

### 3. グルコアミラーゼ糖鎖の糖組成

親株と変異株のグルコアミラーゼに付加している糖鎖を塩酸で加水分解して、各構成単糖の組成量を分析した。得られた糖組成を Table 5-3 に示す。

親株グルコアミラーゼと変異株グルコアミラーゼはともにマンノースとガラクトース及び N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の三種類が検出された。

H-1 株及び G-4 株グルコアミラーゼの糖鎖は、マンノースの組成量がそれぞれ 5.4 mol%と 6.5 mol%であり、それぞれの親株グルコアミラーゼでの組成量 3.1 mol%、3.5 mol%の約 2 倍多かった。しかし、各変異株と親株ともにグルコアミラーゼ糖鎖全体に占めるマンノースの割合はかなり少なく、糖鎖の組成は主に GlcNAc とガラクトースで占められていた。GlcNAc とガラクトースの組成量 (mol%) は、各変異株グルコアミラーゼと親株グルコアミラーゼの糖鎖では大きく変わらなかった。しかし、H-1 株と氷上タイプ株 (親株) のグルコアミラーゼ糖鎖は、GlcNAc とガラクトースのどちらも 46~51 mol%でほぼ 1 : 1 の比率であったのに対して、G-4 株と吟香株 (親株) のグルコアミラーゼ糖鎖は、GlcNAc (約 40 mol%) に対してガラクトース (約 60 mol%) の割合が多く、1 : 1.5 の比率であった。

Table 5-3 Monosaccharide composition of N-glycan in glucoamylases from parent strains and mutant strains

Strain	Mannose		GlcNAc		Galactose		GlcNAc/ Mannose ratio	Galactose/ Mannose ratio
	(pmol)	(mol%)	(pmol)	(mol%)	(pmol)	(mol%)		
<i>Hikami-type</i> (Parent)	7.0	3.1	117.5	51.2	105.0	45.6	16.8	15.0
H-1	10.0	5.4	85.0	45.6	91.4	49.0	8.5	9.1
<i>Ginka</i> (Parent)	8.5	3.5	92.5	38.5	139.5	58.0	10.9	16.4
G-4	20.5	6.5	117.5	37.5	175.0	55.9	5.7	8.5

#### 4. グルコアミラーゼのペプチドマッピング

親株と変異株グルコアミラーゼをリシルエンドペプチダーゼで分解して、得られたペプチド断片の HPLC 分析を行い、分離パターンの比較を行った。各々のグルコアミラーゼの 4 時間酵素処理分解物ペプチドマップを Fig. 5-13 と 5-14 に、24 時間酵素処理分解物のペプチドマップを Fig. 5-15 と 5-16 に示す。

両変異株グルコアミラーゼのペプチドマップは親株グルコアミラーゼのペプチドマップと全体的にかなり類似したが、異なるクロマトパターンが現れている部分はいくつか認められた。H-1 株グルコアミラーゼは、4 時間及び 24 時間処理のどちらの場合も、保持時間 40~80 分で親株の氷上タイプにはないあらたなピークが若干みられた。一方、G-4 株グルコアミラーゼのペプチドマップは、特に 24 時間処理において、親株の吟香株で保持時間 80~120 分の間に見られたピークがいくつか消失しており、現れるピーク数が明らかに少なかった。

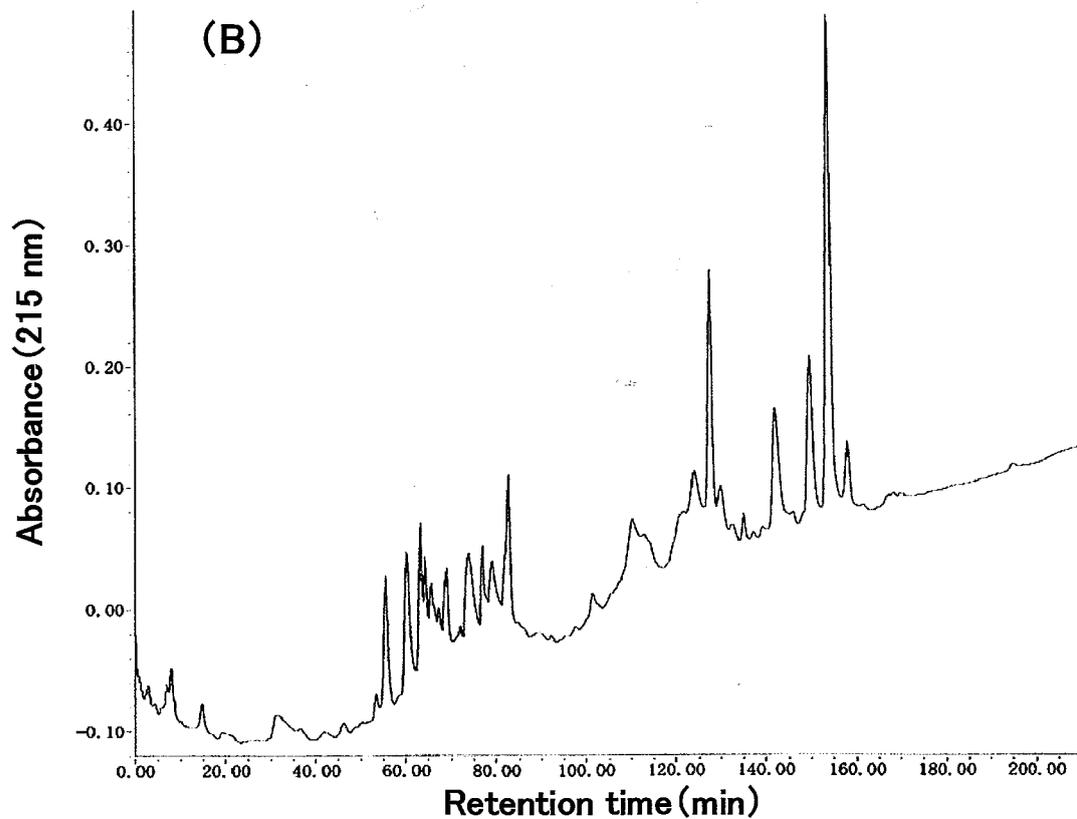
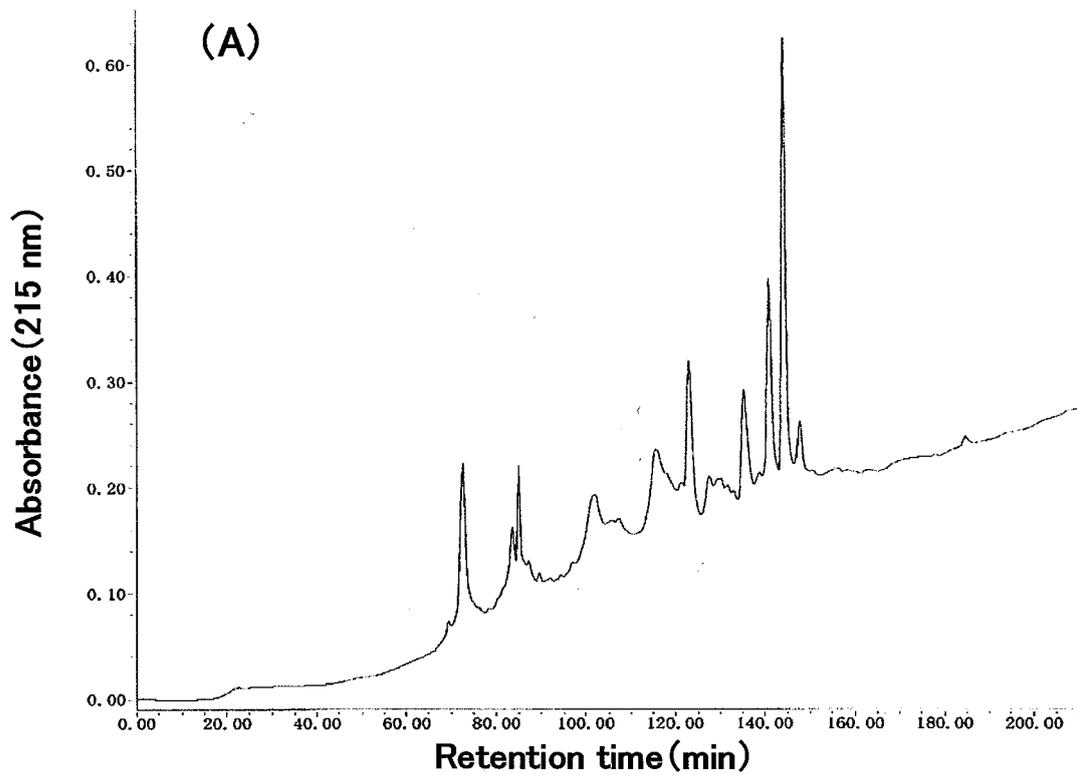


Fig. 5-13 Reverse phase HPLC of lysylendopeptidase digests of glucoamylases from *Hikami*-type strain (A) and H-1 strain (B) for 4 h

