



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

味噌用麹菌の酸性ホスファターゼ遺伝子に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2015-10-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 安田, 庄子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/50394

味噌用麹菌の酸性ホスファターゼ遺伝子
に関する研究

2014 年

岐阜大学大学院連合農学研究科
安 田 庄 子

目次

序論-----	1
第1章 味噌用麹菌における高頻度遺伝子相同組換え系の確立	
1-1 諸言-----	8
1-2 実験材料および実験方法-----	11
1-3 実験結果および考察-----	15
1-4 要約-----	21
第2章 味噌用麹菌における酸性ホスファターゼ A 遺伝子 (<i>aphA</i>) の破壊と AphA の諸性質の解明	
2-1 諸言-----	22
2-2 実験材料および実験方法-----	23
2-3 実験結果および考察-----	27
2-4 要約-----	38
第3章 味噌用麹菌の主要な酸性ホスファターゼ C 遺伝子 (<i>aphC</i>) の特定と AphC の諸性質の解明	
3-1 諸言-----	40
3-2 実験材料および実験方法-----	40
3-3 実験結果および考察-----	48
3-4 要約-----	64
総括および結論-----	65
謝辞-----	68
引用文献-----	69
学位論文の基礎となる学術論文および既発表学術論文-----	76

序論

味噌は日本の伝統的な発酵調味食品であり、醤油、酒、味噌、酢と同様に、現在も日本の料理に欠かせない調味料である。味噌は、最近ではその奥深い調味性だけでなく、健康を増進する機能性においても注目され、広く世界で利用されている。味噌には身体に必須な栄養成分である必須アミノ酸や各種ビタミン類が豊富に含まれている。疫学的には、味噌汁の摂取によりがんや生活習慣病のリスクが低下することが明らかにされており、脂肪酸やペプチド等がその主要な機能性成分であると考えられている。また、原発事故によって受ける健康被害すなわちがんの抑制の効能についても注目されている。さらに、味噌汁を摂取する日本食形態そのものが栄養摂取の観点で理想的なバランスをもたらし、人々の健康に寄与するとして見直されている。したがって、味噌の消費量を向上させることは、日本社会そして世界にとって大変意義深いことである。

みそ品質表示基準（平成 23 年 10 月 31 日消費者庁告示第 11 号）によると、みそ（味噌）の定義は「1. 大豆若しくは大豆及び米，麦等の穀類を蒸煮したものに，米，麦等の穀類を蒸煮してこうじ菌を培養したものを加えたもの又は大豆を蒸煮してこうじ菌を培養したもの若しくはこれに米，麦等の穀類を蒸煮したものを加えたものに食塩を混合し，これを発酵させ，及び熟成させたもののうち半固形状のもの。2. 1に砂糖類（砂糖，糖みつ及び糖類をいう。），風味原料（かつおぶし，煮干魚類，こんぶ等の粉末又は抽出濃縮物，魚醤油，たん白加水分解物，酵母エキスその他これらに類する食品をいう。以下同じ。）等を加えたもののうち半固形状のもの。」とされている。

日本の味噌の起源には諸説がある。古代中国の「鼓」^し（塩を加えない発酵大豆食品）あるいは「醬」^{ひしお}（魚・肉の塩漬けペースト食品）に源があると日本の古文書には記されているが、中国には「味噌」に類似した語の記録はない。また、縄文人の生活跡からは、縄文時代にどんぐりを使用した味噌のような食品があったことがわかっている。

いずれにしても現在の日本の味噌は中国のそれとは製造技術と品質、形態、用途が大きく異なっていることから、日本で独自に造られてきたものである（中野政弘, 1982）。中国や東南アジアの国々では穀物粉を水で練ったものにクモノスカビ（*Rhizopus* 属）を生育させた「もち麴」を利用する。それに対し日本の味噌では、蒸した米（米味噌）や大麦（麦味噌）および大豆（豆味噌）に麴菌（*Aspergillus* 属）の孢子を接種して培養した「ばら麴」を麴として使用することが最大の特徴である（加藤百一, 1987）。味噌麴には、主に *Aspergillus oryzae* が分泌生産した多種多様な糖質加水分解酵素やたんぱく質分解酵素、脂質分解酵素、グルタミナーゼ、フィターゼなどが多量に含まれ、これらの酵素は味噌の発酵・熟成に重要な役割を果たす。製麴工程の後、米味噌や麦味噌の場合は米麴・麦麴に蒸した大豆と塩水を加え、豆味噌の場合は豆麴がスターターかつ分解基質であるため塩水のみを加えて、数か月～数年熟成することにより「元味噌」と呼ばれる生の味噌が製造される。製麴中および熟成中には、味噌用麴菌 *A. oryzae* のほか、原料や製造現場の道具に由来する耐塩性乳酸菌（*Tetragenococcus halophila*）や耐塩性酵母（*Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida versatilis*）などの様々な微生物が複合的に作用し、醸造所特有の味噌の味や風香味が付与される。味噌の品質を表す尺度には「味・香り・色」が挙げられる。醸造所によっては、味噌の「味・香り・色」の向上を目的として、種麴のブレンドや、特定の乳酸菌や酵母を添加するなどの数々の工夫をしている。

現在、日本には数百年もの古い歴史をもつ種麴メーカーが複数存在し、長年にわたり収集・改良してきた麴菌菌株コレクションの中から、味噌の種類や醸造所の製造条件に合わせて麴菌孢子をブレンドし種麴として供給している。種麴メーカーの歴史を辿っていくと、既に室町時代に酒や味噌・醤油製造に「麴」を販売する「もやし屋」として活躍していた（奈良原秀樹, 1987）。彼らは優良な麴にアルカリ性の木灰（主に椿）を振りかけることで他のかびや雑菌を排除し、さらに麴菌孢子の耐久性を向上させるという特殊技術を活用して優良な麴の種を生産していたと考えられる。その後、

明治時代に寒天培地を用いた麴菌の単離・純粋培養法が海外から導入され、純粋培養して得られた麴菌胞子をブレンドした「種麴」が、酒や味噌・醤油などの醸造に使用されるようになったとされる。

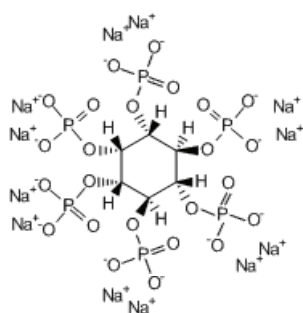
味噌用麴菌に要求される一般的な性質としては、①繁殖速度が速い、②プロテアーゼが強い、③機械製麴における通風のため中毛～短毛である、④麴の香りが良い、などが挙げられる。伝統的な味噌の製法、つまり木桶を用いた天然醸造では、麴の品質は使用する麴菌の違いよりも、工場における製麴操作条件の違いに大きく影響されていた。しかし、近代的設備を導入した工場では製麴条件の制御がある程度可能となったため、麴菌の改良が味噌の品質向上に反映されやすくなった。そこで醸造メーカーでは、1960 年頃から自然変異や人為突然変異（薬剤・UV 等）により優良麴菌の育種・選抜を精力的に行ってきた。しかし、このような育種・選抜方法にはその低い確率や選抜株の評価方法確立など困難な点が多いため、麴菌の好ましい性質のみを改良・付与することは至難の業である。21 世紀に入り生命科学の進歩は著しく、麴菌 *A. oryzae* の「生命の設計図」である全ゲノム配列が *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus* と同時に 2005 年に決定された (Machida *et al.*, 2005)。 *A. oryzae* のゲノム解析には、ソラマメが分離源で野生株に近いとされる酒類総合研究所の保存株 RIB40 株が使用された。その後 *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus sojae* (Sato *et al.*, 2011) と次々と *Aspergillus* 属糸状菌の全ゲノム配列が決定された。その結果、これまで明確でなかった重要な知見が新たに得られた。例えば、これまで麴菌 *A. oryzae* のプロテアーゼに関しては約 20 種類が知られていたが、ゲノム上には 126 ものプロテアーゼ様遺伝子が存在していた (Machida *et al.*, 2005)。また Tominaga らは *A. oryzae* RIB40 株のアフラトキシン生合成遺伝子ホモログクラスター 46 kb をクローニングし、その中の遺伝子の一部が欠落しているによりアフラトキシンを生産できないこと（安全であること）を示したが、「ゲノム上に他のアクティブなアフラトキシン生合成遺伝子ホモログクラスター配列がない」ことが示され、安全性の根拠がより明確になった

(Tominaga *et al.*, 2006)。そしてほぼ同時に、麹菌の遺伝子操作技術のうち、これまで非常に効率が悪かった遺伝子ターゲティング技術が大きく向上した（詳細は第1章で述べる）。このように、農学・医学・衛生学等において重要な *Aspergillus* 属糸状菌のゲノム情報が公開され、麹菌の遺伝子操作技術が向上したことは、日本の醸造産業にとって製造プロセスの革新や新たな健康機能性を付与した新製品開発を行う上で大きな前進であると考えられる。

日本では近年、消費者の嗜好変化や利便性追求の影響を受け、元味噌の市場は縮小し、核酸系調味料を添加した調味味噌（だし入り味噌加工品）の市場が拡大している。だし入り味噌加工品には主として 5'-リボヌクレオチドナトリウム、すなわち鰹節の旨味主成分 5'-IMP および椎茸の旨味主成分 5'-GMP のナトリウム塩 (Fig. I-1) が添加されており、これらが元味噌に含まれるグルタミン酸と協調的に働いて「味」を劇的に向上させる。だし入り味噌加工品の製造においては、生味噌を通常 85°C、15 分相当の加熱処理を行い、味噌中に含まれるだし成分分解酵素、ホスファターゼを不活化する必要がある (Oike *et al.*, 1984)。この高温加熱工程には大規模な加熱設備、燃料費および人件費が必要であるため、だし入り味噌加工品を製造できるメーカーは一定規模以上のメーカーに限定されている。しかし、味噌は現在も地域色の強い調味料であり、地域の小規模メーカーの製品にも根強い人気がある。したがって、高温加熱処理を必要としない新たな調味料製造技術を開発すれば、地域の醸造メーカーの特色ある地域食材開発に貢献でき、消費者の選択肢も広がって豊かな暮らしに貢献できる。また、現状のだし入り味噌加工品の製造工程においても、高温の加熱工程が省略できれば電力や燃料の使用量抑制に貢献できると共に、加熱による製品の劣化が防止できるため品質向上に役立つと考えられる。

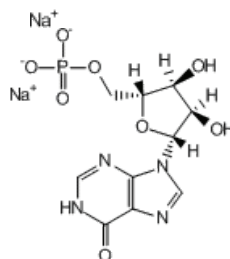
元味噌由来の加水分解酵素の一種、酸性ホスファターゼ (Acid phosphatase, Aph) は、味噌に添加される 5'-リボヌクレオチドを脱リン酸化して旨味のないヌクレオシドを生成する主要な分解酵素であると考えられる (Fig. I-2, Oike *et al.*, 1984)。味噌

A

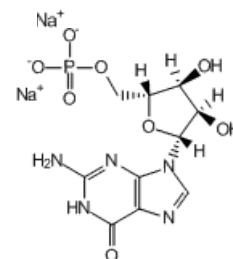


Sodium Phytate

B



5'-IMP · 2Na



5'-GMP · 2Na

Fig. I-1. Chemical structures of (A) sodium phytate and (B) disodium 5'-nucleotides supplemented in *miso* products as *umami* flavor enhancers. The illustrations were quoted from Japan Chemical Substance Dictionary Web service.

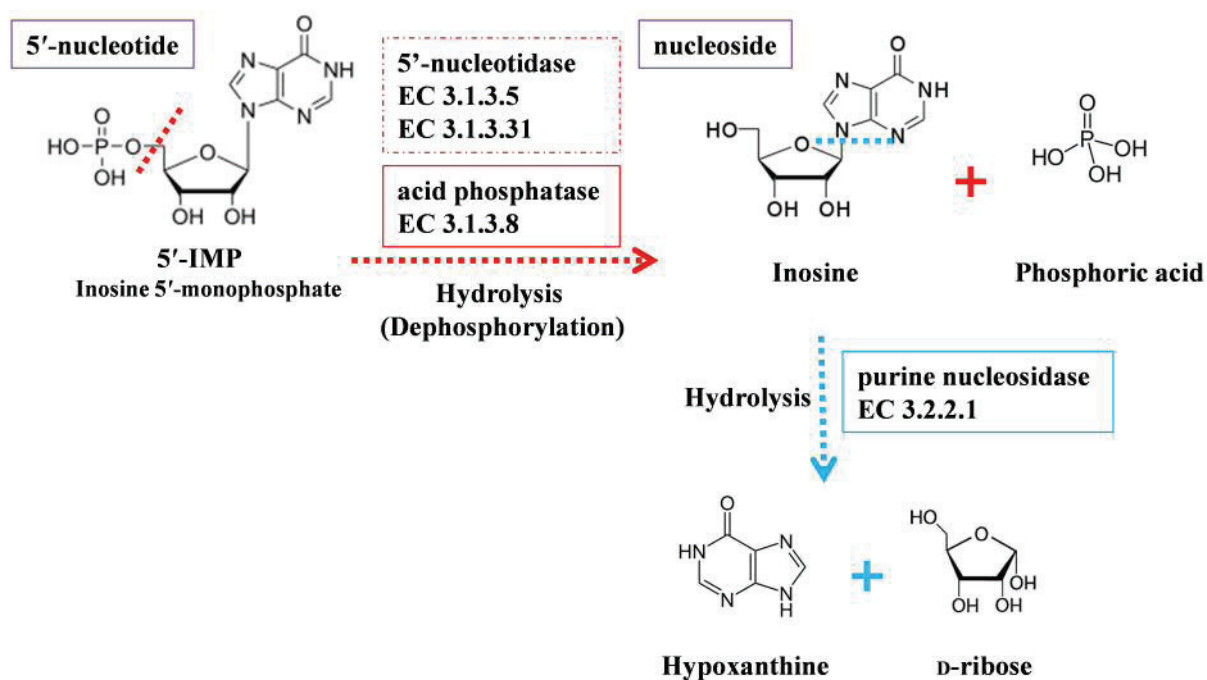


Fig. I-2. A hypothetical primary pathway for degradation of 5'-IMP (5'-nucleotides) added to unheated *miso*.

の醸造過程には様々な微生物が関与しているため、複数の微生物由来の多種類の酵素が含まれる。しかし、上述したように元味噌中に含まれる加水分解酵素の多くは味噌麴に由来するため、その大部分は味噌用麴菌 *A. oryzae* に由来すると考えられる。そこで本研究では、酸性ホスファターゼ活性の低い元味噌の製造を実現するために、味噌麴において酸性ホスファターゼ活性の極めて低い *A. oryzae* を分子生物学的手法により育種することを目標とした。

リンはすべての生物の必須元素であり、生体内では主に DNA や RNA などの核酸、ATP・ADP などのエネルギー貯蔵体、脊椎動物の骨格成分であるリン酸カルシウムという形で存在している。そして、リン酸はエネルギーの代謝や細胞シグナルの情報伝達など様々な生体反応に関与している。したがって、リン酸を体外から取り込んで利用する機構は生命にとって必須である。味噌用麴においては、麴菌 *A. oryzae* は米・麦・大豆といった植物種子を栄養源としているため、植物種子の主要なリン酸貯蓄形態であるフィチン酸やその他のリン酸エステルを分解してリン酸を取り込んでいると考えられる。*A. oryzae* が分泌する酸性ホスファターゼおよび酸性ホスファターゼの一種であるフィターゼに関しては、これまでにいくつかの研究が報告されている (Fujishima *et al.*, 1964; Wang *et al.*, 1980; Oike *et al.*, 1984; Shimizu, 1993; Fujita *et al.*, 2003a, 2003b)。フィターゼはフィチン酸を効率的に加水分解し、リン酸を遊離する。糸状菌由来のフィターゼは基質特異性が低く、活性の測定に用いられるパラニトロリン酸 (PNPP) を基質とした場合にも脱リン酸化活性を示す (Mitchell *et al.*, 1997; Wyss *et al.*, 1999b)。 *A. oryzae* RIB40 株由来のフィターゼ遺伝子産物は精製され、性質の一部が明らかにされている (Uchida *et al.*, 2006)。フィターゼ以外の酸性ホスファターゼについては他の糸状菌 *Aspergillus niger* (MacRae *et al.*, 1988) や *Penicillium chrysogenum* (Hass *et al.*, 1992) 由来のものに知見があり、環境中にリン酸が豊富な場合にはその酵素生産 (遺伝子発現) が抑制されることがわかっている。以上のように、麴菌 *A. oryzae* 由来の酸性ホスファターゼに関しては一部が解明されているが、大部分は不明

のままである。また、解明された酵素に関しても 5'-リボヌクレオチドに対する脱リン酸化活性についてはほとんど調べられていない。

A. oryzae においては、形質転換法、遺伝子破壊法や遺伝子削除法およびレポーター融合遺伝子の導入法といった分子生物学的手法がある程度確立しており、我々もこれまでに醤油麹菌実用株において高頻度遺伝子相同組換え系を開発している。第 1 章では、味噌用の麹菌実用株における酸性ホスファターゼ低生産株の分子育種を行うために、株式会社ビオックから供与を受けた味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株を用いて、効率的な相同組換え系の開発を試みた。すなわち、双方向性遺伝子マーカーである *pyrG* 遺伝子および非相同末端結合修復系の構成因子 Ku70 タンパク質をコードする *ku70* 遺伝子の二重破壊株を *A. oryzae* KBN630 株から取得した。第 2 章では、第 1 章で開発した味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株の高頻度相同組換え系を活用して、*A. oryzae* RIB40 株由来のフィターゼ遺伝子を *aphA* 遺伝子と命名して破壊し、中京地域特産の豆味噌用の味噌玉麹（豆麹）を作製し、酸性ホスファターゼ活性の変化を測定した。また、*A. oryzae* において *aphA* 遺伝子を高発現させ、精製した AphA タンパク質について、5'-リボヌクレオチドに対する基質特異性や pH・温度に関する諸性質を解析した。第 3 章では、豆麹中の主要な 5'-IMP 脱リン酸化活性を担う酸性ホスファターゼを明らかにするために、7 個の候補の *aph* 遺伝子破壊株を作出し、豆麹中の酵素生産性を試験した。その結果、*aphC* 遺伝子こそが、味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株の豆麹中の酸性ホスファターゼ活性および 5'-IMP 脱リン酸化活性の両活性において主要な役割を果たすことが判明した。そこで、*A. oryzae* において AphC タンパク質を分泌生産させ精製酵素の諸性質を明らかにし、AphC の 5'-リボヌクレオチド分解への関与を考察した。

第1章 味噌用麹菌における高頻度遺伝子相同組換え系の確立

1-1 諸言

味噌製造において麹菌 *A. oryzae* 由来の酵素が果たす役割を解明することは、味噌製品の品質向上や味噌製造の工程改善に役立つと期待される。*A. oryzae* においては、これまでにいくつかの菌株において形質転換法、遺伝子破壊法や遺伝子削除法およびレポーター融合遺伝子の導入法といった基礎的な遺伝子操作法が確立されている(Yu *et al.*, 2004)。*A. oryzae* の遺伝子操作にはまず、麹菌細胞内に外来 DNA を導入するための形質転換系を確立することが必要である。麹菌は多核であるため栄養要求性変異株を分離することが難しい。また、麹菌は抗生物質などの多くの薬剤に耐性を示すため、大腸菌や酵母のように薬剤耐性遺伝子を有性選択マーカーとして利用することが出来ない。そのような中でも、麹菌の優性マーカーとして利用可能な遺伝子がいくつか報告されている (Table 1-1)。近年、その有用性により盛んに使用されているのが *pyrG* 遺伝子マーカーである。*pyrG* 遺伝子はポジティブセクションとネガティブセクションの両双方向性のセクションマーカーとして利用できるため、連続的遺伝子破壊すな

Table 1-1. Selective marker genes used for *Aspergillus oryzae* transformation

Gene name	Encoded protein	Phenotype
<i>argB</i>	Ornithine carbamoyltransferase	Complementation of arginine auxotrophy
<i>pyrG</i>	Orotidine-5'-phosphate decarboxylase	Complementation of uracil auxotrophy
<i>niaD</i>	Nitrate reductase	Assimilation of nitrate
<i>amdS</i>	Acetamidase	Assimilation of acetamide
<i>sC</i>	Sulfate adenylyltransferase (ATP)	Assimilation of sulfate
<i>pvtA</i>	Thiazole biosynthetic enzyme	Resistance to pyrithiamine
<i>adeA</i>	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamidesynthase	Complementation of adenine auxotrophy

わち「遺伝子マーカーレスキュー法」において大きな役割を果たす。

A. oryzae の遺伝子操作には形質転換系の確立のほかにも重要な課題があった。それは遺伝子ターゲティング効率の低さである。例えば、醤油麹菌 *A. oryzae* KBN616 株の *pyrG* 遺伝子マーカーによる形質転換系で *amyR* 遺伝子破壊を試みた結果、遺伝子ターゲティング効率は 4.5%（形質転換株 200 株中 9 株）であった (Kitamoto *et al.*, 2006)。

最近, *A. oryzae* RIB40 株や KBN616 株において、遺伝子マーカーレスキュー法および高頻度相同組換え系が確立された (Takahashi *et al.*, 2006 b; Kitamoto and Yasuda, 2008; Mizutani *et al.*, 2008)。真核生物の染色体では二重鎖切断が頻繁に起こる。真核生物は完全な染色体を維持するために、二重鎖切断を適切に修復する機構を持っている。遺伝子操作の観点では、この二重鎖切断の修復時に外来 DNA が染色体に組込まれると考えられる。二重鎖切断修復機構には相同組換え修復系と非相同末端結合修復系の2種類が存在している (Kanaar *et al.*, 1998) (Fig.1-1)。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では主に相同組換え修復系により二重鎖切断修復が行われるため、外来 DNA は染色体の相同領域へ組み込まれる頻度が高い。一方、麹菌などの糸状菌では主に非相同末端結合修復系により二重鎖切断修復が行われるため、外来 DNA は染色体上のランダムな位置に組込まれる頻度が高く、遺伝子破壊効率は非常に低い。非相同末端修復系では DNA 依存型プロテインキナーゼ触媒ユニット(DNAPkc), KU70-KU80 ヘテロダイマー, DNA LIG4-XRCC4 複合体が関与している (Walker *et al.*, 2001; Critchlow and Jackson *et al.*, 1998)。したがって、これらのタンパク質をコードする遺伝子の一つを破壊することにより非相同末端結合修復系を遮断することが可能であり、相同組換え修復系による遺伝子ターゲティング効率を著しく上昇させることが出来る。実際に *Neurospora crassa* では *ku70* 遺伝子破壊により遺伝子破壊効率が 100%に上昇し (Ninomiya *et al.*, 2004), *A. fumigatus* では *ku80* 遺伝子破壊により遺伝子破壊効率が 80%に上昇した (Ferreina *et al.*, 2004)と報告されている。また, *A. oryzae* においても RIB40 株では *ku70* 遺伝子破壊により遺伝子破壊効率が約 60%に上昇し (Takahashi *et*

