粗酵素液を得た。上記の粗酵素液を TSKgel Phenyl-5PW (ϕ 21.5 mm x 150 mm) カラムに通液後、溶離液; A 液 1.2 M 硫酸アンモニウム含有 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、B 液 20% エチレングリコール含有 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) の条件で、硫酸アンモニウムの 1.2 M から 0 M への、及びエチレングリコールの 0% から 20% への各濃度勾配で溶出した。

次に、活性画分をセントリプレップ YM-10 (ミリポア) を用いて、0.01 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いて脱塩、濃縮およびバッファー置換後、TSKgel DEAE-5PW (ϕ 7.5 mm x 75 mm) カラムに通液し、タンパク質をカラムに吸着させた。溶離液; A 液 0.01 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、B 液 1.0 M NaCl 含有 0.01 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) の条件で、NaCl の 0 M から 1.0 M への濃度勾配で溶出した。

続いて、活性画分をセントリプレップ YM-10 で濃縮後、TSKgel G3000 SW (東ソー、 ϕ 7.6 mm x 600 mm x 2) カラムに 0.25 ml ずつ注入し、溶離液; 0.2 M NaCl 含有 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) の条件で溶出した。

(3) N 末端および内部アミノ酸配列の決定

CnGahA タンパク質の N 末端アミノ酸配列は、東レリサーチセンターに解析を依頼した。内部アミノ酸配列については、以下の通りに行った。精製グルタミナーゼ標品 400 μg を 1 μg のリジルエンドペプチダーゼ(和光純薬工業)、0.3%SDS を含む 50 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 9.0) 500 μl 中で、37°C、16 時間酵素消化した。この酵素消化液を Shimadzu HPLC システム(島津製作所、カラム: Asahipak ODP-5E) に供し、生成したペプチド断片を精製した。上記ペプチド断片のアミノ酸配列をプロテインシークエンサー492 型(アプライドバイオシステムズ)を用いて、エドマン分解法により分析した。尚、全タンパク質の定量には、Bio-Rad Protein Assay kit(日本バイオラッド)を用いた。SDS-PAGE には、マルチゲル II ミニ 10/20(コスモバイオ)を使用し、ゲルの染色には、クイック CBB 染色キット(和光純薬工業)を用いた。

CaGahA タンパク質の内部アミノ酸配列は、以下の通りに行った。精製酵素 6 μg に糖タンパク質から N 結合型糖鎖を脱グリコシル化する PNGase F(ニュー・イングランド・バイオラボ) 500 U(ユニット)を作用させた。脱糖鎖処理を行った反応液を SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜に転写し、クイック CBB 染色キットの A 溶液(CBB-R250 含有)のみを用いて染色した。目的のバンドを切り出し、直ちにプロテインシークエンサーに供した。尚、PVDF 膜への転写処理は、日本エイドーの転写装置を用い、セミドライ法で行った。

(4) 染色体 DNA および RNA の抽出

一般的な DNA、RNA 操作については、常法に従った^{54, 55)}。*C. nodaensis* および *C. albidus* を YM 培地(0.5%ペプトン、0.3%酵母エキス、0.3%マルトエキス、1.0%グルコース、pH 6.0) 100 ml に接種し、25°C で 30 時間培養した。培養終了後、得られた培養液を 3000 rpm、10 分間遠心分離して菌体を回収し、液体窒素中で凍結させた後、乳鉢と乳棒を用いて物理的に磨砕した。染色体 DNA の抽出には、核酸抽出剤 Sepagene(三光純薬)を利用し、全 RNA の抽出には、RNeasy Plant mini Kit(キアゲン)を利用した。全ての操作は、添付のプロトコールに従った。

(5) 染色体 DNA のサザンブロット解析

C. nodaensis 由来の染色体 DNA 3 μg を、制限酵素 *Bam*H I、*Eco*R V、*Hind* III、*Nru* I、*Not* I、*Sac* I、*Sal* I、*Stu* I、*Xho* I 各 100 U を用い、37°C で 16 時間消化した。得られた制限酵素消化 DNA を 0.7%アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、サザンブロット法により、ナイロン膜 Hybond-N⁺(アマシャムファルマシアバイオテック)に DNA を転写した。ハイブリダイゼーションのプローブとしては、CnPrb-s と CnPrb-as をプライマーとし、PCR DIG ラベリングミックス(ロシュ・ダイアグノスティックス)存在下で PCR により増幅させた約 1.4 kb の断片を使用した。転写後のナイロン膜を 2×SSC で洗浄後、DIG システムを

用い、ユーザーガイド（ロシュ・ダイアグノスティックス）に従って解析した。

(6) *C. nodaensis* 由来のグルタミナーゼ遺伝子のクローニング

上記(3)で明らかにした内部アミノ酸配列に対応するコドン配列から DNA 配列を合成した(表 1-2)。次にその化学合成 DNA を用いて PCR を行い、遺伝子をクローニングした。尚、DNA を合成する際に、各アミノ酸のコドン配列で、サードコドンのように複数の塩基に相当するものには修飾塩基を使用した。

GVTSGGLAFQPASV (ペプチド F)に相当する peptideF-s と LWYEDYAEQNDD(ペプチド G) に相当する peptideG-as をプライマーに用いて、2つのコード領域間の DNA 断片を PCR により増幅させた(下線部が DNA 配列を合成するのに利用した領域を示す)。増幅した DNA 断片は 0.7%アガロースゲル電気泳動後にゲルより回収し、これを TOPO TA Cloning Kit (インビトジェン)を用いて pCR2.1-TOPO ベクターに組み込んだ。ゲルからの DNA 断片の抽出精製は、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン)を用いて行った。得られた組換えプラスミドは、Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (アマシャムファルマシアバイオテック)を用いてシーケンス反応を行い、LI-COR MODEL 4200L シーケンサー (アロカ)で塩基配列の確認を行った。シーケンス反応は、添付のプロトコールに従った。

染色体上の遺伝子の全長を取得するために、*EcoR* V 断片と *Sa*/I 断片を用いて、インバース PCR を行った。*EcoR* V および *Sa*/I 消化した染色体 DNA 3 μ g を 0.7%アガロースゲル電気泳動で分離し、それぞれの大きさに相当する (*EcoR* V であれば、約 2.5 kb、*Sa*/I であれば、約 2 kb) 位置のアガロースゲルを切り出した。抽出精製した DNA 断片を DNA Ligation Kit Ver. 2 (タカラバイオ)を用いてセルフライゲーションさせた。上記のライゲーション産物を鋳型とし、常法に従いインバース PCR を行った。インバース PCR に使用したプライマーは、*EcoR* V 断片を鋳型としたものには、CnInv5' -s と CnInv5' -as の組み合わせで、*Sa*/I 断片を鋳型としたものには、CnInv3' -s と CnInv3' -as の組み合わせで行った。増幅された DNA 断片は、上記と同様に pCR2.1-TOPO ベクターにクローニングし、塩基配列を確認した。

完全長 cDNA の取得には全 RNA を使用し、FirstChoice RLM-RACE Kit (アンビオン)、3' -Full RACE Core Set (タカラバイオ)を利用して、それぞれグルタミナーゼ cDNA の 5' 側領域に相当する DNA 断片及び、3' 側領域に相当する DNA 断片を増幅した。全ての操作は、添付のプロトコールに従った。FirstChoice RLM-RACE Kit には CnRace5' -as、3' -Full RACE Core Set には CnRace3' -s のプライマーを使用した。増幅された DNA 断片は、上記と同様に pCR2.1-TOPO ベクターにクローニングし、塩基配列の確認を行った。次に 3' -Full RACE Core Set で得られた一本鎖 DNA を鋳型とし、得られた配列情報を基に Cn-s と Cn-as のプライマーを構築し、全長グルタミナーゼ (ORF : Open Reading Frame) 領域を PCR により DNA を増幅した (約 2 kb)。増幅した DNA 断片は、上記と同様に pCR2.1-TOPO ベクターに組み込み、プラスミド pCngahA を得た。

表1-2. 本研究に用いたプライマー

Primer name	Oligonucleotide sequence (5'-3')
Cloning primer for <i>CngahA</i> gene	
peptideE-s	GARTTYATHGAYACIGARGTIYT
peptideE-as	ARIACYTCIGTRTCDATRAAYTC
peptideF-s	GGIGTIACIWSIGGIYTIGCITTCYAARCC
peptideG-as	TTYTGYTICIGCRTARTCYTCRTA
CnPrb-s	CACCGTGGGCGACAAGCAGTATTTG
CnPrb-as	CCACGAGCTGTTCGGCAAGATGAGA
CnInv5'-s	ATCGTATGGTTCGAGCCAGTCGTATGCACCT
CnInv5'-as	AGGTCTACGCCAACCTGATCACCTACTACC
CnInv3'-s	TCCAATCCCCATTTCAGCTCCGATGCTGTAC
CnInv3'-as	AAAGTCGCGAGCGTATCGGTGAGTGAGGGA
CnRace5'-as	CATCCTCTCCGTTGGCAAATTGGCTC
CnRace3'-s	CACCGTGGGCGACAAGCAGTATTTG
Cn-s	GCAGGTACCATGGCCACAAGCATCAACATGCTGGCC
Cn-as	ATTGAATTCTACACGCGATCTGGGTAGGCGACTGC
Cloning primer for <i>CagahA</i> gene	
peptideI-s	TAYATHGCIWSITAYAAAYCAYGC
peptideJ-as	ACICCYTCIARIGCICKIGGRTTIGC
CaRace5'-as	TTCTTGGTGTACAGGCGCGAAGGTACAGG
CaRace3'-s	CGACTCGATCGATCTGACTCAAGTATTCC
Ca-s	TCTCGGTACCATGTCTCTCCTTCGCCTTGCG
Ca-as	AGAGAATTCTCTACTTCAAA GGATAGGTC

斜体は、制限酵素部位を示している。全長ORF領域をクローニングして塩基配列を確認後、酵母発現ベクターに組み込むために制限酵素部位を付加している。

A : アデニン, T : チミン, C : シトシン, G : グアニン, I : イノシン, Y : TあるいはC, R : AあるいはG, K : GあるいはT, H : AあるいはTあるいはC, W : AあるいはT

(7) *C. albicus* 由来のグルタミナーゼ遺伝子のクローニング

基本的には、*CngahA* 遺伝子のクローニングと同様に行った。上記(3)で明らかにした内部アミノ酸配列から予想される両方向の DNA 配列を合成した。TVSAKTVPSGPYIASUNHASD (ペプチド I) の下線部ペプチド配列に相当する peptideI-s と NVAVPRALEGVRVAVKDLTAGLP (ペプチド J) の下線部ペプチド配列に相当する peptideJ-as をプライマーに用いて、PCR 反応を行い、その配列情報を基に、CaRace5' -s と CaRace3' -as を合成し、RACE 法にて cDNA 配列を決定した。最終的に Ca-s と Ca-as のプライマーを用いて ORF 全長を pCR2.1-TOPO ベクターに組み込み、プラスミド pCagahA を得た。

(8) パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主とした取得 cDNA の発現

発現ベクターには、ガラクトースによりタンパク質の誘導発現が可能な pYES2 ベクター (インビトロジェン) を使用した。pCngahA をおよび pCagahA を *Kpn* I と *Eco*R I で制限酵素処理し、得られた断片を切り出し精製した後、同処理を行った pYES2 ベクターにクローニングした (pYES2_CngahA および pYES2_CagahA)。

クローニングしたプラスミドは酢酸リチウム法⁵⁶⁾により、宿主 INVSc 株に導入した。選択培地には、SD-U 培地 (2% glucose、0.67% Yeast nitrogen base without amino acids (ディフコ)、0.192% Yeast synthetic drop-out medium supplement without uracil (シグマ)) を使用した。得られた形質転換体を用いて、pYES2 ベクターの添付のプロトコールに従い、タンパク質の発現を行った。

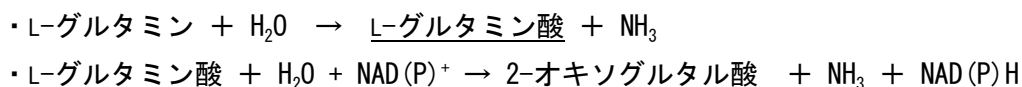
(9) グルタミナーゼ活性の測定

本研究に使用したグルタミナーゼ活性測定法について以下にまとめる。本研究で用いたグルタミナーゼ活性測定法は、①酵素反応後に生成するグルタミン酸を定量する方法、②酵素反応後に生成するアンモニアを定量する方法、③ヒドロキシルアミンとグルタミンとの間で生成するヒドロキサム酸を定量するヒドロキサメート法を用いた。

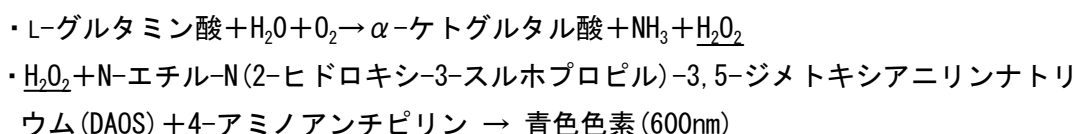
① L-グルタミンを加水分解して生成される L-グルタミン酸を定量する方法

2% (w/v) の L-グルタミン溶液 1.0 ml に 0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 2.0 ml および菌体培養液または酵素懸濁液 1.0 ml を混合し、37°C、30 分間反応させた。0.75 N 過塩素酸液 1.0 ml を添加して反応を停止させ、10 分間静置した。その後、1.5 N 水酸化ナトリウム溶液 0.5 ml を加え、中和した。上記の反応液 0.1 ml を 50 mM の EDTA・Na を含む 0.1 M 塩酸ヒドロキシルアミン溶液 (pH 8.0) 1.0 ml、20 mM の NAD⁺ 溶液 1.0 ml および 500 U/ml の L-グルタミン酸脱水素酵素液 (シグマ) 50 μ L を添加し、37°C で 30 分間反応させた。分光光度計 U-2000 (日立製作所) により 340 nm における吸光度値を測定した。そして、予め作成した L-グルタミン酸の検量線より、L-グルタミン酸の生成量を定量し、

上記反応条件で1分間に1 μmol のグルタミン酸を生産する酵素量を1 Uとした。



グルタミン酸の定量には、グルタミン酸脱水素酵素を用いた測定だけでなく、ヤマサ L-グルタミン酸測定キット II (ヤマサ醤油) を用いて添付のプロトコールに従って測定した。本キットは、L-グルタミン酸オキシダーゼの酸化反応により、L-グルタミン酸より産生された過酸化水素を、パーオキシダーゼを用いた青色色素形成反応により定量化する方法である。

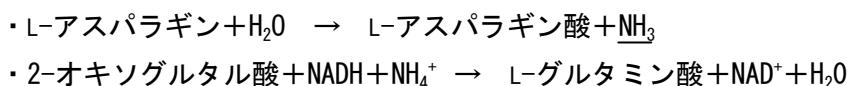


第2章以降に使用するしょうゆ麹様培地など培地によっては、グルタミン酸脱水素酵素を用いた L-グルタミン酸の測定では、バックグラウンドが高く、また、培養液や抽出液中に他の脱水素酵素が混在するのか、活性誤差が大きかった。そのため、特異性の高い L-グルタミン酸オキシダーゼを使用している本キットを併用した。以下の測定は全て線形性の保たれる濃度範囲を確認した上で実験した。第2章および第3章で測定したしょうゆ麹における菌体結合型のグルタミナーゼ活性はこの方法を用いた。

② 酵素反応で L-グルタミンから生成するアンモニアを定量する方法

①に記載した方法でグルタミナーゼ反応を行い、得られた反応中和液 0.1 ml を F-キットアンモニア (JK インターナショナル) を用いて添付のプロトコールに従いアンモニア濃度を定量した。上記反応条件下で、1分間に1 μmol のアンモニアを生成する酵素量を1 Uとした。アスパラギンやペプチドに対する脱アミド化反応は、反応生成物がグルタミン酸ではないため、グルタミン酸を定量する方法では活性を測定できない。そのため、反応性生物であるアンモニアを定量し、酵素活性を測定した。

本キットの測定原理は、下記の Glutamate dehydrogenase による反応に基づく。

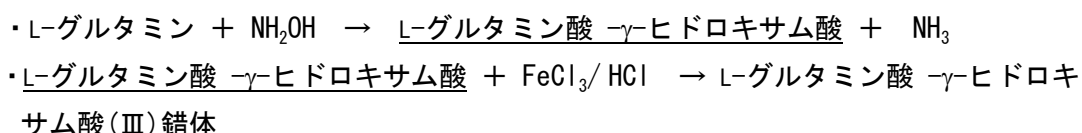


この反応で消費される NADH の量がアンモニアの量に相当するので、340nm における吸光度の減少を測定し、アンモニア標準溶液を基に生成したアンモニア量を定量した。

③ ヒドロキサメート法

L 字型試験管に菌体懸濁液または酵素懸濁液 7.0 ml、終濃度 0.1 M L-グルタミンおよび 1M 塩酸ヒドロキシルアミン含有 0.1 M Tris 溶液 (pH 8.0、水酸化ナトリウムで調整) 5.0 ml を添加し、60°C で 30 分間振とうしながら反応した。反応終了後、5% FeCl_3 含有 8 N 塩

酸溶液を 2.0 ml 添加し、反応を停止させた。ろ紙 No. 5C (アドバンテック) でろ過し、分光光度計 U-2000 (日立製作所) により 540 nm における吸光度値を測定した。予めヒドロキサム酸量を検量線により求め、1 分間に 1 μmol のヒドロキサム酸を生成する酵素量 1 U と定義した。この方法は、過剰のヒドロキシルアミン存在下で L-グルタミンを直接 L-グルタミン酸 γ モノヒドロキサメートに変換し、これを塩化第 2 鉄で錯体をつくらせ発色する方法である。



1 段階でグルタミナーゼ活性を簡便に測定でき、上記の酵素法と相関が高いため、しょうゆ麴のグルタミナーゼ活性を測定する一般的な測定法とされている。ただし、この反応 (ヒドロキシルアミンへの転移) が起こらず、グルタミンを加水分解する反応しか持たない酵素もある (例えば、第 4 章の Gls タンパク質などが挙がる)。そのため、一概にこの酵素活性測定法ですべてのグルタミナーゼ活性を測定できるとは限らないが、第 2, 3, 4 章において、しょうゆ麴における全グルタミナーゼ活性についてはこの方法を用いて測定した。

本章における通常の活性測定は、①の方法に準じて行った。

形質転換体の活性測定は、以下の通りに行った。形質転換体を非誘導培地 SR-U 培地 (SD-U 培地の 2% グルコースを 2% ラフィノースに置換したもの) で 30°C、24 時間、前培養した後に、OD₆₀₀ が 0.4 となるように、非誘導培地 (SR-U 培地) または誘導培地 (SRG-U 培地; SR-U 培地の 2% ラフィノースを 1% ラフィノースと 1% ガラクトースに置換したもの) に植菌し、培養 4、6、9、12、32 時間後に、10000 rpm で 10 分間遠心して菌体を回収した。20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いて、得られた菌体を 3 回洗浄後、同緩衝液で 1.0 ml となるように再懸濁した。得られた菌体懸濁液を活性測定に使用した。

(10) グルタミナーゼ遺伝子解析

Amidase signature enzymes family に属する酵素の塩基配列およびアミノ酸配列は、UniProt (<http://www.uniprot.org/>) のデータベースより入手した。

ホモロジー検索は、NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) のデータベースを利用し、BLASTN および BLASTP のデフォルトプログラムで行った。

シグナル配列の予測には SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) を、局在性の予測には、PSORT II Prediction (<http://psort.hgc.jp/form2.html>) を、膜貫通領域の予測には SOSUI (<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>) を用いた。

マルチプルアライメントと系統樹は、N-J 法で行い、Clustal W

(<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)⁵⁷⁾、および GENETYX(ゼネティックス)をデフォルトプログラムで利用した。系統樹のグラフ化は、Tree-View ソフト (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview>)を使用した。

【結果および考察】

(1) *Cryptococcus nodaensis* 由来のグルタミナーゼ (CnGahA タンパク質) の N 末アミノ酸配列および内部アミノ酸配列の決定

CnGahA タンパク質は SDS-PAGE 上で単一バンド、最終ゲルろ過カラムで単一ピークにまで精製された酵素が当研究所に保管されていた (図 1-1)。脱糖鎖処理をすると、バンドがシフトしたことから糖鎖付加タンパク質であることが明らかになった。東レリサーチセンターからの解析報告によれば、高度に精製されたタンパク質にも拘らず、精製タンパク質の N 末アミノ酸配列解析では、少なくとも 3 本のポリペプチドが含まれていると予想され、ペプチドシーケンサーのシグナル強度から、それぞれペプチド A : GVTSGLAFQPASVSFT、ペプチド B : KVASVSIPQGAYLAH、ペプチド C : SGSIPQGQYLAH と推定された。ペプチド B とペプチド C のシグナル強度はペプチド A に比べて弱く、それらのペプチド配列は類似していた (太下線字が共通のアミノ酸)。

次に、内部のアミノ酸配列を以下のように決定した。尚、X は、未同定のアミノ酸残基を示している。ペプチド D : TSQFA、ペプチド E : EFIDTEVL、ペプチド F : GVTSGLAFQPASVXF、ペプチド G : LWYEDYAEQNDD。

(2) PCR 法による *CngahA* 遺伝子の部分断片の取得

(1) の内部アミノ酸配列より、多くのアミノ酸残基を同定できたペプチド配列 E、F、G のアミノ酸配列をもとにプライマー DNA を合成し、PCR 反応を行った。その結果、peptide F-s と peptide G-as の組み合わせで約 1.7 kb が、peptide F-s と peptide E-as の組み合わせで 1.9 kb が、peptide G-s と peptide E-as の組み合わせで 0.2 kb の DNA 断片が増幅した。このことからグルタミナーゼの内部ではペプチド F-ペプチド G-ペプチド E の順序で並んでいることが予想された。

ペプチド F-s とペプチド G-as の組み合わせで増幅した 1.7 kb の PCR 断片の塩基配列を決定した。決定した塩基配列から推定されるアミノ酸配列にはペプチド D の配列も見いだされた。相同性検索を行ったところ、既知のグルタミナーゼとの類似はみられなかったが、いくつかのアミダーゼやアミドトランスフェラーゼなどと部分的な類似がみられた。以上の結果から、取得した DNA 断片は *CngahA* 遺伝子の一部であると結論付けた。

(3) インバース PCR 法による *CngahA* 遺伝子のゲノム遺伝子の取得

EcoR I、*Sma* I、*Xba* I で制限酵素処理した染色体 DNA を用いてサザンブロット解析した結果、それぞれサイズの異なるバンドが 1 つだけ検出された (データ未掲載)。このことから本遺伝子は染色体上に 1 コピー存在することが推定された。

EcoR V、*Bam* H I、*Sa* I で適度な大きさ (約 2~4 kb) のバンドが確認できたため (図 1-2)、これらの制限酵素で染色体 DNA を処理し、ライゲーションさせてインバース PCR を行った。その結果、*EcoR* V で制限酵素処理して鋳型としたものから既知配列の下流域がクローニン

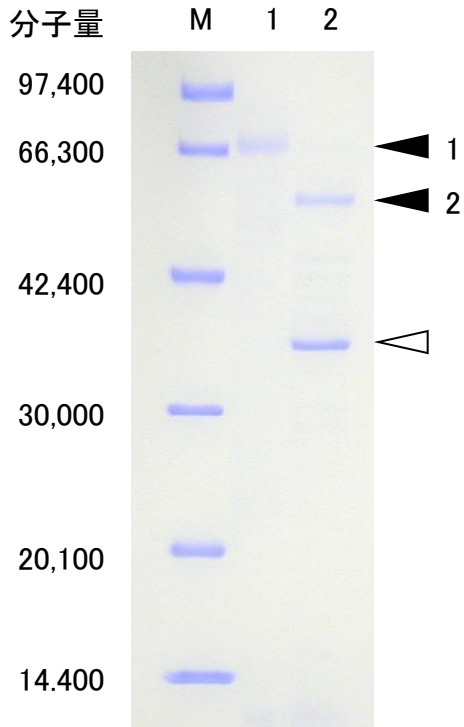


図1-1 CnGahAタンパク質のSDS-PAGE

M; 分子量マーカー、レーン1; 精製酵素、レーン2; 脱糖鎖処理後の精製酵素。

CnGahA(◄)、脱糖鎖処理に用いた酵素PNGase F(◁)を表す。

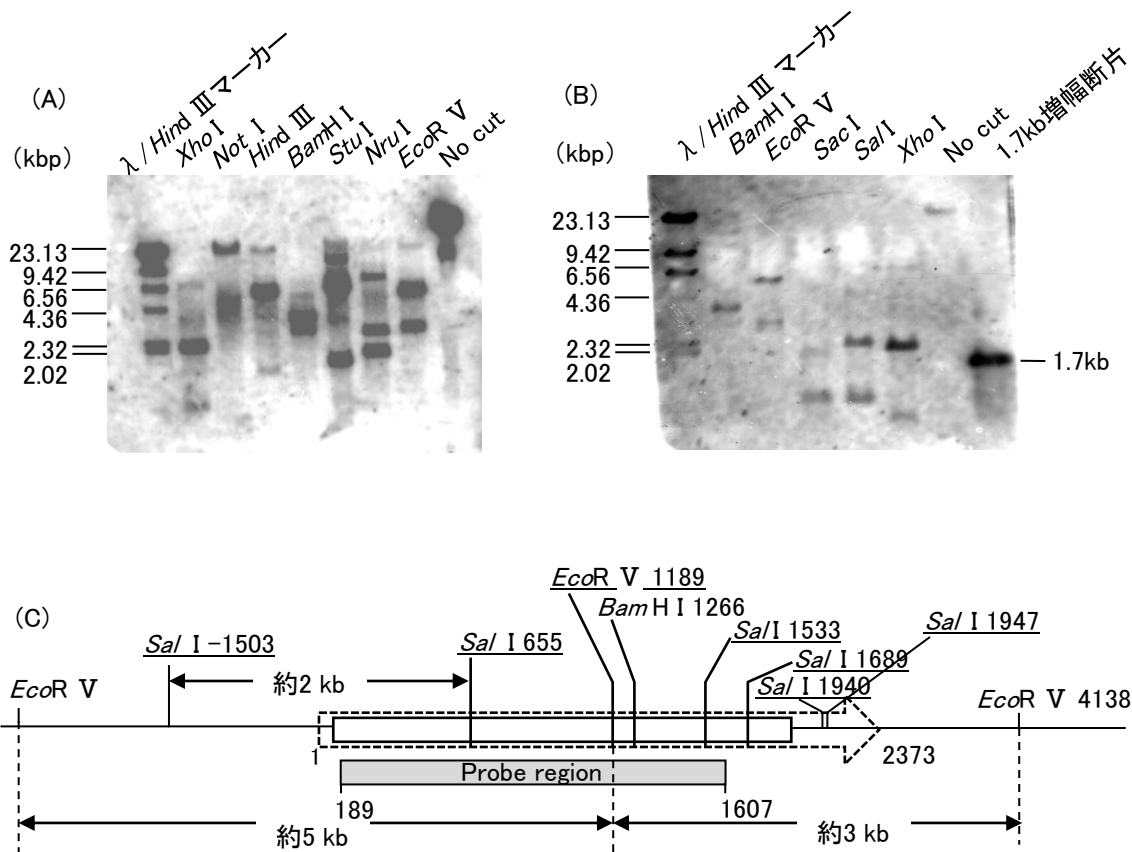


図1-2 *CngahA*遺伝子のサザン解析

(A)(B)ゲノムDNAを各種制限酵素で処理し、DIGラベル化したプローブをハイブリダイズさせた。

(C)部分遺伝子断片を解析した塩基配列とサザン解析から予想される制限酵素地図。白いBOXはペプチド配列から増幅させた約1.7 kbの領域(145-1853)を表し、灰色のBOXはプローブに使用した領域を表す。点線矢印はORF領域を表す。番号は開始コドンATGのAを1とした時の各制限酵素部位が位置する番号。

ができ、*SaI* で制限酵素処理して鋳型としたものから上流域のクローニングに成功した。

得られた遺伝子上流域を含む配列の中には、N末端解析で見られたペプチド A、B および C 配列をコードする塩基配列が見出され、また、TATA ボックスと推定される配列も見出された(図 1-3)。ペプチド B および C 配列をコードする塩基配列は、推定されるアミノ酸配列が完全には一致していなかった。これは、ペプチドシーケンスでのシグナル強度が低かったことにより誤って同定されたと考えられる。

予測下流域を含む配列には、polyA 付加シグナル様配列 (TATAAA) が見出された。これまでに得られた塩基配列をすべて連結した全長約 6 kb の塩基配列中には、N末端および内部部分アミノ酸配列の解析で得られたペプチド配列をコードする塩基配列が全て見出された。これにより、染色体上にコードされるグルタミナーゼのゲノム遺伝子を取得したと結論付けた。

(4) Rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法を用いた *CngahA* 遺伝子の cDNA の取得

上記で得られた染色体 DNA にコードされる *CngahA* 遺伝子配列はイントロンを含んでいることが予想されたため、5' および 3' -RACE 法を用いて、cDNA を取得した。その結果、CnGahA タンパク質は 2052 bp の塩基配列からなり、アミノ酸数は 684 残基、推定分子量が約 74,000 のタンパク質をコードする遺伝子であった。cDNA の塩基配列と先の染色体上のグルタミナーゼ遺伝子配列を比較したところ、イントロンは、全部で 6 ヶ所存在することが明らかとなった(図 1-3, 図 1-7)。SignalP 解析から Met¹ から Ser²² までがシグナル配列と予測されたことから、CnGahA タンパク質は、分泌タンパク質であることが示唆された。

N末端解析から、SDS-PAGE において単一バンドにまで精製された標品中には 3 種類のタンパク質が混在しており、また、ゲルろ過法による酵素の分子量が 270,000 と推定されたため、SDS-PAGE での分子量(約 78,000)と比較して、3 つの異なるサブユニットからなるヘテロ 3 量体ではないかと疑われた。しかし、今回得られた結果から、CnGahA タンパク質は、最もシグナル強度の強かったペプチド A の配列を N 末端とするタンパク質として主に存在しており、精製工程等で部分分解を受けて、ペプチド B およびペプチド C の配列を N 末端にもつタンパク質が精製標品中に微量に混在したと考えられる。従って、CnGahA タンパク質は、単一遺伝子にコードされたホモ 3 量体(もしくは 4 量体)であると結論付けた。

(5) パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主とした取得 cDNA の発現

cDNA 配列から推測されるアミノ酸配列には、N末端解析および内部アミノ酸分析で見出された全てのペプチド配列が確認できたが、この遺伝子がグルタミナーゼ遺伝子であるという直接的な証拠にはならない。そこで、取得した cDNA 遺伝子からタンパク質を発現させ、グルタミナーゼ活性を有するか確認した。

上記で決定した cDNA を酵母発現ベクター pYES2 にクローニングし、タンパク質を発現させた。pYES2 ベクターのみを導入した Sc_pYES2 株(対照株)と pYES2-CngahA を導入した形質

転換体(ScOE_CngahA 株)をそれぞれ液体培養し、様々な培養時間で集菌して、*Cryptococcus* 属酵母と同様に菌体懸濁液を用いてグルタミナーゼ活性を測定した。その結果、ScOE_CngahA 株は、Sc_pYES2 株と比較し生育に差は見られなかったが、菌体(菌体表面)のグルタミナーゼ活性が約 6~7 倍、上昇していた(図 1-4)。

次に発現させたグルタミナーゼの耐熱性および耐塩性を測定した。ScOE_CngahA 株を 65°C、70°C で 30 分熱処理した後のグルタミナーゼ活性を測定した結果、熱処理をしない対照と比べて、それぞれ 100%と約 60%の残存活性を示した(図 1-5(A))。

さらに、反応系に 20%の NaCl を含んだ状態でグルタミナーゼ活性を測定した結果、NaCl を含んでいない条件と比較して、約 65%の活性を示したことから、耐塩性も保持されていることが明らかになった(図 1-5(B))。

以上の結果より取得した遺伝子が耐熱性および耐塩性に優れるグルタミナーゼ遺伝子であることが明らかとなり、*C. nodans*由来のグルタミナーゼ遺伝子として、塩基配列を DDBJ へ登録した(Accession No. A610785)。

(6) *CagahA* 遺伝子の取得および発現解析

*C. nodans*由来のグルタミナーゼと同様に、*C. albidus*からもグルタミナーゼを精製し、その遺伝子を単離した。疎水性カラム(TSKgel Phenyl-5PW)、イオン交換カラム(TSKgel DEAE-5PW)、ゲルろ過カラム(TSKgel G3000SW)の 3 種類の異なるカラムを用いて単一ピークとなるまで酵素を分離精製した。ゲルろ過カラム後の活性フラクションを SDS-PAGE で解析した結果、本酵素はブロードなメインバンドとして検出され、他には不純なタンパク質が殆ど認められなかった(図 1-6 レーン 1)。このブロードなバンドは、大きなメインバンドが 2 つ重なっているようにも見えた。しかしながら、遺伝子の単離が目的であること、3 種類の異なるモードの HPLC でほぼ同様の挙動を示してきたことから、これ以上の精製は難しいと判断し、本段階で精製を終了した。

一般的に糖タンパク質は、SDS-PAGE でブロードになることが知られている。CnGahA タンパク質が糖タンパク質であったことから CaGahA タンパク質も糖タンパク質である可能性が考えられた。そこで、脱糖鎖処理を行い、実際の単純タンパク質ではどの程度精製されているか確認した。その結果、脱糖鎖処理液の SDS-PAGE は、2 本のメインバンド[分子量 66,000(ペプチド H)、58,000(ペプチド I)]と 1 本のマイナーバンド[分子量 54,000(ペプチド J)]、の 3 本の分離を示した(図 1-6 レーン 2)。従って、CaGahA タンパク質の精製標品中には、3 種類の異なる大きさのタンパク質が混在していることが明らかとなった。

次に、単純タンパク質のアミノ酸一次配列の決定を行った。CnGahA タンパク質の精製標品中にも、N 末端配列が異なる 3 種類のタンパク質が混在していたが、それらは同一遺伝子由来であり、成熟タンパク質とその部分分解物であった。CaGahA タンパク質についても同様の現象が考えられた。そこで得られた 3 種類のペプチドのアミノ酸一次配列を調べた結果、下記のように配列が確認された。ペプチド H : LHEISASVMPMGVFEGTGQQLL、ペプチド I :

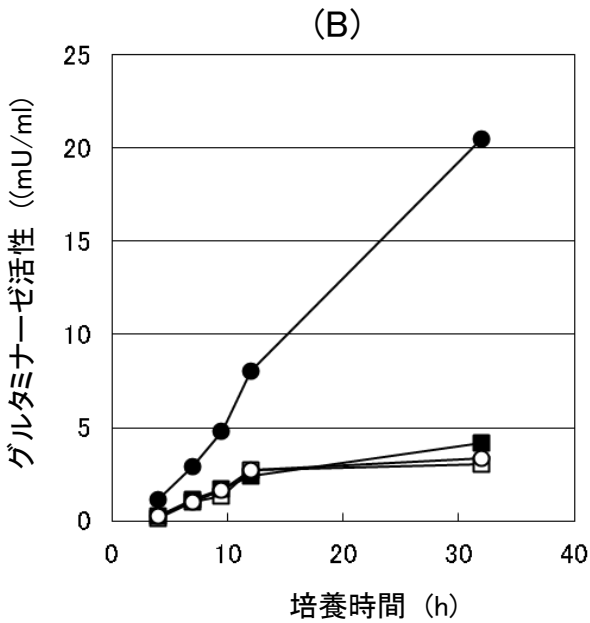
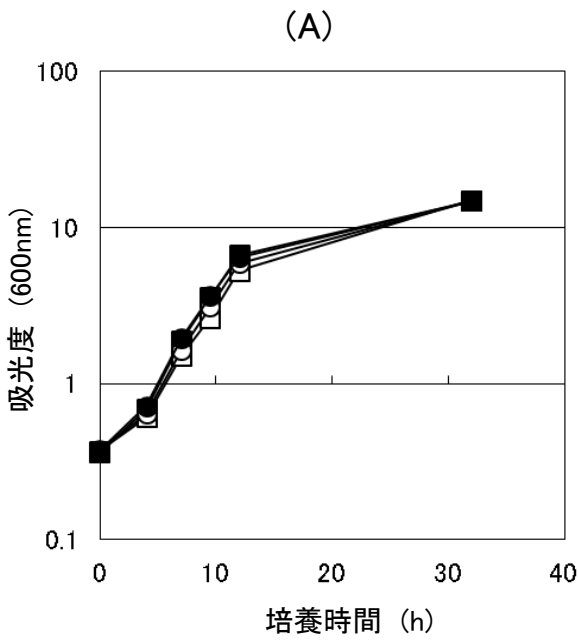


図1-4 *CngahA*遺伝子導入株の生育曲線(A)とグルタミナーゼ活性(B)
S. cerevisiae INVSc1株を発現ベクターpYES2とpYES2-*CngahA*で形質転換した。
 Sc_pYES2株(■)およびScOE_ *CngahA*株(●)を誘導培地(ガラクトース添加; ●、■)または
 非誘導培地(ガラクトース無添加; ○、□)で培養し、各培養時間で集菌して洗浄し、
 菌体をリン酸Na緩衝液で再けん濁し、培養液1ml当たりの菌体(菌体表面)のグルタミ
 ナーゼ活性を測定した。

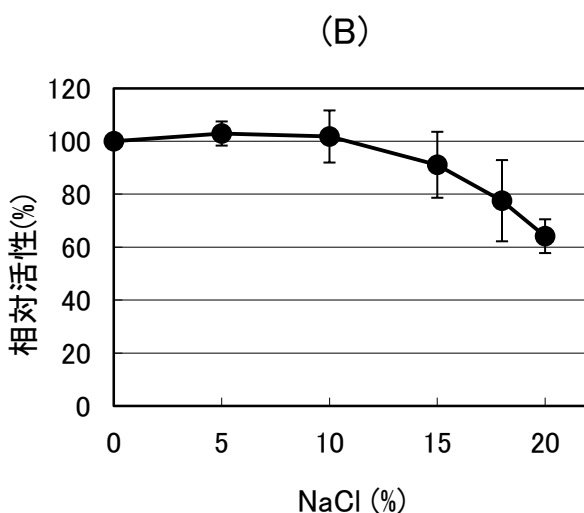
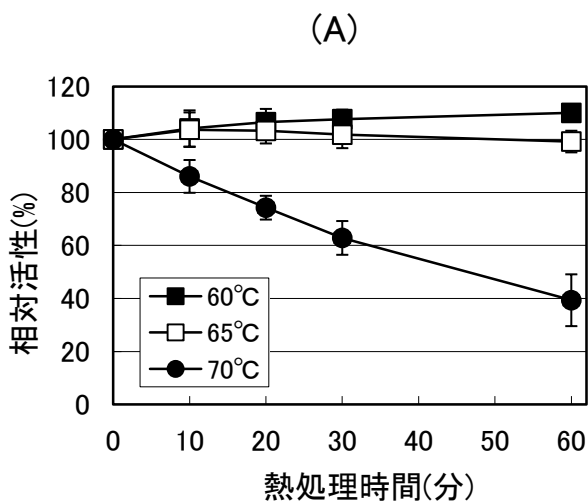


図1-5 *CngahA*遺伝子由来のグルタミナーゼの耐熱性(A)と食塩による活性阻害に対する耐性(B)

S. cerevisiae INVSc1株をpYES2-*CngahA*で形質転換したScOE-*CngahA*株を誘導培地で30°C、30時間培養し、菌体を回収した。菌体懸濁液を酵素液として使用し、グルタミナーゼ活性を測定した。耐熱性では、菌体懸濁液を各温度でそれぞれ熱処理した後に、通常の方法でグルタミナーゼ活性を測定した。熱処理をしていない活性値を100%とした相対活性で表している。食塩(NaCl)による活性阻害に対する耐性は、活性測定系に終濃度が各濃度(5%、10%、15%、18%、20%)となるようにNaClを添加し、グルタミナーゼ活性を測定した。NaClを含まない反応条件で得られた活性値を100%とした相対活性で表している。

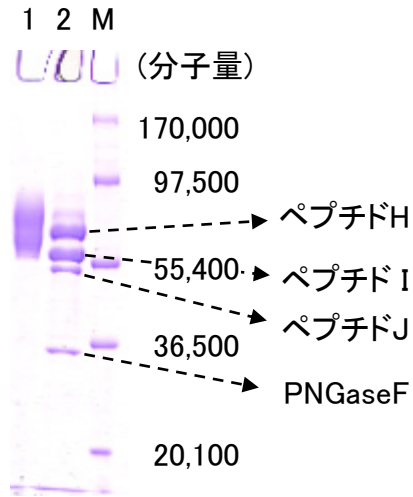


図1-6 CaGahAタンパク質のSDS-PAGE
 M;分子量マーカー、レーン1;精製酵素(未処理)、レーン2;脱糖鎖
 処理後の精製酵素。ペプチドH-JのN末配列は、脱糖鎖後にPVDF
 膜へ転写し、アミノ酸配列を決定した。

TVSAKTVPSGPYIASYNHASD、 ペプチド J: NVANPRALEGVRRVAVKDLYYDTAGLP

そのうち、I と J のペプチド配列は、CnGahA タンパク質のアミノ酸一次配列に類似の個所があった。そこで、ペプチド I と J のアミノ酸配列をもとにプライマーを合成し(表 1-2)、*C. albidus* の染色体 DNA を鋳型として PCR により DNA の増幅を行った。その結果、ペプチド I-s とペプチド J-as の組み合わせで 120 bp の DNA 断片が増幅した。その塩基配列を決定した結果、塩基配列から推定されるアミノ酸配列には、プライマー配列に対応させなかったペプチド配列を含み、また、CnGahA タンパク質との相同性が高かったことから、この配列を CaGahA タンパク質の部分遺伝子断片と判断した。

次に、上記塩基配列情報をもとにプライマーを設計し、5' および 3' RACE 法を利用して cDNA の取得を試みた。それぞれ *CagahA* 遺伝子の 5' 領域に相当する約 700 bp の DNA 断片及び、3' 領域に相当する約 1.5 kb の DNA 断片の増幅が得られた。増幅した DNA 断片の塩基配列を決定した結果、CaGahA タンパク質は 2,100 bp の塩基配列にコードされ、塩基配列から推定されるアミノ酸数は 700 アミノ酸残基、推定分子量が約 76,000 のタンパク質であることが明らかとなった。

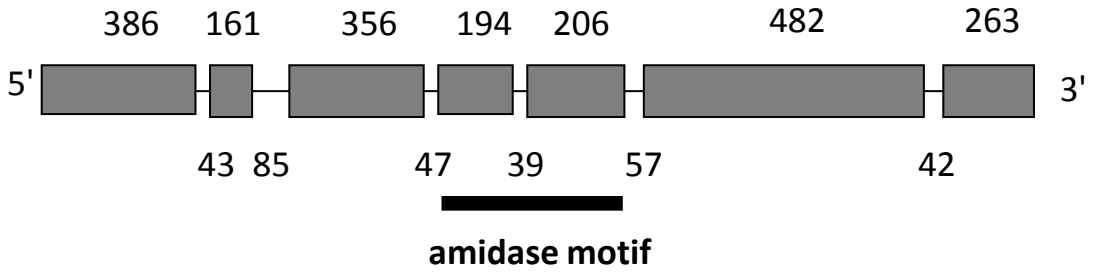
SignalP 解析から Met¹ から Ala¹⁸ までがシグナル配列と予測されたことから、CaGahA タンパク質も CnGahA タンパク質と同様に、分泌タンパク質であることが示唆された。また、CaGahA タンパク質の推定アミノ酸配列には精製標品中に含まれた SDS-PAGE 上の 3 種のタンパク質から決定されたペプチド配列が全て見出された。従って、これらのタンパク質は、CnGahA タンパク質と同様に CaGahA タンパク質の部分分解物であると結論付けた。染色体 DNA を鋳型とした PCR 解析より、*CagahA* 遺伝子にはイントロンが 7 ヶ所存在することが明らかとなった。これらイントロンは比較的 *CngahA* 遺伝子と類似した位置に挿入されていたが、一致はしていなかった(図 1-7)。

取得した遺伝子がグルタミナーゼ遺伝子であることを確かめるため、cDNA から発現させたタンパク質がグルタミナーゼ活性を有するか確認した。*CngahA* 遺伝子と同様に cDNA を酵母発現ベクター-pYES2 にクローニングし、タンパク質を発現させた。対照である Sc_pYES2 株と ScOE_CagahA 株を液体培養し、グルタミナーゼ活性を測定した結果、ScOE_CagahA 株は、Sc_pYES2 株と比較し生育に差は見られなかったが、培養 24 時間後の菌体(菌体表面)のグルタミナーゼ活性が約 11 倍に上昇していた(図 1-8)。以上の結果より取得した遺伝子がグルタミナーゼ遺伝子であることが明らかとなり、*C. albidus* 由来のグルタミナーゼ遺伝子として、塩基配列を DDBJ へ登録した (Accession No. A610786)。

(7) *Cryptococcus* 属酵母由来のグルタミナーゼ遺伝子の特徴

公共のデータベースを用いて CnGahA タンパク質および CaGahA タンパク質と類似の配列を持つタンパク質を探索したが、既知のグルタミナーゼとの相同性は低く、いくつかの機能未知タンパク質と相同性があるのみであった⁵⁸⁾。CnGahA タンパク質と相同性の高い機能

(A) *CngahA*遺伝子



(B) *CagahA*遺伝子

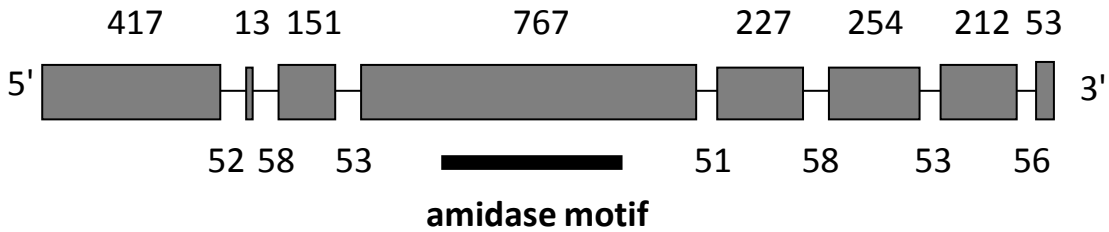


図1-7 *CngahA*遺伝子と*CagahA*遺伝子の比較

開始コドンから終始コドンまでの塩基配列を模式的に表している(*CngahA*遺伝子は2369 bp、*CagahA*遺伝子は2489 bp)。番号1は開始コドンATGのAの番号を示し、BOXはコード領域を、線はイントロンの領域を表し、それぞれの数値は塩基の長さを示している。

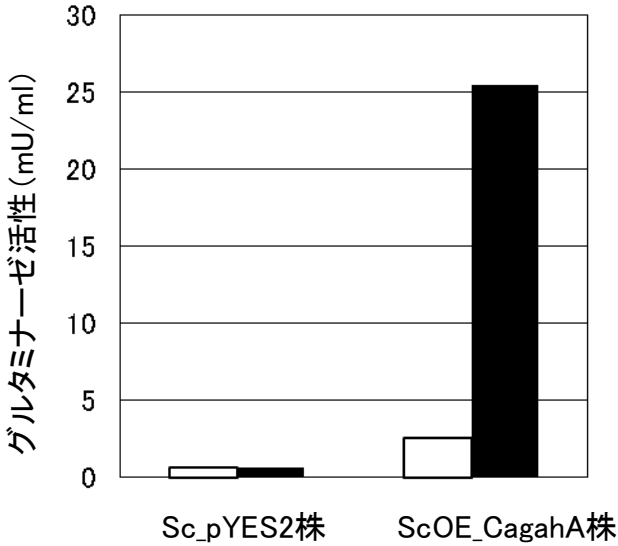


図1-8 培養24時間における *CagahA* 遺伝子導入株のグルタミナーゼ活性
S. cerevisiae INVSc1 株を発現ベクター pYES2 のみ (対照株) と pYES2-*CagahA* で形質転換した。Sc_pYES2 株および ScOE_ *CagahA* 株を誘導培地 (ガラクトース添加; ■) または非誘導培地 (ガラクトース無添加; □) で、30°C、24 時間培養後に集菌し、緩衝液で再懸濁した菌体懸濁液を用いて、培養液 1 ml 当たりの菌体 (菌体表面) のグルタミナーゼ活性を測定した。

未知タンパク質としては、*Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (アミノ酸同一性 39%、E value, $2e^{-104}$), *Sclerotinia sclerotiorum* 1980 (アミノ酸同一性 38%、E value, $8e^{-102}$), *Aspergillus oryzae* RIB40 (アミノ酸同一性 38%、E value, $6e^{-102}$), *Aspergillus flavus* (アミノ酸同一性 38%、E value, $7e^{-101}$), *Nectria haematococca* (アミノ酸同一性 39%、E value, $1e^{-98}$)、*Saccharomyces cerevisiae* strain CBS4411 (アミノ酸同一性 37% identity; E value, $1e^{-93}$)などが挙げられる。

また、ドメイン検索の結果、CnGahA タンパク質および CaGahA タンパク質は、amidase domain, Asp-tRNA^{Asn}/Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase A subunit-related amidase domain を持つことが明らかとなった。グルタミナーゼ反応もアミダーゼ反応の一種であることからこのドメイン領域が活性中心と考えられる。特に他の酵素において、アミダーゼ活性に必須とされる触媒残基 Lys-Ser-Ser (Catalytic triad)は、共に保存されていた⁵⁹⁻⁶² (CnGahA タンパク質の Lys²⁶⁵-Ser³⁴⁵-Ser³⁷⁰、CaGahA タンパク質の Lys²⁸⁰-Ser³⁶⁰-Ser³⁸⁵ (図 1-9、図 1-10))。CnGahA タンパク質と CaGahA タンパク質の配列同一性は核酸レベルで 53%であり、アミノ酸レベルで約 44%であったが、活性中心と予想されるアミダーゼドメイン周辺領域ではアミノ酸レベルで 67%と特に同一性が高かった(図 1-10)。

アミダーゼドメインを持つ多くのタンパク質が見つかるが (Amidase signature (AS) enzymes family と称される)、その基質特異性は様々である。コンピューター解析により、これらのタンパク質はいくつかのサブファミリーを形成することが知られている⁶³。最近では、Ko らによって 6 つのサブファミリーに分類されたが⁶⁴、CnGahA タンパク質と CaGahA タンパク質は新たに別のカテゴリーにサブファミリー (GAH サブファミリーと命名) を形成した(図 1-11)。AS enzymes family の中で唯一グルタミナーゼ反応を示す Asp-tRNA^{Asn}/Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase A (GatA)⁶⁵とも離れたカテゴリーに属した。以上の結果から、これらの酵素は、酵素学的な性質からだけでなく、遺伝子レベルの解析からも新規なグルタミナーゼであることが明らかとなった。

CnGahA タンパク質および CaGahA タンパク質は、共に酵母菌体表面に局在性を示す。SOSUI 解析から、これらのグルタミナーゼのアミノ酸配列にはシグナルペプチド配列以外に膜貫通領域が存在しなかったことから、膜を介して結合しているのではないことが推測される。

また、これらの酵素を精製する際には、セルラーゼ活性が高く植物細胞壁溶解に使用される酵素剤 Cellulase ONOZUKA R-10 を使用して菌体から可溶化させた。これらのことから、CnGahA タンパク質および CaGahA タンパク質は、細胞壁に結合していると推測される。細胞壁に共有結合するタンパク質は、GPI アンカータンパク質と、カビなどに見られる弱アルカリ処理で細胞壁から可溶化するタンパク質の主に 2 つに大別される⁶⁶。多くは前者に属するが、GPI 修飾部位予測解析から CnGahA タンパク質および CaGahA タンパク質のアミノ酸配列には GPI アンカー型の特徴を持たないことが明らかになった。

一方、後者のタンパク質の代表的なものに PIR タンパク質 (proteins with an internal repeat) が挙がる。PIR タンパク質とは、C 末端領域にグルタミンを含んだ繰り返し配列

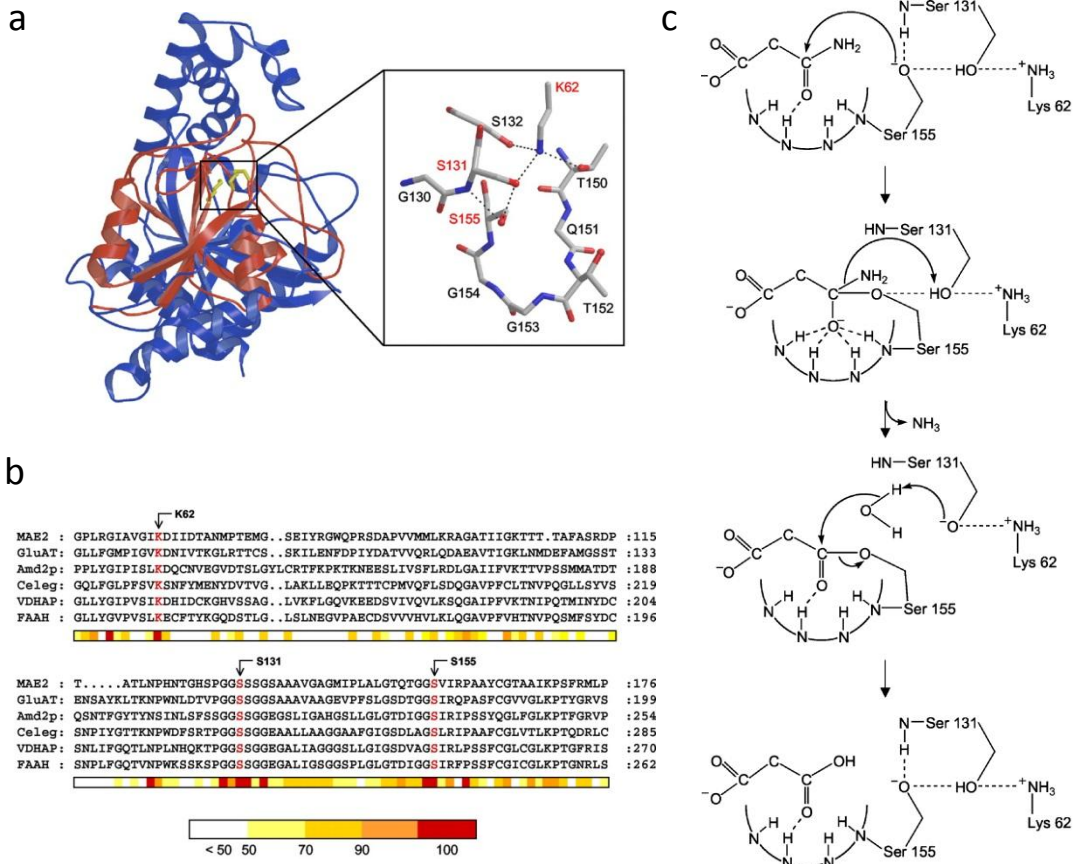


図1-9 Amidase signature (AS) enzymes familyのmalonamidase E2(MAE2)の立体構造と推定される触媒メカニズム⁶²⁾

- a. AS enzymes familyで初めて明らかにされたMAE2の立体構造。赤色はAS enzymes familyで相同性の高い領域(配列)を示し、青色は相同性の低い領域を表す。四角内は、Catalytic triadの領域を拡大している。水素結合を点線で示している。Gly¹³⁰とSer¹³¹とがcis型のペプチド結合を形成する。また、Ser¹⁵⁵、Gly¹⁵⁴、Gly¹⁵³、Thr¹⁵²の主鎖のNH基がオキシアニオンホールを形成する。
- b. AS enzymes familyのアミノ酸配列比較(MAE2, bacteria由来Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase(GluAT), yeast由来の推定アミダーゼ(Amd2p), *C. elegans*由来推定アミダーゼ(Celeg), チキン由来 vitamin D3 hydroxylase-associated protein(VDHAP), ヒト由来fatty acid amide hydrolase (FAAH))。3つの触媒残基は赤字で示している。色付きのバーは、20種類のAS enzymes familyタンパク(6種に加え、生化学的に性質が明らかにされているタンパクと明らかにされていないタンパクを含めた20種)の配列保存性を示している
- c. MAE2の反応機構モデル
 触媒反応は、アシル酵素中間体の形成と分解を経て起こる。主鎖の4つのNH基から構成されるオキシアニオンホールは四面体の遷移状態を安定化させる。cis型のSer¹³¹の側鎖のOH基と主鎖のNH基による直接的な水素結合の効果と、オキシアニオンホール及びArg¹⁵⁸による付加的な双極性の相互作用により、Ser¹⁵⁵が中性pH域において、脱プロトン化状態にあり、基質のカルボニル炭素を求核攻撃する。

引用文献⁶²⁾のS. Shin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **278**, 24937-24943 (2003)より図を引用した)

CnGahA	1	MATSINMLA	LLYGLLSASP	ALS	QLAGNEDY	AHAARQ	SLAHNPTE	GKRG	--VTSG	LAFQPAS	VSFTV	---	65
CaGahA	1	-MSLLRLAL	LASLTATTT	LA	AGPAGNEDY	QFSRSRLR	SLSTINK	FSARDN	LAPVSL	SLDQT	SYTFS	VQDE	69
CnGahA	66	-GDKQY	LSPTGAQ	FR	YSIGA	EWGLDAL	----	AGQSLAV	TVLEVE	GE	--VTC	DVLS	128
CaGahA	70	SEDKVY	ISPAGDK	EKKY	TLTAN	-GLAS	LKHEISAS	VMPMT	VFEV	TGQQQL	TCDSM	EKAVADY	138
CnGahA	129	TSFLNG	IFLTTT	SSYHV	ASDVSS	CLEG	-WGS	SLVVKSG	NATSDV	EGVSV	ARVASV	IPQGP	194
CaGahA	139	EAFMQT	IFLLK	SDKPI	SFAAD	LHECL	PGHW	TSVVL	STAQT	QGNLQ	GINVK	TVSAKT	208
CnGahA	195	GNITLT	QIYRS	YRDEA	QAFTAG	VTH	-TEDNT	FVDL	STPV	PALNT	LSISV	PSRLY	263
CaGahA	209	DSIDL	TQVFR	LYRDE	QAFTT	PLIP	FADG	QSFS	PLAAQ	SGMNT	LSIPV	PSRLY	278
CnGahA	264	VKDLF	DMA	LKTK	GGN	RAYNT	YPAKN	VTAI	AIQRL	VDQGG	IIVGR	VKTSQ	333
CaGahA	279	VKDLY	DVAG	VPSGL	GNRAY	WLTY	EPRNV	TAVS	IQRL	IDQGA	VIIIG	KVTSQ	348
CnGahA	334	PRGDGY	QPASS	SSSG	PAAA	GAYD	WLDHT	TIGSD	TGGS	IID	PASVQ	GVYGL	403
CaGahA	349	MRGDGY	DPST	SAGSG	SSIG	AYD	WVDV	TIGSD	TGGS	VVR	PAANN	GAFGL	418
CnGahA	404	TAGFF	ARD	AQSGL	AFAQ	GWYGD	RFGN	FSTL	PTNL	LIP	NSSWE	FAPDF	471
CaGahA	419	TAGYL	TRNA	KEFAA	FGKAW	YGDKE	FESY	NERP	KTI	FVP	NDY	PPLAS	487
CnGahA	472	VDV	RDFE	GYW	NTSG	RFEQ	VNAT	ASDYL	YEV	YANL	ITYQ	WNN	541
CaGahA	488	ID	TRSF	ADI	WNS	SGTME	QVQ	QTIP	SFLN	EITY	PTL	IGYY	557
CnGahA	542	TY	ARDN	LTEA	DNS	STAK	KE	LFK	EFID	TB	VLVK	DNST	611
CaGahA	558	AY	GRQR	-GEA	GE	EEEL	RKN	VFRD	DF	FSEY	VLKA	DNET	626
CnGahA	612	P--	AQF	SGV	EQL	IVPI	GQL	PYE	STIT	NH	EYLP	LT	679
CaGahA	627	EV	YSP	FHEG	PE	ISIP	LGL	QV	PEYN	STV	SNH	EYLP	696
CnGahA	680	Y	P	DRV									684
CaGahA	697	Y	PLK	-									700

図1-10 CnGahAタンパク質とCaGahAタンパク質のアミノ酸配列比較
 共通のアミノ酸は黒いボックスに白字で示している。*はアミダーゼのCatalytic triad
 を示す。ボックスで囲ってある領域はアミダーゼドメイン領域を示す。

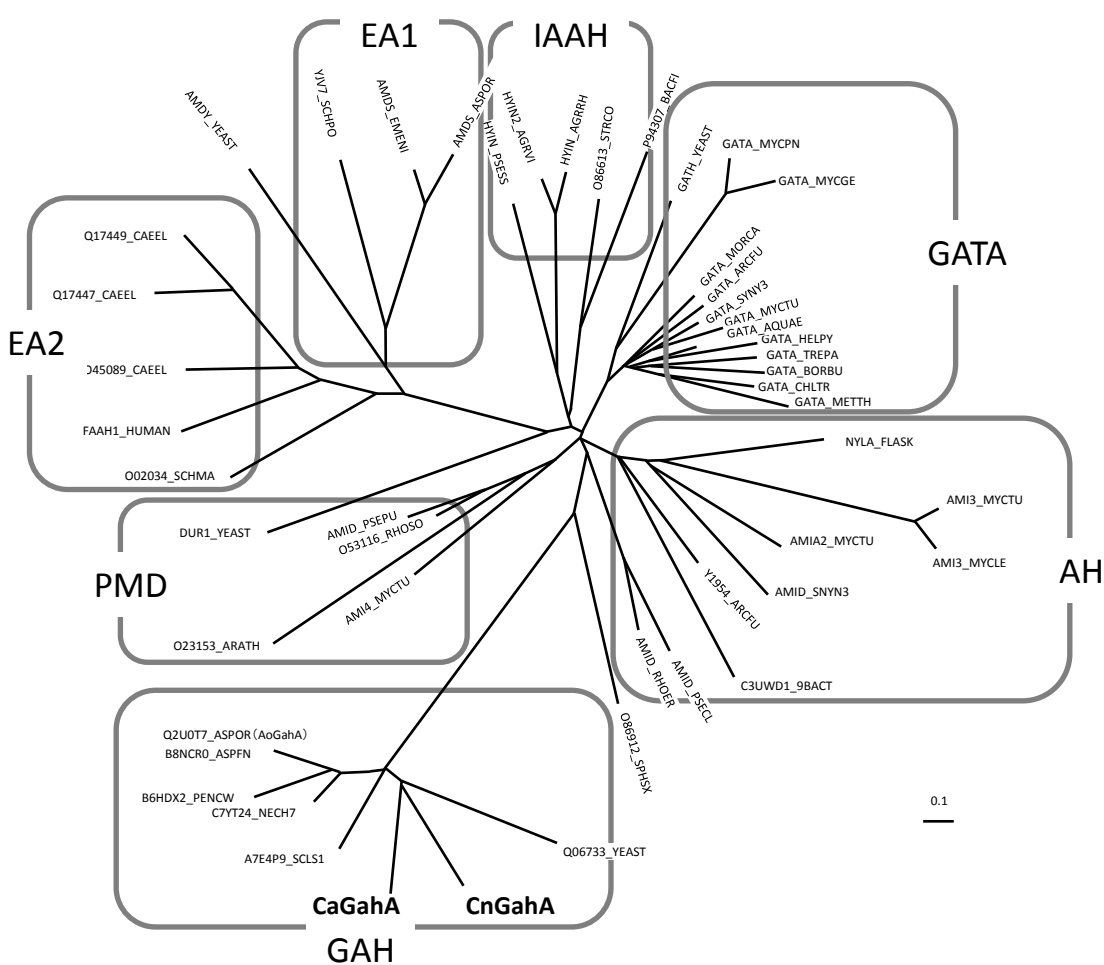


図1-11 アミダーゼドメインをもつタンパク質AS enzymes familyの系統樹解析
 タンパク質のアミノ酸配列はUniprotデータベースより入手し、マルチプルアライメントはClustal Wでデフォルトパラメーターを使用して行った。系統樹はTree Viewを使用して作製した。Boxは、AS enzymes familyのサブファミリーを表し、Koらの解析したタンパク質にGAHサブファミリーでCnGahAタンパク質と相同性の高い上位6つのタンパク質を加えて解析し、分類した。Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase Subunit A (GATA) family: GATA_MYCGE, GATA_MYCPN, GATA_MYCTU, GATA_ARCFU, GATA_SYNY3, GATA_MORCA, GATA_AQUAE, GATA_HELPY, GATA_BORBU, GATA_TREPA, GATA_METTH, GATA_CHLTR; peptide amidase (PMD) family: AMID_RHOER, AMID_PSECL, AMID_PSEPU, O23153_ARATH, Q53116_RHOSO, O86912_SPHSX, AMI4_MYCTU, DUR1_YEAST; indole-acetamide hydrolase (IAAH) family: HYIN2_AGRVI, HYIN_AGRRH, HYIN1_AGRVS, HYIN_PANNY, HYIN1_PSESS, P94307_BACFI, O86613_STRCO; 6-aminohexanoate-cyclic dimer hydrolase (AH) family: C3UWD1_9BACT, Y1954_ARCFU, AMID_SNYN3, AMIA2_MYCTU, NYLA_FLASK, AMI3_MYCLE, AMI3_MYCTU; eukaryotic amidase 1 (EA1): AMDS_ASPOR, AMDS_EMENI, AMDY_YEAST, YJV7_SCHPO; eukaryotic amidase 2 (EA2, fatty acid amide hydrolase (FAAH) family): Q17449_CAEEL, Q17447_CAEEL, O45089_CAEEL, FAAH1_HUMAN, O02034_SCHMA; glutaminase (GAH) family: CnGahA, CaGahA, A7E4P9_SCLS1, B6HDX2_PENCW, B8NCR0_ASPFN, C7YT24_NECH7, Q2KH33_9PEZI, Q2U0T7_ASPOR, Q06733_YEAST.