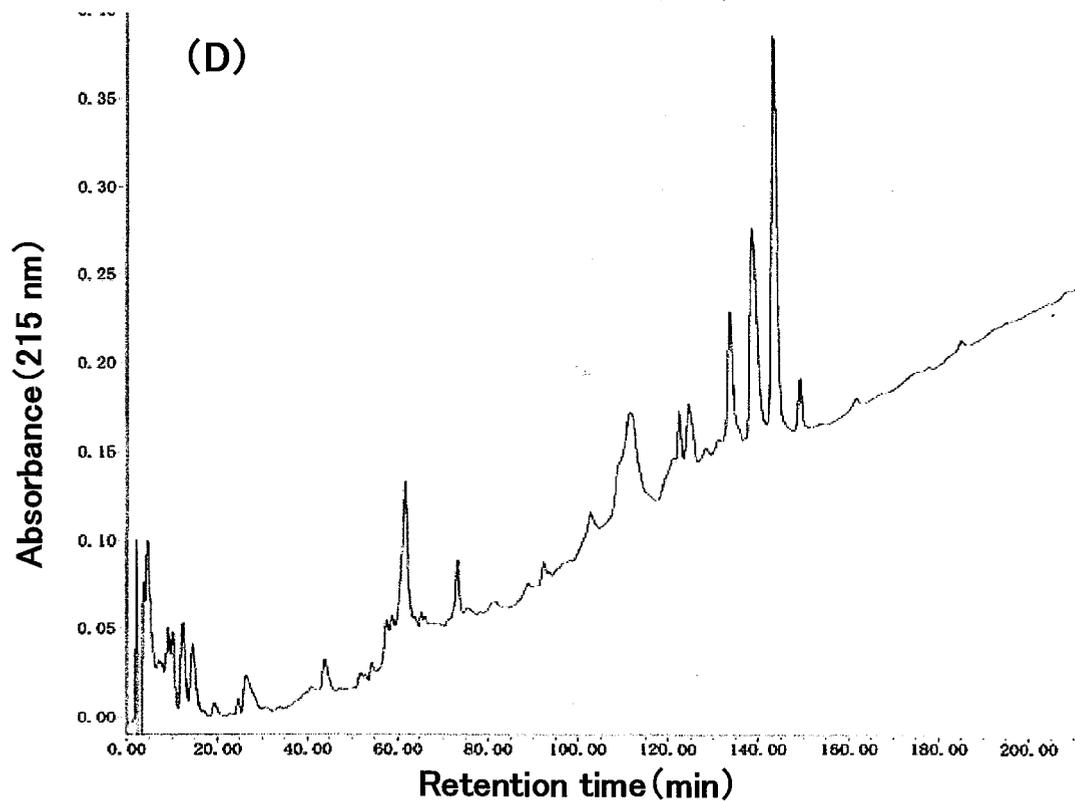
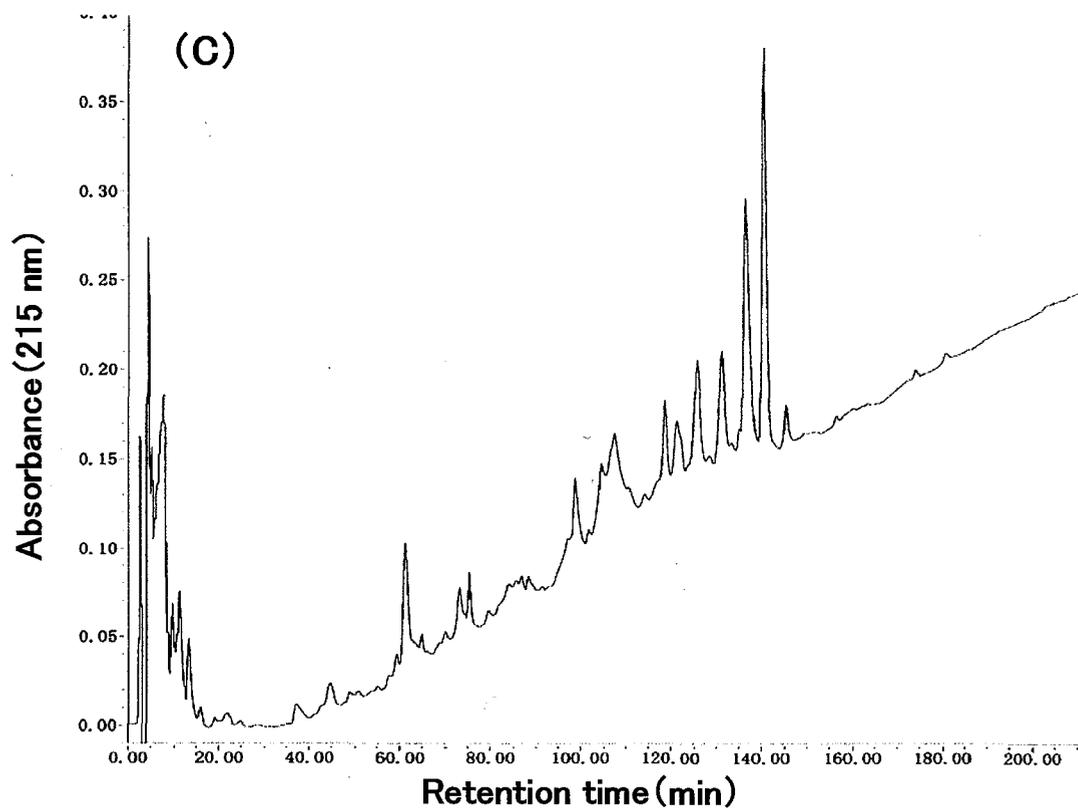


Fig. 5-14 Reverse phase HPLC of lysylendopeptidase digests of glucoamylases from *Ginka* strain (C) and G-4 strain (D) for 4 h

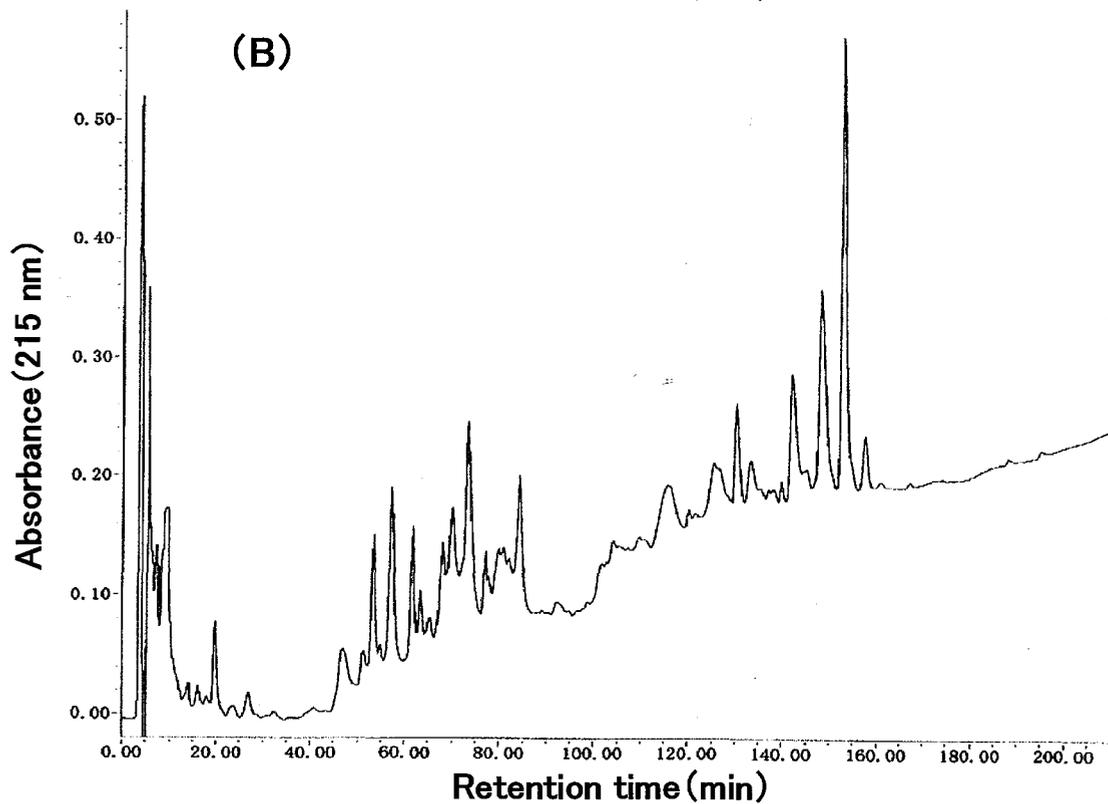
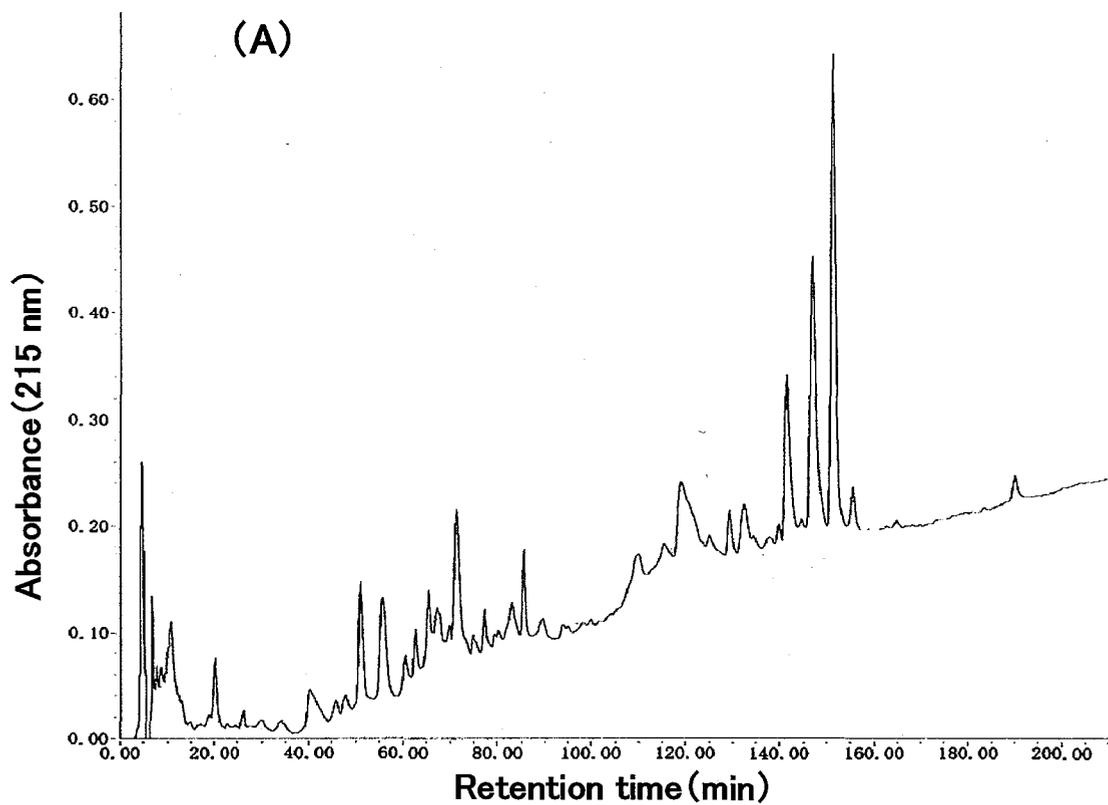


Fig. 5-15 Reverse phase HPLC of lysylendopeptidase digests of glucoamylases from *Hikami-type* strain (A) and H-1 strain (B) for 24 h