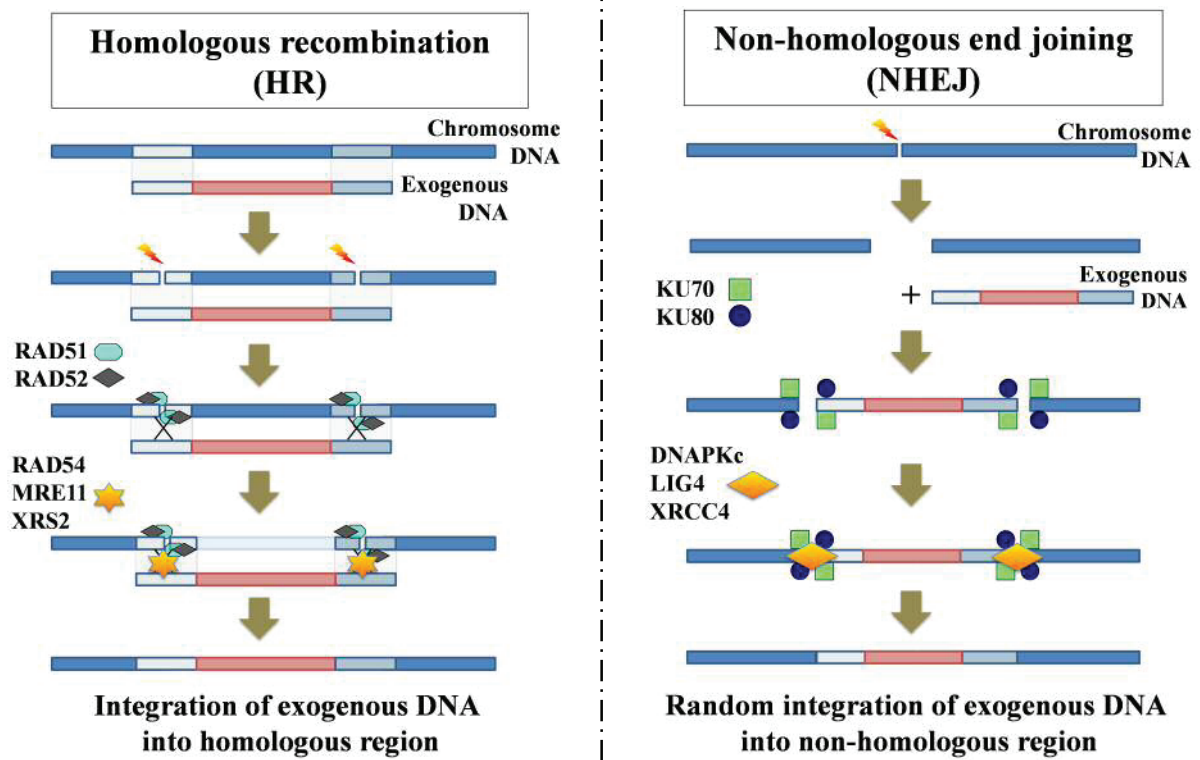


Fig. 1-1. Integration machinery of exogenous DNA into chromosome.

al., 2006b), 醤油麹菌 KBN616 株では *ku70* 遺伝子破壊により遺伝子破壊効率が約 80%に上昇した (Kitamoto and Yasuda, 2008)。また *ligD* 遺伝子の破壊によって *A. oryzae* RIB40 株で遺伝子破壊効率が 100%に上昇した (Mizutani *et al.*, 2008)。このように、*A. oryzae* において効率の良い遺伝子破壊システムが確立し、ようやくの未知の遺伝子の機能や特徴を評価することが可能となったと言える。しかし、味噌用の *A. oryzae* 実用菌株においては、このような効率的な相同組換え系を構築した例が報告されていない。

そこで第 1 章では、味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株における高頻度遺伝子相同組換え系の開発を試みた。双方向選択性の遺伝子マーカーである *pyrG* 遺伝子の形質転換法を利用するために、始めに *A. oryzae* KBN630 株の染色体 DNA から *pyrG* 遺伝子を削除した。次に、導入する DNA 断片の相同組換え効率を増大させるために、非相同末端結合修復系の構成因子 Ku70 タンパク質をコードする *ku70* 遺伝子を、*pyrG* 遺伝子削除変異株の染色体 DNA から削除した。

1-2 実験材料および実験方法

1-2-1 使用菌株

株式会社ビオックから分譲を受けた味噌用麹菌株 *A. oryzae* KBN630 株を *pyrG* 遺伝子遺伝子削除株の分離, *ku70* 遺伝子削除株の分離および染色体 DNA の調製に用いた。*Escherichia coli* DH5 α を種々の DNA 断片のクローニングに使用した。

1-2-2 培地および培養条件

A. oryzae KBN630 株とその派生株の固体培養には, Czapek-Dox (CD) 培地 (3.0% glucose, 0.3% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% KCl, 0.005% MgSO₄·7H₂O, 0.001% FeSO₄·7H₂O) に 1.5% Agar を添加したものを使用した。単一コロニー化には, さらに 0.25% Triton-X100 および 1.0% Trace element (0.014% CaCl₂, 0.0039% MnCl₂·4H₂O, 0.01% ZnSO₄, 0.0005% CuCl₂·2H₂O, 0.00005% Na₂MoO₄·2H₂O, 0.000015% CoCl₂·6H₂O, 0.01% FeCl₃ 0.0372% citric acid) を添加して使用した。*A. oryzae pyrG* 遺伝子欠損株のポジティブセレクションには, 上記寒天培地に 0.1% 5-fluoroorotic acid (5-FOA) と 0.15% uridine および 0.07% uracil を添加したものを使用した。*A. oryzae* の液体培養には, グルコースポリペプトン培地 (GP 培地) (2% glucose, 1% polypeptone, 0.5% KH₂PO₄, 0.5% KCl, 0.1% NaNO₃, 0.05% MgSO₄·7H₂O) を使用した。アミラーゼ活性の検出には, CD 最小寒天培地中のグルコースをスターチに置換えたスターチ寒天培地を使用した。*A. oryzae* の培養は 30°C にて行い, 液体培養時は約 160 rpm の回転式振とうを行った。

E. coli の培養には, 2xYT 培地 (1.6% Bacto tryptone, 1.0% Bacto yeast extract, 0.5% NaCl) を用い, 必要に応じて濃度 50 μ g/mL の ampicillin sodium を添加し, 固体培養時には 1.5% Agar を添加した。培養は 37°C にて行った。

1-2-3 *A. oryzae* の形質転換

A. oryzae を MP 培地 (2.0% malt extract, 0.1% Bacto peptone, 2.0% glucose, pH6.0) 中で (*pyrG* 遺伝子欠損株は 0.25% uridine を加えた MPU 培地中で) 30°C, 24 時間培養後, 菌体をプラスチックフィルターで集菌した。菌体約 4 g を 40 mL のプロトプラスト調製液 (0.38% Novozyme234, 0.12% Cellulase “ONOZUKA” R-10, 0.8 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄ (pH 5.8)) 中で 30°C, 約 2 時間インキュベートした。この液をプラスチックフィルターでろ過後, ろ液を遠心分離して沈殿を回収し, 0.8 M NaCl 溶液で 2 度洗浄し, 0.8 M NaCl-50 mM CaCl₂ 溶液で 1 度洗浄した。得られた沈殿に 0.8 M NaCl-50 mM CaCl₂ 溶液を約 100μl 加えて懸濁し, これをプロトプラスト液とした。プロトプラスト液 50 μl に DNA 断片約 5μg と 12.5 μl の PEG 溶液 (25% PEG6000 in 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)) を加えて氷上で 20 分間保持し, さらに上記の PEG 溶液を 500μl 加えて氷上で 5 分間保持した。この液に 1 mL の 0.8 M NaCl-50 mM CaCl₂ 溶液を加えて混合した後, 滅菌プラスチックシャーレに分注し, 10 mL の再生培地 (21.9 % Sorbitol, 1% Glucose, 0.6% NaNO₃, 0.15% KH₂PO₄, 0.05% KCl, 0.05% MgSO₄·7H₂O, a trace of FeSO₄·H₂O, 2% Bacto agar (pH 6.5)) を加えて固化させ, 30°C で約 1 週間培養して形質転換株を取得した。

1-2-4 *A. oryzae* 染色体 DNA の調製, PCR および DNA シーケンス

A. oryzae の染色体 DNA は, GP 培地で 30°C, 3 日間培養した *A. oryzae* の菌体を集菌して水分を除去した後, 凍結乾燥して粉碎し, フェノール-クロロホルム法で調製した (Sambrook and Russell, 2001; Raeder and Bronda, 1985)。

PCR 用酵素は, TaKaRa Ex Taq DNA ポリメラーゼ (Takara Bio, Otsu, Shiga) および PfuUltra II Fusion HS DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を使用し, それぞれのプロトコルに準じて反応を行った。PCR 装置は GeneAmp9700 サーマルサイクラー (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用した。第 1 章で使用したオリゴヌクレオチドプライマーを Table 1-2 に示した。

主なクローニングステップでは、model 4000LS DNA シーケンサー (LI-COR, Lincoln, NE, USA) および GenomeLab GeXP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いたシーケンシングにより生成物を確認した。

1-2-5 *pyrG* 遺伝子削除用ベクターおよび *ku70* 遺伝子削除用ベクターの構築

pyrG 遺伝子削除用ベクター, pDispyrG は以下のように構築した。*pyrG* 遺伝子 (GenBank/EMBL/DDBJ accession no. AB017705, NITE DOGAN ID: AO090011000868) の 5'-隣接領域 1.6-kb を *A. oryzae* 染色体 DNA とプライマーペア pyrG11/pyrG12 を用いて増幅し, 制限酵素 *SacI* と *XbaI* で消化した。*pyrG* 遺伝子の 3'-隣接領域 1.4-kb を *A. oryzae* 染色体 DNA とプライマーペア pyrG13/pyrG14 を用いて増幅し, 制限酵素 *XbaI* と *HindIII* で消化した。2つの断片を pUC18 の *SacI-HindIII* 部位に挿入し, *pyrG* 遺伝子削除用ベクター pDispyrG を作製した。

ku70 遺伝子削除用ベクター, pDelku70-2 は以下のように構築した。*ku70* 遺伝子 (GenBank/EMBL/DDBJ Accession No. AB214649) の 5'-および 3'-隣接領域それぞれ 1.0-kb を *A. oryzae* 染色体 DNA とプライマーペア ku70-1/ku70-6 および ku70-72/ku70-82 を用いて増幅した。*ku70* 遺伝子コード領域の一部 1.0-kb 断片を *A. oryzae* 染色体 DNA とプライマーペア ku70-9/ku70-10 を用いて増幅した。これらの3つの PCR 産物を混合したものをテンプレートとして, プライマーペア ku70-1/ku70-10 を用いてフュージョン PCR を行った。フュージョン PCR 産物を pUC18 の *SmaI* 部位にサブクローン化して pDelku70-1 を作製した。*A. oryzae* 染色体 DNA とプライマーペア pyrGN2/pyrGC2 を用いて増幅した *pyrG* 遺伝子断片 1.8-kb を *StuI* で消化して pDelku70-1 の *Aor51HI* 部位に挿入し, *ku70* 遺伝子削除用ベクター pDelku70-2 を作製した。

A. oryzae のゲノム情報は, 独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) (<http://www.bio.nite.go.jp/dogan/top>) から取得した。

Table 1-2. Oligonucleotide primers used in Chapter 1

Primer	Sequence
pyrG11	5'-GCGAGCTCTACATTGGCAAAGGAAT-3'
pyrG12	5'-GGTCTAGAATATTTAATCAGCTACC-3'
pyrG13	5'-TGTCTAGACACTAGCTATACCGCCC-3'
pyrG14	5'-CTAAGCTTATCAGCTGCATATCTCT-3'
pyrGN2	5'-CAAGGCCTGCTGGAATTGACATTATTATGG-3'
pyrGC2	5'-AAAGGCCTGATCAATACCGTACGGGAGATT-3'
ku70-1	5'-TGGAATTCGGACCATTTTCGGATAGG-3'
ku70-6	5'-AGAAGCTTTCAGGTGTGTTTGAAAG-3'
ku70-72	5'-TCAAACACACCTGAAAGCTTCTGCCAACTTCCTGCAC-3'
ku70-82	5'-CTGCGTCCCATATAATAGCGCTTTCGTCCGTTTGGATATA-3'
ku70-9	5'-AAAGCGCTATTATATGGGACGCAGG-3'
ku70-10	5'-CCGTCGACCATAGCCCCCAGAACAG-3'
ku70-11	5'-AGCATGCATTTCTGGGATTAGACAGG-3'
amyRN1	5'-TTGAATTCGATCCCTGACTAGAGTC-3'
amyRC1	5'-TTGGATCCAATCCTTCGGTTTACTA-3'

1-3 実験結果および考察

1-3-1 *pyrG* 遺伝子削除株の作出

多くの *A. oryzae* の形質転換方法は、例えば *niaD* 遺伝子 (Kitamoto *et al.*, 1995), *sC* 遺伝子 (Yamada *et al.*, 1997), *pyrG* 遺伝子 (Kitamoto and Yoshino, 1999), *argB* 遺伝子 (Gomi *et al.*, 1987) および *adeA* 遺伝子 (Jin *et al.*, 2004) のような栄養要求遺伝子マーカーの使用に基づいている (Table 1-1)。その中で、オロチジン-5'-リン酸カルボキシラーゼをコードする *pyrG* 遺伝子の使用は、ポジティブセレクションとネガティブセレクションの両方が可能であるため、大きな利点がある。ウリジン・ウラシル非要求性株はウリジン・ウラシル非添加培地中で選抜され、一方、ウリジン・ウラシル要求性株は 5-fluoroorotic acid (5-FOA) 添加培地中で選抜される。5-FOA はウラシル前駆体オロチン酸のアナログ物質であり、糸状菌の生育を著しく阻害する。したがって、ウリジン・ウラシル非要求性株は 5-FOA 存在下では生育できない。

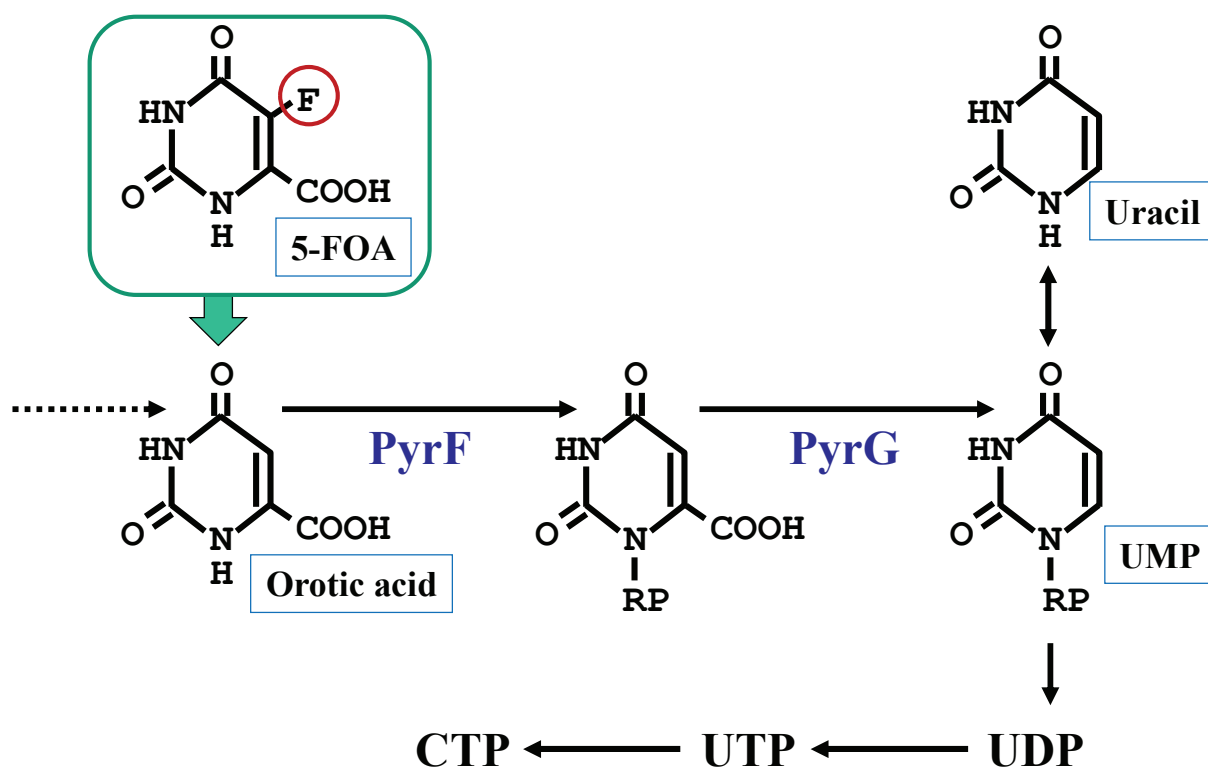


Fig. 1-2. Uracil biosynthesis pathway

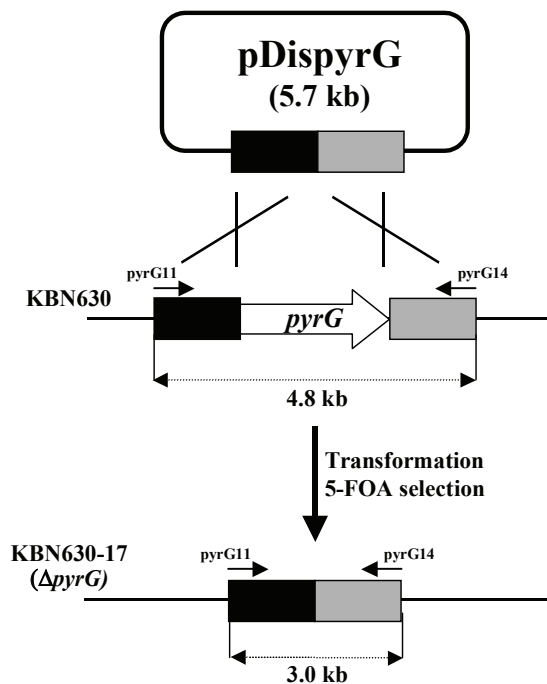
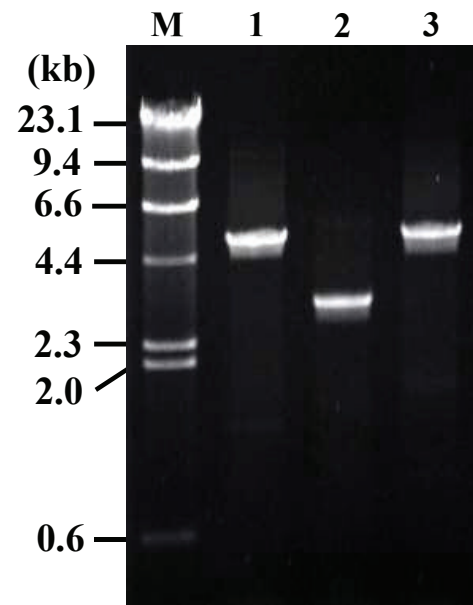
A**B**

Fig. 1-3. Construction scheme and confirmation of the *pyrG* deletion mutant.

A. Scheme of the *pyrG* deletion is shown. PCR-amplified DNA fragments from a *pyrG* deletion vector, pDisPyrG, were transformed to *A. oryzae* KBN630, and 5-FOA resistant transformants were selected. A *pyrG* deletion mutant, *A. oryzae* KBN630-17, was obtained. Black and gray boxes indicate the 5'- and 3'-flanking regions of the *pyrG* gene, respectively, and the open arrow indicates the *pyrG* gene region. The direction of the arrow indicates the orientation of the *pyrG* gene. Small arrows indicate the position of oligonucleotide primers used.

B. Agarose gel electrophoresis of amplified DNA fragments in the *pyrG* gene region of the 5-FOA resistant transformants using primer pair pyrG11/pyrG14. Parental strain, *A. oryzae* KBN630 (Lane 1), the *pyrG* deletion mutant. *A. oryzae* KBN630-17 (Lane 2), and the *pyrG* undeleted mutant, *A. oryzae* KBN630-19 (Lane 3) are shown.