(DGQXQがコア配列)と4つのシステインリッチなドメインを持つタンパク質である。しかし、これらの特徴的な配列も CnGahA タンパク質および CaGahA タンパク質は共に持たない。

弱アルカリ処理で細胞壁から可溶化するタンパク質の中には、GPI アンカータンパク質および PIR タンパク質のどちらにも属さないタンパク質もいくつか報告されている⁶⁷⁾。これらのタンパク質には、Kex2p プロテアーゼの基質認識部位 (KK/KR) 配列を N 末端領域に持ち、この基質認識部位に先行して、少なくとも3つのポジティブチャージのアミノ酸残基(ヒスチジン残基を含む)を持つ特徴を有する。CnGahA タンパク質および CaGahA タンパク質は、N 末端領域に Kex2p プロテアーゼの基質認識部位を持つが、それに先行した少なくとも3つのポジティブチャージのアミノ酸残基は確認できない。尚、CnGahA タンパク質および CaGahA タンパク質共に弱アルカリ処理で細胞壁から可溶化するかは検討していない。そのため、これらの細胞表面(細胞壁)に結合する機構は、未だ不明である。

相同性検索の結果、CnGahA タンパク質や CaGahA タンパク質と相同性のあるタンパク質に、多くの機能未知タンパク質が検出された (GAH サブファミリー)。それらのいくつかのタンパク質と CnGahA タンパク質および CaGahA タンパク質とのアミノ酸配列を比較した (図 1-12)。

GatA タンパク質などアミダーゼ活性に必須な Lys-cis-Ser-Ser の触媒活性部位は、GAH サブファミリーにおいても完全に保存されていた。*Helicobacter pylori* の GatA タンパク質において、これらのアミノ酸残基の置換は、著しくグルタミナーゼ活性を低下させることが知られている⁶⁸⁾。

CnGahA タンパク質と CaGahA タンパク質は C 末領域においても部分的に相同性を示している。AS enzymes family は、アミダーゼドメイン以外の領域 (C 末領域を含む) は相同性が低く、多様な基質認識に関わっていると考えられている⁶⁰⁾。*S. aureus* の GatA タンパク質の立体構造解析から、グルタミンのアミド基とカルボキシル基は、それぞれ Asp⁴²⁵ と Arg³⁵⁸ とで認識されていることが明らかになっている⁶⁵⁾ (図 1-12)。これらのアミノ酸は C 末領域に位置しており、他の生物種の GatA タンパク質でも完全に保存されている。しかし、CnGahA タンパク質および CaGahA タンパク質の C 末領域は、GatA タンパク質の C 末領域と相同性が低く、さらに、グルタミンの認識に関わる両アミノ酸残基も保存されていなかった。また、GatA タンパク質が加水分解できない D-Gln を CnGahA タンパク質および CaGahA タンパク質は加水分解することができる^{51, 53, 69)}。これらの結果から、CnGahA タンパク質および CaGahA タンパク質のグルタミンに対する基質認識は、GatA タンパク質とは異なることが予想される。第3章で述べるが、この GAH サブファミリーは遊離のグルタミンだけでなく、ペプチドのグルタミンにも作用するペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼファミリーであることが明らかになった。そのため、基質認識が既知のグルタミナーゼ活性を持つ amidase (GatA) とは異なるのだろう。

GAH サブファミリーのタンパク質は、N 末領域の長さや配列がそれぞれで大きく異なる。CnGahA タンパク質および CaGahA タンパク質は、PSORT II の局在予測解析から、N 末領域に分泌シグナル配列を持ち、細胞外分泌タンパク質と予測される。一方で、Q06733_YEAST と

Q2KH33_9PEZI は、分泌シグナル配列を持たず、細胞質または小胞体タンパク質として予測される。さらに、Q2KH33_9PEZI は、N 末領域に 2 つの膜貫通領域 (168-190、200-222) を持ち、膜タンパク質として予測される。このことから、N 末領域は、GAH サブファミリーの局在性に関与していることが示唆される。

精製 CnGahA タンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定した際に、3 つの異なる配列がそのシグナル強度から読み取れたが、3 種とも CnGahA タンパク質由来であった。CnGahA タンパク質は、最もシグナル強度の強かったペプチド A の配列を N 末端配列とするタンパク質として主に存在していると結論付けた。しかし、この N 末配列となる切断部位は分泌シグナルペプチドの切断部位とは異なっていた (図 1-3)。この原因として、以下の 2 つが考えられる。すなわち、(1) 酵素精製過程でプロテアーゼの混入によって分解される、(2) タンパク質のプロセッシングによって特異的に切断されることが考えられる。

精製した CnGahA タンパク質は、SDS-PAGE 解析では単一バンドとなり (図 1-1)、Kex2p プロテアーゼの切断部位 (KR) が精製 CnGahA タンパク質の N 末配列 (ペプチド A の配列に相当する) の直前に存在した。そのため、精製した CnGahA タンパク質は、Kex2p プロテアーゼによるタンパク質プロセッシングにより切断され、ペプチド A 配列を N 末端に持つタンパク質となり、その後、その一部が精製工程中に混入したプロテアーゼによって分解され、三つの異なる N 末配列を持つタンパク質として混在したのではないかと考えている。CnGahA タンパク質は分子量測定からホモ 3 量体 (もしくは 4 量体) を形成しているため、その一部が部分分解を受けたのかもしれない。N 末領域の違いは、局在性やタンパク質分解によるプロセッシングなどに関わり、生理的な役割がそれぞれの Gah タンパク質で異なるのかもしれない。CnGahA タンパク質や CaGahA タンパク質に相同性のある機能未知タンパク質が多く見出されたが、*Cryptococcus* 属酵母由来の Gah タンパク質以外は、すべて *Ascomycetes* に属した生物種由来である。CnGahA タンパク質や CaGahA タンパク質は耐熱性・耐塩性に優れるグルタミナーゼであるが、*C. nodaensis*、*C. albidus* 自身は耐塩性・耐熱性の性質を持つ酵母ではない。これらのグルタミナーゼの生理的な役割は、現在のところ不明であるが、とても興味深い。

第2章 黄麹菌由来の新規ペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼの単離と諸性質の決定

【はじめに】

黄麹菌 *A. oryzae* と *A. sojae* は、日本の伝統的な発酵食品であるしょうゆ、味噌、日本酒などの醸造に広く使用されている。また、黄麹菌 *A. oryzae* の持つ高い酵素生産能を利用し、産業用酵素の生産や遺伝子組み換え技術によるタンパク質生産の宿主としても利用されている。2001年に黄麹菌 *A. oryzae* RIB40株のEST (Expressed Sequence Tag) 解析⁷⁰⁾、2005年には同菌株の全ゲノム解析⁷¹⁾が終了し、遺伝子配列情報の全容が明らかとなった。黄麹菌 *A. oryzae* は、永年の食経験からその安全性が高く評価され、米国食品医薬品局 (FDA) より GRAS (Generally Recognized As Safe) の認定を受けており、遺伝子資源としても注目されている⁷²⁾。また、黄麹菌における遺伝子破壊などの分子生物学的な研究手法が進歩し^{73, 74)}、遺伝子レベルの研究が活発に行われるようになった。

黄麹菌由来のグルタミナーゼは、うま味の強いしょうゆを製造する上で極めて重要な酵素である。そのため、古くから黄麹菌グルタミナーゼの研究は行われており、いくつかグルタミナーゼ活性をもつタンパク質が精製され、遺伝子も単離されている^{34, 37, 40)}。これらの知見から、黄麹菌は複数のグルタミナーゼ活性をもつタンパク質を生産するということが明らかになっている。しかし、従来報告されている黄麹菌のグルタミナーゼは、耐塩性・耐熱性に乏しく、至適 pH がややアルカリ側にあるなどしょうゆ醸造 (pH 5 弱、食塩含量 16-18%) に適している性質とは言い難い (序章表 0-1 参照)。それ故に、筆者らは、しょうゆ醸造に適したグルタミナーゼが未だ黄麹菌より見出されていないのではないかと考えた。

しょうゆのグルタミン酸生成に関与する黄麹菌のグルタミナーゼは、菌体 (細胞壁) に結合しており、細胞壁溶解酵素などで遊離させるとタンパク質分解酵素による分解を受けやすい。そのため、酵素を精製し、逆遺伝学的な手法で遺伝子を単離・同定するのは極めて困難であった。そこで、黄麹菌 *A. oryzae* RIB40株のゲノム配列および EST 配列情報を活用し、*in silico* で既知の耐塩性グルタミナーゼと相同性の高い遺伝子を探索することにした。第1章で *Cryptococcus* 属酵母由来の耐塩性・耐熱性に優れるグルタミナーゼは、既知のグルタミナーゼとは相同性がなく、新規なグルタミナーゼであることが明らかとなった。

本章では、黄麹菌からしょうゆ醸造に適した新規なグルタミナーゼを見つけることを目的とし、第1章で明らかにした *Cryptococcus* 属酵母由来の耐塩性グルタミナーゼ遺伝子の配列を用いて、黄麹菌 *A. oryzae* RIB40株のゲノム配列および EST 配列データベースに対して相同性検索を行った。その結果、相同性のある *AogahA* 遺伝子を見出した。*A. sojae* のオルソログ遺伝子である *AsgahA* 遺伝子を単離し、黄麹菌を宿主に用いて、*AsgahA* 遺伝子由来の *AsGahA* タンパク質を大量発現させた。*AsGahA* タンパク質がグルタミナーゼ活性を有することを確認した後に精製し、諸性質を決定した。基質特異性を詳細に調べた結果、遊離のグルタミンやアスパラギンだけでなく、ペプチドの C 末端に位置するグルタミンやアス

パラギンにも作用する新規なペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼであった。しょうゆ醸造に重要な黄麹菌のグルタミナーゼは、菌体結合型の局在性を示すことから、AsGahAタンパク質の局在性についても検証した。

【実験の材料と方法】

(1) 実験に使用した培地

PD 培地は、2.0% dextrin、1.0% polypeptone、0.5% KH_2PO_4 、0.1% NaNO_3 、0.05% MgSO_4 、0.1% カザミノ酸を混合後、pH 6.0 に調整した。DPY 培地は、2.0% dextrin、1.0% polypeptone、0.5% yeast extract、0.5% KH_2PO_4 、0.05% MgSO_4 を混合後、pH 6.0 に調整した。DPYS 培地は、DPY 培地に終濃度 2% となるように soytone を加えた。ツァペックードックス (Cz) 最少培地は 0.1% KH_2PO_4 、0.05% KCl、0.2% NaNO_3 、3% Glucose、0.05% MgSO_4 、0.001% FeSO_4 を混合後、pH 6.0 に調整した。タンパク質誘導培地である Cz-M 培地は、Cz 最少培地の Glucose を Maltose に置き換えた。さらに、Cz-M+カザミノ酸培地は、Cz-M 培地に終濃度 1% となるようにカザミノ酸を加えた。

マルツ培地は、8%マルツエキス(オリエンタル酵母)に 0.1% (1/1000 量)の Traceelement (0.1% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.88% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.04% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.01% $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、0.005% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)を添加後、pH 6.0 に調整した。大豆粉培地は、3.0%パフミンF (キッコーマン食品)、3.0% KH_2PO_4 を混合し、pH 6.0 に調整した。各培地は、121°Cで 15 分間、オートクレーブを用いて滅菌した。

フスマ麴培地は、80%散水した小麦フスマを 121°Cで 50 分間、オートクレーブを用いて滅菌した。しょうゆ麴培地は、脱脂大豆 2.46g、割砕焙煎小麦 2.7 g に 3.6 ml の水を入れて、121°Cで 30 分間、オートクレーブを用いて滅菌した。尚、フスマ麴培地としょうゆ麴培地は固体培地であり、その他は液体培地である。液体培地に終濃度 1.5%となるように寒天を加えた培地も使用した。

(2) 実験に使用した株

グルタミナーゼ遺伝子の単離には、*Aspergillus sojae* NBRC4241 株を使用した。グルタミナーゼ遺伝子の発現には、*A. oryzae* RIB40 RP-1 株 ($\Delta pyrG$) を宿主として使用した⁷³⁾。プラスミドの調製には、*Escherichia coli* TOP10 F' (インビトロジェン) および *E. coli* JM109 (タカラバイオ)を使用した。

(3) DNA、RNA 操作

一般的な DNA、RNA 操作については、常法に従った^{54, 55)}。ゲノム DNA の抽出は、下記の通りに行った。*A. sojae* NBRC4241 株を PD 培地で 30°C、一晩培養して得られた菌体をキムワイプで十分に水分を除去した後に、液体窒素で凍結し、乳鉢および乳棒を用いて破碎した。破碎した菌体から Wizard Genomic DNA Purification Kit (プロメガ)を用いてプロトコルに従って抽出した。

全 RNA の抽出は大豆粉培地で 16 時間、30°Cで培養した菌体から抽出した。培養した菌体を直ちに液体窒素を用いて凍結させ、乳鉢・乳棒を用いて、菌体をすり潰した後、ISOGEN (ニッポンジーン) および RNeasy plant mini kit (キアゲン) を用いてプロトコルに従っ

た。

ザンハイブリダイゼーションおよびノーザンハイブリダイゼーション解析に用いるプローブは、ジゴキシゲニン (DIG) ラベリングミックス (ロッシュ) を用いて PCR にて合成した。PCR に使用したプライマーは、表 2-1 に記した。

ハイブリダイゼーションおよびバンドの検出には、DIG Wash and Block Buffer Set および CDP-STAR ready to use を用いた (共にロッシュ・ダイアノグノティス)。実際の操作は添付の protocols および「DIG システムを用いてハイブリダイゼーションを行うためのユーザーガイド【第 2 版】」に従った。クローニングした塩基配列の確認は、第 1 章と同様に行った。

(4) プラスミド

pCR2.1-TOPO ベクター (インビトロジェン) および pTA2 (東洋紡) は遺伝子のクローニングに使用した。黄麹菌におけるタンパク質発現解析には、pMAP ベクターを用いた。pMAP ベクターは、黄麹菌 TAKA アミラーゼプロモーター、ターミネーターおよびアミラーゼプロモーター下にマルチクローニングサイトをもつ pMAR5⁷⁵⁾ の *argB* 遺伝子を *A. sojae* 由来の *pyrG* 遺伝子に置換して、以下のように作製した。pMAR5 を *Sph*I 処理した後に DNA blunting kit (タカラバイオ) を用いてブラント化し、その後 *Sa*I 処理して、*argB* 遺伝子を除去した (これを pMAR5* とする)。次に pNr26 プラスミド⁷⁶⁾ を *Bam*HI 処理し、その後ブラント化、続いて *Sa*I 処理して、*A. sojae* 由来の *pyrG* 遺伝子を含む約 2.0 kb の DNA 断片を得た。これを pMAR5* と連結させ、pMAP とした (図 2-1)。

(5) 染色体 DNA ライブラリーの構築および染色体 *AsgahA* 遺伝子の単離

A. sojae NBRC4241 株より抽出した染色体 DNA を *Xba*I 処理し、pUC18 にクローニングして得られたプラスミドを用いて、大腸菌を形質転換した。鋳型に *A. sojae* ゲノムを用いて、*gahA*-Prb_s と *gahA*-Prb_as のプライマーセットで、AoEST04086 に相当する領域 (約 0.8 kb) を PCR により増幅した DNA 断片をプローブとし、得られた形質転換体からコロニーハイブリダイゼーションにより *AsgahA* 遺伝子を含む DNA 断片を選抜した。PCR には、ファージライブラリーは Lamda EMBL3/GigapackIII gold cloning kit (ストラタジーン) を用いて作製し、同様のプローブを用いて選抜した。

(6) cDNA のクローニングと *AsgahA* 遺伝子強制発現株 (AoOE_*AsgahA* 株) の作製

AsgahA 遺伝子の cDNA のクローニングにおいて、5'-RACE および 3'-RACE は、Marathon-Ready cDNA Amplification kit (クロンテック) を用いて行った。5'-RACE には、*gahA*-5R_as と *gahA*-5R_nas、3'-RACE には、*gahA*-3R_s と *gahA*-3R_ns のプライマーを用いた。*AsgahA* 遺伝子の完全長 ORF は、3'-RACE で得られた cDNA を鋳型に用いて、*gahA*-full_s と *gahA*-full_as のプライマーセットで PCR により増幅し、pCR2.1-TOPO ベクターにクロー

表2-1 実験に使用したプライマー

Primer name	Oligonucleotide sequence (5'→3')
gahA-Prb_s	ATGGTCCCGTACTGTGCAAGCTTGGTATCC
gahA-Prb_as	GCAGCGCAACACTGACCGGCAAATACTCGG
gahA-5R_as	TAGCTATGGTCCCGTACTGTGCAAGCTTGG
gahA-5R_nas	ATGGCTTGACACACAATCTCCCACCACACC
gahA-3R_s	GCAGCGCAACACTGACCGGCAAATACTCGG
gahA-3R_ns	AAGAGCGACTTGGAGCAGGAGGCACATCGG
gahA-full_s	GGG <i>GAA</i> <i>TT</i> CATGTTTCTTAGTACACTCCTCTCACTGG
gahA-full_as	AAA <i>CCCGG</i> <i>TT</i> TAGGAGTATAGGCGAGAGCC

斜体は、制限酵素部位を示している。

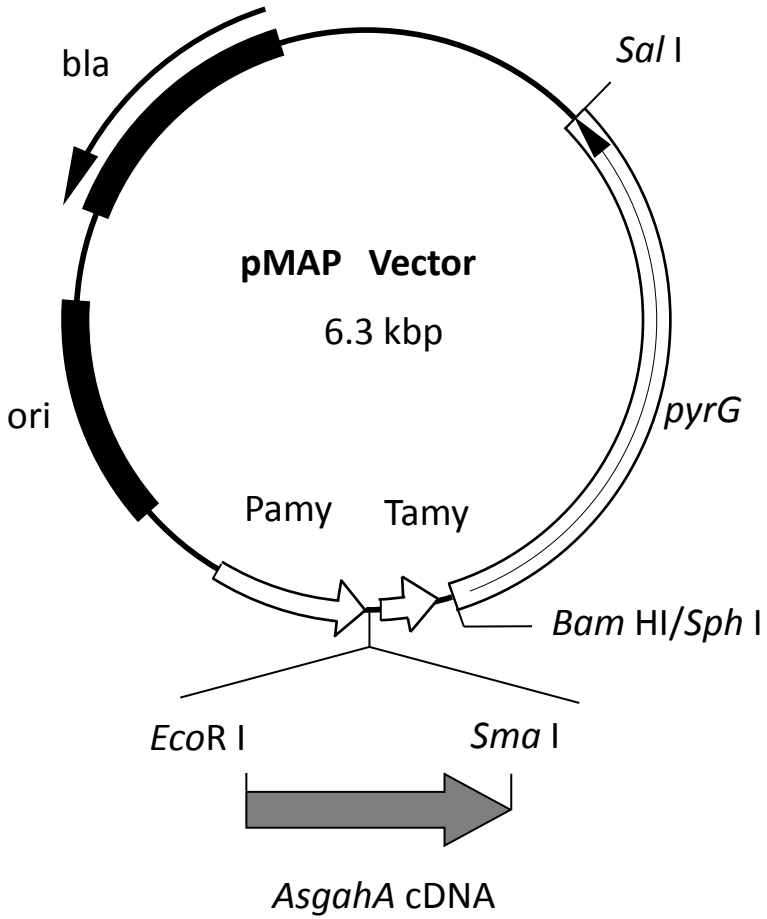


図2-1 pMAP_AsgahAタンパク質発現プラスミド
 黄麹菌 *A. oryzae* の発現ベクターであるpMAPベクターに *AsgahA* cDNA をクローニングした。ori は大腸菌の複製のためにpUC18由来のもの。pMAPベクターは黄麹菌の中で自律複製することができないため、染色体に組み込まれる。

ニングして、配列を確認した。配列確認後、*EcoR* I と *Sma* I とで制限酵素処理し、アガロースゲル電気泳動法により、目的の大きさの DNA 断片 (*AsgahA* 遺伝子) を切り出し精製し、同制限酵素で処理した黄麹菌発現ベクター-pMAP ベクターと連結させた (pMAP_ *AsgahA* タンパク質発現プラスミド、図 2-1)。DNA 断片の精製には、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いた。得られたプラスミドを用いて、黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 RP-1 株を定法に従って、形質転換し、*AsgahA* 遺伝子強制発現株 (Ao0E_ *AsgahA* 株) を取得した。

(7) *AsgahA* 遺伝子の発現

上記 (6) で得られた黄麹菌の形質転換体は、Cz 最少培地、Cz-M 最少培地もしくは DPY 液体培地で、30°C、4 日間培養した。培養後、ミラクロース (ミリポア) を用いたろ過で菌体と培養上清に分離した。菌体は、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で十分に洗浄し、培養上清はさらに 14000 rpm で遠心して、清澄な培養上清を得た。得られた湿菌体および培養上清を用いて、グルタミナーゼ活性を測定した。全タンパク質の定量には、Bio-Rad Protein Assay kit (日本バイオラッド) を用いた。ジャー培養のための培地の検討では、上記に加え、Cz-M+カザミノ酸、DPYS 培地、マルツ液体培地を用いた。各培地 50 ml に Ao0E_ *AsgahA* 株の分生子を 10^6 個/ml になるように接種し、150 ml 容三角フラスコで 30°C、190 rpm で 36 時間、培養した菌体を用いてグルタミナーゼ活性を測定した。

分生子数の測定は、以下の通りに行った。マルツ寒天培地に分生子を点植し、5 日間、30°C で培養した。菌が生育した寒天プレート上に 0.01% Tween80 溶液を適量加えて、スプレッターで分生子を懸濁後、セルストレーナー (BD ファルコン) でろ過した。血球計測盤を用いて、顕微鏡下でろ液に含まれる分生子数を測定した。

(8) *AsGahA* タンパク質の細胞壁からの可溶化

物理的もしくは酵素的処理による *AsGahA* タンパク質の可溶化は以下のように行った。ポリトロン処理および酵素処理は全て湿菌体重量 10 g の菌体を 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 10 ml に懸濁したものを使用した。ポリトロン・ホモジナイザー (セントラルサイエンティフィックコマーシュ) 処理は 30 秒行った後、30 秒水中で冷却する操作を 6 回繰り返した。液体窒素による凍結破碎処理は、湿菌体重量 10 g の菌体をキムワイプ等に包んで吸水させて、十分に水分を除去した後に液体窒素で凍結後、乳棒と乳鉢を用いて破碎し、20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 10 ml に再懸濁した。細胞壁溶解酵素である Yatalase (タカラバイオ)、Cellurase ONOZUKA R-10 (ヤクルト)、Dricelase (シグマ) は、終濃度 3 mg/ml となるように添加し、30 °C でゆっくりと振とうしながら 3 時間酵素処理を行った。酵素処理後、14000 rpm、10 分間遠心し、反応上清と残渣とに分離して、各画分を用いてグルタミナーゼ活性を測定した。可溶化はグルタミナーゼ活性測定後の吸光度 (340 nm) の Δ (デルタ) 値で比較したが、吸光度の Δ 値は、グルタミナーゼ反応の前に反応停止液を加えたものをブランクとして算出した。

(9) AsGahA タンパク質の精製

AoOE_AsgahA 株を DPY 培地で 30°C、4 日間、培養した。培養には 30 L ジャーを使用し、内圧 0.1 kg/cm²、通気 0.25 vvm、攪拌 200 rpm で行い、消泡剤として 0.05% の東レシリコーン SH5500 を用いた。得られた菌体は、40 L の脱イオン水および 20 L の 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) で洗浄後、可能な限り脱水した。得られた湿菌体 (100 g) を、3 mg/ml の Yatalase を含む同緩衝液 1 L に懸濁し、30°C、3 時間、菌体を可溶化させた。得られた可溶化液をミラクロスに通過させて菌体残渣を取り除き、通過液を 14000 rpm、15 分間遠心した。得られた上清は、ただちに 4°C まで冷却し、PMSF (終濃度 1.0 mM)、EDTA (5 mM)、ペプスタチン A (1.0 μg/ml)、ロイペプチン (0.5 μg/ml)、キモスタチン (0.1 μg/ml) を添加した。次に終濃度 1.2 M となるように硫酸アンモニウムを加え、4°C で約 1 時間、スターラーを用いて攪拌しながら静置した。その後、遠心分離 (12000 rpm、20 分間) し、不溶性タンパク質を除去して粗酵素液を得た。

上記の粗酵素液を TSKgel Phenyl-5PW (φ21.5 mm x 150 mm) カラムに通液後、溶離液; A 液 1.2 M 硫酸アンモニウム含有 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、B 液 20% エチレングリコール含有 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) の条件で、硫酸アンモニウムの 1.2 M から 0 M へ、及びエチレングリコールの 0% から 20% への各濃度勾配で溶出した。

次に、活性画分をセントリプレップ YM-10 (ミリポア) を用いて、脱塩、濃縮および 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) にバッファー置換して、TSKgel DEAE-5PW (φ7.5 mm x 75 mm) カラムに通液し、溶離液; A 液 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、B 液 1.0 M NaCl 含有 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) の条件で、NaCl の 0 M から 1.0 M への濃度勾配で溶出した。

続いて、活性画分をセントリプレップ YM-10 で濃縮後、TSKgel G3000 SW (東ソー、φ7.6 mm x 600 mm、2 本を連結) カラムに 0.25 ml ずつ注入し、溶離液; 0.2 M NaCl 含有 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) の条件で溶出した。

(10) 分子量の測定

精製酵素の分子量は、MW-Marker (オリエンタル酵母) および TSKgel G3000 SW (2 本を連結) を用いて求めた。一方、変性酵素の分子量は、蛋白分子量マーカー (タカラバイオ) を用いて、SDS-PAGE により求めた。SDS-PAGE は、第 1 章と同様に行った。

(11) AsGahA タンパク質の N 末端および内部アミノ酸配列の決定

精製した AsGahA タンパク質のアミノ酸配列は、精製酵素 2 μg を SDS-PAGE で分離後、Sequi-Blot PVDF 膜 (日本バイオラッド) に転写し、クイック CBB 染色キットの染色液である A 溶液を用いて染色した。その後、目的のバンドを切り出し、プロテインシーケンサー-492 型 (アプライドバイオシステムズ) を用いて、エドマン分解法により分析した。尚、

PVDF 膜への転写処理は、日本エイドーの転写装置を用い、セミドライ法で行った。

(12) グルタミンナーゼ活性の測定

液体培養で得られた湿菌体 (100–200 mg) を用いた測定は、均一な菌体を含んだ培養液または、湿菌体を滅菌水に再懸濁して使用し、第 1 章の測定法①に準じて行った。

精製酵素を用いた標準的な測定は以下のように行った。終濃度 10 mM のグルタミン (L-Gln) と 0.105 M のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を含む反応液 (380 μ L) を 37°C で 5 分間、加温後、精製酵素 20 μ L (0.2–10 μ g) を添加して、37°C で 30–60 分間反応させた。反応後、100 μ L の過塩素酸 (0.75 N) を添加して、反応を停止させた。15 分間室温に静置させた後に 50 μ L の水酸化ナトリウム (1.5 N) を添加して中和させた。その後、14000 rpm で 10 分間遠心した後、得られた上清を用いて反応産物 (グルタミン酸またはアンモニア) を定量した (第 1 章参照)。

ヒドロキシルアミン存在下における転移活性は下記のように行った。終濃度 10 mM の各種基質、0.1 M ヒドロキシルアミン、0.1 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 9.0) を含む反応液 (180 μ L) を 37°C で 5 分間、加温後、精製酵素 20 μ L (0.1–5 μ g) を添加して、37°C で 60 分間反応させた。35 μ L の反応停止液 (28% (w/v) トリクロロ酢酸、2.5 M HCl、5% 塩化第二鉄 (FeCl₃)) を加えて反応を終了させた後、14000 rpm で 10 分間遠心して、得られた上清の 540 nm の吸光度を測定した (第 1 章参照)。

(13) 酵素の諸性質の決定

至適 pH ; 種々の緩衝液を用いて反応系の pH を変え、各 pH でのグルタミンナーゼ活性を測定した。反応温度は 37°C で行った。最も活性の高かった値を 100% とした相対活性を求めた。緩衝液は、酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.5–5.5)、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0–8.0)、トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.0–9.0)、炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0–11.0) を使用した。

pH 安定性 ; 終濃度 50 mM の緩衝液となるように 0.2 M の各緩衝液を加えて、16 時間、4°C または 30°C でインキュベートした後、標準的な方法で活性測定した。最も活性の高かった値を 100% とした相対活性を求めた。緩衝液は、酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.5–5.5)、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0–7.5)、トリス・塩酸緩衝液 (pH 8.0–9.0)、炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.5–11.0) を使用した。

至適温度 ; 標準的な測定条件で反応温度を変えてグルタミンナーゼ活性を測定し、最も活性の高かった値を 100% とした相対活性を求めた。温度は、30、37、45、50、55、60°C で行なった。反応は、pH 7.0 (0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液) と至適 pH である pH 9.5 (0.1 M 炭酸ナトリウム緩衝液) で行なった。

耐熱性； 基質を除いた反応液を各温度で 30 分間熱処理し十分に冷却した後に、基質を添加して 37°C で反応させた。温度は、30、37、45、50、55、60°C で行なった。反応は、pH 7.0 (0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液) と至適 pH である pH 9.5 (0.1 M 炭酸ナトリウム緩衝液) で行なった。

塩阻害に対する耐性； 反応系に終濃度 0、5、10、15、18、20% となるように NaCl を添加し、グルタミナーゼ反応させ、NaCl 0% の活性値を 100% とした相対活性を求めた。反応は、pH 7.0 (0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液)、37°C で行なった。

耐塩性； 各濃度の NaCl を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 20 μ l 中で精製酵素を 4°C または 30°C で 16 時間インキュベートした。その後、0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を 500 μ l、NaCl を終濃度 0.4% となるように加えて、37°C で反応を行なった。NaCl 0% の活性値を 100% とした相対活性を求めた。

基質特異性； 終濃度 10mM の基質 (γ -glutamyl-*p*-nitroanilide (γ -glutamyl-*p*NA) のみ 1.25mM) を用いて標準反応条件で反応させた。L-Gln、L- γ -Glutamyl hydrazide、L- γ -Glu-Val、L- γ -Glu-Leu、L- γ -Glu-Cys-Gly (グルタチオン) は、生成したグルタミン酸を定量し、carboxybenzoyl (CBZ)-Gln、CBZ-Gln-Gly (シグマ)、D-Gln、L-アスパラギン (L-Asn)、D-Asn (フルカ)、L-Glu、L-Gly-Gln、L-Ala-Gln、L-Gln-Gly (東京化成工業)、L-Leu-Gly-Gln、L-Pro-Leu-Gly-Gln、L-Leu-Gly-Asn、L-Leu-Ala-Asn、L-Pro-Leu-Gly-Asn (ピーエイチジャパン)、acetamide、acrylamide、L-Tyr-Gly-NH₂ (国産化学) は、アンモニアを定量し、L-Gln に対する反応性を 100% とした相対活性を求めた。 γ -glutamyl-*p*NA は、生成したパラニトロアニリドを 405 nm で定量した。 K_m 値および k_{cat} 値は、Lineweaver/Burk-plot により求めた。分子量は、遺伝子配列から推定されるアミノ酸配列より求め、2 量体として計算した。

金属イオン効果； 各種金属イオンを終濃度 2 mM となるように反応系に添加し反応させた。金属イオン無添加での活性を 100% とした相対活性を求めた。

(14) 固体培養における AsGahA タンパク質の局在性

AoOE_AsgahA 株をしょうゆ麹様培地に植菌し、30°C、42 時間培養した。培養後、50 ml の 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を加え、氷中で 16 時間抽出した。その後、ポリトロン・ホモジナイザーで 1 分間、麹を破碎し、14000 rpm、15 分間遠心した。得られた上清を菌体外グルタミナーゼ画分とした。

一方で、沈殿物は、同緩衝液 50 ml に再懸濁して、14000 rpm、15 分間遠心し、上清を捨て沈殿物を洗浄した。この洗浄操作を 8 回繰り返した後、30 ml の同緩衝液で懸濁し、沈殿

物を含んだ状態で酵素液とした。これを菌体結合画分とした。それぞれの画分の酵素液を 1 ml 使用し、第 1 章の①の測定法に準じてグルタミナーゼ活性を測定した。

菌体外画分については、脱糖鎖処理をして SDS-PAGE により分離した後、上記(11)と同様に PVDF 膜に転写し、抗 AsGahA タンパク質抗体(タカラバイオ社にて受託合成。ポリクローナル抗体)を用いてウェスタン解析を行った。脱糖鎖処理には PNGaseF (ニュー・イングランド・バイオラボ)を用い、添付のプロトコルに従って処理した。ウェスタン解析には、BM Chemiluminescence Western Blotting Kit (ロシュ・ダイアノグノティス)を用い、添付のプロトコルに従った。

(15) AsGahA タンパク質の菌体外プロテアーゼによるタンパク質部分分解

A. oryzae RIB40 株の分生子をしょうゆ麹様培地に植菌し、30°C、42 時間培養した。培養後、10 倍量の 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)を加え、氷中で 16 時間抽出した。抽出液を No. 2G のろ紙(ADVANTEC)でろ過し、タンパク質分解酵素を含んだ粗酵素液とした。精製 AsGahA タンパク質と粗酵素液とを混合し、30°C、16 時間反応させた。この時、酵素を失活させるために、粗酵素液を 10 分間煮沸したものおよび粗酵素液を 10 倍希釈したものも同時に行った。反応後、脱糖鎖処理をして SDS-PAGE により分離した後、上記(11)と同様に PVDF 膜に転写し、抗 AsGahA タンパク質抗体を用いてウェスタン解析を行った。

(16) グルタミナーゼ遺伝子解析

グルタミナーゼのホモログ遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列は、DOGAN (<http://www.bio.nite.go.jp/dogan/project/view/A0>) および AspGD (<http://www.aspgd.org/>) より入手した。ホモロジー検索は、第 1 章と同様に NCBI のデータベースを利用し、BLASTN および BLASTP のデフォルトプログラムで行った。ドメイン検索は、Pfam(<http://pfam.xfam.org/>)のデータベースを用いた⁷⁷⁾。また、タンパク質のホモロジー検索には、GENETYX(ゼネティックス)をデフォルトプログラムで利用した。

【結果および考察】

(1) 黄麹菌ゲノム配列情報を利用した *Cryptococcus* 属酵母由来のグルタミンナーゼ (CnGahA タンパク質) と相同性のある遺伝子の探索

黄麹菌酵素がしょうゆ醸造で機能するという視点から、耐塩性のグルタミンナーゼ遺伝子を黄麹菌が持つと仮定した。*A. oryzae* RIB40 株のゲノムデータベース DOGAN を利用して、新規な耐塩性グルタミンナーゼである CnGahA タンパク質の遺伝子配列を用いて相同性検索を行った。その結果、*A. oryzae* RIB40 株のゲノム配列中に相同性の高い 4 つの遺伝子 A0090003001406 (34% amino acid identity; E value, 1×10^{-90})、A0090011000310 (35% amino acid identity; E value, 3×10^{-97})、A0090701000634 (28% amino acid identity; E value, 1×10^{-52})、A0090011000138 (31% amino acid identity; E value, 7×10^{-52}) が存在することを見出した。これらの遺伝子を *AogahA* (A0090003001406)、*AogahB* (A0090011000310)、*AogahC* (A0090701000634)、*AogahD* (A0090011000138) と命名した。全ての遺伝子産物は、アミダーゼモチーフ(ドメイン)を持つが、機能未知タンパク質と予測された。

続いて、*A. oryzae* RIB40 株の EST データベースに対して、同様に相同性検索をすると、炭素源飢餓液体培養 (LS library; liquid carbon-starved library) から得られた一つのクローン (配列; AoEST04086) が検出された。その配列は、*AogahA* 遺伝子の 3' 側の 781 bp と一致した。

しょうゆ醸造には *A. oryzae* だけでなく、*A. sojae* も使用される。*A. sojae* はタンパク質分解能が高いことから醤油、味噌製造に限定的に使用される。また、*A. sojae* のグルタミンナーゼ活性は、*A. oryzae* より高いことも知られている³¹⁾。そこで、*A. oryzae* RIB40 株で *gahA* 遺伝子が発現していることが明らかになったので、*A. sojae* におけるこの相同遺伝子の存在および発現の有無を確認した。まず、*A. sojae* の染色体 DNA を鋳型に用いて、この 781 bp に相当する領域が PCR で増幅することを確認した。次に、この PCR により増幅した DNA 断片をプローブとし、大豆粉培地で培養した *A. sojae* より抽出した全 RNA を用いてノザン解析を行った。その結果、十分に発現していることを確認した (図 2-2(A))。

続いて、5'-RACE および 3'-RACE 法を用いて cDNA を取得した (図 2-2(B))。同時に、*A. sojae* ゲノムライブラリーより、*AsgahA* 遺伝子を含む約 7.2 kb の染色体 DNA を取得した。*AsgahA* 遺伝子の ORF は、1929 bp からなり、イントロンは含まず、643 アミノ酸からなるタンパク質 (このタンパク質を *AsGahA* タンパク質と命名) をコードすることが明らかとなった (図 2-3)。黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 株の EST 解析は、poly A tail から cDNA を合成して解析されている。しかし、AoEST04086 は *AsgahA* 遺伝子 ORF の 3' 側 1110 bp-1889 bp 領域と一致しており、我々が推定した poly A 付加部位とは異なっていた。EST 解析時に mRNA が分解した形でアダプターが付加されたか、ゲノムが混入したのではないかと考えられる。

Aspergillus nidulans のグルタミンナーゼは窒素および酸素による発現の制御を受けることが知られている⁷⁸⁾。*Aspergillus* 属糸状菌において、窒素源による発現制御は転写因子で

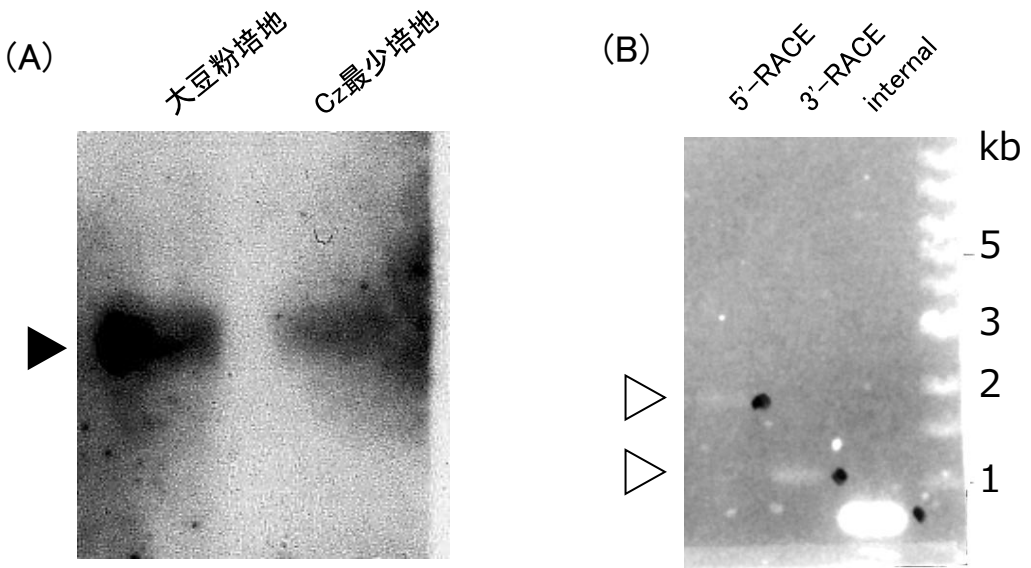


図2-2 黄麹菌グルタミナーゼの発現確認

A. sojae NBRC4241株を大豆粉培地およびCz最少培地で培養し、AoEST04086に相当する領域をプローブにして、ノザン解析を行った(A)。大豆粉培地で培養した菌体から全RNAを抽出し、5'および3' RACE法によるグルタミナーゼ遺伝子をクローニングした(B)。internalはAoEST04086(プローブに使用)に相当する領域を示し、ゲノムを鋳型にしてPCRにより増幅させたもの。▶は*AsgahA*遺伝子のmRNAを示し、▷は各RACE法でクローニングしたDNA断片を示す。

atagggaacaattttctgctttgcaagaccggcagaaggccgtatgatttagctgtttcacaatcttgctaaggccatgactgacccagagtagcat -901
ttgagctgagctcggatggtaattgggataatgactggtgagagcccaagatctttatcattgtatttggccgaaggaacacattccgtgtccgtggga -801
gaaggagtgaatcttaaccgtaggagcatgtttgctggatgggtagctagttatcaatttggctgcaattgaaatgacaacatctgagcttatcaagacaccc -701
ggggaaagtcaccatgaatgatctccatccacggccacatattggttagaccaccacacaagctttaaaccgctatgggcattattccgaagcaagcatg -601
tatttgggtagaattgttcgctcaagcctctttattttatggatgagttctctatgctggacctgaagaatgacattctctctcggcaggcaagtta -501
atatttaataagaattacggctacattcttaaaaaaagaactcgacaaactctatttggatgagttagaagaacacagcattctcatcggaatcatgaaata -401
ccatagaagaacaacaagtgagcagactccatccatgggaaaagatccgaagaacgggagacccggctctcgcttggaaatcaactatcggtatgtctac -301
cgagagcacagcgagagcatagcagaagataaaccaagctgcacaaggacccccgggaaaacacgggagatcctaatcaataggatttcagcgatattgcccag -201
actaaatcatgaatggagccggccaagcagattagatcctacttggcgtcgggctatcgcgacacccgataagagtgattatcacaaatthaagggttggc -101
tatctcgagatcgtgcttgtgactaatgccaacccctcactgtaataataaaggaggaagaacgagcagcattcaaatgaggggtgacagactaatccttc -1
ATGTTTCTTAGTACACTCTCTCACTGGCGGGCTGTTGCCGGCGCTGCCATCCCCAATGGCCAGACGCTTTCTCTCAATGACATTCCTTACTATGTGA 100
M F L S T L L S L A A V A V A G A A I P N G Q T L S L N D I P Y Y V S
GCGGCATCTCTGTCAACTTTGCAAGGTACAATGCCTTGACATGCTGCTTTGACAAAAGGGAATAGATTTGGTGCCATTAAGCTTAACTCTGTAAC 200
G I P V S T L Q G Y N A S A Y A A L T K G I D L V P L T V I P V T
TCCTACCAGAACTTGGAGTCGCTGCTATCGGACTATTGGAACCGAGATGATGTCTCCAGCCGGCTTTCTCGCTGCAGCTATCTCACAGCTTCCACT 300
P T T N L E S L L S D Y V E R D D V F T Q P A F L R A V Y L T A S T
GCTGATGACATTGACCTCCAAGTGAACATTCGGTCAATTCCTCAAGCTTCCGGACCCGAGCTGCTGGTGTGATTCAGAAGTACACACCGCTTCGT 400
A D D I D S Q L S N Y A S I L K S S G G T D V L L V D S E V H T A S S
CAGATTCACAATCACAGCGCAGTGTACCAAAAGAGCTGCCAGTGGGCCCTATTTTGTCTCCTTGATATACTGGAGAGGTGTTTAGAGCGTACCGGTGTGA 500
D S T I T A Q L T K E L P S G P Y F V S L Y T G E V F R A Y R L Y
CCCTGACGACAACCTAGCTTTCATTCAAGCAGGAATCAGTGACGAGAAGGGAGGTGCTGCCCTACCAGCCGTCAGACAGAAAACCGGATGACCAAAGAC 600
P D D N L A F I Q A G I S D E K G G V L P L P A V T E N A M T K D
GTTGCCGTGCTTACGCTCTATTATACACCGCAGAAAAGCCATTAGCCGGTCTGAGGTAGGTGTCAAGGATATCTACCAGTAAAGGCTCA 700
V A V P S R L Y T T P T A E K P L A G L R L G V K D I Y H V K G L K
AGACGATGGCGCAGTCTGCTTCTATTTATACCGAACTCAGAATGTACTGCCCTTATTCAGAGACTGTTGGACTTAGCCGCGGTCTTTGT 800
T S G S R S Y Y Y L Y G T O N V T A P S I O R L L D L G A V F V
CGGTAATACTGGGACCGTTCAGTTTGTCTAACGGTGTGACCTACTGCCGACTGGGTGGATTTCCACTGTCCATTCAACCCACGGGAGAAGGATATCAG 900
G K T G T V O F A N G D R P T T A D W D V D F H C P F N P R G E G Y Q
GCACCTAGCGGTCTCTCCTCCGGCTCAGGTGFGGCTATGACAGCTTACGACTGCCCTTCTGACCTTGGACCTTGGCTGACACTGGGTTCAATGCGTCC 1000
A P S G S S S G S G V A I A A Y D W L D L A V G S D T G G S M R S P
CAGCTGACGTTCAAGGATATATGGCAACAGGCCATCTACTGGCGCTATCTCTAGATCATGCTTACCTCTCTCGCCGGCTCTGGATACAGCGGGCGT 1100
A A V Q G I Y G N P S T G A I S L D H V L L P S P A L D T A G V
CTTTGCCCGCAAGTCCCTACTACTGTCCATCTGCAAGCTTGGTATCTCATCTCCAGCACAAATTTACGTCCTTCCCTCGGCAGCTGCTCTAGCC 1200
F A R S A S L W S H T V Q A W Y P H L Q H N F T S F P R Q L L L A
GGTGGTGGATGGGATAAAGGCATCAGTCCCGAGGCCATCAGAGCTTTACACATTACACAGTGGGCTTGAGGCATTCCTCGGAACAAACCATACCA 1300
G G G W D G K G I S P E A H Q S L T T F T R G L E A F L G T N H T N
ATGTCGACGTGTGCGACGATGGCTTGCACACACTCTCCACCAACCAAGCCTGGAAGAGATGCTCAACCTGACCTATGCCACACTTACTTCTGTGGA 1400
V D V S A R C W L L D T H S P T A S S L E E M L N L T A C T L T S V D
TCAGTTCAACCACTAGCCGCTCTCTTTGCTGACTATAAAGCCGTCACCCGGTCTGACGCTTTCTATTAAACCCGCCATTAGCGGCTTGGCAG 1500
Q F N H L A V P L F A D Y K A V H R G R Q P F I N P G G P L A R W Q
TGGGCCAGGCGAATGGCGAAACACTCTGCTAGCTGACGCTTCCGCAACATGACTACTTCCGAACCTGGGAGAAGTCCGGGTATGGTCACTGCGG 1600
W G Q A N G G N T S Y D A A L R N M T T F R N W W E K S G Y G Q S D
ATAATGCCTCTTGTCTCAGGTCTGCTTTCTGCTCAGTGTGATTCGGTTCGGCACCCTGACTACCCTGAACCAATAATATTATGAGGGCCYACTACCCCCACT 1700
N A S C S R S L F V S V Y S V G T T D T D Y R N Q Y Y E A P T T P P L
GGGATTCCTGATCGGACCGATCCGGTATTAGGTGGAGCAGCTGAGTGTGTGTTCTGTTGGGAGAGTCCCCATACAATAGTATCTCTTCTGTCAGACC 1800
G F S I G R I A V L G G A P E V V V P V G E S P Y N S T I A T S L Q T
GAGTATTGGCCGCTCAGTGTCCGCTGCAGATGGCCGAGGATGTGACCATTTCTGGCTTGGTTCGCTGGCTTGGAGAAAGGGCGTCTCCCGAC 1900
E Y L P V S V A L Q M A R G C D H V L T A C S L V A G L E K K G V R P
CTGTGACTACCGCTCTCGCTTACTCTTAAatgaaaatcacagatgaagagcggtatcaagctagggtaaaagtaaaaagtagagtagtgcggttcaa 2000
V S T G S R L Y S *

図2-3 *Asgah*4遺伝子の塩基配列

プロモーター領域1kbを含む染色体DNAの配列。塩基配列の小文字はUTR領域、大文字はORF領域を示す。転写開始点(▲)およびポリA付加部位(▼)を示す。TATA boxは黒のボックスで示す。二重線、直線、点線で下線を引いた箇所は、それぞれ推定のCreA結合部位(5'-SYGGRG-3')、AreA結合部位(5'-HGATAR-3')、PacC結合部位(5'-GTCARG-3')を表す。灰色のBOXに白字は、アミダーゼモチーフ領域(Pro²¹¹-Ser³⁷³)を示し、斜体に下線はAoEST040861に相当する領域を示す。

あるAreAタンパク質を介することが知られている⁷⁹⁾。*AsgahA*遺伝子のプロモーター領域(約1.0 kb)の領域には1箇所のAreA結合部位が推定された。また、黄麴菌由来のグルタミナーゼは炭素源によるカタボライト抑制を受けることも報告されている⁸⁰⁾。*Aspergillus*属糸状菌において、炭素源によるカタボライト抑制は、転写因子であるCreAタンパク質が関与する⁸¹⁾。*AsgahA*遺伝子のプロモーターには5箇所の結合部位が推定された。これらの結果は、*A. nidulans*と同様に*AsgahA*遺伝子も、それぞれによる発現制御を受ける可能性があることを示唆している。

AsGahAタンパク質は、CnGahAおよびCaGahAタンパク質と比較して、全体でそれぞれ36%と34%のアミノ酸同一性であった。予測されるアミノ酸配列からドメイン検索をすると、CnGahAおよびCaGahAタンパク質と同様にアミダーゼドメインを持つことが明らかになり(Amidase signature (AS) enzymes superfamily)、このアミダーゼドメイン領域(Pro²¹¹-Ser³⁷³)ではそれぞれと約60%のアミノ酸同一性を示した。

(2) *AsgahA* 遺伝子の強制発現および酵素活性の検出

次に、*AsgahA*遺伝子がグルタミナーゼ活性をもつタンパク質をコードする遺伝子であるか否かを確かめた。pMAP-*AsgahA*ベクターを用いて、*A. oryzae* RIB40 RP-1株を形質転換し、pMAP-*AsgahA*ベクターが複数コピー染色体に挿入された形質転換体(AoOE-*AsgahA*株)を得た。pMAP-*AsgahA*ベクターはアミラーゼプロモーター下に*AsgahA*遺伝子を連結しているプラスミドである(図2-1)。

AoOE-*AsgahA*株をCz最少培地とアミラーゼプロモーターの誘導基質であるマルトースを含むCz-M最少培地で培養し、湿菌体を用いてグルタミナーゼ活性を測定した。その結果、グルタミナーゼ活性が培養上清では検出されず、菌体表面に検出された(図2-4)。得られた形質転換体はpMAPベクターだけを導入したAo_pMAP株に比べて、グルタミナーゼ活性が高く、かつCz最少培地よりも誘導培地であるCz-M最少培地の方が高い活性を示した。以上の結果から、単離した*AsgahA*遺伝子がグルタミナーゼ活性を有するタンパク質をコードすることが明らかとなった。

(3) AsGahA タンパク質の精製

誘導培地であるCz-M最少培地でグルタミナーゼ活性を検出できたが、最少培地では生育速度が遅く活性も低いため、培地の検討を行った。Cz-M最少培地、Cz-M最少培地+1%カザミノ酸、DPY培地、DPYS培地(DPY培地+2%Soytone)、マルツ液体培地の5種類を用いて、グルタミナーゼ活性を測定した結果、DPYS培地で最も高い活性を示した(図2-5)。しかし、DPYS培地では、培養菌体がパルプ状の形態を示した。黄麴菌を液体培養すると、培養条件によって、菌体がペレット状かパルプ状になり、酵素生産性、ジャーの攪拌効率などからペレット状が好ましいとされる。そのため、培地調製の手間とジャーの攪拌効率を考慮し、2番目に活性の高かったDPY培地で大量培養することにした。

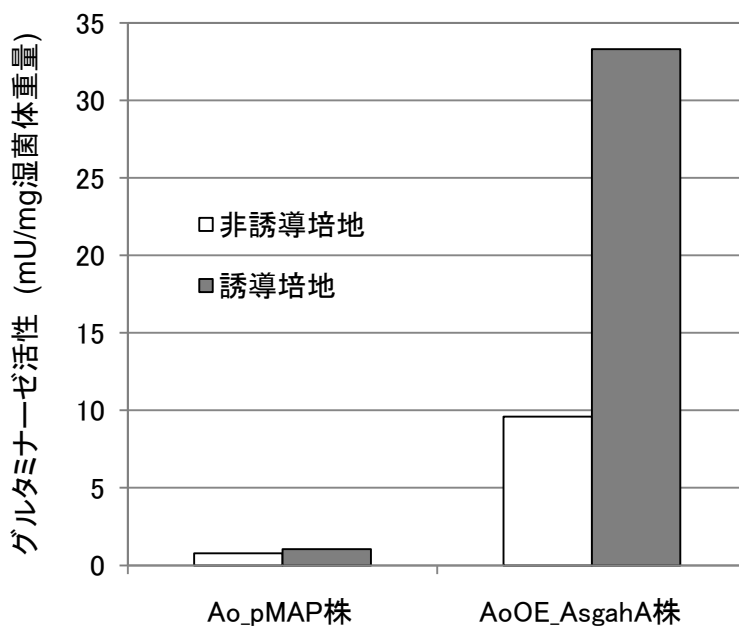


図2-4 *AsgahA*遺伝子高発現株のグルタミナーゼ活性

pMAP_AsgahAを用いて*A. oryzae* RP-1株を形質転換し、非誘導培地(□: Cz-G最少培地)、誘導培地(■: Cz-M 最少培地)で培養した。4日間培養後、集菌し、湿菌体を用いて菌体表面のグルタミナーゼ活性を測定した。

Ao_pMAP株: 対照株、pMAPベクターのみを導入した株、 AoOE_AsgahA株: pMAP_AsgahAを導入した株

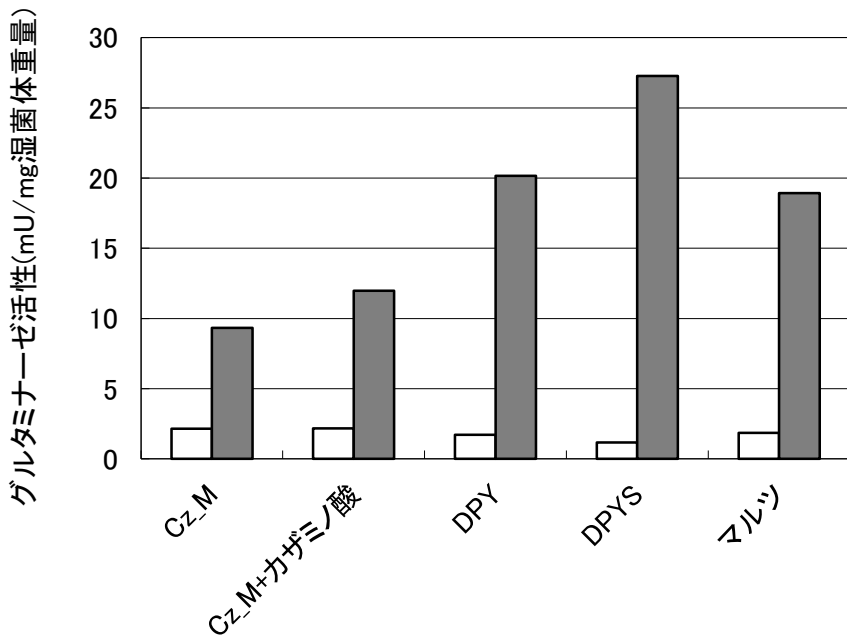


図2-5 AoOE_AsgahA株の各培地におけるグルタミナーゼ活性
 AoOE_AsgahA株およびAo_pMAP株を各培地で30°C、36時間培養し、湿菌体を用いて菌体表面のグルタミナーゼ活性を測定した。□(白抜きバー)はAo_pMAP株、■(灰色バー)はAoOE_AsgahA株のグルタミナーゼ活性を示す。