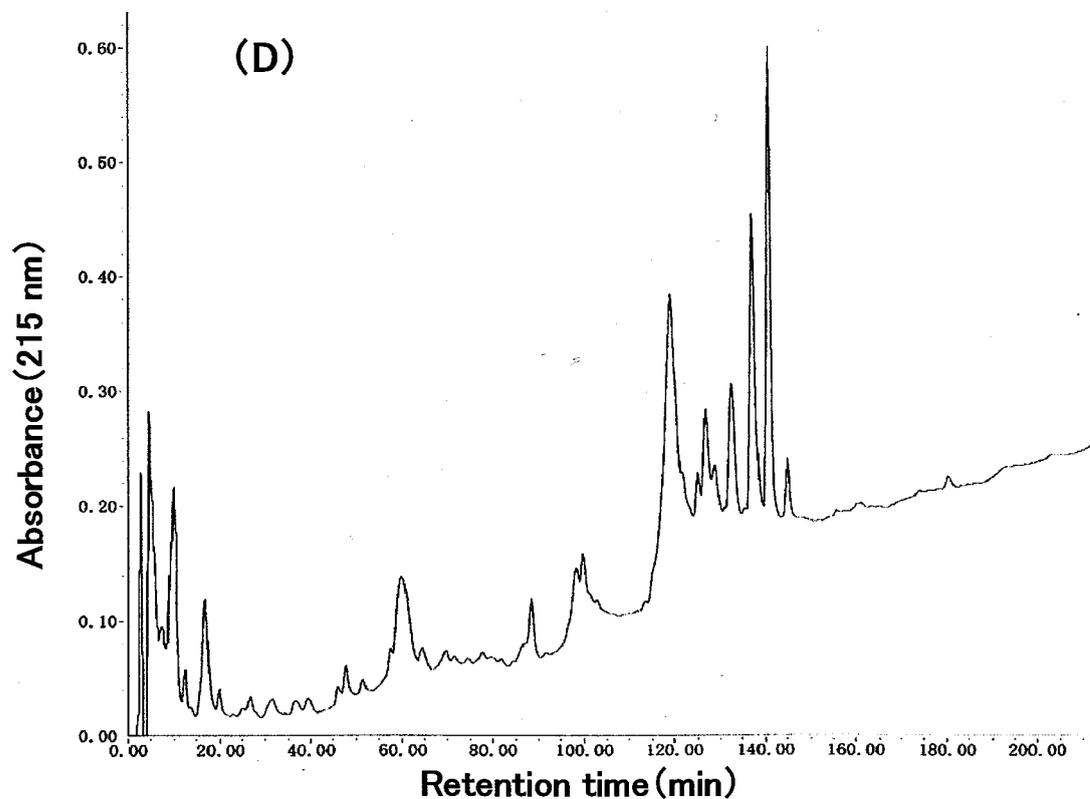
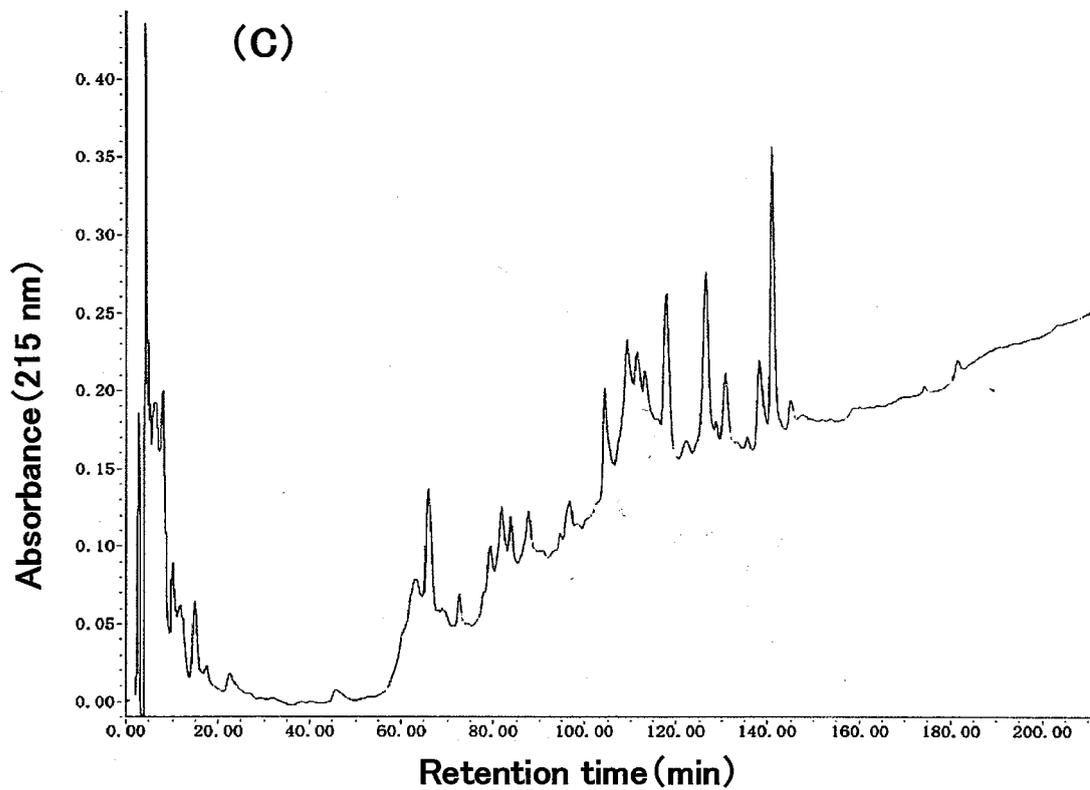


Fig. 5-16 Reverse phase HPLC of lysylendopeptidase digests of glucoamylases from *Ginka* strain (C) and G-4 strain (D) for 24 h

### III. 考察

変異株 H-1 株と G-4 株のグルコアミラーゼのアミノ酸組成は、どちらもそれぞれの親株氷上タイプ株と吟香株のグルコアミラーゼと明らかに異なっていた。両変異株はセリン、スレオニン及びアラニンの組成量が少なく、バリンやイソロイシンの組成量は多かったことから、両変異株グルコアミラーゼの一次構造が何箇所か変異を受けていると推察される。さらに、リシルエンドペプチダーゼ分解によるペプチドマップが両変異株と親株グルコアミラーゼに違いが認められたことから、両変異株のグルコアミラーゼはアミノ酸配列の一部及び結合している糖鎖の数や糖鎖が結合している位置等が変異している可能性が示唆される。

これまで、固体培養で生成する *A. oryzae* のグルコアミラーゼは N-グリコシド結合型糖鎖が付加され、熱安定性等に関わっていることが報告されている<sup>51)-53)</sup>。両変異株と親株のグルコアミラーゼ糖鎖について糖組成を比較した結果、すべての菌株のグルコアミラーゼ糖鎖はマンノース組成量が 10mol%以下であり、糖鎖の構成糖全体の中で占める割合がかなり少なく、主にガラクトースと GlcNAc (ほぼ 1 : 1 または 1 : 1.5) で構成されていた。これらの結果からグルコアミラーゼ糖鎖は高マンノース型ではなく、複合型か混成型の糖鎖であると考えられる。このことから、糖鎖中のマンノース数がほぼコア構造の 3 分子のみであると仮定すると、両変異株グルコアミラーゼの糖鎖の場合、Table 5-3 に示すようにコア構造のマンノース 1 分子あたりに結合するガラクトースと GlcNAc 数は 6~9 であり、親株グルコアミラーゼの糖鎖 (ガラクトースと GlcNAc 数は 11~17) と比べて糖鎖の各分岐の長さが約半分ほどに短くなっていると推察される。また、変異株の G-4 株は H-1 株よりもグルコアミラーゼ糖鎖のマンノース当たりのガラクトースと GlcNAc の割合が少ないことから、G-4 株グルコアミラーゼ糖鎖の方が短い可能性が示唆される。

両変異株と親株のグルコアミラーゼを各種脱糖鎖酵素で処理して糖鎖構造の違いを検討した結果、Table 5-2 にまとめたように、PNGase F はハイマンノース型、複合型及び混成型すべての糖鎖に広く基質特性を持っているため<sup>54,55)</sup>、親株と変異株グルコアミラーゼともに PNGase F 処理によって完全に脱糖鎖された。しかし、Endo H 酵素処理では、親株と変異株のグルコアミラーゼで反応結果が異なり、両変異株グルコアミラーゼは完全に脱糖鎖されたが、親株グルコアミラーゼは部分的にしか脱糖鎖されなかった。Endo H は複合型糖鎖に対して基質特異性が無く<sup>56,57)</sup>、作用できないことから考えて、親株グルコアミラーゼ糖鎖は複合型であるが、変異株グルコアミラーゼ糖鎖はマンノースとの混成型に変化していると推測され、コア構造以外にもマンノースが付加していることが示唆される。この結果は、両変異株グルコアミラーゼ糖鎖を構成するマンノースの組成量が親株と比べて多かったことから裏付けられる。PNGase A は PNGase F と同様の幅広い基質特異性を示すが、立体構造による障害を受けやすいという特徴を持つことが報告されていることから<sup>58,59)</sup>、変異株及び親株グルコアミラーゼの糖鎖はどちらもかなり巨大で PNGase A が作用できなかったものと考えられる。

以上の結果から、変異株グルコアミラーゼの糖鎖は糖組成及び構造が親株グルコアミラーゼと異なっており、糖鎖が明らかに変異していると推察される。また、N-グリコシド結合型糖鎖の結合には Asn-X-Thr (または Ser) モチーフが必要であるが<sup>45,49)</sup>、アミノ酸組成分析の結果、両変異株グルコアミラーゼは Thr と Ser の組成量が親株と比べて減少していることから、糖鎖の結合部位に変異が生じ、糖鎖数が減少していることが示唆される。*A. awamori* は *A. oryzae* のグルコアミラーゼと同様に N-結合型糖鎖のグルコアミラーゼを持つが<sup>60,61)</sup>、脱糖鎖することによって 50℃ 以上での残存活性は 30% 以上低下したことを Neustroev らは報告している<sup>62)</sup>。両変異株のグルコアミラーゼは親株と比べて熱安定性が低い

ことを前章で明らかにしたが、本章で示されたアミノ酸組成や糖鎖の変異によって熱安定性が低くなったと推察される。

## 第6章 変異株のグルコアミラーゼ発現量解析

変異株 H-1 株と G-4 株は親株氷上タイプ株と吟香株よりも菌体あたりのグルコアミラーゼを多量に生成することを第4章で明らかにした。本章では、リアルタイム PCR による mRNA 発現量の定量解析を行い、変異株と親株のグルコアミラーゼ遺伝子からの転写発現量を比較検討した。

### I. 実験材料及び方法

#### 1. 使用菌株

低褐変性、高グルコアミラーゼ活性変異株 H-1 株と高褐変性、高グルコアミラーゼ活性変異株 G-4 株及び対照としてそれぞれの変異株の親株である氷上タイプ株と吟香株の計 4 菌株を用いた。

#### 2. 固体培養麴試料の調製

各菌株を第2章 I.5 に従って固体培養し、36 時間培養（グルコアミラーゼ活性出現期）、44 時間培養（グルコアミラーゼ活性最大期）の2種類の培養時期の固体培養麴試料を製造した。