味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株の *pyrG* 遺伝子削除変異株を取得するために、pDispyrG をテンプレートとしてプライマーペア pyrG11/pyrG14 を用いて PCR 増幅を行い、得られた DNA 断片を用いて *A. oryzae* KBN630 株を形質転換した (Fig. 1-3 A)。ソルビトール、ウリジンおよびウラシルを含む CD 最小培地上に生育してきた形質転換株の上に、5-FOA 耐性形質転換株を選抜するために、さらに 5-FOA、ウリジンおよびウラシルを含む CD 最小寒天培地を重層した。得られた 9 株の 5-FOA 耐性株のうち、2 株がウリジン・ウラシル要求性を示した。*pyrG* 遺伝子の削除はプライマーペア pyrG11/pyrG14 を用いた PCR によって確認した。親株 *A. oryzae* KBN630 の染色体 DNA からは 4.8-kb 断片が増幅され (Fig. 1-3 B, Lane 1), *pyrG* 遺伝子削除株の染色体 DNA からは 3.0-kb 断片が増幅された。2 株のウリジン・ウラシル要求性株のうち、一方の *A. oryzae* KBN630-17 株は *pyrG* 遺伝子削除変異株であり (Fig. 1-3 B, Lane 2), 他方の *A. oryzae* KBN630-19 株は *pyrG* 遺伝子削除変異株ではなかった (Fig. 1-3 B, Lane 3)。 *A. oryzae* KBN630-17 株を *pyrG* 遺伝子 (Kitamoto and Yoshino, 1999) を用いて形質転換することで、ウリジン・ウラシル非要求性が回復した。これらの結果から、味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株において、*pyrG* 遺伝子を選択マーカーとする形質転換系が確立したことが示された。

1-3-2 *pyrG*, *ku70* 二重削除変異株の作出

ku70 遺伝子削除カセットを載せたプラスミド pDelku70-2 を *A. oryzae* KBN630 *pyrG*, *ku70* 二重削除変異株の構築に使用した (Fig. 1-4 A)。プライマーペア ku70-1/ku70-10, テンプレート pDelku70-2 を使用した PCR 増幅断片を用いて *A. oryzae* KBN630-17 株を形質転換した。形質転換株からプライマーペア ku70-1/ku70-11 を使用して PCR を行い、増幅した DNA 断片を検出する方法で形質転換株を調べた。調べた 100 株の形質転換株のうち 8 株について、6.3-kb 断片 (Fig. 1-4 B, Lane 2) が検出され、一方親株では 3.6-kb 断片 (Fig. 1-4 B, Lane 1) が検出された。このことは、PCR で増幅した *ku70*

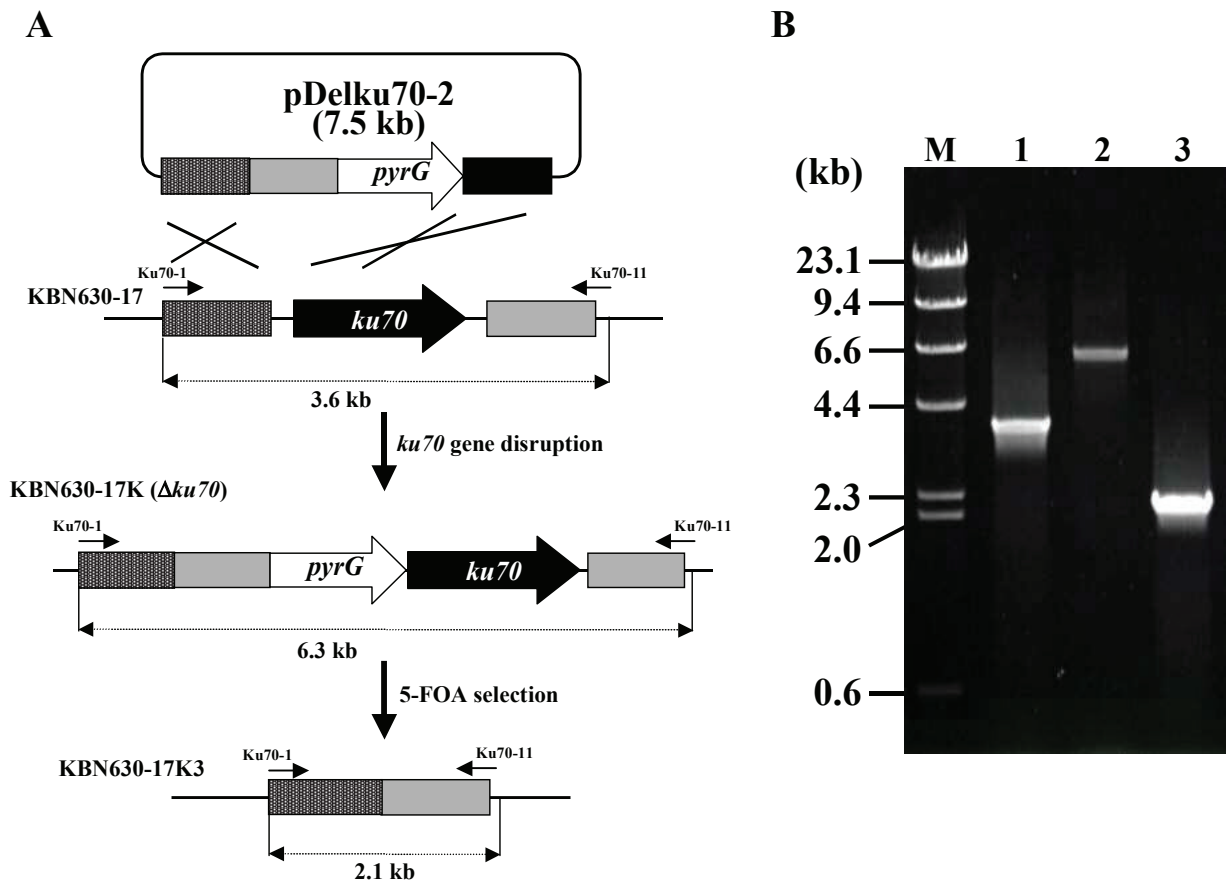


Fig. 1-4. Construction scheme and confirmation of the *ku70* deletion mutant.

A. Scheme of the *ku70* deletion is shown. PCR-amplified DNA fragments from a *ku70* deletion vector, pDelku70-2, were transformed to *A. oryzae* KBN630-17, and *ku70* disruption mutants were selected. A *ku70* disruption mutant, *A. oryzae* KBN630-17K3, was obtained. Then, a *ku70* deletion mutant was selected on 5-FOA treatment of *A. oryzae* KBN630-17K3. Black and gray boxes indicate the 5'- and 3'-flanking regions of the *ku70* gene, respectively. The open and black arrows indicate the *pyrG* and *ku70* genes, respectively. The direction of the arrow indicates the orientation of the *ku70*, *pyrG* genes. Small arrows indicate the position of oligonucleotide primers used. **B.** Agarose gel electrophoresis of amplified DNA fragments in the *ku70* gene region of the *ku70* disruption and deletion strains using primer pair ku70-1/ku70-11. Parental strain, *A. oryzae* KBN630-17 (Lane 1), the *ku70* disruption mutant, *A. oryzae* KBN630-17K (Lane 2), and the *ku70* deletion mutant, *A. oryzae* KBN630-17K3 (Lane 3) are shown.

遺伝子削除カセットが *ku70* 遺伝子座に導入されたことを示す。得られた *ku70* 破壊変異株のうち一株である *A. oryzae* KBN630-17K 株を以降の実験に使用した。*ku70* 遺伝子削除カセットが *ku70* 遺伝子座へ導入されることによって、*ku70* 遺伝子の 1.0-kb の 3'-隣接領域が *pyrG* 遺伝子と *ku70* 遺伝子を挟んだ両側にダイレクトリピートの形で重複する。これらの同一配列間で相同組換えが起こることにより、5-FOA で処理すると *pyrG* 遺伝子および *ku70* 遺伝子が削除される。*pyrG* 遺伝子および *ku70* 遺伝子を削除するために *A. oryzae* KBN630-17K 株の分生子を 5-FOA, ウリジンおよびウラシルを添加した CD 寒天培地に塗抹し、5-FOA 耐性コロニーを選抜した。これらのコロニーは約 1×10^{-2} の頻度で得られた。*pyrG* 遺伝子および *ku70* 遺伝子の検出は、プライマーペア *ku70*-1/*ku70*-11 を使用した PCR により行った。増幅した DNA 断片を検出する方法で形質転換株を調べた。*A. oryzae* KBN630-17K 株の染色体 DNA からは 6.3-kb 断片 (Fig. 1-4 B, Lane 2) が増幅され、5-FOA 耐性株 *A. oryzae* KBN630-17K3 株の染色体 DNA から (Fig. 1-4 B, Lane 3) が増幅された。これらの結果から、KBN630-17 株の *ku70* 遺伝子削除に成功したことが示された。

1-3-3 *pyrG*, *ku70* 二重削除変異株における遺伝子ターゲッティング頻度

ku70 遺伝子削除の遺伝子ターゲッティング頻度に与える効果を調べるために、*A. oryzae* KBN630-17K3 株を *amyR* 遺伝子破壊用ベクター pDisAmR100 (Kitamoto *et al.*, 2006) の制限酵素 *EcoRI* および *SaII* 消化物を用いて形質転換した。再生した *pyrG*⁺ 形質転換株を CD 寒天培地上で選抜して純化し、スターチ寒天培地に移した。*AmyR* はアミラーゼ遺伝子群の誘導転写因子であるため (Petersen *et al.*, 1999), *amyR*⁺ の形質転換株はスターチ寒天培地上で生育させた後に KI-I₂ 染色を行うとクリアゾーンを形成するが、*amyR* 遺伝子破壊株はクリアゾーンを形成しない。50 株の形質転換株中 46 株はクリアゾーンを形成しなかった。すなわち、92% の形質転換株が *amyR* 遺伝子破壊株であり、これらの株において相同組換えが起こったと考えられた。*amyR* 遺伝

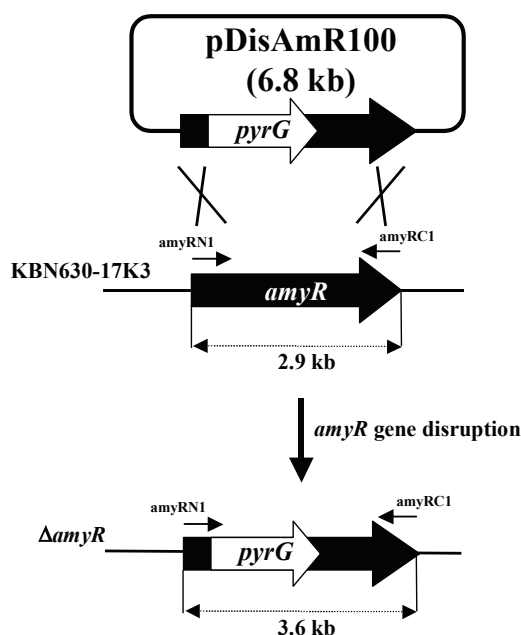
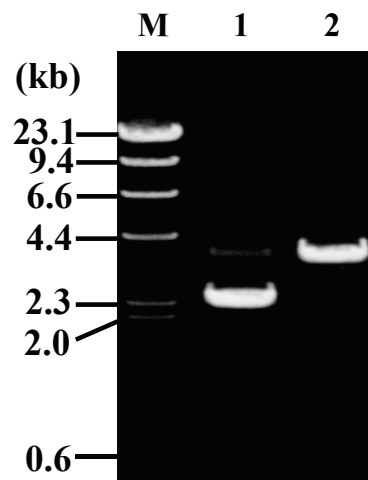
A**B**

Fig. 1-5. Construction scheme and confirmation of the *amyR* disrupted strain.

A. Scheme of the *amyR* disruption is shown. The *amyR* disruption vector pDisAmR100 digested with *Eco*RI and *Sal*I was transformed to *A. oryzae* KBN630-17K3, and the transformants with no amylase activity were selected. Black and white arrows indicate the *amyR* and *pyrG* genes, respectively, and the direction of the arrows indicates the orientation of the respective genes. Small arrows indicate the position of oligonucleotide primers used.

B. Agarose gel electrophoresis of amplified DNA fragments in the *amyR* gene region of the transformants with no amylase activity using primer pair *amyRN1/amyRC1*. Parental strain, *A. oryzae* KBN630-17K3 (Lane 1), the amylase-negative transformant (Lane 2) are shown.

子破壊ベクターpDisAmR100によって親株の *amyR* 遺伝子が置換されたか否かを、プライマーペア *amyRN1/amyRC1* を用いた PCR 解析によって確かめた (Fig. 1-5 A)。親株 *A. oryzae* KBN630-17K3 株の染色体 DNA では 2.9-kb 断片が増幅したのに対し (Fig. 1-5 B, Lane 1), アミラーゼ非生産性形質転換株の染色体 DNA では 3.6-kb 断片が増幅した (Fig. 1-5 B, Lane 2)。 *A. oryzae* KBN630-17K3 株における遺伝子ターゲットイン

グ頻度は、*A. oryzae* KBN616 株の *ku70* 遺伝子破壊株 (82.3%) (Kitamoto and Yasuda, 2008) や *A. oryzae* RIB40 の *ku70* 遺伝子破壊株 (63.4%) (Takahashi *et al.*, 2006b) のそれより高かった。これらの結果から、非相同性末端修復の頻度は *A. oryzae* 株間でも差のあることが示唆されたが、この結果は過去に報告された研究結果 (Takahashi *et al.*, 2006b) とは異なっていた。

これまでの報告と同様に (Takahashi *et al.*, 2006a; Takahashi *et al.*, 2006b), *ku70* 遺伝子の破壊は、生育速度や胞子の着生および発芽といった表現型には影響を与えなかった。*ku70* 遺伝子破壊株と 5-FOA を介した *pyrG* 遺伝子の削除の手法を組み合わせることにより、マーカーをリサイクルして同一株中で効率的に複数の遺伝子を削除することが可能である (Takahashi *et al.*, 2008)。ゆえに、*pyrG*, *ku70* 二重削除変異株である *A. oryzae* KBN630-17K3 株は、味噌麹菌実用株 *A. oryzae* KBN630 の特定の醸造特性解明を目的として広範囲の遺伝子削除解析を行うにあたり、強力なツールとなる。この効率的な遺伝子置換システムを用いることにより、様々な遺伝子の破壊を施した、味噌の製造に適した味噌麹菌実用株の作出が期待できる。

1-4 要約

味噌用麹菌 *Aspergillus oryzae* KBN630 株において *pyrG* 遺伝子 (オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子) 削除株を分離し、*pyrG* 遺伝子を選択マーカーとする形質転換系を開発した。相同組換えによる外来遺伝子の染色体上への組込み頻度を向上させるために、*A. oryzae* KBN630 株に由来する *pyrG* 遺伝子削除株のゲノム上から DNA 二本鎖切断修復機構の 1 つ、非相同末端結合修復系に関わる Ku70 タンパク質をコードする *ku70* 遺伝子を除去した。取得した *pyrG*, *ku70* 遺伝子 2 重削除株において *amyR* 遺伝子の破壊を試みたところ、90% 以上の頻度で *amyR* 遺伝子を破壊することができた。この結果より、味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株において高頻度遺伝子相同組換え系を確立することができた。

第2章 味噌用麹菌における酸性ホスファターゼ A 遺伝子 (*aphA*) の破壊と AphA の諸性質の解明

2-1 諸言

味噌の味を向上させるために、5'-イノシン酸二ナトリウム (5'-IMP) や 5'-グアニル酸二ナトリウム (5'-GMP) のような 5'-リボヌクレオチド二ナトリウムが添加された調味味噌 (だし入り味噌加工品) が製造されている。元味噌中には、5'-リボヌクレオチド二ナトリウムを脱リン酸化して旨味のないリボヌクレオシドを生成する酵素、ホスファターゼが含まれている。そこで、味噌麹中のホスファターゼ活性が著しく低下した味噌用麹菌 *A. oryzae* 菌株を作出することによって、ホスファターゼ失活のための高温加熱処理を回避した、新規な省エネルギー型のだし入り調味味噌製造技術の開発が可能であると考えられる。

A. oryzae が分泌するホスファターゼとフィターゼに関して、これまでにいくつかの研究が報告されているが、それらの酵素の 5'-リボヌクレオチドに対する分解活性についてはほとんど知られていない (Fujishima *et al.*, 1964, Wang *et al.*, 1980, Oike *et al.*, 1984, Shimizu., 1993, Fujita *et al.*, 2003a, 2003b)。フィターゼは、ホスファターゼサブクラスのヒスチジン酸性ホスファターゼファミリーに属する。フィターゼは、植物種子における主要なリン酸貯蓄形態であるフィチン酸を効率的に加水分解し、リン酸を遊離する。糸状菌由来のフィターゼは、酸性ホスファターゼ (Acid phosphatase, Aph) 活性の測定に用いられるパラニトロリン酸 (PNPP) を基質とした場合にも活性を示すことが知られている (Mitchell *et al.* 1997, Wyss *et al.* 1999b)。 *A. oryzae* RIB40 株由来のフィターゼ遺伝子の cDNA 配列は、データベース上に公開されている (GenBank/EMBL/DDBJ accession no. AB042805)。その遺伝子産物は精製され、性質の一部が明らかにされている (Uchida *et al.*, 2006)。我々は、その遺伝子産物がフィチン酸よりも PNPP を基質にした場合により高い活性を示したことから、その遺伝子を酸性ホスファターゼ A 遺伝子 (*aphA* 遺伝子) と命名した。

第2章では、第1章で開発した味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株の高頻度遺伝子相同組換え系を活用して *aphA* 遺伝子を破壊し、豆味噌用の麹における酸性ホスファターゼ活性の変化を観察した。次に、麹菌における強力なプロモーターである *TEF1* 遺伝子プロモーター (Kitamoto *et al.*, 1998) を活用して *aphA* 遺伝子を高発現させ、AphA を分泌生産させると共に、AphA を精製して酵素学的諸性質を解析した。

2-2 実験材料および実験方法

2-2-1 使用菌株

味噌用麹菌株 *A. oryzae* KBN630 株を DNA 調製に使用した。第1章で作出した *A. oryzae* KBN630 株由来の *pyrG*, *ku70* 遺伝子二重削除変異株である *A. oryzae* KBN630-17K3 株および、醤油用麹菌 KBN616 株由来の *alp*, *pyrG* 遺伝子二重破壊変異株である *A. oryzae* PDE1 を形質転換用宿主として使用した。*A. oryzae* PDE1 株は、組換えタンパク質を効率よく生産させるためにアルカリプロテアーゼ遺伝子 (*alp* 遺伝子) (Murakami *et al.*, 1991) を破壊した株である。本株の作製方法についてはどこか別の機会に発表する予定である。

E. coli DH5 α を種々の DNA 断片のクローニングに使用した。

2-2-2 培地および培養条件

A. oryzae の液体培養には、米でんぷん培地 (RS 培地) (3% rice starch, 1% polypeptone, 1% NaNO₃, 0.2% KCl, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O) を使用して 30°C, 約 160 rpm の回転式振とう培養を行った。

豆麹培養は、蒸煮大豆ペレットを培養基として 30°C, 43 時間の培養を行った。蒸煮大豆ペレットは、大豆を水に 2 時間浸漬後、35 分蒸煮してできた蒸煮大豆をミンチ機で直径約 10 mm, 長さ 15~20 mm に成形して使用した。

E. coli の培養には、2xYT 培地 (1.6% Bacto tryptone, 1.0% Bacto yeast extract, 0.5% NaCl)

を用い, 必要に応じて濃度 50 μ g/mL の ampicillin sodium を添加し, 固体培養時には 1.5% Agar を添加した。培養は 37°C にて行った。

2-2-3 *A. oryzae* の形質転換

A. oryzae (Δ pyrG) を MPU 培地 (2.0% malt extract, 0.1% Bacto peptone, 2.0% glucose, 0.25% uridine, pH6.5) 中で 30°C, 24 時間培養後, 1-2-3 に示した方法と同様に Novozyme234 および Cellulase “ONozuka” R-10 を用いてプロトプラスト化した。得られたプロトプラストに PEG 存在下で DNA 断片の取り込みを行わせて形質転換を行い, 再生寒天培地中で 30°C, 約 1 週間培養して形質転換株を取得した。

2-2-4 *A. oryzae* 染色体 DNA の調製, PCR および DNA シークエンス

A. oryzae の染色体 DNA は, GP 培地で 30°C, 3 日間培養した *A. oryzae* の菌体を集菌して水分を除去した後, 凍結乾燥して粉碎し, フェノール-クロロホルム法で調製した (Sambrook and Russell, 2001; Raeder and Bronda, 1985)。

PCR 用酵素は, TaKaRa Ex Taq DNA ポリメラーゼ (Takara Bio, Otsu, Shiga) および PfuUltra II Fusion HS DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を使用し, それぞれのプロトコルに準じて反応を行った。PCR 装置は GeneAmp9700 サーマルサイクラー (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用した。第 2 章で使用したオリゴヌクレオチドプライマーを Table 2-1 に示した。

主なクローニングステップでは, model 4000LS DNA シーケンサー (LI-COR, Lincoln, NE, USA) および GenomeLab GeXP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いたシーケンシングにより生成物を確認した。

2-2-5 *aphA* 遺伝子破壊用ベクターの構築

aphA 遺伝子破壊用ベクター, pDisAphA を以下のように構築した。*aphA* 遺伝子の

Table 2-1. Oligonucleotide primers used in this study

Primer	Sequence
phyA1	5'-TCGAGCTCGGTACCCCTGTTTCATTTTGGTTGAGAA-3'
phyA2	5'-CAGCGGCTTGATCAACTCGTACAAGGCGAC-3'
phyA3	5'-TTGATCAAGCCGCTGCTGGAATTGACATTA-3'
phyA4	5'-GTGACGGGAGATTGTACGAACAGATGGCCC-3'
phyA5	5'-ACAATCTCCCGTCACGGTGCACGGTATCCA-3'
phyA6	5'-CTCTAGAGGATCCCCAGTTTCCACCCGATGTAACG-3'
fupyrGN	5'-CGGTACCCGGGGATCCAAGCCGCTGCTGGAATTGACA-3'
pyrGC2	5'-AAAGGCCTGATCAATACCGTACGGGAGATT-3'
pyrGtef	5'-ATTGATCAGGCCTTTCACTGTGGACCAGACAGGC-3'
tefPrev	5'-CATTTTGAAGGTGGTGCGAACTTTG-3'
tefaphA	5'-ACCACCTTCAAAATGGCGGTCCTTAGCGTGCTCCTTC-3'
aphASal	5'-ATGCCTGCAGGTCGACTGAGGAGAGGAAGGATGGG-3'

5'-隣接領域 1.0-kb と 3'-隣接領域 1.1-kb をそれぞれ *A. oryzae* 染色体 DNA とプライマーペア phyA1/phyA2 および phyA5/phyA6 を用いて PCR 増幅した。*pyrG* 遺伝子断片 1.8-kb を *A. oryzae* 染色体 DNA とプライマーペア phyA3/phyA4 を用いて PCR 増幅した。得られた 3 つの PCR 増幅断片と *Sma*I で消化したベクター pUC18 の合計 4 断片を混合し、In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit (Takara Bio) を用いて In-Fusion 反応を行った。このようにして得られた、*aphA* 遺伝子の 5'-隣接領域と 3'-隣接領域の間に *pyrG* 遺伝子が位置するプラスミドを pDisAphA とした。

2-2-6 *aphA* 遺伝子発現用ベクターの構築

aphA 遺伝子を *A. oryzae* *TEF1* 遺伝子のプロモーター制御下で発現させるために、

発現用プラスミド pTFAphA を以下のように構築した。*pyrG* 遺伝子断片 1.8-kb を *A. oryzae* 染色体 DNA とプライマーペア fupyrGN/pyrGC2 を用いて PCR 増幅した。*A. oryzae* *TEF1* 遺伝子プロモーターの 0.8-kb 断片を *A. oryzae* 染色体 DNA とプライマーペア pyrGtef/tefPrev を用いて増幅した。*aphA* 遺伝子 2.0-kb 断片を *A. oryzae* 染色体 DNA とプライマーペア tefaphA/aphASal を用いて増幅した。得られた 3 つの PCR 増幅断片と *Bam*HI/*Sal*I で消化したベクター pUC18 の合計 4 断片を混合し、In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit を用いて In-Fusion 反応を行った。このようにして得られた、*TEF1* 遺伝子のプロモーターが *aphA* 遺伝子のコード領域の隣に正確に位置するプラスミドを pDisAphA とした。