次に、グルタミナーゼが菌体表面に局在性を示したことから、菌体から遊離する条件を検討した。ポリトロンなどを用いた物理的な破碎よりも細胞壁溶解酵素処理の方がよく遊離した。様々な酵素を検討した結果、Yatalase 処理が最も効果的であった(図 2-6)。Yatalase 処理では 3 mg/ml 以上で遊離活性に変化がなかった。精製を考慮し(夾雑タンパクが少ない方がよい)、遊離活性が最も高く、少ない量である 3 mg/ml とした。Yatalase 処理では、プロトプラストができる。その破裂を防ぐために 0.8 M NaCl 存在下で、菌体から AsGahA タンパク質の遊離を試みたが、食塩非存在下での Yatalase 処理と比較してグルタミナーゼ活性が低下したため、Yatalase 処理時には、食塩を含まない条件で行うことにした。

黄麹菌はグルタミナーゼを複数持つことが知られている^{34, 37, 40}。一方で、一般的なバッチ培養で黄麹菌 *A. oryzae* を培養するとカタボライト抑制等により、グルタミナーゼ活性が著しく低いことも知られている⁸⁰。そこで、pMAP ベクターのみを導入した Ao_pMAP 株と AoOE_AsgahA 株から Yatalase 処理をした粗酵素液を調製し、最初のカラムである疎水クロマトグラフィー(TSKgel Phenyl-5PW カラム)のクロマトチャートを比較した。その結果、Ao_pMAP 株ではほとんどグルタミナーゼ活性を示すタンパク質ピークはなく、一方で AoOE_AsgahA 株では顕著に高いグルタミナーゼ活性を示すタンパク質ピークが得られた(図 2-7)。

そこで、このタンパク質ピークについてイオン交換およびゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、単一ピークとなるまでタンパク質を精製した(表 2-2、図 2-8)。AsGahA タンパク質は、粗酵素液から 38%の収率で、約 30 倍にまで精製され、比活性は 15.7 U/mg であった。SDS-PAGE の結果、3 種のポリペプチドが混在することが明らかとなり、分子量の大きい順に A、B、C とした。(それぞれ 67,000、59,000、13,000、図 2-8、2-9(A))。しかし、Native-PAGE では、単一バンドしか見られなかった(図 2-8)。また、ゲルろ過カラムでも単一のピークとなったことから、これらのポリペプチドは複合体を形成していることが予想された。ゲルろ過法により分子量を推定した結果、約 135,000 であり(図 2-9(B))、SDS-PAGE の結果から推定される 3 種のポリペプチド A、B、C の分子量の和がほぼこの値と一致することからも複合体を形成していることが強く示唆された。

そこで、これらのポリペプチドが同一遺伝子由来のものかを確認するために、各ポリペプチドの N 末アミノ酸配列を決定した。ポリペプチド A、B、C のすべての N 末アミノ酸配列がクローニングした *AsgahA* 遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列中に存在した(図 2-10)。このことから、精製したタンパク質が目的の遺伝子産物由来のものであることが明らかとなった。

また、A と C の N 末アミノ酸配列が完全に一致した。推定されるアミノ酸配列を用いてシグナル配列を予測すると、開始 Met から 14 残基がシグナルペプチドと予測される。A と C の N 末アミノ酸残基は、開始 Met から 16 残基目であり、ほぼこのシグナルペプチドが除去されたペプチドの N 末と一致する。また、SDS-PAGE の結果から推定される 3 種のポリペプチドの分子量をもとに計算すると、B と C の分子量の和が、ほぼ A の分子量と一致する。さ

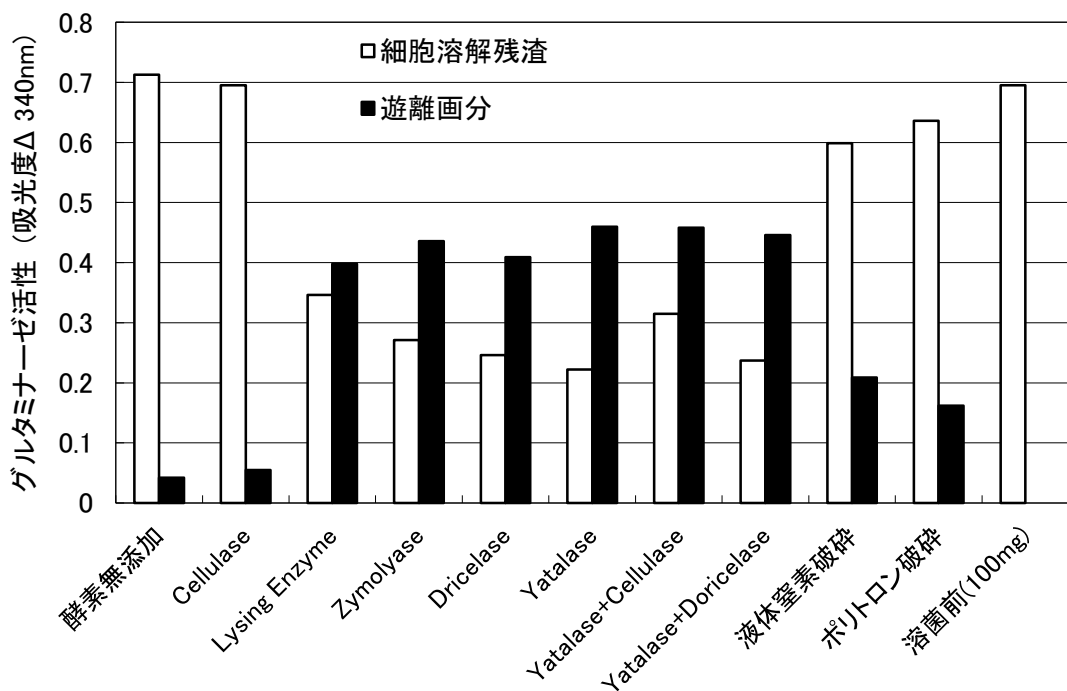


図2-6 AsGahAタンパク質の菌体からの可溶化

DPY培地で培養したAoOE_AsgahA株の湿菌体を用いて、酵素処理および物理的な処理により、AsGahAタンパク質を菌体から遊離させ、その可溶化率を比較した。酵素処理または物理的処理後、遠心して反応上清(遊離画分)と残渣(細胞溶解残渣画分)に分離し、各画分のグルタミナーゼ活性を測定した。細胞溶解残渣画分(白抜きバー; □)は湿菌体重量100 mgあたりのグルタミナーゼ活性値を示し、遊離画分(黒塗りバー; ■)は反応上清1 mlあたりのグルタミナーゼ活性値を示す。細胞溶解残渣画分の活性が低く、遊離画分の活性の高い処理法が最も効果的であると判断した。

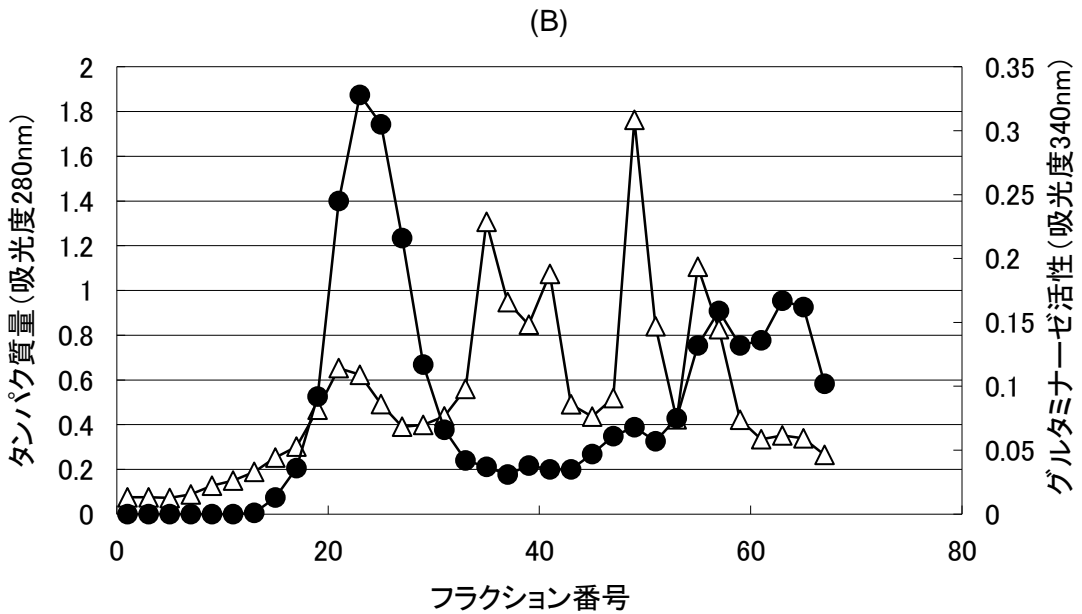
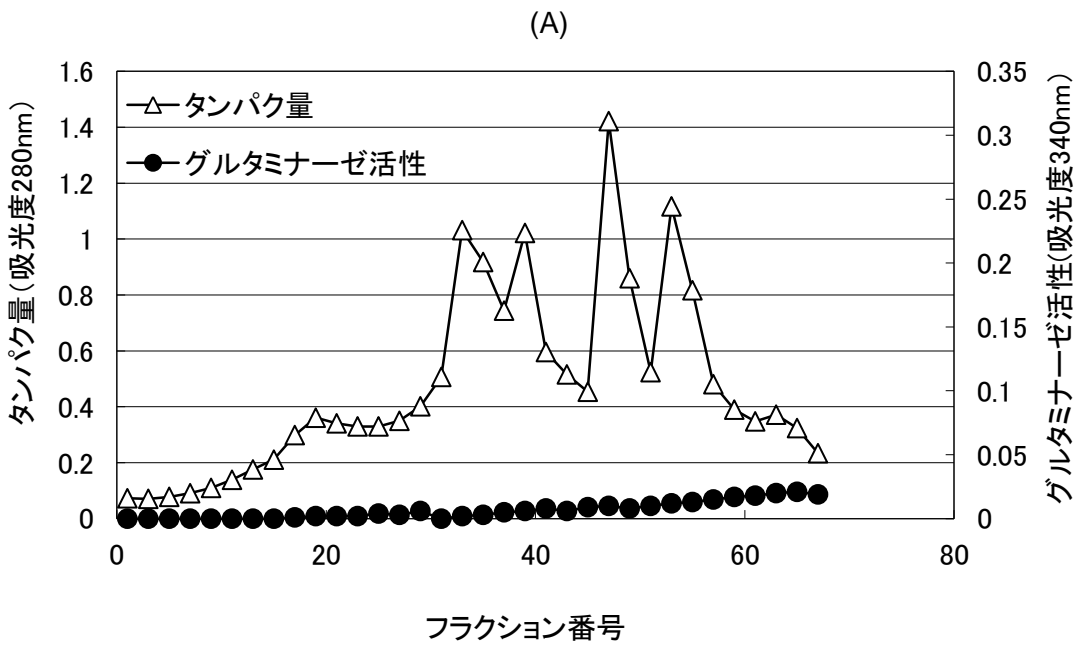


図2-7 各粗酵素液の疎水クロマトグラフィーによる分画比較
 Ao_pMAP株 (A) およびAoOE_AsgahA株 (B) から調製した粗酵素液の疎水
 クロマトグラフィー (TSKgel Phenyl-5PWカラム) 分画のクロマトチャートの
 比較。●は各フラクションのグルタミナーゼ活性を示し、△は、各フラク
 ションのタンパク濃度を表す。

表2-2 AsGahAタンパク質の精製

	全タンパク量 (mg)	全活性 (U)	比活性 (U・mg ⁻¹)	精製倍率 (fold)	回収率 (%)
粗酵素液	1070	505	0.5	1	100
疎水クロマトグラフィー分画 (TSKgel Phenyl-5PW)	55.3	418	7.6	16	83
イオン交換クロマトグラフィー分画 (TSKgel DEAE-5PW)	18.5	254	13.8	29	50
ゲルろ過クロマトグラフィー分画 (TSKgel G3000SW)	12.3	192	15.7	33	38

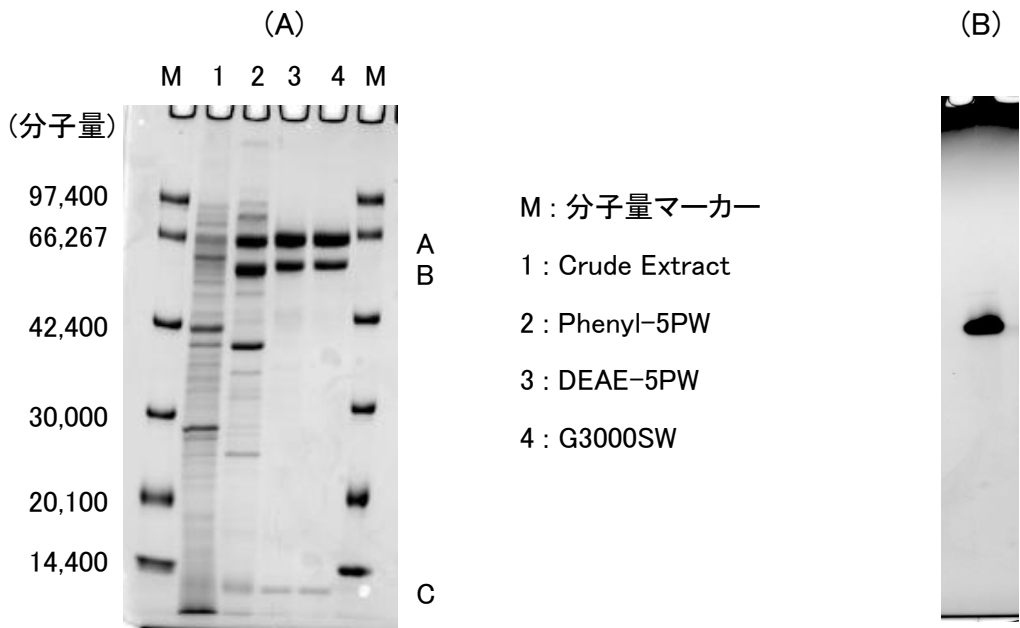
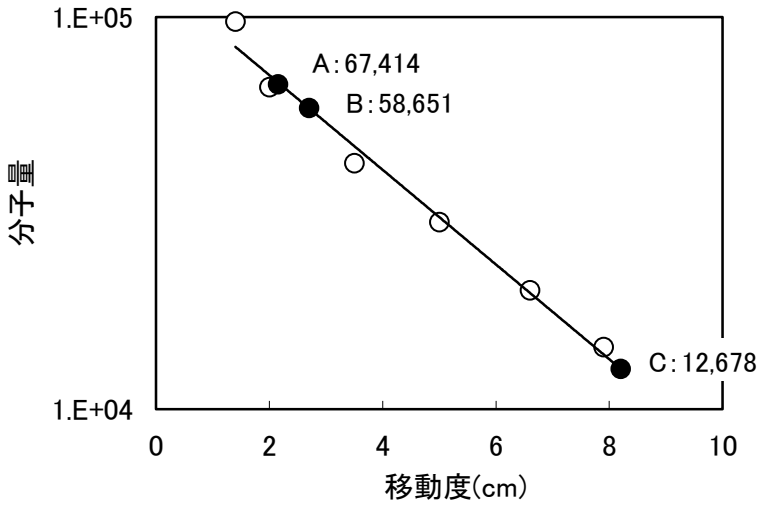


図2-8 AsGahAタンパク質の精製

AsGahAタンパク質の精製過程におけるSDS-PAGE(A)と、最終精製品(ゲル濾過 TSKgel G3000SW)のNative-PAGE(B)。

SDS-PAGEで分離したポリペプチドは、分子量の大きい順にポリペプチドA、ポリペプチドB、ポリペプチドCとした。

(A)



(B)

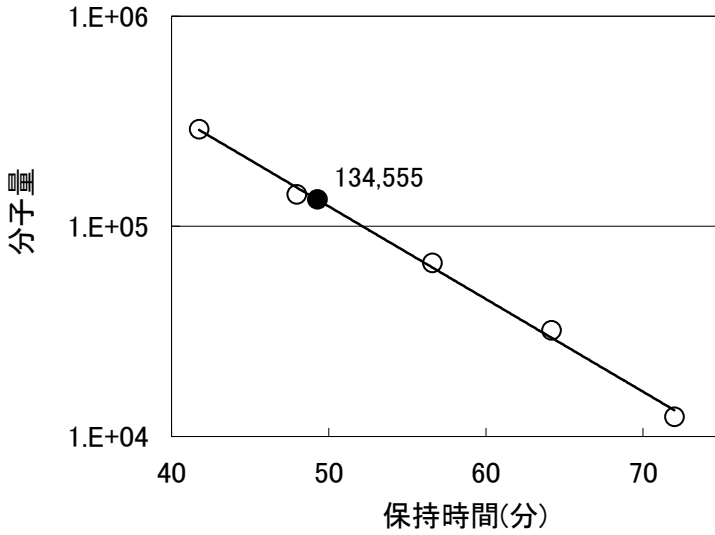


図2-9 AsGahAタンパク質の分子量の測定

SDS-PAGEで分離した精製AsGahAタンパク質の分子量測定(A)とゲルろ過クロマトグラフィーによる精製AsGahAタンパク質の分子量測定(B)。○は分子量マーカー、●は精製AsGahAタンパク質の分子量をプロットした。

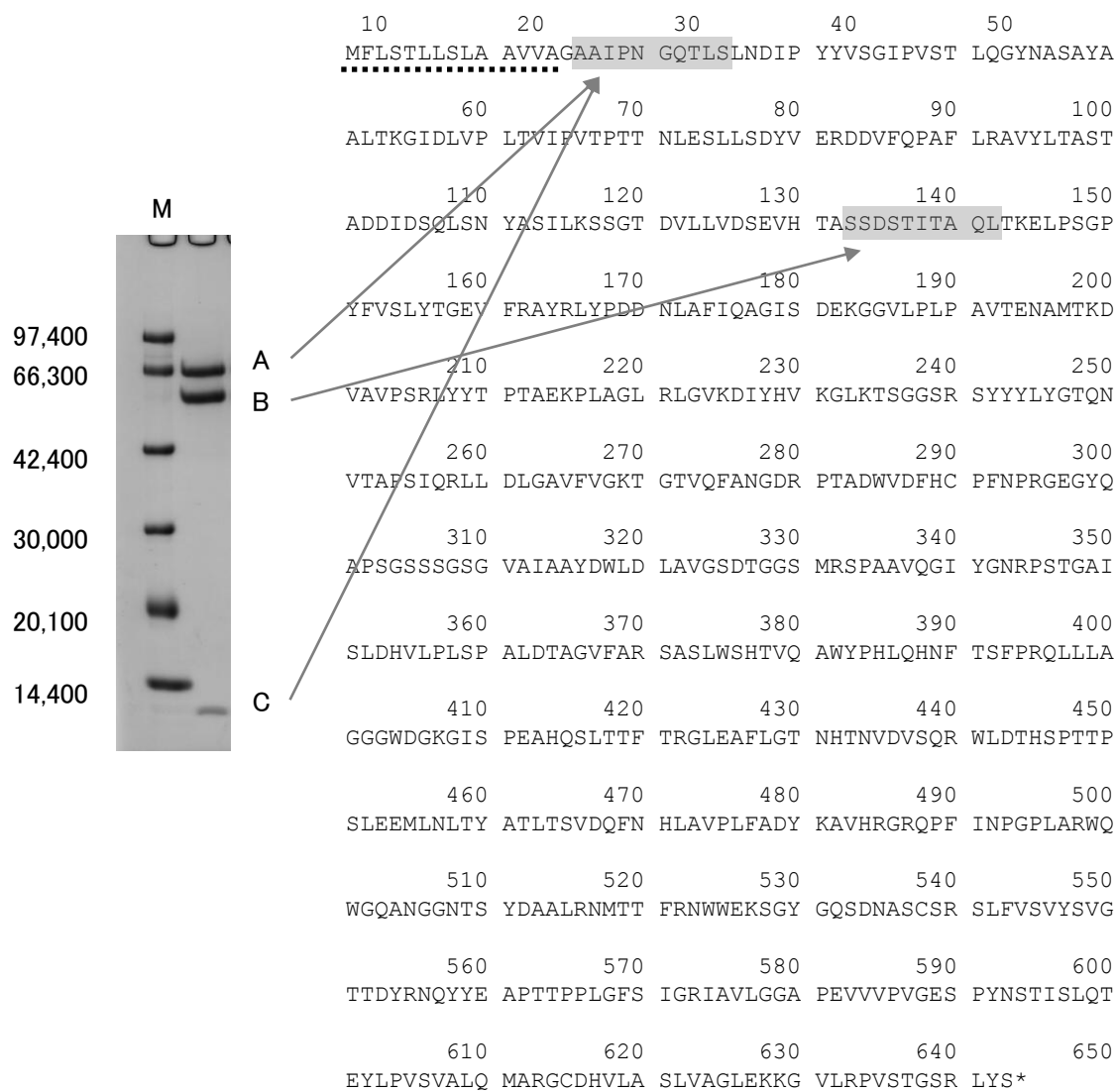


図2-10 精製したAsGahAタンパク質のSDS-PAGEで分離された各ポリペプチドのN末端配列Mは分子量マーカ-を表す。SDS-PAGEで分離したポリペプチドA, B, CのN末端アミノ酸配列は、PVDF膜へ転写後、エドマン分解法によりアミノ酸配列を決定した。点線は予想されるシグナル配列(14残基)を示す。灰色の網掛けは、同定した各ポリペプチドのN末端アミノ酸配列を示す。

らに、ポリペプチド A、B、C はそれぞれのアミノ酸配列から推定される分子量とも概ね一致している。従って、B と C は A が部分分解を受けたものである可能性が高い。この結果と先の Native-PAGE およびゲルろ過法による分子量測定の結果とを合わせると、これら 3 種のポリペプチドから形成される複合体は本来ホモ 2 量体であり、菌体から可溶化させる際に部分分解を受けたか、精製過程の間に部分分解を受けたのではないかと考えられる。

(4) AsGahA タンパク質の酵素諸性質の決定

精製した AsGahA タンパク質を用いて、酵素の諸性質を決定した(図 2-11)。

至適 pH ; 至適 pH は 9.5 であった。黄麴菌のグルタミナーゼについては、粗酵素を用いた性質の検討について、いくつか報告がある^{25, 26, 29}。それらの報告によると菌体結合型のグルタミナーゼは至適 pH が 8.0-9.0 である。従って、本酵素はこれらの報告とは異なったものであると考えられる。

pH 安定性 ; 4℃と 30℃で異なり、4℃ではほとんど pH による影響を受けなかったのに対し、30℃では pH がアルカリ側になると著しく失活した。

至適温度 ; 至適温度は pH によって異なり、pH 7.0 では 50℃であったのに対し、至適 pH 9.5 では 45℃であった。

耐熱性 ; 至適温度と同様に pH 7.0 と pH 9.5 で行なった。PH 7.0 では 50℃、30 分の処理では約 85%の活性を保持していたが、pH 9.5 では完全に失活した。

以上の結果から、アルカリ条件下では温度に対して不安定になることが明らかとなった。そこで、これ以降では pH 7.0 のみで行なうことにした。

しばしば耐塩性と塩阻害耐性とが混同して用いられることがある。ここでは、各食塩濃度の食塩存在下での酵素の安定性を耐塩性とし、反応系に食塩が含まれる場合の活性阻害に対する耐性を塩阻害耐性とする。しかし、一般的に耐塩性という場合には後者の塩阻害耐性をさす場合が多い。

塩阻害耐性 ; 反応系の NaCl 濃度が高くなるほど阻害を受けた。18%濃度で NaCl 無添加と比較し、約 85%阻害された。菌体に結合していると阻害を受けにくいとも考えられた。そこで、菌体自体を用いて活性を測定した結果、精製酵素と同様に食塩濃度の上昇と共に活性が減少する傾向にあったが、若干、精製酵素よりも菌体自体を用いた方が塩阻害を受けにくかった。一般的に黄麴菌のグルタミナーゼには耐塩性(ここで言う耐塩性は塩阻害耐性をさす)がないということが報告されている^{26, 29}(表 0-1 参照)。粗酵素での報告によると、NaCl 5%存在下で 80%近く阻害され、NaCl の存在によって急激に反応が阻害される。しかし、本酵素は NaCl 5%存在下では 40%程度の阻害しか受けておらず、18%まで緩やかに阻害されることから本酵素は以前の報告のものとは異なったものと考えられる。

耐塩性 ; 4℃と 30℃で異なり、30℃の方がより失活した。30℃では 18%濃度に 16 時間インキュベートすると、30%失活した。

金属イオン効果 ; 各種金属イオン添加による活性向上効果はなかった(表 2-3)。一方、Hg

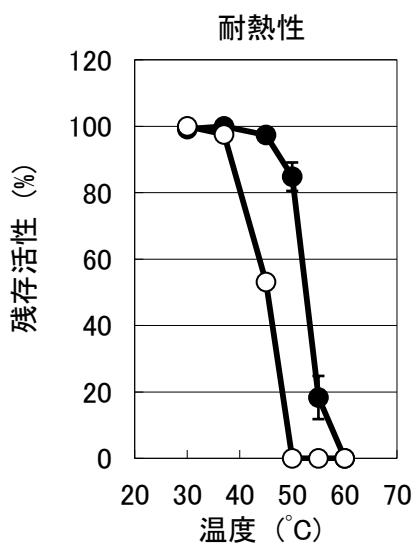
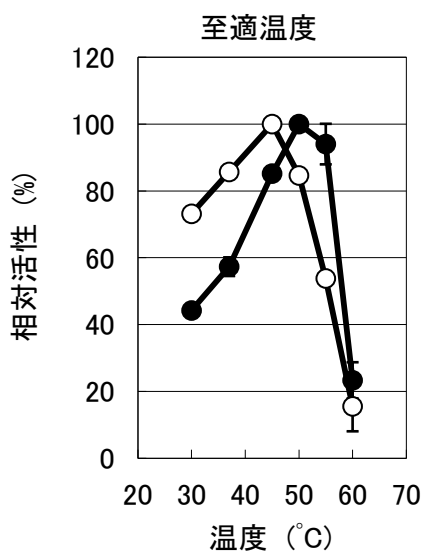
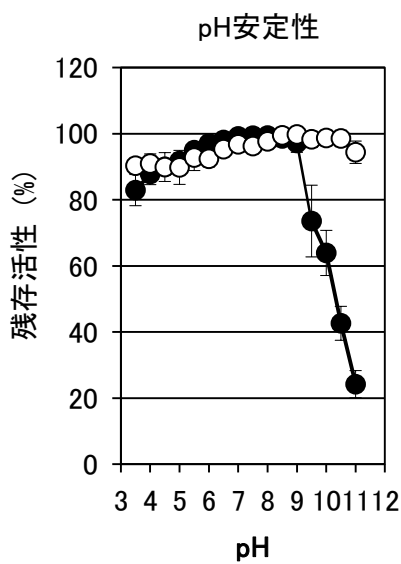
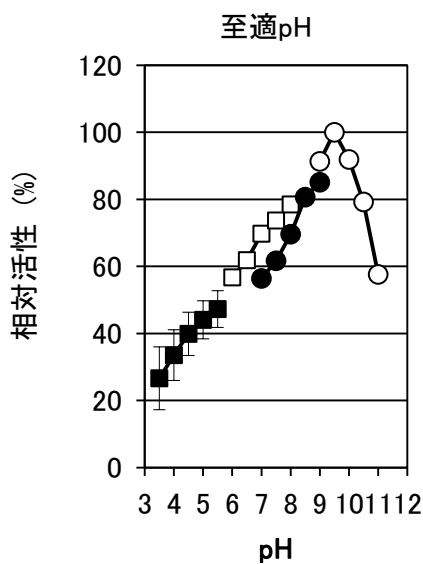


図2-11-1 AsGahAタンパク質の諸性質

至適pH: 各緩衝液(酢酸ナトリウム緩衝液(■; pH 3.5-5.5)、リン酸ナトリウム緩衝液(□; pH 6.0-8.0)、トリス・塩酸緩衝液(●; pH 7.0-9.0)、炭酸ナトリウム緩衝液(○; pH 9.0-11.0))を用いて活性測定し、最も活性の高かった値を100%とした相対活性を求めた。

pH安定性: 上記の緩衝液を用いて16時間、4°C(○)または30°C(●)でインキュベートした後に活性測定し、最も活性の高かった値を100%とした相対活性を求めた。

至適温度: 反応温度を変えてグルタミナーゼ活性を測定し、最も活性の高かった値を100%とした相対活性を求めた。反応は、pH 7.0(●)とpH 9.5(○)で行った。

耐熱性: 各温度で30分間熱処理した後、基質を添加してグルタミナーゼ活性を測定し、最も活性の高かった値を100%とした相対活性を求めた。反応は、pH 7.0(●)とpH 9.5(○)で行った。

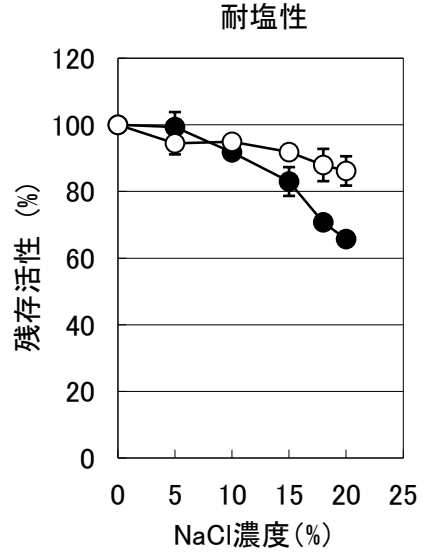
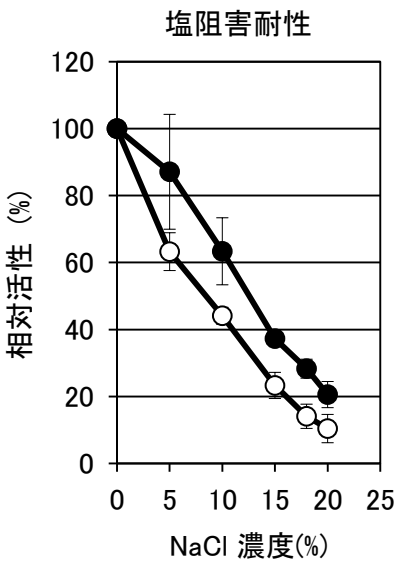


図2-11-2 AsGahAタンパク質の諸性質

塩阻害耐性: 反応系に終濃度が各濃度となるようにNaClを添加してグルタミナーゼ活性を測定した。NaCl 0%の活性値を100%とした相対活性を求めた。精製酵素(○)と菌体懸濁液(●)を用いて測定した。

耐塩性: 各濃度のNaClを含む状態で4°C(○)または30°C(●)で16時間インキュベートした後に、反応系に含まれるNaCl濃度を一定にして、グルタミナーゼ活性を測定した。NaCl 0%の活性値を100%とした相対活性を求めた。

表2-3 AsGahAタンパク質の金属イオンの効果

金属名	相対活性(%)
なし	100
CuCl ₂	87.5 ± 2.9
NaF	94.9 ± 3.7
CoCl ₂	99.9 ± 4.8
CaCl ₂	95.4 ± 4.1
HgCl ₂	45.0 ± 5.2
SnCl ₂	98.4 ± 3.7
MnCl ₂	96.3 ± 1.4
MgCl ₂	98.0 ± 2.4
NiCl ₂	97.4 ± 3.2
ZnCl ₂	97.5 ± 1.1
FeCl ₂	105.4 ± 0.5
FeCl ₃	116.2 ± 10.5

によって著しく反応が阻害された。岩浅らによると CaGahA タンパク質や他のグルタミナーゼも Hg によって阻害されることが報告されている⁴⁸⁾。グルタミナーゼの一般的な性質の一つなのかもしれない。黄麹菌の菌体結合型グルタミナーゼは NaF によって著しく阻害されるという報告がある²⁹⁾。しかし、本酵素では若干の阻害は見られたが、既報ほどの阻害は受けなかった。

基質特異性；*Cryptococcus* 属酵母由来のグルタミナーゼ・アスパラギナーゼと相同性があったことから、予想通り、遊離の L-グルタミンと L-アスパラギンを加水分解した(表 2-4-(A))。また、L 型に比べて反応性は低いものの、D 型の遊離グルタミンおよびアスパラギンも加水分解した。

一方で、遊離の L-グルタミン酸や γ -グルタミル化合物(L- γ -Glu-Leu、L- γ -Glu-Val、グルタチオン(L- γ -Glu-Cys-Gly))には反応せず、アンモニアを検出できなかった。このことから α 位のアミド基には作用しないことが分かった。

さらに、遊離の L-グルタミンと L-アスパラギンだけでなく、グルタミンやアスパラギンを含むペプチドに対しても反応性を示すことが明らかになった。ペプチドに対する k_m 値は、遊離の L-グルタミンや L-アスパラギンより 10 倍以上低く、Cbz-Gln が最も k_{cat}/k_m 値が高かった(表 2-5)。しかし、Cbz-Gln の C 末端に Gly が連結した Cbz-Gln-Gly には、ほとんど反応せず、N 末にグルタミンが位置する Gln-Gly には全く反応性を示さなかった。このことから、AsGahA タンパク質は、ペプチドの内部や N 末端に位置するグルタミンの γ -アミド基への反応性は低く、ペプチドの C 末端に位置するグルタミンに高い反応性を示すことが明らかとなった。どのペプチドを用いた反応液中にも遊離のグルタミン酸が検出されず、アンモニアが検出されることから、ペプチドの状態で脱アミド化されていることが明らかとなった。

Kikuchi らは、*Bacillus circulans* より、ペプチドのグルタミンを脱アミド化する 2 つのタイプのペプチドグルタミナーゼを報告している^{82, 83)}。ペプチドグルタミナーゼ I は、AsGahA タンパク質と同様にペプチドの C 末端に位置するグルタミンを特異的に脱アミド化し、ペプチドグルタミナーゼ II は、ペプチドの N 末端もしくは内部に位置するグルタミンの側鎖を脱アミド化する。しかし、両者とも遊離およびペプチドのアスパラギンには作用せず、AsGahA タンパク質と異なる。また、これらの遺伝子は同定されていない。

AsGahA タンパク質は、アミノ酸配列情報から AS enzymes family に属する。これに属する酵素の中に、ペプチドの C 末端のカルボキシル基(-COOH)にアミド(-NH₂)が結合したペプチドアミド(-CO-NH₂)結合を加水分解するペプチドアミダーゼが含まれる。唯一、諸性質が明らかにされている *Stenotrophomonas maltophilia* 由来のペプチドアミダーゼ (Q8RJN5) と AsGahA タンパク質のアミノ酸同一性は 35%である⁸⁴⁾。このペプチドアミダーゼは、遊離のグルタミンやアスパラギン、およびペプチドの C 末端に位置するグルタミンの γ 位やアスパラギンの β 位のアミド基には作用しない。また、AsGahA タンパク質は、ペプチドアミダーゼの典型的な基質である L-Tyr-Gln-NH₂ に作用しなかった。このことから、AsGahA タンパク

表2-4 AsGahAタンパク質の基質特異性(比活性)の解析

基質	基質特異性 ($\mu \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	
	(A)	(B)
L-Gln	75.2±25	55.9±8.3
L-Gly-Gln	212.3±45	119.6±16.3
L-Ala-Gln	317.3±78	119.2±21.3
L-Leu-Gly-Gln	185.9±20	106.2±14.1
L-Pro-Leu-Gly-Gln	160.5±23	70.6±7.8
Cbz-Gln	236.3±67	72.1±3.1
Cbz-Gln-Gly	0.09±0.01	0.16±0.03
D-Gln	23.1±2.3	9.6±2.9
L-Gln-Gly	n.d.	n.d.
L-Asn	84.0±26	47.4±5.5
L-Gly-Asn	113.5±35	98.5±2.1
L-Leu-Ala-Asn	70.4±26	36.9±1.8
L-Leu-Gly-Asn	119.9±5.0	80.2±7.6
L-Pro-Leu-Gly-Asn	207.1±38	87.9±5.6
D-Asn	0.25±0.03	0.17±0.03
Cbz-Asn	24.7±8.9	22.2±3.4
L-Glu	n.d.	0.3±0.1
Acrylamide	0.18±0.04	1.1±0.1
Acetamide	n.d.	0.1±0.02
L-Gly-Tyr-NH ₂	n.d.	n.d.
L-γ-Glu-Leu	n.d.	n.d.
L-γ-Glu-Val	n.d.	n.d.
L-γ-Glu-Cys-Gly	n.d.	n.d.

各基質を用いてた脱アミド(deamidation)活性(A)と転移(Transferring)活性(B)を測定した。

脱アミド活性は、各基質を用いて、反応により遊離するアンモニアを定量した。転移活性はヒドロキシルアミンへの転移活性をヒドロキサメート法で測定した。n.d.は、検出限界以下を表し、比活性で $0.05 \mu \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 以下のものを検出限界以下とした。活性測定は、独立して4回行った。

表2-5 AsGahAタンパク質の各基質に対する酵素反応速度論的解析

基質	K_m [mM]	k_{cat} [sec ⁻¹]	k_{cat}/K_m [sec ⁻¹ ・mM ⁻¹]
L-Gln	5.22 ± 0.10	489 ± 103	93 ± 21
L-Gly-Gln	0.66 ± 0.12	711 ± 84	1085 ± 74
L-Leu-Gly-Gln	0.43 ± 0.13	751 ± 67	1870 ± 666
L-Pro-Leu-Gly-Gln	0.33 ± 0.08	833 ± 20	2662 ± 786
Cbz-Gln	0.07 ± 0.02	833 ± 63	11986 ± 3014
L-Asn	8.03 ± 0.18	1023 ± 39	127 ± 7
L-Gly-Asn	0.63 ± 0.03	439 ± 46	692 ± 36
L-Leu-Gly-Asn	1.06 ± 0.06	408 ± 56	388 ± 71
L-Pro-Leu-Gly-Asn	0.74 ± 0.19	715 ± 77	991 ± 144

質はペプチドアミダーゼ活性を持たないことが考えられる。さらに、その他のアミダーゼの基質であるアクリルアミド、アセトアミドにも作用しなかった。

次にヒドロキシルアミン存在下で AsGahA タンパク質を反応させ、各基質との間でヒドロキサム酸を形成する転移活性の有無を調べた(表 2-4-B)。その結果、反応性(基質特異性)は、アンモニアを測定した加水分解活性の結果とほぼ一致した。この転移活性は、一部のグルタミナーゼにも報告されるが⁸⁵⁾、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性としてよく知られる⁸⁶⁾。しかし、AsGahA は、(1)上述したグルタチオンなどの γ -グルタミル化合物に反応しない、(2)L-Gly-Gly の有無に関わらず、 γ -glutamyl - *p*-NA に反応しない、(3)グルタミンとバリンもしくはロイシン存在下で AsGahA タンパク質を反応させても、 γ -グルタミル化合物が得られなかったことから(データ未掲載)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性はないと考えられる。

次にペプチドやタンパク質に内在のグルタミンを脱アミド化する酵素としてトランスグルタミナーゼやプロテイングルタミナーゼがある^{87, 88)}。しかし、AsGahA タンパク質は、これらの基質である Cbz-Gln-Gly と、ヒドロキシルアミンの有無に関わらずほとんど反応しなかった。以上の結果から、AsGahA タンパク質は、遊離のグルタミンおよびペプチドの C 末端に位置するグルタミンの γ -アミド結合および遊離のアスパラギンおよびペプチドの C 末端に位置するアスパラギンの β -アミド結合を加水分解する新規なペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼであると結論付けた。

(5) AsGahA タンパク質の局在性

上記(2)に記載した通り、AsGahA タンパク質は液体培養では菌体表面に局在性を示した。次に、固体培養での局在性を調べた。AoOE_AsgahA 株をしょうゆ麹様培地で培養し、分泌型(菌体外)と菌体結合型のグルタミナーゼ活性を測定した。その結果、分泌型のグルタミナーゼ活性が菌体結合型のグルタミナーゼ活性と比較して約 6 倍高かった(表 2-6)。このことから、AsGahA タンパク質は、液体培養では菌体表面に結合するが、固体培養では、菌体外(分泌型)に局在性を示すことが示唆された。しかし、Ao_pMAP 株と AoOE_AsgahA 株の菌体結合型グルタミナーゼ活性を比較すると、AoOE_AsgahA 株は Ao_pMAP 株より 20 倍以上活性が高い。菌体結合型グルタミナーゼ画分を得るために、何度も菌体(麹)の洗浄を繰り返しているため、洗いきれていない分泌型のグルタミナーゼが反応系に混入したとは考えにくい。このことから、主に分泌型として局在性を示す AsGahA タンパク質の一部が、固体培養においても菌体表面に結合していると考えられる。

抗 AsGahA タンパク質抗体を用いて、固体培養抽出液のウェスタン解析を行った結果、ブロードなバンドとして検出された(図 2-12(A))。しかし、脱糖鎖処理して、ウェスタン解析をすると、このブロードなバンドは消失し、一つのメインバンドといくつかのマイナーバンドが検出された(図 2-12(A))。このブロードなバンドを示したのは、AsGahA タンパク質への多様な糖鎖付加によるものと考えられる。

表2-6 固体培養におけるAsGahAタンパク質の局在性の比較

菌株名	グルタミナーゼ活性 (U/g 麴)	
	分泌型	菌体結合型
Ao_pMAP	0.47 ± 0.01	0.11 ± 0.07
AoOE_AsgahA	17.90 ± 3.77	2.98 ± 0.93

各菌株を用いてしょうゆ麴を作製し、水抽出液画分を分泌型(菌体外)とし、残った残渣画分を8回洗浄し、菌体結合型としてそれぞれのグルタミナーゼ活性を測定した。

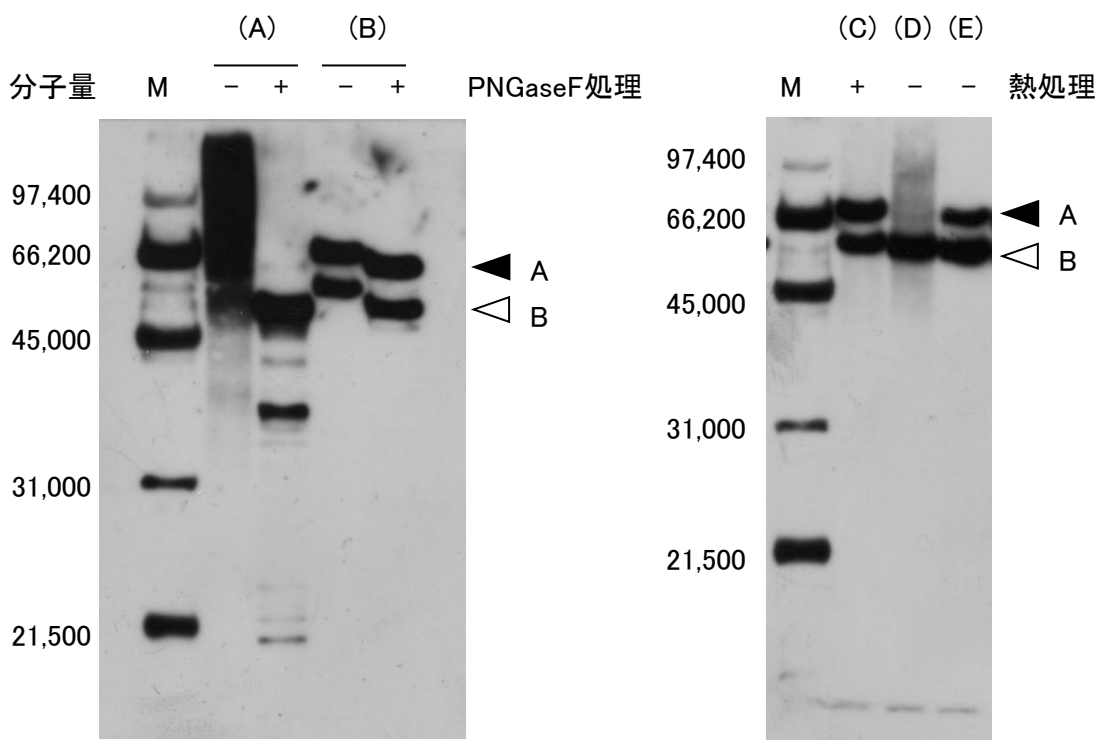


図2-12 固体培養と液体培養でのAsGahAタンパク質の糖鎖付加の相違

AoOE_AsgahA株を2日間培養したしょうゆ麹様培地に20mMリン酸緩衝液(pH 7.0)を添加して抽出した抽出液(A)と液体培養した菌体から精製したAsGahAタンパク質(B)を脱糖鎖処理をしてSDS-PAGEで分離した。その後、抗AsGahA抗体を用いてウェスタン解析を行った。

(C) 精製AsGahAタンパク質に*A. oryzae* RIB40株を2日間培養したしょうゆ麹様培地抽出液を10分間、煮沸させた後に、*in vitro*で作用させた、(D) *A. oryzae* RIB40株のしょうゆ麹様培地抽出液を用いて、*in vitro*で作用させた、(E) 10倍希釈した*A. oryzae* RIB40株のしょうゆ麹様培地抽出液を用いて、*in vitro*で作用させた。抽出液と精製AsGahAタンパク質とは30°Cで16h反応させた後に、SDS-PAGEにてタンパク質を分離し、抗AsGahAタンパク質抗体を用いてウェスタン解析を行った。ポリペプチドAとBはそれぞれ黒と白の矢印で示している。

一方、液体培養から精製した AsGahA タンパク質を同様にウェスタン解析すると、2本のメインバンドが検出され、脱糖鎖処理するとバンドの移動度が僅かに変化した(図 2-12(B))。このことから、AsGahA タンパク質は糖鎖付加タンパク質であるが、固体培養では液体培養よりも多くの糖鎖が付加されていることが推定される。固体培養抽出液を脱糖鎖処理し、ウェスタン解析して得られるメインバンドは、精製した AsGahA タンパク質を脱糖鎖処理して得られる下のバンド(ポリペプチド B に相当する)と同じ分子量を示した。精製した AsGahA タンパク質をしょうゆ麴抽出液(タンパク質分解酵素を含む)で処理すると、上のバンドが消失したが、下のバンドは変化せず、ややシグナル強度が増加(バンドが太くなった)し、タンパク質の部分分解を受けた(図 2-12(D、E))。

一方、熱処理した(タンパク質分解酵素を失活させた)しょうゆ麴抽出液で処理しても、バンドの変化は見られなかった(図 2-12(C))。また、精製する際に菌体から遊離させるために使用した 3 mg/ml Yatalase 溶液を作用させても、タンパク質の部分分解は見られなかった。以上の結果から、AsGahA タンパク質は大きいポリペプチド A として生産され、その後、黄麴菌の生産するプロテアーゼによって部分分解を受けて、ポリペプチド B として安定的に存在することが示唆された。

以上の結果および推察から、AsGahA タンパク質の局在について以下のモデルを考えている(図 2-13)。

AsGahA タンパク質は、ポリペプチド A の 2 量体として生成され、菌体表面に一度ゆるく結合される。その後、黄麴菌自身の生産するタンパク質分解酵素によって部分分解を受け、菌体から遊離する。この時、固体培養に比べて液体培養は、タンパク質分解酵素が拡散され易いため、タンパク質分解酵素による部分分解を受けにくい。一方、水分量が低い固体培養では局所的にタンパク質分解酵素の濃度が高くなる。そのため、部分分解を受けやすくなり、遊離量が多くなる。従って、液体培養では菌体結合型、固体培養では分泌型の局在性を示したのではないかと考えている。*Cryptococcus* 属酵母由来の CaGahA タンパク質および CnGahA タンパク質も菌体結合型のグルタミナーゼである(第 1 章)。これらが含まれる GAH サブファミリーのタンパク質は、N 末領域の長さがそれぞれ異なり、予測される局在性も異なる。N 末領域は、酵素の局在性に関わっているのかもしれない。

AsGahA タンパク質は、これまでに報告されている黄麴菌のグルタミナーゼとは酵素学的にも異なる新規なグルタミナーゼであると言える。しかし、粗酵素液を含め数多く報告されている黄麴菌のグルタミナーゼは、しょうゆ麴や一般的な富栄養培地で主に発現(存在)しているものであると推察される。このことから、しょうゆ麴や一般的な富栄養培地での本酵素の発現量は少ないのかもしれない。少なくとも主に発現しているグルタミナーゼではないのだろう。しかし、発現量が低いからといって、必ずしもしょうゆ醸造中で作用していないとは限らない。本酵素がしょうゆ中で働くか否かについては、本遺伝子の破壊株を用いてしょうゆの試験醸造を行った第 4 章で議論する。

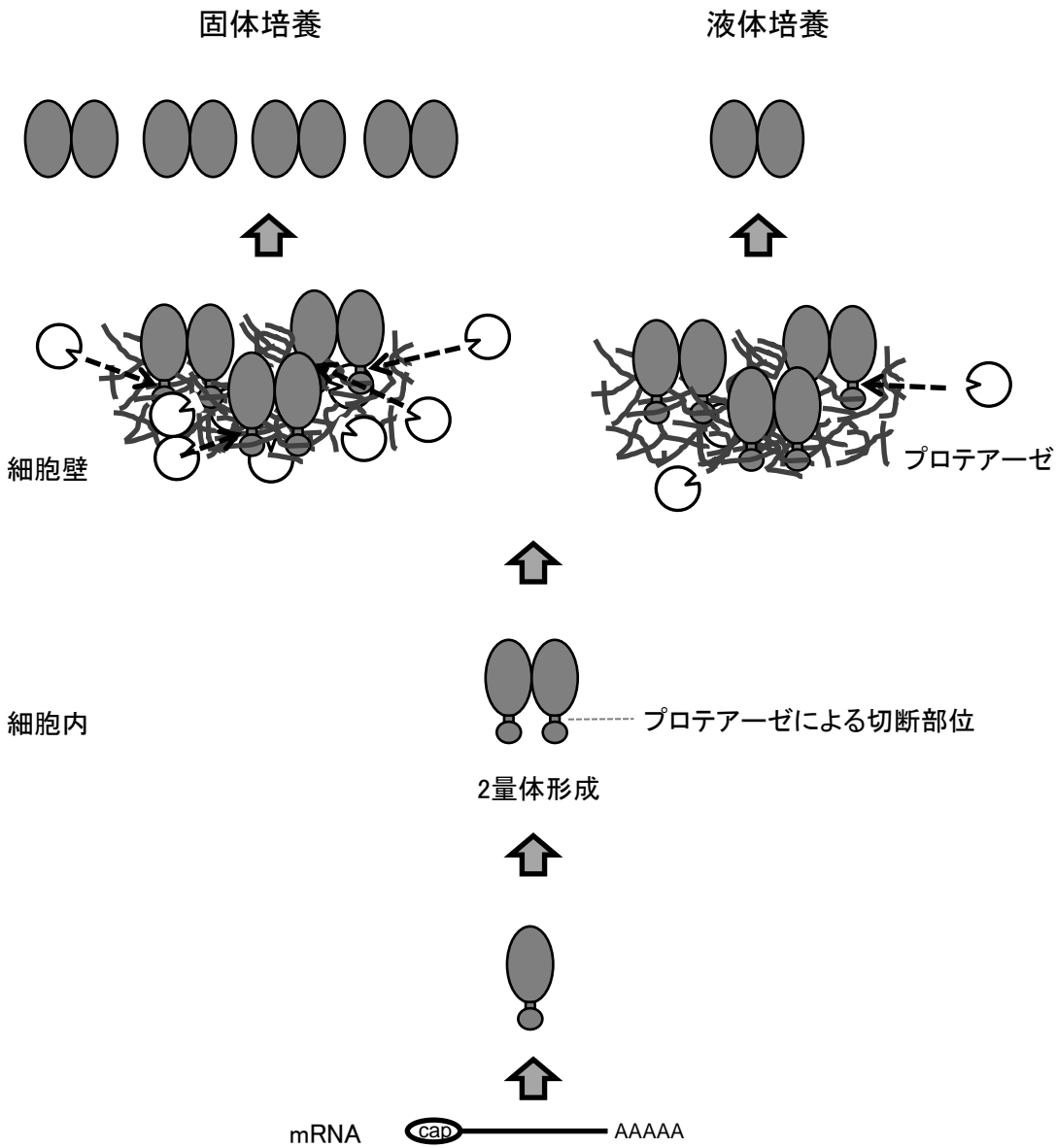


図2-13 固体培養と液体培養でのAsGahAタンパク質の局在性のモデル(仮説)
 mRNAからタンパク質が翻訳された後に2量体を形成し、菌体外に分泌される。菌体外では、細胞壁と相互作用し、一時的に菌体表面に結合する。麹菌の生産するプロテアーゼ(タンパク質分解酵素)により、AsGahAタンパク質が部分分解を受け、細胞壁から遊離する。部分分解を受けやすい領域が存在するのかもしれない。固体培養では、水分含量が少ないため、菌体周辺にプロテアーゼが多く存在し、AsGahAタンパク質が部分分解を受けやすいため、遊離量が多い。一方、液体培養では、プロテアーゼが拡散するため、菌体周辺のプロテアーゼの存在量は少なく、結果的にAsGahAがあまり部分分解を受けず、菌体表面に留まる量が多くなる。

第3章 しょうゆ麴で主要なグルタミンナーゼ活性を示す黄麴菌グルタミンナーゼ遺伝子の同定と解析

【はじめに】

黄麴菌のグルタミンナーゼはしょうゆのうま味の主体であるグルタミン酸を生成する上で鍵となる重要な酵素である。そのため、古くから様々な研究機関で、タンパク質の精製や遺伝子の単離が行われている。序章で記載したとおり、異なる研究機関から複数のグルタミンナーゼ活性をもつタンパク質が黄麴菌より精製され、遺伝子が単離されている^{34, 37, 40}。

それぞれの研究機関が、自分達の単離したグルタミンナーゼがしょうゆ醸造で機能する真(本物)のタンパク質(遺伝子)であると主張しているが、タンパク質や遺伝子由来のグルタミンナーゼ活性を確認しているだけで、しょうゆ醸造で直接的な効果を確認しているわけではない。そのため、しょうゆ醸造で真に機能するグルタミンナーゼがどれなのかは未だ不明のままである。

黄麴菌 *A. oryzae* RIB40 株のゲノム情報が開示されたことにより、黄麴菌のグルタミンナーゼを明らかにする方法として、従来のタンパク質側からのアプローチに加え、黄麴菌のゲノム配列情報を活用した *in silico* でのアプローチが可能となった。前章では、第1章で筆者らが見出した *Cryptococcus* 属酵母由来の新規な耐塩性グルタミンナーゼと相同性のある遺伝子を黄麴菌 *A. oryzae* RIB40 株のゲノム配列の中から探索した。その結果、*A. oryzae* RIB40 株には、4つのホモログ遺伝子(*AogahA*, *AogahB*, *AogahC*, *AogahD*)が存在することを明らかにした。その内の一つである *AogahA* 遺伝子が *A. oryzae* RIB40 株の EST (Expressed Sequence Tag) データベースより炭素源飢餓液体培養で発現していることを見出した。そこで、そのオルソログ遺伝子を *A. sojae* から単離して、グルタミンナーゼ活性を有する酵素であることを明らかにした。この結果は、遺伝子側からのアプローチにより、黄麴菌のゲノム配列中に存在する新規なグルタミンナーゼを単離同定する手法が有効であることを示した。

2006年、非相同性組換え修復に関わる *ku70* 遺伝子を破壊すると相同組換え効率が著しく向上することが発見され⁷³、黄麴菌における遺伝子破壊解析が飛躍的に進歩した。この技術を利用し、黄麴菌のゲノム配列中に存在する複数のグルタミンナーゼ遺伝子を破壊することが可能である。そして、それら破壊株の中にグルタミンナーゼ活性が著しく低下するものがあれば、しょうゆ醸造で働くグルタミンナーゼである可能性が高いと考えられる。

本章では、黄麴菌のゲノム配列中に存在するグルタミンナーゼ遺伝子を明らかにし、その中からしょうゆ麴における主要なグルタミンナーゼ活性を示す遺伝子を特定することを目的にした。黄麴菌 *A. oryzae* RIB40 株および2011年に報告された *A. sojae* NBRC4239 株のゲノム情報を利用して、*Cryptococcus* 属酵母由来を含め既知のグルタミンナーゼ遺伝子配列との相同性検索から、それぞれのゲノム配列中に存在するグルタミンナーゼ遺伝子を同定した。続いて、*ku70* 遺伝子破壊株を宿主に用いて、各グルタミンナーゼ遺伝子破壊株を作製した。それら遺伝子破壊株のグルタミンナーゼ活性を測定した結果、しょうゆ麴における主要

なグルタミナーゼ活性を示すタンパク質遺伝子 (*gahB* 遺伝子) を特定した。さらに、この *gahB* 遺伝子を黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 株で大量に発現させ、タンパク質を精製して、諸性質を決定した。AsGahB タンパク質は、第 2 章で解析した AsGahA タンパク質と同様に、ペプチドグルタミナーゼ活性を保持していたが、その基質特性は AsGahA タンパク質と異なっていた。過去の知見では、黄麹菌のグルタミナーゼのうち、しょうゆ醸造に関与するのは菌体結合型のグルタミナーゼであることから、タンパク質の局在性についても検証した。

【実験方法】

(1) 実験に使用した培地

酵母における組み換えタンパク質発現に用いた SD-U 培地、SR-U 培地、SRG-U 培地は、第 1 章と同様に調製した。黄麹菌 *A. oryzae* 株および *A. sojae* の培養に用いたフスマ麹培地、しょうゆ麹様培地、PD 培地、DPY 培地、Cz 最少培地は第 2 章と同様に調製した。

Cz-5FOA 培地は、Cz 最少培地に終濃度が 3 mg/ml および 10 mM となるように 5-フルオロオロチン酸 (5FOA) とウリジンを加えた。5FOA は、ウラシルのアナログであり、Orotidine-5'-Phosphate (OMP) Decarboxylase (*pyrG* 遺伝子) を合成する細胞に対してのみ致死作用を示す。*pyrG* 遺伝子が欠損している、5FOA は代謝されない、致死にならず耐性を示すが、ウラシルを合成できなくなるので、この株はウラシル(ウリジン)要求性となる。すなわち、*pyrG* 遺伝子の有無によるポジティブ・ネガティブセレクションが可能となる。

Cz- KClO₃培地は、Cz最少培地に終濃度470 mMおよび10 mMとなるように塩素酸カリウム (KClO₃) とグルタミン酸ナトリウムを加えた。硝酸は透過タンパクにより菌体内に取り込まれた後、*niaD*遺伝子にコードされる硝酸還元酵素により亜硝酸に、続いて *niaA*遺伝子にコードされる亜硝酸還元酵素によりアンモニウムにまで還元され、窒素源として利用される。硝酸のアナログであるKClO₃は、菌体内に取り込まれて還元されると毒性を示す。そのため、野生株は生育できず、KClO₃耐性株として*niaD*株が取得できる。*niaD*株は、硝酸のみを単一窒素源として利用できないため、窒素源としてグルタミン酸ナトリウムを添加している。

(2) 実験に使用した株

グルタミナーゼ遺伝子の単離、発現および酵素精製に使用した宿主株、プラスミドの調製に使用した菌株は、第 1 章および第 2 章と同様のものを使用した。

グルタミナーゼ遺伝子破壊用の宿主には、*A. oryzae* AoXKu70::ptrA 株 ($\Delta pyrG$, $\Delta ku70::ptr1^+$)⁸⁹ と、*A. sojae* NBRC4241 株由来の *A. sojae* BM-7 株 (*pyrG*, *niaD*, $\Delta ku70::niaD$) を使用し、AoXKu70::ptrA/P 株 (*pyrG*, $\Delta ku70::ptr1^+$) および *A. sojae* KuP8 株 (*pyrG*, $\Delta ku70::pyrG$) をグルタミナーゼ活性測定の対照株として使用した。

A. sojae BM-7 株および KuP8 株は、下記の通りに作製した。0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液に懸濁した *A. sojae* NBRC4241 株由来の分生子に UV 照射し、10⁶ 個/プレートとなるように Cz-5FOA 培地に塗布した。生育してきた耐性株について、Cz-5FOA 培地で単分生子分離を 3 回繰り返して核純化させた後、ウラシル要求性を確認した。核純化後、*A. sojae* NBRC4241 由来の *pyrG* 遺伝子を導入し、*pyrG* 遺伝子で相補されることを確認した。

続いて、このウラシル要求性を示した 5FOA 耐性株の分生子を 10⁶ 個/プレートとなるように 10 mM のウリジンを加えた Cz- KClO₃培地に塗布した。自然変異により得られた耐性株について、同培地で単分生子分離を 3 回繰り返して核純化させた後、硝酸要求性を確認した。

得られたウラシルおよび硝酸の 2 重栄養要求性株を、*niaD* 遺伝子を選択マーカー遺伝子として持つ *ku70* 遺伝子破壊カセットを用いて形質転換し、10 mM のウリジンを加えた Cz 最少培地に生育してきた形質転換体を宿主株 *A. sojae* BM-7 株とした。KuP8 株は、上記で得られた *A. sojae* NBRC4241 由来のウラシル要求性株を、*pyrG* 遺伝子を選択マーカー遺伝子として持つ *ku70* 遺伝子破壊カセットを用いて形質転換した。

AoXKu70::ptrA/P(*pyrG*⁺, $\Delta ku70::ptr1^+$) 株は、*A. oryzae* AoXKu70::ptrA より小川ら⁸⁹⁾と同様に、AspyrG2522_F と AspyrG4359_R のプライマーセットで PCR により増幅した *pyrG* 遺伝子断片を導入して取得した。尚、AoXKu70::ptrA 株は(公財)野田産業科学研究所より分譲して頂いた。

