

論文の内容の要旨

論文題目 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
氏 名 伊藤 考太郎

1. はじめに

しょうゆは大豆と小麦と食塩を原材料とし、微生物発酵によって作られる日本の伝統的な発酵調味料である。しょうゆはアミノ酸を多く含んだ調味液であり、各種アミノ酸は様々な呈味を与える。その中でもしょうゆのうま味の中心的な役割を果たすのがグルタミン酸である。

しょうゆ中のグルタミン酸は、以下の2つの経路から生成されると考えられている(図参照)。すなわち、(1)原料タンパク質がプロテアーゼ、ペプチダーゼによって分解され、直接遊離する経路と、(2)原料タンパク質の分解により生じたグルタミンがグルタミナーゼという酵素によりグルタミン酸に変換される経路である。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、グルタミンは、非酵素的な反応によって、比較的速やかにうま味のないピログルタミン酸へと変換する。しょうゆ中のグルタミン酸含量を高めるためには、速やかにグルタミンをグルタミン酸に変換させ、ピログルタミン酸の生成反応を上回る必要がある。そのために(2)の経路が重要となる。

グルタミナーゼは、様々な生物種に見出されているが、しょうゆ醸造では、黄麹菌のグルタミナーゼが深く関わっていることが知られている。そのため、古くから黄麹菌のグルタミナーゼを単離、精製し、遺伝子を同定する試みがされている。しかし、黄麹菌のグルタミナーゼは、生産量が低く、菌体に結合しており、かつ、プロテアーゼ分解を受けやすい性質から酵素精製が非常に困難であり、タンパク質側からしょうゆ醸造に寄与するグルタミナーゼを探すアプローチは難しい状況にあった。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* および *Aspergillus sojae* のゲノム解析が報告され、遺伝子配列情報の全容が明らかとなった。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飛躍的に進歩し、遺伝子レベルの研究も活発に行われるようになってきている。そこで筆者は、ゲノム情報を活用し、真にしょうゆ醸造に寄与するグルタミナーゼを遺伝子側から明らかにするアプローチで研究を行った。

1. 酵母由来の耐塩性グルタミナーゼ遺伝子の単離

黄麹菌のグルタミナーゼは、至適 pH がややアルカリ側で、耐塩性に乏しいという問題点があった。そのため、黄麹菌のグルタミナーゼが重要視される一方で、しょうゆ醸造に適した耐塩性に優れるグルタミナーゼも求められていた。過去の研究で、様々な微生物種から耐塩性グルタミナーゼのスクリーニングが行われ、*Cryptococcus* 属酵母 (*C. albidus*, *C. nodaensis*) にその活性が見出されていた。そこで、筆者らは、これらの酵素を精製して遺伝子をクローニングした。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 enzymes family に属するが、相同性の高いタンパク質は全て機能未知タン

パク質であり、その中でも独立したサブファミリーを形成した。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遺伝子として *gah* (glutamine amidohydrolase) 遺伝子と名付けた。

2. *Cryptococcus* 属酵母由来の耐塩性グルタミナーゼと相同性のある黄麹菌グルタミナーゼ遺伝子の探索

黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 株のゲノム配列情報が明らかとなったため、上記の *Cryptococcus* 属酵母由来の新規なグルタミナーゼと相同な遺伝子を *in silico* で探索した。その結果、相同性の高い4つ遺伝子 (*AogahA*, *AogahB*, *AogahC*, *AogahD*) を見出した。その中でも *AogahA* 遺伝子は EST (Expressed Sequence Tags) 解析で発現が確認されたので、そのオルソログ遺伝子 (*AsgahA*) を *A. sojae* よりクローニングし、大量発現させ、タンパク質の精製および諸性質の決定を行った。*AsGahA* タンパク質は耐塩性グルタミナーゼと相同性のあるタンパク質であったが、耐塩性は低かった。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。

3. しょうゆ麹における主要なグルタミナーゼ活性を示す黄麹菌グルタミナーゼ遺伝子の特定

黄麹菌には複数のグルタミナーゼが存在することが明らかになっていたが、ゲノム配列中に存在する遺伝子数は不明であった。そこで、既知のグルタミナーゼと相同性のある遺伝子を *in silico* で探索した。その結果、*C. nodaensis* 由来の耐塩性グルタミナーゼと相同性のある Type I、*Bacillus subtilis* 由来の γ -グルタミルトランスぺ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、*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、*Micrococcus luteus* 由来の耐塩性グルタミナーゼと相同性のある Type IV の4つの Type に分かれ、*A. oryzae* および *A. sojae* のゲノム配列中には、それぞれ12個と10個のグルタミナーゼ遺伝子が存在した。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。

次に、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。検証しやすさを考慮して、宿主には *A. sojae* を用いた。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 *AsgahB* 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、しょうゆ麹における黄麹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。続いて、*AsgahB* 遺伝子由来のタンパク質を精製し、諸性質を決定した結果、基質特異性は異なるものの *AsGahA* タンパク質と同様にペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼであることを明らかにした。