2-2-7 *A. oryzae* 高生産株からの AphA タンパク質の精製，アミノ酸配列決定および脱グリコシル化

A. oryzae 形質転換株 APA4 を米でんぷん培地（RS 培地）で 5 日間振とう培養した。菌体をろ過して除去した後，培養上清 150 ml に含まれるタンパク質を 80% 飽和の硫酸で沈殿し，10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) に溶解し，同バッファーに対して透析した。粗精製酵素液を，同バッファーで平衡化した HR16/20 Fast Flow Q-Sepharose 陰イオン交換カラム（GE Healthcare, Buckinghamshire, UK）にのせ，0.0 M から 0.3 M NaCl の直線勾配により溶出した。AphA を含む分画を同バッファーに対して透析し，再度 HR16/20 Fast Flow Q-Sepharose 陰イオン交換カラムにのせた。そして吸着したタンパク質を 0.0 M から 0.3 M NaCl の直線勾配により溶出した。

N 末端アミノ酸配列を解析するために，精製酵素を ProSorb（Applied Biosystems）装置を用いて PVDF 膜に転写し，Applied Biosystems Procise 491 シーケンサーを用いて説明書（Applied Biosystems）に従って配列を決定した。精製酵素の脱グリコシル化は endoglycosidase H（Glyko, Novato, CA, USA）を用いてメーカー説明書に従って行った。endoglycosidase H を添加する前にタンパク質の変性を行った。

2-2-8 酵素活性の測定

酸性ホスファターゼ活性は大池ら (Oike *et al.*, 1984) の方法を若干変更して行った。一定量の酵素液を 100 mM 酢酸バッファー (pH 4.0) に溶解した 1 mM *p*-ニトロフェニルリン酸 (PNPP) 溶液中で 40°C, 10 分インキュベートした。酵素反応を 10% トリクロロ酢酸溶液を加えて停止した。2 M 炭酸ナトリウム溶液を加えた後、遊離した *p*-ニトロフェノール (PNP) 量を 405 nm の吸光度により測定した。酵素 1 ユニットは本条件で 1 分間に 1 μ mol の PNP を遊離する酵素量とした。豆麴培養の場合は、酸性ホスファターゼ活性測定の反応条件は 40°C, 10 分に替えて、37°C, 20 分とした。酵素の至適 pH は、様々な pH (3.0 to 7.0) の 100 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.0) 溶液中で酵素を 40°C, 10 分インキュベートして測定した。酵素の至適温度は、100 mM 酢酸ナトリウム溶液中で酵素を様々な温度 (25°C to 65°C) で 10 分インキュベートして測定した。温度安定性と pH 安定性は、様々な温度 (25°C to 65°C) で 30 分インキュベートした後と、様々な pH (3.0 to 7.0) で 30°C, 1 時間インキュベートした後の酵素活性をそれぞれ測定した。基質特異性は以下のように調べた。100 mM 酢酸バッファー (pH 4.0) に溶解した 2 mM の基質溶液中で酵素を 40°C, 30 分インキュベートした。遊離した無機リン酸量を Phosphor C Test Kit (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を用いて測定した。

アルファアミラーゼ活性は公定法 (Nishiya 1993) に従って測定した。中性プロテアーゼ活性は公定法 (Nishiya 1993) を若干変更して測定した。バッファーは McIlvaine buffer (pH 3.0) に替えて McIlvaine buffer (pH 6.0) を使用した。

2-3 実験結果および考察

2-3-1 *aphA* 遺伝子の *in silico* クローニングと遺伝子破壊

A. oryzae は複数の酸性ホスファターゼ (Aph) およびフィターゼを生産する。そのうちいくつかは精製され、N 末端アミノ酸配列が決定されている (Fujita *et al.*, 2003a,

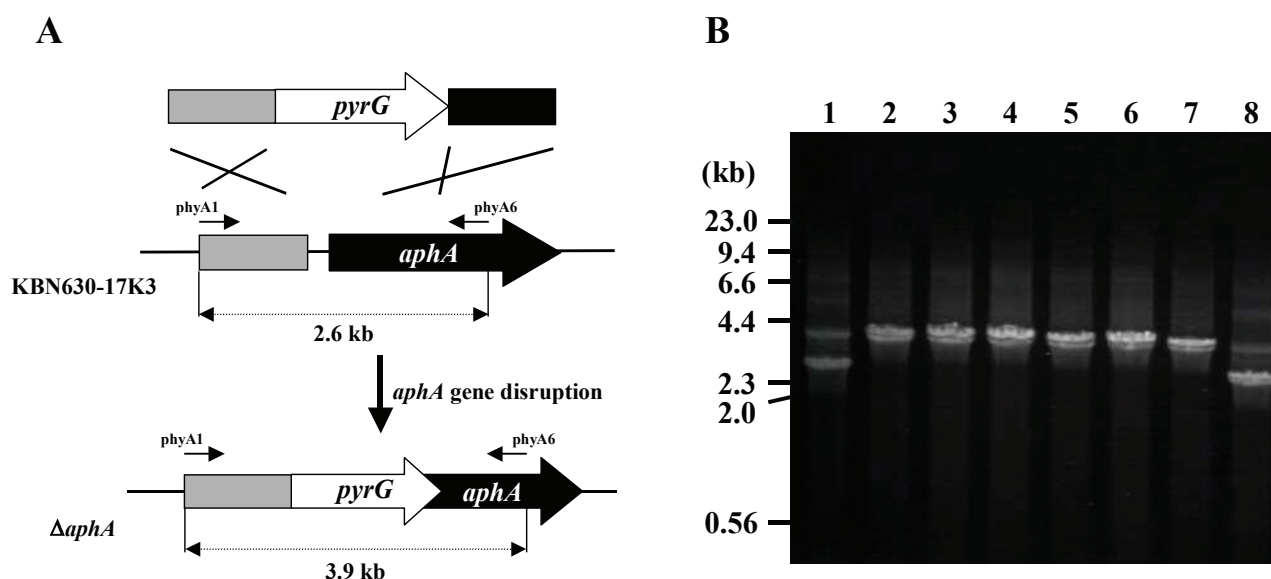


Fig. 2-1. Construction scheme and confirmation of the *aphA* disrupted strain.

A. Scheme of the *aphA* disruption is shown. PCR-amplified DNA fragments from a *aphA* disruption vector, pDisAphA, were transformed into *A. oryzae* KBN630-17K3. Gray and black boxes indicate the 5'-flanking region and a part of the coding region of the *aphA* gene, respectively, and the closed and open arrows indicate the *aphA* gene and *pyrG* gene regions, respectively. The direction of the arrow indicates the orientation of the *aphA* and *pyrG* genes. Small arrows indicate the position of oligonucleotide primers used.

B. Agarose gel electrophoresis of amplified DNA fragments in the *aphA* gene region of the transformants using primer pair phyA1/phyA6.

2003b)。しかし、それらのアミノ酸配列に対応する遺伝子を *A. oryzae* ゲノムデータベース上に見出だすことが出来なかった。そのため、我々は *A. oryzae* ゲノムデータベースから BLAST 検索により推定酸性ホスファターゼ遺伝子を調査した。その結果、5 個の推定酸性ホスファターゼ遺伝子と 8 個の推定フィターゼ遺伝子が見つかった。推定酸性ホスファターゼ遺伝子の発現は、大豆に含まれるフィチン酸由来の豊富なリン

酸によって抑制されると考えられた。その理由は、それらの遺伝子が *Aspergillus niger* (MacRae *et al.*, 1988) や *Penicillium chrysogenum* (Hass *et al.*, 1992) 由来のリン酸抑制性酸性ホスファターゼと相同性があるためである。残りの候補遺伝子の中で、性質がよく解明されている *A. niger phyA* 遺伝子 (van Hartingsveldt *et al.*, 1993) と最も相同性の高い遺伝子 (NITE DOGAN ID: AO090023000692) を選択した。この遺伝子はこれまでに報告されている *A. oryzae* RIB40 のフィターゼ遺伝子 (GenBank/EMBL/DDBJ accession no. AB042805) (Uchida *et al.*, 2006) と同一であり, *aphA* 遺伝子と命名した。そして、我々は AphA が 5'-リボヌクレオチドに対し、加水分解 (脱リン酸化) 活性を示すかどうかを調べた。

aphA 遺伝子破壊株を取得するために、プラスミド pDisAphA をテンプレートとし、プライマーペア phyA1/phyA6 を用いた PCR 増幅により得られた DNA 断片を使用して、セルフクローニングにより *A. oryzae* KBN630-17K3 を形質転換した (Fig. 2-1 A)。形質転換株についてプライマーペア phyA1/phyA6 を用いた PCR を行い、増幅した DNA 断片のサイズにより形質転換株を調べた。調べた 8 株のうち 6 株について、3.9-kb 断片が検出された (Fig. 2-1 B, lane 2 から 7)。一方、残りの 2 株については 3.9-kb 断片に加えて 2.6-kb 断片が検出された (Fig. 2-1 B, lanes 1 および 8)。これらの結果より、前者の 6 株において *aphA* 遺伝子が破壊されたことが示唆された。得られた *aphA* 遺伝子破壊株のうち 3 株を次の試験に使用することにした。

aphA 遺伝子の破壊が豆麴中の酸性ホスファターゼ活性に与える影響を調べるために、*aphA* 遺伝子破壊株の酵素生産性を親株と比較した。3 株の *aphA* 遺伝子破壊株は共に蒸煮大豆ペレットに正常に生育した。したがって、*aphA* 遺伝子の破壊は、蒸煮大豆を栄養源とした場合の生育に影響を与えないことがわかった。Table 2-2 に示すように、*aphA* 遺伝子破壊株の酸性ホスファターゼの生産は親株に比べて約 20% 減少した。反対に、アミラーゼと中性プロテアーゼの生産は親株に比べて約 10% 増加した。これらの結果から、*aphA* 遺伝子の破壊がアミラーゼのような他の酵素生産をいくら

Table 2-2. Effect of *aphA* gene disruption on enzyme production

Strain	α -Amylase (% of control)	Neutral protease (% of control)	Acid phosphatase (% of control)
Δ aphA-1	778 $\pm$ 54.4 (122)	31,883 $\pm$ 1460.2 (110)	324 $\pm$ 30.5 (84)
Δ aphA-2	721 $\pm$ 43.1 (113)	30,061 $\pm$ 1803.8 (104)	304 $\pm$ 32.7 (79)
Δ aphA-3	695 $\pm$ 68.6 (109)	30,547 $\pm$ 601.0 (105)	309 $\pm$ 13.1 (80)
<i>A. oryzae</i> KBN630	636 $\pm$ 14.8 (100)	29,028 $\pm$ 338.0 (100)	387 $\pm$ 22.3 (100)

The enzyme activity is shown as U/g *koji*.

The activity of two independent experiments is presented as the average $\pm$ standard deviation.

か増加させる可能性が示唆された。ゆえに、*aphA* 遺伝子破壊株では他の酸性ホスファターゼの生産を増加した可能性があり、*aphA* 遺伝子破壊の効果は実際より低く見積もられているかもしれない。*aphA* 遺伝子産物の全酸性ホスファターゼ活性における寄与率を調べるためには、他の酸性ホスファターゼ遺伝子群の破壊株を取得して解析する必要がある。

2-3-2 AphA の高発現と精製

aphA 遺伝子産物の酵素学的性質を明らかにするために、*aphA* 遺伝子を *A. oryzae* *TEF1* 遺伝子プロモーターの制御下で高発現させた。*TEF1* 遺伝子プロモーターは *A. oryzae* において最も強いプロモーターの一つである。*A. oryzae* *TEF1* 遺伝子のプロモーター制御下に *aphA* 遺伝子を組込んだ発現ベクター、pTFAphA を 2-2-5 で述べたように構築した。*A. oryzae* KBN630 株由来の *aphA* 遺伝子は (Fig. 2-2), 68 bp のイントロン 1 個を含む 1,469 bp から成り、その塩基配列は *A. oryzae* RIB40 のフィターゼ遺伝子 (GenBank/EMBL/DDBJ accession no. AB042805) と完全に一致した。*aphA*

```

ATGGCGGTCCTTAGCGTGCTCCTTCCCATACCTTCTCTCGAGGtaagctcacccatagatgctgcctatagtggatgcctaataat 90
M A V L S V L L P I T F L L S S 16
ctaacagcggctgatcttcattcagTGTACCAGGCACTCCGGTGACCAGCCCAGACAAACAGTCGTGCAATACCGTTGACGAAGGCTACC 180
V T G T P V T S P R Q Q S C N T V D E G Y Q 38
AGTGCTTCTCCGGGCTCTCTCACTTGTGGGGCCAGTATTTCGCCTTACTTCTCGGTTCGACGACGAGTCTTCCTTGTCCGAAGACGTTCCGG 270
C F S G V S H L W G Q Y S P Y F S V D D E S S L S E D V P D 68
ACCACTGCCAGGTTACCTTTGCCCAAGTGCTCTCCCGTCACGGTGACGGTATCCAACGAAGAGCAAGTCTGAGAAGTACGCCAAGCTCA 360
H C Q V T F A Q V L S R H G A R Y P T K S K S E K Y A K L I 98
TCAAGGCCGTCCAGCATAATGCTACCTCGTTCTCCGGGAAGTATGCGTTCCTGAAATCTTACAACACTACTCCCTCGGCGCCGATGACCTTA 450
K A V Q H N A T S F S G K Y A F L K S Y N Y S L G A D D L T 128
CGCCTTTTGGAGAGAACCAGTTGGTGGATTCCGGGATCAAGTTCTACCAGCGCTATGAGGAGCTCGCCAAGAACGTCGTTCTTTCATTA 540
P F G E N Q L V D S G I K F Y Q R Y E E L A K N V V P F I R 158
GGGCATCGGGTTCGGATCGGGTAATCGCATCCGGCGAGAAATTCATCGAGGGCTTCCAGAAGGCAAAGCTTGGTGACTCTAAGTCTAAGC 630
A S G S D R V I A S G E K F I E G F Q K A K L G D S K S K R 188
GGGGCCAGCCTGCTCTATTGTCAACGTAGTTATTACTGAGACCGAGGGTTTCAACAACACGTTGGACCACAGTCTCTGCACGGCCTTTG 720
G Q P A P I V N V V I T E T E G F N N T L D H S L C T A F E 218
AGAACAGCACAAACAGGGGATGACGCAGAGGACAAGTTACCGCTGTTTTTACGCCCTCGATTGTTGAGCGTCTGGAGAAGGACCTCCAG 810
N S T T G D D A E D K F T A V F T P S I V E R L E K D L P G 248
GAACCACGCTCTCCAGCAAAGAGGTGGTTTATCTGATGGACATGTGCTCATTGACACCATCGCCTTGACCCGTGACGGCAGTCGGCTAT 900
T T L S S K E V V Y L M D M C S F D T I A L T R D G S R L S 278
CCCCTTCTGCGCTTTGTTACCCAGGAAGAATGGGCACAATATGACTACCTGCAGTCAGTCTCTAAGTACTACGGCTACGGTGGAGGAA 990
P F C A L F T Q E E W A Q Y D Y L Q S V S K Y Y G Y G G G N 308
ACCCTCTCGGACCTGCGCAGGGCATCGGCTTCGCTAACGAGCTGATCGCTCGCCTGACCAAGTCTCCGGTTAAGGATCACACCACCACCA 1080
P L G P A Q G I G F A N E L I A R L T K S P V K D H T T T N 338
ATACCACGCTGGACTCAAATCCCGCCACCTTCCCGCTGAATGTACGCTCTATGCGGACTTCTCGCACGATAACACGATGACCTCCGTTT 1170
T T L D S N P A T F P L N A T L Y A D F S H D N T M T S V F 368
TCTTCGCGCTTGGTCTGTATAATACGACCCCTCTCTCAGACTTCGGTGCAGTCCACTGAGGAGACGAACGGATATTATCCGCCC 1260
F A L G L Y N T T E P L S Q T S V Q S T E E T N G Y S S A R 398
GGACCGTTCCATTCCGGGCCAGAGCCTACGTCGAGATGATGCAGTGCACGGATGAGAAGGAGCCTCTCGTCCGCGTACTGGTCAACGACC 1350
T V P F G A R A Y V E M M Q C T D E K E P L V R V L V N D R 428
GGGTCAATCCGCTGCAAGGCTGTGATGCTGATGAGTATGGCCGGTGTAACGGGACGATTTTCGTGCAAGGACTGAGCTTCGTTACATCGG 1440
V I P L Q G C D A D E Y G R C K R D D F V E G L S F V T S G 458
GTGGAAACTGGGAGAGTGCTTTGCTTAA 1470
G N W G E C F A * 466

```

Fig. 2-2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *aphA* gene from *A. oryzae* KBN630.

Numbers on the right refer to nucleotide sequence and amino acid sequence. Intron sequence is in lower-case letters. An asterisk (*) marks the translation stop codon. The N-terminal amino acid sequence analyzed chemically is thick-underlined. Potential N-glycosylation sites are fine-underlined.

Table 2-3. Summary of purification of AphA from *A. oryzae* APA4

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific Activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Culture filtrate	1,414	56.4	25.1	100.0	1.0
Ammonium sulfate precipitation	485	18.4	26.4	34.3	1.1
Q-Sepharose HP (1st)	361	3.9	92.5	25.5	3.7
Q-Sepharose HP (2nd)	303	2.8	108.4	21.4	4.3

遺伝子高発現ベクターpTFAphA を *A. oryzae* PDE1 株に導入し、取得した形質転換株を RS 培地で培養した。培養液中の Aph 活性を測定することにより、AphA 高生産株を選抜した。30 株の形質転換株のホスファターゼ活性は 2.3 ~ 12.1 U/ml (21 ~ 112 mg/l) であり、それに対して対照株、すなわち *pyrG* 遺伝子を導入した *A. oryzae* PDE1 株は全く活性を示さなかった。

最も AphA 活性の高かった APA4 株培養液から、2 回の陰イオン交換クロマトグラフィーによって AphA を単一のタンパク質にまで精製した (Table 2-3)。AphA の精製倍率は 4.3 倍で、回収率は 21.4%であった。精製 AphA のタンパク質量当たりの比活性は 108.4 U/mg であった。AphA は SDS-PAGE 上で 58.0 から 65.0 kDa (Fig. 2-3, lane 2) のブロードなバンドであった。この分子量は、成熟タンパク質のアミノ酸配列に基づいて計算した分子量 47,581 Da よりも約 10.0 ~ 17.0 kDa 大きい値であった。

AphA の分子量の計算値と実際の値との差は、タンパク質のグリコシル化によるものであると考えられる。このことは、AphA の推定アミノ酸配列に Asn-X-Ser / Thr タイプの N 結合型グリコシル化部位 7 か所 (Fig. 2-2 の細い下線のアミノ酸 : Asn-104,

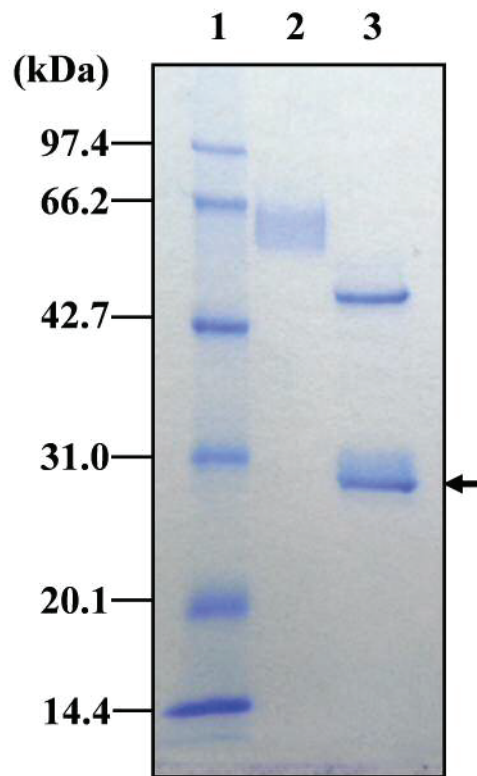


Fig. 2-3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of AphA purified from an *A. oryzae* transformant, APA4.

AphA was purified as described in the Materials and Methods. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. The protein band corresponding to the endoglycosidase H is indicated by the arrow. Lane 1, molecular-mass markers: [rabbit muscle phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.3 kDa), rabbit muscle aldolase (42.4 kDa), bovine carbonic anhydrase (30.0 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa), and egg white lysozyme (14.4 kDa)]; lane 2, purified AphA; lane 3, endoglycosidase H treated AphA.

