

醤油麹菌 *Aspergillus oryzae* KBN616株における形質転換系の開発

北本則行

醤油醸造では、麹菌 (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*)、耐塩性乳酸菌 (*Tetragenococcus halophila*) 及び耐塩性酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida versatilis*) が使用されている。これらの微生物は醤油原料の分解、醤油諸味の熟成及び醤油の香味形成において大変重要な役割を果たしている。醤油は原料配合、製麹技術、諸味管理、火入れ熟成などの微妙な変化によってその品質が大きく影響を受けるが、これらのうちで製麹の良否が製品醤油の品質に及ぼす影響が最も大きい。したがって、醤油醸造において麹菌が果たす役割は他の微生物が果たす役割に比べてはるかに大きいと考えられる。麹菌が醤油醸造において担う多彩な役割の中で、①原料分解に関わる酵素や呈味物質及び芳香性物質生成に関わる酵素の供給源としての役割、②麹や諸味の香りに影響を与える有機酸やアルコール類などの芳香源としての役割が大変重要である。そこで、麹菌が生産する酵素類が醤油醸造において果たす役割を詳細に解析することは、醤油醸造工程の改良や醤油の品質向上などに大きく貢献することができる。麹菌は有性世代を持たず、多核の無性胞子を形成するために、古典遺伝学的手法による遺伝解析は困難である。しかし、遺伝子操作技術を駆使することによって、特定の麹菌酵素遺伝子の多コピー化や遺伝子破壊により酵素生産量を任意に変化させることが可能とな

り、分子レベルで麹菌酵素の醤油醸造における役割を明らかにすることも可能となってきた。

醤油麹菌において遺伝子操作を行うためには外来 DNA を麹菌細胞内に導入することが不可欠であり、そのためには醤油麹菌の形質転換系を確立することが必要となってくる。麹菌の宿主株には形質転換体として検出ができる栄養要求性などの遺伝子マーカーが付与されている必要があるが、分生子が多核である麹菌から適当な栄養要求性変異株を実用的な有用性質を損なうことなく分離することが困難である。そのため、大腸菌や酵母などのように抗生物質などの薬剤に対する耐性遺伝子を優性選択マーカーとして使用する形質転換系が望まれているが、麹菌は他のカビで利用できるような薬剤に高い耐性を示すことが多く、また、感受性と耐性の差が小さいために適当な優性マーカーがほとんどなかった¹⁾。しかし、最近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きている (表1)。これらの中で、硝酸塩非還元性の *niaD*⁻ 株は塩素酸塩耐性を示す自然突然変異株の中より得られ、UV 照射等の変異処理を行わないので麹菌実用株の優れた性質を損なう可能性が低い。そこで、*niaD* 遺伝子を選択マーカーとする醤油麹菌 *A. oryzae* KBN616 株の形質転換系の開発を試みた。

宿主株として使用する *niaD*⁻ 株の取得は以下のように

表1 麹菌の形質転換に利用される選択マーカー遺伝子

選択マーカー	コードされる酵素・たんぱく質	表現型
<i>argB</i>	オルニチン・カルバモイルトランスフェラーゼ	アルギニン要求性相補
<i>pyrG</i>	オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ	ウラシル要求性相補
<i>niaD</i>	硝酸還元酵素	硝酸塩還元
<i>amdS</i>	アセトアミダーゼ	アセトアミド還元
<i>sC</i>	ATP スルフィダーゼ	硫酸塩還元
<i>ptrA</i>	チアゾール合成酵素	ピリチアミン耐性
<i>met</i>	未同定	メチオニン要求性相補