#### 3. RNA の抽出

本章 I.2 で培養調製した各菌株の固体培養麴試料 50 mg を RNA 抽出キット QuickGene RNA tissue kit SII（富士写真フィルム）の溶解液 500  $\mu$ l に懸濁し、ビーズ式細胞破碎装置 Micro Smash MS-100R（トミー精工）により 3,800 rpm

で2分間ホモジナイズした。ホモジナイズ試料を15,000 rpmで3分間遠心して上清を385  $\mu$ l回収した。回収した上清にQuickGene RNA tissue kit SIIの可溶化液175  $\mu$ lを加えて15秒間ボルテックスした。さらに、特級エタノール(99.5%)140  $\mu$ lを添加して1分間ボルテックスした。ボルテックス後、RQ1 RNase-Free DNase (Promega) 40  $\mu$ lを添加して、溶液全量を全自動核酸抽出装置QuickGene-810 (富士写真フイルム)に注入してTotal RNAの抽出を行った。

#### 4. 抽出したRNAの定量と純度の検定

抽出したTotal RNAの濃度は、260 nmの吸光度が1のとき40  $\mu$ g/mlとして求めた。さらに、280 nmの吸光度を測定して純度 ( $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ ) を検定した。

#### 5. cDNAの合成

iScript Select cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD) を用い、本章I.3で抽出したTotal RNAからcDNAの合成を行った。以下の組成の反応液で合成を行った。

Total RNA	13 $\mu$ l (150 ng)
<u>Oligo(dT)<sub>20</sub> primer</u>	<u>2 <math>\mu</math>l</u>
Total	15 $\mu$ l

反応液を65°Cで5分間反応させた後、氷上で60秒冷却して5 $\times$ iScript select reaction mix 4  $\mu$ lとiScript reverse transcriptase 1  $\mu$ lを添加して42°Cで90分間cDNA合成反応を行った。反応後、85°Cで5分間加熱して合成反応を停止した。

## 6. PCR プライマーの設計

GenBank<sup>63)</sup>に登録されている *A. oryzae* RIB40 のグルコアミラーゼ遺伝子 *glaB* (GenBank accession no.AP007155, locus tag AO070341000269) の配列を参考にして、センスプライマー-glaB-F とアンチセンスプライマー-glaB-R を作製した。また、ハウスキーピング遺伝子として用いる $\beta$ -tubulin 遺伝子のプライマーは、Tominaga らが用いている *A. oryzae* の $\beta$ -tubulin 遺伝子のプライマー配列<sup>64)</sup>を参考にして、センスプライマー-tubulin-F とアンチセンスプライマー-tubulin-R を作製した。各プライマーの詳細な塩基配列は以下に示す。

glaB-F : 5'-CAACAATGGACGTGGAGCA-3'

glaB-R : 5'-ACTTGACCTTGTTTGTCCCACTG-3'

tubulin-F : 5'-CCAAGAACATGATGGCTGCT-3'

tubulin-R : 5'-CTTGAAGAGCTCCTGGATGG-3'

## 7. リアルタイム PCR による発現量解析

### 1) リアルタイム PCR 反応

iQ SYBER Green Supermix (BIO-RAD) を用い、本章 I.5 で合成した cDNA を鋳型としてリアルタイム PCR を行った。反応液は、以下の組成で調製した。

2×iQ SYBER Green Supermix	25 $\mu$ l
Forward primer (50 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
Reverse primer (50 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
滅菌水	22 $\mu$ l
鋳型 cDNA	2 $\mu$ l
<hr/>	
Total	50 $\mu$ l

PCR 増幅はリアルタイム PCR 装置 DNA Engine Opticon System (MJ Japan Ltd.) を用いて初期変性 95°C-3 分、変性 95°C-30 秒、アニーリング 47°C-15 秒、伸長 72°C-30 秒の条件で、SYBER Green I の蛍光強度をモニタリングしながら 40 サイクル行った。増幅された PCR 産物は 55~95°C の融解曲線分析により確認した。

## 2) 発現量解析

リアルタイム PCR 反応で得られた蛍光増幅曲線からある一定の産物量 (Threshold line) に達したときのサイクル数 Threshold Cycle (Ct) を求め、相対定量法 (Comparative Ct 法) により定量した。その際の PCR 効率が 100% であることはあらかじめ確認しておいた。麹菌のハウスキーピング遺伝子である  $\beta$ -tubulin 遺伝子を内部標準として基準にし、グルコアミラーゼ遺伝子 (*glaB*) の mRNA 発現量を相対比として以下の計算により求めた。

親株のサイクル差  $\Delta Ct_{(p)} = Ct_{(p)} (glaB) - Ct_{(p)} (\beta\text{-tubulin 遺伝子})$

変異株のサイクル差  $\Delta Ct_{(m)} = Ct_{(m)} (glaB) - Ct_{(m)} (\beta\text{-tubulin 遺伝子})$

$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{(m)} - \Delta Ct_{(p)}$

発現量比 =  $2^{- (\Delta \Delta Ct)}$

## II. 実験結果

両親株と親株での *glaB* 遺伝子からの mRNA 発現量を比較するために、各菌株の固体培養菌体から抽出した Total RNA をもとに合成した cDNA を鋳型とし、*glaB* 遺伝子に特異的なプライマーと  $\beta$ -tubulin 遺伝子 (ハウスキーピング遺伝子)

のプライマーを用いてリアルタイム PCR による定量解析を行った。各菌株の cDNA での PCR 増幅における蛍光強度曲線を Fig. 6-1 と 6-2 に示す。glaB プライマーを用いた PCR では、両変異株の cDNA を鋳型とした場合に PCR 増幅の立ち上がりが早く、*glaB* 遺伝子の初期鋳型量が親株の場合よりも多いことが明らかであった。この結果は菌体の培養条件が 36 時間及び 44 時間のいずれの場合においても同じであった。また、各プライマーによる PCR 増幅産物の融解曲線は、Fig. 6-3~6-4 に示すように目的の増幅産物のピーク（glaB プライマーによる増幅産物の融点：86℃、tubulin プライマーによる増幅産物の融点：85℃）のみが見られ、非特異的増幅は行っていないことが確認された。

各プライマーを用いた PCR の蛍光強度曲線から、蛍光強度 0.02~0.05 を Threshold line としてそれぞれ Ct を求め、相対定量法により各菌株の *glaB* 遺伝子の発現量を定量した。親株に対する各変異株の *glaB* 発現量比を Table 6-1 と 6-2 に示す。H-1 株は氷上タイプ株（親株）よりも *glaB* が 1.3~1.7 サイクル分はやく増幅し、その発現量は 36 時間培養時で 3.3 倍、44 時間培養時で 2.5 倍であった。一方の変異株 G-4 株の吟香株（親株）に対する *glaB* の増幅のサイクル差（4.5~4.6）はそれよりもさらに大きく、G-4 株の *glaB* 発現量は 36、44 時間の各培養時でそれぞれ 24.8、22.2 倍であった。

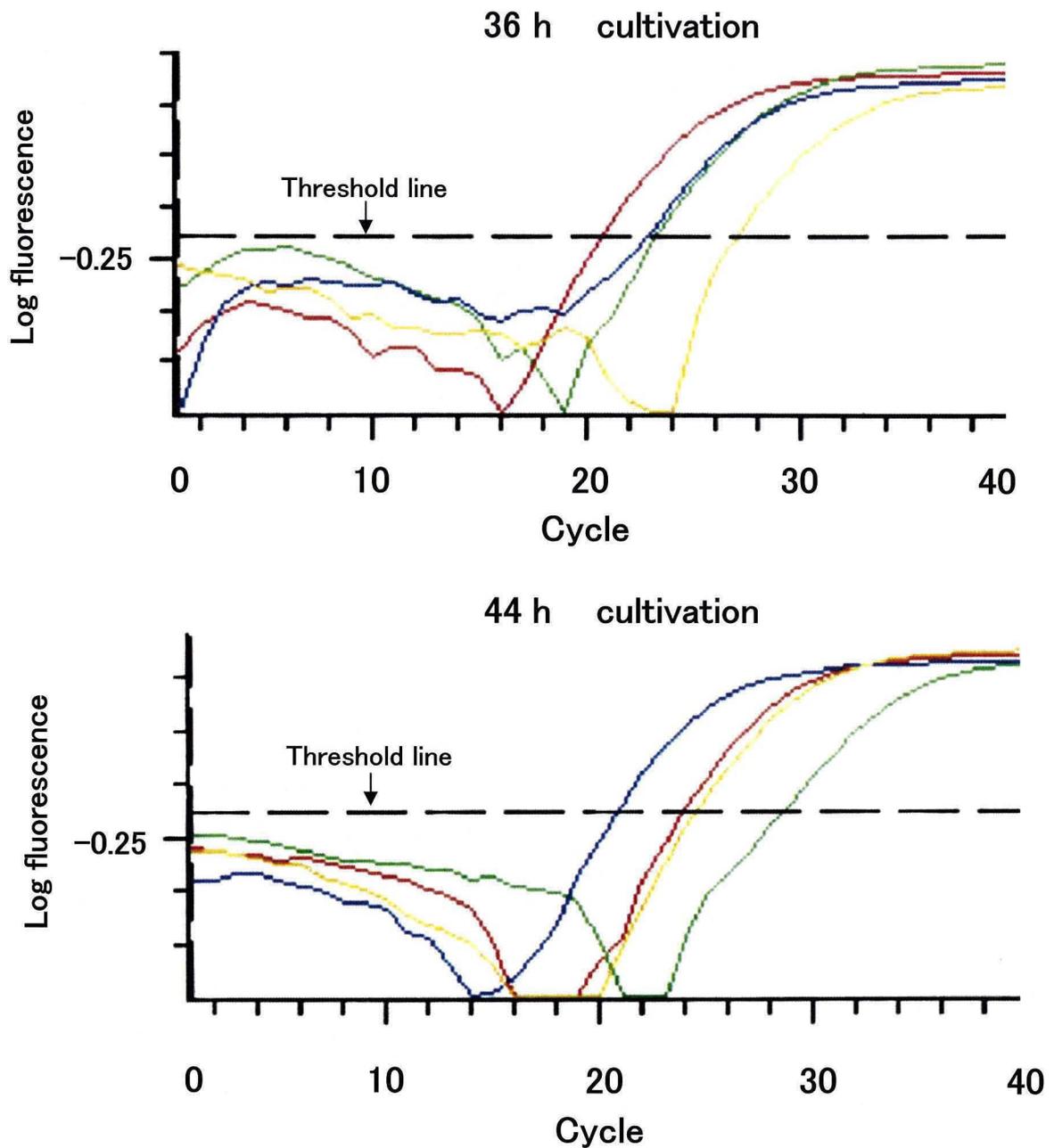


Fig. 6-1 Real-time PCR fluorescence data graph(1)