Asn-119, Asn-206, Asn-219, Asn-338, Asn-351, Asn-375) が存在すること、また、エンドグリコシダーゼ H で精製酵素を処理した AphA は (Fig. 2-3, lane 3), 分子量が 48.0 kDa に小さくなったことにも支持される。精製 AphA の分子量は、これまでに報告された別の *A. oryzae* 菌株で高発現された遺伝子産物 (Uchida *et al.*, 2006) とは異なっていた。その違いはグリコシル化の程度の違いではないかと考えられ、このことは、*A. niger* に *A. fumigatus* のフィターゼを発現させるシステムにおいて、グリコシル化の程度はバッチ毎に異なることが観察されていること (Wyss *et al.*, 1999b) から支持される。

精製 AphA の N 末アミノ酸配列は、Gln-Ser-X-Asn-Thr-Val-Asp-Glu-Gly-Tyr-Gln (X は決定不能) であった (Fig. 2-2, 太い下線のアミノ酸)。この配列は、化学的に決定できなかった Cys-30 を除く Gln-28 から Gln-38 の推定アミノ酸配列において、完全に一致した。SignalP 3.0 プログラムを用いた解析により、AphA の N 末端から 19 のアミノ酸配列はシグナルシーケンスであると予想された。ゆえに、AphA の 20 から 27 番目のアミノ酸配列は、他の糸状菌フィターゼ (Wyss *et al.*, 1999a, Lassen *et al.* 2001) と同様にプロペプチドと推定された。AphA の N 末端アミノ酸配列は、*A. oryzae* RIB128 株の 2 つの Aph および 2 つのフィターゼとは大きく異なっていた。このことから、AphA は *A. oryzae* RIB128 株においては分泌されていないものと考えられた。

2-3-3 AphA の酵素学的性質

精製 AphA についての酵素学的性質を試験した。始めに至適 pH, 至適温度, pH 安定性および温度安定性を試験した (Fig. 2-4, Fig. 2-5)。AphA の至適 pH は 4.0, 至適温度は 40°C であった。AphA は pH 3.0 から pH 7.0 の広い pH 範囲で安定であった。AphA は温度 35°C までは安定で、35°C を超える温度で急速に失活した。

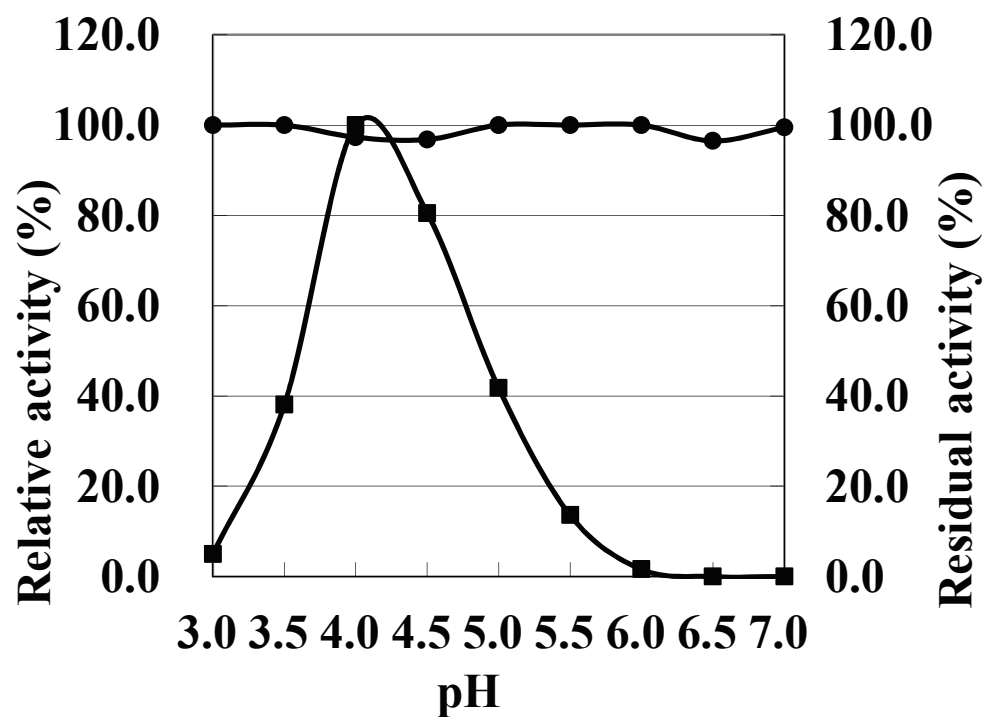


Fig. 2-4. Effects of pH on enzyme activity and stability of AphA.

The effects of pH on enzyme activity were investigated by measurement at 40°C in various pH acetate buffers.

Symbols: ■, activity; ●, stability.

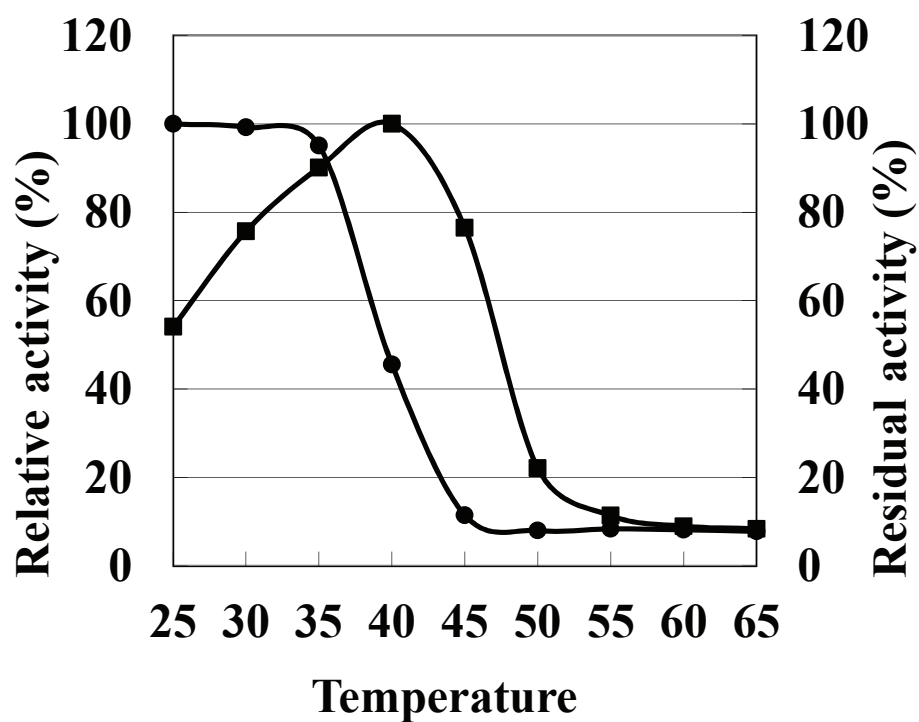


Fig. 2-5. Effects of temperature on enzyme activity and stability of AphA.

The effects of temperature on enzyme activity were investigated by measurement in pH4.0 at various temperatures. For the temperature stability, residual activity was measured at 40°C after incubation in acetate buffer (pH4.0) at various temperatures.

Symbols: ■, activity; ●, stability.

Table 2-4. Comparison of the properties of AphA with those of other acid phosphatases from *A. oryzae*

	AphA	ACP-I ^a	ACP-II ^a	ACP-III ^a	AphK1 ^b
Molecular mass (kDa)	58.0 to 65.0	110	58	56	70
pH optimum	4.0	4.5	5.0	5.5	5.5
pH stability	3.0 to 7.0	4.3 to 5.5	4.8 to 6.5	5.0 to 5.5	2.0 to 7.0
Optimum temperature (°C)	40	60	40	45	60
Thermal stability (°C)	<35	<45	<35	<40	ND ^c

^aThe results of ACP-I, ACP-II and ACP-III were taken from the report by Fujita *et al.* (Fujita *et al.* 2003a).

^bThe results of AphK1 were taken from the report by Shimizu (Shimizu 1993).

^cND, not determined.

次に AphA の基質特異性を試験した (Table 2-5)。基質は次のものを使用した：*p*-ニトロフェニルリン酸 (PNPP)、フィチン酸 (phytate)、 α -グリセロリン酸 (glycerophosphate)、ピロリン酸 (pyrophosphate)、グルコース 6 リン酸 (D-glucose-6-phosphate)、5'-グアニル酸 (5'-GMP) および 5'-イノシン酸 (5'-IMP) である。AphA は PNPP を最も大きい反応速度で加水分解した。しかし、フィチン酸 (phytate)、 α -グリセロリン酸 (glycerophosphate) およびグルコース 6 リン酸 (D-glucose-6-phosphate) に対しても 2 分の 1 程度の活性を示し、AphA が広い基質特異性を有する酵素であることが明らかになった。AphA は 5'-GMP と 5'-IMP に対しても、7-8%の脱リン酸化活性を示した。この結果より、AphA は味噌に添加される 5'-リボヌクレオチドナトリウムの脱リン酸化にある程度関わっている可能性が示唆された。AphA は他の *A. oryzae* 由来酸性ホスファターゼとは異なる基質特異性を持っていた。このように N 末端アミノ酸配列、酵素学的性質および基質特異性を比較すると、

Table 2-5. Comparison of AphA substrate specificity with those of other acid phosphatases from *A. oryzae*

Substrate	Relative activity ^a (%)				
	AphA	ACP-I ^b	ACP-II ^b	ACP-III ^b	AphK1 ^c
Sodium <i>p</i> -nitrophenylphosphate	100	100	100	100	100
Sodium phytate	54.0	14	255	23	3.3
Sodium glycerophosphate	49.2	10	0	81	93.3
Sodium pyrophosphate	33.3	ND ^d	ND	ND	183.3
D-Glucose-6-phosphate	43.4	52	0	45	ND
5'-GMP	8.1	ND	ND	ND	ND
5'-IMP	6.9	ND	ND	ND	ND

^aHydrolysis rate of *p*-nitrophenylphosphate was taken as 100%.

^bThe results of ACP-I, ACP-II and ACP-III were taken from the report by Fujita *et al.* (Fujita *et al.* 2003a).

^cThe results of AphK1 were taken from the report by Shimizu (Shimizu 1993).

^dND, not determined.

AphA は Fujita *et al.* (Fujita *et al.*, 2003a, 2003b) や Shimizu (Shimizu, 1993) が報告した酸性ホスファターゼやフィターゼとは明確に異なっていた。また、これは *A. oryzae* 由来の酸性ホスファターゼが 5'-GMP と 5'-IMP からリン酸を遊離することを直接的に示した初めての報告となった。

2－4 要約

味噌用麹菌 *Aspergillus oryzae* KBN630 株の高頻度相同組換え系を活用して、*A. oryzae* KBN630 株の酸性ホスファターゼ A 遺伝子 (*aphA* 遺伝子) を破壊した。取得

した *aphA* 遺伝子破壊株は豆麴では正常に生育した。しかし、酸性ホスファターゼの活性は *A. oryzae* KBN630 株と比較して約 20%低下していた。麴菌 *TEF1* 遺伝子プロモーターを活用して *aphA* 遺伝子を高発現させたところ、AphA タンパク質を培地中に分泌させることができた。AphA タンパク質の分子量は 58.0 - 65.0 kDa で、至適 pH は 4.0、至適温度は 40°C であった。AphA タンパク質は 5'-GMP 及び 5'-IMP を分解して、無機リン酸を遊離させた。

第3章 味噌用麹菌の主要な酸性ホスファターゼ C 遺伝子 (*aphC*) の特定と AphC の諸性質の解明

3-1 諸言

第2章では, *A. niger phyA* 遺伝子と最も相同性の高い *A. oryzae* KBN630 株由来 *aphA* 遺伝子 (GenBank accession number AB042805 / AP007157) について, 遺伝子破壊と遺伝子高発現による解析を行った。その結果, *aphA* 遺伝子のコードする酸性ホスファターゼ AphA は, 5'-IMP および 5'-GMP の脱リン酸化活性をある程度有することが明らかになった。しかし, 豆麹中の酸性ホスファターゼ活性は, *aphA* 遺伝子破壊によって 20%しか低下しなかった。これらの結果から, 別の *A. oryzae* の酸性ホスファターゼが豆麹中の酸性ホスファターゼ活性に大きく寄与していると考えられた。

そこで第3章では, 5'-IMP 脱リン酸化活性を有する主要な酸性ホスファターゼを明らかにするために, *A. niger phyA* 遺伝子と相同性のある残り 7 個の候補の *aph* 遺伝子破壊株を作出し, 豆麹中の酵素生産性を試験した。その結果, *aphC* 遺伝子こそが, 豆麹中の酸性ホスファターゼ活性および 5'-IMP 脱リン酸化活性の両活性において主要な役割を果たすことが判明した。そこで, *A. oryzae* において最も強力なプロモーターの一つであるタカアミラーゼ遺伝子 (*taaG2* 遺伝子) のプロモーターを用いて *aphC* 遺伝子を高発現させ, AphC タンパク質を精製してその諸性質および基質特異性を明らかにした。

3-2 実験材料および実験方法

3-2-1 使用菌株

味噌用麹菌株 *A. oryzae* KBN630 株を DNA 調製に使用した。第1章で作出した *A. oryzae* KBN630 株由来の *pyrG*, *ku70* 遺伝子二重削除変異株である *A. oryzae* KBN630-17K3 株および, 醤油用麹菌 KBN616 株由来の *alp*, *pyrG* 遺伝子二重破壊変異株である *A. oryzae* PDE1 を形質転換用宿主として使用した。*A. oryzae* PDE1 株は, 組換えタ

ンパク質を効率よく生産させるためにアルカリプロテアーゼ遺伝子 (*alp* 遺伝子) (Murakami *et al.*, 1991) を破壊した株である。本株の作製方法についてはどこか別の機会に発表する予定である。また、第 2 章で作出した *A. oryzae* $\Delta aphA$ 株を *aphA* 遺伝子破壊株として使用した。

E. coli DH5 α を種々の DNA 断片のクローニングに使用した。

3-2-2 培地および培養条件

A. oryzae の液体培養には、米でんぷん培地 (RS 培地) (3% rice starch, 1% polypeptone, 1% NaNO₃, 0.2% KCl, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O) を使用して 30°C, 約 160 rpm の回転式振とう培養を行った。

豆麴培養は、蒸煮大豆ペレットを培養基として 30°C, 43 時間の培養を行った。蒸煮大豆ペレットは、大豆を水に 2 時間浸漬後、35 分蒸煮してできた蒸煮大豆をミンチ機で直径約 10 mm, 長さ 15~20 mm に成形して使用した。

E. coli の培養には、2xYT 培地 (1.6% Bacto tryptone, 1.0% Bacto yeast extract, 0.5% NaCl) を用い、必要に応じて濃度 50 μ g/mL の ampicillin sodium を添加し、固体培養時には 1.5% Agar を添加した。培養は 37°C にて行った。

3-2-3 *A. oryzae* の形質転換

A. oryzae ($\Delta pyrG$) を MPU 培地 (2.0% malt extract, 0.1% Bacto peptone, 2.0% glucose, 0.25% uridine, pH6.5) 中で 30°C, 24 時間培養後、1-2-3 に示した方法と同様に Novozyme234 および Cellulase “ONozuka” R-10 を用いてプロトプラスト化した。得られたプロトプラストに PEG 存在下で DNA 断片の取り込みを行わせて形質転換を行い、再生寒天培地中で 30°C, 約 1 週間培養して形質転換株を取得した。

3-2-4 *A. oryzae* 染色体 DNA の調製, PCR および DNA シーケンス

A. oryzae の染色体 DNA は、GP 培地で 30°C、3 日間培養した *A. oryzae* の菌体を集菌して水分を除去した後、凍結乾燥して粉碎し、フェノール-クロロホルム法で調製した (Sambrook and Russell, 2001; Raeder and Bronda, 1985)。

PCR 用酵素は、TaKaRa Ex Taq DNA ポリメラーゼ (Takara Bio, Otsu, Shiga) および PfuUltra II Fusion HS DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を使用し、それぞれのプロトコルに準じて反応を行った。PCR 装置は GeneAmp9700 サーマルサイクラー (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用した。第 3 章で使用したオリゴヌクレオチドプライマーを Table 3-1 に示した。

主なクローニングステップでは、model 4000LS DNA シーケンサー (LI-COR, Lincoln, NE, USA) および GenomeLab GeXP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いたシーケンシングにより生成物を確認した。

3-2-5 *aph* 遺伝子群の破壊用ベクターの構築

aphB 遺伝子破壊用ベクター、pDisAphB を以下のように構築した。*aphB* 遺伝子の 5'-隣接領域 1.0-kb と 3'-隣接領域 1.0-kb をそれぞれ *A. oryzae* 染色体 DNA とプライマーペア phyB1/phyB2 および phyB3/phyB4 を用いて PCR 増幅した。*pyrG* 遺伝子断片 1.8-kb を *A. oryzae* 染色体 DNA とプライマーペア pyrGN2/ pyrGC2 (Table 1-1) を用いて PCR 増幅した。得られた 3 つの PCR 増幅断片と *Sma*I で消化したベクター pUC18 の合計 4 断片を混合し、In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit (Takara Bio) を用いて In-Fusion 反応を行った。このようにして得られた、*aphB* 遺伝子の 5'-隣接領域と 3'-隣接領域の間に *pyrG* 遺伝子が位置するプラスミドを pDisAphB とした。プラスミド pDisAphB をテンプレートとし、プライマーペア phyB1/phyB4 を用いた PCR により *aphB* 遺伝子破壊用 DNA 断片を増幅し、*A. oryzae* KBN630-17K3 を形質転換した。*aphB* 遺伝子破壊の確認試験には、形質転換体から抽出した染色体 DNA をテンプレートとして用い、プライマーペア phyB1/phyB4 を用いた PCR を行った。Table 1 のプラ

Table 3-1. Oligonucleotide primers used in Chapter 3

Name	Sequence (5' to 3')	Direction
Primers for gene disruption		
The <i>aphB</i> gene		
phyB1	CGGTACCCGGGGATCCCAACCGTACTCCTAGGAGTGG	Forward
phyB2	TTCCAGCAGGCCTTGAAAGCATGGCGCACTATCGCGG	Reverse
phyB3	ATTGATCAGGCCTTTCGACCAGCTAACCAAGACTAGT	Forward
phyB4	ATGCCTGCAGGTCGACATGATCAACGAATTCCTTCAACG	Reverse
The <i>aphC</i> gene		
phyC1	CGGTACCCGGGGATCCTATGCCGGGATACTAACACAAT	Forward
phyC2	TTCCAGCAGGCCTTGCTATTAGTGGGTAATGCATAGTG	Reverse
phyC3	ATTGATCAGGCCTTTGAATGAGTGGGAGTATGTGCTC	Forward
phyC4	ATGCCTGCAGGTCGACAAGTCCAGATCTCGGAAATCAG	Reverse
The <i>aphD</i> gene		
phyD1	CGGTACCCGGGGATCCATCCTTAACAGTAGACTACTTGG	Forward
phyD2	TTCCAGCAGGCCTTGCAGACTAACACTTCTAGACTAAG	Reverse
phyD3	ATTGATCAGGCCTTTAACTTCCGAACCCGCTATGCTAG	Forward
phyD4	ATGCCTGCAGGTCGACAACTTGACTCTCGTTCTTCGGTG	Reverse
The <i>aphE</i> gene		
phyE1	CGGTACCCGGGGATCCCTGTGATCACTTTGAATAACACC	Forward
phyE2	TTCCAGCAGGCCTTGCAACATAACTTACTTGAAGACCAG	Reverse
phyE3	ATTGATCAGGCCTTTGGTCGTGATATTTTGCTTGCCAC	Forward
phyE4	ATGCCTGCAGGTCGACAGGTCCAGATTTTCGGAGATTAG	Reverse

The *aphF* gene

phyF1	CGGTACCCGGGGATCCAGAATACAACATGCTGACTATGG	Forward
phyF2	TTCCAGCAGGCCTTGATGCGATACTAAGCAAAGCAATC	Reverse
phyF3	ATTGATCAGGCCTTTGCTCAAAGGGTCACTTGATCGCC	Forward
phyF4	ATGCCTGCAGGTCGACATACTAGATGGAACCGGAAAGG	Reverse

The *aphG* gene

phyG1	CGGTACCCGGGGATCCTTTAGACAATTCAGTCCCGCTC	Forward
phyG2	TTCCAGCAGGCCTTGAAATGCAGCAGGTACGTTCTC	Reverse
phyG3	ATTGATCAGGCCTTTGGATCAAATACGGCAGGCTG	Forward
phyG4	ATGCCTGCAGGTCGACATAGAGGATCGGATCCAAAGAG	Reverse

The *aphH* gene

phyH1	CGGTACCCGGGGATCCACACAGAACAAACAAAAGATCTG	Forward
phyH2	TTCCAGCAGGCCTTGGTGAAGTTCTCTAGACTCTAGG	Reverse
phyH3	ATTGATCAGGCCTTTCCTTAATGACTGGAGCTATGGGC	Forward
phyH4	ATGCCTGCAGGTCGACCTTCATGAACGTGTCAAGCTCAC	Reverse

Primers for *aphC* expression vector

fupyrGN	CGGTACCCGGGGATCCAAGCCGCTGCTGGAATTGACA	Forward
pyrGC3	TCAGAAGAAAAGGATGATCAATACC	Reverse
pyrGtaa	ATCCTTTTCTTCTGAATTCATGGTGTTTTGATCATTTT	Forward
taaPrev	CATAAATGCCTTCTGTGGGGTTTATTGTT	Reverse
taaaphC	CAGAAGGCATTTATGCAGCAATTATTGCAATCAACGG	Forward
aphCSal	ATGCCTGCAGGTCGACGGGTTGATAGAGCTTGTTCTGGTGATC	Reverse

イマーペアを使用して、その他の 6 個の *aph* 遺伝子破壊ベクター pDisAphC から pDisAphH までを pDisAphB と同様の方法で構築した。6 個の *aph* 遺伝子破壊用 DNA 断片についても *aphB* 遺伝子の場合と同様に増幅し、*A. oryzae* KBN630-17K3 に導入した。遺伝子破壊の確認試験には、形質転換体から抽出した染色体 DNA をテンプレートとして用い、各 *aph* 遺伝子に特異的なプライマーペア (*aphC* 遺伝子については phyC1/phyC4, *aphD* 遺伝子については phyD1/phyD4, *aphE* 遺伝子については phyE1/phyE4, *aphF* 遺伝子については phyF1/phyF4, *aphG* 遺伝子については phyG1/phyG4, *aphH* 遺伝子については phyH1/phyH) を使用して PCR を行った。

3-2-6 *A. oryzae* *taaG2* 遺伝子プロモーターの制御下における *aphC* 遺伝子の発現

aphC 遺伝子を *A. oryzae* *taaG2* 遺伝子プロモーター (Tsukagoshi *et al.*, 1989) の制御下で発現させるために、*aphC* 遺伝子高発現用ベクター、pTAAPhC を以下のように構築した。*pyrG* 遺伝子断片 1.8-kb を *A. oryzae* KBN630 株の染色体 DNA とプライマーペア fupyrGN/pyrGC3 を用いて PCR 増幅した。*A. oryzae* *taaG2* 遺伝子のプロモーター 0.6-kb 断片を *A. oryzae* 染色体 DNA とプライマーペア pyrGtaa/taaPrev を用いて増幅した。*aphC* 遺伝子 2.0-kb 断片を *A. oryzae* 染色体 DNA とプライマーペア taaaphC/aphCSal を用いて増幅した得られた 3 つの PCR 増幅断片と、*Bam*HI/*Sal*I で消化したベクター pUC18 の合計 4 断片を混合し、In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit を用いて In-Fusion 反応を行った。このようにして得られた、*taaG2* 遺伝子のプロモーターが *aphC* 遺伝子のコード領域の隣に正確に位置するプラスミドを pTAAPhC とした。そして、プラスミド pTAAPhC を *A. oryzae* PDE1 株に導入した。

aphC 遺伝子のイントロンを確認するために、High Fidelity RNA PCR Kit (Takara Bio) と後述の AphC 高生産株から得られたトータル RNA を用いて RT-PCR を行った。二本鎖 cDNA 合成は、Adaptor Primer FB と taaaphC のプライマーペアを用いて行った。