タンパク質部分分解解析に用いた $\Delta alpA$ (A0090003001036) 株 ($\Delta pyrG$, $\Delta alpA::pyrG^+$, $\Delta ku70::ptr1^+$)、 $\Delta alpB$ (A0090020000517) 株 ($\Delta pyrG$, $\Delta alpB::pyrG^+$, $\Delta ku70::ptr1^+$)、 $\Delta aor I$ (A0090026000083) 株 ($\Delta pyrG$, $\Delta aor I::pyrG^+$, $\Delta ku70::ptr1^+$) および $\Delta aor II$ (A0090023000263) 株 ($\Delta pyrG$, $\Delta aor II::pyrG^+$, $\Delta ku70::ptr1^+$) は、*A. oryzae* AoXKu70::ptrA 株より作製したものを(公財)野田産業科学研究所より分譲して頂いた。

(3) DNA、RNA 操作

染色体 DNA および全 RNA の抽出は、第 2 章と同様に行った。ただし、全 RNA の抽出は、*A. oryzae* RIB40 株の分生子 10^6 個をフスマ培地に接種し、48 時間培養した菌体から抽出した。遺伝子のクローニングおよび遺伝子破壊のための PCR には、それぞれ Ex-taq polymerase(タカラバイオ)および KOD-plus(東洋紡)を用いた。本研究で用いたプライマーを表 3-1 に示す。塩基配列は GenomeLab DTCS-Quick Start Kit と DNA シークエンサー GEQ2000(共にベックマン・コールタール)で確認した。塩基配列の確認には、ユニバーサルプライマー-M13-Forward primer と M13-Reverse primer を用いた。

(4) プラスミド

pCR2.1-TOPO ベクター(インビトロジェン)および pTA2(東洋紡)は遺伝子のクローニングに使用した。酵母におけるタンパク質発現解析には、pYES2.1/V5-His-TOPO(インビトロジェン)を、黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 株におけるタンパク質発現解析には、pMAP ベクター(第 2 章参照)を用いた。

(5) cDNA のクローニング

AogahB, *AogahC*, *AogahD* の cDNA クローニングで用いた全 RNA 画分は、フスマ培地で 48 時間培養した *A. oryzae* RIB40 株の菌体より調製した。5'-RACE および 3'-RACE は、Marathon-Ready cDNA Amplification kit(クロンテック)を用いて行った。また、5'-RACE には、First Choice RLM-RACE Kit(アンピオン)、および 3' RACE には、3'-Full RACE Core Set(タカラバイオ)も併用した。

表3-1-1 実験に使用したプライマーリスト

Primer name	Oligonucleotide sequence (5'→3')
Primers used for 5' and 3' RACE	
AogahB_5'RACE_as	AGAATATAATCTCGAGCCCGCAGAAACAGG
AogahB_5'RACE_nas	ATTGTCAAACCTGGTGC AAAGCTTCGCTGCC
AogahB_3'RACE_s	TCTCACAGCAAC TGGGACGAGTCCAC
AogahB_3'RACE_ns	GCTTCTTCGCAGACTACGCCCATC
AogahC_5'RACE_as	AGATAGCTTCGCGAAAGATGTCGCATCC
AogahC_5'RACE_nas	CATTCTCGGTCCGAGGTCCAAGCAGTTGTG
AogahC_3'RACE_s	ACACAACCTGCTTGGACCTCGGACCGAGAATG
AogahC_3'RACE_ns	CTTGAGCACGCTCTTGAATGGGCTGG
AogahD_5'RACE_as	CCTTGGCAAACCTGGCCCATTGCGCCGGATC
AogahD_5'RACE_nas	AAGCATACCCTGCAGCGTGTATCCCTG
AogahD_3'RACE_s	TGCCGGCAATACCAGTGTAACTGCC
AogahD_3'RACE_ns	TGGGTTCCAGATCACGCCTGTTGCCAACAG
Primers used for the gene expression in <i>S. cerevisiae</i>	
AogahB_pYESTOPO_F	AAAGAGCTCAAATGCTCTCCTCTGTTCTCCTTG
AogahB_pYESTOPO_R	AGAATATAATCTCGAGCCCGCAGAAACAGG
AogahC_pYESTOPO_F	ACCATGGCTGCCCGACTGTCTGCCCTCGATC
AogahC_pYESTOPO_R	AAAGTCACCTCTCAGCGGTAGTTGCGCAG
AogahD_pYESTOPO_F	CCAACATGGTTTCGTGGAAGCAAAC
AogahD_pYESTOPO_R	AAATGCCTGCTTGCAGTCTTAACGGCCTG
Primers used for the gene expression in <i>A. oryzae</i>	
AsgahB pAP_Clone_F	AAAGAATTCATGCTCTCCTCTGTCTCCTCGTCTCTTCTC
AsgahB pAP_Clone_R	TACCCCGGGTTAAGAATATAACCTCGAGCCCGCAGAAACAG
Primers used for the gene disruption	
AsgahA disrupt_F1	TCCAGGACAGGCAGAGCGATGAATGGCAATCC
AsgahA disrupt_R1	TAGCAATAAGCCCAATCACCCCTCATTTTGAATGCTGCCGATCT
AsgahA disrupt_F2	TCAAAAATGAGGGTGATTGGGCTTATTGCTATGTCCCTGAA
AsgahA disrupt_R2	TGGAGTGTTAAAGTGACCGCACCTCAGAAGAAAAGGATGA
AsgahA disrupt_F3	CTTCTGAGGTGCGGTCACTTTAACTCCAAGACAACCGTAGA
AsgahA disrupt_R3	CCGCCTTTCATCGGATGCAGTACGAGAGGCTGGGAA
AsgahA disrupt_F4	GTA CTGCATACCGATGAAGAGGCGGTATCAAGCTAGGGT
AsgahA disrupt_R4	CCCCAGTACTCGATATGCC TTTCTGTGCTTCT
AsgahD Left_F1	AGTCATGGGAGGGGTTGAGCTTATCTAGAACGTTG
AsgahD Left_R1P	TAGCAATAAGCCCAATGCAACTTCTGATTGCAGAAATCGG
AsgahD Right_F1P	TCTTCTGAGGTGCGGACGACAACTGAATGGGACAGACTGAC
AsgahD Right_R1	GGGGAGCGCGATACATTAGGTACTCAGCAACATGGACCTCT
AsgahD Nest_F1	GGAATAAACGACCAATCGGGGTTAGG
AsgahD Nest_R1	CGAATGGTACTGATTTCCCGATCACTC
AsggtA Left_F1	CTCTATCTGACGGAGACGTACATCACCT
AsggtA Left_R1P	TAGCAATAAGCCCAACCAAGGTCACCAACTAGGTACTGCTAC
AsggtA Right_F1P	TCTTCTGAGGTGCGGGGTCCTAACCTTGTTACTTCGCTGATG
AsggtA Right_R1	CCCGTCGCACATCACTTATAAACCTG
AsggtA Nest_F1	TGCGAGAGAAGTAAATCAGGACATTTGGG
AsggtA Nest_R1	CGCAGGCATCGACATCAATCACAGA
AsggtC Left_F1	CAGATGAATTTGGCTCGGTTTCTAGAGTTGG
AsggtC Left_R1P	TAGCAATAAGCCCAAGCTAGCAAACCAAAGAGGGGTAACCTTGC
AsggtC Right_F1P	CTTCTGAGGTGCGGCAACTCATTTGCAAACGCCCTCACT
AsggtC Right_R1	ACAAGAAGCCAATGGGAACAACAGTACAAGCAACT
AsggtC Nest_F1	TGCAATGCAATAGGTATCTGACCTAGCTGT
AsggtC Nest_R1	TCACGGCCTATACGGGGAACAAGG
AsggtD Left_F1	AATACCGAACCAGACGCAAAGTGG
AsggtD Left_R1P	GACATAGCAATAAGCCCAAGAAGTCGGGGTTCAGTCTGGAGTAG
AsggtD Right_F1P	TCC TTTTCTTCTGAGGTGCGGTGGAATGGCTATTCCGGTCTGT
AsggtD Right_R1	CCTTTCGTGACCTACGTCACTTACGAGA
AsggtD Nest_F1	CTGGTTCCCTAGTGTTCGTACGGATAG
AsggtD Nest_R1	AATCTTACGGCAGCTAGCTCTACAGAGTGA

表3-1-2 実験に使用したプライマーリスト

Primer name	Oligonucleotide sequence (5'→3')
Primers used for the gene disruption	
AsgtaA Left_F1	TACTAGAATCAAGCGGTCAGCCAGTACGAC
AsgtaA Left_R1P	GCAATAAGCCCAAGACAATTCAGGAGGGACTATGGAAGTTTAGCAC
AsgtaA Right_F1P	TTCTGAGGTGCGGTTACCATGGCTATGAGACCAAATTGACCGTTGTT
AsgtaA Right_R1	GGTGAACCATTTGACGACCTCGACGTT
AsgtaA Nest_F1	GGTGAACCAAGTGATGCTTGTGTCCCTT
AsgtaA Nest_R1	CGAGGATGCAGTTTGGACGCGGTTT
AsgtaB Left_F1	GTGTAGTCGGGTACATTCCGGAGATTATTGGG
AsgtaB Left_R1P	AGCAATAAGCCCAATCGGATTGATCACGAGTGATAGGTAAGCGA
AsgtaB Right_F1P	CTTCTGAGGTGCGGAGTTTACCGGGTATGAATCCGAAAGGATAG
AsgtaB Right_R1	CGGCATGCATACCATCAACGAGAA
AsgtaB Nest_F1	TGCGCAACATGTGGCCCTTCTGAC
AsgtaB Nest_R1	ACAATCGACTCGTCCGCTCCCCATT
AsgtaC Left_F1	AGATGTCTGTCCACAAGCTCAAAGTCGGTATGGCTGGTCT
AsgtaC Left_R1P	TAGCAATAAGCCCAAGGAGCCAGATCACATCCACGCGGCAGTT
AsgtaC Right_F1P	CTTCTGAGGTGCGGGAGTCCGTTGCCATATATTAGATACGAGA
AsgtaC Right_R1	GCTGTGTCAATTAGCTCACCCATTTGCGAGT
AsgtaC Nest_F1	ACCAACCCCTAGCGCAACTTCGTCAA
AsgtaC Nest_R1	GCAGACGAAGCTTGACACCACCTATATCCAGT
Asgls Left_F1	GTAGCGGTGGAGTGGTGAAGATTTGGTTTCAG
Asgls Left_R1P	CAATAAGCCCAAGGACTAAATTTTCGACGCTAGCTTAC
Asgls Right_F1P	CTTCTGAGGTGCGGCTCGTTGTTTGAAGAAACCCGTGAAC TG
Asgls Right_R1	TTGATCGGTAAGTAACTAAATCCAACCTGTGCACT
Asgls Nest_F1	GCACCTTTGCTAAGGACCACTTACTCC
Asgls Nest_R1	CGACCGTGGGTTATGCTTTGTTAGCC
AsgahB Left_F1	CCGAAATGCATAGCCGCGCTTTACCTGAAGCGT
AsgahB Left_R1P	TAGCAATAAGCCCAAGGATCATGGCAAATGCCGAAGAAATAGGGA
AsgahB Right_F1P	CTTCTGAGGTGCGGACACTCGACTCAGTGAGAAGACAGTTTCC
AsgahB Right_R1	GCATTGGCATCTGGGGAAGTTCGTACAGC
AsgahB Nest_F1	GCAGGTGTA CTGGTGGAGATTCCGG
AsgahB Nest_R1	CAGAAGCTTTCAGGAAGGTATGAGAA TTA CTTAACGG
AsPyrG2522_F	TTGGGCTTATTGCTATGTCCCTGAA
AsPyrG4359_R	CCGCACCTCAGAAGAAAAGGATGA
AogahB Left_F1	CTTTAGTCGGGCAACATACTCTCTTTGGTC
AogahB Left_R1P	TAGCAATAAGCCCAATTTATTGACTTGGCGTTTCATTGTCTGTGTG
AogahB Right_F1P	TCTTCTGAGGTGCGGAGTAAGCTGTGCAATGACAAAAGACTCTG
AogahB Right_R1	CCAAAGTACTACGCTCAATTCAAAAGCAAC
AogahB Nest_F1	CAGTAAAAGTTCCGGTAGCTCAGGAACGAG
AogahB Nest_R1	ACACACTGCAATACGGTGAATGCTACA
AopyrG_407F	TTGGGCTTATTGCTATGTCCCTGAA
AopyrG_1433R	CTGCACCTCAGAAGAAAAGGATGA
Asku70Left_F1	ACGTAAATCCAGGATCGCTAGAGG
Asku70Left_R1N	CACATCCGATCATGGAGCTTACCATGTTAGCCTCCAAAGCTTTTAGGTTG
Asku70Right_F1N	CACGTTTCGAGGATGCCAGATAGGTGGAGACAGACGAGCAAGGT
Asku70Right_R1	AGTTCCCGTATTTGTCCACGGGTAA
AsNiaD_273F	TGGTAAGCTCCATGATCGGATGTG
AsNiaD_5403R	TATCTGGGCATCCTCGAAACGTTG
0325Nest_F1	CCGCCGAAGCCTAACATATACAAGAG
Asku70Left_F1	ACGTAAATCCAGGATCGCTAGAGG
Asku70Left_R1P	TTCAGGGACATAGCAATAAGCCCAATGTTAGCCTCCAAAGCTTTTAGGTTG
Asku70Right_F1P	TCATCCTTTTCTTCTGAGGTGCGGAGGTGGAGACAGACGAGCAAGGT
Asku70Right_R1	AGTTCCCGTATTTGTCCACGGGTAA
Asku70Nest_F2	TGGGAATAACCAAAAGACCTGGTCAA
Asku70Nest_R2	CTGTGGGGATTCTCACTTTTCGACA

AsgahB 遺伝子の完全長 ORF は、次のようにして得た。*A. sojae* NBRC4241 の染色体 DNA を鋳型に、*AsgahB_pAP_Clone_F* と *AsgahB_pAP_Clone_R* をプライマーに用いて PCR により増幅させた DNA 断片を pCR2.1-TOPO ベクターにクローニングして、配列を確認した。配列確認後、制限酵素 *EcoR* I と *Sma* I 処理して、アガロースゲル電気泳動法により目的の大きさの DNA 断片を切り出し精製し、同制限酵素処理した黄麹菌発現ベクター-pMAP ベクターと連結させた。DNA 断片の精製には、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン)を用いた。得られたプラスミドを用いて、黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 RP-1 株を定法に従って、形質転換した。*AogahB*、*AogahC*、*AogahD* については、3' -RACE 法で得られた cDNA を鋳型に、X-pYESTOPO-F と X-pYESTOPO-R (X は、例えば *AogahB* などの遺伝子名を表す。)のプライマーを用いて PCR により DNA を増幅させ、pYES2.1/V5-His-TOPO に連結した。得られたプラスミドを用いてパン酵母 *S. cerevisiae* INVSc1 株をリチウム酢酸法にて形質転換した。

(6) グルタミンナーゼ遺伝子の発現

上記(5)で得られた黄麹菌の形質転換体は、DPY 培地で、30°C、4 日間培養した。培養後、ミラクロースを用いて菌体と培養上清に分離し、培養上清はさらに 14000 rpm で遠心して、清澄な培養上清を得た。一方、菌体は、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で十分に洗浄した。得られた湿菌体および培養上清を用いて、グルタミンナーゼ活性を測定した。

パン酵母の形質転換体は、SR-U 培地で 30°C、24 時間、前培養し、誘導基質であるガラクトースを含む SRG-U 培地に植菌して、一定時間間隔で菌体を回収した。菌体を破碎した菌体内酵素(細胞内可溶性画分)、菌体破碎時に得られる残渣画分(細胞内不溶性画分)、菌体懸濁液を用いた細胞表面画分および培養上清(細胞外画分)のグルタミンナーゼ活性を測定した。尚、菌体内酵素は、集菌した菌体を 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) で十分に洗浄後、液体窒素で凍結させ、乳鉢と乳棒を用いて菌体を破碎し、破碎菌体をタンパク質抽出緩衝液 (20 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.5)、1 mM EDTA、5 mM MgCl₂、50 mM KCl、5% グリセロール、3 mM DTT、プロテアーゼインヒビターミックス (和光純薬工業) に懸濁後、14000 rpm で 10 分間、遠心して得られる菌体残渣画分を取り除いた画分を用いた。全タンパク質量の定量および SDS-PAGE は第 1 章と同様におこない、ウェスタン解析は、抗 V5 エピトープタグ抗体 (インビトロジェン) と BM Chemiluminescence Western Blotting Kit (ロシュ・ダイアノグノティス) を用いて、添付のプロトコルに従った。

(7) グルタミンナーゼ遺伝子の破壊

グルタミンナーゼ遺伝子および *ku70* 遺伝子の遺伝子破壊カセットは、表 3-1 に記載したプライマーを用いて融合 PCR にて作製した。すなわち、レフトアーム (X-Left_F1 と X-Left_R1P、X は各遺伝子名を表す)、ライトアーム (X-Right_F1P と X-Right_R1) および *pyrG* 遺伝子 (*AopyrG_407F* と *AopyrG_1433R*、*AspyrG2522_F* と *AspyrG4359_R*) は、それぞれ独立に PCR により DNA を増幅 (1st PCR) し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。これ

ら精製した PCR 増幅産物を混合し、プライマーを添加せずに PCR により DNA を増幅 (2ndPCR) し、それぞれの DNA 断片を融合させた。2ndPCR 反応は、アニーリング温度を通常より 5-10°C 低く設定し、サイクル数は 11 サイクルとした。続いて、2ndPCR の DNA 増幅産物を鋳型に Nested PCR 用のプライマーセット (X-Nest_F1 と X-Nest_R1) を用いて、PCR により DNA を増幅し (3rdPCR)、得られた増幅断片を遺伝子破壊カセットとした。グルタミナーゼ遺伝子破壊カセットは、宿主に *pyrG* 遺伝子および *ku70* 遺伝子の 2 重欠損変異株 (BM-7 または *A. oryzae* AoXKu70::ptrA) を用い、*ku70* 遺伝子破壊カセットは、宿主に *A. sojae* NBRC4241 の *niaD* 遺伝子および *pyrG* 遺伝子 2 重栄養要求性変異株 (*pyrG*、*niaD*) または BM-7 を用いた。

(8) グルタミナーゼ活性測定

上記 (6) で得られた湿菌体 (100-200 mg) を用いた測定および精製酵素を用いた標準的な測定は第 2 章と同様に行った。酵母で発現させたグルタミナーゼは、遺伝子発現誘導後、一定時間で回収した菌体を液体窒素で凍結させ、乳鉢と乳棒で破碎した。(6) に記載のタンパク質抽出緩衝液に破碎した菌体を懸濁し、12000 rpm、15 分間遠心して得られる上清を菌体内画分、菌体そのものを用いた画分を菌体表面画分、培養液の培養上清を菌体外画分としてグルタミナーゼ活性を測定した。グルタミナーゼ活性測定は、第 1 章および第 2 章と同様に行った。

グルタミナーゼ遺伝子破壊株の全グルタミナーゼ活性は以下のように測定した。遺伝子破壊株と KuP8 株 (対照株) をしょうゆ麹様培地に植菌し、30°C、4 日間培養した。培養後、20 倍量 (vol/wt) の滅菌水を加えて、良く混合し、室温で 3 時間静置した。十分に水が浸透したしょうゆ麹を、ポリトロンホモジナイザーで粉碎した。この粉碎麹を用いて、第 1 章に記載したヒドロキサメート法でグルタミナーゼ活性を測定した。

菌体結合型グルタミナーゼ活性は、50 ml 容の遠沈管に麹 5 g と 30 ml の 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を加えて、ポリトロンホモジナイザーで粉碎した後、12000 rpm で 10 分間遠心し、上清を除去した。沈殿物を同緩衝液 30 ml にポリトロンホモジナイザーを用いて再懸濁し、12000 rpm で 10 分間遠心して、上清と沈殿物に分離した。この操作を 8 回繰り返して、沈殿物を洗浄し、最終的に 30 ml の同緩衝液で懸濁して酵素液とした。得られた酵素液 1 ml を用いて第 2 章と同様に測定した。

(9) AsGahB タンパク質の精製

AsgahB 遺伝子高発現株を DPY 培地で 30°C、4 日間培養した。得られた湿菌体 (100 g) を 0.02 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) で十分に洗浄後、同緩衝液 500 ml で再懸濁し、水中で冷却させた。十分に冷却した菌体懸濁液は、圧力式ホモジナイザー-LAB1000 (エスエムテー) を用いて、圧力 800 bar で菌体を破碎した。これを 2 回繰り返して、十分に菌体を破碎した。12000 rpm、30 分間、遠心して、菌体破碎残渣を取り除いた。

得られた上清に終濃度 1.0 mM となるように PMSF を加え、さらに終濃度 25% となるように

硫酸アンモニウムを添加した。4°Cで1時間、攪拌後、12000 rpm、30分間、遠心して、沈殿物を除去した。得られた上清に、終濃度80%となるように硫酸アンモニウムを添加し、一晚4°Cで攪拌後、12000 rpm、30分間、遠心して、沈殿物を得た。

得られた沈殿物は、1.0 mMのPMSFおよび2.0 Mの硫酸アンモニウムを含む0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)に再懸濁し、0.45 μ mのMilliporeフィルターに通液後、全量を同緩衝液で平衡化したTOYOPEAL-Butyl 650M カラム(ϕ 2.0 cm x 30 cm)に2.5 ml/min (Econo Pump BioRad 使用)で通液した。通液後、2.0 M硫酸アンモニウム含有0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)で吸光度280 nmがベースラインに戻るまで通液した。溶離液; A液 2.0 M硫酸アンモニウム含有0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)、B液 0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)の条件で、硫酸アンモニウムの2.0 Mから0 Mへの各濃度勾配で流速0.5 ml/minで17時間かけて10倍量の緩衝液で溶出した。

次に、活性画分をセントリプレップYM-10(ミリポア)を用いて、脱塩、濃縮および0.01 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)を用いてバッファー置換を行った後、TSKgel DEAE-5PW(ϕ 7.5 mm x 75 mm)カラムに通液し、溶離液; A液 0.01 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)、B液 1.0 M NaCl 含有0.01 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)の条件で、NaClの0 Mから1.0 Mへの濃度勾配で溶出した。

活性画分をセントリプレップYM-10で濃縮後、TSKgel G3000 SW(東ソー、 ϕ 7.6 mm x 600 mm、2本を連結)カラムに0.25 mlずつ注入し、溶離液; 0.2 M NaCl 含有0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)の条件で溶出し、単純タンパク質として純度の高い活性画分を精製標品とした。

(10) AsGahB タンパク質のN末端および内部アミノ酸配列の決定

精製したAsGahBのアミノ酸配列は、精製酵素2 μ gをSDS-PAGEで分離後、Sequi-Blot PVDF膜(日本バイオラッド)に転写し、クイックCBB染色キットのA溶液を用いて染色した。染色後、目的の大きさのバンドを切り出し、PPSQ-31A(島津製作所)を用いて、エドマン分解法により分析した。尚、PVDF膜への転写処理は、日本エイド一の転写装置を用い、セミドライ法で行った。

(11) 精製酵素の分子量測定および酵素の諸性質の決定

精製酵素の分子量の測定および酵素の諸性質の決定は第2章と同様に行った。尚、AsGahBタンパク質は糖鎖付加タンパク質であり、PNGase Fを用いた脱糖鎖処理後の分子量も測定した。脱糖鎖処理は、第2章と同様に行った。

至適温度および耐熱性については、0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)と0.1 M炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.0)を用いて測定した。また、基質特異性については、L- γ -Glutamyl-p-NA(1.25 mM)以外は各基質濃度を終濃度10 mMとし、0.1 M炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.0)を用いて測定した。尚、希釈失活を防ぐために反応系には、0.01%BSA(タカ

ラバイオ)を加えて反応させた。 K_m および k_{cat} 値は、Lineweaver/Burk-plotにより求めた。分子量は、遺伝子配列から推定されるアミノ酸配列より求め、2量体として計算した。

(12) AsGahB タンパク質の部分分解解析

精製 AsGahB タンパク質および精製 AsGahA タンパク質と黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 株およびそのプロテアーゼ破壊株を用いたフスマ麴抽出液を混合し、*in vitro* で反応させた。

フスマ麴抽出液は、フスマ麴培地に分生子を 10^6 個接種し、 30°C で 5 日間培養した麴に 10 倍量の滅菌水で 4°C 、24 時間抽出した。抽出後、フィルターペーパーNo. 5C (アドバンテック) で麴を除去し、ろ液を $0.45\ \mu\text{m}$ の Millipore フィルター (ミリポア) を通して、滅菌水で 10 倍希釈したものを反応に使用した。

精製 AsGahB タンパク質または精製 AsGahA タンパク質 $1\ \mu\text{g}$ と上記フスマ麴抽出液 $2.5\ \mu\text{l}$ および終濃度 $20\ \text{mM}$ リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を混合し (全量 $5\ \mu\text{l}$)、 30°C で 16 時間反応させた。プロテアーゼ阻害剤を使用する際には $0.5\ \mu\text{l}$ を添加し、全量を $5\ \mu\text{l}$ とした。反応終了後、PNGaseF を作用させて脱糖鎖処理し (全量 $10\ \mu\text{l}$)、SDS-PAGE でタンパク質を分離した。

プロテアーゼ阻害剤としては、プロテアーゼ阻害剤カクテルキットIV カビ・酵母用 (和光純薬工業)、AEBSF (4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride) (ロシュダイアグノシス 終濃度 $1\ \text{mM}$)、E-64 (ロシュダイアグノシス、終濃度 $15\ \mu\text{M}$)、1,10-phenanthroline (和光純薬工業、終濃度 $5\ \text{mM}$)、pepstatin A (ペプチド研究所、終濃度 $20\ \mu\text{M}$) を使用した。フスマ抽出液は 10 分間煮沸して、酵素を失活させたものをネガティブコントロールとして使用した。また、*A. sojae* NBRC4241 株由来のフスマ抽出液の調製も *A. oryzae* RIB40 株と同様に行った。

(13) グルタミナーゼ遺伝子解析

既知のグルタミナーゼ遺伝子およびタンパク質の配列は Uniprot より、*Aspergillus* 属糸状菌由来のグルタミナーゼホモログ遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列は、DOGAN および AspGD より入手した (第 2 章参照)。黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 株の RNA-Seq 情報は、(独) 酒類総合研究所の黄麹菌ゲノムデータベース (<http://nrif21.nrif.go.jp/CFGD/>) より入手した。相同性検索、ドメイン検索、系統樹解析は第 1 章および第 2 章と同様に行った。また、個別のタンパク質 (または遺伝子) と AsGahB タンパク質 (または遺伝子) の相同性検索には、GENETYX (ゼネティックス) をデフォルトプログラムで利用した。

【結果および考察】

(1) 黄麴菌ゲノム中のグルタミンナーゼ遺伝子の同定

黄麴菌 *A. oryzae* のゲノム配列中に存在するグルタミンナーゼ遺伝子の数を調べるために、*A. oryzae* RIB40 株のゲノム配列情報から他生物由来の既知グルタミンナーゼ遺伝子と相同性のある遺伝子を探索した。相同性検索の結果、黄麴菌 *A. oryzae* RIB40 株のゲノム配列中には、そのアミノ酸配列の相同性から 4 つのタイプに分かれて、12 個の遺伝子が存在することが明らかとなった(表 3-2)。Type I は、*Cryptococcus* 属酵母由来の耐塩性を有するグルタミンナーゼ・アスパラギナーゼ、Type II は *B. subtilis* 由来の耐塩性を有する γ -グルタミルトランスペプチダーゼ、Type III は、黄麴菌で初めて同定されたグルタミンナーゼ、Type IV は *Micrococcus luteus* 由来の耐塩性グルタミンナーゼと相同性のある遺伝子であった。Type IV の *gls* 遺伝子以外は複数のホモログ遺伝子が存在した。

2011 年、当社で *A. sojae* NBRC4239 株のゲノム配列の解読に成功し、その配列情報を公開した⁹⁰⁾。このゲノム配列情報を利用し、*A. oryzae* RIB40 株で見出した 12 個のグルタミンナーゼ遺伝子のオルソログ遺伝子を探索した(表 3-2、図 3-1)。5' および 3' UTR を含む ORF 領域について、*A. sojae* と *A. oryzae* を比較した(図 3-1)。*gtaA* 遺伝子のように全領域に渡って類似しているもの、*gahB* 遺伝子のように 5' プロモーター領域が異なっているもの、*gls* 遺伝子のように ORF 領域は高い相同性を示すにも関わらず、5' および 3' 領域の類似性が低いなど様々な違いが見られた。これらの違いは、*A. oryzae* と *A. sojae* でグルタミンナーゼ遺伝子の発現に影響しているのかもしれない。

AogahC 遺伝子のオルソログ遺伝子の ORF 領域には、塩基置換や塩基挿入、欠失が多く見られた。塩基配列から推定されるアミノ酸配列には終止コドンが多数生じ、タンパク質として機能していないと判断した。また、*AoggtB* 遺伝子のオルソログ遺伝子領域は、このオルソログ遺伝子の ORF を含む約 4 kb の領域の欠失が見られ、*A. sojae* にはこの遺伝子が存在しないことが明らかとなった。以上の結果から、黄麴菌 *A. sojae* のゲノム配列中には、*A. oryzae* と同様に 4 つのタイプに分かれて、10 個の遺伝子が存在することが明らかとなった(表 3-2、図 3-1)。

(2) 黄麴菌グルタミンナーゼ遺伝子破壊株を用いた主要なグルタミンナーゼ活性を示す遺伝子の特定

しょうゆ醸造において、黄麴菌由来のグルタミンナーゼ活性としょうゆ諸味中のグルタミン酸濃度との間には正の相関がある。そのため、筆者は、しょうゆ麴で主要な活性を示すグルタミンナーゼ遺伝子を特定できれば、しょうゆのグルタミン酸生成に参与するグルタミンナーゼを明らかにすることができると考えた。そこで、ゲノム配列中に存在するグルタミンナーゼ遺伝子の数が少なく、かつグルタミンナーゼ活性の高い *A. sojae* を用いて検証することにした。

10 個のグルタミンナーゼ遺伝子の単独遺伝子破壊株を作製し、しょうゆ麴様培地における

表3-2 黄麹菌のグルタミナーゼ遺伝子

相同性検索に利用した 遺伝子/タンパク質		遺伝子 ID (<i>A. oryzae</i> RIB40)	<i>A. sojae</i> NBRC4239株にお けるオルソログ遺伝子の有無	<i>A. oryzae</i> RIB40 株のEST解析	<i>A. oryzae</i> RIB40株の米麴 における発現解析 (RNA-Seq)
Type I	glutaminase-asparaginase (<i>Cryptococcus nodaensis</i>)	<i>gahA</i> AO090003001406	+	+	+
		<i>gahB</i> AO090011000310	+	-	+
		<i>gahC</i> AO090011000138	-	-	-
		<i>gahD</i> AO090701000634	+	-	+
Type II	γ-glutamyl transpeptidase (<i>Bacillus subtilis</i>)	<i>ggtA</i> AO090005000169	+	+	+
		<i>ggtB</i> AO090023000537	-	-	+
		<i>ggtC</i> AO090113000029	+	-	+
		<i>ggtD</i> AO090009000211	+	-	+
Type III	glutaminase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	<i>gtaA</i> AO090020000289	+	+	+
		<i>gtaB</i> AO090003000638	+	+	+
		<i>gtaC</i> AO090001000625	+	-	+
Type IV	glutaminase (<i>Micrococcus luteus</i>)	<i>gls</i> AO090010000571	+	-	+

A. oryzae RIB40株および*A. sojae* NBRC4239株における既知のグルタミナーゼ遺伝子と相同性のある遺伝子を示す。相同性検索は、AspGDおよびNCBIのデータベースに対し、既知のグルタミナーゼの遺伝子またはアミノ酸配列(*C. nodaensis* (Accession No. A610785)、*B. subtilis* (E433299)、*A. oryzae* (AB029552)、*M. luteus* (DQ019448))を用いて行った。相同性の有無はE値で判断し、 E^{-40} 以下を相同性のある遺伝子とした。+は*A. sojae* NBRC4239株においてオルソログ遺伝子が存在することを意味し、-は存在しないことを意味する。*A. oryzae* RIB40株におけるEST解析のデータベースに対して相同性のある配列が検出されたものを+とした。*A. oryzae* RIB40株の米麴における様々な培養時間でのRNA-Seqデータベース(<http://nrif21.nrif.go.jp/CFGD/>)を用いて、各遺伝子IDの発現状態を目視で確認し、発現しているものを+で表す。

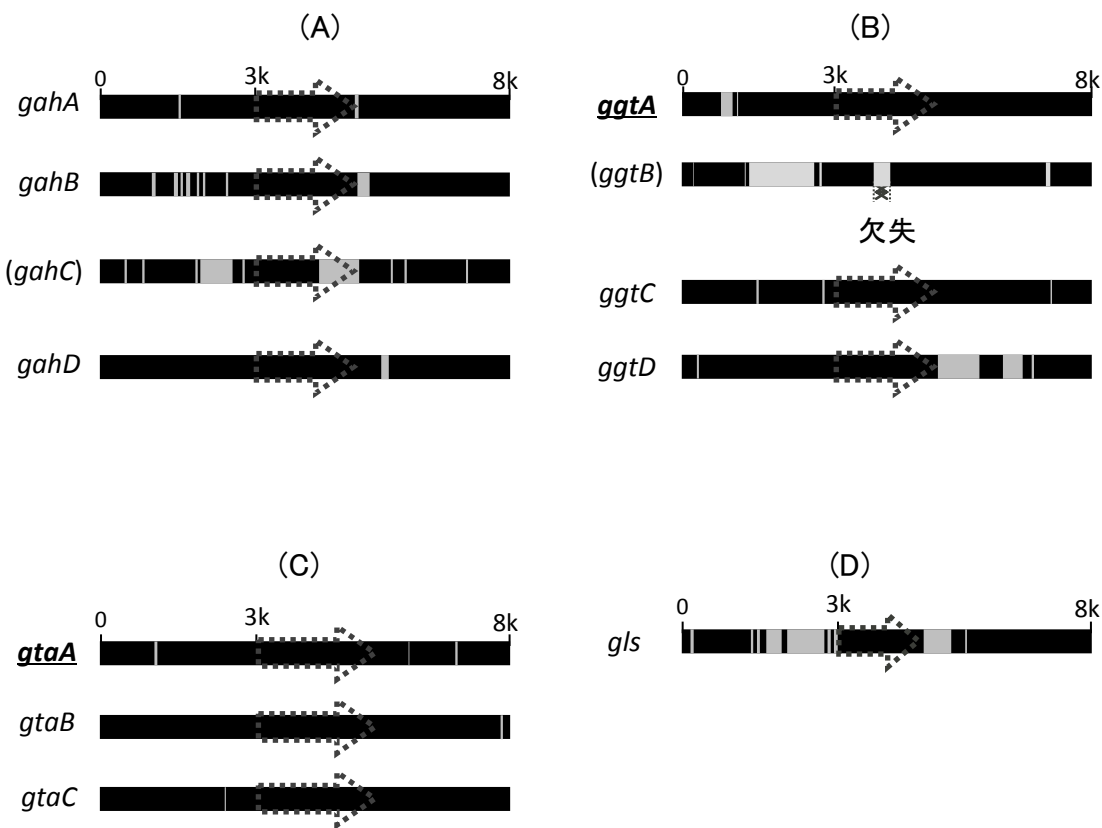


図3-1 *A. sojae* のグルタミナーゼ遺伝子領域と*A. oryzae*のグルタミナーゼ遺伝子領域の比較

A. sojae NBRC4239株のグルタミナーゼ遺伝子(ORF領域)の5' および3' UTR領域3 kbを含む約8.0 kbの領域を*A. oryzae* RIB40株のAspGD(<http://www.aspgd.org/>)のゲノムデータベースに対して、BLAST検索した。点線矢印は、予測ORF領域を表し、下線太字は、黄麹菌のゲノム配列情報が明らかになる前に酵素精製され、黄麹菌よりクローニングされていた遺伝子を示す。黒色の領域は相同性の高い領域を表し、灰色の領域は相同性の低い領域を表す。*gahC*遺伝子は、ORFの3' 領域が著しく相同性が低く、その配列情報からタンパク質として機能していない遺伝子と判断した。また、*ggtB*遺伝子については、遺伝子が欠失していた。(A): Type I (*gah*タイプ)、(B): Type II (*ggt*タイプ)、(C): Type III (*gta*タイプ)、(D): Type IV (*gls*タイプ)

グルタミナーゼ活性を測定した(図 3-2(A))。全てのグルタミナーゼ単独破壊株で生育速度に差は無かった。しかし、*gahB* 遺伝子破壊株のグルタミナーゼ活性は、KuP8 株(対照株)と比較して、約 1/10 に低下した(図 3-2(A))。その他のグルタミナーゼ遺伝子破壊株は対照と有意な差はなかった。この *gahB* 遺伝子破壊の効果は、*A. oryzae* でも同様であった(図 3-2B)。以上の結果から、しょうゆ麹様培地(固体培地)における黄麹菌 *A. oryzae* および *A. sojae* の主要なグルタミナーゼ活性を示すのは、*gahB* 遺伝子由来のグルタミナーゼであることが明らかとなった。

近年、様々な *Aspergillus* 属糸状菌のゲノム解読が活発に行われ、遺伝子配列情報が報告されている⁹¹⁾。そこで、黄麹菌で見出したグルタミナーゼ遺伝子が他の *Aspergillus* 属糸状菌にも保存されているか調べた(表 3-3)。Type I と Type II のグルタミナーゼ遺伝子は、*Aspergillus* 属 *Flavi* 節に属する種において、遺伝子(ホモログ)数が多かった。さらに、Type IV のグルタミナーゼ遺伝子は、*Flavi* 節の種しか保持していなかった。Type IV のグルタミナーゼ遺伝子は、バクテリア(*M. luteus*)由来のグルタミナーゼ遺伝子と相同性が高く、遺伝子内にはイントロンも含まれない。このことから *Aspergillus* 属の共通祖先が進化の過程で *Flavi* 節に分岐した後に水平伝播によって遺伝子を獲得した可能性が考えられる。

Aspergillus 属糸状菌は、*gahB* 遺伝子のオルソログ遺伝子を少なくとも一つは持つ(表 3-3、図 3-3)。表 3-2 で示した Type I のグルタミナーゼは、アミダーゼドメインを持つ特徴を有し、*gahB* ホモログ遺伝子は全て機能未知タンパク質として予測される。これらが全てグルタミナーゼ活性を持つかは不明である。第 2 章で *A. oryzae* RIB40 株のゲノム配列中に見出された Type I の 4 つのグルタミナーゼ遺伝子 (*AogahA*、*AogahB*、*AogahC* および *AogahD*) は、フスマ麹の全 RNA より cDNA をクローニングした結果、全て発現していた(第 2 章で *A. sojae* の *gahA* 遺伝子については解析したため、*AogahA* 遺伝子のクローニングは割愛した。図 3-4、図 3-5、図 3-6)。

AogahB 遺伝子はイントロンが無く、DOGAN の遺伝子予測と一致した。*AogahC* 遺伝子は PCR による cDNA の増幅効率が極めて悪かった。米麹由来の *A. oryzae* RIB40 株の RNA-Seq 解析結果を見ると、*AogahC* 遺伝子は発現していない。このことから、*AogahC* 遺伝子はフスマ麹培養でも極めて発現が低いと考えられる。尚、DOGAN の *AogahC* 遺伝子と *AoGahD* 遺伝子とは、イントロンの箇所等が予測と異なっていたことから、遺伝子予測が必ずしも正しいとは限らないことも明らかになった。これらの配列は、AB693952 (*AogahC* 遺伝子) および AB693953 (*AogahD* 遺伝子) として DDBJ に登録した。

次に *S. cerevisiae* を宿主に用いて、V5 エピトープタグを付加させた形でこれらの遺伝子を発現させたところ、第 2 章で活性を確認した *gahA* 遺伝子以外でグルタミナーゼ活性を確認できたのは、*gahB* 遺伝子だけであった(図 3-7(A))。抗 V5 エピトープタグ抗体を用いたウェスタン解析を行った結果、可溶性画分にタンパク質が検出できたのが *AoGahB* タンパク質のみであり、*AoGahC* タンパク質および *AoGahD* タンパク質は、不溶性画分に検出され、正しく発現ができなかった可能性が考えられる(図 3-7(B))。*AoGahB* タンパク質は、*AoGahA*

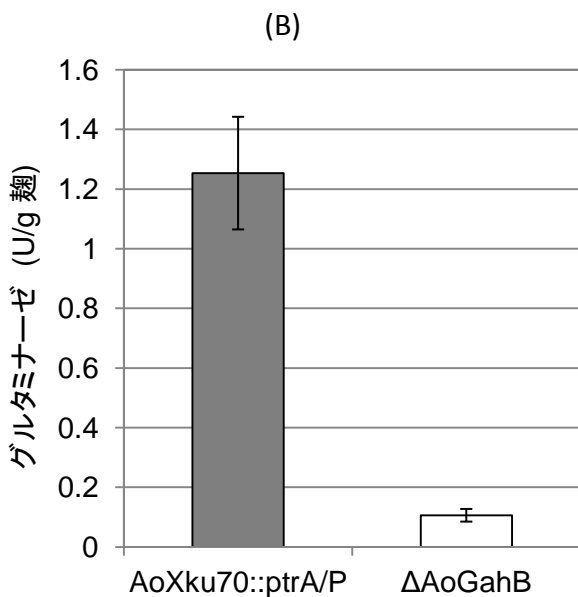
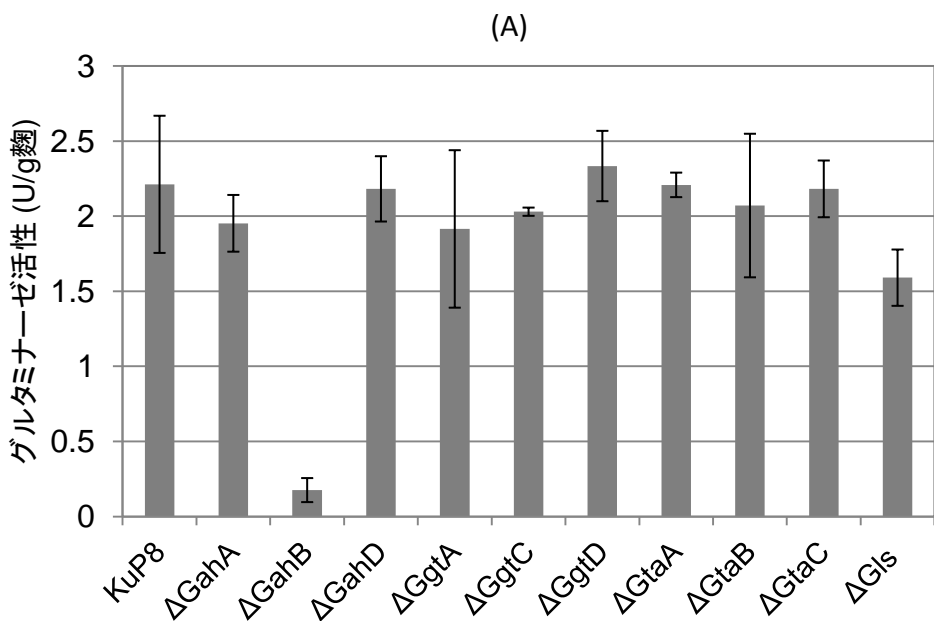


図3-2 各グルタミナーゼ遺伝子破壊株の全グルタミナーゼ活性

各グルタミナーゼ遺伝子破壊株をしょうゆ麹様培地に接種し、30℃、4日間培養した後にグルタミナーゼ活性を測定した。A. sojaeを宿主にした各グルタミナーゼ遺伝子破壊株のグルタミナーゼ活性(A)と、A. oryzaeを宿主にしたAogahB遺伝子破壊株のグルタミナーゼ活性(B)を示す。KuP8およびAoXku70ptrA/Pは宿主株にpyrG遺伝子のみを導入した対照株。

表3-3 *Aspergillus*属糸状菌におけるグルタミナーゼ遺伝子の比較

	Type I	Type II	Type III	Type IV
	Gah	Ggt	Gta	Gls
<i>A. oryzae</i>	4	4	3	1
<i>A. flavus</i>	4	4	3	1
<i>A. sojae</i>	3	3	3	1
<i>A. parasiticus</i>	3	3	3	1
<i>A. terreus</i>	2	2	3	0
<i>A. niger</i>	1	1	2	0
<i>N. fischeri</i>	2	1	3	0
<i>A. fumigatus</i>	2	0	3	0
<i>A. clavatus</i>	1	2	3	0
<i>A. nidulans</i>	1	2	3	0

相同検索にはAspGD(<http://www.aspgd.org/>)およびNCBIのデータベースに対し、表1に記載したタンパク質のアミノ酸配列(*C. nodaensis* (Accession No. A610785)、*B. subtilis* (E433299)、*A. oryzae* (AB029552)、*M. luteus* (DQ019448))を用いた。相同性の有無はE値で判断し、 E^{-40} 以下を相同性のある遺伝子とし、その遺伝子の数を示した。灰色は*Aspergillus*属の*Flav*節を表す。

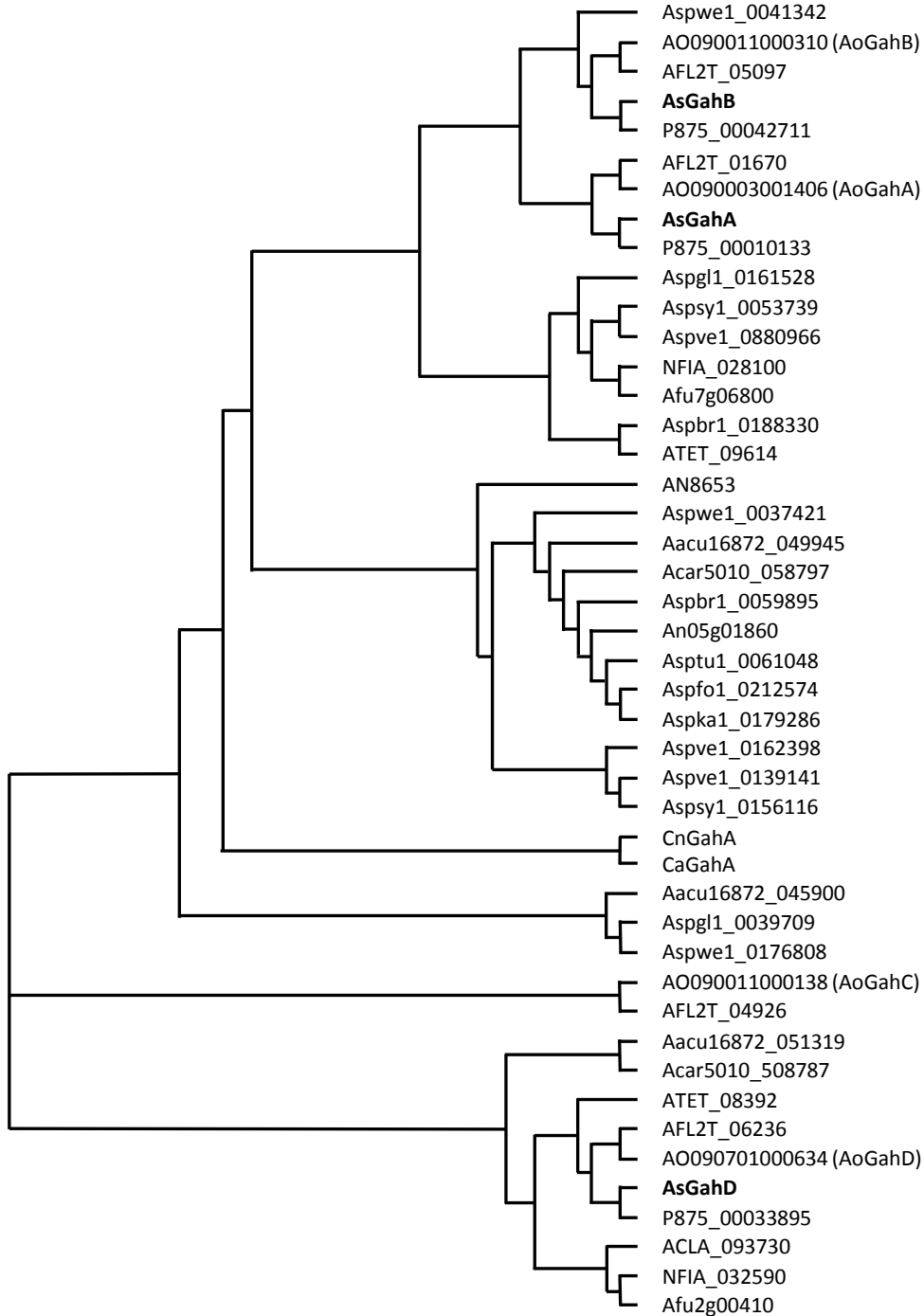


図3-3 *Aspergillus*属糸状菌における*AsgahB*遺伝子のオルソログ遺伝子の系統樹解析
 AspGDのデータベース(<http://www.aspgd.org/>)に対してAsGahBタンパク質のアミノ酸配列を用いてBLAST検索し、 E^{-40} 以下の相同性を示したタンパク質について解析した。*A. parasiticus*についてはAspGDのデータベースにゲノム配列情報がないのでNCBIのデータベースに対して同様に行った。系統樹解析には、ClustalWを用いた。

Aspwe1_: *Aspergillus wentii*、AO090-: *Aspergillus oryzae*、AFL2T_: *Aspergillus flavus*、P875_: *Aspergillus parasiticus*、Asppl1_: *Aspergillus glaucus*、Aspsy1_: *Aspergillus sydowii*、Aspve1_: *Aspergillus versicolor*、NFIA_: *Neosartorya fischeri*、Afu-: *Aspergillus fumigatus*、Aspbr1_: *Aspergillus brasiliensis*、ATET_: *Aspergillus terreus*、AN8653: *Aspergillus nidulans*、Aacu16872_: *Aspergillus aculeatus*、Acar5010_: *Aspergillus carbonarius*、An05g-: *Aspergillus niger*、Asptu1_: *Aspergillus tubingensis*、Aspka1_: *Aspergillus kawachii*、: *Aspergillus clavatus*、CnGahA: *Cryptococcus nodaensis*、CaGahA: *Cryptococcus albidus*

```

-480 ccactctaatagttgaatatagtgccgaagatcccttctcggcaaacctgtcgtgocgagtaaccacataaattagacacgttttttcgacacagctc -381
-380 gtgaacatgggggctgtatcaaaagcagcgagcgtcgttgttcttttgcgaaaatcagtgaaacctgattcgcgagcgatgtacagtgcatgtgcgatc -281
-280 agatctcacatacaaaagatctccactctataccagaacacacagacaatgaacgccaaagtcaataaatccctctggccacaaaagccccattcaacaaa -181
-180 gcatttcaattgccaataaagattaaattgactcttgccaattgaagccggttttctgtctccttatttttcggcatttaccatgattcaattgccatg -81
-80 ctcaagctgccatcagtatgataaaacaaggataactctactagtcaatgagagaagaca▲aaagctcaaaaaacccaaaATGCTCTCTCTGTCTCTCT 20
M L S S V L L

21 TGTCCTCTTCTCAGCGGCGGTGGGGGCAAAAGACCGTGCCCAACGGCCAAACACTCACCCCTCAACGGCATACCCTACTATCTCAGTGGGATCCCATTTCG 120
V L F S A A V G A K T V P N G Q T L T L N G I P Y Y L S G I P I S

121 AATTTCACATAATGTTTTTCGATAAAGCAAGCAAGDGTGCGATATCTTCCCTTTTACAGTCACCAGACTCTTACAGCCCGTTTACATAGTAGCTTTCTGA 220
N F S H N V F D K A S N D V D I F P F T V I Q T S S T V H S S F L S

221 GTGAAACAGTGTGCCAATTTTACCAGCAGGATGACGTGTTCACACCTCGGTTTCTTCCAGCCGTCTATTGACTTCTTCTGTTGAGCGGTGCGAAATCGA 320
E T V A N F T Q Q D D V F Q P A F L Q T V Y L T S S V E A S Q I D

321 CGAACTGTCTGGCAGCGAAGCTTTGCACCAGTTTGACAATAAGATGTTCTCTAACCGAATCTGATGCTTCTCTGTCTACGCCCTTCCGAATGGACCTTAT 420
E L S G S E A L H Q F D N K M F L T E S D A S L S T P L P N G P Y

421 TTTGCTTCGCGCCGCACAGGACACATTTTCCAGCCCTATCGTCTCTACTCTGATGACTCTTTGGCGTTCATCTCGGCCCTATTAGCGATGAGAGTGGTG 520
F A S A R T G H I F R A Y R L Y S D D S L A F I S A A I S D E S G G

521 GTTTCATTCTCATGACTGGAGTTACAGAGGGCGTCATGACGAAAATGTCGCTGTCGCCATCCCGTCTCTACTACACCCCTACTGCTGAAAAGCCTTTAGC 620
F I P M T G V T E G V M T K N V A V P S R L Y Y T P T A E K P L A

621 TGGTTCCCGGCTGGCCGTGAAGGATATATTCACATTAAGGGTCTTAGAACCCAGTGTGGAAGCCGTCGCTACTACTACCTACGATGAGCAGAATGTT 720
G F R L A V K D I F H I K G L R T S G G S R A Y Y L Y D E Q N V

721 ACCACTCCCTCTGTGCAACGGCTCTTTGACCTGGGTGCCGTAAGTGGTGGGAAAGTGGGCACCTGTTCAATTCGCCAATGGTGATCGTCTCTACTGCGGACT 820
T T P S V Q R L F D L G A V M V G K V G T V Q F A N G D R P T A D W

821 GGGTCGATCTGCACTGTCCATTCAACCCCGAGGGGACGGATATCAATATCCAGTGGCTCCCTGCTGTGTTCCGGTCTGCCATCGCCCGTATGAATG 920
V D L H C P F N P R G D G Y Q Y P S G S S S G S G A A I A A Y E W

921 GTTAGATCTGGCTATTGGCAGTGACACGGGTGGTCCATCGCGGACCTGCCGGTGTGACGGGTATCTATGGTAAATCGGCCATCAACTGGGGCTATCACT 1020
L D L A I G S D T G G S M R G P A G V Q G I Y G N R P S T G A I T

1021 TTAGAGCATGCCCTTGCCACTCTCGCCTCCACTCGATACAGCCGGTATGTTTCGACAGGAGCGGTCTTTATGGTCAAAGACCGTCCAAGCCCTGGTACCCCA 1120
L E H L A V L P L S P P L T A G M F A R S A S L W S K T V Q G A W Y P N

1121 ACTTCAACCCGAGCTATCCATCCCAACCCCAACAGCTCTACCTCTCTCACAGCACTGGGACAGAGTCCACCCGCAACCCGAAGCAACGAACTGGAAC 1220
F N R S Y P S H P K Q L Y L T S H S N W D E S T A P E A N E H L E T

1221 ATTCATGCAGAGACTCGAAGATTTCTGGATACAAATCGCACAAATCGTCAACGTACAGAACTGGTCCGAAACCCACAACCTCACCCCTCTTTGATCAAC 1320
F M Q R L E D F L D T N R T I V N V T E R W S E T H N S P S L I N

1321 CTCTGAACACAACTACGCCTACCTAGTCGCGCTCGGCCAATGGAATAATCTCGCCAAAGGCTTCTTCGAGACTACGCCAATCCACACGAGCGCGTC 1420
L L N T T Y A Y L V G V G Q W N N L A K G F F A D Y A Q S H D G R R

1421 GCCCATTATCAATCCCGGTCCCTTGGCCCGCTGGGAATGGGCCAARGCAACCGTGGAAACGCATCTACGACGCCCGCTGCATAACATGACTGTCTT 1520
P F I N P G P L A R W E W G Q A N G G N A S Y D A A L H N M T V F

1521 CCGAGACTGGTGGTCGAGCTCCGGATACGGACGTTCTGATGATGATTCTTGCTCGGAAGGTATCTTCGTACACGCCTGGGCCCGGAGCAGACTAC 1620
R D W W S T S G Y G R S D D D S C S E G I F V H A Y A T G A A D Y

1621 CGTAACCGGTACTTCAACCCCTCTGGTCCCGCTTCGGATTACAGACAGCAGCTATCGCCGTTTTCCGCGGCGCCGCTGAAGTTGTTGCTCCCATGGGCG 1720
R N R Y F N P P G P P F G F T D D A I A V V F A G A P E V V V P L G E

1721 AGTCGCCTTATAACAGTACCATCAGTTGACAGGAGTATCTCCCTGTTTCGATCGGCTTGACAGTGGCTAGAGGCTGCGATCGGGCCTGCTGAGTT 1820
S P Y N S T I T L H E E Y L P V S I G L Q M A R G C D R A L A E L

1821 GGTGGATGATCTAGGCAAGCAGGATTTTGAAGCCTGTTTCTCGGGCTCGAGATTATATTTCTTAAttatatgtaattctatgtagatcttgggata 1920
V D D L G K A G I L K P V S A G S R L Y S *

1921 tatagattgatatactggctatgtatgaataacacatccctcag▼cttagaagagagtttccaagagccgtattagagatttgactagtaagctgtgcaa 2020
tagcaaaagactctgcattcagaacctcgcaataaatttgcaaaataatgaaatatttgaccgcctactacgcagatcttcaatagatgcaacttatac 2120
ttgacgctagagcctgttttccgaccaactacatcacatcattgtacactctgcacttttctcaattcaatcaatcagcaagatgtaagccacgca 2220
cgaagggcaacgctctctcagcagcagatcttcaaccggaggaggataaataacctggacaactactccgatttcgcccgaagtgccctctctgtgtg 2320
tggactttgtgcccctgaagggcaatttcaggctggtcttgagatgcaactacgatatacaagctgtggtgtgcgatgctgccaatggtgtagtattgtg 2420