(Quantity of glucoamylase and  $\beta$ -tubulin mRNA in *Hikami-type* strain and H-1 strain)

- |  |  |
|--|--|
| <p>— <i>Hikami-type</i> strain (glaB)</p> <p>— <i>Hikami-type</i> strain (tubulin)</p> | <p>— H-1 strain (glaB)</p> <p>— H-1 strain (tubulin)</p> |
|--|--|

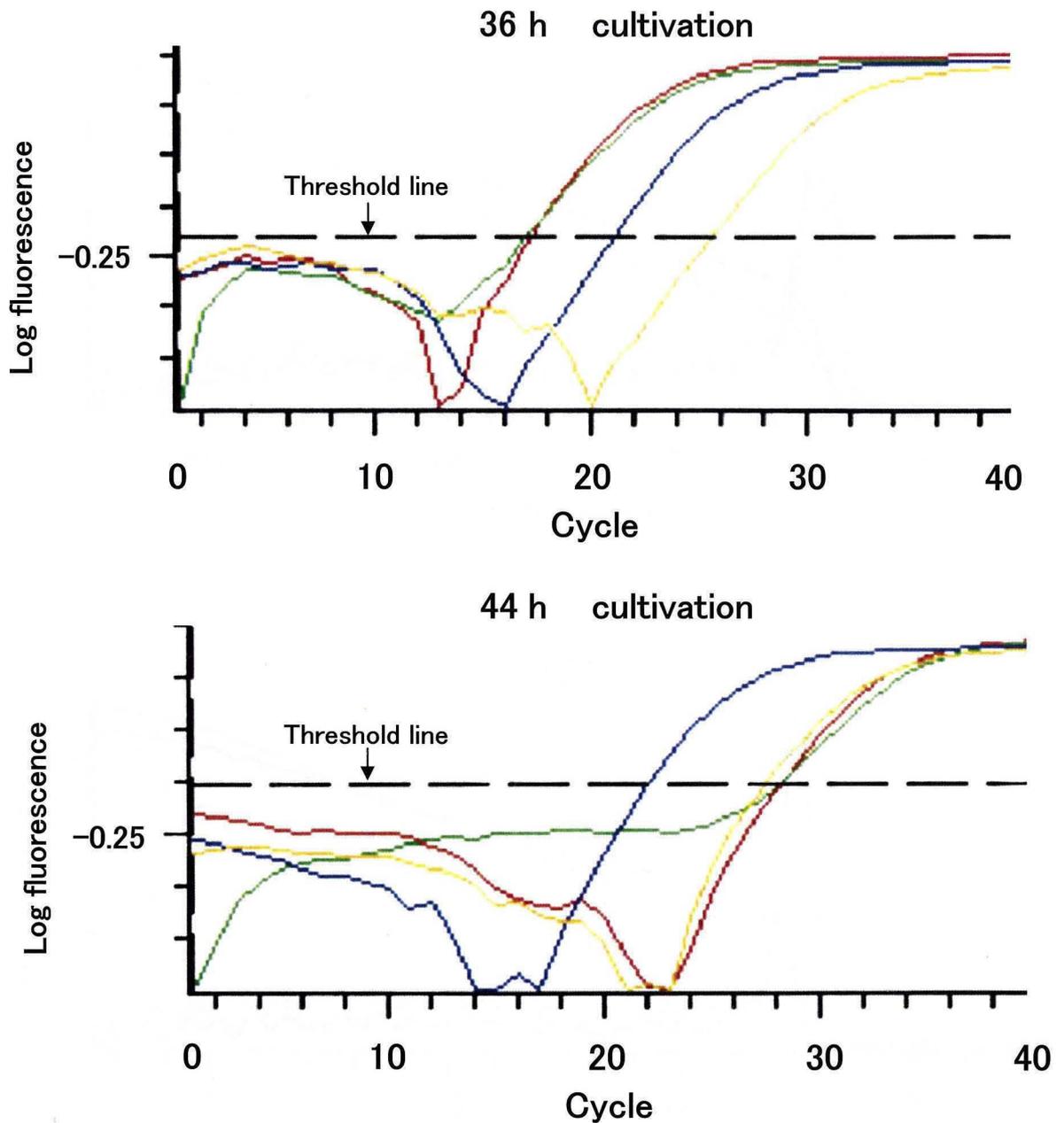


Fig. 6-2 Real-time PCR fluorescence data graph (2)

(Quantity of glucoamylase and  $\beta$ -tubulin mRNA in *Ginka* strain and G-4 strain)

- |  |  |
|--|--|
| <span style="color: red;">—</span> <i>Ginka</i> strain (glaB)      | <span style="color: blue;">—</span> G-4 strain (glaB)      |
| <span style="color: green;">—</span> <i>Ginka</i> strain (tubulin) | <span style="color: yellow;">—</span> G-4 strain (tubulin) |

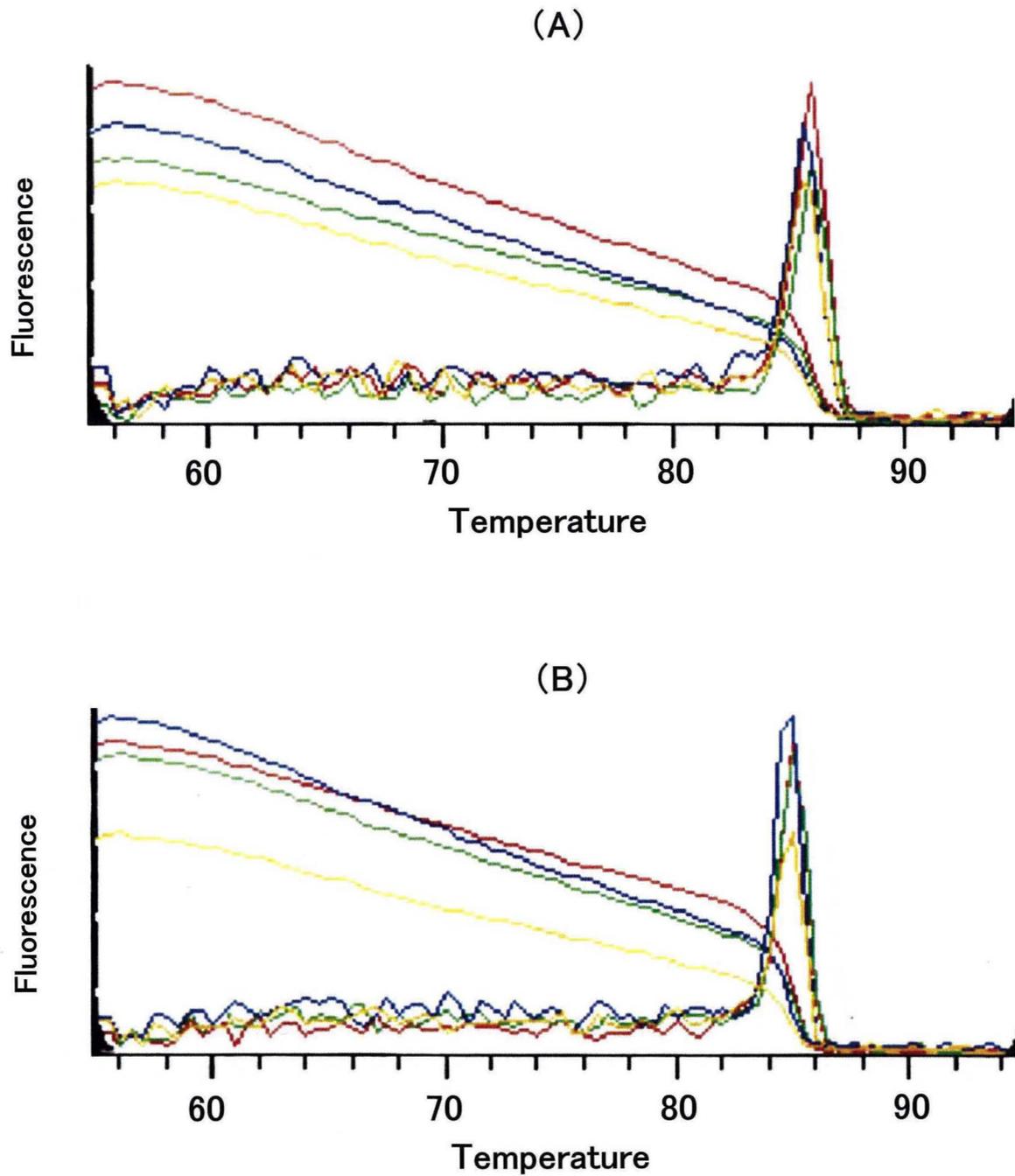


Fig. 6-3 Melting curve of real-time PCR products using primers for glucoamylase(A) and  $\beta$ -tubulin(B) genes in mutant strains and parent strains cultivated for 36 h