4. 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同定

黄麴菌のグルタミンナーゼ活性としょうゆ諸味のグルタミン酸含量とは正の相関にあるという知見から、*AsgahB* 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、*AsgahB* 遺伝子破壊株を含め、単独遺伝子破壊株を用いて試験醸造したしょうゆのグルタミン酸含量はどれも低下しなかった。これら 10 個の遺伝子は全てグルタミン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ンナーゼ活性により補完される可能性が考えられた。

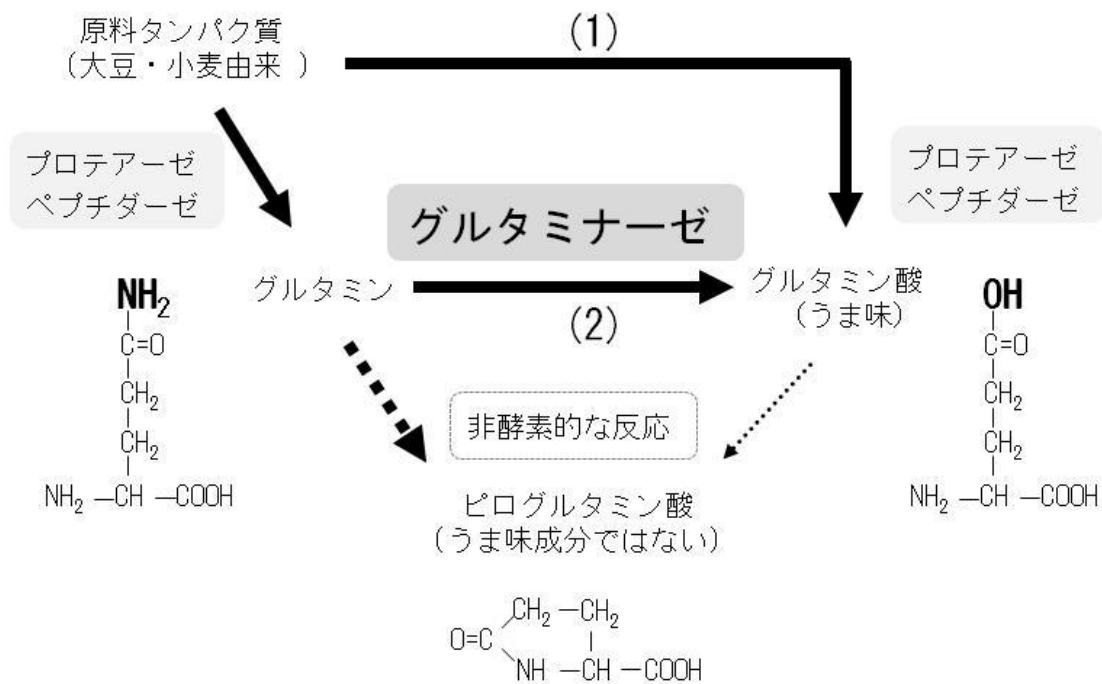
そこで、この 10 個のグルタミンナーゼ遺伝子について、タイプ別に多重に破壊した株、それぞれのタイプを組み合わせて多重に破壊した株、さらに全てのグルタミンナーゼ遺伝子を破壊した株を作製した。Type I、Type II および Type IV を同時に破壊した 7 重遺伝子破壊株および全グルタミンナーゼ遺伝子破壊株はグルタミンナーゼ活性が 1/100 以下に低下した。それらを用いて試験醸造したしょうゆでは、グルタミン酸含量が 60% 減少し、同時にピログルタミン酸含量が増加した。このグルタミン酸の減少量は、筆者らが推定したグルタミンナーゼ反応により生成される量とほぼ一致した。

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 *AsgahA*、*AsgahB*、Type II の *AsggtA* および Type IV の *Asg/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試験醸造では、仕込み初期に市販のグルタミン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になった。以上の結果から、しょうゆのグルタミン酸生成には、これら 4 つのグルタミン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 つのグルタミンナーゼの中で 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、AsGahB タンパク質もしくは AsGahA タンパク質が残存する 3 重遺伝子破壊株 ($\Delta gahA \Delta ggtA \Delta g/s$ 、 $\Delta gahB \Delta ggtA \Delta g/s$) 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 のグルタミン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 種のグルタミンナーゼは共通して、ペプチドグルタミンナーゼ活性をもつため、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を明らかにした。

5. おわりに

酵母由来の耐塩性グルタミンナーゼ遺伝子の同定を端緒にし、ゲノム情報を活用することで、これまで推定されながらも明らかにできなかったしょうゆ醸造で機能する黄麴菌由来のグルタミンナーゼを同定した。しょうゆ醸造に寄与する 4 つの黄麴菌グルタミンナーゼのうち、3 つはゲノム情報が明らかになって初めて見出されたものである。また、しょうゆのグルタミン酸生成にはペプチドグルタミンナーゼ活性が重要であり、この活性を指標に黄麴菌を選抜することで、グルタミン酸含量の高いしょうゆをつくるのが可能となる。今後は、本研究手法と同様に、しょうゆ醸造で機能する黄麴菌由来の様々な酵素を特定し、しょうゆ醸造で重要な酵素を強化した黄麴菌を育種することで、さらにおいしいしょうゆの開発に取り組んでいきたい。



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、非酵素的な反応により自発的に環化し、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。