```

図3-4 *AogahB*遺伝子のクローニング

大文字はOpen reading frame (ORF)領域、小文字はUntranslated region (UTR)を示す。太字はRACE法で明らかにした転写開始点(▲)およびPolyA付加部位(▼)を示す。黒ボックスで白抜き字はTATAボックスを表す。

```

-500  tatgtcttttgggtgctctcatgtagaccggttttgcgaagtcacggttttaggaatgcggtctttaacatocgtgtggacacogtcccgcgactagt  -401
-400  agattttaaatgcacattctcacaccataatcaatacctcaagagtcaggaatctgagaaaatgggaaacagacatgtttatgtagggataaaacatggaac  -301
-300  ttccaatgggttagcatagtcggacagatatctcttggtagctcttttggtagaactttacattaccagaccacactgctggcggtcggtataaatgttt  -201
-200  gctgtaccactatacctgctatgtagaactagactcogttagaccctgaaacactcaagcattacgcctgaggttgtccctgttgcgtgtgtcctcagggc  -101
-100  ttgtccactgccagcgcTATAagcttggcttttaactaccgtgagtatgatacctattttctcaccactctctgattcctattagacatccga▲ggcctcc  -1

1  ATGGTGCCCGGACTGCTCGCTCGATCACACTCCGACTAGGGGAGACTGCATATTACATGCACCAAGTCCCTGAGGtacctggagatctagatctcaaca  100
M A A R L S A S I T L R L G E T A Y Y M H Q V P E

101  aagcttagctcatagctgaatgactaaacaatcacgaatcgctctagCAAGGAGATCCCTATCGGTGTCAACCAAATGACAGCTCCCTGCACCTGATTTC  200
Q G D P I G V N Q M T A P C T T V F T

201  AATTCACGGTTCGTCGACCCGAAAAGGGTCTAAGCGAGAGCATCGAAAGATTCGGCCGGTGGATGTCTGGTCCACGGGACTTCTTACAAAACGCTC  300
I H G S S T A K E V L S E S I E R F G R L D D V W S P D F L Q N V

301  GTTCTGCAATCACTATCTTCGACGAGTCCATCCGAAAGGACGCGGAAGACATACTGGCGCGGTATAATACATCTTCAATCTACATAACTTCGCTCAT  400
V L Q S L S S Q E S I R K D A E D I L R P Y N T S S I Y I T S V S S

401  CCGCGCGCTCAATGAGGGCCCATACTTCTTAAATATGGGAAGGCTGCACCAGCATAACCGGTGTACCCGGATTATGCTGTGCATTTATTGCACCCGAC  500
G A L N E G P Y F L N M G R L H P A Y R L Y P D Y A G A F I A P T

501  AGTGCCACGGAGATCCATACTGtctcagtgaaagcttggctcaccctgggtgtagacagaatgtgtcaacacgatgaagagggtcttctctgaccaattta  600
V P T E D P Y C

601  tagCTACAAACCTCTAGATGCCGCTGCATATGGAGAGACTATCCTTCTTCGTAACCGTGGCCGCTCTCGCTATATCACTCCCAACACCCGAA  700
Y K P L L D A A A Y G E T Y P S S L T V A V P S R L Y H S P T P E

701  AACCCATTCGACGAGATCGAGTTGGAGTTAAAGATATCATGGACCTTCGCGGGCTCCGCACAGGGCCCTCATCGCGAGCATATACACAACCTGCTGGAC  800
N P F A G T R V G V K D I M D L C G L R T G G A S S R A Y T Q L L G P

801  CTCGACCCGAGAATGCAGAGGTTATCCAAAAATTACTGGGGCTGGGTTTCTAGTGTGGGAAATTAAGACCACACAATTTGCGACTCGGAGTGGCC  900
R T E N A E V I Q K L L G L G F I V V G K L K T T Q F A D S E W P

901  GACTTGCAGACTATGTCGACTATCATGCGCGTTCACCCCTCGTGGCGGACGATACACAGCAGTACGCGGTAGTAGCTGTGGGAGCGCAGCTGCGGTTGCT  1000
T C D Y V D Y H A P F N P R A D G Y Q T T S G S S C G S A A A V A

1001  TCGTATGTATGGCTGGACTTTGCTCTGGGAATGCAGatgtgtgctgactcctcttttggaccagtggtgctgacttagatggctaatgctaaaacagC  1100
S Y V W L D F A L G T D T

1101  ACTGGGAAGCATCCGCGCTCCGGCTACCGTTC AAGGCCTCTATGGAATGCGACCCCTCACTGGACGCCACGAGCTTTAAGGGGATAATCCCATATACTAAg  1200
L G S I R A P A T V Q G L Y G M R P S L D A T S F K G I I P Y T K

1201  tatgatgataaaccacatcggtatgaaacagagtttggatgctaatcagctgttatcttctctctccatagACTGGCAGATACTGCTGGTGGCTTCGCT  1300
L A D T V G G F A

1301  CGGGATGCGACATCTTTCCGGAAGTATCTCGCGCCCTTTATGGCTCTATCAATGATCCACCGTTTTCCAAggtatgtaaatactagttagcttcttgc  1400
R D A T S F A K L S R A L Y G S I N D P P F S K

1401  ggagctaggttccacagggccataataacataatgtattccgcagAAACCCAgtaaggttctataatcccggtggaataactggtcagagacaagcagggagca  1500
K P K

1501  tgacgctgtcctagAATCCTTCATTTGTAATAACTGGAACGGCATCTCGGGTFCGAGCGAACCGTATAAGTTTAGAAGAGATCTGGGCGACAACAAAACCA  1600
S F I V K L E R H L G V E R T R I S L E E I W A T T K P

1601  GTACATGAAAATACACCATGAAAGAGTACCTTTGAGCAGCTCTTTGAATGGGCTGGGAATCCCTCTCAATGGAAGACTTCTCAGTCCATTCATAACTG  1700
V H E N I T M K E Y L E H V F E W A G N P S Q W K D F L S P F I T E

1701  AGTACAGAAACCTACGGCCGAGATCCAGTCTCAACCCCACTGCAATATAAGCGggttcgtaatgtgttttcaactccaaaagaagtttcaagaaa  1800
Y R N T Y G R G D P A L N P Q L Q Y K R

1801  gtgtgactctaattggagaaccgaacagCGGTACTCTCCCAACGATAACGGATGAACAGGAGAAAGAGGGTCTCAAAGATGGAACCTTCAAGTCTTG  1900
G Y L P T I T D E Q E K E G L K R W K T F K S W

1901  GTATGAGACCAATATTTCCACCACCAGCATAGATGGCTTCTCCGACACTCTGCTTCTCCTGCCATGGAGTACTGGGAAGCCGGACTATCGAGATACGTAT  2000
Y E T N I L P P A I D G F S D T L L L L P W S T G K P D Y R D T Y

2001  CGTATGGGCCACAGAGGTTTACGGGTATCGGTTTTTCTTCTATAATCTGTCTCTTACCTGAGGGCCCGGAGGCGATATTGCCTGgtaaggggttgt  2100
R D G P Q R F T G I G F F F Y N L S P Y S E G P E A I L P V

2101  tctttatccctaacaacattacatactagccagagattaacatacatcatggatagTCGGCCAAACGTCCTACACTTCAGAAITAACCACTCCACTGAG  2200
G Q T S Y T S R I T N S T E

2201  CATTGCCCAGCTCTATCGGGATAGCAGCGGAAAGGGAGTGTATGATGCTGACCATTTCATCGCAGACTTGTACTGAGACAAATATCCAGGGTG  2300
H L P A S I G I S S G K G S D V M L T D F I A D L M T E T N I Q G V

2301  TGGGATGCGCTCTCGGCATTTGAGAATATCGACAATATGGGCACTACTTCACTCTATACACAGTCAGCTGCGCAACTACCGCTGAGAGGTGACTTTTA  2400
G V G S R A F E N I D N M G T T S L Y T Q S A A Q L P L R G D F *

2401  Accocacttggccattatttccaagcgtgaactgtgaacttgacatccatcttggagttcatgctgaaattgattgcttacctgatagtgcacatca  2500
2501  aaaagaattgcacgtgaaggtgtggtcatatagactaggagatgaaccagtaataatcagatttttccagggctctccagtcacagatatattcct  2600
2601  ttgcactcaagttattttttatagcaagagtgtctgcgcagacatggctctctcttatttcttagtgctgtatggttaggttcccaatttggg  2700
2701  aactcctatcagcagaccgaagtttcgtcgcactcctcaatttaagtcgttccatgacggcgctcaatcatggaagagataatgtacagagattaatgctgg  2800
2801  tcaactgctctgtgacccaacatgacagattctccacacgtgacatcccaaaaactttttaaagcattgacgcaaaaataataatacaagggaa  2900
2901  tgactgagtttaactctgatatataatctcagataatgctgcagcaatgagatccctctcttttggtcggaatccactgacactaggaatggcaatgtgt  3000

```

図3-5 *AogahC*遺伝子のクローニング
 遺伝子配列の大文字はORF領域、小文字はUTRを示す。太字はRACE法で決定した
 転写開始点(▲)を示す。黒ボックスで白抜き字はTATAボックスを表す。

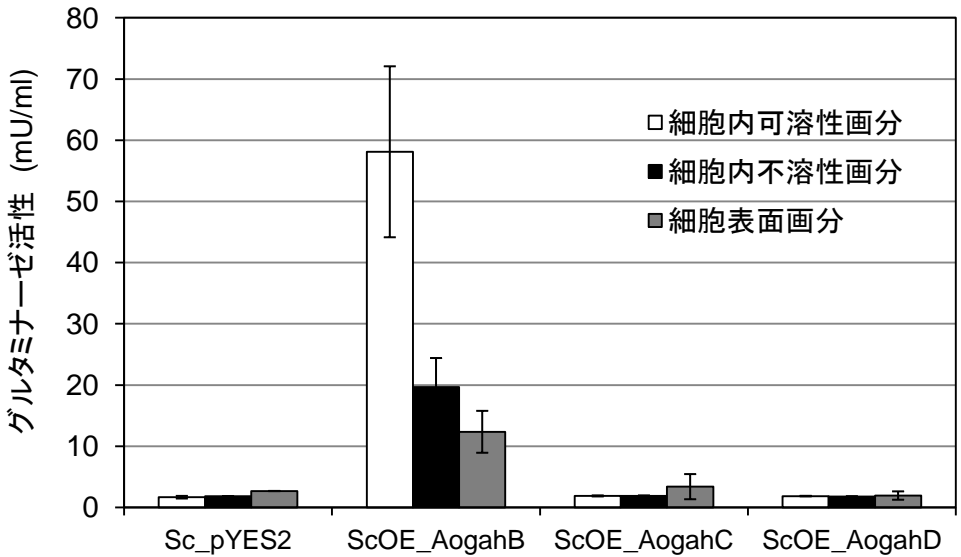
```

-500 ccagaaaaaaatgccattatgttacgtccagatggaatgagttcatttatgtctctgttctggtgtcaccattcattagattagggtctaggggagagacttg -401
-400 gacacacctcccagctgtgacacatctgggcoagattcaacccaattttgtgctacatgaagcagttcagcctctaagtagcgcagtgtagtagcacaaa -301
-300 cagccatcctatctttcattaccctttaatggttgctttcaaccattatcctgactcagtggaaccaacagtgaaaaaggtaagtcacctaaagaatagtccccca -201
-200 tagccagtagtttccacggtacgaacccccgattactgcaatcagaagtcgacgtttaagacatccacggaaacgtgcatgctggtggtgatggcccttgct -101
-100 tcgactggggccaccacacttcaccacgcctatggtccaccttataataatcagagatggcaacattgcaactcagtcgacacaagaagtcac▲ggaccaac -1
1 ATGGTTTCCTGGGAAGCAAACCTTCATTAAGTCCCTTGCTTGGGCTCGGCCTCGAAGGTGGCAGCGCAAGCCCTCTTTCTTTCGGAATATACTACAAA 100
M V S W K Q T F I K V L V L G S A F E G G S A S P L S L S N I L Q Q T
101 CATCTGAAGCTGTCTCTATCAACTGGGTGACACTACCTATCTTGCCAAATGCAAAGAAGCCCCGGGATACACTGACCATCAACCCCAAGGTTGACAA 200
S E A V S Y Q L G D T T Y L A N A K E P R D T L T I I N P K V D N
201 TCACTACGCTACTGGCACAATCATAACCTTGACAGTCATCCCGCCAACGAGACCATCGTGACTGTCTACCACCTCAATGCCACAATCTCGAGCTATTTG 300
H Y A T G T I I T L T V I P A N E T I V T A H H L N A T I S S Y L
301 GCAAAATGACGATGTTTTCTCAACAGAGTTTCTCGGTGCCGTCTATCTCACCTCATCTGCCGGCAATACCAGTGTAACCTGCCGATGCTTTGGAGTATCTTT 400
A N D D V F S T E F L G A V Y L T S S A G N T S V T A D A L E Y L S
401 CGAGCGCCGGTGCAGAGACCATCTATCTGACTCCATTGCTTCAAGAGCCAGGGCAGACGAGCAATATCGATCCACCACAAGTCCGCTAAGACTCTGGC 500
S A G A E T I Y L D S I V F K S Q G R R A I S I H H K S A K T L A
501 GCCTGTCCATATACTGCCGTGTGCAAGACAAAGSTTAGTCTTCTAGACACGTCACCGCTATACCGACATATCTAGCTGATTTTCGTACCAGGTTATG 600
P G P Y T A V M S K D C K V S L L D T Y R L Y P D M Y R L D F V Y G T M
601 TATCCGTCCAACGATGGCAGCGGCTCTTTGTACCACCTCAATCTATGCTCTCAAGGCTCTGGGCAACCGTTGGTCCCCGTGCCGAGCCGATCCATTCAT 700
Y P S N D G S G S F V P L Q S M S S R L W A P L V P V P S R I H S W
701 GGGGAGACCCACGGCGGTAGTGCCAAACGAGTGGCAGTCAAGGATATATTCGACATCAAAGGGTGCACGCTCAGCGGGAAGCCAAAGCGTGGGTTC 800
G D P R P L A G K R V A V K D I F D I K G V Q T S A G S Q A W V Q
801 GATCACGCCTGTTGCCAACAGAACCGCCACCCGCGATTTCAGCGACTGGTGTATCTGGGCGCAATTCTAGTGGGGAAGCAAAGTTGGCACAGTTTGTCTCC 900
I T P V A N R T A P A I Q R L V D L G A I L V G K Q K L A Q F A S
901 GGCAGCAATGCCTGGGATGGACAGATGGCAAGCTCCTTTAAACCAGGGGTGATGGACTACTGACTTGCAGCAGCATCAAGCTCCGCGGGAGCCTGCT 1000
G A N A W D W T D G Q A P F N P R G D G Y L T C A A S S S G G A C S
1001 CCATTCGGCGTACGACTGGCTGGATGCCCGGATTGGCAGTGACACTGGCCTTCCATCCGTCGCCCAAGCGGTGTACAGGAACCTTTGGAACACGACC 1100
I A R A Y D W L D A A I G S D T G V S I R R P A G A V T D G T F G N R P
1101 CAGTCAGGGAATGATCAGCTGCAGGGTATGCTTGCCAGAATTTGGGCTGAGGACACAGCTGGTGTCTGTCGGAATCCGGCCGATGGCCAGGTTT 1200
S Q G M I T L Q G M L A Q N W A E D T A G V L C R N P A E W A R F
1201 GCCAAGGCTTGGTATACTCCAGAACTTCACCAGCCAGCGTCGATTACAGGGTATATCTCCCCTGTCCGTTCCGGACACAATGGCCTTCCCAGCCAGATAC 1300
A K A W Y T P E L H Q P A S I T G L S P L S V P D T M A F P T Q I L
1301 TGTATCCAGAAGAGCAATTTCCCTCGTGAATCCTGCCGCTCAGAAGATCCTTGAGCCTTTCTCTCCACCATAGCAAAGGAACCAACATGAGTATCAA 1400
Y P E E Q F P L V N P A A Q K I L E P F L S T I A K E L N M S I K
1401 ATACACGAACCTTAGCGCTACGCTCATTGAGGCGCCTATCTTCGGACAATAAACCACATGGACCGTCTCCTGACGGCAACGGCTGCCCTAACATAT 1500
Y T N L S A T L I E A P I F S D N N N T M D R L L T A T A A L T Y
1501 TGGTCACTGCATGTAGCTGTTGCTGACCCCTGTGATGACCGCAATGGCCAGCCCGTTACGAAGGACGCTTTCCCCAGTAGATCCGCTGTGGCGCAAAGAGT 1600
W S S H V A V A D G T L M T E W A R R Y E G R F P P V D G T F W R K E W
1601 GGTGCAATTCACGCCAGCGTCATCAATCAGCAGCATCAGCCAGGCCCTTACAGGATAAAAGGAAGGGTGTGCTGCTGGTTCGAAGGAATGTGTTACC 1700
S Q F N A S V I N Q A A Y D Q A L Q D K R K G V D W F E R N V L P
1701 AGAGACGCCCAATCCTGCTCGGAGTCAATTATTGATTTGTGACATTGGCACTGGTGGACTGCCAGTTTTTCGGAGAAAGCTCTTAACGAGGGTCCCAAT 1800
E T P Q S C S E S L L I C D I G T G G L P S F R E K A L N E G P N
1801 GCTACGTTTCTGGGAAGGATGCCAGATTGGGCCGCGATACCTTGTTCATGATCTGTCTATTTTTGGGtgagttcagtttagcaccttgatattgtgaaa 1900
A T F L G R M P D W A A I P C S M I C P I F G
1901 atgagatagtagtaaatatgttctgctgagCTGCGCCGACTTCACCATTCCCTTAGGCCAAGTCCGTATCACTCGCCGTTGACGAATGTGACGGAACAGT 2000
C A D F T I P L G Q V P Y H S P V T N V T E Q F
2001 TTCCCGTGAGCATCAATATGATTGTGCGTCCGGGATGCGACTTTGTATTGTTCAATATGGTCGAGAAGCTGGCCGGGGGGGTATCATTGAGCCCGTTAA 2100
P V S I N M I V R R G C D F V L F N M V E K L A R A G I I Q A V K
2101 GACTGGCAAGCAGGCATTTTAGTcgtggaccccttggttaattctctgctggttggcggttgatattcttctagtttacattagaatagatacaatg 2200
T G K Q A F
▼
2201 gactttgaaattctcgtc▲aaataactataaatcctacggggtaaaaattgtggaacacttttgggttgaccaagaaccaggatataatagcagctcc 2300
cgaaacaacaacgaatggggcgcagtggcatcttcgagttctcgagttcgtgaatcaacagcattattaataaaacaccaccaagacactatgactcccc 2400
atccggccaccacggagtttcttctcttctcttctctcttcttcttctcttctctcaaccattctctcgtctgagcccagaggggtggggcattat 2500
atcccagccaactcaacccccctgattgaagcagagtgccggtgagcagtcataacccccaaagcctggtctcgcggttctaagatattgttccgggaca 2600

```

図3-6 *AogahD*遺伝子のクローニング
 遺伝子配列の大文字はORF領域、小文字はUTRを示す。太字はRACE
 法で決定した転写開始点(▲)およびポリA付加部位(▼)を示す。黒ボッ
 クスで白抜き字はTATAボックスを表す。

(A)



(B)

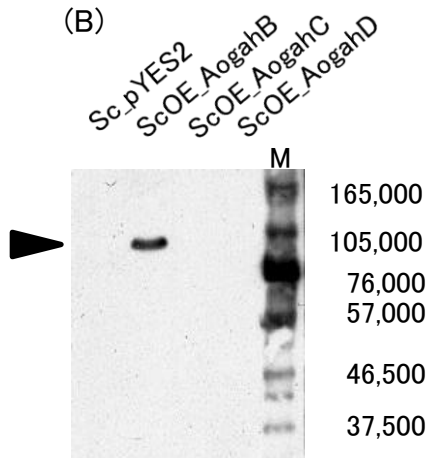


図3-7 *AogahB*遺伝子、*AogahC*遺伝子、*AogahD*遺伝子の *S. cerevisiae*での発現
各遺伝子高発現株を誘導培地で30°C30時間培養して集菌し、培養上清(細胞外画分)、細胞けん濁液(細胞表面画分)、細胞をガラスビーズで破碎し、遠心して得られる上清の細胞内可溶性画分と残渣である細胞内不溶性画分とに分離し、グルタミナーゼ活性を測定した(A)。菌体外画分には活性が検出されなかった。□は細胞内可溶性画分、■は細胞内不溶性(残渣)画分、■は細胞表面画分の活性値を示す。
細胞内可溶性画分をSDS-PAGEで分離させ、PVDF膜に転写後、抗V5エピトープタグ抗体を用いてウェスタン解析を行った(B)。

タンパク質と全域に渡って相同性が高く、アミノ酸同一性は、61%であった。

一方、AoGahC タンパク質および AoGahD タンパク質は、AoGahA(または AoGahB) タンパク質とアミダーゼドメイン以外の相同性が低い。系統樹解析から AoGahC タンパク質と AoGahD タンパク質は、AoGahA タンパク質、AoGahB タンパク質、*Cryptococcus* 属酵母由来のグルタミナーゼ(CnGahA タンパク質および CaGahA タンパク質)とも離れた距離に位置した(図 3-3)。

さらに、*AogahA* 遺伝子や *AogahB* 遺伝子はイントロンを含まないのに対し、*AogahC* 遺伝子および *AogahD* 遺伝子は、それぞれ、8 個と 1 個のイントロンを含んでいた(図 3-4、図 3-5、図 3-6)。*AogahA* 遺伝子と *AogahB* 遺伝子は、高い相同性およびイントロンのない遺伝子の特徴などからパラログ遺伝子である可能性が高い。一方で、*AogahC* 遺伝子および *AogahD* 遺伝子はパラログ遺伝子とは異なる可能性が考えられる。従って、AoGahC タンパク質および AoGahD タンパク質は、グルタミナーゼ活性を持たないタンパク質かもしれない。

(3) *AsgahB* 遺伝子の発現と酵素精製

黄麹菌の主要なグルタミナーゼが *gahB* 遺伝子由来であることが明らかになったので、本遺伝子由来のタンパク質を精製し諸性質を決定するために、*AsgahB* 遺伝子の強制発現を試みた。*AogahB* 遺伝子をクローニングした結果と *in silico* による遺伝子予測から *AsgahB* 遺伝子は、イントロンが含まれない遺伝子として考えられた。そのため、*A. sojae* NBRC4241 株の染色体 DNA を鋳型に、ORF 領域を PCR により増幅して黄麹菌用発現ベクターである pMAP ベクターにクローニングした。得られた pMAP_*AsgahB* プラスミドを用いて *A. oryzae* RIB40 RP-1 株を形質転換して、*AsgahB* 遺伝子強制発現株(AoOE_*AsgahB* 株)を得た。AoOE_*AsgahB* 株は、AoOE_*AsgahA* 株と同様に菌体表面に高いグルタミナーゼ活性を示した。しかし、グルタミナーゼ活性は菌体表面だけでなく、培養上清や細胞内にも検出された(データ未掲載)。

前項で述べたとおり、パン酵母 *S. cerevisiae* を宿主に用いて、*AogahB* 遺伝子を強制発現させると、細胞内画分と細胞表面画分に高いグルタミナーゼ活性を検出した(図 3-7A)。さらに、細胞内画分を用いて抗 V5 エピトープ抗体を用いたウェスタン解析を行うと、約 100,000 の大きさに単一バンドが検出された(図 3-7(B))。一方で、第 2 章で述べたとおり、細胞表面から酵素処理により遊離させて精製した *AsGahA* タンパク質は、精製過程で部分分解を受けている可能性が示唆された。そこで、*AsGahB* タンパク質を菌体表面からではなく、細胞内画分から 3 種類のクロマトグラフィーを用いて単一ピークとなるまで精製した(表 3-4)。

AsGahB タンパク質の分子量を求めた結果、SDS-PAGE では約 110,000 であり、ゲルろ過クロマトグラフィーでは約 259,000 であった(図 3-8)。このことから、*AsGahB* タンパク質は *AsGahA* タンパク質と同様に通常はホモ 2 量体を形成していると考えられる。精製した *AsGahB* タンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定した結果、KTVPNGQTLTLN と同定され、*AsgahB* 遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列の Lys¹⁷ から Asn²⁸ と一致した。Signal-P 解析から分泌シグナルペプチドの切断部位は Ala¹⁶ と Lys¹⁷ の間と予測され、精製した *AsGahB*

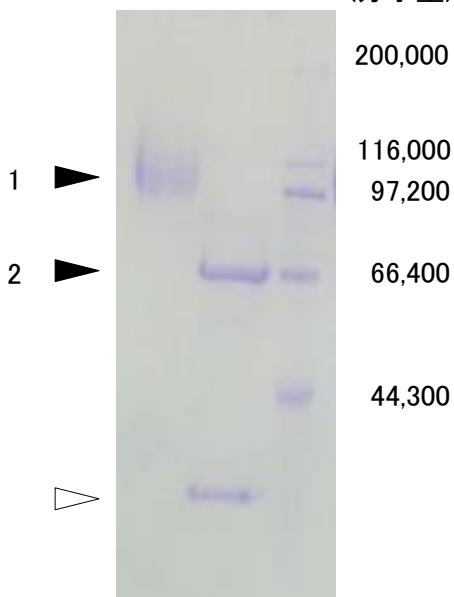
表3-4 AsGahBタンパク質の精製

	全タンパク量 (mg)	全活性 (U)	比活性 (U・mg ⁻¹)	精製倍率 (fold)
粗酵素液	574	9014	15.7	1
25% 硫酸アンモニウム分画	74.9	7439	99.3	6.3
80% 硫酸アンモニウム分画	27.9	3855	138	8.8
疎水クロマトグラフィー分画 (Butyl-TOYOPEARL)	7.5	2436	322.7	20.5
イオン交換クロマトグラフィー分画 (TSKgel DEAE-5PW)	4.1	1724	417.6	26.6
ゲルろ過クロマトグラフィー分画 (TSKgel G3000SW)	1.8	1277	711.4	45.3

(A)

脱糖鎖処理

- + M (分子量)



(B)

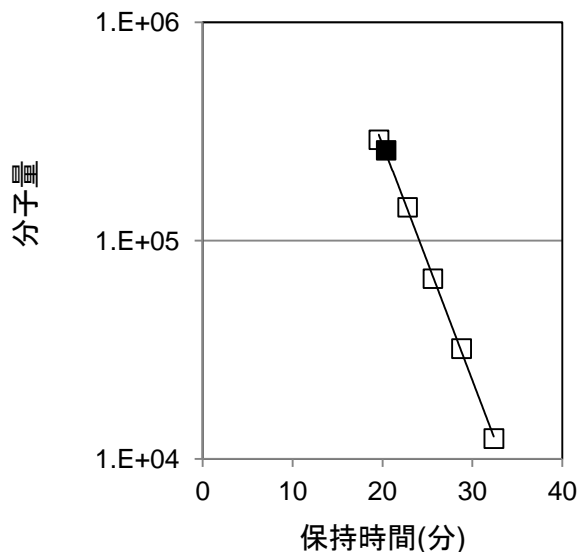


図3-8 精製AsGahBタンパク質のSDS-PAGE(A)とNative型の分子量測定(B)

精製したAsGahBタンパク質の脱糖鎖処理前(-)とPNGase Fを用いた脱糖鎖処理後(+)
のSDS-PAGE(A)。矢印は精製したAsGahBタンパク質(▶)、脱糖鎖処理酵素
PNGaseF(▷)で表し、レーンMは分子量マーカを表す。

ゲルろ過クロマトグラフィー-TSKgel G3000SWを用いて、MW-Marker(オリエンタル酵母)
を指標にNative型の分子量を測定した(B)。□は分子量マーカ、■は細胞内画分よ
り精製したAsGahBタンパク質の分子量をプロットした。

タンパク質は分泌シグナルペプチドが除去されたタンパク質として存在していることが明らかとなった(図 3-9)。精製した AsGahB タンパク質は、SDS-PAGE でややブロードなバンドを示したことから AsGahA タンパク質と同様に糖鎖付加タンパクであることが示唆された。そこで、脱糖鎖処理をして SDS-PAGE を行った結果、分子量は約 66,400 の一本のシャープなバンドが検出された(図 3-8(A))。これは、塩基配列から推定されるアミノ酸配列から分泌シグナルペプチドを除去したアミノ酸配列の分子量とほぼ一致した。

AsGahB タンパク質の分子量(259,000)は、AsGahA タンパク質の分子量(135,000)より大きかった。しかし、予測アミノ酸配列から推定される分子量は、それぞれ、68,500 と約 69,000 でほぼ同等である。また、通常 2 量体を形成していることも同じである。AsGahA タンパク質、AsGahB タンパク質は共に糖鎖付加タンパク質であるため、分子量の違いは糖鎖付加によるものと考えられる。予測アミノ酸配列から N 型糖鎖付加部位は、AsGahA タンパク質が 7 ヶ所、AsGahB タンパク質が 9 ヶ所と推定され、AsGahB タンパク質の方が多く糖鎖付加されることが考えられる。

また、AsGahA タンパク質は精製する際に細胞壁溶解酵素である Yatalase を使用した。AsGahA タンパク質と同様に液体培養した菌体の菌体表面から Yatalase 処理して AsGahB タンパク質を遊離させ、同じく 3 種のクロマトグラフィーを用いて最終のゲルろ過クロマトグラフィーで単一ピークとなるまで精製すると、SDS-PAGE 上で、AsGahA タンパク質と同様に大きく 2 つのメインバンド(62,000 と 57,000)に分離した(図 3-10(A))。これらのタンパク質は、共に細胞質内から同様に精製して得られた AsGahB タンパク質(110,000)と比較してかなり小さかった。ゲルろ過法による分子量測定でも 158,000 であり、細胞内から精製した AsGahB タンパク質(259,000)よりも小さかった(図 3-10(B))。このことから、Yatalase には、 β -1, 3-glucanase 以外に脱糖鎖活性を持つ酵素が含まれており、精製過程で糖鎖除去された可能性が考えられる。それ故に、細胞内から精製した AsGahB タンパク質は、糖鎖付加などが自然に近い形と考えられ、分子量等も正しいと考えられる。以上の結果から目的である AsGahB タンパク質が精製されたと判断した。

(4) AsGahB の酵素の諸性質の決定

精製した AsGahB タンパク質を使って酵素の諸性質を決定した(図 3-11)。

至適 pH および pH 安定性；至適 pH は、9.0 であった。pH 4.0-10.0 の範囲で 30°C、16 時間、静置しても 80%以上の残存活性を示し安定であった。

至適温度および耐熱性；測定系の pH に関わらず、至適温度は 50°C であった。耐熱性は、氷中に 30 分間処理したものを 100%として残存活性を求めた。その結果、45°C 以下では 30 分間の熱処理をしても 80%以上の残存活性を示した。至適 pH である pH 9.0 と pH 7.0 とでは、耐熱性に若干差が生じた。pH 9.0 では 45°C 以下で熱処理をするとやや活性化され、55°C で一気に失活した。一方、pH 7.0 では活性化は観察されず、熱処理の温度上昇と共に徐々に活性が低下した。

```

-1000 acctgctcaagaagcacttactaaaacaactcaocaaatgtgactggttggatataatgaacgctgagccctcctttatattccatggctgtaggtacacta
-900 gtcctcgcacagacatattcttcccatagccgtagcaaaagtacacagccttagaggttgaatggttggctcatggcgtgctgtacagtggtcgccctgtgta
-800 tgatattccocagtgtaacagttctgtatacaacatgctcctgtagtcaactcttagtcacatgcgaactgaatgatcaatgcgactggccatggaatcagtt
-700 tcacggaaacacatcaocggtgtaccattgtgtttccaattcgtttgtcatcctattctcggacatcattagacaaaactctgaaactccatcagtcgccat
-600 tcatcaccaaagtcaggaaatcagcagaacgatcatcattgatcaactttgtcttctactctacaggaactacaatatctcaccgagtttccagtagccccc
-500 actattccgatcagaccagtcataatagttggatatagtgcccgaagatccctctcggcaaaaacctgtcgtgtcgcagtagccacataaatattggaacacg
-400 tttcttcgacagcagctggtgacatgggggctgtatcaaaagcagcagcagctgctgttcttttcggcaaaaacctggaactgattctatgagtgatgac
-300 agtgcactgtgcgatcagatcacatatacagatgctctccatccatccacagaacactgcagcagtggaatgcccgaagtcaataaatccctctggtagtgc
-200 ggtcccattcaacaaatgcatctcattggccaaaaaaagatacaaatgtgactctgccaattcaagccggtttctctgtctccctatttcttcggcatttggc
-100 atgatccattggccatgctcaggtgccaacagtagtatacaaaataaagataaacctcactagttaatgagagaagcaaaagtataaaaaaaaaaaaaacaa
1 ATGCTCTCCTCTGTTCTCTCCGCTCTCTTCTCAGCGGCGCTCGGGGCAAAAACCGTGCCCAACGGCCAAACACTCACCCTTAAATGGCATACCTACTATC
M L S S V L L V L F S A A V G A K T V P N G Q T L T L N G I P Y Y L
101 TCAGTGGCATCCCGATATCAAAATTCTCACCAATGTTTTCGATAAAGCAAGCAGCGACGCTGCACATCTCCCATTTCAGGTTTACAGTATTCCAGACTCTTAGCAC
S G I P I S N F S H N V F D K A S D D V D I A F P T T V I Q T S S T
201 CGTCCATAGTAGTTTTCTGAGTGAACAATTGCCAATTTTACCAGCAGGATGACGCTGTTTCAATCTGCATTTCTTCAGACGCTCTATGTGACATCTTCT
V H S S F L S E T I A N F T Q Q D D V F Q S A F L Q T V Y V T S S
301 GACGAAACATCGCGAATTACCGAACTCTTCGGCAGCGAAGCTTTGCACCAGTTCGACAAATAAGATGCTCCTAACCGAATCTGATGCTTCCTTGTCTACGC
D E T S R I T E L S G S E A L H Q F D N K M L L T E S D A S L S T P
401 CCCTCCGAATGGACCTTATTTTGCTCCGCTCGCACAGGACATTTTCAGAGCCTATCGTCTCTATGCTGACGACTCTTTGGCGTTCATCTCGGCCG
L P N G P Y F A S A R T G H I F R A Y R L Y A D D S L A F I S A A
501 TATTAGCGATGAGAATGATGGTTTCATCCCCATGACTGGAGTTACAGAGGGCGTTCATGACGAAGAATGTCGCTGTCCTCCATCCCGTCTCTACTACACCCCG
I S D E N D G F I P M T G V T E G V M T K N V A V P S R L Y Y T P
601 ACTACTGAAAAGCCTTTAGCTGGTCTCCGGCTGGCCGTGAAGGATATTTTCCACGTTAAGGGTCTTAGAAGCTAGTGGTGAAGCCGCTGCGTACTACTACC
T T E K P L A G L R L A V K D I F H V K G L R T S G G S R A Y Y Y L
701 TCTACGACGAGCAGAATGCTCACCCTCCCTGTGACGCGCTCTTCGACTTGGGTGCTATAATGGTCGGAAGGTGGGTACTGTTCAATTCCGCAATGG
Y D E Q N V T T P S V Q R L F D L G A I M V G K V G T V Q F A N G
801 GGATCGTCTACTGCGGACTGGGTGCATGCTGCACTGTCCATTTCAACCCCGAGGAGACGGATATCAATATCCAGTGGCTCCTGCTGTTGGGTGGT
D R P T A D W V D L H C P F N P R G D G Y Q Y P S G S S S G S G A
901 GCCATTGCCGCTATGAATGGTGGATCTGGCTATTGGCAGTGACACGGGTGGTTCTATCGCGGACCTGCCGCTGTACAGGTTATCTATGCAATCGGC
A I A A Y E W L D L A I G S D T G G S M R G P A G V Q G I Y G N R P
1001 CATCGACTGGGGTACTCACTTTAGAGCATGCCTTACCACCTCTCACCTCCACTCGATACAGCCGGTATGTTTCGACGGAAGCGCGCTGTTATGGTCAAAGAC
S T G A I T L E H A L P L S P L D T A G M F A R S A S L W S K T
1101 CGTCCAAAGCCTGGTACCCCACTTCAACCCGAGTTTTCATCCCAACCCCAACAACCTCTATCTCTCGCAGCAACTGGGACGAGTGGGACGACGGCCGAA
V Q A W Y P N F N R S F P S H P K Q L Y L S R S N W D E S T A P E
1201 GCAAAAGCAATCTCGAAACATTCATGACAGACTCGAAGATTTCCATAGACACAACCGCACCATCGTCAACGTCACAGAACGTTGGTCCGAAACCCACA
A N E H L E T F M Q R L E D F L D T N R T I V N V T E R W S E T H S
1301 GCTCACCTCGTAAATCAACCTCCTCAACACAACCTACGCTACCTAGTTCGGCGTGGCCAAATGGAATAATCTCGCAAAGGCTTCTTCGACGACTATGC
S P S L I N L L N T T Y A Y L V G V G Q W N N L A K G F F A D Y A
1401 CCAGGCCACGACGGCGCTGCCATTATCAACCTGGTCCCTTGGCGCGTGGCAATGGGGCCAAAGCAACGGCCGAAACGATCTACGACGGCCG
Q A H D G R R P F I N P G P L A R W Q W G Q A N G G N A S Y D A A
1501 CTGCATAACATGACTGTCTTCCGAGACTGGTGGTGCAGCTGCGGATCGGACGTTCTGATAANTGATTTCTGCTCGGAAGGTATCTTCGTACACGGCCTGG
L H N M T V F R D W S T S C G Y G R S D N D S C T E G I F V H A W A
1601 CCACCGGACGACGACTACCGTACCCGCTACTTCAACCTCTGGTCCCGCTTCGGATTACAGACGACGATCTCCGCTTTTCGGCGGCGCCCTGA
T G A A D Y R N R Y F N P P G P P F G F T D D D I A I F A G G A P E
1701 AGTTGTTGCCATTTGGCGAGTCGCCTTATAACAGTACCACAGTTGCACAAGGAGTATCTCCCTGTTTCGATCGGCTTGCAAAATGGCTAGAGGCTGC
V V V P L G E S P Y N S T I T L H K E Y L P V S I G L Q M A R G C
1801 GATCGGCACTTGGCGAGTTGGTGGATGATCTAGGCAAGGAGGATTTTGAAGCCTGTTTCTCGGGCTCGAGGTTATATTCTTAAttatatgtaattc
D R A L A E L V D D L G K A G I L K P V S A G S R L Y S *
1901 tgtgatagaccttggatataatgtagattgatataccggctcaataaataaactgaataaactgactcagtgagaagacagtttccaagag
2001 ctttattagagattggctggaatgctgtccaactgtaattataaaaacctggccctatagcaaacacctgaaattcttccgcattagtagtaaacgc
2101 aggatagactgcaacagatagaattgttgaacgcttagcgaagtgcacaaagcgtttgctgtgggatgtcaaaactgtaacgcttccatgatgca
2201 caagaattcatccaacgagatgtcttcttagaaagtccaacttggacgagcaaatcgttcaaaaccttaccgctatagccatcaaaatgaccgcccgg
2301 gaagatgtgcaatttcttcgctctcagcggcgaagaatcgcctccagagcaaatatcagttggagtgatagcatcattgtccgccacagtcacacagtt

```

図3-9 *Asgah* 遺伝子の塩基配列

塩基配列の小文字はUTR領域、大文字はORF領域を示す。TATAbox、PolyA付加シグナルは黒のボックスで示す。直線、点線で下線を引いた箇所は、それぞれAreA結合部位(5' -HGATAR-3')、PacC結合部位(5' -GCCARG-3')を表す。CreA結合部位はなかった。二重線はシグナルペプチド配列を示す。灰色のBOXは決定したN末端アミノ酸配列を示す。

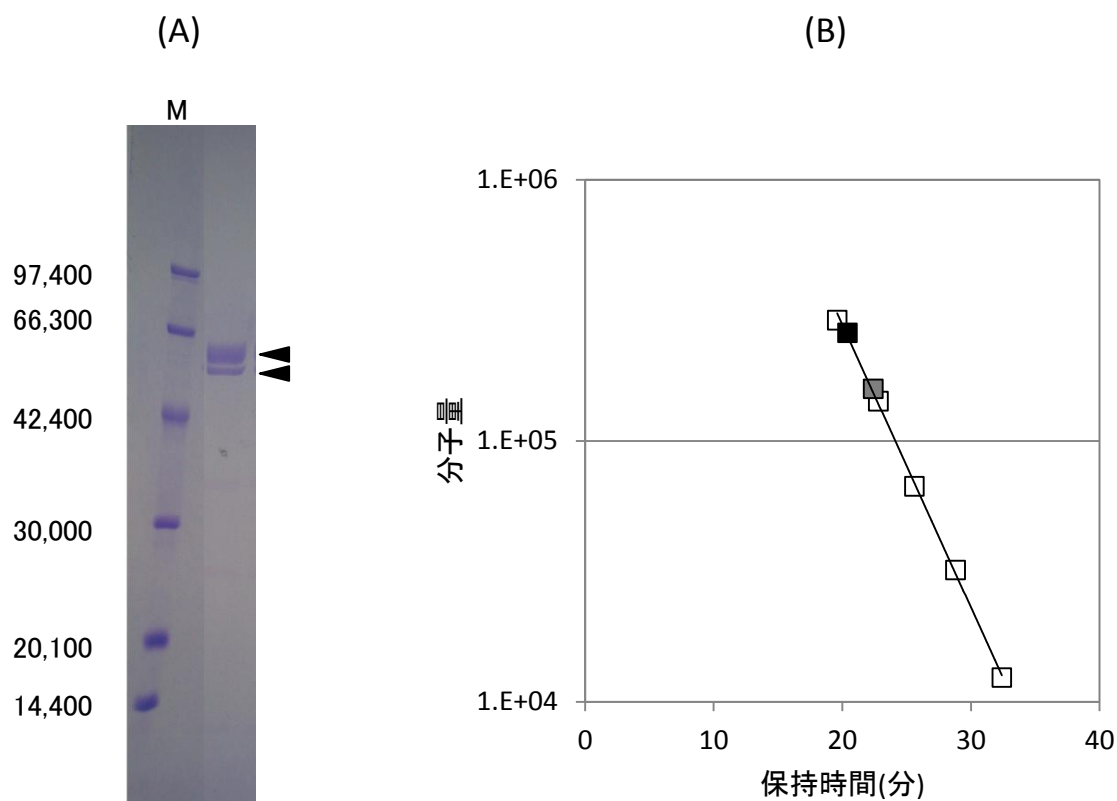


図3-10 菌体表面からYatalase処理により遊離させて精製したAsGahBタンパク質

(A)ゲルろ過クロマトグラフィー後のAsGahBタンパク質のSDS-PAGE。AsGahAタンパク質と類似して、2本の大きなバンドに分離された。

(B)ゲルろ過法による分子量の測定。精製酵素の分子量は、MW-Marker (オリエンタル酵母)およびTSKgel G3000 SW を用いて求めた。□は分子量マーカー、■は細胞内画分より精製したAsGahBタンパク質、■は細胞表面よりYatalase処理をして遊離させて精製したAsGahBタンパク質の分子量をプロットした。

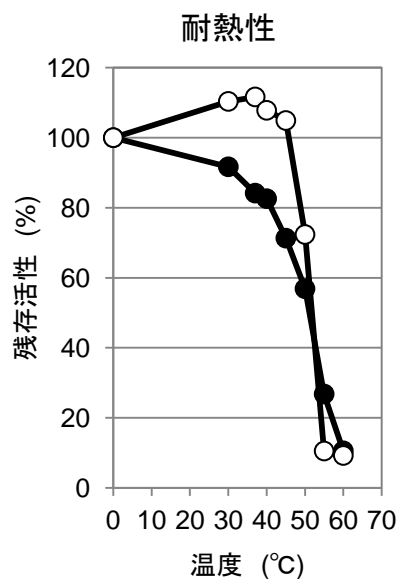
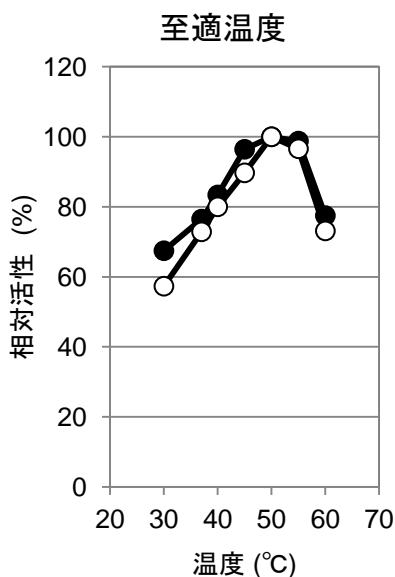
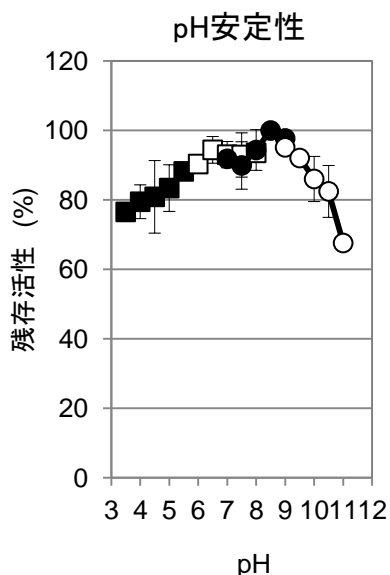
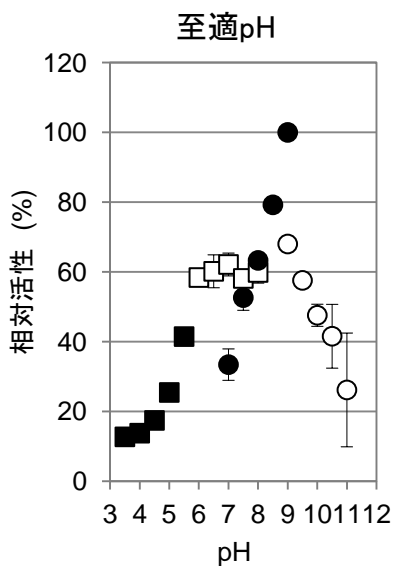


図3-11-1 AsGahBタンパク質の諸性質

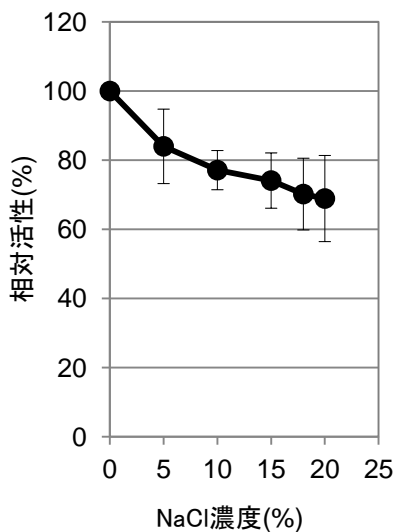
至適pH: 各緩衝液(酢酸ナトリム緩衝液(■; pH 3.5-5.5)、リン酸ナトリム緩衝液(□; pH 6.0-8.0)、トリス・塩酸緩衝液(●; pH 7.0-9.0)、炭酸ナトリウム緩衝液(○; pH 9.0-11.0))を用いて活性測定し、最も活性の高かった値を100%とした相対活性を求めた。

pH安定性: 上記の緩衝液を用いて16時間、30°Cでインキュベートした後に活性測定し、最も活性の高かった値を100%とした相対活性を求めた。

至適温度: 反応温度を変えてグルタミナーゼ活性を測定し、最も活性の高かった値を100%とした相対活性を求めた。反応は、pH 7.0(●)とpH 9.0(○)で行った。

耐熱性: 各温度で30分間熱処理した後、基質を添加してグルタミナーゼ活性を測定し、最も活性の高かった値を100%とした相対活性を求めた。反応は、pH 7.0(●)とpH 9.0(○)で行った。

耐塩性



塩阻害耐性

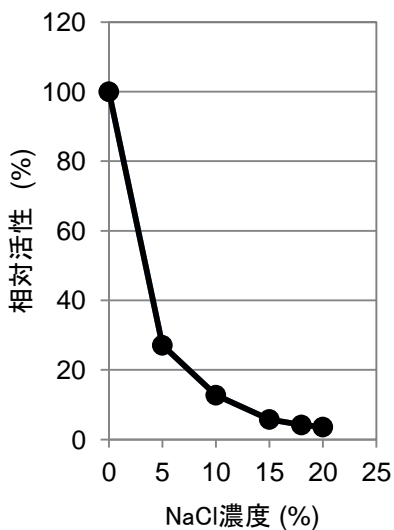


図3-11-2 AsGahBタンパク質の諸性質

塩阻害耐性: 反応系に終濃度が各濃度となるようにNaClを添加してグルタミナーゼ活性を測定し、NaCl 0%の活性値を100%とした相対活性を求めた。

耐塩性: 各濃度のNaClを含む状態で、30°C、16hインキュベートし、グルタミナーゼ活性を測定した。NaCl 0%の活性値を100%とした相対活性を求めた。

耐塩性と塩阻害耐性；耐塩性は、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で 30°C、16 時間、各食塩濃度で処理した後に活性を測定した。食塩濃度 0%での処理を 100%とした時の相対活性を求めた。その結果、20%NaCl 存在下においても約 70%以上の残存活性を示した。

塩阻害耐性は、測定系に含まれる食塩濃度が高くなるにつれて、活性が阻害された。18%NaCl 存在下では、約 95%活性が阻害された。耐熱性および耐塩性に優れる *Cryptococcus* 属酵母由来のグルタミンナーゼと相同性があるにも関わらず、AsGahA タンパク質と同様に耐塩性、耐熱性は低かった。

基質特異性；AsGahB タンパク質は AsGahA タンパク質と同様に、遊離のグルタミンやアスパラギンだけでなく、ペプチドに含まれるグルタミンやアスパラギンも脱アミド化した (表 3-5)。また、AsGahA タンパク質と同様に N 末にグルタミンが位置する L-Gln-Gly には反応性を示さなかった。ペプチド内部のグルタミン (Cbz-Gln-Gly) に対する反応性は、AsGahA タンパク質よりも高かった。しかし、AsGahA タンパク質とは異なり、ペプチドに対する反応性は、遊離のグルタミンへの反応性に比べて半分以下と低かった。さらに、 γ -グルタミル化合物 (γ -グルタミルヒドロリド、グルタチオン、L- γ -Glutamyl-*p*-NA) に対しても反応性を示さなかったことから、AsGahA タンパク質と同様に γ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性を持たないことが明らかになった。L-グルタミン、L-アスパラギン、L-Gly-Gln に対する K_m 値を測定した結果、それぞれ、9.0、7.3、46.2 mM であり、ペプチドに対する親和性が低下していた。一方で、上記基質に対する k_{cat} 値は、6249、1606、4790 sec⁻¹であった (表 3-6)。他のペプチド基質に対する K_m 値、 k_{cat} 値は反応性が極めて低いため測定できなかった。しかし、AsGahB タンパク質は、C 末端にグルタミンやアスパラギンを持つペプチドに対して酵素濃度依存的に加水分解反応を示したこと (図 3-12) から、AsGahB タンパク質も AsGahA タンパク質と同様にペプチドグルタミンナーゼ・アスパラギナーゼであると結論付けた。

AsGahA タンパク質と AsGahB タンパク質は、高い相同性を有するにも関わらず、pH 安定性、温度安定性や基質特異性などが異なった。AsGahA タンパク質は至適温度、耐熱性、pH 安定性の結果から、アルカリ条件下では温度に対して極めて不安定となったが、AsGahB タンパク質では pH による温度安定性への影響は小さかった。

AsGahB タンパク質は、AsGahA タンパク質と基質特異性が異なり、遊離アスパラギンやペプチドの C 末端に位置するグルタミンやアスパラギンと比べて、遊離のグルタミンに著しく高い反応性を示した。遊離のグルタミンに対する K_m 値は、AsGahA タンパク質 (5.2 mM) も AsGahB タンパク質 (9.0 mM) もほとんど変わらないが、 k_{cat} 値が AsGahA タンパク質に比べて AsGahB タンパク質が 13 倍高かった。AsGahB タンパク質の遊離グルタミンに対する k_{cat} 値や k_{cat}/K_m 値は、既知の黄麹菌由来のグルタミンナーゼと比較して最も高い値を示している (表 3-7)。それ故に、GahB タンパク質が *Aspergillus* 属糸状菌における主要なグルタミンナーゼ活性を示すのではないかと考えている。

第 1 章で記載した通り、*Cryptococcus* 属酵母由来の CnGahA タンパク質および CaGahA タンパク質は、Amidase signature (AS) enzymes family の中でさらにサブファミリー (GAH

表3-5 AsGahBタンパク質の基質特異性

基質	比活性 ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)
L-Gln	720.5 \pm 267
D-Gln	50.6 \pm 19.4
Cbz-Gln	32.4 \pm 11.2
L-Ala-Gln	236.2 \pm 65.3
L-Gly-Gln	308.3 \pm 89.7
L-Gln-Gly	n.d.
L-Leu-Gly-Gln	16.3 \pm 2.8
L-Pro-Leu-Gly-Gln	73.2 \pm 21.2
Cbz-Gln-Gly	29.9 \pm 9.2
L-Asn	293.7 \pm 64.5
D-Asn	n.d.
L-Gly-Asn	21.9 \pm 8.1
L-Leu-Ala-Asn	4.8 \pm 1.3
L-Leu-Gly-Asn	20.8 \pm 8.6
L-ProL-Leu-Gly-Asn	36.5 \pm 0.6
L-Glu	n.d.
L-g-Glutamyl p-nitroanilide	n.d.
L-g-Glu-Cys-Gly	n.d.
L-g-Glutamyl hydrazide	n.d.

活性測定は、各基質を用いて反応し、脱アミド化反応によって生成するアンモニアを定量した。n.d.は、検出限界以下を表し、比活性で $0.05 \mu \text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 以下のものを検出限界以下とした。活性測定は、独立して4回行った。

表3-6 AsGahAタンパク質とAsGahBタンパク質の各基質に対する
酵素反応速度論的解析の比較

AsGahAタンパク質			
基質	K_m [mM]	k_{cat} [sec ⁻¹]	k_{cat}/K_m [sec ⁻¹ ・mM ⁻¹]
L-Gln	5.2	489	93
L-Asn	8.0	1023	127
L-Gly-Gln	0.7	711	1085

AsGahBタンパク質			
基質	K_m [mM]	k_{cat} [sec ⁻¹]	k_{cat}/K_m [sec ⁻¹ ・mM ⁻¹]
L-Gln	9.0	6249	694
L-Asn	7.3	1606	220
L-Gly-Gln	46.2	4790	104

AsGahBタンパク質はAsGahAタンパク質と異なり、Cbz-Glnなどのペプチドへの反応性が低く、L-Gly-Gln以外のペプチドの測定ができなかった。ここでは、同一基質での反応性を比較した

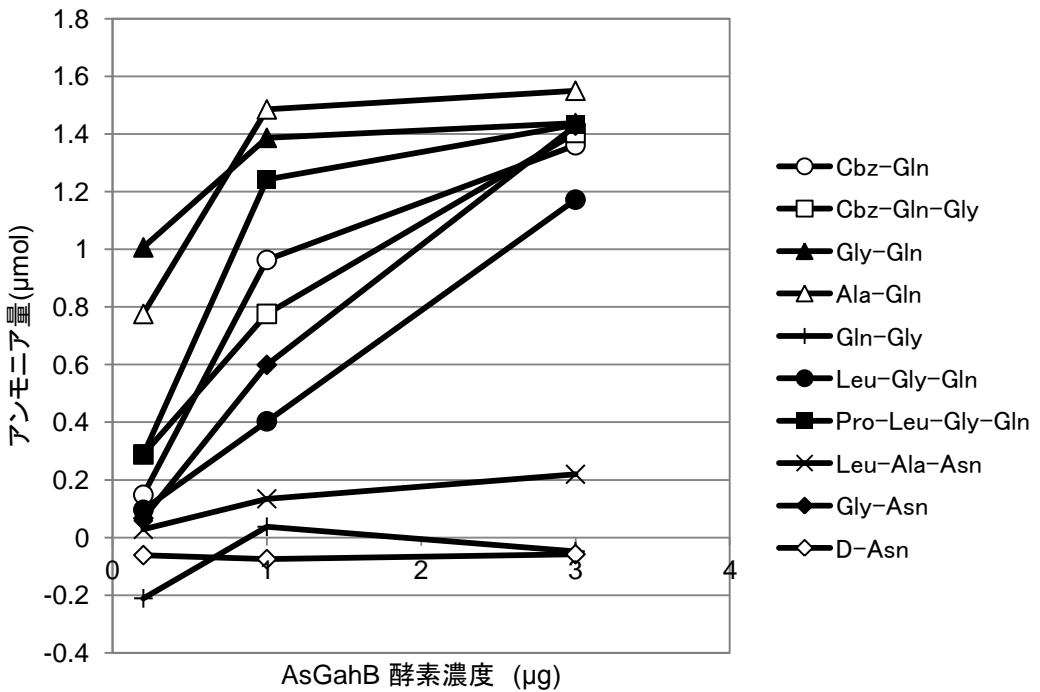


図3-12 各基質に対してのAsGahBタンパク質の反応性

反応系に用いるAsGahB酵素濃度(0.2-3.0 μg)を変えて反応し、生成するアンモニア量を測定した。多くのペプチドで濃度依存的に生成アンモニア量が多くなった。1μg、3μgを使用すると反応が飽和する基質もあったが、Gln-GlyやD-Asnは全く反応せず、Leu-Ala-Asnも著しく反応性が低いことが分かる。

表3-7 既知の黄麴菌グルタミナーゼとの酵素学的諸性質の比較

	GahA	GahB	GlsA ⁹⁸⁾	GtaA ³⁷⁾	GgtA ⁴⁰⁾	GgtA 菌体内 ³⁴⁾	GgtA菌体外 ³⁴⁾
起源	<i>A. sojae</i>	<i>A. sojae</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. sojae</i>	<i>A. oryzae</i>	
分子量	137,000 (2量体)	259,000 (2量体)	100,000 (2量体)	82,000 (単量体)	71,000 (単量体)	113,000 (?)	113,000 (?)
至適pH	9.5	9.0	8.0-9.0	9.0	8.5	9.0	9.0
pH 安定性	3.5 - 9.0	5.0-10.0	7.5-8.0	6.5-8.0	5.0-10.0	7.0-10.0	7.0-10.0
至適温度*	50 °C	50 °C	30 °C	37-45 °C	45 °C	45 °C	45 °C
耐熱性*	45 °C以下	45 °C以下	35 °C以下	45 °C以下	40 °C以下	37 °C以下	37 °C以下
塩阻害耐性(18%食塩存在)	14%	4%	54%	20%	n.d.	10%	10%
Km値 (L-glutamine)	5.2 mM	9.0 mM	4.5 mM	1.2 mM	n.d.	0.091mM	0.096mM
Kcat値 (L-glutamine)	489 sec ⁻¹	6249 sec ⁻¹	617 sec ⁻¹	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
アスパラギナーゼ活性	+	+	-	n.d.	-	-	-
γ-グルタミルトランスペプチダーゼ活性	-	-	-	+	+	+	+

*AsGahAタンパク質は、アルカリ条件下で温度に対して不安定となるため、至適温度および耐熱性については、pH7.0の反応条件下での値を示している。+ : 活性あり、- : 活性なし、n.d.: 活性測定の未実施を表す。

サブファミリー)を形成する。AsGahA タンパク質と同様に AsGahB タンパク質もこのサブファミリーに属する。

CaGahA タンパク質は、遊離のグルタミンと Cbz-Gln は脱アミド化するが、L-Gly-Gln には反応しないため、ペプチドグルタミナーゼではないと岩浅らにより報告されている⁴⁸⁾。しかし、第1章で遺伝子クローニングのために精製した CaGahA タンパク質を用いて再解析した結果、Cbz-Gln だけでなく、L-Gly-Gln を含めたペプチドの C 末端のグルタミン残基を脱アミド化した(表 3-8)。この結果から、CaGahA タンパク質もペプチドグルタミナーゼであることが明らかになった。また、精製した酵素が失活していた CnGahA タンパク質についても、菌体懸濁液を用いて測定した結果、CaGahA タンパク質と同様にペプチドの C 末端のグルタミンおよびアスパラギン残基を脱アミド化することを確認した(データ未掲載)。このことから AS enzymes family の GAH サブファミリーは、ペプチドの C 末端のグルタミンもしくはアスパラギンを脱アミド化するタンパク質ファミリー(ペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼファミリー)であることを示唆する。

AsGahA タンパク質は、遊離およびペプチドの C 末端に位置するグルタミンとアスパラギンには同等の反応性を示す。CaGahA タンパク質は、遊離およびペプチドの C 末端に位置するグルタミンには高い反応性を示すが、遊離およびペプチドの C 末端に位置するアスパラギンにはほとんど反応しない(表 3-8)。一方、本章で明らかにした AsGahB タンパク質はペプチドの C 末端に位置するグルタミンやアスパラギンへの反応性が低く、遊離のグルタミンに高い反応性を示す。また、遺伝子は未同定だが、Kikuchi らによって同定されたペプチドグルタミナーゼ I は、遊離およびペプチドの C 末端に位置するグルタミンを脱アミド化するのに対し、ペプチドグルタミナーゼ II は、ペプチドの N 末端および内部のグルタミン残基を脱アミド化する^{82, 83)}。しかし、共にアスパラギンに対しては反応しない。このように、ペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼの中では、その基質特異性が実質的に異なっており、多様化しているのかもしれない。ペプチドグルタミナーゼ I と II の遺伝子が単離され、この GAH サブファミリーに属するとなれば、このサブファミリーの中でもさらに分類される可能性があるだろう。AsGahA タンパク質、AsGahB タンパク質、ペプチドグルタミナーゼ I、II は、ホモ 2 量体を形成しており、CnGahA タンパク質および CaGahA タンパク質は 3 もしくは 4 量体を形成している。さらに、ペプチドグルタミナーゼ I 以外はすべて糖鎖が付加されるタンパク質である。このようなタンパク質の構造の違いが基質特異性だけでなく、耐熱性、耐塩性、pH 安定性などの酵素特性に影響しているのかもしれない。

(5) AsGahB タンパク質の特異的なタンパク質部分分解解析

(2)の項で記載したとおり、細胞壁溶解酵素により菌体表面から遊離させて AsGahB タンパク質を精製すると、AsGahA タンパク質と同様に特異的な部分分解を受けた。第2章で、AsGahA タンパク質の部分分解は、黄麹菌の生産するタンパク質分解酵素によると考察した。そこで、AsGahB タンパク質も同様な現象で部分分解を受けるか検証した。

表3-8 CaGahAタンパク質の脱アミド化活性

基質	比活性 ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	相対活性 (%)
L-Gln	412.8 \pm 52.6	100
L-Gly-Gln	567.3 \pm 23.7	137
L-Ala-Gln	397.8 \pm 86.3	96
L-Leu-Gly-Gln	407.8 \pm 47.3	99
L-Pro-Leu-Gly-Gln	372.7 \pm 31.7	90
L-Asn	31.1 \pm 1.3	7.5
L-Gly-Asn	11.2 \pm 1.9	2.7
L-Leu-Ala-Asn	1.0 \pm 0.1	0.2
L-Leu-Gly-Asn	6.7 \pm 0.2	1.6
L-Pro-Leu-Gly-Asn	5.2 \pm 1.0	1.4

遺伝子クローニングのために精製したCaGahAタンパク質を用いて測定した。脱アミド化活性は、各基質と反応させた後に遊離するアンモニア量を定量して測定した。

精製 AsGahB タンパク質に黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 株を培養したフスマ麴の抽出液を *in vitro* で作用させると、AsGahA タンパク質と同様に部分分解を受けた(図 3-13(A))。しかし、煮沸して酵素を失活させたフスマ麴抽出液やプロテアーゼ阻害剤カクテルを添加すると部分分解されなかった(図 3-13(A))。さらに、プロテアーゼ阻害剤を対象プロテアーゼの種類別に個別に添加すると、セリンプロテアーゼ阻害剤を添加したときに部分分解が阻害された(図 3-13(A))。この現象は、精製 AsGahA タンパク質でも同様であった(図 3-14)。