- *Hikami-type* strain
- *Ginka* strain
- H-1 strain
- G-4 strain

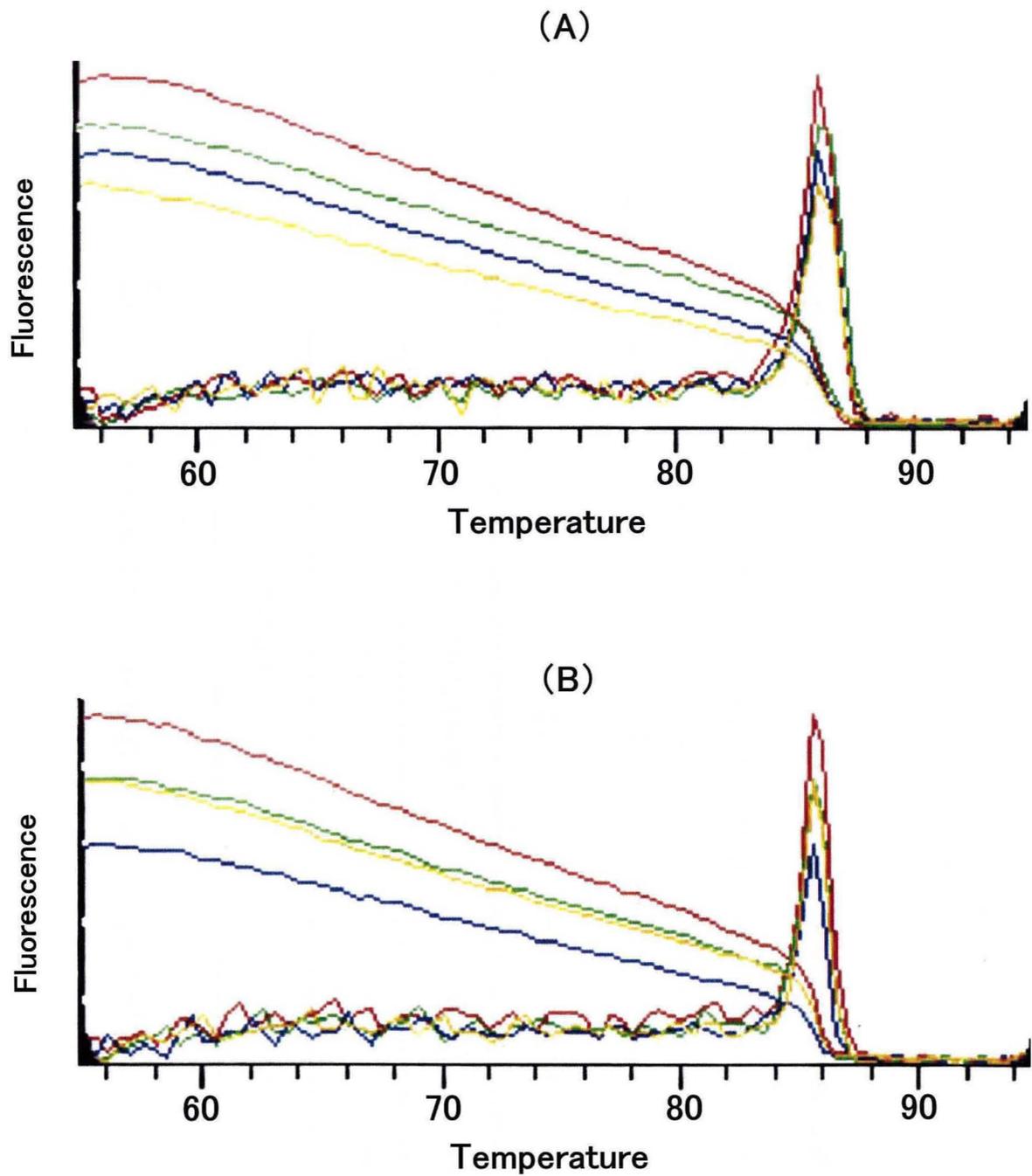


Fig. 6-4 Melting curve of real-time PCR products using primers for glucoamylase (A) and  $\beta$ -tubulin (B) genes in mutant strains and parent strains cultivated for 44 h

- |  |   |
|--|---|
| <span style="color: red;">—</span> <i>Hikami-type</i> strain | <span style="color: blue;">—</span> <i>Ginka</i> strain |
| <span style="color: green;">—</span> H-1 strain              | <span style="color: yellow;">—</span> G-4 strain        |

Table 6-1 Transcription level of *glbB* in H-1 strain and *Hikami-type* strain

Cultivation time	H-1 strain		<i>Hikami-type</i> strain		Expression level ratio			
	$Ct(m)^{\times 1}$	$\Delta Ct(m)$	$Ct(p)^{\times 2}$	$\Delta Ct(p)$				
(h)	glucoamylase	$\beta$ -tubulin	glucoamylase	$\beta$ -tubulin				
36	22.53	26.74	-4.21	20.51	22.98	-2.47	-1.74	3.3
44	20.39	24.85	-4.46	23.77	26.91	-3.14	-1.32	2.5

※1 : Threshold cycle of glucoamylase gene and  $\beta$ -tubulin gene in mutant (H-1 strain)

※2 : Threshold cycle of glucoamylase gene and  $\beta$ -tubulin gene in parent strain (*Hikami-type* strain)

Table 6-2 Transcription level of *glaB* in G-4 strain and *Ginka* strain

Cultivation time  (h)	G-4 strain			<i>Ginka</i> strain			$\Delta \Delta Ct$	Expression level ratio
	$Ct(m)^{\ast 1}$		$\Delta Ct(m)$	$Ct(p)^{\ast 2}$		$\Delta Ct(p)$		
	glucoamylase	$\beta$ -tubulin		glucoamylase	$\beta$ -tubulin			
36	21.81	26.51	-4.70	17.96	18.03	-0.07	-4.63	24.8
44	21.51	27.90	-6.39	27.98	29.90	-1.92	-4.47	22.2

※1: Threshold cycle of glucoamylase gene and  $\beta$ -tubulin gene in mutant (G-4 strain)

※2: Threshold cycle of glucoamylase gene and  $\beta$ -tubulin gene in parent strain (*Ginka* strain)

### III. 考察

リアルタイムPCRによって、個体培養麹における両変異株と親株の *glaB* 遺伝子からの mRNA 発現量の定量解析を行い、両変異株は *glaB* 遺伝子の初期鋳型量が親株よりも多いことを明らかにした。各培養時期を通して変異株 H-1 株は親株氷上タイプ株の約 2.5~3 倍、変異株 G-4 株は親株吟香株の約 22~25 倍の mRNA が *glaB* 遺伝子から発現された。この結果と、さらに第 4 章において両変異株の精製グルコアミラーゼの比活性は約 750 U/mg で親株の精製グルコアミラーゼの比活性約 760~800 U/mg と変わらないことが明らかになっていることから（第 4 章 Table 4-1~4-4）、H-1 株と G-4 株は酵素自体の変異によって活性が上昇したのではなく、転写段階でグルコアミラーゼの発現量が増加したことにより、グルコアミラーゼ活性が高くなったことを示唆している。第 2 章 Table 2-1 に示すように、H-1 株は固体培養麹における実際のグルコアミラーゼ活性が約 3.5 倍に増加しており、mRNA 発現量の増加の割合とほぼ一致していた。一方 G-4 株固体培養麹はグルコアミラーゼ活性が約 4.4 倍に増加しているが、これは mRNA 発現増加量の 5 分の 1 程度の増加量であり、mRNA 発現量と活性が比例していなかった。この理由としては、(1) G-4 株のグルコアミラーゼ遺伝子の mRNA の代謝回転が速くて翻訳される前に壊れてしまった、(2) 翻訳速度が遅くて大量に発現された mRNA を翻訳しきれていない、(3) 翻訳後にタンパク質分解を受けた、(4) タンパク質輸送を担う糖鎖が変異した影響でうまく菌体外に分泌されなかった等、様々な可能性が考えられる<sup>65)</sup>。

*A. oryzae* の *glaB* 遺伝子は固体培養した場合にのみ特異的に大量発現することが明らかにされているが、レポーター遺伝子によるプロモーター解析により、*glaB* 遺伝子のプロモーターは、特に培地の水分活性を低下させたり、培養温度を高温で行ったり、菌糸伸長に障害を与えることなどによって発現誘導されること

がわかっている<sup>66)</sup>。それらの固体培養条件での高発現には *glaB* プロモーター領域の中の熱ショック因子 (5'-AGAAT-3') と GC-rich 配列 (GC box) が必須であり、特に GC-rich 配列の置換によって固体培養での誘導発現が完全に欠落することから、GC-rich 配列が最も重要な制御因子 (*cis* 因子) である可能性が示唆されている<sup>67,68)</sup>。この両方の制御因子を含む領域をプロモーターに多コピー導入することによって、固体培養でのプロモーター活性が4倍以上に高められることが報告されている<sup>69,70)</sup>。本研究の両変異株は *glaB* プロモーター領域中のそれらの *cis* 因子や未知の重要な制御因子部分に変異が起こったか、または *cis* 因子に結合する *trans-regulatory factor* に変化があったことにより、グルコアミラーゼが高発現されたのではないかと推察される。

## 第7章 総括

これまで取得された清酒麹菌の人工変異株は、グルコアミラーゼとチロシナーゼの活性が常に連動して高活性化され、人工変異による褐変しないグルコアミラーゼ高活性菌株の育種は困難であると考えられてきた。本研究は実用株として清酒醸造に利用することを目的に低褐変性のグルコアミラーゼ高活性麹菌株を人工変異により育種開発し、取得した変異麹株の清酒醸造における適性や生産するグルコアミラーゼの特徴、構造及び発現量について研究を行った。

既存の麹菌株に紫外線照射して得られたグルコアミラーゼ高活性変異株の大半は、これまでの知見と同様に高いチロシナーゼ活性を示したが、チロシナーゼ活性が低い変異株として H-1 株を取得することが出来た。H-1 株はスクリーニング変異株の中で唯一チロシナーゼ活性が親株と変わらずに低活性に抑えられており、グルコアミラーゼ活性だけが親株の約 3.5 倍に増加していた。さらに、H-1 株は他の変異株と比べてもかなり高い G/A 比を示すことから、H-1 株の酵素バランスは液化よりも糖化が優位であり、デンプンの糖化力が強いことを明らかにした。また、チロシナーゼ高活性変異株の固体培養麹の摩砕抽出液は著しい褐変がみられたが、H-1 株の固体培養米麹の摩砕抽出液は長期間保存しても褐変が起こらず低褐変性であることを明らかにした。

H-1 株と、比較対照としてチロシナーゼ高活性変異株 G-4 株を選抜して、実地スケールでの製麹試験と清酒醸造試験を行い、実用可能性の検討を行った。製麹された両変異株の米麹は簡易製麹と同様にグルコアミラーゼ活性が高く、H-1 株麹はチロシナーゼ低活性で、他方 G-4 株は活性が高く、実地スケールで製造した麹においても酵素活性の特性が保持されていることを明らかにした。変異株 H-1

株と G-4 株の米麴 1 g 当たりの菌体量は親株の氷上タイプ株と吟香株の菌体量よりも 1 mg 以上少なかった。麴菌の菌体に含まれる不飽和脂肪酸が酵母による香気成分の生成を著しく抑制するため、吟醸酒醸造においては菌体量が少ないことが望ましいことが吉沢らによって報告されている<sup>71)</sup>。このことは、両変異株は香気成分が要求される高級酒の製造に適していることを示唆している。

両変異株の麴で仕込んだもろみはグルコース濃度が親株と比べて高く推移し、得られた生成酒のカプロン酸エチル生成量は親株の生成酒よりも明らかに多かった。このことから、グルコアミラーゼ活性が高い変異株麴によって香気成分の高い芳醇な生成酒が醸造されることが示唆される。また、H-1 株による醸造後の酒粕はほとんど褐変が見られず、目的とする低褐変性を備えていることが実地レベルで確認された。一方 G-4 株を用いた場合、H-1 株で醸造するよりも多量のカプロン酸エチルが生成されたが、得られた酒粕は強く褐変が現れた。

以上のことから、変異株 H-1 株の高グルコアミラーゼ活性と低チロシナーゼ活性は、清酒醸造実地レベルにおいても再現性があり安定した性質であることから酒粕を褐変させない実用的に優れた菌株であると考えられる。