増幅断片をシーケンスするために *HincII* で消化した pUC118 にクローニングした。

3-2-7 *A. oryzae* 高生産株からの AphC タンパク質の精製, アミノ酸配列決定および脱グリコシル化

形質転換株の *A. oryzae* APC15 株を RS 培地で 5 日間培養した。菌体をろ過して除去した後、培養上清 50 ml を 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) で透析した。この粗酵素液を、同バッファーで平衡化した HR16/20 Fast Flow Q-Sepharose 陰イオン交換カラムにのせ、0.0 M から 0.25 M NaCl の直線勾配により溶出した。AphC を含む分画を同バッファーに対して透析し、再度 HR16/20 Fast Flow Q-Sepharose 陰イオン交換カラムにのせ、同じ条件で再度溶出した。AphC を含む分画を同バッファーに対して透析した後 40% 飽和となるように硫酸を加えたものを、40% 飽和硫酸を加えた同バッファーで平衡化した HiLoad 26/10 Phenyl Sepharose HP (GE Healthcare) カラムに供した。カラムを平衡化バッファーでウォッシュし、吸着タンパク質を 40% から 0% 飽和硫酸の直線勾配により溶出した。AphC を含む分画を 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) で透析し、SDS-PAGE で単一バンドになることを確認した。N 末端アミノ酸配列を解析するために、精製酵素を ProSorb (Applied Biosystems) 装置を用いて PVDF 膜に転写し、Applied Biosystems Procise 491 シーケンサーを用いて説明書 (Applied Biosystems) に従い配列を決定した。精製酵素の脱グリコシル化は endoglycosidase H (Glyko, Novato, CA, USA) を用いてメーカー説明書に従って行った。endoglycosidase H を添加する前にタンパク質の変性を行った。

3-2-8 酵素活性の測定

酸性ホスファターゼ活性は大池ら (Oike *et al.*, 1984) の方法を若干変更して行った。一定量の酵素液を 100 mM 酢酸バッファー (pH 4.0) に溶解した 1 mM *p*-ニトロフェニルリン酸 (PNPP) 溶液中で 40°C 10 分インキュベートした。酵素反応を 10% トリ

クロロ酢酸溶液を加えて停止した。2 M 炭酸ナトリウム溶液を加えた後、遊離した *p*-ニトロフェノール (PNP) 量を 405 nm の吸光度により測定した。酵素 1 ユニットは本条件で 1 分間に 1 μ mol の PNP を遊離する酵素量とした。豆麴培養の場合は、酸性ホスファターゼ活性測定の反応条件は 40°C, 10 分に替えて、37°C, 20 分とした。酵素の至適 pH は、様々な pH (3.0 to 7.0) の 100 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.0) 溶液中で酵素を 40°C, 10 分インキュベートして測定した。酵素の至適温度は、100 mM 酢酸ナトリウム溶液中で酵素を様々な温度 (25°C to 65°C) で 10 分インキュベートして測定した。温度安定性と pH 安定性は、様々な温度 (25°C to 65°C) で 30 分インキュベートした後と、様々な pH (3.0 to 7.0) で 30°C, 1 時間インキュベートした後の酵素活性をそれぞれ測定した。基質特異性は以下のように調べた。100 mM 酢酸バッファー (pH 4.0) に溶解した 2 mM の基質溶液中で酵素を 40°C, 30 分インキュベートした。遊離した無機リン酸量を Phosphor C Test Kit (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を用いて測定した。

アルファアミラーゼ活性は公定法 (Nishiya, 1993) に従って測定した。中性プロテアーゼ活性は公定法 (Nishiya 1993) を若干変更して測定した。バッファーは McIlvaine buffer (pH 3.0) に替えて McIlvaine buffer (pH 6.0) を使用した。

5'-IMP の脱リン酸活性は以下のように行った ; 1 mL の 20 mM IMP 溶液を 0.2 mL の 200 mM 酢酸バッファー (pH 4.0) と混合し、0.1 mL の透析した培養液を加えて 37°C で 20 分インキュベートした。反応を 0.1 mL の 1 N NaOH 溶液を加えて停止し、0.1 mL の 1 N HCl 溶液を加えて中和した。遊離したリン酸を Pi ColorLock ALS (Innova Biosciences Ltd., Cambridge, UK) を用いて測定した。酵素活性の定義は、本測定条件下で 1 分間に 1 μ mol のリン酸を遊離させる酵素量を 1 ユニットとした。

3-2-9 コンピューターによる配列解析

aph 遺伝子の相同性検索は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) の the

Database of the Genomes Analyzed at NITE (DOGAN, <http://www.bio.nite.go.jp/dogan/top>) の BLAST 検索により行った。

シグナルペプチドの検索は SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) のプログラムを用いて行った。グリコシル化部位の検索は、オンラインの二つのグリコシル化部位予測サーバーを用いて行った。O-付加型グリコシル化部位には NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) を, N-付加型グリコシル化部位には NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) を使用した。

3-3 実験結果および考察

3-3-1 酸性ホスファターゼ遺伝子 (*aph* 遺伝子) 破壊株の作出とその性質
前章に述べたように, 我々は, 性質がよく解明されている *A. niger phyA* 遺伝子 (van Hartingsveldt *et al.*, 1993) と相同性のある推定 *aph* 遺伝子を, BLAST 検索により *A. oryzae* ゲノムデータベースから 8 つ見出した (Table 3-2)。

Table 3-2. Acid phosphatase genes in *A. oryzae* studied during Chapter 3

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

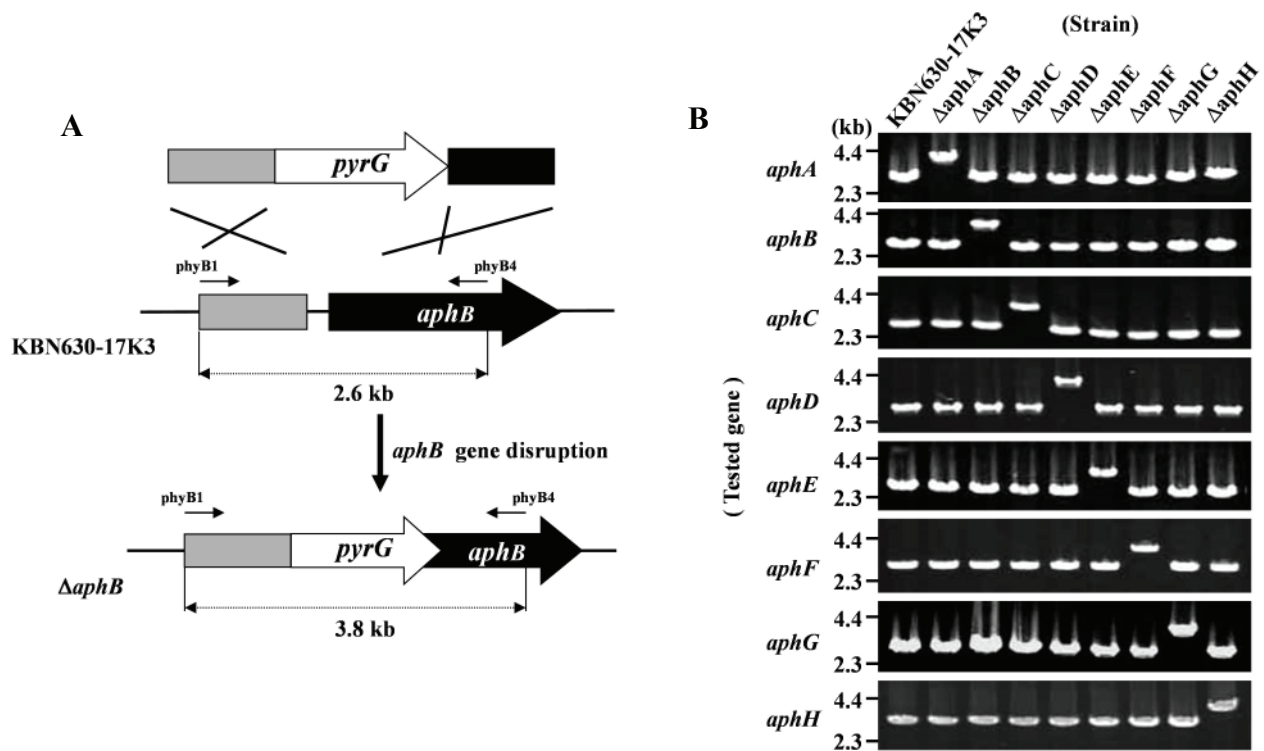


Fig. 3-1. Construction scheme for *aphB* disruption (A) and confirmation of *aphA-H* single disruptants (B).

A. Scheme for *aphB* gene disruption is shown. PCR-amplified DNA fragments from the *aphB* gene disruption vector, pDisAphB, were transformed into *A. oryzae* KBN630-17K3. Gray and black boxes indicate the 5'-flanking region and a part of the coding region of the *aphB* gene, respectively, and closed and open arrows indicate the *aphB* gene and *pyrG* gene regions, respectively. The direction of the arrow indicates the orientation of the *aphB* and *pyrG* genes. Small arrows indicate the positions of the oligonucleotide primers used.

B. Agarose gel electrophoresis of amplified DNA fragments in the *aphA-H* gene regions of the eight *aph* disruption strains using primer pairs phyB1/phyB4 to phyH1/phyH4 listed in Table 3-1, and phyA1/phyA6 from Chapter 2.

aphA 遺伝子破壊株の性質解明の結果から、麴中の主要な酸性ホスファターゼ活性は他の Aph タンパク質（1種類または複数種類）によるものと示唆された。そこで IMP 脱リン酸活性を有する主要な Aph タンパク質（1種類または複数種類）を明らかにするために、*aphA* 遺伝子破壊株に加えて、他の 7 つの *aph* 遺伝子破壊株を作出した。例として *aphB* 遺伝子破壊の構築スキームを Fig. 3-1 A に示した。ランダムに選択した形質転換株 8 株の染色体 DNA を、プライマーペア phyB1/phyB4 を用いた PCR により解析した。その結果、5 株において 3.8-kb のバンドのみが検出され、これらの株では *aphB* 遺伝子破壊が起こっていることが示された（データ省略）。他の *aph* 遺伝子破壊についても *aphB* 遺伝子破壊と同様の手順で行った。各 *aph* 遺伝子破壊の効率は、それぞれ *aphB* 遺伝子が 62.5%, *aphC* 遺伝子が 100%, *aphD* 遺伝子が 87.5%, *aphE* 遺伝子が 100%, *aphF* 遺伝子が 62.5%, *aphG* 遺伝子が 87.5% および *aphH* 遺伝子が 100% であった。Fig. 3-1 B のように、他の *aph* 遺伝子に影響を与えることなく、標的とした *aph* 遺伝子において正しく遺伝子破壊が起こったことが示された。

aphA-H 遺伝子の単独破壊が麴中の酸性ホスファターゼ活性に及ぼす影響を調べるために、遺伝子破壊株の酵素生産を親株の *A. oryzae* KBN630 株と比較した。*aphA-H* 遺伝子の単独破壊株は豆麴中で親株と変わりなく正常に生育した。従って *aphA-H* 遺伝子の単独破壊は、蒸し大豆を栄養源とした場合の生育には影響を与えないことが示された。

Table 3-3 のように、*aphA* 遺伝子破壊株、*aphC* 遺伝子破壊株および *aphE* 遺伝子破壊株は、親株の *A. oryzae* KBN630 株よりも豆麴中の酸性ホスファターゼ活性および 5'-IMP 脱リン酸化活性が低かった。その一方で、他の酵素活性は低下しなかった。これら 3 つの遺伝子破壊株の中で、*aphC* 遺伝子破壊株の酸性ホスファターゼ活性および 5'-IMP 脱リン酸化活性がそれぞれ親株の活性の 3 % および 6 % と著しく低下した。これらの結果から、豆麴中において、AphC が主たる Aph 活性および 5'-IMP 脱リン酸化活性を担うことが示唆された。

Table 3-3. Effects of *aphA-H* gene disruption on enzyme production in soybean-*koji* culture

Strain	Enzyme activity (units/g <i>koji</i> culture) (% of control)							
	Acid phosphatase		5'-IMP dephosphorylation		α -Amylase		Neutral protease	
<i>ΔaphA</i>	394 ± 39.4	(80)	547 ± 57.9	(89)	959 ± 50.0	(130)	20,800 ± 461	(106)
<i>ΔaphB</i>	482 ± 52.3	(98)	692 ± 18.7	(112)	894 ± 7.8	(121)	20,200 ± 385	(102)
<i>ΔaphC</i>	13 ± 0.6	(3)	36 ± 10.3	(6)	899 ± 15.6	(122)	20,800 ± 307	(106)
<i>ΔaphD</i>	478 ± 27.2	(97)	632 ± 16.5	(103)	853 ± 4.2	(116)	20,400 ± 461	(104)
<i>ΔaphE</i>	378 ± 14.1	(76)	481 ± 1.0	(78)	869 ± 2.8	(118)	18,500 ± 461	(94)
<i>ΔaphF</i>	528 ± 4.4	(107)	667 ± 39.2	(108)	881 ± 7.1	(120)	22,000 ± 537	(112)
<i>ΔaphG</i>	496 ± 64.2	(100)	661 ± 75.7	(107)	924 ± 40.3	(125)	21,400 ± 615	(109)
<i>ΔaphH</i>	452 ± 20.7	(91)	590 ± 30.0	(96)	822 ± 24.0	(112)	21,000 ± 93	(107)
KBN630	494 ± 28.3	(100)	615 ± 21.2	(100)	736 ± 42.4	(100)	19,700 ± 707	(100)

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

A. oryzae KBN630 株とは別の菌株であるが、*A. oryzae* KBN 8048 株においては、米麴中および豆麴中の *aph* 遺伝子群の転写レベルの発現解析の結果から、*aph* 遺伝子群は米麴でより発現量の大きい R タイプと、豆麴でより発現量の大きい S タイプに分類できる (Marui *et al.*, 2012)。S タイプに分類される *aphC* 遺伝子の破壊によって、豆麴における Aph 活性および 5'-IMP 脱リン酸化活性は著しく低下した。これに対して、R タイプに分類される *aphA* 遺伝子の破壊によっても両活性は低下した。これらの結果から、*aph* 遺伝子群の転写レベルの発現はホスファターゼ (PHO) の制御機構 (Oshima, 1997)、pH による制御あるいはその他の未知の機構により複雑に制御されていることが示唆された。さらに、*aphA-H* 遺伝子の単独破壊株のアミラーゼ活性は親株に比べて 12 % から 30 % 上昇し、中性プロテアーゼ活性は *aphE* 破壊株を除いて 2% から 9 % 上昇した。これらの結果から、理由は明らかでないが、*aphA-H* 遺伝子の単独破壊はアミラーゼなどの酵素活性にいくらかの上昇効果があることが示唆された。ゆえに、*aphA-H* 遺伝子の単独破壊株をより深く調べることは、*A. oryzae* の *aph* 遺伝子群の制御機構の解明に意義があり、また、麴におけるアミラーゼやプロテアーゼの生産上昇にも役立つと考えられる。

3-3-2 AphC の高発現と精製

aphC 遺伝子産物の酵素学的性質を明らかにするために、*A. oryzae* KBN630 の *aphC* 遺伝子 (GenBank accession number AB775132) を、*A. oryzae* において最も強いプロモーターの一つである *taaG2* 遺伝子プロモーターの制御下で高発現させることを試みた (Fig. 3-2)。

A. oryzae KBN630 の *aphC* 遺伝子は、47 bp の 2 個のイントロンを含む 1,678 bp から成り、527 アミノ酸をコードする ORF を含んでいた (Fig. 3-3)。イントロンは後に cDNA 断片のシーケンスにより確認した。

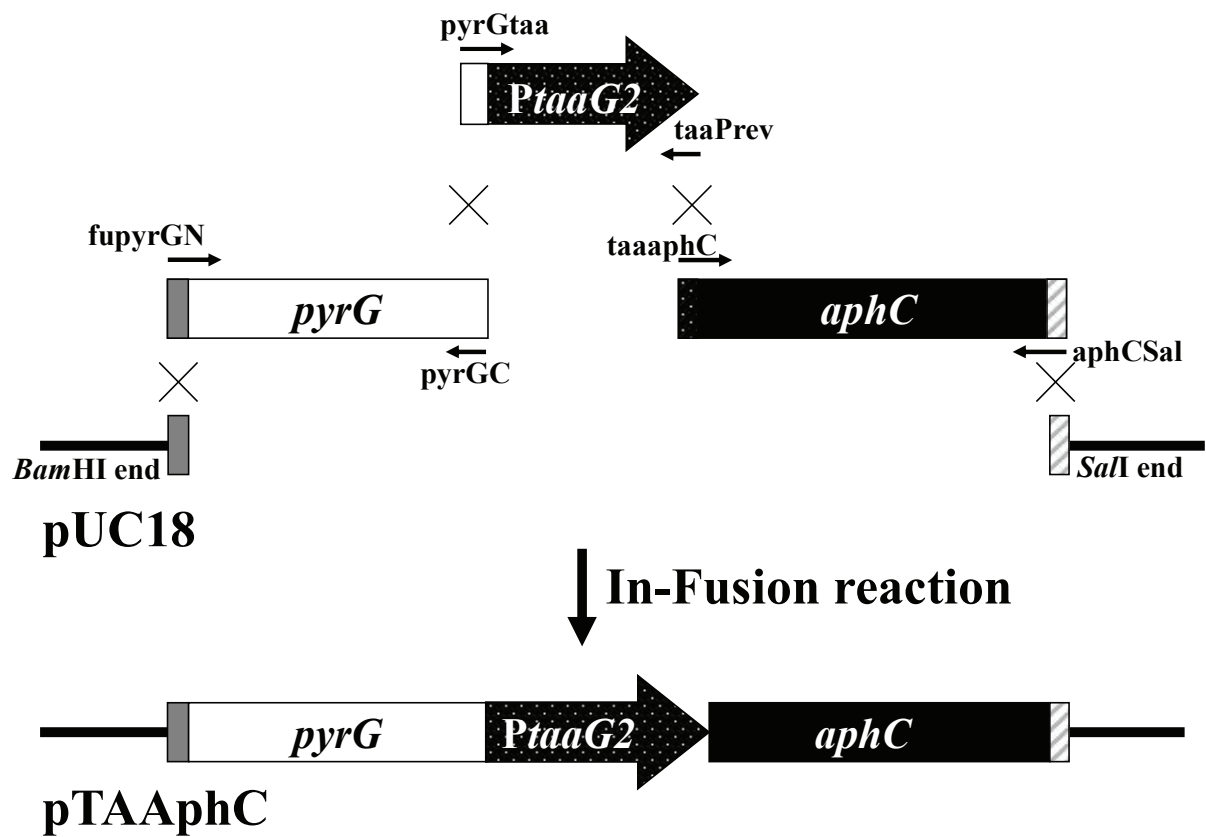


Fig. 3-2. Construction of an *A.oryzae* *aphC* gene expression vector.

Small arrows indicate the oligonucleotide primers used for PCR amplification of each fragment. The three PCR-products and the *Bam*HI/*Sal*I-digested pUC18 were joined in a four-piece In-Fusion reaction using an In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit. The resultant plasmid was designated as pTAaphC, in which the *A. oryzae* *taaG2* gene promoter was positioned precisely next to the *aphC* gene coding region, carrying *pyrG* gene as a selective marker.

```

ATGCAGCAATTATTGCAATCAACGGCAGCCCTGCTCGCCTTTTCAGGCAGTTGTAGGCGATGCAGCTCCACCTCAAGCTCATCAGCCGCG 90
M Q Q L L Q S T A A L L A F Q A V V G D A A P T S S S S A A 30
GCATCTGGTCCGACTGGGGCCAGCTACCCGTCTGGATTTGACATGTCCACCAGCTGGGGCAACCTTAGCCCTTATAAGGACCAGCCTGGG 180
A S G P T G A S Y P S G F D M S T S W G N L S P Y K D Q P G 60
TTCGAGGTGCGAACGGTGTCCCAAGGGGTTGTGAGCTCTCCAGGTCCATGTCTCCACAGACACGCACAGCGCTATCCTACGTCGTGG 270
F E V P N G V P R G C E L S Q V H V L H R H A Q R Y P T S W 90
AAACTAGACGGTGGCGTAATAGAAGATTTTGCCCGAAGCTCAAGATTACACCAAGCGCCATGACAACGCGACAGTCGGTAAAGGAGCT 360
K L D G G V I E D F A Q K L K N Y T K R H D N A T V G K G A 120
TTGTCGTTTTTGAATGAGTGGGAGTATGTGCTCGGAGAGGACCTTCTGCTCGTATCTGGTGTGCGACGGAGGCGACGTCGGGTGCAAT 450
L S F L N E W E Y V L G E D L L L V S G A A T E A T S G A N 150
GTTTGGTCTAAGTATGGACGCGCACTTTATCATGCCCTGTGCGCGTCGCGTCTTACGATTCTTCGTTGAACGCTCTATCCCAATGGGACC 540
V W S K Y G R A L Y H A P V G V A S Y D S S L N V Y P N G T 180
GAGCGACCGAAACCAATCTTCAGGACAACAGATCAGGCCAGAATATTGGAGAGCGCCCGCTGGTGGTTGAgtagcttgcgccaataaccag 630
E R P K P I F R T T D Q A R I L E S A R W W L S 204
tgtaactgggtcgctgctgactgttagG G F F G N T I G A N S S Y S E Y D L V I T H 720
ACGAGGGCACTGGGTTCAACAACACCTGCGCTCCGACGGTTCCTGCCCCGAGACTTAGAAGAAGGgtaagccctgactttgtgtttcg 810
E G T G F N N T L A S D G S C P G D L E E G 247
catactatgtgctgaccgtctcagCGATGATTCGGGAGAAAAGTTTCATCCCAATCTTACTAAGGATGCCCTGAAGAGGCTGTCCCATT 900
D D S G E K F I P N L T K D A L K R L S H F 269
CCTTCCCTCTGATTTCAACCTCACGGCCAACGATGTGGTGGGCGATGTTAGTCTTTGCCCATACGAAACTGCGGCGCTAGGCAGCTCATC 990
L P S D F N L T A N D V V G M F S L C P Y E T A A L G S S S 299
GTTTTGCTCATTATTCACGGAGCAGGAATGGCGCGATTTTCGAGTACTTTCGTTGACCTTCAGTTTTATGGTAACTATGGATTTCGGCGCCCC 1080
F C S L F T E Q E W R D F E Y F V D L Q F Y G N Y G F G A P 329
CACTGGCCGCGCTCAGGGCATGGATATGTTCTCGAGCTGGCAGCCAGATTAGAGGGCAAGCGGATTGAGACCAGCGATACGAGTATCAA 1170
T G R A Q G I G Y V L E L A A R L E G K R I E T S D T S I N 359
CGCTACTGTGCTCAAGCCTGCCACATTCCTCTTAACGAGCCATTGTATATGGACATGTCCCACGATGATGTGATGTCGGGGTCCT 1260
A T V D S K P A T F P L N Q P L Y M D M S H D D V I V G V L 389
GGCCGCTCTGGGTCTCAAGTACTTCAACTATGGATCAAAGGGCTTGCTGACGATGTGGCTCATGTGTCCCCGTAAGTCAAGCTCAA 1350
A A L G L K Y F N Y G S K G L P D D V A H A V P R N F K L N 419
TGAGGTTACACCTTTTCGAGACATCTGATTTCGAGATCTGGACTTGTCTGAAAAGACTAACTTCCACGAAGTGGATGGCGCGTGTA 1440
E V T P L I S E I W Y F E K T T N F H E L D G A L Y 449
CAAGAACCCGGATCTTTCCTCGACATCAGACACACAGATGTTATTTCGGTTTCGTGTTAACGGTTCTCCGGTGTGCGAGGAAGGCCTAGA 1530
K N P D L S S T S D T T D V I R F V L N G S P V S Q E G L D 479
TGGATGCGAGACCTCTATCAATGGCTTCTGTAGTGTGAGGACTTCTGAAAGGTGTTCCCAAGCTGAAGGTAAAGCCGAGTACCAGTA 1620
G C E T S I N G F C S V E D F L K G V P K L K V K A E Y Q Y 509
TGCTTGTTTTGGGAACCTACACGGCCGCTCACCAGGTTGGTGATGGACGCCCTGAGTGA 1678
A C F G N Y T A G H Q V G D G R P E * 527

```

Fig. 3-3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *aphC* gene from *A. oryzae* KBN630 (GenBank/EMBL/DDBJ accession no. AB775132).