次に、黄麹菌の生産する主なセリンプロテアーゼであるアルカリプロテアーゼ AlpA とそのホモログタンパク質である AlpB の遺伝子破壊株、アオルシン I (Aor I) の遺伝子とそのホモログタンパク質の Aor II の遺伝子破壊株を培養したフスマ麴抽出液を用いると、*alpA* 遺伝子破壊株($\Delta alpA$)のフスマ麴抽出液では、部分分解が起こらなかった(図 3-13B)。この $\Delta alpA$ 株の効果は、*A. sojae* での破壊株でも同様の結果であった(データ未掲載)。このことから AsGahB タンパク質は黄麹菌の生産するアルカリプロテアーゼによって部分分解を受けることが明らかになった。プロテアーゼなどは、生体内で自身のタンパク質を分解しないために前駆体(未成熟型)として存在し、菌体外に分泌された後にプロセッシングを受け、成熟型となり活性を持つ。精製 AsGahB タンパク質は、AsGahA タンパク質と比較して、ペプチドへの反応性が著しく低い。これは AsGahA タンパク質が部分分解(プロセッシング)を受けて、成熟型となり、ペプチドへの反応性が向上したからではないかと考えた。そこで、精製 AsGahB タンパク質にフスマ麴抽出液を作用させて、ペプチドへの反応性を調べた。しかし、ペプチドへの反応性は向上しなかった(データ未掲載)。さらに、その他の酵素学的な諸性質(至適 pH、pH 安定性、至適温度、耐熱性、耐塩性)の変化もなかった(データ未掲載)。以上の結果から、この AsGahB タンパク質の部分分解はタンパク質の機能的な成熟化のためのプロセッシングではないと考えられる。

AsGahB タンパク質の部分分解を受けた後の N 末配列を決定した結果、ESDASLST(Glu¹²⁶–Thr¹³³と一致)であった。興味深いことに、AsGahA タンパク質と AsGahB タンパク質の N 末端領域の相同性は低いにも関わらず、この AsGahB タンパク質の切断部位は、AsGahA タンパク質の部分分解を受けた切断部位と 1 次構造上かなり近傍に位置していた(図 3-15)。

第 1 章で、*Cryptococcus* 属のペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼである CnGahA タンパク質の部分分解には、Kex2p プロテアーゼが関与している可能性を考察した。しかし、AsGahA および AsGahB タンパク質の切断部位周辺には、Kex2p プロテアーゼ認識部位は存在しなかった。アルカリプロテアーゼはエンド型のセリンプロテアーゼで非特異的にタンパク質を分解する²⁰⁾。部分分解後に残ったタンパク質領域は、アミダーゼモチーフを含みグルタミナーゼ活性に必須なコア領域と考えられ、タンパク質分解酵素に対してもある程度の耐性を持っているのかもしれない。AsGahB タンパク質や AsGahA タンパク質は、N 末ドメイン、触媒ドメインなどのドメイン構造を形成し、それぞれのドメインはリンカーで繋がっており、そのリンカー部分がタンパク質分解酵素によって切断された可能性も考えられる。AsGahA タンパク質および AsGahB タンパク質はペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼ

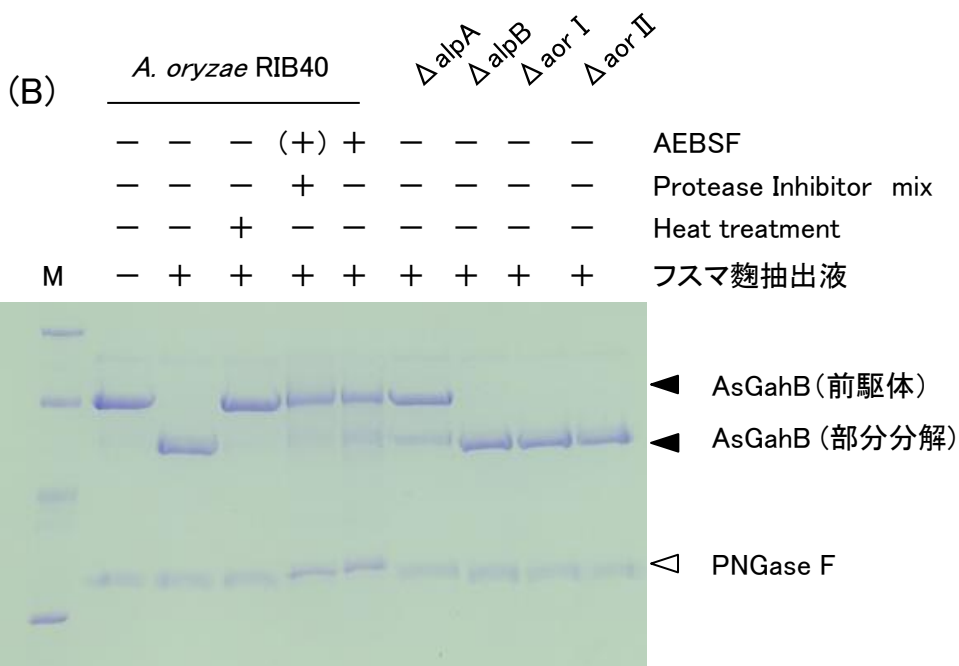
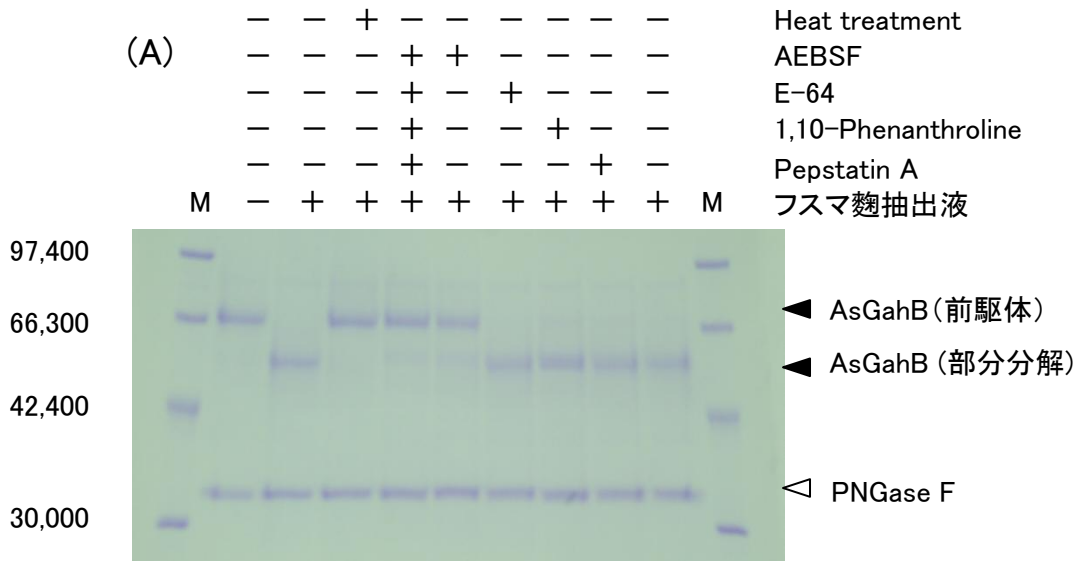


図3-13 精製AsGahBタンパク質を用いた*in vitro*における特異的なタンパク質部分分解
 (A)精製AsGahBタンパク質と*A. oryzae* RIB40株(野生株)由来のフスマ麴抽出液とを各プロテアーゼ阻害剤の存在、非存在下で*in vitro*で30°C、16時間反応させた。反応後、脱糖鎖処理して、SDS-PAGEを行った。煮沸してタンパク質分解酵素を失活させたフスマ麴抽出液をネガティブコントロールとして使用した。◁は脱糖鎖処理に使用したPNGaseFを表す。
 (B) 精製AsGahBタンパク質と*A. oryzae* RIB40株由来の各プロテアーゼ破壊株のフスマ麴抽出液とを(A)と同様に反応させた。Protease Inhibitor mixには、AEBSFが含まれるため(+)と表記する。

	-	-	-	(+)	+	AEBSF
	-	-	-	+	-	Protease Inhibitor mix
	-	-	+	-	-	Heat treatment
M	-	+	+	+	+	Extraction from wheat bran

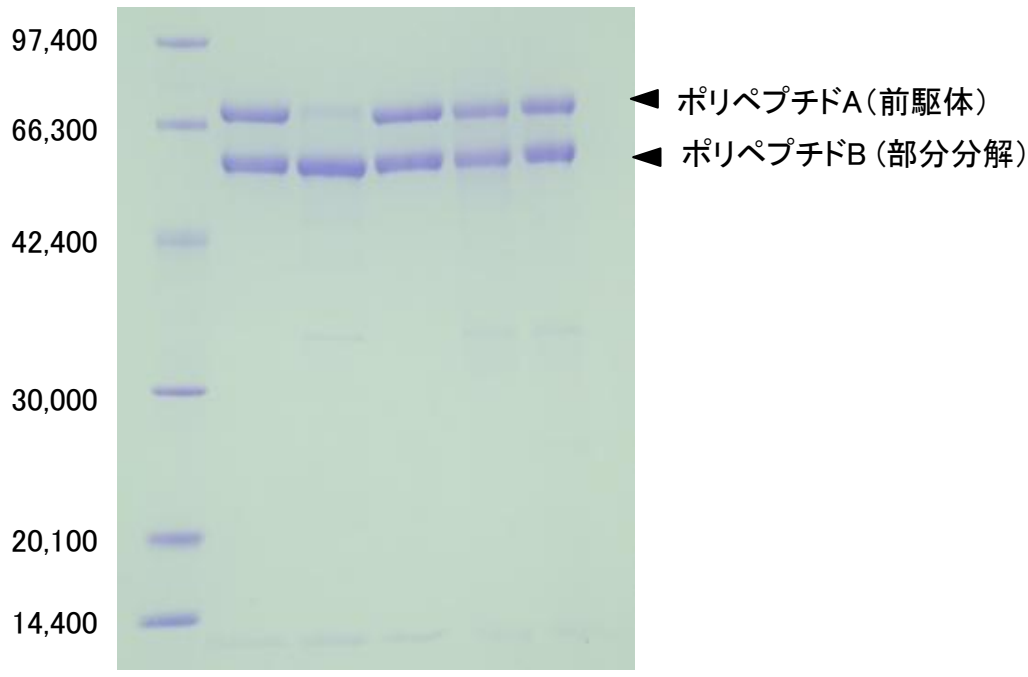


図3-14 精製AsGahAタンパク質を用いた*in vitro*における特異的なタンパク質部分分解
 精製AsGahAタンパク質を*A. oryzae* RIB40株由来のフスマ麴抽出液とを*in vitro*で30°C、16時間反応させた。反応後、SDS-PAGEを行ってタンパク質を分離した。

AsGahA	1	MFLSTLLSL-AAVVAGAAIPNGQTL	SLNDIPYYVSGIPVSTLQGYNASAYAALTKGIDL	DLV	59			
AsGahB	1	MLSSVLLVLFSAAVGAKTVPNGQTL	TLNGIPYYLSGIPIS---	NFSHNVFDKASDDVDIF	57			
AsGahA	60	PLTVIPVTFPTN---	LESLLSDYVERDDVFQPAFLRAVYL	TASTADDIDSQLSNYASILK	116			
AsGahB	58	PFTVIQTSSTVHSSFLSETIANFTQQ	DDVFQSAFLQTVYVTS	DETSRITELSG-SEALH	116			
AsGahA	117	SSGTDVLLVDSEVHTASSDSTITAQL	TKELPSGPYFVSLYTGEVFRAYRLYP	PDDNLAFIQ	176			
AsGahB	117	QFDNKMLLT-----	ESDASLSTPL---	PNGPYFASARTGHIFRAYRLYADDSLAFIS	165			
AsGahA	177	AGISDEKGGVLPPLPAVTENAMTKD	VAVPSRLYYTPTAEKPLAGLRL	GVKDIYHVKGLKTS	236			
AsGahB	166	AAISDENDGFIPMTGVTEGMVKNV	VAVPSRLYYTPTTEKPLAGLRL	AVKDIYHVKGLRIS	225			
AsGahA	237	GGRSYYYLYGTQNVTA	PSIQRLDLGAVFVGK	TGTVQFANGDRPTADWVDFHCPFNPRG	296			
AsGahB	226	GGSRAYYYLYDEQNVTP	PSVQRLFDLGAIMVGK	VGTVQFANGDRPTADWVDLHCPFNPRG	285			
AsGahA	297	EGYQAPSGSSSGSVAIAAYD	WLDLAVGSDTGGSMRSPAAVQ	GTIGNRPSTGAISLDHVL	356			
AsGahB	286	DGYQYPSGSSSGSAAIAAYE	WLDLAVGSDTGGSMRGPAGVQ	GYIGNRPSTGAITLEHAL	345			
AsGahA	357	PLSPALDTAGVFARSASLWSHT	VQAWYPHLQHNFTSFPRQLL	LAGGWDGKGISPEAHQS	416			
AsGahB	346	PLSPPLDTAGMFARSASLWSK	TVQAWYPNFNRSFSPHPKQ	LYLSRSNWDE-STAPEANEH	404			
AsGahA	417	LTTFTRGLEAFLG	TNHTNVDVSRWLDTHSPTT	PSLEMLNLT	YATLTSVDQFNHLAVPL	476		
AsGahB	405	LETFMQRLED	DFLDTNRTIVNVTERWSE	THSS--PSLINL	NLT	YAYLVGVGQWNNLAKGF	462	
AsGahA	477	FADYKAVHRGRQ	PFINPGPLARWQWGQANGNT	SYDAALRNMTTFRN	WWEKSGYGQSDNA	536		
AsGahB	463	FADYQAQHDGRR	PFINPGPLARWQWGQANGN	ASYDAALHNMTVFRD	WWSTSGYGRSDND	522		
AsGahA	537	SCSRSLFVSVY	SVGTTDYRNQY	YEAP	TPPLGFSIGRIA	VLGGAPEVVVPV	GESPYNSTI	596
AsGahB	523	SCSEGI	FVHAWATGAADYRNRY	FNPPG-PPFG	FTDDDI	IAIFAGAPEVVVPL	GESPYNSTI	581
AsGahA	597	SLQTEYLPVSV	ALQMARGCDHVLAS	ILVAGLEKKGVLR	VPVSTGSRLYS		643	
AsGahB	582	TLHKEYLPVSI	GLQMARGCDRALAE	LVDDLKAGILK	VPVSTGSRLYS		628	

図3-15 AsGahAタンパク質とAsGahBタンパク質のアミノ酸配列比較

黒の網掛けは同一のアミノ酸を表す。黒塗り三角印(▲, ▼)はNativeなタンパク質のN末アミノ酸配列部位、白塗り三角印(△, ▽)は、特異的なタンパク質部分分解を受けた後のN末アミノ酸配列部位を表す。灰色の網掛けは、同定されたN末アミノ酸配列を表す。

という新しいカテゴリーのタンパク質であり、その中でも基質特異性に多様性が見られる。結晶構造解析を行うことで、ドメイン構造、酵素学的諸性質や基質特異性の違いなどが分かるかもしれない。

第2章でAsGahAタンパク質の局在性について、菌体表面に一度ゆるく結合した後に黄麹菌自身の生産するタンパク質分解酵素によって部分分解を受け、菌体から遊離するモデルを考察した。AsGahAタンパク質とAsGahBタンパク質は、共にそのアミノ酸配列から菌体外の分泌タンパク質として局在性が予測される。黄麹菌 *A. oryzae* を液体培養するとアルカリプロテアーゼは、培養初期から培養後期にかけて、転写量が上昇する⁹²⁾。また、しょうゆ麹においてはアルカリプロテアーゼ活性が培養の後期に上昇することが明らかになっている²⁷⁾。

AoOE_AsgahA株と同様に、AoOE_AsgahB株を固体培養すると菌体外に主要な活性を検出できるが、菌体結合型のグルタミナーゼ活性は対照株より有意に高く、AsGahBタンパク質の一部が菌体表面(細胞壁)に結合していると考えられる(データ未掲載)。以上の結果および考察から、AsGahBタンパク質も、菌体に一時的に結合し、その後、自身のアルカリプロテアーゼによって部分分解を受け、遊離するのではないかと考えられる。

しかし、高濃度のフスマ麹抽出液を *in vitro* で作用させると、AsGahAタンパク質およびAsGahBタンパク質は共に完全に消失し、活性もほとんど検出できなくなった(データ未掲載)。また、 Δ alpA株の抽出液でも完全に部分分解が抑制されるわけではなかった(データ未掲載)。さらに、 Δ alpA株の菌体結合型のグルタミナーゼ活性は、対照と比較してほとんど変化しなかった(データ未掲載)。今回の *in vitro* での反応条件下で、アルカリプロテアーゼが最も反応しやすかっただけなのかもしれない。また、現時点で、AsGahAタンパク質およびAsGahBタンパク質が分泌された後にプロテアーゼによる切断を受けている可能性を否定できない。固体培養後の酵素抽出時に切断を受けている可能性も考えられる。そのため、細胞表面から黄麹菌自身の生産するプロテアーゼによる自己消化によって遊離してくるかは未だ不明のままである。

しかし、先の局在性のモデルが正しいと仮定すると、以下のような考察ができる。至適pHをアルカリ側にもつ黄麹菌のグルタミナーゼは、諸味初期(中性からややアルカリ側のpH)にアルカリプロテアーゼと共同して効率的に働く。つまり、黄麹菌のアルカリプロテアーゼによって、菌体表面から遊離することにより、黄麹菌のタンパク質分解酵素による原料タンパク質の分解によって生じた基質(グルタミンやC末端にグルタミンを含むペプチド)に作用しやすくなる。しかし、自身のタンパク質分解酵素により徐々に分解され、やがて活性を失う。遊離型のグルタミナーゼは、菌体結合型のグルタミナーゼと比較して、タンパク質安定性が悪く、プロテアーゼによるタンパク質分解を受けやすい²⁶⁾。一方、菌体結合型グルタミナーゼは遊離型と比較して、タンパク質分解酵素に対して耐性である。そのため、菌体周辺の基質に対して反応しながら、徐々にアルカリプロテアーゼにより遊離され、諸味後期まで作用する。それ故に、しょうゆ諸味中のグルタミン酸と黄麹菌の菌体結合型グルタミナーゼ活性とに正の相関があったのかもしれない。これは、高窒素かつ高グ

ルタミン酸含量のうま味の強いしょうゆを作るために、高プロテアーゼ活性かつ高グルタミナーゼ活性の株が人為的に選抜されてきた、いわゆる家畜化によって起きた結果かもしれない。

グルタミナーゼ遺伝子破壊解析から固体培養における主要なグルタミナーゼ活性は、*gahB* 遺伝子由来であることを本章で明らかにした。黄麹菌 *A. oryzae* および *A. sojae* のグルタミナーゼ活性は液体培養より固体培養の方が著しく高い活性を示すことが知られている³¹⁾。また、筆者は、Wang らが解析した *A. oryzae* での固体培養(寒天培養)と液体培養の RNA-Seq を用いた発現比較解析データ⁹³⁾から、*AogahB* 遺伝子(A0090011000310)は液体培養に比べて固体培養での発現量が 2⁶ 倍多いことを見出した。グルタミナーゼ遺伝子の発現量はとても低く、検証できていないが、固体培養に比べて液体培養でグルタミナーゼ活性が低い一因に転写レベルでの制御があると推測している。すなわち、液体培養は固体培養よりもさらに発現量が低いと考えられる。そのため、これらの結果は「GahB タンパク質が固体培養における主要なグルタミナーゼである」とする今回の結果を支持するのではないかと考えている。

本研究で、*AsgahB* 遺伝子破壊株は全グルタミナーゼ活性と同様に菌体結合型のグルタミナーゼ活性も対照株と比較して著しく低下していた(データ未掲載)。しょうゆ醸造では GahB タンパク質がしょうゆ中のグルタミン酸生成に関わっている可能性があり、最も重要なグルタミナーゼである可能性が考えられる。この GahB タンパク質がしょうゆ醸造におけるグルタミン酸生成に関与しているか否かについては、本章で得られた *AsgahB* 遺伝子破壊株を用いてしょうゆの試験醸造を行った次章で議論する。

第4章 しょうゆ醸造におけるグルタミン酸生成に関わる黄麹菌由来のグルタミナーゼの同定

【はじめに】

第3章において、黄麹菌ゲノム配列情報を活用し、既知のグルタミナーゼと相同性のある遺伝子を探索した結果、*A. oryzae* RIB40 株と *A. sojae* NBRC4239 株には、それぞれ4つのタイプに分かれて、12個および10個のグルタミナーゼ遺伝子が存在した。また、遺伝子破壊解析の結果、*gahB* 遺伝子由来のグルタミナーゼがしょうゆ麹における主要なグルタミナーゼ活性を示すことを明らかにした。

黄麹菌は、複数のグルタミナーゼ遺伝子を持ち、そのいくつかは生産されることが明らかになっているが、どのグルタミナーゼがしょうゆ醸造で作用するかについての直接的な証明はされていない。

しょうゆ醸造において、過剰な黄麹菌の酵素は、火入れ迄の増加につながり⁴¹⁻⁴³⁾、しょうゆの歩留まりを低下させるため、しょうゆ醸造中で作用する酵素のみを黄麹菌に生産させる必要がある。従って、しょうゆのグルタミン酸含量を高めるためには、真にしょうゆ醸造で作用するグルタミナーゼを特定し、そのグルタミナーゼを強化した黄麹菌を育種することが望ましい。

黄麹菌の菌体結合型グルタミナーゼ活性としょうゆ諸味のグルタミン酸量との間には、正の相関がある²⁷⁾。そのため、グルタミナーゼ遺伝子を破壊し、その遺伝子由来のグルタミナーゼを生産しない黄麹菌を用いてしょうゆ醸造を行い、しょうゆ中のグルタミン酸含量が低下すれば、しょうゆ醸造で作用するグルタミナーゼを特定できると考えた。

本章では、しょうゆ醸造におけるグルタミン酸生成に寄与する黄麹菌グルタミナーゼを直接的に明らかにすることを目的に、第3章で作製した各グルタミナーゼ遺伝子の単独破壊株を用いてしょうゆの試験醸造を行った。しかし、詳細は後述するが、単独遺伝子破壊株を用いたしょうゆのグルタミン酸含量は低下しなかった。複数のグルタミナーゼが作用すると考え、各グルタミナーゼ遺伝子を複数同時に破壊した多重遺伝子破壊株を作製し、それらを用いたしょうゆの試験醸造を行った。その結果、しょうゆ醸造では酵素特性の異なる4つのグルタミナーゼが相補的かつ相互に作用することが明らかになった。さらに、高いグルタミン酸含量のしょうゆを得るためには、第2章および第3章で明らかにしたペプチドグルタミナーゼ活性を持つグルタミナーゼが重要であることを見出した。

【実験の材料と方法】

(1) 実験に使用した株および培地

各種遺伝子の単離には、*Aspergillus sojae* NBRC4241 株を使用した。破壊株用の宿主には、*A. sojae* NBRC4241 株由来の *A. sojae* BM-7 株を使用した。また、*A. sojae* KuP8 株をグルタミナーゼ活性測定およびしょうゆ試験醸造の対照株として使用した(第 3 章参照)。使用した菌株は、実験に使用した菌株リストに記載する。PD 培地、DPY 液体培地、フスマ麴培地、しょうゆ麴様培地、ツアペックードックス(Gz)最少培地、Gz-5FOA 培地は第 2, 3 章と同様に調製した。液体麴培地は、2.5%小麦フスマ、0.5%脱脂大豆ミール、0.1%KH₂PO₄、0.4%大豆油を混合しオートクレーブを用いて 121°C、30 分間滅菌した。大豆油は、別容器で 121°C、60 分間滅菌したものを後から添加して使用した。

(2) DNA、RNA 操作

染色体 DNA 抽出、PCR、サザンブロット解析は、第 2、3 章と同様に行った。遺伝子破壊のための融合 PCR と遺伝子破壊(ターゲティング)の確認には、それぞれ KOD-plus(東洋紡)および Ex-taq polymerase(タカラバイオ)を用いた。

(3) グルタミナーゼ遺伝子破壊株の作製

アミダーゼ等のグルタミナーゼ反応を示す可能性のあった 19 遺伝子の単独破壊株は第 3 章と同様に作製した。実験に使用したプライマーは表 4-2 にまとめる。グルタミナーゼ多重遺伝子破壊株の作製は、ループアウトによるマーカー遺伝子(*pyrG* 遺伝子)の除去と再利用を繰り返して作製した(図 4-1)。

多重遺伝子破壊株作製用カセットは、以下のように作製した(図 4-2)。第 3 章で作製した各単独遺伝子破壊株の染色体 DNA を鋳型として表 4-1 に記載した X-Nest_F1 と X-Nest_R1(X は各遺伝子名を表す)を用いて PCR により DNA を増幅した。得られた DNA 断片を Target Clone-plus-(東洋坊)を用いて pTA2.1 ベクター(東洋坊)にクローニングした。形質転換した *E. coli* よりプラスミド DNA を QIAprep Spin Miniprep Kit(キアゲン)を用いて抽出、精製した。得られたプラスミド DNA を鋳型にして、プライマー AspYrG4359_R と X_Infusion Right_F を用いて PCR により増幅させ、Inverse PCR 断片を得た。次に、各グルタミナーゼ遺伝子の 5' 上流領域を X_Infusion_F1 と X_Infusion_R1 のプライマーセットで PCR により DNA を増幅した。得られた増幅断片と先の Inverse PCR 断片とを In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit(タカラバイオ)を用いて連結させた。続いて、得られたプラスミドを鋳型として、X-Nest_F1 と X-Nest_R1 のプライマーセットで PCR により増幅させた DNA 断片をグルタミナーゼ遺伝子破壊カセットとした。この遺伝子破壊カセットを用いて、*A. sojae* BM-7 株を形質転換させ、遺伝子破壊株を得た。

遺伝子破壊(ターゲティング)は、X_Left_F1 と AspYrG4359_R、AsPyrG2552_F と X_Right_R1 および X_Left_F1 と X_Right_R1 のプライマーセットで PCR により目的の大きさに DNA が増

表4-1-1 実験に使用したプライマー

Primer name	Oligonucleotide sequence (5'→3')
Primers used for the disruption of asparaginase genes	
AsAsnA Left_F1	CGTTTTGGTCATTGCAACTACGCTT
AsAsnA Left_R1P	ATAGCAATAAGCCCAAGGTTATAAAGTGCTTCCAAGTTCAGTCTC
AsAsnA Right_F1P	TTTTCTTCTGAGGTGCGGGATTTTGTTAGGGTTGGAGTTGCGT
AsAsnA Right_R1	TGCGGGAAGCACTGCCTTT
AsAsnA Nest_F1	CGTTGCCCTTTGGCTTTGAGGAATG
AsAsnA Nest_R1	AGGCATCTTTGTACCTCGACCTGA
AsAsnB Left_F1	GCGGCAGACGCGTATATAAGGG
AsAsnB Left_R1P	TCAGGGACATAGCAATAAGCCCAACCTTGCCGCTCCTACAACGA
AsAsnB Right_F1P	TTCTTCTGAGGTGCGGCCGAGGAATTAATTTCTGTCTAGATCC
AsAsnB Right_R1	CATCCACTGTGGTTCATATCGTG
AsAsnB Nest_F1	GACGATACCCTGCAGCCATAGGAG
AsAsnB Nest_R1	GCTTTGCCACACAATATTGAATGCTAGA
AsAsnC Left_F1	TCGGTGGTGCTTTCTGTATGGGT
AsAsnC Left_R1P	ACATAGCAATAAGCCCAAGGGAAGCGGGTCTTATATGCAGGTT
AsAsnC Right_F1P	TTTCTTCTGAGGTGCGGAGTCACTTTAAGGCAAGAAGACGAGA
AsAsnC Right_R1	C CGAATTCATTAGAGCAAGCCTCAAG
AsAsnC Nest_F1	CGGGCTAATAAGATGAACTATAGGCA
AsAsnC Nest_R1	GCAGAAGAGAGCAAAAATGGGAAAG
AsAsnD Left_F1	TCTAAATTTGCCCTTGTCCCAATGCC
AsAsnD Left_R1P	AGCAATAAGCCCAAGTACCTTTTGTAGATACAGAACCCTCGTAG
AsAsnD Right_F1P	CCTTTTCTTCTGAGGTGCGGTGCTGACCAAATCATTGGCGTTC
AsAsnD Right_R1	ACAATACAGAGCGTTATCAACATCGCATTC
AsAsnD Nest_F1	CTTGATCGAACAGGATCTTGTACG
AsAsnD Nest_R1	CCTACAAGTTCCTTGAATGCCAC
AsAsnE Left_F1	CATCTCCGGGTACGAAAGCCGTCTTG
AsAsnE Left_R1P	CATAGCAATAAGCCC AATCAACTAACAGCCTTGATGGTGGACTGTG
AsAsnE Right_F1P	TTCTTCTGAGGTGCGGAATTGCTTTCTGCAAGAGACGTACGA
AsAsnE Right_R1	TGGAGAATCATGATAATGCGCTTCCA
AsAsnE Nest_F1	GGACGGACATTTCTGAATTTTCCCT
AsAsnE Nest_R1	TGGGGCAATGCTAACTGACACAC
Primers used for the disruption of the fructose-6-phosphate amidotransferase genes	
AsGfaA Left_F1	GAGTTATGCGCTATTGGTGTTCTGG
AsGfaA Left_R1P	GACATAGCAATAAGCCCAAATTACAGGAAATCGATGACCCCACTT
AsGfaA Right_F1P	TTCTTCTGAGGTGCGGGGCTTCGTATTGGAGTAAACGATTG
AsGfaA Right_R1	TTCCGCATGAAGATAGTTTTGGTGTC
AsGfaA Nest_F1	CTGGGAATAAAGTAACATTTCCGATCTG
AsGfaA Nest_R1	GTTCTGCACAATCTTAAGAGATCTATAGCC
AsGfaB Left_F1	TGAGGGTCTAAAATTGGACTGAACC
AsGfaB Left_R1P	GGACATAGCAATAAGCCCAACCTCCGGATGTTGAAAGCAAGTC
AsGfaB Right_F1P	TTCTTCTGAGGTGCGGAGTTGCAGAGTCTTATCGAGAACTCTTAC
AsGfaB Right_R1	CGGTAGAGGAAGAGAGCAGATCC
AsGfaB Nest_F1	CAAGTAGGAGTTAGATGACGATGGTGAGAC
AsGfaB Nest_R1	CAGTAGGGTTGTATATGGTCCCTCAAC
Primers used for the disruption of glutamate synthase gene	
AsGltA Left_F1	CAAATTTACGGACTGGAGGGGCGAGTT
AsGltA Left_R1P	GGACATAGCAATAAGCCCAACGGGTTGGAGAAGCGTATAGATGTG
AsGltA Right_F1P	TCTTCTGAGGTGCGGGCAGTTACATTGACATGTTAGCAACAATGG
AsGltA Right_R1	CTGCGTTGACTACGCATTTCTG
AsGltA Nest_F1	ACGACCTATAAAGGAAGCCCTCGGAAT
AsGltA Nest_R1	GGCCTAGTAGTGAGGATGTCTGGGATCTC
Primers used for the disruption of N-terminal amidase genes	
AsNtaA Left_F1	ATGGCGCTTTCTCTATCAAACCTCTAC
AsNtaA Left_R1P	GGGACATAGCAATAAGCCCAACTGGTTCGCCATACGCAGAACAG
AsNtaA Right_F1P	TCCTTTTCTTCTGAGGTGCGGGCGGCAATCTGAATGCTCCTAC
AsNtaA Right_R1	CCATTGAGATGTCATGTGTCGAA
AsNtaA Nest_F1	CCCCGAGGCAGTTTCTCTTCGT
AsNtaA Nest_R1	TTTCCCCGGGTCTGCAGTGTTCT

表4-1-2 実験に使用したプライマー

Primer name	Oligonucleotide sequence (5'→3')
Primers used for the disruption of amidase genes	
AsamidA Left_F1	TCCATAAATCCAGCGCCTCTAGGT
AsamidA Left_R1P	ATAGCAATAAGCCCAACTCATTCCAGGTCTATGCGGGCTAA
AsamidA Right_F1P	TCTTCTGAGGTGCGGGGCCATGCATACTGTTGTGATCTGGT
AsamidA Right_R1	CGAGAAGAAAAGATGGGTCCGCGATT
AsamidA Nest_F1	CACAGTCTCTGTTTCATGTCCAAGGT
AsamidA Nest_R1	TCGTGGTGTCACTTCTTTGAGTGT
AsamidB Left_F1	AGGTGCATTCAAAACCCATAGACAC
AsamidB Left_R1P	TAGCAATAAGCCCAAGCTTCCATGTTTGGAGGTCGTTT
AsamidB Right_F1P	TCTTCTGAGGTGCGGGTTGGGAATTAAGCATTGTCCCTTG
AsamidB Right_R1	CGATCCCACATTATCAGAACACTT
AsamidB Nest_F1	AAGTGTTCGCTTGATCTTCCGAAA
AsamidB Nest_R1	AAGATCAACATGAAACCTCAGCTGT
Primers used for the disruption of glutamine dehydrogenase genes	
AsGdhA Left_F1	TGTATGTACGGCGCGCTAGTGTCT
AsGdhA Left_R1P	GGACATAGCAATAAGCCCAAGTCGGACGAGAAGAGGGTGGGAA
AsGdhA Right_F1P	TTCTTCTGAGGTGCGGTGATTACGCTCCATTGATACCTCTG
AsGdhA Right_R1	AGTCCCGTCATGACAGCGTACGAC
AsGdhA Nest_F1	TTATAACCAACACGACGCCGTTTGCAC
AsGdhA Nest_R1	CGAAATGCCGTTTGC AAAGTCACTACTGG
AsGdhB Left_F1	TTTGTGGAGATTACCTCATCGACTCA
AsGdhB Left_R1P	ATAGCAATAAGCCCAACCTTTTCCAGATACTACGTGTCTCTACTC
AsGdhB Right_F1P	TTCTTCTGAGGTGCGGATGACTGCACATAGGCAGTGTCTACA
AsGdhB Right_R1	CGTAAGCACGCCAACC GATATTATGACAG
AsGdhB Nest_F1	ACTGCCCTTCAACAGTTGAGGTAAG
AsGdhB Nest_R1	CTGCGACATGCCCGAGAAAAGTATGG
Primers used for the disruption of glutamine synthetase genes	
AsGlnA Left_F1	TCAGTATGACAAGGCACATATCGAG
AsGlnA Left_R1P	ATAGCAATAAGCCCAATTCTCGCATAGAATAAAGACGACA
AsGlnA Right_F1P	TTCTTCTGAGGTGCGGCCGTACAACCTCTGCTATGCAGTTC
AsGlnA Right_R1	CCGCTACTCCTTGGTATCGTCATC
AsGlnA Nest_F1	CTATAAGCCATGCGCCCAATCTACC
AsGlnA Nest_R1	CCGACAATTCCAGGCGAACACCC
AsGlnB Left_F1	CAGTTAGCTACCCCTTCTGAGCAAGT
AsGlnB Left_R1P	CATAGCAATAAGCCCAACTTGCCCATTTGCCAGTCCACATC
AsGlnB Right_F1P	TTCTTCTGAGGTGCGGAGCTCCAAAGTTTCCGGGTAGTCC
AsGlnB Right_R1	CTCACGGATGTGCTTGGTCTCTG
AsGlnB Nest_F1	ACCGTACGATGATTATCAGTCAAG
AsGlnB Nest_R1	AGTCTGGTTC AACCTGATAGGCA
AsGlnE Left_F1	TTGTTTGTGGAAGGGGAGAGTGTG
AsGlnE Left_R1P	GGACATAGCAATAAGCCCAACGAGAGGTTCTCTAATGTGGCGTTT
AsGlnE Right_F1P	TCTTCTGAGGTGCGGGTTTAAAGCGGTACATTGAGACGGGTGTA
AsGlnE Right_R1	TGGAGAATCATGATAATGCCTTCCA
AsGlnE Nest_F1	GGACGGACATCTCTGAATTTTCCCT
AsGlnE Nest_R1	TGGGGCAATGCTAACTGACACAC
Primers used for the disruption of Asp-tRNA Asn/Glu-tRNA Gln amidotransferase genes	
AsGatA Left_F1	CAATCTGCTCGGGATGAGCAGAA
AsGatA Left_R1P	ACATAGCAATAAGCCCAACCGAAAAGGTACTCATCGAAGATACGTG
AsGatA Right_F1P	CCTTTTCTTCTGAGGTGCGGATCCGCAAAACATTTACAGCCTCATCC
AsGatA Right_R1	GCGCATCATGGACAGAAAAGTTCA
AsGatA Nest_F1	ATTGTGACACCAGATACCCCATTAACAGAC
AsGatA Nest_R1	TCTCTCAATGAACGGCTTATAGACAGCTAC
AsGatB Left_F1	TATCCTCTAGCCCGGCTGTCTCT
AsGatB Left_R1P	GACATAGCAATAAGCCCAACAATCGGCGTAGGCAACATTCTCTC
AsGatB Right_F1P	CTTTTCTTCTGAGGTGCGGAACTTCTTAAAGTAAAGCCCTCTGT
AsGatB Right_R1	ACCTTACTTTCTGCCCATTTGAG
AsGatB Nest_F1	CITTATTGTTCTGATCTTCCCGAACT
AsGatB Nest_R1	AACCTGAGGCATCCACAACCTGTC
AsGatE Left_F1	CATGAGCCAGAGAAAAGAAGCATCCA
AsGatE Left_R1P	CATAGCAATAAGCCCAATGGTACCCATTTTTCGAAAACAGTTCCAC
AsGatE Right_F1P	TCCTTTTCTTCTGAGGTGCGGGGAGGTTCTTCTGGTAACCAAGA
AsGatE Right_R1	TGTGACCATGCAAAAACCAACTGTG
AsGatE Nest_F1	CAGGCTGGTATTGTGAGAATGACCTAGT
AsGatE Nest_R1	GCTTGAAGAAGCGTACACCAACCTG

表4-1-3 実験に使用したプライマー

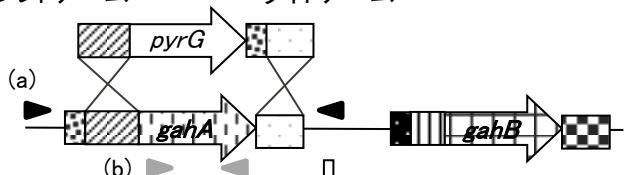
Primer name	Oligonucleotide sequence (5'→3')
Primers used for the multiple glutaminase gene disruption	
AsgahA Left_F1	TCCAGGACAGGCAGCGCATGAATGGCAATCC
AsgahA In fusion_F1	CTTCTGAGGTGCGGTCACCTTTAACACTCCAAGACAACCGTAGA
AsgahA In fusion_R1	CCGCCCTTCATCGGTATGCAAGTACGAGAGGCTGGGAA
AsgahA In fusion Right_F	GATGAAGAGGCGGTATCAAGCTAGGGT
AsgahA Right_R1	CCCCAGTACTCGATATGCCTTTCTGTGCTTCT
AsgahA Nest_F1	GGCAGAAGGCCGTATGATTTAGTCGT
AsgahA Nest_R1	AGTGTCTCTCACGATTTCCAAATTC
AsgahA_del_Check_F1	GGGGAATTCATGTTTCTTAGTACACTCCTCTCACTGG
AsgahA_del_Check_R1	AAACCCGGTTAGGAGTATAGCGAGAGCC
AsgahA_loopout_Check_F1	TGCTCAGCCCGTACACTGGCGAGTT
AsgahA_loopout_Check_R1	CCCCAGTACTCGATATGCCTTTCTGTGCTTCT
AsgahB Left_F1	CCGAAATGCATAGCCGCGCTTTACCTGAAGCGT
AsgahB In fusion_F1	TCTTCTGAGGTGCGGGGATCAGATGATTTGGATGCTTCCCTTT
AsgahB In fusion_R1	CACGTAGTCAGGTGTGACGAGGTGGTAATAACTCACTTGG
AsgahB In fusion Right_F	ACACTCGACTCAGTGAGAAGACAGTTTCC
AsgahB Right_R1	GCATTGGCATCTGGGGAAGTTCGTACAGC
AsgahB Nest_F1	GCAGGTGTAICTCGGTGGAGATTCCG
AsgahB Nest_R1	CAGAAGCTTTCAGGAAGGTATGAGAATTACTTAACGG
AsgahB_del_Check_F1	AAAGAATTCATGCTCTCCTCTGTTCTCCTCGTCCCTTCTCTC
AsgahB_del_Check_R1	TACCCGGGTTAAGAATATAACCTCGAGCCCGCAGAAACAG
AsgahD Left_F1	AGTCATGGGAGGGGTTGAGCTTATCTAGAAGCTTG
AsgahD In fusion_F1	CTTCTGAGGTGCGGCGGCCAGTATGGTGGAACTCACACA
AsgahD In fusion_R1	CCATTCTGTTGTCGTTCAATGGCTTGGGACACTGGGCTATC
AsgahD In fusion Right_F	GTCCCAAGCCAATGAACGACAACGAATGGGACAGACTGAC
AsgahD Right_R1	GGGAGCGCGATACATAGGTACTCAGCAACATGGACCTCT
AsgahD Nest_F1	GGAATAAACGACCACTTCGGGGTTAGG
AsgahD Nest_R1	CGAATGGTTACTGATTTCCCGATCACTC
AsgahD_del_Check_F1	ATGGTTTTCTGGAAGCAAATCTTCA
AsgahD_del_Check_R1	TTACCCGAAATAGGACAATCATGG
AsgahD_loopout_Check_F1	GTTGAAACATAGAGAGATTTAGGCCA
AsgahD_loopout_Check_R1	CAGGTCTGTTTTCCGCTTCAATATCTACC
AsggtA Left_F1	CTCTATCTGACGGAGACGTACATCACCT
AsggtA In fusion_F1	TCTTCTGAGGTGCGGCCCGGGGAAGTTAGATACCAACCATTCCAG
AsggtA In fusion_R1	AACAAGGTTAGGACCTAGGCGCTCAAATGATGTCAGTAATAGCC
AsggtA In fusion Right_F	GGTCTTAACTTGTACTTCTGCTG
AsggtA Right_R1	CCCGTCGCACATCACTTATAAACTG
AsggtA Nest_F1	TGCGAGAGAAGTAAATCAGGACATTTGGG
AsggtA Nest_R1	CGCAGGCATCGACATCAATCACAGA
AsggtA_del_Check_F1	GCATCTTTGCAATCCTCTCATCATGAAGGATGTACCCTGTGTGAATCCC
AsggtA_del_Check_R1	CAGTACCATCATATACTCTCCACCCTCAGACCAGCAGAAACCACAGAGT
AsggtC Left_F1	CAGATGAATTGGCTCGGTTTCTAGAGTTGG
AsggtC In fusion_F1	TCTTCTGAGGTGCGGGATCCAACACTCCGTTGACGTTGTCTAC
AsggtC In fusion_R1	TTTTGCAATGAGTTGGTTACACTGCTTGGTACGTCATGTCCCTTTC
AsggtC In fusion Right_F	CAACTCATTGCAAAAACGCCCTCACT
AsggtC Right_R1	ACAAGAAGCCAATGGGAACAACAGTACAAGCAACT
AsggtC Nest_F1	TGCAATGCAATAGGTATCCTGACCTAGCTGT
AsggtC Nest_R1	TCACGGCCTATACGGGGAACAAGG
AsggtC_del_Check_F1	GCATCTTTGCAATCCTCTCATCATGGATTGCAATGGGTAGAAGAGCAG
AsggtC_del_Check_R1	CAGTACCATCATATACTCTCCACCCTTACCAGAACTTGGCAGCGTGCA
AsggtD Left_F1	AATACCGAACCAGACGCAAGGTGG
AsggtD Left_R1P	GACATAGCAATAAGCCCAAGAAGTCCGGGTTCACTGAGTAG
AsggtD Right_F1P	TCTTTTCTTCTGAGGTGCGGGTGAATGGCTATTCCGGTGTCTGT
AsggtD Right_R1	CCTTTCGTGACCTACGTCACTTACGAGA
AsggtD Nest_F1	CTGGTTCCCTAGTGTGCGTACGGATAG
AsggtD Nest_R1	AATCTTACGGCAGTAGCTCTACAGAGTGA
AsgtaA Left_F1	TACTAGAATCAAGCGGTCAGCCAGTACGAC
AsgtaA In fusion_F1	TCTTCTGAGGTGCGGAGCGTAGTATATACTCATTACACCCCAAGA
AsgtaA In fusion_R1	TCATAGCCATGGTAAAGAACAATCATGGCCTGAGGCAAA
AsgtaA In fusion Right_F	TTACCATGGCTATGAGACCAAAATG
AsgtaA Right_R1	GGTGAACCAATTTGACGACCTCGAGTT
AsgtaA Nest_F1	GGTGAACCAAGTATGCTTGTGCTTCT
AsgtaA Nest_R1	CGAGGATGCAAGTTTGGACGCGGTTT
AsgtaA_del_Check_F1	GCATCTTTGCAATCCTCTCATCATGAAGGATGTACCCTGTGTGAATCCC
AsgtaA_del_Check_R1	CAGTACCATCATATACTCTCCACCCTTAGAGAATTAACAACGCAAAAGG
AsgtaA_loopout_Check_F1	CACAAGATGCCCAAGCGCAGTGACCTCAC
AsgtaA_loopout_Check_R1	CGATTGTGGAGAAGTTAATCTCACGTTAGCTG

表4-1-4 実験に使用したプライマー

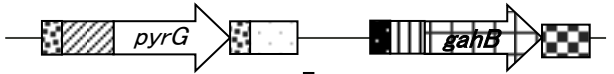
Primer name	Oligonucleotide sequence (5'→3')
AsgtaB Left_F1	GTGTAGTCGGGTACATTCCGGAGATTATTGGG
AsgtaB In fusion_F1	TCTTCTGAGGTGCGGGTGTAGTCGGGTACATTCCGGAGATTATTGGG
AsgtaB In fusion_R1	CATACCCGTCAAACCTACGTCTGAGTACCACATGCTGACTTGACTG
AsgtaB In fusion Right_F	AGTTTGACGGGTATGAATCCGAAAG
AsgtaB Right_R1	CGGCATGCATACCATCAACGAGAA
AsgtaB Nest_F1	TGCGCAACATGTGGCCCTTCTGAC
AsgtaB Nest_R1	ACAATCGACTCGTCCGCTCCCCATT
AsgtaB_del_Check_F1	GCATCTTTGCAATCCTCTCATCATGCGTTTATCCTTTGCAGTACTGACA
AsgtaB_del_Check_R1	CAGTACCATCATATACTCTCCACCCTTTACAATTGCGGATGACACTAAT
AsgtaB_loopout_Check_F1	GTCCGGCTACCCCTGATAATCAGTCC
AsgtaB_loopout_Check_R1	GCTTGTGATTGCTTCCCTGTGGAA
AsgtaC Left_F1	AGATGTCTGTCCACAAGCTCAAAGTCGGTATGGCTGGTCT
AsgtaC In fusion_F1	ATATGGCAACGGACTACAGATAATTTACCCTCGGTGCCAATGAC
AsgtaC In fusion_R1	TCTTCTGAGGTGCGGTGTCTGTCCACAAGCTCAAAGTCGGTATGG
AsgtaC In fusion Right_F	AGTCCGTTGCCATATATTAGATACG
AsgtaC Right_R1	GCTGTGTCAATTAGCTCACCCATTTGCAGT
AsgtaC Nest_F1	ACCAACCCTCAGCGCAACTTCGTCAA
AsgtaC Nest_R1	GCAGACGAAGCTTGACACCACCTATATCCAGT
AsgtaC_del_Check_F1	GCATCTTTGCAATCCTCTCATCATGTCCAATAGTCTCATTCTCCCAGTT
AsgtaC_del_Check_R1	CAGTACCATCATATACTCTCCACCCTTCACAGCTCCTCTCTCTGCGTCT
AsgtaC_loopout_Check_F1	ACCAGCTCAGGAATTCCTTTTGCAAC
AsgtaC_loopout_Check_R1	ATACGGGTTCCGATGGGTCGTACAC
Asgls Left_F1	GTAGCGGTGGAGTGGTGAAGATTTGGTTCAG
Asgls In fusion_F1	TCTTCTGAGGTGCGGCAGCCATGCAATATATGAGCGCGTAAGGTC
Asgls In fusion_R1	TTTCTAAACAACGAGACACCAATACGTGATATGTCCGAGAGCCAA
Asgls In fusion Right_F	CTCGTTGTTTAGAAACCCGTGAAC
Asgls Right_R1	TTGATCGGTAAGTAACCTAAATCCAACCTGTGCACT
Asgls Nest_F1	GCACCTTTGCTAAGGACCACTTACTCC
Asgls Nest_R1	CGACCGTGGGTTATGCTTTGTTAGCC
Asgls_del_Check_F1	AAAGAATTCATGAAGTCTCCTATCCCTGACTATCTTCGAC
Asgls_del_Check_R1	CAGGGTACCTCACCAATCATCACTATGGGAAACGGCCCTG
Asgls_loopout_Check_F1	ATCAGTGTGGCGACTGTTTGCCT
Asgls_loopout_Check_R1	CGCGTATGGGATTTCCCAAATCACTC
AsPyrG2522_F	TTGGGCTTATTGCTATGTCCCTGAA
AsPyrG4359_R	CCGCACCTCAGAAGAAAAGGATGA

レフトアーム ライトアーム

遺伝子ターゲティング
宿主BM-7($\Delta pyrG$)株

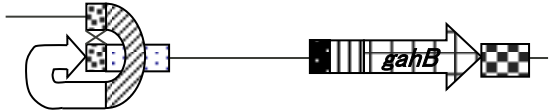


1つ目の遺伝子を破壊



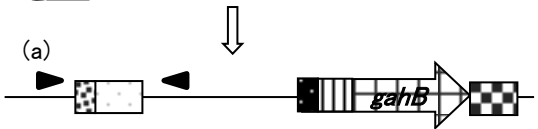
5FOA Selection

分子内相同組換えを
起こす(ループアウト)



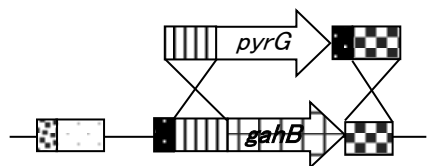
5FOA耐性株を取得

*pyrG*遺伝子が除去される

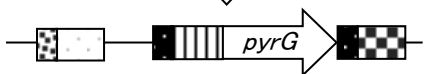


$\Delta pyrG$ 株となる=次の遺伝子破壊作製のための宿主株となる

遺伝子ターゲティング
宿主 $\Delta gahA$ 株 ($\Delta pyrG$)株

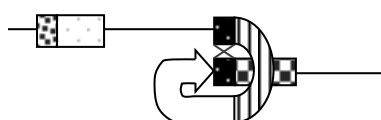


2つ目の遺伝子を破壊



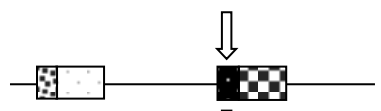
5FOA Selection

分子内相同組換えを
起こす(ループアウト)



5FOA耐性株を取得

*pyrG*遺伝子が除去される



再び $\Delta pyrG$ 株となる

次のターゲット遺伝子の破壊へ

図4-1 グルタミンナーゼ多重遺伝子破壊株の作製方法

レフトアーム領域より上流の配列をマーカー(*pyrG*)遺伝子の下流に導入した遺伝子破壊カセットによりターゲティングする。これにより一つ目の遺伝子破壊が行われる。得られた形質転換体の分生子を5-フルオロオロチン酸(5FOA)を含むCz培地に塗布すると、分子内相同組換え(ループアウト)によりマーカー遺伝子が除去され、耐性株として得られる。この耐性株は $\Delta pyrG$ 株となるので、次の宿主となる。この一連のターゲティングとマーカー遺伝子の除去を繰り返して多重遺伝子破壊株を作製した。ターゲティングおよび*pyrG*遺伝子の除去は、(a)のプライマーセットを用いて確認し、さらに遺伝子破壊については、(b)のプライマーセットで遺伝子内部が増幅しないことを確認した。

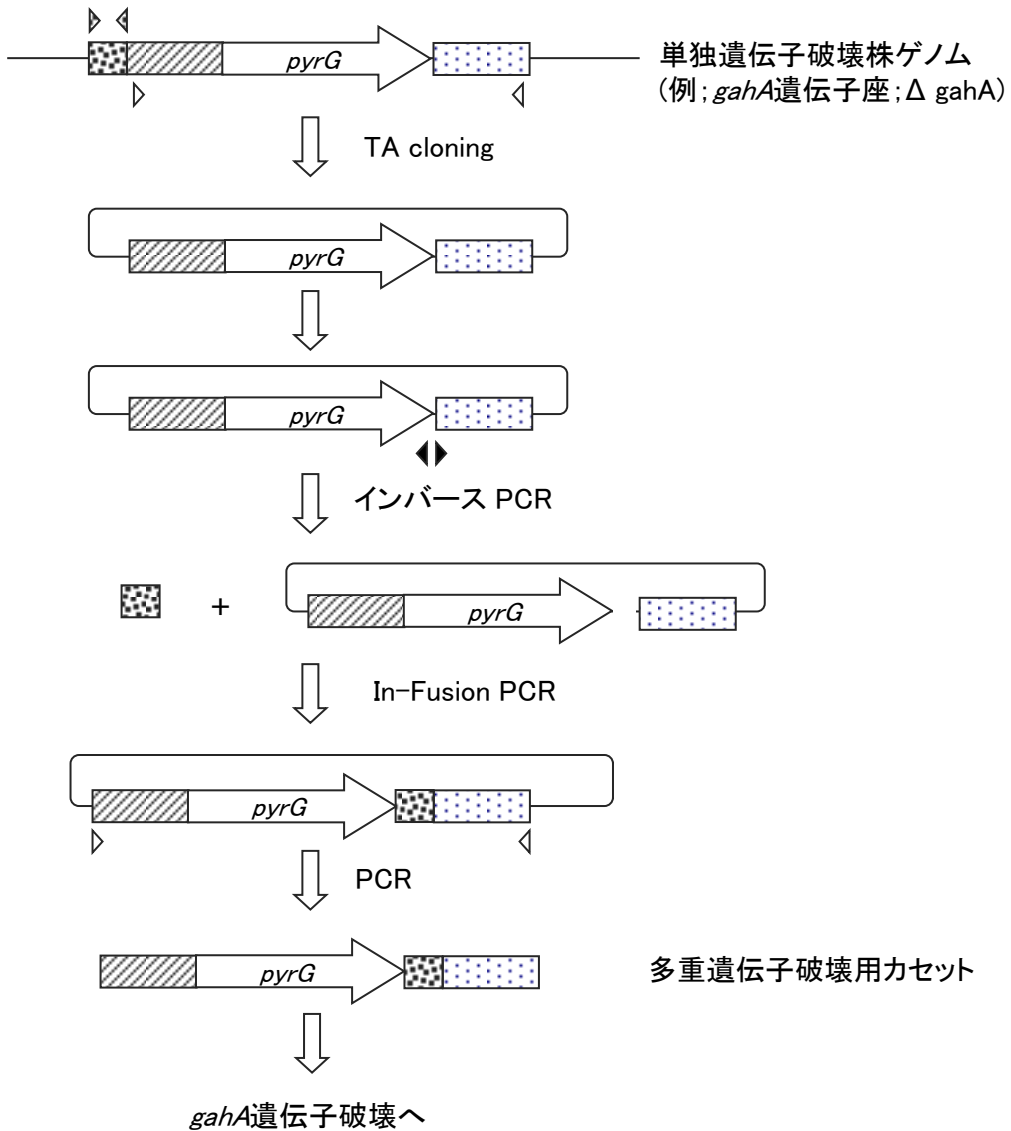


図4-2 グルタミナーゼ多重遺伝子破壊カセットの作製方法

第3章で作製した単独遺伝子破壊株の染色体を鋳型にして、PCRで破壊カセット領域を増幅し、TAクローニングする。得られたプラスミドをベクター全体が増幅するようにインバースPCRを行う。次に左アームよりも上流の領域(約 500b)を親株の染色体を鋳型に用いてPCRで増幅する。これらの断片をIn-Fusion PCRで連結する。得られたプラスミドDNAを鋳型にして、単独遺伝子破壊カセット領域を増幅させた際に使用したプライマーセットでPCRにより増幅させたDNA断片が多重遺伝子破壊用カセットとなる。

幅することを確認した(図 4-1 の(a)のプライマーセット)。同時に *pyrG* 遺伝子をプローブとしたサザンブロット解析を行い、非特異的な挿入の有無を確認した。さらに、ターゲット遺伝子の内部領域を X_del_Check_F1 と X_del_Check_R1 のプライマーセットで PCR により増幅させ、DNA 断片が増幅しないことも確認した(図 4-1 の(b)のプライマーセット)。

次に得られたグルタミナーゼ遺伝子破壊株の分生子 10^6 個を Cz-5FOA 培地に塗布し、生育してきた耐性株について、同培地で単分生子分離を 3 回繰り返して純化させた。直列に並んだ分子内相同組み換えによる *pyrG* 遺伝子の除去は、X_loopout_Check_F1 と X_loopout_Check_R1 または X_Left_F1 と X_Right_R1 のプライマーセットで PCR により確認した。目的どおりに *pyrG* 遺伝子が除去できた株を次のグルタミナーゼ遺伝子破壊のための宿主として使用した。全グルタミナーゼ遺伝子破壊株(KGd-Tall10)は、遺伝子ターゲティングとマーカー(*pyrG* 遺伝子)リサイクルをそれぞれ、10 回と 9 回繰り返して作製した。

(4) 酵素活性測定

遺伝子破壊株の分生子を植菌し、30°C で 4 日間培養したしょうゆ麹様培地および板蓋で製麹したしょうゆ麹 5 g を用いて、菌体結合型グルタミナーゼ活性および全グルタミナーゼ活性について、それぞれ、第 2, 3 章と同様にグルタミン酸定量法およびヒドロキサメート法により求めた。尚、多重遺伝子破壊株の中で、グルタミナーゼ活性が極めて低かった株(KGd-T124, KGd-Tall10, KGd-NT124-4)について、菌体結合型グルタミナーゼ活性は 120 分まで反応時間を延ばし、全グルタミナーゼ活性測定では、12 時間または 24 時間に反応時間を延ばして測定した。

プロテアーゼ活性およびロイシンアミノペプチダーゼ I、II 活性は既報^{20,94)}と同様に測定した。アミラーゼ活性および酸性カルボキシペプチダーゼ活性は、それぞれ、 α -アミラーゼ測定キットおよび酸性カルボキシペプチダーゼ測定キット(共にキッコーマンバイオケミファ)を用いて、添付のプロトコルに従って測定した。

(5) しょうゆの試験醸造

しょうゆの試験醸造は既報⁹⁵⁻⁹⁷⁾と同様に行った。すなわち、等量の蒸煮した脱脂大豆ミールと焙煎小麦を混合し、KuP8 株(対照株)およびグルタミナーゼ遺伝子破壊株の種麴を 1/1000 量(w/w)接種した。種麴は、マルツ寒天培地で 5 日間培養した分生子を白金耳でフスマ麴培地に接種し、30°C で 5 日間培養したものを使用した。種麴を十分に混合した後、湿度 95%、25-30°C に制御された恒温恒湿機(日測エンジニアリング)内で 3 日間培養してしょうゆ麴を得た。しょうゆ麴の作製には、板蓋を使用し、麴が焼けないように(黄麹菌自身が生育と共に発熱し、温度が高すぎると、死滅する)、温度管理をしながら 2 回手入れを行った。

得られたしょうゆ麴に最終食塩含量が統一されるように 120-130%の飽和食塩水を加えて混合し、純粋培養したしょうゆ乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* を添加して諸味を調

製した。原料タンパク質の分解によるアミノ酸の溶出およびしょうゆ乳酸菌による有機酸の生成等により諸味の pH が徐々に低下し、pH が 5.2 付近まで低下したら、純粹培養したしょうゆ酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* を添加した。諸味は、15-30°C で発酵熟成させた。発酵熟成期間中は、時々、生成した成分を均一化し、しょうゆ酵母の生育を活発化させるために、通気して攪拌した。酵母が生育してきたところで、嫌氣的な条件下に移し、アルコール発酵させた。アルコール発酵後は、30°C で静置した。

黄麹菌の液体培養物（以下、液体麴と称す）は、既報⁹⁴⁾と同様に調製した。すなわち、*A. sojae* NBRC4241 株の分生子を液体麴培地（坂口フラスコ使用。培養液は 50 ml）に適量接種し、30°C、3 日間前培養した。この前培養液を同様の培地を含む 3 L ジャーファーマンター（培地は 2 L）に全量接種し、30°C、3 日間培養した。