変異株がグルコアミラーゼ高活性となった要因を明らかにするために、H-1 株と G-4 株の固体培養米麴からグルコアミラーゼを精製して、諸性質を検討した。両変異株グルコアミラーゼの比活性はいずれも約 750~800 U/mg で親株と同等であったが、SDS-PAGE 分析による推定分子量は 70~95 kDa であり、親株グルコアミラーゼ推定分子量 (65~95 kDa) とわずかに異なることを明らかにした。これらは、両変異株グルコアミラーゼが一次構造や糖鎖の不均一性に変化があるものの、活性に重大な影響を与えるような大きな変異は起こっていないことを示唆している。また、親株と変異株のグルコアミラーゼのこれらの特徴は、秦らによって報告されている *A. oryzae* の固体培養時に発現するグルコ

アミラーゼの比活性及び分子量とかなり類似していた<sup>51)</sup>。両変異株は、グルコアミラーゼ遺伝子 *glaB* からの mRNA 発現量が親株よりもかなり増加しており、H-1 株は約 2.5~3 倍、G-4 株は約 22~25 倍に高発現していることを明らかにした。さらに、精製したグルコアミラーゼタンパク質量から求めた両変異株 1 g あたりのグルコアミラーゼ生産量は親株の場合よりも 2~3 倍多くなっていることから、両変異株はグルコアミラーゼの比活性が高くなったのではなく、転写発現が高まって生成量が増加したことによってグルコアミラーゼ高活性になったと考えられる。

変異株グルコアミラーゼは 40°C 以上での熱安定性がわずかに低かった。両変異株グルコアミラーゼは構成アミノ酸の組成が親株グルコアミラーゼと異なり、特に糖鎖の結合部位を構成するアスパラギン酸とセリンがかなり少なかった。これらのアミノ酸ほどではないが、糖鎖の結合部位を構成するもう一つのアミノ酸、スレオニンも両変異株グルコアミラーゼで少なくなっていることから、糖鎖結合モチーフが減り糖鎖量が少なくなっている可能性が考えられる。これは、糖鎖が関わっているとされる熱安定性が両変異株グルコアミラーゼで低下していることから裏付けられる。両変異株グルコアミラーゼの糖鎖は親株グルコアミラーゼ糖鎖と比べてコア構造マンノース当たりの GlcNAc とガラクトースの割合が半分以下で、明らかに少なかった。変異株の G-4 株は H-1 株と比べてグルコアミラーゼ糖鎖のマンノース当たりの GlcNAc とガラクトースの割合が少なかったことから、G-4 株グルコアミラーゼの方が糖鎖は短い、または少ないと考えられる。G-4 株グルコアミラーゼは H-1 株より  $T_m$  値がわずかではあるが低く、その可能性は高い。さらに、親株グルコアミラーゼと異なり、複合型糖鎖に対して作用できない Endo H 酵素で両変異株グルコアミラーゼ糖鎖は完全に脱糖鎖された。これらのことから、変異株グルコアミラーゼの糖鎖

は変異によって明らかな変化が生じ、複合型から混成型に変わったと考えられる。

*A. oryzae* は、2つの異なるグルコアミラーゼ遺伝子 *glaA*<sup>72)</sup> と *glaB*<sup>50)</sup> を持っていて、それぞれの遺伝子から性質の全く違うグルコアミラーゼを生産することが報告されている<sup>51,73)</sup>。両遺伝子の発現特性は、種々の培養条件下で全く異なり、*glaA* 遺伝子は主に液体培養でのみ発現され<sup>74-78)</sup>、*glaB* 遺伝子は液体培養では抑制されるが固体培養で大量に発現される<sup>66,79)</sup>。チロシナーゼ遺伝子もまた2つの異なる遺伝子 *melO*<sup>80)</sup> と *melB*<sup>81)</sup> 遺伝子が存在していて、同様に *melO* 遺伝子は液体培養で優先的に発現され<sup>82)</sup>、*melB* 遺伝子は固体培養で大量に発現されることが報告されている。この類の遺伝子セットが *A. oryzae* の EST 解析においてくつかみつかっており<sup>83,84)</sup>、*A. oryzae* は様々な培養条件に適合する遺伝子のセットを持つことで、その時々々の培養条件に最適な遺伝子を選んでいるものと推測されている<sup>85)</sup>。このグルコアミラーゼやチロシナーゼでみられる遺伝子セットの培養条件による切換は、共通の転写発現制御機構によって行われている可能性が示唆されており<sup>86)</sup>、これまでに人工変異によって得られてきた高グルコアミラーゼ活性変異株はおそらくその共通の制御機構に変異を受けたために同時にチロシナーゼも高発現したのではないかと考えられる。しかし、本研究で得られた H-1 株は両酵素の挙動が異なり、グルコアミラーゼのみ高発現していることから、共通の制御機構には関連しない別の未知な転写制御因子に変異が起こっている可能性が考えられる。このことは、チロシナーゼ低活性で糖化力のより強い優れた清酒麹菌株を育種開発する上でグルコアミラーゼ高発現の機構解明に重要な役割を持つ菌株であると考えられる。

以上の結果を総合すると、本研究で育種したグルコアミラーゼ高活性変異株は香気成分の高い高級酒を醸造するのに優れており、特に酒粕が褐変しない H-1

株は実用菌株としての有用性が高いと考えられる。H-1 株はグルコアミラーゼ高活性に変異することにより、1)比活性は変わらないが、転写段階でグルコアミラーゼが高発現して菌体当たりの生成量が多くなったこと、2)グルコアミラーゼのアミノ酸組成が変化しており、そのため糖鎖の結合部位が少なく、また分岐鎖が短くなった可能性があること、3) グルコアミラーゼの糖鎖構造が変化したこと、4) 熱変性による残存活性において、グルコアミラーゼの熱安定性が低下したこと、5)チロシナーゼ活性は親株と同じ低活性であったこと、を一連の実験で明らかにした。H-1 株のこれらの特徴を模式的に Fig. 7-1 に示す。これまで形質転換でしか得られなかったグルコアミラーゼとチロシナーゼが連動しない麹菌変異株の人工変異による育種開発に本研究で初めて成功することができた。

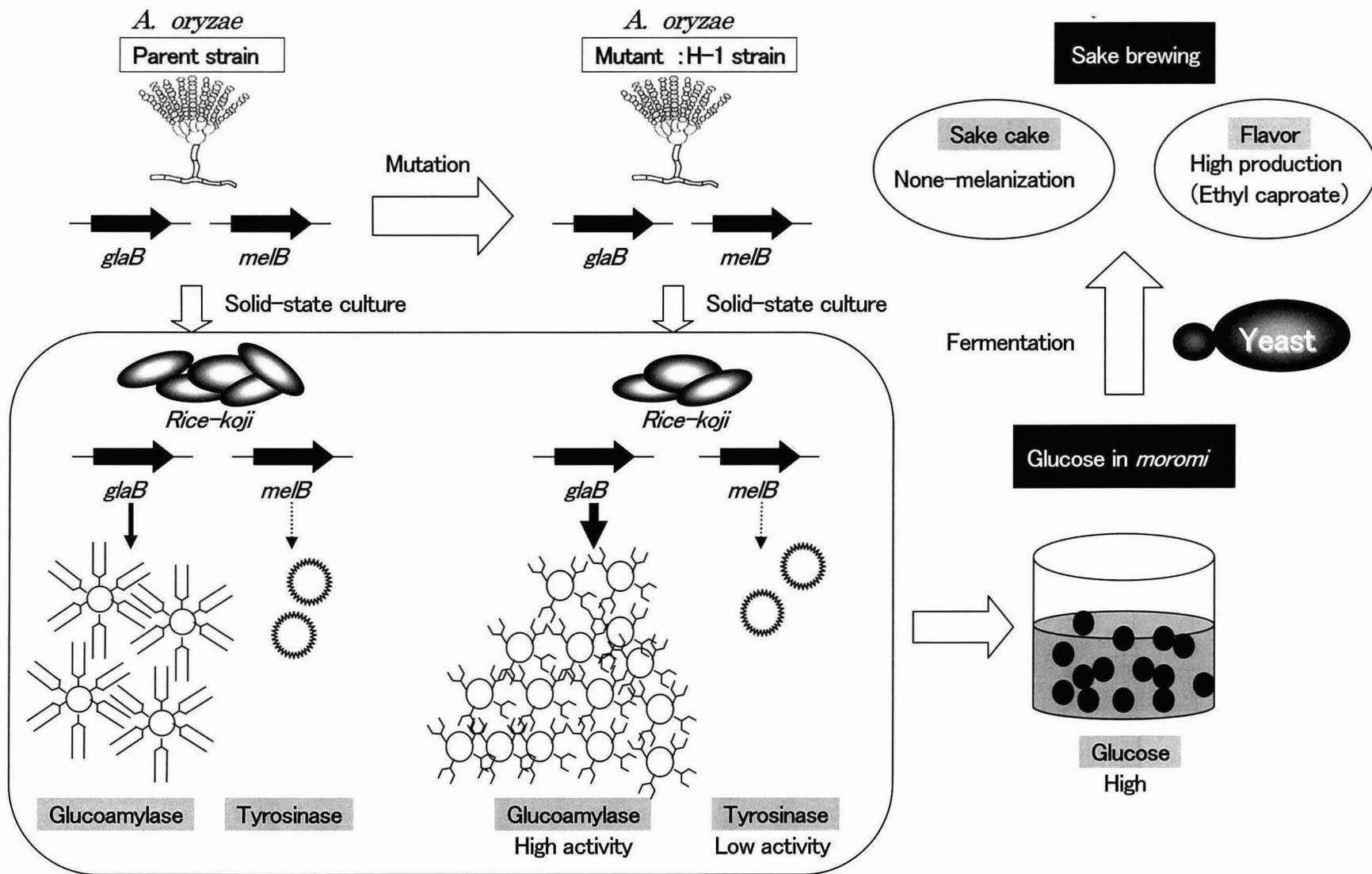


Fig. 7-1 Diagrammatic representation of the role of *A. oryzae* mutant strain (strain H-1) possessing high glucoamylase activity and low tyrosinase activity in the sake brewing

## 要約

本研究は、実用株として清酒醸造産業に利用することを目的に人工変異ではこれまで得られていなかった低褐変性の高グルコアミラーゼ活性麹菌株を人工変異によって育種開発し、取得した変異株の清酒醸造における適性や生産するグルコアミラーゼの特徴、構造及び発現量について研究を行ったものである。