Numbers on the right refer to nucleotide sequence and amino acid sequence. Intron sequences are in lower-case letters. An asterisk (*) marks the translation stop codon. The N-terminal amino acid sequence analyzed chemically is thick-underlined. Potential N-glycosylation and O-glycosylation sites are fine-underlined.

A. oryzae KBN630 株の *aphC* 遺伝子は *A. oryzae* RIB40 株の *aphC* 遺伝子 (GenBank accession number AP007157) と合計 25 箇所の塩基に違いがあり、その結果、アミノ酸配列は *A. oryzae* RIB40 株の Asn-279 が *A. oryzae* KBN630 株では Tyr に、同じく Ala-344 が Ser にと、計 2 か所異なっていた。

aphC 遺伝子高発現ベクター pTAAphC を *A. oryzae* PDE1 株に導入し、取得した形質転換株 7 株を RS 培地で培養し、培養液中の酸性ホスファターゼ活性を測定して AphC 高生産株を選抜した (Table 3-4)。7 株の個々の形質転換株の酸性ホスファターゼ活性のレベルは 203 ~ 490 U/ml (0.14 ~ 0.34 mg/l) であり、それに対して対照株 (*pyrG* 遺伝子を導入した *A. oryzae* PDE1 株) では全く活性が検出されなかった。Fig. 3-4 に、最も Aph 活性の高かった APC15 株の培養液 (lane 3) と対照株 (*pyrG* 遺伝子を導入した *A. oryzae* PDE1 株) の培養液 (lane 2) の SDS-PAGE の結果を示した。

Table 3-4. Acid phosphatase productivities of the seven *A. oryzae* strains carrying the *aphC* expression plasmid, pTAAphC

Strain	Phosphatase activity (U/ml)
APC4	203
APC15	490
APC16	250
APC19	278
APC25	282
APC27	178
APC35	215
Control*	0.2

**A. oryzae* PDE1 carrying *pyrG* gene

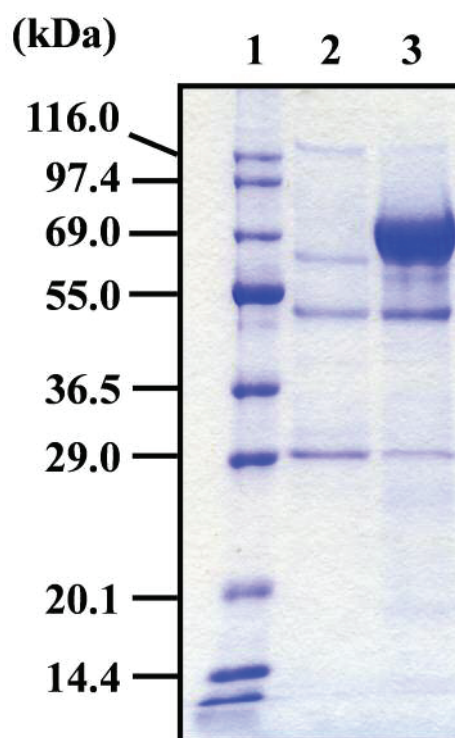


Fig. 3-4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the culture supernatant of the highest AphC producing strain, *A. oryzae* APC15.

Each 10 μ l of the culture supernatant of the strains, Control (*A. oryzae* PDE1 carrying *pyrG* gene) and APC15, was applied to the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. Lane 1, molecular-mass markers [*E. coli* β -galactosidase (116.0 kDa), rabbit muscle phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (69.0 kDa), glutamate dehydrogenase (55.0 kDa), porcine muscle lactate dehydrogenase (36.5 kDa), bovine liver carbonate anhydrase (29.0 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa), and egg white lysozyme (14.4 kDa)]; lane 2, Control; lane 3, APC15.

Table 3-5. Summary of purification of AphC from *A. oryzae* APC15

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific Activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Culture filtrate	20,396	29.9	682	100.0	1.0
Q-Sepharose HP (1st)	13,238	9.4	1,408	63.8	2.1
Q-Sepharose HP (2nd)	10,734	7.8	1,376	52.6	2.0
Phenyl-Sepharose HP	9,919	6.8	1,459	49.4	2.1

Table 3-5 に示したように, APC15 株の培養液から 2 回の陰イオン交換クロマトグラフィーと 1 回の疎水クロマトグラフィーによって AphC を精製した。AphC の精製倍率は 2.1 倍で回収率は 49.4%であった。pNPP を基質とした時の精製 AphC のタンパク質質量当たりの比活性は 1,459 U/mg であり, AphA に比べて約 13 倍の高さであった。AphC は SDS-PAGE 上で 69.0 kDa (Fig. 3-5, lane 2) の単一バンドに精製された。

精製 AphC の N 末アミノ酸配列を解析した結果, Ala-Pro-X-X-X-X-X-Ala-Ala-Ala (X は化学的に決定不能)であった。この配列は, *aphC* 遺伝子の推定アミノ酸配列の Ala-22 ~ Ala-31 (Fig. 3-3, 太い下線部) とよく一致した (ただし, 決定不能の Thr-24 ~ Ser-28 の 5 残基は除く)。Thr-24 は NetOGlyc 3.1 プログラムで予測された O 型グリコシル化部位の一つであることから, グリコシル化によって Thr-24 ~ Ser-28 の配列決定が不能となったかも知れない。SignalP 4.0 を用いた解析により, AphC の初めから 21 アミノ酸がシグナル配列と予測され, この位置は決定した N 末端アミノ配列の結果と一致した。したがって, AphC 成熟タンパクは 506 アミノ酸から成り, 分子量は 55,105 Da と推定された。AphC の推定分子量は SDS-PAGE 上の精製 AphC の分子量 (Fig. 3-5, lane 2) よりも約 14.0 kDa 小さいが, 推定値と実測値のこの差はタンパク質のグリコ

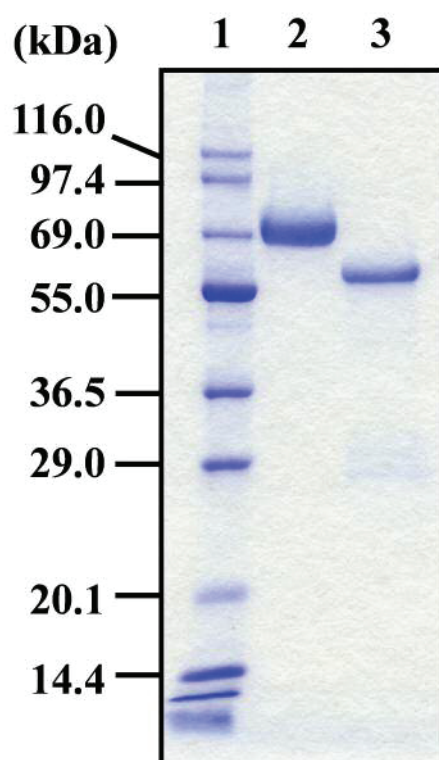


Fig. 3-5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of AphC purified from *A. oryzae* transformant APC15.

AphC was purified as described in the Materials and Methods. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. Lane 1, molecular-mass markers [*E. coli* β -galactosidase (116.0 kDa), rabbit muscle phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (69.0 kDa), glutamate dehydrogenase (55.0 kDa), porcine muscle lactate dehydrogenase (36.5 kDa), bovine liver carbonate anhydrase (29.0 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa), and egg white lysozyme (14.4 kDa)]; lane 2, purified AphC; lane 3, endoglycosidase H treated AphC.

シル化によるものであると考えられた。AphC のアミノ酸配列中の N 型および O 型グリコシル化部位を、それぞれ NetNGlyc 1.0 プログラムおよび NetOGlyc 3.1 プログラムを用いて予測したところ、6 か所の N 型グリコシル化部位 (Asn-106, Asn-113, Asn-178, Asn-213, Asn-257, Asn-275) と 3 か所の O 型グリコシル化部位 (Thr-24, Ser-32, Thr-35) の存在が予測された (Fig. 3-3 の細い下線アミノ酸)。マンノースリッチな N 型糖鎖を切断するエンドグリコシダーゼ H で精製 AphC を処理したところ (Fig. 3-5, lane 3), 実測上の分子量が 58.0 kDa に小さくなった。この値は推定値の 55.1 kDa より大きく、残りの推定値との差 2.9 kDa は O 型グリコシル化によるものであると推測された。

3-3-3 AphC の酵素学的性質

精製 AphC を用いて酵素学的性質を試験した。始めに至適 pH, 至適温度, pH 安定性および温度安定性を試験した (Fig. 3-6, Fig. 3-7, Table 3-6)。AphC の至適 pH は 4.5, 至適温度は 50°C であった。AphC は pH3.5 から pH 6.5 の酸性域の広い範囲で安定であった。AphC の温度安定性については、30°C 未満では緩やかに活性が失われ、30°C を超える温度では急速に失活し、50°C を超えると完全に失活した。この結果から AphC は熱により失活しやすいことが示された。

次に AphC の基質特異性を試験した (Table 3-7)。基質は第 2 章の AphA の試験と同様、次のものを使用した。p-ニトロフェニルリン酸 (PNPP), フィチン酸 (phytate), α -グリセロリン酸 (glycerophosphate), ピロリン酸 (pyrophosphate), グルコース 6 リン酸 (D-glucose-6-phosphate), 5'-グアニル酸 (5'-GMP) および 5'-イノシン酸 (5'-IMP) である。AphC は広い基質特異性を示したが、フィチン酸に対しては非常に低い活性しか示さなかった。一方、5'-GMP (19.2%) と 5'-IMP (37.3%) に対しては、かなり高い活性を示した。Table 3-6 および Table 3-7 に示すように、AphC の酵素学的性質や基質特異性は、既知の *A. oryzae* 由来酸性ホスファターゼである AphA, ACP-I, ACP-II,

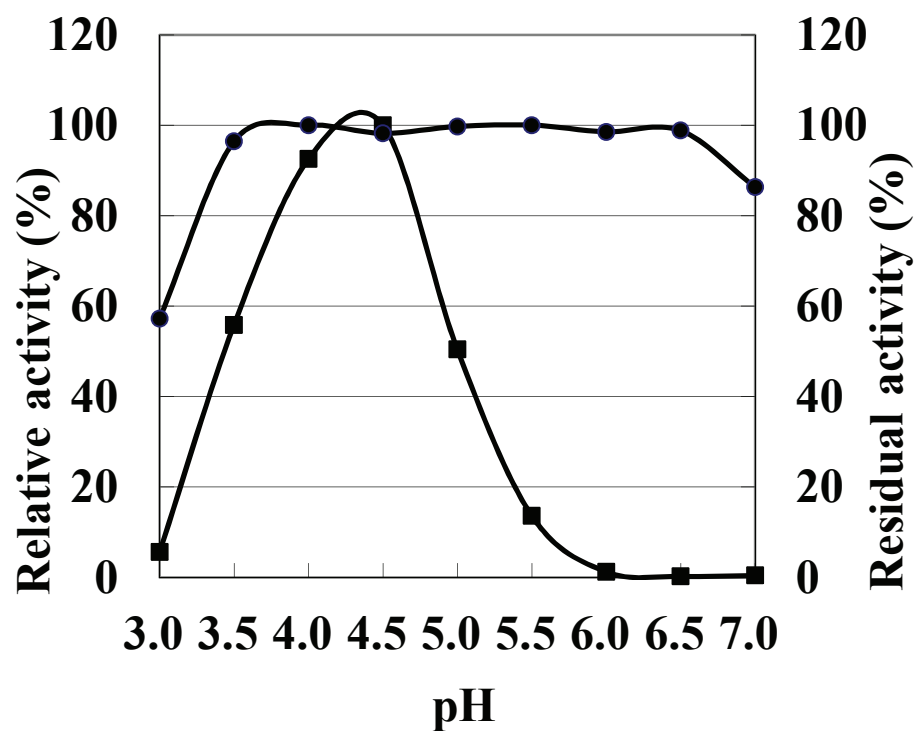


Fig. 3-6. Effects of pH on enzyme activity and stability of AphC.

The effects of pH on enzyme activity were investigated by measurement at 40°C in various pH acetate buffers.

Symbols: ■, activity; ●, stability.

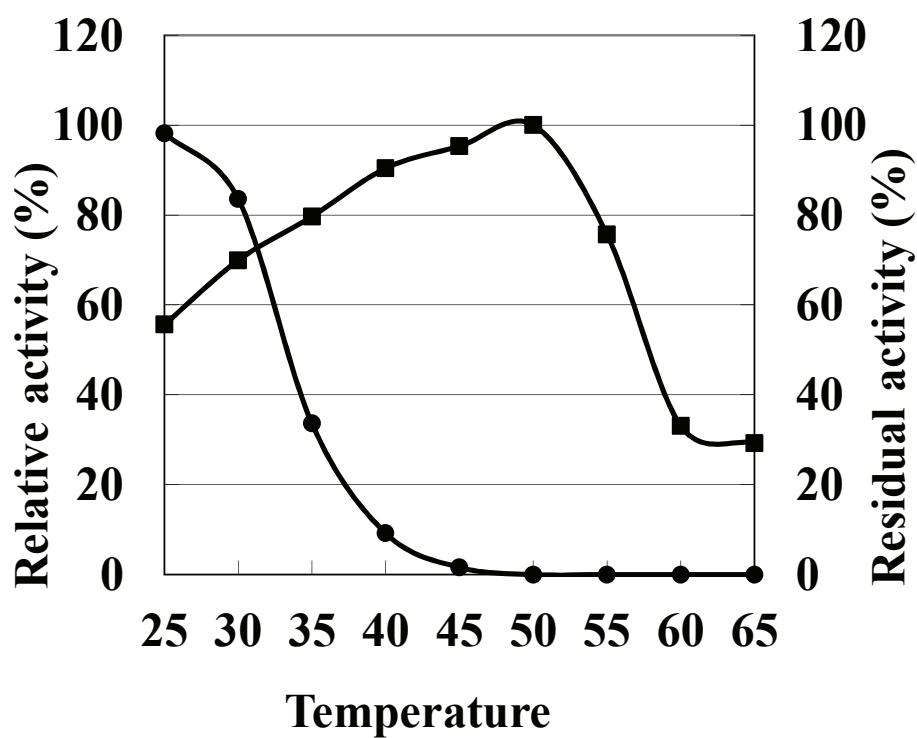


Fig. 3-7. Effects of temperature on enzyme activity and stability of AphC.

The effects of temperature on enzyme activity were investigated by measurement in pH4.0 at various temperatures. For the temperature stability, residual activity was measured at 40°C after incubation in acetate buffer (pH4.0) at various temperatures.

Symbols: ■, activity; ●, stability.

Table 3-6. Comparison of the properties of AphC with those of other acid phosphatases from *A. oryzae*

	AphC	AphA ^a	ACP-I ^b	ACP-II ^b	ACP-III ^b	AphK1 ^c
Molecular mass (kDa)	69.0	58.0 to 65.0	110	58	56	70
pH optimum	4.5	4.0	4.5	5.0	5.5	5.5
pH stability	3.5 to 6.5	3.0 to 7.0	4.3 to 5.5	4.8 to 6.5	5.0 to 5.5	2.0 to 7.0
Optimum temperature (°C)	50	40	60	40	45	60
Thermal stability (°C)	<25	<35	<45	<35	<40	ND ^d

^aThe results of AphA were taken from Chapter 2.

^bThe results of ACP-I, ACP-II and ACP-III were taken from the report by Fujita *et al.* (Fujita *et al.* 2003a).

^cThe results of AphK1 were taken from the report by Shimizu (Shimizu 1993).

^dND, not determined.

Table 3-7. Comparison of AphC substrate specificity with those of other acid phosphatases from *A. oryzae*

Substrate	Relative activity ^a (%)					
	AphC	AphA ^b	ACP-I ^c	ACP-II ^c	ACP-III ^c	AphK1 ^d
Sodium <i>p</i> -nitrophenylphosphate	100	100	100	100	100	100
Sodium phytate	0.04	54.0	14	255	23	3.3
Sodium glycerophosphate	12.1	49.2	10	0	81	93.3
Sodium pyrophosphate	16.2	33.3	ND ^e	ND	ND	183.3
D-Glucose-6-phosphate	6.5	43.4	52	0	45	ND
5'-GMP	19.2	8.1	ND	ND	ND	ND
5'-IMP	37.3	6.9	ND	ND	ND	ND

^aHydrolysis rate of *p*-nitrophenylphosphate was taken as 100%.

^bThe results of AphA were taken from Chapter 2.

^cThe results of ACP-I, ACP-II and ACP-III were taken from the report by Fujita *et al.* (Fujita *et al.* 2003a).

^dThe results of AphK1 were taken from the report by Shimizu (Shimizu 1993).

^eND, not determined.

ACP-III および AphKI とは明確に異なっていた。AphC と AphA の PNP に対する比活性（それぞれ 1,459 U/mg および 108 U/mg）に基づいて計算すると、AphC は、5'-GMP と 5'-IMP に対して、AphA のそれぞれ約 30 倍および 70 倍もの高い比活性を有していた。この結果より、AphC は *A. oryzae* の豆麴培養における 5'-ヌクレオチド脱リン酸化活性に深く関与していることが示唆された。この特徴的な基質特異性は、*aphC* 遺伝子破壊株の豆麴培養において 5'-ヌクレオチドの脱リン酸化活性が著しく低下したこ

と関係があると考えられた (Table 3-3)。実用レベルの観点からは, *A. oryzae* KBN630 株および豆麴用に用いられる様々な麴菌実用株において *aphC* 遺伝子が実際どの程度発現しているかを試験することは非常に興味深い。我々は, *aphC* 遺伝子破壊株を利用することにより, だし入り味噌製品に添加される 5'-IMP や 5'-GMP のような 5'-リボヌクレオチドの分解を防止できるのではないかと期待している。今後, 実験室レベルの豆味噌醸造を行うことによって, *aphC* 遺伝子破壊株を利用する効果を検証する必要がある。また, 味噌醸造に関わる乳酸菌や酵母が与える影響についても考慮する必要がある。さらに, 豆麴中の酸性ホスファターゼ活性をより低下させるために, 我々は *A. oryzae* KBN630 株の *aphA*, *aphC* および *aphE* 遺伝子三重破壊株の作出を試みる予定である。

3-4 要約

味噌用麴菌 *A. oryzae* KBN630 株において 7 個の酸性ホスファターゼ遺伝子(*aphB-H*)の単遺伝子破壊を行い, 豆麴培養中の酸性ホスファターゼ生産への影響を調べた結果, *aphC* 遺伝子が酸性ホスファターゼ生産において主要な役割を担っていることが明らかになった。*aphB-H* の各遺伝子の破壊は, *A. oryzae* KBN630 株の豆麴培養中の生育に影響を与えなかった。*aphC* 遺伝子破壊株の酸性ホスファターゼ活性および 5'-IMP 脱リン酸化活性は, 共に親株に比べて 95%も減少した。*A. oryzae taaG2* 遺伝子のプロモーターを活用して, *A. oryzae* において *aphC* 遺伝子を高発現させることにより, AphC タンパク質を分泌生産することができた。AphC の分子量は 69.0 kDa であり, 至適 pH は 4.5, 至適温度は 50°Cであった。AphC は旨味増強物質である 5'-IMP および 5'-GMP に対して高い脱リン酸化活性を示したことから, AphC は豆味噌製品に添加される 5'-リボヌクレオチド二ナトリウムの分解に関与しているのではないかと考えられた。

総括および結論

本論文は、味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株において高頻度相同組換え系を確立し、これを用いることにより、5'-リボヌクレオチドの分解性という観点から本菌の酸性ホスファターゼ遺伝子およびその遺伝子産物を解析してまとめたものである。

5'-リボヌクレオチドナトリウムを添加した「だし入り味噌加工品」の製造においては、元味噌を通常 85°C、15 分相当の加熱処理を行い、元味噌中に含まれるだし成分分解酵素、ホスファターゼを不活化する必要がある。そこで本研究では、ホスファターゼ活性の低い元味噌の製造を実現するために、味噌麹においてホスファターゼ活性の極めて低い *A. oryzae* 実用株を育種することを目標とし、主要なホスファターゼを特定することを試みた。