液体麴を用いたしょうゆの試験醸造は、脱脂大豆ミールと焙煎小麦に、上記の飽和食塩水の代わりに液体麴の培養液を添加した。さらに、食塩含量が通常の固体麴仕込みと同等になるように固形食塩を添加した。また、グルタミナーゼ反応により生成するグルタミン酸量を推定するために、*Bacillus* 由来の耐塩性グルタミナーゼであるグルタミナーゼダイワ（大和化成）を 500 U/L となるように添加した。しょうゆ乳酸菌およびしょうゆ酵母の添加は固体麴と同様に行った。固体麴および液体麴を用いたしょうゆの試験醸造は、共にしょうゆの液に含まれる食塩含量が 17% になるように加水して水分量を調整した。仕込み期間は約半年間行った。

(6) しょうゆ中に含まれる全窒素成分、アミノ酸、有機酸の定量

全窒素分量は、ケルダール自動蒸留滴定計算装置スーパーケル 1200（アクタック）を用いて測定した。グルタミン酸は、L-グルタミン酸測定キット II（ヤマサしょうゆ）を用いて測定した。その他のアミノ酸は、Hitachi High Speed Amino Acid Analyzer L-8900（日立ハイテック）を用いて、アミノ酸標準液タイプ B とタイプ H（和光純薬工業）を基に定量した。有機酸は、Shodex RSpak C-811 カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより測定した。エタノールは、HP6890 GC System を用いてガスクロマトグラフィーにより測定した。

【結果および考察】

(1) グルタミナーゼ反応により生成されるしょうゆ中のグルタミン酸量の推定

黄麹菌 *A. oryzae* および *A. sojae* は、固体培養に比べて液体培養のグルタミナーゼ活性が著しく低い³¹⁾。また、黄麹菌 *A. oryzae* および *A. sojae* のグルタミナーゼ活性は、グルコースやスクロースなどによりカタボライト抑制が起こる⁸⁰⁾。そのため、乳糖など資化速度の遅い炭素源を使用する、またはグルコースを低濃度で連続添加する等でカタボライト抑制を解除するとグルタミナーゼ活性が向上する⁸⁰⁾。さらに、炭素源を制限した状態で、培養中期にグルタミン酸などの各種窒素源を添加すると、活性が誘導されることも知られている⁸⁰⁾。このように黄麹菌は、培養条件(窒素源や炭素源等の制限)を制御せず、回分培養(液体培養)すると、培養上清および菌体表面等にほとんどグルタミナーゼ活性が検出されない。一方で、アルカリプロテアーゼやロイシンアミノペプチダーゼなどのタンパク質分解酵素は、原料タンパク質を分解するのに十分な酵素量を生産する(図 4-3)。このことから、筆者らはグルタミナーゼ活性を欠いた酵素剤として黄麹菌 *A. sojae* の液体培養物(液体麴)が利用できると考えた。

しょうゆ中のグルタミン酸は、タンパク質分解酵素による原料タンパク質からの直接的な遊離とグルタミナーゼ反応による生成の2つの経路から生じる(図 0-2, 図 4-4)。しかし、しょうゆ醸造中にグルタミナーゼ反応によって生成するグルタミン酸量が不明であった。そこで、その量を明らかにするために、黄麹菌の液体麴を用いて検証した。すなわち、グルタミナーゼ活性がほとんど検出されない液体麴を水(食塩水)の代わりに使用して、諸味の初期に市販の耐塩性グルタミナーゼ製剤を無添加または添加してしょうゆの試験醸造を行った。その結果、グルタミナーゼ製剤無添加で醸造すると極めて低いグルタミン酸含量となり、かつピログルタミン酸含量が上昇した(図 4-4(A))。これは、グルタミナーゼの不足により、遊離のグルタミンがグルタミナーゼによってグルタミン酸へと変換されず、非酵素的な反応によってピログルタミン酸へと変換されたためと考えられる。グルタミナーゼ製剤無添加における Glu/TN 値(全窒素成分あたりのグルタミン酸量)は、0.4 であった。これは原料タンパク質に含まれるグルタミン酸がタンパク質分解を受けて遊離してくる量と考えられる(図 4-4(A)-a)。

一方、グルタミナーゼ製剤を添加すると、グルタミン酸含量は高くなり、同時にピログルタミン酸含量が低下した。この液体麴と耐塩性グルタミナーゼ製剤を添加して得られたしょうゆのグルタミン酸含量は、通常の固体麴(しょうゆ麴)を用いて醸造したしょうゆのグルタミン酸含量とほぼ同等であった(図 4-4(B))。市販の耐塩性グルタミナーゼ製剤にはタンパク質分解活性が検出されなかったことから、このグルタミナーゼ製剤の添加によるグルタミン酸の増加量は、グルタミナーゼ反応によってグルタミンからグルタミン酸へと変換された量と考えられる(図 4-4(A)-(b))。以上の結果から、しょうゆ中のグルタミン酸の約 40%が原料タンパク質の分解によって直接遊離してくる量であり、残りの約 60%は、グルタミナーゼ反応によって、グルタミンから変換される量と推定した。中台は、グルタ

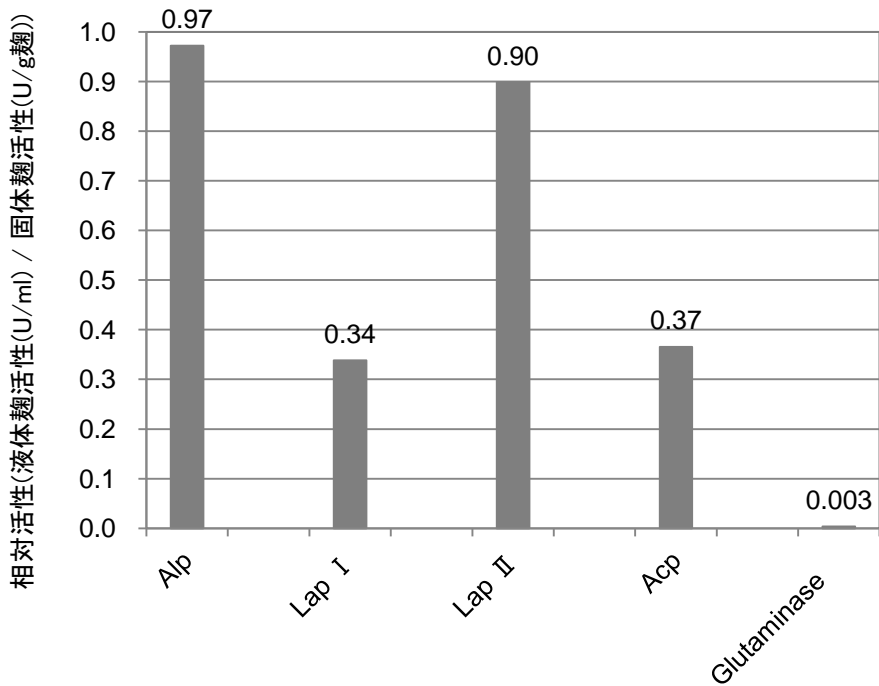


図4-3 液体麴と固体麴における各酵素活性の比較

液体麴の酵素活性値(U/ml)を、固体麴の酵素活性値(U/g麴)に対する相対値(液体麴値/固体麴値)で比較した。共にKuP8株を使用した。固体麴に比べて各酵素活性は若干低下するが、グルタミナーゼ活性は1/300以下になりほとんど活性が検出されない。Alp:アルカリプロテアーゼ, Lap:ロイシンアミノペプチダーゼ, Acp:酸性カルボキシペプチダーゼ

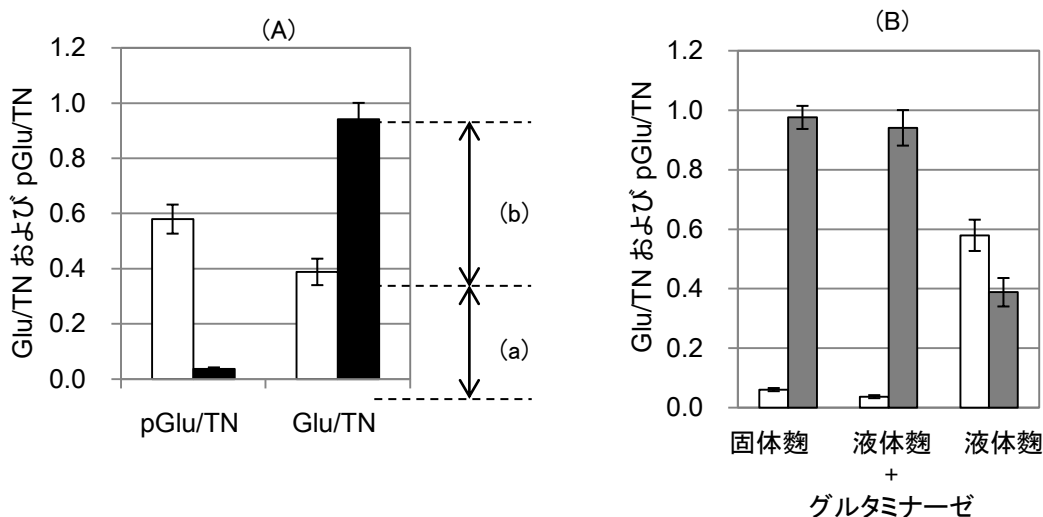
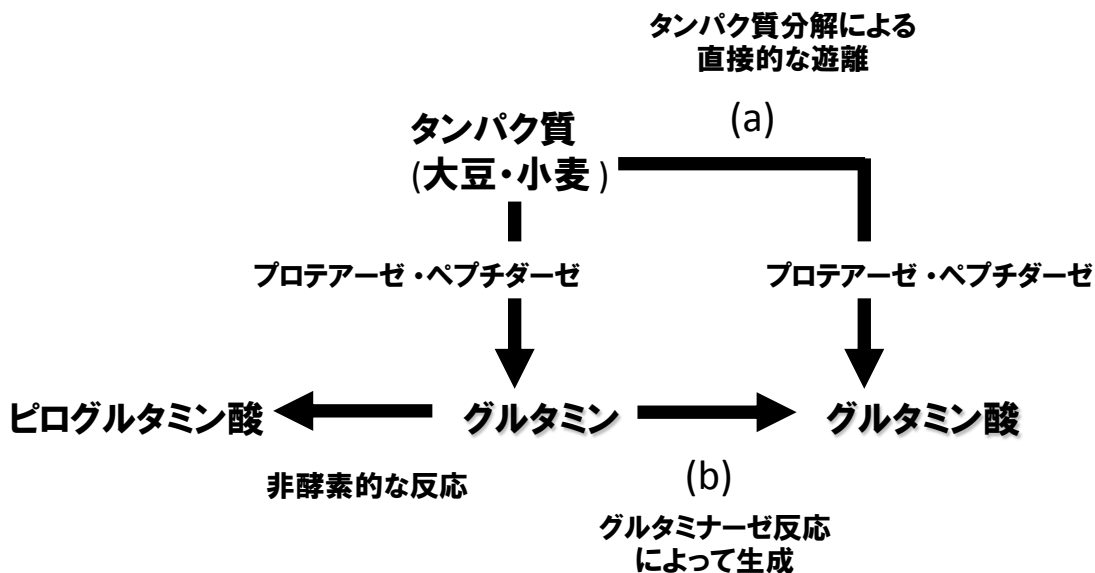


図4-4 試験醸造したしょうゆの全窒素成分(TN: Total Nitrogen)あたりのグルタミン酸(Glu)とピログルタミン酸(pGlu)含量

(A)グルタミナーゼダイワの添加(■)または無添加(□)条件下で、液体麴を用いてしょうゆの試験醸造を行い、TN、Glu、pGlu量を測定した。原料タンパク質の分解により直接遊離して生成するGlu量(a)とグルタミナーゼ反応により生成されるGlu量(b)を推定した。

(B) 通常の固体麴(しょうゆ麴)を用いたしょうゆと液体麴を用いて試験醸造したしょうゆのGlu/TN(■)およびpGlu/TN(□)の比較。液体麴を用いたしょうゆも市販のグルタミナーゼを添加をすると通常の固体培養でのしょうゆと変わらないGlu/TN値となる。

ミナーゼ活性の異なる 15 種類の黄麴菌を用いて試験醸造した生しょうゆ中の Glu/TN を調べた結果、グルタミナーゼ活性がほとんどない場合は、Glu/TN が 0.48 であったと報告している²⁰⁾。さらに、四方らは、グルタミナーゼ活性が異なる工場の種々の麴を用いて、40℃、5 日間の恒温消化試験を行った。その結果からグルタミナーゼ活性が全くないしょうゆ麴でも Glu/TN が 0.4 となると推定している²⁷⁾。これらの結果は、酵素消化による原料タンパク質からの直接的なグルタミン酸の溶出量を示しており、今回の推定値と一致している。

(2) 黄麴菌グルタミナーゼ遺伝子単独破壊株を用いたしょうゆの試験醸造

前章において、黄麴菌 *A. sojae* には、そのゲノム配列中に 10 個のグルタミナーゼ遺伝子を持つことを明らかにし、その単独遺伝子破壊株を作製した。さらに、その 10 個のグルタミナーゼのうち、*gahB* 遺伝子を破壊すると、グルタミナーゼ活性が 90%以下に低下し、*gahB* 遺伝子由来のグルタミナーゼが主要なグルタミナーゼ活性を示すことを明らかにした。

この 10 個のグルタミナーゼのうち、どのグルタミナーゼがしょうゆ醸造中のグルタミン酸生成に寄与しているのかを明らかにするために、これらの単独遺伝子破壊株を用いてしょうゆの試験醸造を行った。*gahB* 遺伝子破壊株は、製麴時の生育速度や、グルタミナーゼ以外の他の酵素活性（例えば、プロテアーゼやペプチダーゼなどタンパク質分解酵素活性やアミラーゼなどの糖質分解酵素活性）は、KuP8 株(対照株)と比較して大きな変化はなかった(データ未掲載)。しょうゆ諸味中のグルタミン酸含量と黄麴菌のグルタミナーゼ活性とには正の相関があるため²⁷⁾、*gahB* 遺伝子単独破壊株を用いたしょうゆのグルタミン酸含量は顕著に低下すると思われた。しかし、予想に反し、*gahB* 遺伝子単独破壊株を用いたしょうゆのグルタミン酸含量は KuP8 株を用いたしょうゆとほとんど変化なかった(図 4-5)。さらに、他のグルタミナーゼ遺伝子単独破壊株を用いたしょうゆのグルタミン酸含量も KuP8 株のしょうゆと変わらなかった(図 4-5)。以上の結果から以下の 2 つの仮説を立てた。

- 1) 前章で明らかにした 10 個のグルタミナーゼ以外に、通常の測定法では測定できない別のグルタミナーゼ（例えば、ATP や補酵素、カップリング反応で別の基質を必要とするなど）が存在し、それが醸造中に作用している。
- 2) 10 個のグルタミナーゼ遺伝子はすべてグルタミンをグルタミン酸に変換する活性を有することが予想される。そのため、複数のグルタミナーゼが相互に補完しながら、しょうゆ醸造のグルタミン酸生成に寄与しており、実験室規模の試験醸造では、*gahB* 遺伝子単独破壊株で残存するグルタミナーゼ量で十分である。

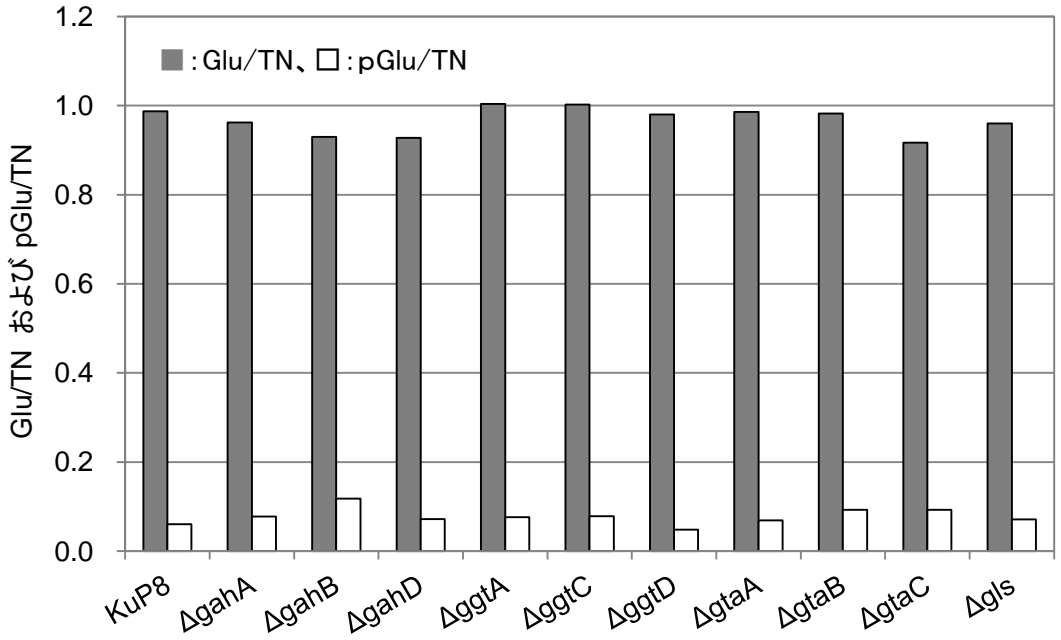


図4-5 各グルタミナーゼ単独遺伝子破壊株を用いて試験醸造したしょうゆの全窒素成分あたりのグルタミン酸(Glu/TN: ■)とピログルタミン酸(pGlu/TN: □)含量の比較

まず、1)の仮説を検証するために、グルタミン脱アミド活性を持つ酵素やグルタミン酸合成酵素と相同性のある遺伝子について *A. sojae* のゲノム配列から再度、探索した。19 個の候補遺伝子(アスパラギナーゼ : 5 遺伝子、フルクトース-6-ホスフェイトアミドトランスフェラーゼ : 2 遺伝子、グルタミン酸合成酵素 : 1 遺伝子、グルタミン脱水素酵素 : 2 遺伝子、グルタミン合成酵素 : 3 遺伝子、N 末端アミダーゼ : 1 遺伝子、Asp-tRNA^{Asn}/Glu-tRNA^{Gln} アミドトランスフェラーゼ 3 遺伝子、アミダーゼ : 2 遺伝子)について破壊株を作製し、それらを用いてしょうゆの試験醸造を行った。しかし、どの遺伝子破壊株を用いたしょうゆのグルタミン酸含量およびピログルタミン酸含量は、対照と比較して差がなかった(データ未掲載)。

(3) グルタミナーゼ多重遺伝子破壊株の構築

次に、2)の仮説を検証するために、グルタミナーゼ遺伝子の多重遺伝子破壊を行った。多重遺伝子破壊は、相同性組換え効率が向上した *ku70* 遺伝子破壊株を宿主に用い、遺伝子ターゲティングとマーカー遺伝子(*pyrG* 遺伝子)除去を繰り返して作製した⁷⁴⁾(図 4-1)。黄麴菌のグルタミナーゼは、酵素特性の違いから 4 つのタイプに分かれており、それぞれのタイプには、アミノ酸配列が類似した複数のホモログ遺伝子が存在した。ホモログ遺伝子は、同じような機能を果たすことが推測される。そのため、まずは、各タイプのホモログ遺伝子をすべて破壊した多重遺伝子破壊株を作製し、次に、ホモログ遺伝子を全て破壊したタイプを組み合わせた多重遺伝子破壊株を、最終的には 10 個全てのグルタミナーゼ遺伝子を破壊した 10 重遺伝子破壊株を作製した(図 4-6)。

それぞれのグルタミナーゼ遺伝子多重破壊株の菌体結合型グルタミナーゼ活性を図 4-7 に示した。タイプ I のグルタミナーゼ遺伝子を全て破壊した 3 重遺伝子破壊株(KGd-T1 ; Δ *gahA*- Δ *gahB*- Δ *gahD*)には、黄麴菌の主要なグルタミナーゼ活性を示す *gahB* 遺伝子が含まれるため、グルタミナーゼ活性が KuP8 株と比較して 1/10 以下に低下した。その他のタイプにおいては、ホモログ遺伝子を全て破壊してもグルタミナーゼ活性の低下は観察されなかった。さらに、タイプ I と II と IV を全て破壊した 7 重遺伝子破壊株(KGd-T124 ; Δ *gahA*- Δ *gahB*- Δ *gahD*- Δ *ggtA*- Δ *ggtC*- Δ *ggtD*- Δ *g/s*) およびグルタミナーゼ遺伝子を全て破壊した 10 重遺伝子破壊株(KGd-Tall10 ; Δ *gahA*- Δ *gahB*- Δ *gahD*- Δ *ggtA*- Δ *ggtC*- Δ *ggtD*- Δ *gtaA*- Δ *gtaB*- Δ *gtaC*- Δ *g/s*) では、KuP8 株と比較して 1/100 以下に活性が低下した(図 4-7)。これらの多重遺伝子破壊は、しょうゆ麴での生育速度やグルタミナーゼ活性以外の酵素、例えばタンパク質分解酵素や糖質分解酵素活性は、実験誤差範囲であり、大きく影響しなかった(図 4-8)

(4) グルタミナーゼ遺伝子多重破壊株におけるしょうゆの試験醸造

作製した多重遺伝子破壊株を用いてしょうゆの試験醸造を行った。しょうゆ中に含まれる全窒素成分あたりのグルタミン酸(Glu/TN)およびピログルタミン酸量(pGlu/TN)の測定

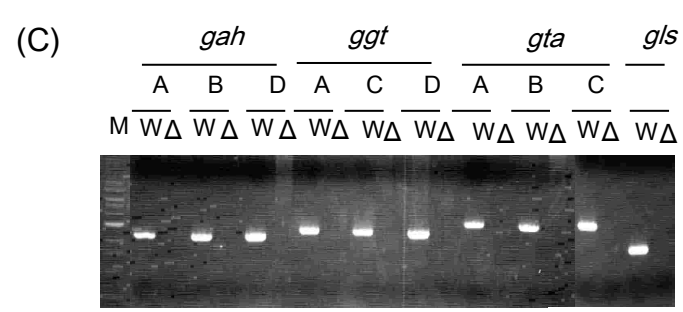
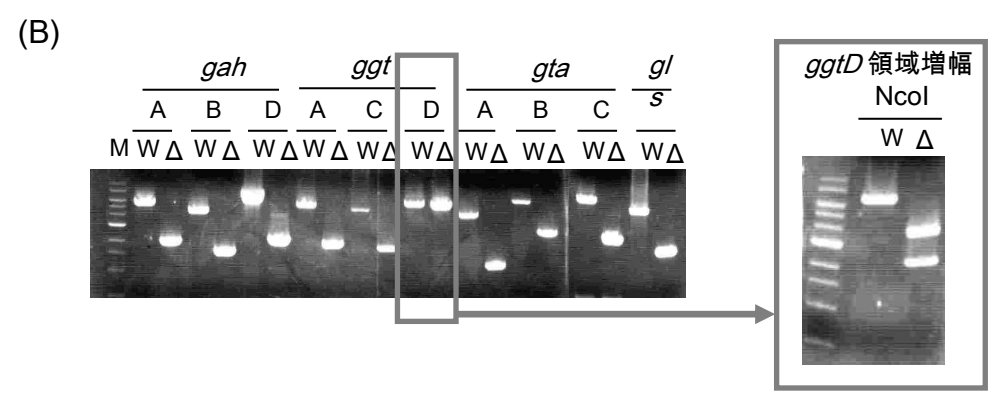
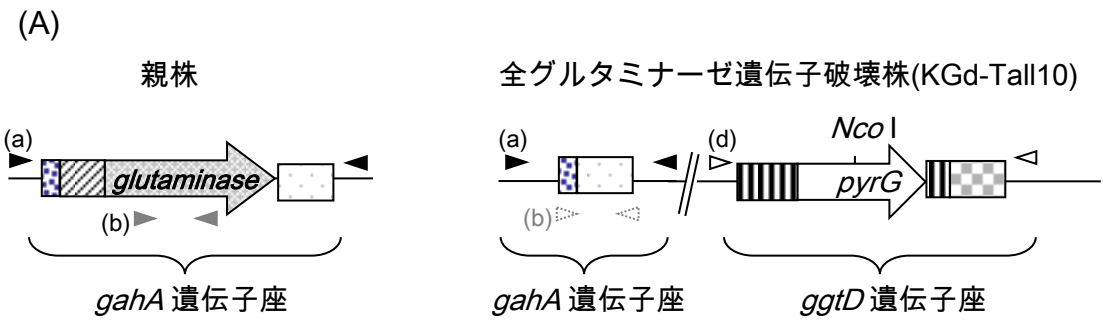


図4-6 全グルタミナーゼ遺伝子破壊株(KGd-Tall10)の作製

(A)親株と全グルタミナーゼ遺伝子破壊株の *gahA* 遺伝子座と *ggtD* 遺伝子座の比較。(a)、(b)、(d)はターゲティングおよびマーカー遺伝子除去の確認に使用したプライマーペアを表す。

(B)10個のグルタミナーゼ遺伝子座のターゲティングおよびマーカー遺伝子除去の確認。*gahA* 遺伝子座では(a)のプライマーセットで、親株はPCRによる約6kbのDNA増幅断片が得られるが、ループアウトによりマーカー遺伝子が除去されると約2kbと短くなる。*ggtD* 遺伝子座は最後にターゲティングしているため、*ggtD* 遺伝子座にマーカー遺伝子が残る。そのため、(d)のプライマーセットでPCRを行うと、親株とほぼ同じ大きさのDNA断片が増幅するが、マーカー遺伝子内に特異的にもつ制限酵素で処理をすると目的の大きさに切断されるのでターゲティングされていることが確認できる。

(C)ORF領域内のPCR増幅確認。遺伝子が破壊されていると増幅断片が得られない。M:DNA分子量マーカー、W:親株、Δ:全グルタミナーゼ遺伝子破壊株

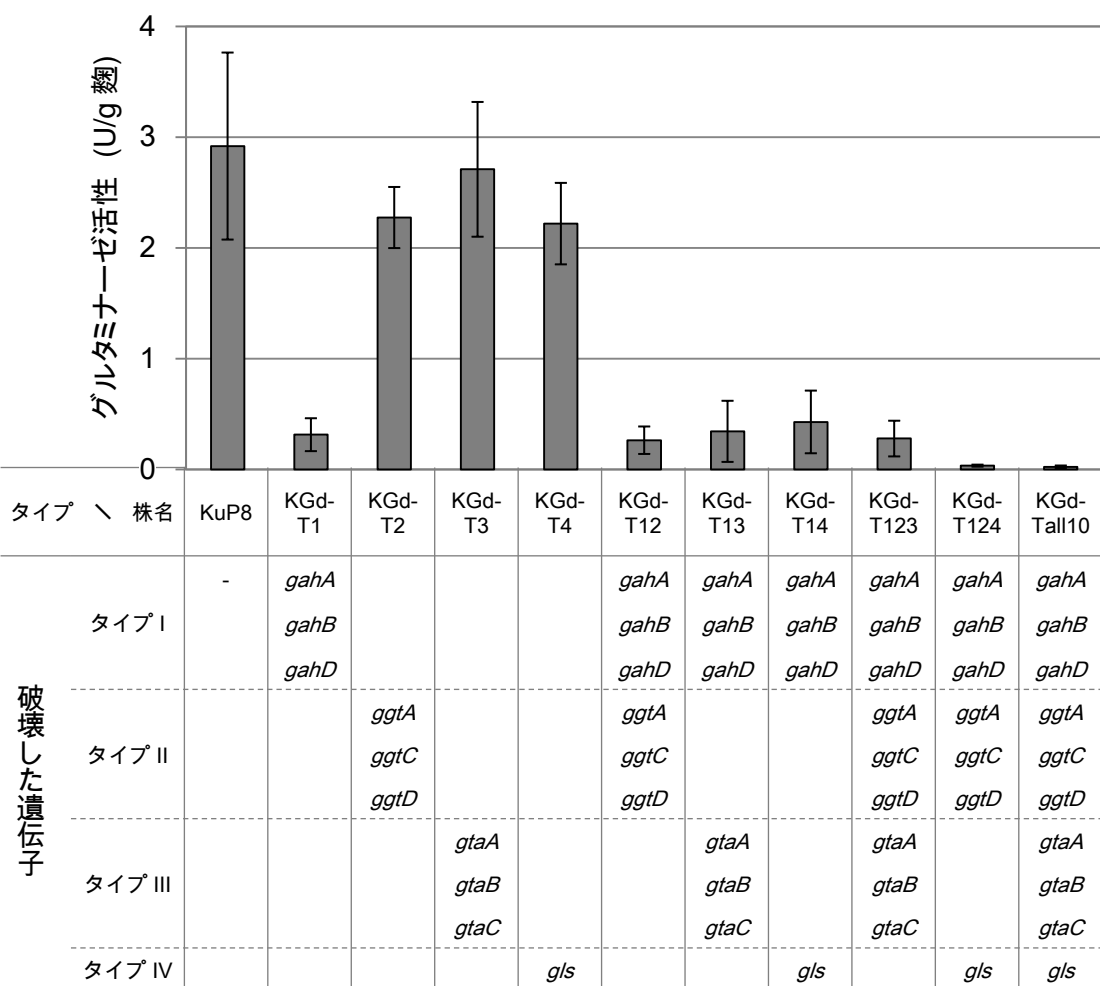


図4-7 グルタミナーゼ多重遺伝子破壊株の菌体結合型グルタミナーゼ活性
各多重遺伝子破壊株の分生子をしょうゆ麴様培地に植菌し、4日間培養して得られた麴の菌体結合型グルタミナーゼ活性を測定した。

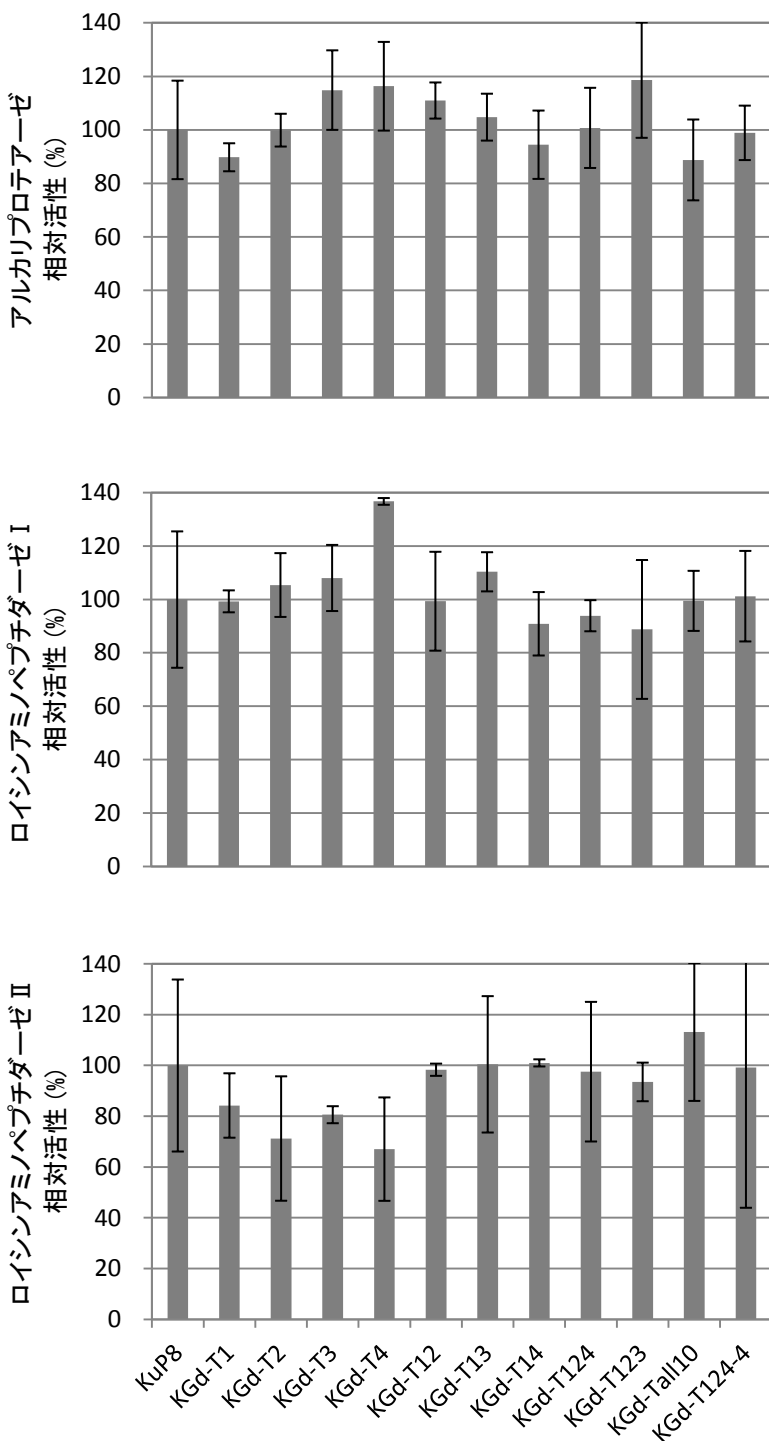


図4-8-1 グルタミンナーゼ多重遺伝子破壊株を用いたしょうゆ麹の酵素活性比較
 グルタミンナーゼ多重遺伝子破壊株を用いて製麹し、得られたしょうゆ麹の各酵素活性を比較した。対照を100%とした相対活性で比較した。

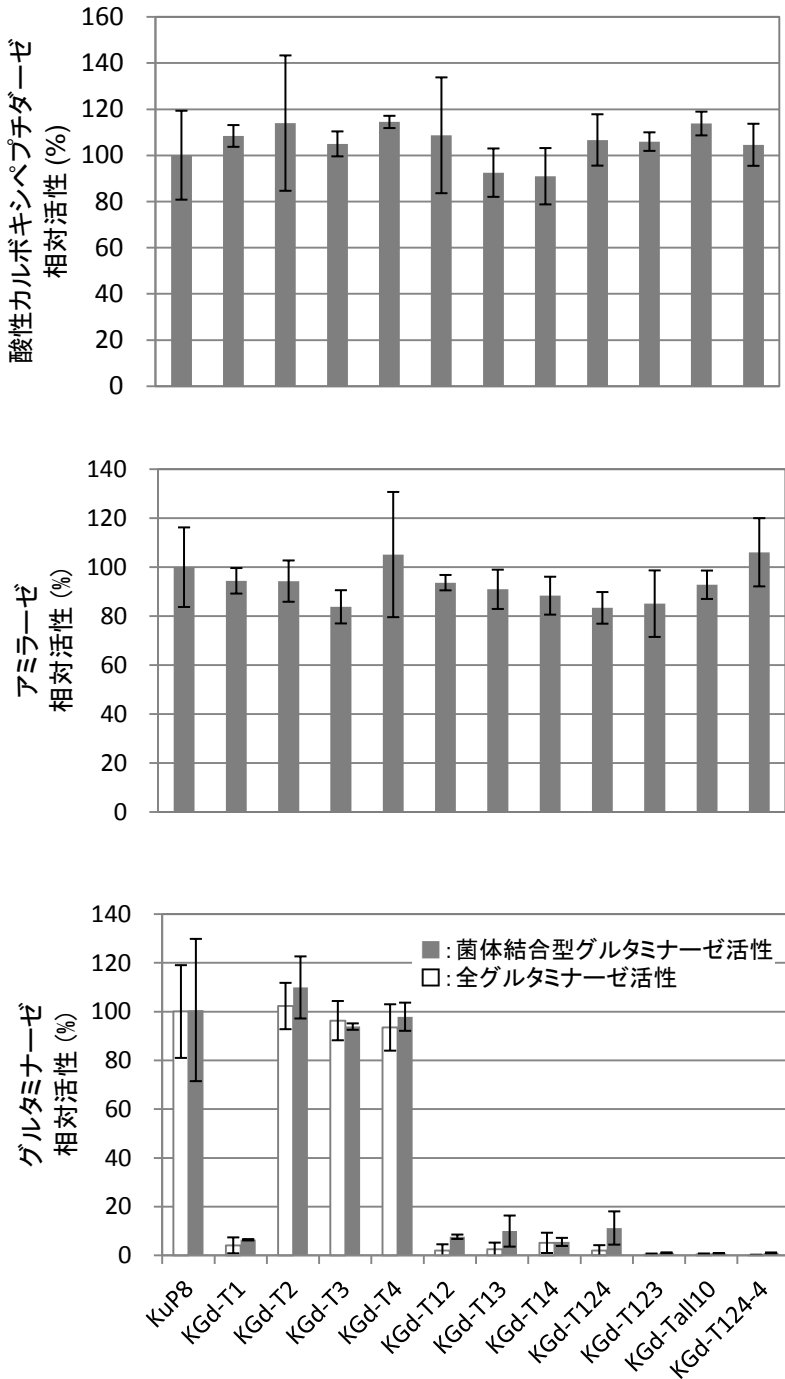


図4-8-2 グルタミナーゼ多重遺伝子破壊株を用いたしょうゆ麴の酵素活性比較
 グルタミナーゼ多重遺伝子破壊株を用いて製麴し、得られたしょうゆ麴の各酵素活性を比較した。対照を100%とした相対活性で比較した。

結果を図 4-9 に示す。本章の(1)で推定したように、しょうゆ中の 40%のグルタミン酸は、原料分解からの直接的な遊離であり、残りの 60%がグルタミナーゼ反応によって生成される。タイプ I のグルタミナーゼ遺伝子を破壊した 3 重遺伝子破壊株 (KGd-T1) では、KuP8 株と比較してグルタミン酸含量が 20-30%減少し、それと同時にピログルタミン酸含量が増加した。その他のタイプにおいては、ホモログ遺伝子を全て破壊しても、しょうゆ中のグルタミン酸含量に大きく影響しなかった。

タイプ I とタイプ II を同時に破壊した 6 重遺伝子破壊株 (KGd-T12) は、KGd-T1 よりもさらにグルタミン酸含量が減少し、それと同時にピログルタミン酸含量が増加した。さらにこの 6 重遺伝子破壊株にタイプ IV の *g/s* 遺伝子を破壊した 7 重遺伝子破壊株 (KGd-T124) は、全グルタミナーゼ遺伝子破壊株 (KGd-Tall10) およびグルタミナーゼ活性が著しく低下する液体麴を用いたしょうゆと同等に最もグルタミン酸含量が減少し、ピログルタミン酸含量が増加した。これらグルタミン酸含量の減少は、グルタミナーゼ活性の低下と概ね相関が見られた。すなわち、グルタミナーゼ活性が 1/10 に低下したタイプ I の多重遺伝子破壊の Glu/TN が KuP8 株よりも低下し、それよりもさらにグルタミナーゼ活性が低下したタイプ I、II、IV の 7 重遺伝子破壊や全グルタミナーゼ遺伝子破壊の Glu/TN は、タイプ I の多重遺伝子破壊の Glu/TN よりも低下した。

また、多重遺伝子破壊株を用いたしょうゆのグルタミン酸以外のアミノ酸含量、有機酸含量、全窒素成分量、食塩濃度およびアルコール濃度等は、KuP8 株のしょうゆと比較して、実験誤差範囲内であり、大きな変化は見られなかった(データ未掲載)。以上の結果から、多重遺伝子破壊株を用いたしょうゆ中のグルタミン酸含量の減少とそれに伴うピログルタミン酸含量の増加は、異なる 3 つのタイプ (I、II、IV) のグルタミナーゼ遺伝子を同時に破壊することに起因することが示唆された。タイプ III (Gta タイプ) のグルタミナーゼは、単独および多重遺伝子破壊株においても、しょうゆのグルタミン酸含量に影響を及ぼさなかったことから、しょうゆ醸造中では、作用していないと考えられる。

タイプ別の多重遺伝子破壊解析から、タイプ I、II、IV の 7 つのグルタミナーゼ遺伝子がしょうゆ醸造のグルタミン酸生成に寄与していることが示唆された。次に、これら 7 つのグルタミナーゼ遺伝子が全て関与しているかを検証した。タイプ I、II、IV の中から各タイプの遺伝子が一つは残るように様々な組み合わせの多重遺伝子破壊株を作製し、しょうゆの試験醸造を行った。その結果、4 重遺伝子破壊株 (KGd-T124-4 ; Δ *gahA*- Δ *gahB*- Δ *ggtA*- Δ *g/s*) において、全グルタミナーゼ遺伝子破壊株と同様にグルタミン酸含量が減少し、ピログルタミン酸含量が増加した(図 4-10)。この 4 重遺伝子破壊株におけるグルタミン酸含量の減少およびそれに伴うピログルタミン酸含量の増加は、KGd-T124-4 株を用いた試験醸造の仕込み初期に市販のグルタミナーゼ製剤を添加すると、グルタミン酸含量およびピログルタミン酸含量は対照と同等レベルになった。この結果から 4 重遺伝子破壊株によるグルタミン酸含量の減少は、グルタミナーゼ活性が不足したこと起因すると考えられる。4 重遺伝子破壊 KGd-T124-4 株のグルタミナーゼ活性は、7 重

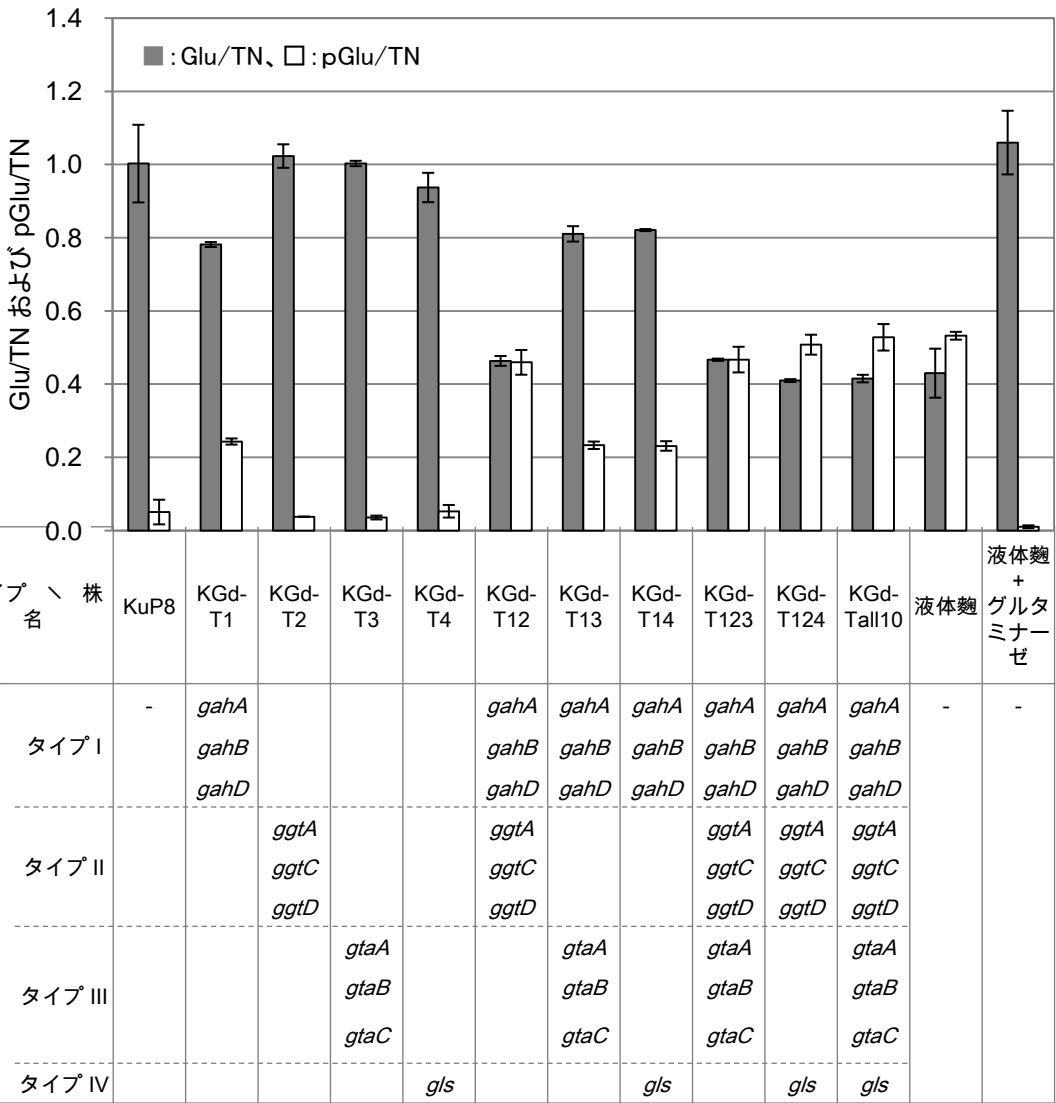


図4-9 多重遺伝子破壊株および液体麴を用いたしょうゆの試験醸造
 多重遺伝子破壊株を用いて、板蓋で製麴し、通常の仕込み条件でしょうゆを試験醸造した。

■ : Glu/TN、□ : pGlu/TN

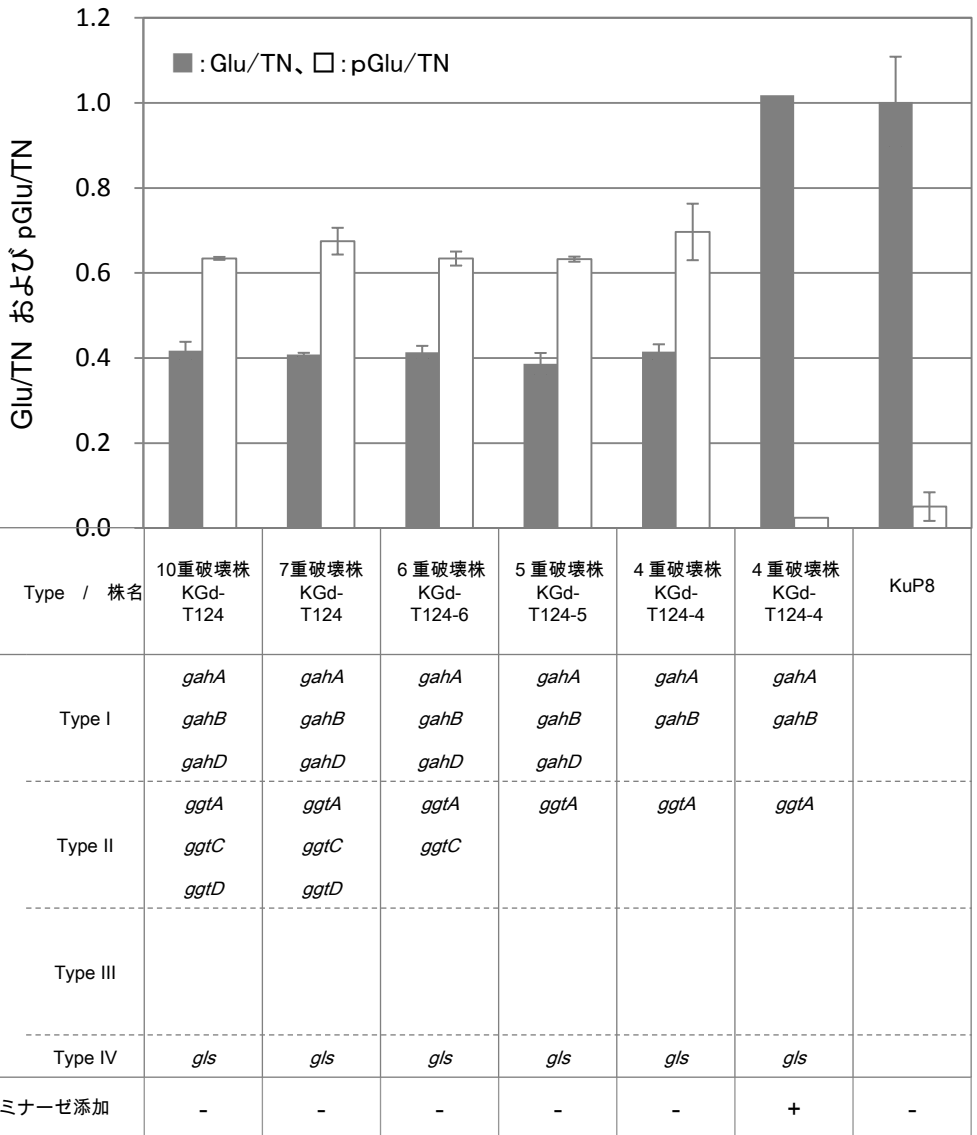


図4-10 多重遺伝子破壊株を用いたしょうゆの試験醸造

7重遺伝子破壊株から各タイプの遺伝子が一つは残るように6重、5重、4重遺伝子破壊株を作製した。板蓋で製麹して、通常の仕込み条件でしょうゆを試験醸造した。4重遺伝子破壊株は仕込み初期に市販のグルタミナーゼ製剤を添加したものとしていないものとして仕込み試験を行った。■ : Glu/TN、□ : pGlu/TN

遺伝子破壊である KGd-T124 および全グルタミナーゼ遺伝子破壊株 KGd-Ta1110 と同等であり、KuP8 株と比較して 1/100 以下に低下していた(図 4-8-2)。

ここまでの黄麹菌 *A. sojae* を用いた実験室規模のしょうゆの試験醸造の結論を以下にまとめる。

- ① *gahB* 遺伝子破壊でグルタミナーゼ活性が 1/10 になってもグルタミン酸の生成量は落ちないので、グルタミナーゼ活性は飽和しており、*gahB* 遺伝子破壊での残存量で十分である
- ② しょうゆのグルタミン酸生成には、3 つの異なる基質特異性をもつ 4 つのグルタミナーゼ(GahA タンパク質、GahB タンパク質、GgtA タンパク質、Gls タンパク質)が相補的かつ相互に関与する

実験室規模のしょうゆ麹では、工場のしょうゆ麹に比べて、グルタミナーゼ活性だけでなく、タンパク質分解酵素活性など様々な酵素活性が全般的に高くなる。そのため、グルタミナーゼの基質であるグルタミンの遊離速度が早く、グルタミナーゼが失活する前に十分量供給され、少ないグルタミナーゼ量で効果が得られた可能性が考えられる。

(5) しょうゆのグルタミン酸生成に寄与する 4 つのグルタミナーゼの多重遺伝子破壊によるしょうゆの試験醸造

タイプ別の多重遺伝子破壊解析の結果からタイプ I のホモログ遺伝子を同時に破壊した 3 重遺伝子破壊株 KGd-T1 でしょうゆ中のグルタミン酸含量が 20-30%低下した(図 4-9)。4 つのグルタミナーゼの中で、遺伝子破壊の組み合わせによって、しょうゆ中のグルタミン酸含量が変化する可能性が考えられた。そこで、4 つのグルタミナーゼの全ての組み合わせの 2 重、3 重遺伝子破壊株を作製し、しょうゆの試験醸造を行った。その結果、タイプ I の *gahA* 遺伝子と *gahB* 遺伝子の 2 重遺伝子破壊株(KGd-NT1-2; $\Delta gahA-\Delta gahB$)で KGd-T1 と同様に、対照と比較して 20-30%グルタミン酸含量が減少した(図 4-11)。その他の 2 重遺伝子破壊株ではグルタミン酸含量の減少は観察されなかった(図 4-11)。さらに、この 2 重遺伝子破壊に *ggtA* 遺伝子破壊を加えた 3 重遺伝子破壊株 KGd-NT12-3($\Delta gahA-\Delta gahB-\Delta ggtA$)はグルタミン酸含量が著しく減少し、一方で *gls* 遺伝子破壊を加えた 3 重遺伝子破壊株 KGd-NT14-3($\Delta gahA-\Delta gahB-\Delta gls$)は、僅かに減少した。このことから、主にしょうゆ醸造のグルタミン酸生成に関与するタンパク質が GahA タンパク質、GahB タンパク質と GgtA タンパク質であり、Gls タンパク質はわずかに作用するということが明らかとなった。

しょうゆ醸造に寄与する 4 つのグルタミナーゼのうち 3 つを破壊した 3 重遺伝子破壊株 KGd-NT124-3a($\Delta gahA-\Delta ggtA-\Delta gls$)および KGd-NT124-3b($\Delta gahB-\Delta ggtA-\Delta gls$)を用いたしょうゆでは、グルタミン酸含量の減少が観察されなかった。これら 3 重遺伝子破壊株は、野生型由来の GahA タンパク質または GahB タンパク質のどちらか一方が残存している。これらの結果は、GahA タンパク質および GahB タンパク質は、GgtA タンパク質および Gls タ

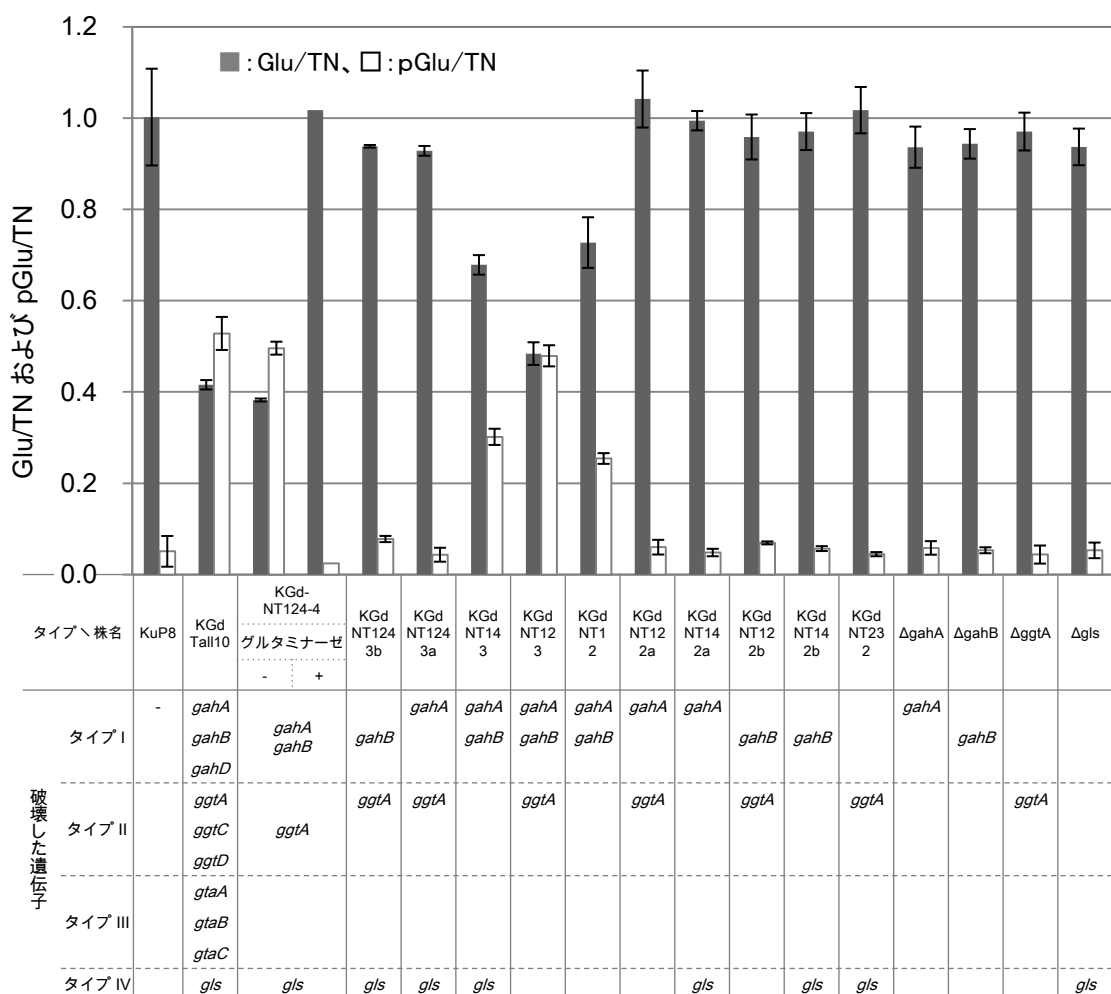


図4-11 しょうゆ醸造に寄与する4つのグルタミナーゼの多重遺伝子破壊株を用いたしょうゆの試験醸造

しょうゆ醸造に寄与する4つのグルタミナーゼの中で様々な組み合わせの多重遺伝子破壊株を作製し、それらを用いて板蓋で製麴し、通常の仕込み条件でしょうゆを試験醸造した。

■ : Glu/TN、□ : pGlu/TN

ンパク質のグルタミナーゼ反応を補うことができるが、GgtA タンパク質および GlS タンパク質は、GahA タンパク質および GahB タンパク質のグルタミナーゼ反応を補うことができないことを示唆している。以上の結果から、GahA タンパク質および GahB タンパク質は相互にグルタミナーゼ反応を相補し、グルタミン酸含量の高いしょうゆを得るためには、GahA タンパク質または GahB タンパク質が必須であることが明らかになった。

(6) しょうゆのグルタミン酸生成に寄与する黄麹菌グルタミナーゼの比較

黄麹菌 *A. sojae* において、4 つのグルタミナーゼがしょうゆ醸造でのグルタミン酸の生成に関与していることが本研究で明らかになった。本研究で明らかにしたグルタミナーゼを含めて、これまでに明らかにされている黄麹菌のグルタミナーゼについては、第 3 章の表 3-6 にまとめている。

GahA タンパク質、GahB タンパク質および GgtA タンパク質は、それらの推定アミノ酸配列から細胞外もしくは細胞壁結合型タンパク質として予測される。第 2 章および第 3 章で *gahA* 遺伝子または *gahB* 遺伝子を強制発現させた黄麹菌を固体培養すると菌体外に分泌生産され、その一部は菌体表面に留まっていることを明らかにした。GgtA タンパク質は、黄麹菌の液体培養上清から精製されていることから⁴⁰⁾、菌体外に局在していると推測される。

一方で、GlS タンパク質は、その推定アミノ酸配列から細胞内に局在すると予測される。黄麹菌 *A. sojae* BM-7 株を宿主にして、*gls* 遺伝子を強制発現させると、細胞内に局在性を示すことを確認した(図 4-12)。GlS タンパク質は、しょうゆ醸造期間中に黄麹菌菌体がバーストし、自己分解することにより、徐々に菌体から漏れ出てくるのかもしれない。GlS タンパク質のしょうゆ醸造におけるグルタミン酸生成への寄与率は、他の 3 つのグルタミナーゼに比べて低い。これは、その局在性に起因すると考えられる。しかし、本研究結果は、黄麹菌の菌体内酵素がしょうゆ醸造で機能していることを実証した初めての例である。GlS タンパク質は、耐塩性を有するグルタミナーゼであるため^{98,99)}、菌体内酵素であつてもしょうゆ醸造中で作用できるのかもしれない。黄麹菌の菌体結合型のグルタミナーゼがしょうゆ醸造のグルタミン酸生成に寄与していると考えられているが、本研究で明らかにした 4 つのグルタミナーゼはどれも菌体(細胞壁)結合型の局在を示さなかった。Yano らは、*A. oryzae* の菌体内と菌体外から黄麹菌グルタミナーゼを精製し、それらは同一であると考察している³⁴⁾。また、Koibuchi らは、黄麹菌の菌体結合型グルタミナーゼは培養後期に細胞壁の自己消化によって、菌体表面から遊離すると推察している³⁷⁾。本研究結果から、菌体外グルタミナーゼと菌体結合型グルタミナーゼは同一であり、菌体外グルタミナーゼの一部が菌体表面に結合して留まっていると考えられる。菌体外グルタミナーゼはプロテアーゼの分解を受けやすく²⁶⁾、結果的に、菌体に結合しているグルタミナーゼがしょうゆ中のグルタミン酸生成に大きく寄与しているのかもしれない。

gtaA 遺伝子は、黄麹菌から初めて単離されたグルタミナーゼ遺伝子である³⁶⁾。この遺伝子由来の GtaA タンパク質およびそのホモログタンパク質は、しょうゆ醸造ではグルタミン

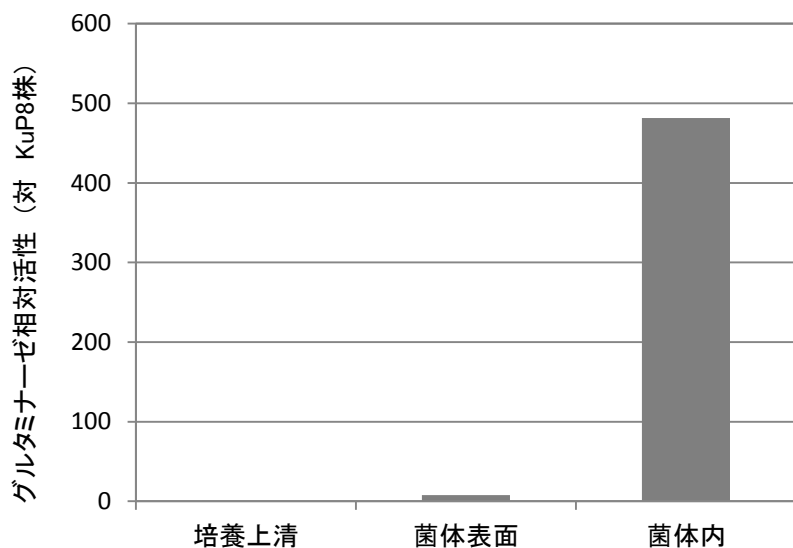


図4-12 *gls*遺伝子強制発現株のグルタミナーゼ活性
 黄麹菌発現ベクターpMAPベクターに*gls*遺伝子をクローニングし、BM-7株に導入した。PD液体培地で30°C、3日間培養し、培養上清、菌体表面、菌体内抽出液を用いて、グルタミナーゼ活性を測定した。各画分のKuP8株の活性値を1とした時の相対活性値で表す。