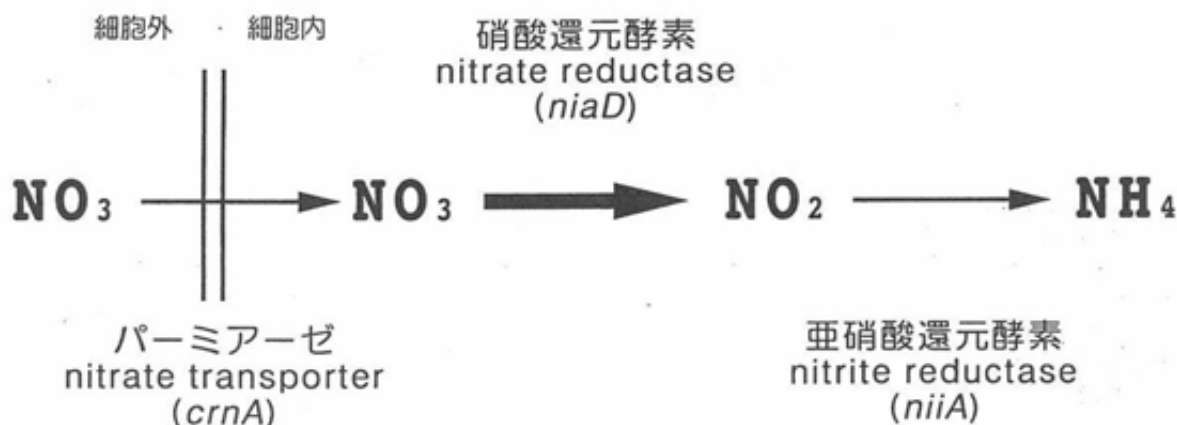


図1 カビにおける硝酸塩の同化経路

表2 *A. oryzae* KBN616 株の塩素酸塩耐性株の窒素源生育試験

窒素源					変異	分離株数
NO_3^-	NO_2^-	Hyp	Glu	Amm		
—	+	+	+	+	<i>niaD</i>	13
+	+	+	+	+	<i>crnA</i>	5
—	+	—	+	+	<i>cnx</i>	17
—	—	+	+	+	<i>nirA</i>	12
—	—	—	—	+	<i>areA</i>	0

+: 生育、—: 生育せず

NO_3^- : 硝酸ナトリウム、 NO_2^- : 亜硝酸ナトリウム、Hyp: ヒポキサンチン、Glu: グルタミン酸ナトリウム、Amm: 塩化アンモニウム

行った。約 10^4 個の *A. oryzae* KBN616 株の胞子を塩素酸カリウムと単一窒素源としてグルタミン酸を含んだツァベック改良培地 (3% グルコース, 0.1% リン酸二カリウム, 0.05% 塩化カリウム, 0.05% 硫酸マグネシウム, 0.001% 硫酸第1鉄, 10mM グルタミン酸ナトリウム, 470mM 塩素酸カリウム, 0.25% Triton X-100, 1.5% 寒天)²⁾ に塗布し、生育の旺盛なコロニーを単離した。二度の単孢子純化を行って 47 株の安定な塩素酸カリウム耐性株を取得した。塩素酸カリウム耐性を示す変異は *niaD* 遺伝子だけではなく、硝酸塩の菌体内取り込みに関与する *crnA* 遺伝子や転写因子の *nirA* 遺伝子などに変異が起きた場合でも同じ表現型を示す (図1) ので、硝酸ナトリウム、亜硝酸ナトリウム及びヒポキサンチン、グルタミン酸ナトリウム、塩化アンモニウムに対する同化性を調べた。これら 5 種類の窒素源に対する同化性より 13 株の *niaD* 株を取得することができた (表2)。変異株の構成割合は既報²⁾ において報告されている構成割合と異なってい