第 1 章では、味噌用麹菌 *Aspergillus oryzae* KBN630 株において *pyrG* 遺伝子を選択マーカーとする形質転換系を開発した。相同組換えによる外来遺伝子の染色体上への組込み頻度を向上させるために、*A. oryzae* KBN630 株に由来する *pyrG* 遺伝子削除株のゲノム上から DNA 二本鎖切断修復機構の 1 つ、非相同末端結合修復系に関わる Ku70 タンパク質をコードする *ku70* 遺伝子を除去した。取得した *pyrG*, *ku70* 遺伝子 2 重削除株において *amyR* 遺伝子の破壊を試みたところ、90%以上の頻度で *amyR* 遺伝子を破壊することができた。この結果より、味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株において高頻度相同組換え系を確立することができた。

第 2 章では、確立した高頻度相同組換え系を活用して、味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株の酸性ホスファターゼ A 遺伝子 (*aphA* 遺伝子) を破壊した。取得した *aphA* 遺伝子破壊株は豆麹では正常に生育した。しかし、酸性ホスファターゼの生産性は *A. oryzae* KBN630 株と比較して約 20% 低下していた。麹菌 *TEF1* 遺伝子プロモーターを活用して *aphA* 遺伝子を高発現させたところ、AphA タンパク質を培地中に分泌させることができた。AphA タンパク質の分子量は 58.0 - 65.0 kDa で、至適 pH は 4.0、至適温度は 40°C であった。基質特異性試験の結果、AphA タンパク質は 5'-GMP 及び 5'-IMP

を分解して、無機リン酸を遊離させることが明らかになった。しかし、5'-GMP 及び 5'-IMP に対する比活性はそれほど高くないことから、別の酸性ホスファターゼが主要な役割を担っていると推測された。

第3章では、味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株において7個の酸性ホスファターゼ遺伝子 (*aphB-H*) の単遺伝子破壊を行い、豆麹培養中の酸性ホスファターゼ生産への影響を調べた結果、*aphC* 遺伝子が酸性ホスファターゼ生産において主要な役割を担っていることが明らかになった。*aphB-H* の各遺伝子の破壊は、*A. oryzae* KBN630 株の豆麹培養中の生育に影響を与えなかった。*aphC* 遺伝子破壊株の酸性ホスファターゼ活性および5'-IMP 脱リン酸化活性は、共に親株に比べて95%も減少した。*A. oryzae* *taaG2* 遺伝子のプロモーターを活用して、AphC タンパク質を分泌生産することができた。AphC の分子量は69.0 kDa であり、至適 pH は4.5、至適温度は50°C であった。AphC は旨味増強物質である5'-IMP および5'-GMP に対して高い脱リン酸化活性を示した。このAphC の基質特異性の結果は、*aphC* 遺伝子破壊株の豆麹で5'-IMP 脱リン酸化活性が著しく低下した結果と一致した。以上のことから、AphC は *A. oryzae* KBN630 株の豆麹培養における5'-リボヌクレオチドの脱リン酸化活性に大きく関与していることが明らかになった。我々は、*aphC* 遺伝子破壊株を利用することで、味噌製品に添加される5'-リボヌクレオチドの分解をある程度防止できるのではないかと考えている。その効果は今後、*aphC* 遺伝子破壊株の豆麹を用いて実験室レベルの味噌醸造試験を行い、明らかにする必要がある。また、味噌醸造に関わる耐塩性乳酸菌や耐塩性酵母が5'-リボヌクレオチドの分解に与える影響についても今後明らかにする必要がある。

ここ十年ほどで *Aspergillus* 属をはじめ *Neurospora* 属、*Fusarium* 属といった人類にとって重要な糸状菌のゲノム解析が行われたが、大半の遺伝子が機能未知である（後藤・岩下, 2011）。それは、これまでに機能が解明されている酵母、マウス、人の遺伝子とのホモロジーを基にアノテーション（構造・機能の情報付け）が行われているか

らである。機能未知遺伝子が半数以上であるということは、糸状菌固有の特性に関わる遺伝子はほとんど未解明であるといえる。研究用の糸状菌としては古くから *Neurospora crassa* や *A. nidulans* が用いられてきた。最近はこれらの糸状菌はもちろん、麹菌においても高発現未知遺伝子の破壊株ライブラリー（後藤・岩下，2011）や、転写因子に関する遺伝子破壊株ライブラリーが作製され（Ogawa *et al.*, 2010; Ogawa *et al.*, 2012），機能未知遺伝子の解明へ向けてチャレンジが行われている。今後様々な遺伝子破壊株の解析によって、糸状菌に特徴的な先端成長性やタンパク質高分泌能などのメカニズムが明らかになり、将来の人々の生活に寄与することが期待される。

現在の社会では、食品製造用微生物を遺伝子操作によって改良することに未だ抵抗感があるため、醸造メーカーはたとえ安全なセルフクロニングによる微生物であっても利用出来ていない。その原因を考察すると、1つ目には人々が遺伝子自体に身近なものという認識が小さく、怖さを感じていることが考えられる。今後、医療の分野では遺伝子検査や治療が当たり前に行われるようになり、私たち一人一人の全ゲノム解析も行われて心理的ハードルが下がるかもしれない。2つ目には、組換え微生物の安全性がはっきり示されないことにあると考えられる。近い将来、微生物の全ゲノム解析は当たり前になり、トランスクリプトーム解析・メタボローム解析によっても多くの情報が得られるであろう。そうなれば、遺伝子ターゲッティング技術によって特定部分のみを改変し安全性試験をした微生物は真に安全である、という事実を人々が受け入れるようになるかもしれない。3つ目に、遺伝子組換え微生物を使用した食品を購入することにメリットを感じられないことも原因であると考えられる。健康・美容機能、頭が良くなる機能などを新たに発見してそれを増強し、有意差を示すことが出来れば、消費者は納得して購入するのではないかと考えられる。

今後は、麹菌の高頻度相同組換え技術やゲノム情報・トランスクリプトーム情報・メタボローム情報を活用して日本古来の伝統的発酵食品の可能性をより広げる研究を進展させ、将来の人々の生活に寄与したいと考えている。

謝辞

本論文を作成するにあたり、懇切なご指導とご高配を賜りました岐阜大学大学院連合農学研究科 鈴木徹教授に心からの感謝の意を表します。また、有益なご助言を賜りました岐阜大学応用生物科学部 中川智行教授，静岡大学農学部 小川直人教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり終始温かいご指導とご助言を賜りました名城大学農学部 加藤雅士教授に厚くお礼申し上げます。また、有益なご助言を賜りました名古屋大学農学部 小林哲夫教授，三重大学地域イノベーション学研究科 荻田修一教授，そして学生時代からご指導を賜りました名古屋大学名誉教授 塚越規弘教授に厚く御礼を申し上げます。

共同研究の統括機関として本研究の推進に多大なご指導とご助力を頂きました農研機構食品総合研究所 楠本憲一博士，鈴木聡博士，丸井淳一郎博士（現・国際農林水産業研究センター）はじめ同所の皆様に心より感謝申し上げます。共同研究機関として本研究の遂行に多大なご助力を頂きました株式会社ビオック 和久豊博士，白石洋平氏，伊賀佳美氏，ナカモ株式会社 杉本達哉氏，図師鏡子氏に厚く御礼申し上げます。

味噌醤油工業における麹菌分子育種の先駆者として，また共同研究者として長年にわたり研究を指導し推進していただいた，あいち産業科学技術総合センター 北本則行博士に深く感謝申し上げます。本研究の実験にご協力頂いた中村恵美さん，安藤あすかさんに心より感謝いたします。

本研究を共同で推進していただいたあいち産業科学技術総合センター 長谷川摂主任研究員，小野奈津子技師，森昭博技師，石原那美技師，また多くのご支援を頂きました同センターの先輩・同僚の皆様，OBの皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に，研究を進めるにあたりお世話になった多くの方々，励ましてくれた友人，支えてくれた家族に感謝します。

引用文献

- [1] Critchlow SE, Jackson SP. (1998). DNA end-joining: from yeasts to man. *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 394-398.
- [2] Denison, S.H. (2000). pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genet. Biol.*, **29**, 61-71.
- [3] Fujishima, T., Yoshino, H. and Chiba, H. (1964). Studies on phosphatase in shoyu. *Chomikagaku*, **13**, 1-5 (in Japanese).
- [4] Fujita, J., Yamane, Y., Fukuda, H., Kizaki, Y., Wakabayashi, S., Shigeta, S., Suzuki, O. and Ono, K. (2003a). Production and properties of phytase and acid phosphatase from a sake koji mold, *Aspergillus oryzae*. *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 348-353.
- [5] Fujita, J., S., Shigeta, Yamane, Y., Fukuda, H., Kizaki, Y., Wakabayashi, S. and Ono, K. (2003b). Production of two types of phytase from *Aspergillus oryzae* during industrial koji making. *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 460-465.
- [6] Gomi, K., Iimura, Y. and Hara, S. (1987). Integrative transformation of *Aspergillus oryzae* with a plasmid containing the *Aspergillus nidulans argB* gene. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2549-2555.
- [7] Hass, H., Redl, B., Friedlin, E. and Ströffler, G. (1992). Isolation and analysis of the *Penicillium chrysogenum phoA* gene encoding a secreted phosphate-repressible acid phosphatase. *Gene*, **113**, 129-133.
- [8] 後藤正利, 岩下和弘 (2011). 麹菌ポストゲノム研究の展開: 糸状菌に特異な機能未知遺伝子を探る. 生物学 **89**, 310-312.
- [9] Jin, F. J., Maruyama, J., Juvvadi, P. R., Arioka, M. and Kitamoto, K. (2004). Adenine auxotrophic mutants of *Aspergillus oryzae*: development of a novel transformation system with triple auxotrophic hosts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 656-662.
- [10] 加藤百一 (1987). 麹の歴史. 村上英也編著 麹学, 第4版 pp. 1-31. 財団法人日本醸

造協会, 東京.

- [11] Kanaar, R. and Hoeijmakers, JH. (1998). Genetic recombination: From competition to collaboration. *Nature* **391**, 335-338.
- [12] Kitamoto, N., Kimura, T., Kito, Y., Ohmiya, K. and Tsukagoshi, N. (1993). Structural features of a polygalacturonase gene cloned from *Aspergillus oryzae* KBN616. *FEMS Microbiol. Lett.*, **111**, 37-42.
- [13] Kitamoto, N., Kimura, T., Kito, Y., Ohmiya, K. and Tsukagoshi, N. (1995). The nitrate reductase gene from a *shoyu koji* mold, *Aspergillus oryzae* KBN616. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1795-1797.
- [14] Kitamoto, N., Matsui, J., Kawai, Y., Kato, A., Yoshino, S., Ohmiya, K. and Tsukagoshi, N. (1998). Utilization of the TEF1- α gene (*TEF1*) promoter for expression of polygalacturonase genes, *pgaA* and *pgaB*, in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 85-92.
- [15] Kitamoto, N. and Yoshino, S. (1999). Nucleotide sequence of the *pyrG* gene from a *shoyu koji* mold, *Aspergillus oryzae* KBN616. *Nihon shoyu kenkyusho zasshi*, **25**, 21-26 (in Japanese).
- [16] Kitamoto, N., Yoshino-Yasuda, S., Hatamoto, O. and Masuda, T. (2006). Disruption of the gene encoding a transcriptional activator for amylolytic genes, AmyR, of *Aspergillus oryzae*. *J. Soy Sauce Res. Technol.*, **32**, 87-91 (in Japanese).
- [17] Kitamoto, N. and Yasuda, S. (2008). Highly efficient gene targeting of the *ku70* gene disruption in the shoyu koji mold, *Aspergillus oryzae*. *Ann. Rept. Aichi Indus. Technol. Inst.*, **7**, 90-93 (in Japanese).
- [18] Lassen, S. F., Breinholt, J., Østergaard, P. R., Brugger, R., Bischoff, A., Wyss, M. and Fuglsang, C. C. (2001). Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 4701-4707.

- [19] 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, DW., Galagan, JE., Nierman, WC., Yu, J., Archer, DB., Bennett, JW., Bhatnagar, D., Cleveland, TE., Fedorova, ND., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, PR., 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, JR., 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. (2005). Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*. **438**, 1157-1161.
- [20] MacRae, W. D., Buxton, F. P., Sibley, S., Garven, S., Gwynne, D. I., Davis R. W. and Arst Jr., H. N. (1988). A phosphate-repressible acid phosphatase gene from *Aspergillus niger*: its cloning, sequencing and transcriptional analysis. *Gene*, **71**, 339-348.
- [21] Marui, J., Tada, S., Fukuoka, M., Suzuki, S., Hattori, R., Wagu, Y., Shiraishi, Y., Kitamoto, N., Sugimoto, T. and Kusumoto, K. (2012). Comparison of acid phosphatase gene expression profiles in solid-state rice and soybean cultures of an *Aspergillus oryzae* strain with low acid phosphatase activity (KBN8048): implications for miso brewing. *Food Sci. Technol. Res.*, **18**, 83-90.
- [22] Mitchell, D. B., Vogel, K., Weimann, B. J., Pasamontes, L. and van Loon, A. P. G. M. (1997). The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiology*, **143**, 245-252.
- [23] Mizutani, O., Kudo, Y., Saito, A., Matsuura, T., Inoue, H., Abe, K. and Gomi, K. (2008). A defect of LigD (human Lig4 homolog) for nonhomologous end joining significantly improves efficiency of gene-targeting in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol.* **45**, 878-889.

- [24] Murakami, K., Ishida, Y., Masaki, A., Tatsumi, H., Murakami, S., Nakano, E., Motai, H. and Arimura, H. (1991). Isolation and characterization of the alkaline protease gene of *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2807-2811.
- [25] 中野政弘 (1982). 概説. 中野政弘編著 味噌の製造技術, 初版 pp. 1-11. 財団法人日本醸造協会, 東京.
- [26] 奈良原秀樹 (1987). 種麴 (もやし). 村上英也編著 麴学, 第4版 pp. 32-47. 財団法人日本醸造協会, 東京.
- [27] Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C. and Inoue, H. (2004). Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12248-12253.
- [28] Nishiya, T. (ed.). (1993). The annotation of the official method of analysis of the National Tax Administration Agency (4th ed.) The brewing society of Japan, Tokyo (in Japanese).
- [29] Oike, T., Yoneyama, T., Yazaki, F., Muramatsu, N., Miyazaki, T. and Negishi, M. (1984). Studies on phosphatase activity in the fermented soybean paste. *Miso no kagaku to gijyutsu*, **32**, 22-25 (in Japanese).
- [30] Ogawa, M., Tokuoka, M., Jin, F.J., Takahashi, T., Koyama, Y. (2010). Genetic analysis of conidiation regulatory pathways in *koji*-mold *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, **47**, 10-18.
- [31] Ogawa, M., Kobayashi, T. and Koyama, Y. (2012). ManR, a novel Zn(II)₂Cys₆ transcriptional activator, controls the β -mannan utilization system in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, **49**, 987-995.
- [32] Oshima, Y. (1997). The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet. Syst.*, **72**, 323-334.
- [33] Petersen, K. L., Lehmbeck, J. and Christensen, T. (1999). A new transcriptional activator for amylase genes in *Aspergillus*. *Mol. Gen. Genet.*, **262**, 668-676.

- [34] Raeder, U. and Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.*, **1**, 17-20.
- [35] Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- [36] Sato, A., Oshima, K., Noguchi, H., Ogawa, M., Takahashi, T., Oguma, T., Koyama, Y., Itoh, T., Hattori, M. and Hanya Y. (2011). Draft genome sequencing and comparative analysis of *Aspergillus sojae* NBRC4239. *DNA Res.*, **18**, 165-76.
- [37] Shimizu, M. (1993). Purification and characterization of phytase and acid phosphatase produced by *Aspergillus oryzae* K1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1364-1365.
- [38] Takahashi, T., Masuda, T. and Koyama, Y. (2006a). Identification and analysis of Ku70 and Ku80 homologs in the koji molds *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 135-143.
- [39] Takahashi, T., Masuda, T. and Koyama, Y. (2006b). Enhanced gene targeting frequency in *ku70* and *ku80* disruption mutants of *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*. *Mol. Genet. Genomics.*, **275**, 460-470.
- [40] Takahashi, T., Jin, F. J., Sunagawa, M., Machida, M. and Koyama, Y. (2008). Generation of large chromosomal deletions in koji molds *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* via a loop-out recombination. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 7684-7693.
- [41] Takita, Y., Takahara, M., Nogami, S., Anraku, Y. and Ohya, Y. (1997). Applications of the long and accurate polymerase chain reaction method in yeast molecular biology: direct sequencing of the amplified DNA and its introduction into yeast. *Yeast*, **13**, 763-768.
- [42] Tominaga, M., Lee, Y.H., Hayashi, R., Suzuki, Y., Yamada, O., Sakamoto, K., Gotoh, K. and Akita, O. (2006). Molecular analysis of an inactive aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 484-490.
- [43] Tsukagoshi, N., Furukawa, M., Nagaba, H., Kirita, N., Tsuboi, A. and Udaka, S. (1989).

Isolation of a cDNA encoding *Aspergillus oryzae* taka-amylase A: evidence for multiple related genes. *Gene*, **84**, 319-327.

- [44] Uchida, H., Arakida, S., Sakamoto, T. and Kawasaki, H. (2006). Expression of *Aspergillus oryzae* phytase gene in *Aspergillus oryzae* RIB40 *niaD*⁻. *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 564-567.
- [45] van Hartingsveldt, W., van Zeijl, C. M. J., Harteveld, G. M., Gouka, R. J., Suykerbuyk, M. E. G., Luiten, R. G. M., van Paridon, P. A., Selten, G. C. M., Veenstra, A. E., van Gorcom, R. F. M. and van den Hondel, C. A. M. J. J. (1993). Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*. *Gene*, **127**, 87-94.
- [46] Walker, JR., Corpina, RA. and Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, **412**, 607-614.
- [47] Wang, H. L., Swain, E. W. and Hesseltine, C. W. (1980) . Phytase of molds used in oriental food fermentation. *J. Food Sci.*, **45**, 1262-1266.
- [48] Wyss, M., Pasamontes, L., Friedlein, A., Rémy, R., Tessier, M., Kronenberger, A., Middendorf, A., Lehmann, M., Schonoebelen, L., Röthlisberger, U., Kuszniir, Eric, Wahl, G., Muller, F., Lahm, H.-W., Vogel, K. and van Loon, A. P. G. M. (1999a). Biophysical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. *Appl. Environ., Microbiol.*, **65**, 359-366.
- [49] Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Rémy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehmann, M. and van Loon, A. P. G. M. (1999b). Biochemical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 367-373.
- [50] Yamada, O., Lee, B. R. and Gomi, K. (1997). Transformation system for *Aspergillus oryzae* with double auxotrophic mutations, *niaD* and *sC*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1367-1369.

- [51] Yu, J., Proctor, R. H., Brown, D. W., Abe, K., Gomi, K., Machida, M., Hasegawa, F., Nierman, W. C., Bhanagar, D. and Cleaveland, T. E. (2004). Genomics of economically significant *Aspergillus* and *Fusarium* species. In “Applied Mycology and Biotechnology, vol. 4, Fungal genomics” ed. by D. K. Arora and G. G. Khachatourians. Elsevier B. V., pp. 249-283.

学位論文の基礎となる学術論文

- [1] Yoshino-Yasuda, S., Mori, A., Ishihara, N., Hasegawa, O., Kato, M. and Kitamoto, N. (2011). Development of a highly efficient gene replacement system for an industrial strain of *Aspergillus oryzae* used in the production of *miso*, a Japanese fermented soybean paste. *Food Sci. Technol. Res.*, **17**, 161-166.
- [2] Yoshino-Yasuda, S., Hasegawa, O., Iga, Y., Shiraishi, Y., Wagu, Y., Suzuki, T., Sugimoto, T., Kusumoto, T., Kato, M. and Kitamoto, N. (2012). Disruption and overexpression of acid phosphatase gene (*aphA*) from a *miso koji* mold, *Aspergillus oryzae* KBN630, and characterization of the gene product. *Food Sci. Technol. Res.*, **18**, 59-65.
- [3] Yoshino-Yasuda, S., Nakamura E., Ono N., Hasegawa, O., Iga, Y., Shiraishi, Y., Wagu, Y., Suzuki, T., Sugimoto, T., Kusumoto, T., Kato, M. and Kitamoto, N. (2014). Characterization of acid phosphatase (AphC) from the *miso koji* mold, *Aspergillus oryzae* KBN630: AphC is mainly responsible for both acid phosphatase activity and 5'-IMP dephosphorylation activity in soybean-*koji* culture. *Food Sci. Technol. Res.*, **20**, 367-374.

既発表学術論文

- [1] Yoshino, S., Oishi, M., Moriyama, R., Kato, M. and Tsukagoshi, N. (1995). Two family G xylanase genes from *Chaetomium gracile* and their expression in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics* **29**, 73-80.
- [2] 安田（吉野）庄子, 北本則行. (2011). 花からの *Saccharomyces cerevisiae* の選択的分離と遺伝的多様性. 日本食品科学工学会誌, **58**, 433-438.
- [3] Yoshino-Yasuda, S., Kato, M. and Kitamoto, N. (2011). Sequence analysis and heterologous expression of polygalacturonase gene (*AspecA*) from a *shoyu koji* mold, *Aspergillus sojae* KBN1340. *Food Sci. Technol. Res.* **17**, 579-584.
- [4] Yoshino-Yasuda, S., Karita, S., Kato, M. and Kitamoto, N. (2012). Sequence analysis and

- heterologous expression of rhamnogalacturonan lyase A gene (*AsrglA*) from *shoyu koji* mold, *Aspergillus sojae* KBN1340. *Food Sci. Technol. Res.* **18**, 901-909.
- [5] Yoshino-Yasuda, S., Fujino, E., Matsui, J., Kato, M. and Kitamoto, N. (2013). Molecular analysis of the α -amylase gene, *AstaaG1*, from *shoyu koji* mold, *Aspergillus sojae* KBN1340. *Food Sci. Technol. Res.* **19**, 255-261.
- [6] Yoshino-Yasuda, S., Fujino, E., Matsui, J., Ono, N., Kato, M. and Kitamoto, N. (2013). Molecular analysis of *AsamyR* gene encoding transcriptional factor for amylolytic gene from *shoyu koji* mold, *Aspergillus sojae* KBN1340. *Food Sci. Technol. Res.* **19**, 505-511.
- [7] Chaya, E., Suzuki, T., Karita, S., Hanya, A., Yoshino-Yasuda, S. and Kitamoto, N. (2014). Sequence analysis and heterologous expression of the wool cuticle-degrading enzyme encoding genes in *Fusarium oxysporum* 26-1. *J. Biosci. Bioeng.* **117**, 711-714.