酸生成に関与していなかった。このことから、グルタミナーゼ活性を持つ酵素が必ずしもしょうゆ醸造中でその機能を発揮しているわけではないという事が明らかになった。GtaA タンパク質が、しょうゆ醸造におけるグルタミン酸生成に寄与しなかった理由は不明であるが、1) *A. sojae* でしょうゆの試験醸造を行ったため (*A. oryzae* では効果があるかもしれない)、2) GtaA タンパク質が他の4つのグルタミナーゼに比べて、しょうゆ醸造中でプロテアーゼ分解を受けやすい、3) GtaA タンパク質に特異的な未知の阻害剤がしょうゆ中には含まれているなどの可能性が考えられる。

GgtA タンパク質は、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) 活性をもつグルタミナーゼとして精製され、遺伝子(本研究で *ggtA* 遺伝子と命名)が単離された⁴⁰⁾。*gtaA* 遺伝子および *ggtA* 遺伝子は精製されたタンパク質の N 末端もしくは内部部分アミノ酸配列情報を利用して遺伝子がクローニングされている。一方で、しょうゆ醸造におけるグルタミン酸生成に寄与した4つのグルタミナーゼのうち、3つのグルタミナーゼ遺伝子 (*gahA* 遺伝子、*gahB* 遺伝子および *gls* 遺伝子)は、黄麹菌のゲノム配列情報が明らかになって初めて見出された。プロテアーゼやペプチダーゼのように各タンパク質を精製し、一つ一つ混合し、しょうゆ醸造での寄与率を求めていく手法は極めて時間がかかる。また、グルタミナーゼのように酵素を精製すること自体が困難な場合には、不可能な手法である。発酵食品中の成分と微生物由来酵素の関わりを明らかにする上で、遺伝子側からのアプローチである本研究手法は大変有効と考えられる。

GGT 活性を持つ GgtA タンパク質は、しょうゆ中のグルタミン酸生成に寄与していた。序章でも記載したが、GGT 活性は、120日間熟成した諸味中でも検出され、さらに、市販のしょうゆ中に γ -グルタミルペプチドの存在が確認されている³⁵⁾。この結果から、Tomita らは、遊離のグルタミンが、GGT 活性により、一度、他のアミノ酸やペプチドと γ -グルタミルペプチドを形成し、続いて、生成した γ -グルタミルペプチドが同じグルタミナーゼの GGT 活性により、グルタミン酸と他のアミノ酸、もしくはペプチドに加水分解されるモデルを提唱した(序章 図 0-3)。しかし、GGT 活性を持たない GahA タンパク質もしくは GahB タンパク質のどちらか一方が残存していれば、*ggtA* 遺伝子を破壊しても、しょうゆ中のグルタミン酸含量は最大となり、GgtA タンパク質の反応を補うことが可能であった。このことから、Tomita らが提唱した GGT 活性による γ -グルタミルペプチドの加水分解を介したグルタミン酸生成経路は、少なくとも試験醸造においては起こっていないと考えられる。

しょうゆ醸造で最大のグルタミン酸含量を得るには、GahA タンパク質もしくは GahB タンパク質が必須であった。これらのタンパク質は共通してペプチドグルタミナーゼ活性を有し、この反応がグルタミン酸含量を高める上で最も重要と考えられる。黄麹菌のグルタミナーゼは GlS タンパク質を除いて、食塩阻害に対する耐性がない。また、酸性 pH 環境下やアルコールによっても活性が阻害され、黄麹菌の生産するプロテアーゼによる分解も受ける。そのため、しょうゆ醸造後期において、黄麹菌のグルタミナーゼはほとんど活性を失い作用できないと考えられる。すなわち、黄麹菌により生産された大量のグルタミナーゼ

は、上記の様々な要因により徐々に活性を失いながら、醸造期間中に活性を保持できているグルタミナーゼが何とかグルタミン酸へ変換していると考えられる。従って、グルタミナーゼが失活するもしくは分解される前に、ペプチド中のグルタミンをグルタミン酸へ変換することで最終的にグルタミン酸含量を高めることは、とても理にかなっていると考えられる。これらの結果は、第 3 章でも述べたが、うま味の強い美味しいしょうゆを作る指標で人間が黄麹菌を選抜してきた結果なのかもしれない。

しょうゆ醸造には、中性および酸性のジペプチドやトリペプチドが多く残存していることが報告されている^{100, 101)}。原料由来のタンパク質は、プロテアーゼ(アルカリプロテアーゼ、中性プロテアーゼ I、中性プロテアーゼ II、酸性プロテアーゼ)により 9-13 残基のペプチドに分解され、これらのプロテアーゼによって直接アミノ酸までに分解されることはない²⁰⁾。生じたペプチドがロイシニアミノペプチダーゼによりペプチドの N 末端側から、酸性カルボキシペプチダーゼにより C 末端側から順次分解され、アミノ酸が遊離する。ロイシニアミノペプチダーゼは N 末端がグリシンや酸性のアミノ酸のペプチドを分解しにくく、酸性カルボキシペプチダーゼは、C 末端がプロリンのペプチドを分解しにくい²⁰⁾。さらに、酸性カルボキシペプチダーゼは、ロイシニアミノペプチダーゼに比べて分解能が低い。加えて、酸性カルボキシペプチダーゼは、ペプチド長が短いトリペプチドになると分解しにくく、ジペプチドになるとさらに分解しにくい。従って、これらのペプチドが分解されずにしょうゆ中で残存すると考えられている²⁰⁾。

しかし、しょうゆ中に残存している酸性ペプチドには、N 末端側だけでなく、C 末端側にグルタミン酸やアスパラギン酸を持つものが多い(L-Gly-Asp、L-Gly-Glu、L-Ala-Asp、L-Ala-Glu、L-Asp-Asp、L-Asp-Glu、L-Glu-Asp、L-Glu-Glu、L-Glu-Glu-Glu)。しょうゆ中から同定された中性ペプチドの中には、ペプチドグルタミナーゼの基質となる L-Gly-Gln も含まれており、また、GahA タンパク質および GahB タンパク質は、L-Gly-Gln、L-Gly-Asn、L-Ala-Asn、L-Ala-Gln を脱アミド化する(脱アミド化されることによって、しょうゆ中に見出された酸性ペプチド L-Gly-Glu、L-Gly-Asp、L-Ala-Asp、L-Ala-Glu となる)。従って、これら酸性ペプチドは、GahA タンパク質または GahB タンパク質のペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼ反応によって、分解されずに残存したペプチドの C 末端のグルタミンやアスパラギンが脱アミド化されて生じたのかもしれない。

C 末端にグルタミン酸やアスパラギン酸をもつオリゴペプチドには、うま味を呈するペプチドとして同定されているものが数多くある。L-Glu-Glu や L-Glu-Asp は、大豆のタンパク質分解酵素による加水分解物の中からうま味ペプチドとして初めて同定された^{102, 103)}。

魚肉のタンパク質分解酵素による加水分解物からは、グルタミン酸ナトリウム塩(MSG)と同様なうま味を呈するペプチドが同定され、その中には C 末端に酸性アミノ酸をもつペプチド(L-Glu-Glu、L-Glu-Asp、L-Thr-Glu、L-Ser-Glu-Glu、L-Glu-Gln-Glu)が同定されている¹⁰⁴⁾。さらに、塩酸処理した小麦グルテンの酵素分解物の中から、MSG 様の味を呈するペプチドとして 4 種のピログルタミルペプチドが同定されており、その中の一つは、C 末端

がグルタミン酸である pGlu-Pro-Glu であった¹⁰⁵⁾。

Maehashi らは、チキンムネ肉の酵素分解物からうま味ペプチドを単離し、C 末端に酸性アミノ酸を持つペプチドを同定した。単独でうま味を感じる L-Glu-Glu の他に、ペプチド単独では酸味を呈するが、0.02%イノシン酸 (IMP) 存在下で、弱いうま味を感じるペプチド (L-Ala-Asp-Glu、L-Asp-Glu-Glu、L-Ser-Pro-Glu、L-Ala-Glu-Asp) を報告しており、さらにそれらの混合物 (L-Glu-Glu、L-Glu-Val、L-Asp-Glu-Glu、L-Asp-Glu-Asp の各 0.5%混合物) は、「厚み」のあるうま味を呈すると報告している¹⁰⁶⁾。

うま味以外の効果として、グルタミン酸を含んだオリゴペプチド (L-Glu-Glu) は、中性ペプチドやアミノ酸由来の苦味をマスキングすると報告されている¹⁰⁷⁾。酸性ペプチド (L-Glu-Glu、L-Asp-Asp) の苦味マスキング効果は、苦味受容体を導入した培養細胞系で、これらのペプチドが存在すると苦味成分 (サリシン) に対する応答性が抑制されることが分子生物学的にも証明されている¹⁰⁸⁾。また、C 末端にグルタミン酸をもち、N 末端に比較的親水性の高いアミノ酸を持つジペプチドに、鰹節エキスとアルギニン混合物に対する塩味増強効果があることも報告されている¹⁰⁹⁾。これらの呈味効果をもつペプチドは、様々な種類のタンパク質分解物由来のオリゴペプチドとして報告されているが、それらの多くはしょうゆ中にも見出されている。しょうゆ中に存在するこれら C 末端にグルタミン酸を持つペプチドは、黄麴菌由来のペプチドグルタミナーゼ反応によって生成されている可能性も考えられる。

しょうゆは調味料であり、様々な食材、他の調味液、出汁と合わせて味付けに使われる。このように酸性アミノ酸を含むペプチドは、しょうゆを使用した日本食の奥深い風味、複雑な味わいに関与しているのかもしれない。GahA タンパク質および GahB タンパク質は、しょうゆ中のグルタミン酸含量を高めるだけでなく、酸性アミノ酸を含むオリゴペプチドの生成を介してもしょうゆの呈味の向上に役立っているかもしれない。

第5章 総括

しょうゆはアミノ酸を豊富に含む調味料であり、各種アミノ酸は様々な呈味を有する。その中でもグルタミン酸はしょうゆの「うま味」の中心的な役割を果たす。アミノ酸を多く含み、かつグルタミン酸含量の高いしょうゆは、「うま味」の強いしょうゆとなる。そのため、原料タンパク質を効率的に分解し、グルタミン酸含量を高める研究は古くから行われていた。

しょうゆのグルタミン酸含量を高める上で、グルタミナーゼは大変重要な酵素である。グルタミナーゼはグルタミンをグルタミン酸とアンモニアに加水分解する酵素であり、様々な生物種で同定されている。しょうゆ醸造では、黄麹菌由来のグルタミナーゼがしょうゆのグルタミン酸生成に寄与していると考えられていた。しかし、黄麹菌のグルタミナーゼは菌体結合型酵素であり、生産量が低く、かつ黄麹菌自身がタンパク質分解酵素を大量に生産するため、分解を受けやすく、酵素を精製することが極めて困難であった。そのため、黄麹菌のグルタミナーゼ酵素に関する報告は部分精製に留まっているものが多かった。

2000年代になり、いくつかグルタミナーゼ活性をもつタンパク質が黄麹菌より精製され、遺伝子が同定された。このことから、黄麹菌は複数のグルタミナーゼを生産するということが明らかになった。黄麹菌の生産する酵素は「原料を分解する」という重要な役割を担っており、タンパク質分解酵素を初め、数多くの酵素が精製されている。その精製酵素を組み合わせ、しょうゆ醸造を模した原料分解試験が行われ、例えば、原料大豆タンパク質分解に寄与する酵素などが同定されている。しかし、黄麹菌由来のグルタミナーゼに関しては、酵素タンパク質側からのアプローチではしょうゆ醸造に寄与する真のグルタミナーゼの特定までには至っていなかった。

一方で、黄麹菌のグルタミナーゼは耐塩性に乏しいことから、しょうゆ醸造に適した耐塩性グルタミナーゼの開発も求められていた。様々な微生物から耐塩性グルタミナーゼが探索され、枯草菌、海洋細菌、ブレラ属酵母等に見出され、多くの特許が出願されていた。分子生物学が活発化し、ヒトゲノム配列が解読された以降、遺伝子レベルで権利を押しやる時代になっていた。

筆者らは、第1章で *Cryptococcus* 属酵母 (*C. albidus* と *C. nodaensis*) の耐塩性グルタミナーゼに着目し、酵素を精製して、その遺伝子を単離、同定した。単離した遺伝子をパン酵母 *S. cerevisiae* を宿主に用いて発現させ、グルタミナーゼ活性を持つことを確認した。遺伝子解析した結果、アミノ酸配列中にアミダーゼモチーフをもつという特徴を有し、Amidase signature (AS) enzymes family に属するが、相同性のあるタンパク質は全て機能未知タンパク質であり、AS enzymes family の中でも独立したサブファミリーを形成した(これを GAH サブファミリーと命名した)。一次構造で他に類似した既知遺伝子の報告がなかったため、新規なグルタミナーゼとして *gah* (glutamine amidohydrolase) 遺伝子と名付けた。

黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 株および *A. sojae* NBRC4239 株のゲノム解析が行われ、黄麹菌の持つ遺伝子配列情報の全容が明らかになった。これにより遺伝子から有用な酵素タンパク質を探すアプローチが可能になった。

第2章では、第1章で見出した *Cryptococcus* 属酵母由来の新規なグルタミナーゼ (Gah) と相同性のある遺伝子をゲノム配列情報から *in silico* で探索した。その結果、*A. oryzae* RIB40 株のゲノム配列中に相同性の高い4つの遺伝子を見出した。そのうちの一つである *AogahA* 遺伝子は、*A. oryzae* RIB40 株の EST 解析で得られた配列にも見出され、炭素源飢餓液体培養で発現していることが分かった。そこで、そのオルソログ遺伝子 (*AsgahA* 遺伝子) を *A. sojae* よりクローニングした。

次いで、黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 株を宿主に用いて、単離した *AsgahA* 遺伝子を強制発現させ、酵素の精製および諸性質の決定を行った。この酵素は、これまで報告されている黄麹菌グルタミナーゼと同様に、至適 pH はややアルカリ側であり、耐熱性や耐塩性が乏しく、しょうゆ醸造に適した酵素特性はなかった。

一方で、基質特異性に特徴があり、遊離のグルタミンやアスパラギンだけでなく、ペプチドの C 末端に位置するグルタミンやアスパラギン残基に対しても脱アミド化する新規なペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼであった。これまでに *B. circulans* 由来の2種のペプチドグルタミナーゼ酵素が見出されている。しかし、遊離のアスパラギンおよびペプチド態のアスパラギンには作用せず、ペプチドアスパラギナーゼ活性を保持する *AsGahA* タンパク質とは異なる。さらに、これらの遺伝子は単離されていない。従って、本研究で、ペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼ酵素およびその遺伝子を世界で初めて同定した。

第3章では、*Cryptococcus* 属酵母由来のグルタミナーゼを含め、既知のグルタミナーゼと相同性のあるタンパク質遺伝子を黄麹菌ゲノム配列から探索した。相同性検索の結果、黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 株のゲノム配列中には、上記の *Cryptococcus* 属酵母由来のグルタミナーゼ・アスパラギナーゼと相同性のある Type I (*gah* タイプ)、*B. subtilis* 由来の γ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性を持つグルタミナーゼと相同性のある Type II (*ggt* タイプ)、*A. oryzae* から初めてグルタミナーゼとして同定された *gtaA* 遺伝子と相同性のある Type III (*gta* タイプ)、*M. luteus* 由来の耐塩性グルタミナーゼと相同性のある Type IV (*g/s* タイプ) の、基質特異性など酵素特性の異なる4つのタイプ、計12個のグルタミナーゼ遺伝子が存在した。

次に、*A. sojae* NBRC4239 株のゲノム情報を用いて、*A. oryzae* RIB40 株で見出された12個のグルタミナーゼ遺伝子が黄麹菌 *A. sojae* にも存在するかを調べた。その結果、*A. oryzae* と同様に4つのタイプに分かれて、10個のグルタミナーゼ遺伝子が存在することが明らかとなった。

続いて、どのグルタミナーゼがしょうゆ醸造に効果があるのかを明らかにするため、各遺伝子の単独破壊株を作製した。*A. sojae* は、*A. oryzae* と比較してグルタミナーゼ活性

が有意に高く、グルタミナーゼ遺伝子の数も少ない。そのため、検証しやすさを考慮して、*A. sojae* を用いて解析した。各グルタミナーゼ破壊株のグルタミナーゼ活性を測定した結果、Type I の *gahB* 遺伝子を破壊するとグルタミナーゼ活性が 1/10 以下に低下した。この遺伝子破壊の効果は、*A. oryzae* でも確認され、しょうゆ麴における黄麴菌の主要なグルタミナーゼ活性は *gahB* 遺伝子由来であることが明らかとなった。

そこで、黄麴菌 *A. oryzae* RIB40 株を宿主に用いて、この *AsgahB* 遺伝子を強制発現させ、酵素を精製し、諸性質を決定した。AsGahB タンパク質は、AsGahA タンパク質と同様に、しょうゆ醸造に適した酵素特性(耐塩性、至適 pH が低い等)はなかったが、ペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼであることが明らかとなった。しかし、遊離のグルタミンに対する反応性がペプチドの C 末端に位置するグルタミンよりも著しく高いなど、AsGahA タンパク質とは異なる基質特異性を示した。

AsGahA タンパク質および AsGahB タンパク質は、第 1 章で明らかにした AS enzymes family 内の GAH サブファミリーに属する。CaGahA タンパク質の基質特異性を再検証した結果、ペプチドグルタミナーゼであることが明らかとなり、このファミリーがペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼファミリーであることが明らかとなった。

第 4 章では、実際のしょうゆ醸造に寄与するグルタミナーゼを特定するために、グルタミナーゼ遺伝子破壊株を用いたしょうゆの試験醸造を行った。まず初めに、グルタミナーゼ活性が著しく低いという液体麴の特性を利用し、市販のグルタミナーゼ製剤と液体麴を用いたしょうゆの試験醸造を行った。これにより、しょうゆのグルタミン酸量の約 60% がグルタミナーゼ反応により生成すると推定した。

次に、各グルタミナーゼ遺伝子単独破壊株を用いたしょうゆの試験醸造を行った。黄麴菌のグルタミナーゼ活性としょうゆ諸味のグルタミン酸量には正の相関があるという知見から、グルタミナーゼ活性が 1/10 以下に低下した *gahB* 遺伝子破壊株を用いたしょうゆのグルタミン酸含量は低下すると予想した。しかし、*gahB* 遺伝子破壊株を含め、全ての単独遺伝子破壊株を用いたしょうゆのグルタミン酸含量は低下しなかった。これら 10 個の遺伝子は全てグルタミナーゼ活性をもつと予想されるため、単独遺伝子破壊では、その他の遺伝子由来のグルタミナーゼ活性により補完される可能性が考えられた。そこで、この 10 個のグルタミナーゼ遺伝子について、タイプ別に多重に破壊した株、それぞれのタイプを組み合わせて多重に破壊した株、さらに全てのグルタミナーゼ遺伝子を破壊した株を作製した。

Type I、Type II および Type IV を同時に破壊した 7 重遺伝子破壊株および全グルタミナーゼ遺伝子破壊株はグルタミナーゼ活性が 1/100 以下に低下した。さらに、それらを用いて試験醸造したしょうゆでは、グルタミン酸含量が 60% 減少し、同時にピログルタミン酸含量が増加した。このグルタミン酸の減少量は、先に推定したグルタミナーゼ反応により生成される量とほぼ一致した。さらに、7 遺伝子の中から様々な組み合わせで多重に破壊した株を作製した結果、Type I の *gahA*, *gahB*、Type II の *ggtA* および Type IV の *g/s* の 4 遺伝子を

同時に破壊すると 7 重遺伝子破壊株と同様の結果が得られた。また、この 4 重遺伝子破壊株を用いたしょうゆの試験醸造では、仕込み初期に市販のグルタミナーゼ製剤を添加すると、グルタミン酸含量およびピログルタミン酸含量が対照と同等になった。以上の結果から、しょうゆ醸造のグルタミン酸生成には、基質特異性の異なる 4 つのグルタミナーゼが相補的かつ相互に作用していることが明らかとなった。

次に、この 4 つのグルタミナーゼの中で 2 重、3 重遺伝子破壊株を作製し、しょうゆの試験醸造を行った。その結果、GahB タンパク質または GahA タンパク質が残存する 3 重遺伝子破壊株 ($\Delta gahA-\Delta ggtA-\Delta gls$ および、 $\Delta gahB-\Delta ggtA-\Delta gls$) では、グルタミン酸含量の低下は観察されなかったが、Type I のグルタミナーゼを同時に破壊した 2 重遺伝子破壊株 ($\Delta gahA-\Delta gahB$) では 20-30%のグルタミン酸含量の低下が観察された。これら 2 種のグルタミナーゼは、共にペプチドグルタミナーゼ活性を有しており、しょうゆ醸造で高いグルタミン酸含量を得るには、この酵素反応が重要であることが明らかになった。

しょうゆ醸造におけるグルタミン酸生成機構

本研究を踏まえて、しょうゆ醸造におけるグルタミン酸生成機構をまとめた(図 5)。大豆と小麦由来のタンパク質は、黄麹菌由来のプロテアーゼ(アルカリプロテアーゼ、中性プロテアーゼ、酸性プロテアーゼ)によってペプチドに分解される。タンパク質分解によって生じたペプチドは、黄麹菌由来のペプチダーゼ(ロイシンアミノペプチダーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ)によってアミノ酸にまで分解される。ここでグルタミン酸は異なる経路を経て生成される。第 1 の経路は、グルタミン酸が原料タンパク質の構成アミノ酸の一種であることから、このペプチドの分解により、タンパク質中に含まれるグルタミン酸が直接遊離する経路である(図 5-(1))。

第 2 の経路は、同じくペプチドの分解によって生じたグルタミンがグルタミナーゼによる加水分解反応によって生じる経路である(図 5-(2))。ここでは、黄麹菌の 4 つのグルタミナーゼ(GahA タンパク質、GahB タンパク質、GgtA タンパク質、Gls タンパク質)が関与する。仕込み初期のしょうゆ諸味は、中性付近からややアルカリ側の pH を示す。全ての麹菌のグルタミナーゼは至適 pH がややアルカリ側にあるため、この期間では同じく酵素の至適 pH が中性からアルカリにあるアルカリプロテアーゼや中性プロテアーゼ、ロイシンアミノペプチダーゼなどと共に効率良く、4 つのグルタミナーゼが作用できると考えられる。

さらに、第 3 の経路として、GahA タンパク質および GahB タンパク質のペプチドグルタミナーゼ反応により、ペプチドの C 末端のグルタミン残基が脱アミド化されてグルタミン酸に変換され、その後遊離する経路がある(図 5-(3))。グルタミナーゼは、醸造期間中に黄麹菌自身のプロテアーゼによる分解、有機酸やアルコールなどにより失活することが推測される。グルタミナーゼが失活する前にペプチドの段階でグルタミン酸に変換することで、グルタミナーゼが失活した後に、ロイシンアミノペプチダーゼがゆっくりとペプチドを分解してもグルタミン酸として遊離される。また、原料タンパク質からの酸性アミノ酸の遊

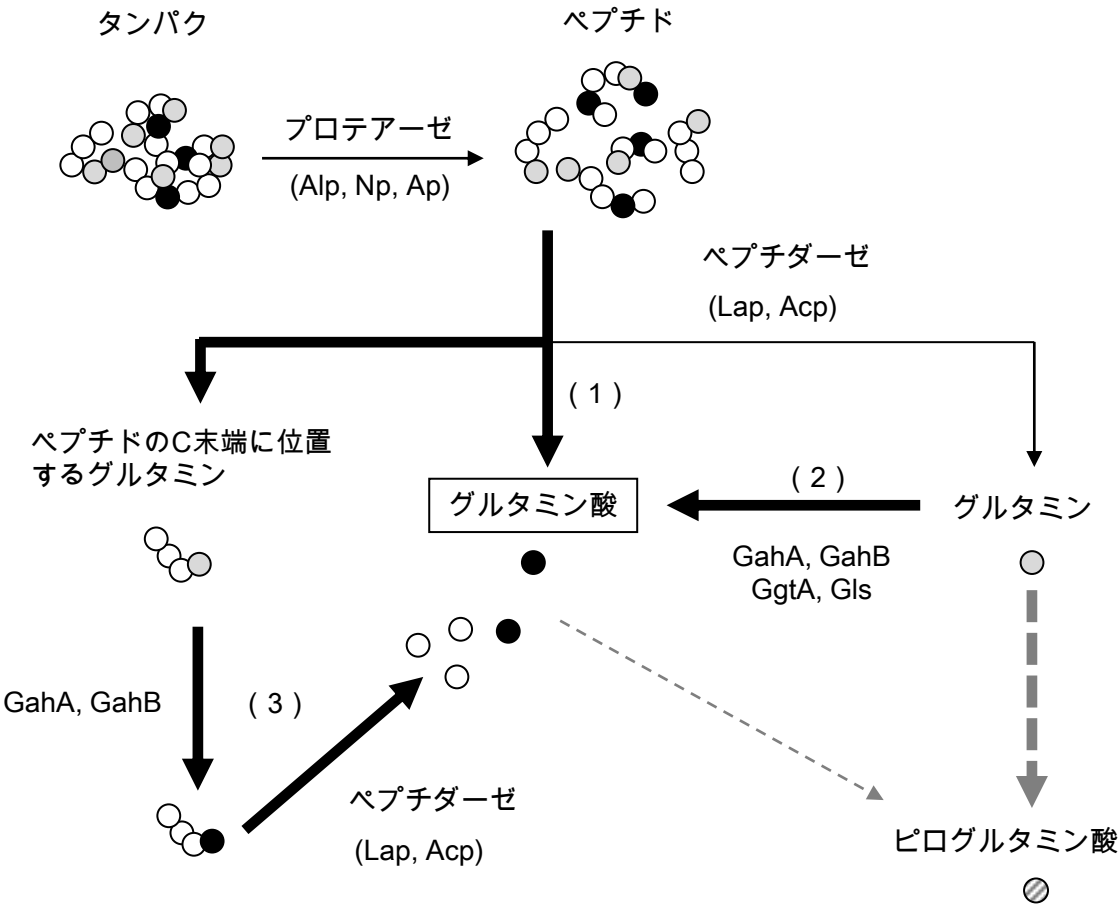


図5 しょうゆ中のグルタミン酸の生成機構

(1)タンパク分解により直接遊離する経路、(2)グルタミンナーゼ反応によってグルタミン酸に変換される経路、(3)ペプチド末端のグルタミンをグルタミン酸に変換する経路。○は各種アミノ酸を表し、●はグルタミンを、●はグルタミン酸を表している。Alp: アルカリプロテアーゼ、Np: 中性プロテアーゼ、Ap: 酸性プロテアーゼ、LAP: ロイシニアミノペプチダーゼ、Acp: 酸性カルボキシペプチダーゼを表す。

グルタミンやグルタミン酸は、非酵素的な反応により、うま味成分ではないピログルタミン酸 ⊙ へと変換されるが、グルタミンの方がかなり容易に変換される(太い点線で表記)。

離やしょうゆ乳酸菌により生産される乳酸や酢酸といった有機酸の生成により、しょうゆ諸味の pH は徐々に低下する。それと共に酸性側に至適 pH を持つ酸性プロテアーゼや C 末端側からアミノ酸を遊離させる酸性カルボキシペプチダーゼが活発化し、C 末端がグルタミン酸に変換されたペプチドからグルタミン酸が遊離する。これらのタンパク質分解酵素は熟成後にもその活性を検出できるほど安定な酵素である。従って、ペプチドの状態でグルタミン酸に変換するペプチドグルタミナーゼ反応がしょうゆ醸造でグルタミン酸含量を高める上で重要な因子であると言える。

おわりに

黄麹菌のゲノム配列情報が開示され、遺伝子解析のアプローチによりしょうゆ醸造で作用するグルタミナーゼを特定することができた。本研究で、明らかになったしょうゆ醸造に寄与する4つのグルタミナーゼのうち、3つ（GahA タンパク質、GahB タンパク質および GlS タンパク質）はゲノム配列情報が明らかになって初めて見いだされたものである。

黄麹菌グルタミナーゼとして初めて単離報告された GtaA タンパク質がしょうゆ醸造では機能していないことから、酵素活性を持っていたとしても必ずしも醸造で効果を発揮するとは限らないことも明らかとなった。

しょうゆ醸造におけるグルタミン酸生成には、不溶性（菌体結合型）のグルタミナーゼが関わりと考えられていた。しかし、主に作用した GahA タンパク質、GahB タンパク質、GgtA タンパク質は、アミノ酸配列情報から菌体外酵素と予測され、強制発現株でも分泌酵素（遊離型）として局在性を示した。しかし、強制発現株の菌体結合型のグルタミナーゼ活性は高く維持されていたことから、菌体表面に一時的に結合することが予想される。そのため、以前から推測されていたように、遊離型と菌体結合型のグルタミナーゼは同一であると考えられる。

一方で、アミノ酸配列情報および強制発現株でも菌体内酵素として局在性を示した GlS タンパク質がしょうゆ醸造で機能していることも明らかとなった。この酵素は、他のグルタミナーゼとは異なり、耐塩性（塩阻害耐性）の性質をもつため、菌体内から徐々に漏れ出て醸造後期に効果を発揮するのかもしれない。寄与率は低いですが黄麹菌の菌体内酵素がしょうゆ醸造で作用することを初めて実証した。

しょうゆ醸造において、過剰な黄麹菌の酵素は、火入れ歪となる可能性があり、しょうゆの歩留まりを低下させる。そのため、しょうゆ醸造中で作用する酵素のみを黄麹菌に生産させるのが理想である。ゲノム配列情報を活用することで、真にしょうゆ醸造でのグルタミン酸生成に寄与する酵素を明らかにすることができ、しょうゆ醸造で効果のある酵素活性を強めた黄麹菌の育種が可能となった。

実験室規模と比べて工場規模で作られるしょうゆ麹の酵素活性は、グルタミナーゼだけでなく、タンパク質分解酵素を含め全般的に低く、得られるしょうゆのグルタミン酸含量（Glu/TN 値）も低い。これは、板蓋製麹（実験室規模）と通風製麹（工場規模）の製麹方法の違

いが一因である。工場規模で製造するしょうゆのグルタミン酸含量を高めることは課題の一つに挙がる。グルタミナーゼ活性、特にペプチドグルタミナーゼ活性を著しく高めた黄麹菌を使用する方法は、工場で製造されるしょうゆのグルタミン酸含量を高める方策の一つであろう。グルタミナーゼは、しょうゆ醸造期間中に徐々に分解・失活しながら作用するが、大過剰量に生産できれば、醸造後期になっても活性を保持したグルタミナーゼが多く残存すると考えられる。そのため、原料の分解速度が遅く、基質であるグルタミンがゆっくりと供給されても、グルタミン酸へと変換することが可能になると考える。

一方で、実験室規模では、グルタミナーゼ活性は飽和しており、通常の1/10以下のグルタミナーゼ活性でも十分であった。工場規模で製麴したしょうゆ麴のグルタミナーゼ活性は、実験室規模の数分の1程度であり、本来であれば十分量の酵素量と考えられる。そのため、工場で製造されるしょうゆのGlu/TNの低下はグルタミナーゼ以外の酵素が律速となっていることが推測される。今後は、タンパク質分解酵素や多糖類分解酵素等の様々な酵素に対して、しょうゆ醸造で真に作用する酵素遺伝子を明らかにすることでこれら律速因子も同定されることだろう。

目指すしょうゆの醸造法の一つは投入した原料を完全に分解し、火入れ迄もしょうゆ粕も発生せず、压榨工程をも省略できる醸造と考えている。それには、原料タンパク質、原料でんぷん質、そして植物細胞壁多糖類等、大豆および小麦の構成成分を分解するのに必要な酵素を特定し、本研究で行ったグルタミナーゼと同様に、しょうゆ醸造で働く酵素を明らかにする必要がある。さらに、それぞれの酵素バランスも重要となり、本研究よりも複雑であることが予想される。地道な研究の一つ一つの積み重ねで、将来、必要な酵素を必要量作る理想の黄麹菌が育種され、原料タンパク質を完全に分解する究極のしょうゆ造りが完成する日を期待する。

引用文献

- 1) 農林水産省, 「和食」がユネスコ無形文化遺産に登録されました!, <http://www.maff.go.jp/j/keikaku/syokubunka/ich/>
- 2) Fukushima D., Industrialization of fermented soy sauce production centering around Japanese shoyu, *Industrialization of indigenous fermented foods New York; Basel, Marcel Dekker edit*, pp. 1-88. (1989).
- 3) Lioe, H. N., Selamat, J., and Yasuda, M., Soy sauce and its umami taste, a link from the past to current situation, *J. Food Sci.*, **75**, R71-76 (2010).
- 4) Wei, D. L. and Jong, S. C., Production of aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* group maintained in ATCC, *Mycopathologia*, **93**, 19-24 (1986).
- 5) 林和也, 麹菌の分類-*Aspergillus sojae*の分類学上の地位を中心として-, 醬研, **10**, 189-198(1984)
- 6) 坂口謹一郎, 山田浩一, 麹菌の形態と其の分類に就て(其の1), 日本農芸化学会誌, **20**, 65-73 (1944).
- 7) 林和也, 寺田勝, 水沼武二, 醤油用麹菌の分類種(*Aspergillus sojae* および *Aspergillus oryzae*)による醸造特性の差異, 醬研, **7**, 166-172 (1981)
- 8) 松本伊左尾, 中沢信吉, 岩淵担, 石原和夫, 今井成一, 本間信夫, *Aspergillus sojae*と *Aspergillus oryzae*を使用した醤油麹及び醤油の比較, 醸協, **84**, 549-554 (1989)
- 9) 斎藤賢道, *Cent. f. Bakteriolog., II Abt.* p. 154 (1907)
- 10) 亀倉正博, 醤油の製造と耐塩性・好塩性微生物, 醬研, **31**, 273-279 (2005)
- 11) 内田金治, 醤油乳酸菌の糖類発酵性パターンの多様性とそのフローラ解析への応用, 醬研, **9**, 29-35 (1983)
- 12) 東和男, 野谷克彦, 河村幸信, 各地醤油諸味中の耐塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus*の糖類発酵性パターン, 醸協, **93**, 579-581 (1998)
- 13) 森治彦, 新しい醤油酵母の分類, 醬研, **10**, 158-164 (1984)
- 14) 横塚保, 佐々木正興, 布村伸武, 浅尾保夫, 醤油の香り(1), 醸協, **75**, 516-522 (1980)
- 15) 末澤保彦, 耐塩性酵母によるフェルラ酸及び p-クマル酸の揮発性フェノール類への変換, 日本農芸化学会誌, **69**, 1587-1596 (1995)
- 16) Shiga, K., Yamamoto, S., Nakajima, A., Kodama, Y., Imamura, M., Sato, T., Uchida, R., Obata, A., Bamba, T. and Fukusaki, E., Metabolic profiling approach to explore compounds related to the umami intensity of soy sauce, *J. Agr. Food. Chem.* **62**, 7317-7322 (2014)
- 17) 河野友美, しょうゆの科学, 生活の科学シリーズ (財)科学技術教育協会, **24**, 6-14

(1990)

- 18) 山形洋平, 黄麹菌 *A. oryzae* のタンパク質分解酵素, 化学と生物, **54**, 109-116 (2016)
- 19) Kobayashi, T., Abe, K., Gomi, K., Juvvadi, P. P., Kato, M., Kitamoto, K., Takeuchi, M. and Machida, M., Genomics of *Aspergillus oryzae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 646-670 (2007)
- 20) 中台忠信, 醤油麹菌の生産する各種酵素の役割, 醬研, **11**, 67-79 (1985)
- 21) 有働繁三, 醤油の味に関する研究(第一報), 農芸化学会誌, **7**, 322-327 (1931).
- 22) 柄倉辰六郎, 醤油の科学と技術, p. 7 (1986)
- 23) 堀信一, 小川鉄雄, 青木良平, 近藤安弘, 太田泰弘, 醤油中の L-グルタミン酸の消長について:(第1報) 醤油中の L-グルタミン酸の形態及び生成機構について, 農芸化学会誌, **30**, 519-523 (1956)
- 24) 黒島英三郎, 大山義朗, 松尾隆治, 杉森恒武, 醤油醸造に関与する微生物グルタミン酸消長に及ぼす影響について:(第3報) 醤油中のグルタミン酸の形態とそれに及ぼす二, 三の因子について, 醗酵工學雑誌, **47**, 693-700 (1969)
- 25) Yamamoto, S., and Hirooka, H., Production of glutaminase by *Aspergillus sojae*, *J. Ferment. Technol.*, **52**(8), 570-576 (1974)
- 26) 四方日出男, 安井卓男, 石上有造, 大森邦英, 醤油麹のグルタミナーゼについて(第1報)-不溶性グルタミナーゼの性質-, 醬研, **4**, 48-52 (1978)
- 27) 四方日出男, 安井卓男, 石上有造, 大森邦英, 醤油麹のグルタミナーゼについて(第2報)-不溶性グルタミナーゼと諸味のグルタミン酸の関係-, 醬研, **5**, 21-25 (1979)
- 28) 安井卓男, 四方日出男, 石上有造, 醤油麹のグルタミナーゼについて(第3報)-全グルタミナーゼ活性の高い麹菌の検索と諸味中のグルタミン酸の溶出-, 醬研, **8**, 117-122 (1982)
- 29) 古屋武, 寺本淳身, 石毛雅夫, 内田一生, 吉野宏, 麹菌グルタミナーゼの細胞内分布とその性質, 醬研, **11**, 109-114 (1985)
- 30) 寺本淳身, 石毛雅夫, 古屋武, 内田一生, 吉野宏, こうじ菌グルタミナーゼの細胞内分布とその性質, 日本農芸化学会誌 **59**, 245-251 (1985)
- 31) 中台忠信, 那須野精一, 酵素剤による蛋白質の分解: 醤油の醸造における酵素剤の利用(I), 醗酵工學雑誌, **54**, 872-884 (1976)
- 32) Nakadai, T. and Nasuno, S., Culture conditions of *Aspergillus oryzae* for production of enzyme preparation, *J. Ferment. Technol.* **66**, 525-533 (1988)
- 33) 岡村英喜, 新規天然系調味料「コウジ・アジ」, 日本農芸化学会誌, **76**, 140-141 (2002)
- 34) Yano, T., Ito, M., Tomita, K., Kumagai, H. and Tochikura, T., Purification and properties of glutaminase from *Aspergillus oryzae*, *J. Ferment. Technol.* **66**, 137-143(1988)
- 35) Tomita, K., Yano, T., Kitagata, T., Ando, N., Kumagai, H. and Tochikura, T.,

- Action of glutaminase in a model system of a soy sauce, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1873–1878 (1989)
- 36) 鯉淵恭子, 長崎浩明, 湯浅安里, 片岡二郎, 北本勝ひこ, 麹菌 *A. oryzae* 由来新規グルタミナーゼ遺伝子のクローニング, 日本農芸化学会 1999 年度大会 大会講演要旨集 p. 212
 - 37) Koibuchi, K., Nagasaki, H., Yuasa, A., Kataoka, J. and Kitamoto, K., Molecular cloning and characterization of a gene encoding glutaminase from *Aspergillus oryzae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 59–68 (2000)
 - 38) 北本則行, 吉野庄子, 伊藤誉, 畔柳孝, 竹田加代子, 新規グルタミナーゼ及びその製造方法, 日本国特許庁特許公開公報 特開 2000–166547
 - 39) Thammamongtham, C., Turner, G., Moir, A., J., Tanticharoen, M. and Cheevadhanarak, S., A new class of glutaminase from *Aspergillus oryzae*, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **3**, 611–617 (2001)
 - 40) 北本則行, 安田庄子, 伊藤誉, 畔柳孝, 新規グルタミナーゼ及びその製造方法, 日本国特許庁 特許第 4651203 号 (2011)
 - 41) 橋本彦堯, 横塚 保, しょう油の火入れおり発生のメカニズム, 醸協, **71**, 496–499 (1976)
 - 42) 曾根原豪志, 林和也, 醤油火入れ漙の構成成分としての多糖類と金属, 醬研, **8**, 16–20 (1982)
 - 43) 田村順一, 醤油火入れ漙について-発生のメカニズムと火入れ漙の出ない生醤油-, 醸協, **85**, 858–862 (1990)
 - 44) 清水 保広, 上山 明代, 後藤 京二, *Bacillus subtilis* GT 株の生産するグルタミナーゼの精製と性質について, 醸協, **86**, 441–446 (1991).
 - 45) Moriguchi, M., Sakai, K., Tateyama, R., Furuta, Y. and Wakayama, M., Isolation and characterization of salt-tolerant glutaminases from marine *Micrococcus luteus* K-3, *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 621–625 (1994)
 - 46) Wakayama, M., Nagano, Y., Renu, N., Kawamura, T., Sakai, K. and Moriguchi, M., Molecular cloning and determination of the nucleotide sequence of a gene encoding salt-tolerant glutaminase from *Micrococcus luteus* K-3, *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, 592–597 (1996)
 - 47) 横塚保, 岩浅孝, 藤井三治, 醤油麴の高温分解に関する研究-1-, 醬研, **13**, 18–25 (1987)
 - 48) 岩浅孝, 藤井三治, 横塚保, *Cryptococcus albidus* ATCC20293 の産出する Glutaminase について-酵素の精製と諸性質-, 醬研, **13**, 205–210 (1987)
 - 49) Nakadai, T. and Nasuno, S., Use of glutaminase for soy sauce made by *Koji* or a preparation of proteases from *Aspergillus oryzae*, *J. Ferment. Bioeng.*, **67**,

- 158-162 (1989)
- 50) Sato, I., Kobayashi, H., Hanya, Y., Abe, K., Murakami, S., Scorzetti, G. and Fell, J. W., *Cryptococcus nodaensis* sp nov, a yeast isolated from soil in Japan that produce a salt-tolerant and thermostable glutaminase, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 127-132 (1999)
 - 51) 本川保之, 佐藤哲郎, グルタミン酸含量の高い醤油の製造法, 日本国特許庁 特許公報(B2) 平1-16465 (1989)
 - 52) 村上成治, 茂田井宏, 柿沼富男, 深瀬哲朗, 高見英人, 耐塩性グルタミナーゼ, 日本国特許庁 特許公報(B2) 特公平6-38748 (1994)
 - 53) 本川保之, 兼松義範, 笠原貢, 山縣孝樹, 耐熱・耐塩性グルタミナーゼ, 日本国特許庁 特許公報(B2) 特公平07-073495 (1995)
 - 54) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Molecular cloning A laboratory manual. Second edition. Volumes 1, 2, and 3., Cold Spring Harbor Laboratory Press., (1989)
 - 55) 村松正實, ラボマニュアル遺伝子工学, 丸善書店, (1989)
 - 56) Kaiser, C., Michaelis, S. and Mitchell, A., "Methods in Yeast Genetics, A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual" 1994 edition, pp. 133-134 (1994)
 - 57) Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J., CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680 (1994)
 - 58) Turakainen, H., Kristo, P. and Korhola, M., Consideration of the evolution of the *Saccharomyces cerevisiae* MEL gene family on the basis of the nucleotide sequences of the genes and their flanking regions, *Yeast*, **10**, 1559-1568 (1994)
 - 59) Patricelli, M. P., Lovato, M. A., and Cravatt, B. F., Chemical and mutagenic investigations of fatty acid amide hydrolase: evidence for a family of serine hydrolases with distinct catalytic properties, *Biochemistry*, **38**, 9804-9812 (1999).
 - 60) Patricelli, M. P. and Cravatt, B. F., Clarifying the catalytic roles of conserved residues in the amidase signature family, *J. Biol. Chem.*, **275**, 19177-19184 (2000).
 - 61) Shin, S., Lee, T. H., Ha, N. C., Koo, H. M., Kim, S. Y., Lee, H. S., Kim, Y. S. and Oh, B. Y., Structure of malonamidase E2 reveals a novel Ser-cisSer-Lys catalytic triad in a new serine hydrolase fold that is prevalent in nature, *EMBO J.*, **21**, 2509-2516 (2002).
 - 62) Shin, S., Yun, Y. S., Koo, H. M., Kim, Y. S., Choi, K. Y. and Oh, B. H.,

- Characterization of a novel Ser-cisSer-Lys catalytic triad in comparison with the classical Ser-His-Asp triad, *J. Biol. Chem.*, **278**, 24937–24943 (2003)
- 63) Chebrou, H., Bigey, F., Arnaud, A. and Galzy, P., Study of the amidase signature group, *Biochim. Biophys. Acta*, **1298**, 285–293 (1996)
- 64) Ko, H. J., Lee, E. W., Bang, W. G., Lee, C. K., Kim, K. H. and Choi, I. G., Molecular characterization of a novel bacterial aryl acylamidase belonging to the amidase signature enzyme family, *Mol. Cells*, **29**, 485–492 (2010)
- 65) Nakamura, A., Yao, M., Chimnarong, S., Sakai, N. and Tanaka, I., Ammonia channel couples glutaminase with transamidase reactions in GatCAB, *Science*, **312**, 1954–1958 (2006)
- 66) de Groot, P. W., Ram, A. F. and Klis, F. M., Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls, *Fungal. Genet. Biol.*, **42**, 657–675 (2005)
- 67) Yin, Q. Y., de Groot, P. W., Dekker, H. L., de Jong, L., Klis, F. M. and de Koster, C. G., Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages, *J. Biol. Chem.*, **280**, 20894–20901 (2005).
- 68) Sheppard, K., Akochy, P. M., Salazar, J. C. and Söll, D., The *Helicobacter pylori* amidotransferase GatCAB is equally efficient in glutamine-dependent transamidation of Asp-tRNA^{Asn} and Glu-tRNA^{Gln}, *J. Biol. Chem.*, **282**, 11866–11873 (2007).
- 69) Jahn, D., Kim, Y. C., Ishino, Y., Chen, M. W. and Söll, D., Purification and functional characterization of the Glu-tRNA(Gln) amidotransferase from *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biol. Chem.*, **265**, 8059–8064 (1990).
- 70) Akao, T., Sano, M., Yamada, O., Akeno, T., Fujii, K., Goto, K., Ohashi-Kunihiro, S., Takase, K., Yasukawa-Watanabe, M., Yamaguchi, K., Kurihara, Y., Maruyama, J., Juvvadi, P. R., Tanaka, A., Hata, Y., Koyama, Y., Yamaguchi, S., Kitamoto, N., Gomi, K., Abe, K., Takeuchi, M., Kobayashi, T., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kashiwagi, Y., Machida, M. and Akita, O., Analysis of expressed sequence tags from the fungus *Aspergillus oryzae* cultured under different conditions, *DNA Res.*, **14**, 47–57 (2007)
- 71) Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D. W., Galagan, J. E., Nierman, W. C., Yu, J., Archer, D. B., Bennett, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Fedorova, N. D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R.,

- Iwashita, K., Juvvadi, P.R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J.R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N. and Kikuchi, H., Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*, *Nature*, **438**, 1157–1161 (2005)
- 72) Machida, M., Yamada, O. and Gomi, K., Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future, *DNA Res.*, **15**, 173–183 (2008)
- 73) Takahashi, T., Masuda, T. and Koyama, Y., Enhanced gene targeting frequency in *ku70* and *ku80* disruption mutants of *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*, *Mol Genet Genomics.*, **275**, 460–70 (2006)
- 74) Maruyama, J. and Kitamoto, K., Targeted gene disruption in *Koji mold Aspergillus oryzae*, *Methods Mol Biol.*, **765**, 447–456 (2011)
- 75) Shibuya, I., Tsuchiya, K., Tamura, G., Ishikawa, T. and Hara, S., Overproduction of an alpha-amylase/glucoamylase fusion protein in *Aspergillus oryzae* using a high expression vector, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1674–16745 (1992)
- 76) Takahashi, T., Hatamoto, O., Koyama, Y. and Abe, K., Efficient gene disruption in the *koji-mold Aspergillus sojae* using a novel variation of the positive-negative method, *Mol Genet Genomics.*, **272**, 344–352 (2004)
- 77) Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E.L., Tate, J. and Punta, M., Pfam: the protein families database, *Nucleic Acids Res.*, **42** (Database issue), D222 (2014)
- 78) Shaffer, P.M., Arst, H.N. Jr., Estberg, L., Fernando, L., Ly, T. and Sitter, M., An asparaginase of *Aspergillus nidulans* is subject to oxygen repression in addition to nitrogen metabolite repression, *Mol Gen Genet.*, **212**, 337–41 (1988)
- 79) Wilson, R.A. and Arst, H.N. Jr., Mutational analysis of AREA, a transcriptional activator mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans* and a member of the "streetwise" GATA family of transcription factors, *Microbiol Mol Biol Rev.*, **62**, 586–96 (1998)
- 80) 湯浅安里, 岡村英喜, 片岡二郎, グルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物及びその利用, 日本国特許庁 特許第 3948151 号 (2007)
- 81) Ruijter, G.J. and Visser, J., Carbon repression in *Aspergilli*, *FEMS Microbiol Lett.*, **151**, 103–14 (1997)

- 82) Kikuchi, M., Hayashi, H., Nakano, E. and Sakaguchi, K., Peptidoglutaminase. Enzymes for selective deamidation of gamma-amide of peptide-bound glutamine, *Biochemistry*, **10**, 1222–1229 (1971)
- 83) Kikuchi, M. and Sakaguchi, K., Some Enzymatic Properties and Substrate Specificities of Peptidoglutaminase-I and II, *Agric. Biol. Chem.* **37**, 1813–1821 (1973)
- 84) Neumann, S. and Kula, M.R., Gene cloning, overexpression and biochemical characterization of the peptide amidase from *Stenotrophomonas maltophilia*, *Appl Microbiol Biotechnol.*, **58**, 772–780 (2002)
- 85) Hartman, S. C. , Glutaminase of *Escherichia coli*. 3. Studies on the reaction mechanism, *J. Biol. Chem.*, **243**, 870–878 (1986)
- 86) Meister, A., Tate, S.S. and Griffith, O.W., Gamma-glutamyl transpeptidase, *Methods Enzymol.*, **77**, 237–253 (1981)
- 87) Folk, J.E. and Chung, S. I., Transglutaminases, *Methods Enzymol.*, **113**, 358–375 (1985)
- 88) Yamaguchi, S., Jeenes, D.J. and Archer, D.B., Protein-glutaminase from *Chryseobacterium proteolyticum*, an enzyme that deamidates glutamyl residues in proteins. Purification, characterization and gene cloning, *Eur J Biochem.*, **268**, 1410–1421 (2001)
- 89) Ogawa, M., Tokuoka, T., Jin, F. J., Takahashi, T. and Koyama, Y., Genetic analysis of conidiation regulatory pathways in *koji-mold Aspergillus oryzae*, *Fungal Genet. Biol.*, **47**, 10–18 (2010)
- 90) Sato, A., Oshima, K., Noguchi, H., Ogawa, M., Takahashi, T., Oguma, T., Koyama, Y., Itoh, T., Hattori, M. and Hanya, Y., Draft genome sequencing and comparative analysis of *Aspergillus sojae* NBRC4239, *DNA Res.*, **18**, 165–176 (2011)
- 91) Linz, J.E., Wee, J. and Roze, L. V., *Aspergillus parasiticus* SU-1 genome sequence predicted chromosome structure and comparative gene expression under aflatoxin-inducing conditions: evidence that differential expression contributes to species phenotype, *Eukaryot Cell*, **8**, 1113–1123 (2014)
- 92) Kimura, S., Maruyama, J., Takeuchi, M. and Kitamoto, K. , Monitoring global gene expression of proteases and improvement of human lysozyme production in the nptB gene disruptant of *Aspergillus oryzae*, *Biosci Biotechnol Biochem.*, **72**, 499–505 (2008)
- 93) Wang, B., Guo, G., Wang, C., Lin, Y., Wang, X., Zhao, M., Guo, Y., He, M., Zhang, Y. and Pan, L., Survey of the transcriptome of *Aspergillus oryzae* via massively parallel mRNA sequencing, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 5075–5087 (2010)

- 94) 海附玄龍, 佐藤洋枝, 杉下操, 福島弥一, 小山泰二, 多重に形質転換された麹菌及びそれを用いる調味料の製造法, 日本国特許庁 特許公開公報 特開 2001-321188 (2001)
- 95) Sugiyama, S., Selection of microorganisms for the use in the fermentation of soy sauce, *Food Microbiol.*, **1**, 339-347 (1984)
- 96) Uchida, K., Trends in preparation and uses of fermented and acid-hydrolyzed soy sauce, *Proceedings of the world congress on vegetable protein utilization in human foods and animal feedstuffs*, American Oil Chemists' Society, 78-83 (1989)
- 97) 樋口猛, 内田金治, 阿部敬悦, 醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* D10 株のフーージ抵抗性株育種, 醬研, **27**, 67-74 (2001)
- 98) Masuo, N., Ito, K., Yoshimune, K., Hoshino, M., Matsushima, K. and Koyama, Y., Molecular cloning, overexpression, and purification of *Micrococcus luteus* K-3-type glutaminase from *Aspergillus oryzae* RIB40, *Protein Expr. Purif.*, **38**, 272-278 (2004)
- 99) Masuo, N., Yoshimune, K., Ito, K., Matsushima, K., Koyama, Y. and Moriguchi, M., *Micrococcus luteus* K-3-type glutaminase from *Aspergillus oryzae* RIB40 is salt-tolerant, *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 576-578 (2005)
- 100) Oka, S. and Nagata, K., Isolation and Characterization of Neutral Peptides in Soy Sauce, *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1185-1194 (1974)
- 101) Oka, S. and Nagata, K., Isolation and Characterization of Acidic Peptides in Soy Sauce, *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1195-1202 (1974)
- 102) Arai, S., Yamashita, M. and Fujimaki, M., Glutamyl Oligopeptides as Factors Responsible for Tastes of a Proteinase-modified Soybean Protein, *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 1253-1256 (1972)
- 103) Arai, S., Yamashita, M., Noguchi, M. and Fujimaki, M., Tastes of L-Glutamyl Oligopeptides in Relation to Their Chromatographic Properties, *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 151-156 (1973)
- 104) Noguchi, M., Arai, S., Yamashita, M., Kato, H. and Fujimaki, M., Isolation and identification of acidic oligopeptides occurring in a flavor potentiating fraction from a fish protein hydrolysate, *J. Agr. Food Chem.*, **23**, 49-53 (1975)
- 105) Schlichtherle-Cerny, H. and Amadò, R., Analysis of taste-active compounds in an enzymatic hydrolysate of deamidated wheat gluten, *J. Agr. Food Chem.*, **50**, 1515-1522 (2002)
- 106) Maehashi, K., Matsuzaki, M., Yamamoto, Y. and Udaka, S., Isolation of peptides from an enzymatic hydrolysate of food proteins and characterization of their taste properties, *Biosci Biotechnol Biochem.*, **63**, 555-559 (1999)

- 107) Noguchi, M., Yamashita, M., Arai, S. and Fujimaki, M., On the bitter-masking activity of a glutamic acid-rich oligopeptide fraction, *J. Food Sci.*, **40**, 367-369 (1975)
- 108) Sakurai, T., Misaka, T., Nagai, T., Ishimaru, Y., Matsuo, S., Asakura, T. and Abe, K., pH-Dependent inhibition of the human bitter taste receptor hTAS2R16 by a variety of acidic substances, *J. Agr. Food Chem.*, **57**, 2508-2514 (2009)
- 109) 下野将司, ペプチドとアミノ酸による美味しい減塩食品の開発, *食品と開発*, **46**, 13-15 (2012)

関連原著論文

1. Ito, K., Umitsuki, G., Oguma, T. and Koyama, Y., Salt-tolerant and thermostable glutaminase of *Cryptococcus* species form a new glutaminase family, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1317–1324 (2011).
2. Ito, K., Matsushima, K. and Koyama, Y., Gene cloning, purification and characterization of a novel peptidoglutaminase–asparaginase from *Aspergillus sojae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 5182–5188 (2012).
3. Ito, K., Hanya, Y. and Koyama, Y., Purification and characterization of a glutaminase enzyme accounting for the majority of glutaminase activity in *Aspergillus sojae* under solid-state culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 8581–90 (2013).
4. Ito, K., Koyama, Y. and Hanya, Y., Identification of glutaminase genes of *Aspergillus sojae*, which are involved in glutamate production during soy sauce fermentation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1832–40 (2013).
5. Ito, K. and Koyama, Y., Analysis of specific proteolytic digestion of the peptidoglutaminase–asparaginase of koji molds, *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 253–5 (2014)
6. Masuo, N., Ito, K., Yoshimune, K., Hoshino, M., Matsushima, K., Koyama, Y. and Moriguchi, M., Molecular cloning, overexpression, and purification of *Micrococcus luteus* K-3-type glutaminase from *Aspergillus oryzae* RIB40, *Protein Expr Purif.*, **38**, 272–8 (2004)
7. Masuo, N., Yoshimune, K., Ito, K., Matsushima, K., Koyama, Y. and Moriguchi, M., *Micrococcus luteus* K-3-type glutaminase from *Aspergillus oryzae* RIB40 is salt-tolerant, *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 576–8 (2005)

関連書籍

本学位論文では、下記の書籍および日本語報文の文章および図を引用している。

1. 伊藤考太郎, 「醤油の微生物」, 環境と微生物の事典, 日本微生物生体学会編, p385-386, 朝倉書店 (2014)
2. 伊藤考太郎, しょうゆ醸造に寄与する黄麹菌グルタミンナーゼ, 発酵・醸造食品の最前線, 北本勝ひこ監修, p143-147, シーエムシー出版 (2015)
3. 伊藤考太郎, 海附玄龍, 小熊哲哉, 小山泰二, *Cryptococcus* 属酵母由来の新規なグルタミンナーゼ遺伝子, 醤油の研究と技術, Vol. 38, No. 5, 279-289 (2012)
4. 伊藤考太郎, 麹菌由来の新規ペプチドグルタミンナーゼ・アスパラギナーゼ - 第1報 -, 醤油の研究と技術 Vol. 42, No. 1, 47-60 (2016)
5. 伊藤考太郎, 麹菌由来の新規ペプチドグルタミンナーゼ・アスパラギナーゼ - 第2報 -, 醤油の研究と技術, Vol. 42, No. 3, 213-226 (2016)
6. 伊藤考太郎, しょうゆ醸造におけるグルタミン酸生成に関わるグルタミンナーゼ遺伝子の同定, 醤油の研究と技術, Vol. 42, No. 5, 339-352 (2016)
7. 伊藤考太郎, 「醤油の旨味と麹菌酵素」, 食と微生物の事典, 朝倉書店 (2017)
8. 伊藤考太郎, しょうゆ醸造に寄与する黄麹菌由来グルタミンナーゼに関する研究, 生物工学会誌, **95** (2017)

謝辞

本論文を作成するにあたり多大なご助言とご指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻分子育種学研究室 正木春彦教授に感謝申し上げます。

本研究は、キッコーマン株式会社および、(公財)野田産業科学研究所において、多くの方々に支えて頂きながら行われたものです。本研究テーマを与えて頂き、また、長い期間研究に従事させて頂いたキッコーマン株式会社 常務執行役員 松山旭研究開発本部長、(公財)野田産業科学研究所 小山泰二所長に深く感謝致します。

また、研究実務において多大なるご助言とご指導を賜りました半谷吉識氏、小熊哲哉博士、海附玄龍博士、松島健一郎博士、高橋理博士に深くお礼を申し上げます。共に同じ部屋で熱い議論をさせて頂いた松田俊文氏、佐藤敦史氏、しょうゆの仕込み試験等を教えていただいた仲原文晴博士に深謝いたします。*A. oryzae* RIB40株のプロテアーゼ破壊株等を分与して頂いた小川真弘博士、原精一博士、篠原靖智氏にお礼申し上げます。そして、私の手となり足となり、無理な要求に不平不満も言わずに、研究をサポートして頂いた遠藤奈穂子氏、中村友紀氏に深く感謝いたします。

GIs タンパク質に関する研究は、大分大学との共同研究で行われたものです。森口充瞭大分大学名誉教授、吉宗一晃博士(現：日本大学生産工学部准教授)、増尾直久博士(現：興人ライフサイエンス(株))に心よりお礼申し上げます。

本論文を執筆するきっかけを与えて頂いた佐々木隆博士に心よりお礼申し上げます。また、本論文を製作する上で、惜しみない協力をして頂いた井上伸昭氏、井上和香子氏に感謝申し上げます。また、ここに至るまで精神的にも経済的にも支えてくれた伊藤俊司氏、伊藤央子氏、伊藤太二郎氏に心から感謝申し上げます。

最後に、本研究で的確な助言を頂き、また、研究に没頭する私を温かい目で支え続けてくれた伊藤咲良博士に心から感謝申し上げます。あなたの助言なくしてこの研究は完成しませんでした。心からお礼申し上げます。その他、数え切れないほど多くの皆様にも支えて頂き、その支えなくして、この研究は成し得ませんでした。ここに深く感謝申し上げます。