るが、供試菌株の違いによるものと考えられた。

取得された *niaD* 株の中より任意に選んだ *A. oryzae* KBN616-39 株を *A. nidulans* の形質転換用培地 (2% 麦芽エキス, 0.1% ペプトン, 2% グルコース) で培養し、得られた菌体を Ballance らの方法³⁾ に従って Novozyme234 でプロトプラスト化した後、PEG4000 存在下でプラスミド DNA を取り込ませて形質転換を行った。*A. oryzae* KBN616 株の *niaD* 遺伝子を組み込んだプラスミド pND300⁴⁾ を用いた場合、約 20 / μg DNA の形質転換効率で形質転換体を得られた。この形質転換効率は Unkles ら⁵⁾ が報告している形質転換効率 (約 60 / μg DNA) に比べると低いが、Yamada ら⁶⁾ が報告している形質転換効率 (約 1 / μg DNA) に比べると高い。ここで行った方法を用いて他の麹菌株由来の *niaD* 株からもほぼ同程度の形質転換効率で形質転換体を得られていることから、供試菌株の違いよりも形質転換方法、例えばプロトプラスト調製方法やプロトプラスト再生方法

などの違いが形質転換効率に影響を及ぼしていると考えられた。形質転換効率の向上にはさらに詳細な条件検討が必要であるが、Unkles ら²⁾の形質転換方法の詳細が不明であることから飛躍的な向上は望むことができないと思われる。形質転換効率の向上のためには、今後、PEGを用いない別の形質転換方法、すなわち、エレクトロポレーション⁹⁾や *Agrobacterium* 属細菌を用いる方法⁷⁾などを検討する必要がある。

このようにして開発された *A. oryzae* KBN616-39 株を用いる形質転換系を使用して、*A. oryzae* KBN616 株由来のセルラーゼ遺伝子¹⁾、ポリガラクトナーゼ遺伝子¹⁾、ペクチンメチルエステラーゼ遺伝子¹⁰⁾、ペクチンリアーゼ遺伝子^{11,12)}、キシラナーゼ遺伝子¹³⁾及びキシロシダーゼ遺伝子¹⁴⁾の高発現に成功している。今後、*A. oryzae* KBN616-39 株において種々の遺伝子を高発現あるいは発現抑制させることによって、麹菌酵素の醤油醸造における真の役割を解明することができると思われる。

文 献

- 1) 五味勝也：醸協，95，494（2000）。
- 2) Unkles, S.E., Campbell, E.I., de Ruiter-Jacobs, Y.M.J.T., Broekhuijsen, M., Macro, J.A., Carrez, D., Contreras, R., van den Hondel, C.A.M.J.J. and Kinghorn, J.R. : *Mol. Gen. Genet.*, 218, 99(1989).
- 3) Ballance, D.J. and Turner, G. : *Gene*, 36, 321 (1985).
- 4) Kitamoto, N., Kimura, T., Kito, Y., Ohmiya, K. and Tsukagoshi, N. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 1795(1995).
- 5) Yamada, O., Lee, B.R. and Gomi, K. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 1367(1997).
- 6) Brown, J.S., Aufauvre-Brown, A. and Holden, D.W. : *Mol. Gen. Genet.*, 259, 327(1998).
- 7) Chen, X., Stone, M., Schlagnhauser, C. and Romaine, C.P. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4510 (2000).
- 8) Kitamoto, N., Go, M., Shibayama, T., Kimura, T., Kito, Y., Ohmiya, K. and Tsukagoshi, N. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 538 (1996).
- 9) Kitamoto, N., Matsui, J., Kawai, Y., Kato, A., Ohmiya, K. and Tsukagoshi, N. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 85 (1998).
- 10) Kitamoto, N., Okada, H., Yoshino, S., Ohmiya, K. and Tsukagoshi, N. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 120 (1999).
- 11) Kitamoto, N., Yoshino-Yasuda, S., Ohmiya, K. and

Tsukagoshi, N. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 209(2001).

- 12) Kitamoto, N., Yoshino-Yasuda, S., Ohmiya, K. and Tsukagoshi, N. : *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 378 (2001).
- 13) Kitamoto, N., Yoshino, S., Ohmiya, K. and Tsukagoshi, N. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 1791(1999).
- 14) Kitamoto, N., Yoshino, S., Ohmiya, K. and Tsukagoshi, N. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 20 (1999)