### I. 低褐変性のグルコアミラーゼ高活性変異株の育種

親株とする5種類の *A. oryzae* 既存菌株に紫外線照射して変異株を取得し、生育が良好でデンプン分解能力の高い変異株を14菌株選抜した。 $\alpha$ 米を原料とした簡易製麹法により造った麹のグルコアミラーゼ活性はいずれの菌株も親株と比べて2~5倍高かった。加えて、ほとんどの菌株がグルコアミラーゼ活性の増加にほぼ比例してチロシナーゼ活性が上昇した。その中でH-1株のみがチロシナーゼ活性は親株と変わらず低く、グルコアミラーゼ活性は3.5倍であった。これとは対照的にG-4株は両酵素活性が14株中最大で、グルコアミラーゼとチロシナーゼ活性は親株と比べて、それぞれ4.4倍、36.3倍であった。ほとんどの変異株はチロシナーゼ活性が高いために麹摩砕抽出液は褐変したが、H-1株の固体培養麹の摩砕抽出液は褐変がみられなかった。以上の結果から、低褐変性、高グルコアミラーゼ活性菌株としてH-1株を、比較対照としてチロシナーゼ活性の高いG-4株を選抜した。

## II. 低褐変性、高グルコアミラーゼ活性変異株を用いた製麴試験及び清酒醸造試験

両変異株の麴の温度経過は順調に推移したが、温度上昇の立ち上がりが親株とは若干異なった。H-1 株は親株よりも温度の立ち上がりが遅く、緩やかな温度上昇を示し、菌糸の生育が蒸し米にまわるのがやや遅れ気味であった。G-4 株は親株よりも温度上昇が早い立ち上がりを示し、他の菌株よりも蒸し米への菌糸のまわりが早かった。グルコアミラーゼ活性は親株の氷上タイプ株と吟香株の米麴と比べて変異株 H-1 株と G-4 株の米麴は 2 倍以上高かった。同時に糖化力全体 (Saccharifying activity) や G/A 比に関しても、変異株米麴は親株米麴よりも 2 倍以上高い値を示した。また、G-4 株米麴のチロシナーゼ活性は、H-1 株より 14 倍高かった。両変異株米麴は親株米麴よりも菌体量が麴 1 g 当たり約 1 mg 少なく、菌体外及び全タンパク質量 (菌体内タンパク質を含む) は 1.5~2 倍多かった。両変異株米麴で仕込んだもろみは最後までグルコース濃度が高く、生成酒のカプロン酸エチル生成量はいずれも親株米麴で醸造した生成酒よりも多かった。H-1 株米麴で醸造した酒粕に褐変は見られなかったが、チロシナーゼ活性の高い G-4 株で醸造した酒粕は褐変がみられ、実地レベルで実証された。以上の結果から、グルコアミラーゼ高活性で酒粕が褐変しない H-1 株は香气成分の高い芳醇な酒を醸造するうえで実用的に優れた麴菌株であることが示唆される。

## III. グルコアミラーゼの精製と諸性質の解明

両変異株、H-1 株と G-4 株の精製グルコアミラーゼの分子量は電気泳動度から 70~95 kDa と推定され、両親株の推定分子量と若干異なっていたが、比活性は両変異株と親株のグルコアミラーゼで大きな違いはなかった。しかし、両変異株のグルコアミラーゼの熱安定性は親株よりも低く、G-4 株のグルコアミラーゼは

20min、H-1 株グルコアミラーゼは 40min の 40℃加熱処理で 40%以上の残存活性が認められた。しかし、両変異株と親株のグルコアミラーゼの  $T_m$  値はほとんど同じであった。また、菌体 1 mg 当たりの精製グルコアミラーゼのタンパク質量は親株に対して H-1 株が 3.1 倍、G-4 株が 2.2 倍多かった。以上の結果から、変異株のグルコアミラーゼ活性の増加は比活性の上昇ではなく、菌体当たりのグルコアミラーゼの生成量が増加したことによると考えられる。

#### IV. グルコアミラーゼの構造解析

変異株 H-1 株と G-4 株のグルコアミラーゼは、糖鎖の結合モチーフを構成するセリン及びスレオニンの組成量が親株グルコアミラーゼよりも少なかった。親株と変異株のグルコアミラーゼの糖鎖は、マンノースとガラクトース及び GlcNAc から構成され、それらの各単糖の組成量は、いずれの菌株の糖鎖もマンノースの割合が少なく、主にガラクトースと GlcNAc で占められた。この糖鎖はハイマンノース型ではなく、複合型か混成型であると考えられる。両変異株グルコアミラーゼの糖鎖は親株の糖鎖と比べてマンノース当たりのガラクトースと GlcNAc が少ないことから各分岐鎖が短いことが推察される。また、変異株の G-4 株グルコアミラーゼの糖鎖は H-1 株グルコアミラーゼの糖鎖と比べてマンノース当たりの GlcNAc とガラクトースの割合が少なかったことから、G-4 株グルコアミラーゼの方が糖鎖はより短いと考えられる。さらに、両変異株グルコアミラーゼは Endo H 処理によって脱糖鎖されたが、親株グルコアミラーゼは脱糖鎖されなかったことから、両変異株グルコアミラーゼの糖鎖は混成型に変化したと推測される。

## V. 変異株のグルコアミラーゼ発現量解析

親株と変異株のグルコアミラーゼ遺伝子からの転写発現量を比較検討するためにリアルタイム PCR による mRNA 発現量の定量解析を行った。mRNA 発現量はそれぞれの親株に対して H-1 株は約 2.5~3 倍、G-4 株は約 22~25 倍多く発現された。この結果から、H-1 株と G-4 株は転写段階でグルコアミラーゼの発現量が増加したことにより、グルコアミラーゼ活性が高くなったことが示唆される。

本研究により、これまで形質転換でしか育種できなかったチロシナーゼ活性の低い高グルコアミラーゼ活性変異株を人工変異で初めて取得することが出来た。

## 引用文献

- 1) H. Narahara, Y. Koyama, T. Yoshida, S. Pichangkura, R. Ueda and H. Taguchi: Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol.*, **60**, 311-319 (1982)
- 2) 村上英也編：麴学，日本醸造協会 (1985)
- 3) 秦洋二：清酒醸造におけるグルコアミラーゼの働きと遺伝子解析，日本農芸化学会誌. **71** (10) , 1024-1027 (1997)
- 4) 峰時俊貴，北本勝ひこ：清酒醸造における麴の働きと遺伝子解析，日本農芸化学会誌. **71** (10) , 1018-1023 (1997)
- 5) 北本勝ひこ：麴および麴菌を分子生物学的に理解する（総説）．醬研, **27** (5) , 223-231 (2001)
- 6) 五味勝也：清酒用麴菌の遺伝子操作技術．醸協, **95** (7) , 494-502 (2000)
- 7) I. Shibuya, K. Gomi, Y. Iimura, K. Takahashi, G. Tamura and S. Hara : Molecular cloning of the glucoamylase gene of *Aspergillus shirousamii* and its expression in *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.*, **54** (8) , 1905-1914 (1990)
- 8) I. Shibuya, G. Tamura, T. Ishikawa and S. Hara : Characteristics of *koji* prepared from the transformant of *Aspergillus oryzae* with the glucoamylase gene of *Aspergillus shirousamii* and its utilization for sake-brewing. *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 415-417 (1992)
- 9) 中田佳幸，森下めぐみ，橋本忠明，辻 安信：醤油麴菌キシラン分解活性低下変異株の育種と淡口醤油への応用．醸協, **94** (4) , 346-351 (1999)
- 10) 井口：日本農芸化学会誌. **25**, 495 (1951)

- 11)井口：日本農芸化学会誌. 29, 73 (1955)
- 12)H. Sekine, S. Nasuno and N. Iguchi : *Agr. Biol. Chem.*, 33, 1477 (1969)
- 13)飯塚, 山口：日本農芸化学会誌. 26, 71 (1952)
- 14)飯塚, 新井：日本農芸化学会誌. 35, 1218 (1961)
- 15)柏木豊, 山口加奈子, 栗原洋子, 鈴木聡, 秋田修, 町田雅之, 小山泰二, 山口庄太郎, 五味勝也, 阿部敬悦, 竹内道雄, 小林哲夫, 堀内裕之, 北本勝ひこ：麴菌の発現遺伝子の大規模解析. 醤研, 30 (4) , 135-141 (2004)
- 16)秋田修：麴菌ゲノム解析への取組み—EST 解析から始まったプロジェクトの進展— 醸協, 96 (1) , 14-20 (2001)
- 17)原昌道, 管間誠之助：清酒麴菌有用変異株の開発 (1) . 醸協, 70 (3) , 169-173 (1975)
- 18)五味勝也：麴菌のアミノ酸要求株の取得法. 醸協, 84 (7) , 465-470 (1989)
- 19)H. Murakami, M. kawai, S. Ueno, T. Takegoshi and T. Ohi : The study of kojic oxidases. *J. Brew. Soc. Jpn.*, 53, 87-92 (1958)
- 20)T. Ohba, H. Murakami and S. Hara : Identification of L-Dopa and Protocatechuic acid as main precursor of pigment of brown rice-*koji*. *Agr. Biol. Chem.*, 35 (5) , 674-681 (1971)
- 21)大場俊輝, 村上英也, 原昌道, 加藤明彦：米麴の褐変に関する研究 (第3報) エーテル可溶性の褐変前駆物質について. 醸協, 66 (1) , 71-75 (1971)
- 22)大場俊輝, 村上英也, 原昌道, 志水伸一, 備前次雄：米麴の褐変に関する研究 (第4報) 醸造行程中の褐変前駆物質の消長. 醸協, 66 (9) , 897-901 (1971)
- 23)大場俊輝, 原昌道, 管間誠之助, 村上英也：米麴の褐変に関する研究 (第5報) 褐変色素前駆物質 L-ドーパの酵素的生成. *J. Ferment. Technol.*, 50 (7) , 481-485 (1972)

- 24)大場俊輝, 原昌道, 管間誠之助, 村上英也: 米麴の褐変に関する研究 (第6報) 米麴チロシナーゼと麴菌体チロシナーゼとの性質の比較. *J. Ferment. Technol.*, 50 (10) , 704-709 (1972)
- 25)大場俊輝, 佐藤和夫, 鹿毛政史, 原昌道, 管間誠之助: 米麴チロシナーゼの簡易測定法と酵素生産条件の検討. 醸協, 69 (1) , 56-58 (1974)
- 26)M. Nakamura, T. Nakajima, Y. Ohba, S. Yamauchi, Byung Rho LEE and E. Ichishima : Identification of copper ligands in *Aspergillus oryzae* tyrosinase by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.*, 350, 537-545 (2000)
- 27)高橋美由紀, 北村靖則, 原山文徳, 下坂誠, 岡崎光雄: 麴菌における形質転換系の開発と実用株育種への応用. 信州味噌研究所報告, 38, 8-30 (2003)
- 28)注解編集委員会編: 第四回改正国税庁所定分析法注解. 日本醸造協会 (1993)
- 29)加藤拓, 下飯仁, 伊藤清: 麴菌細胞壁への酵素のトラップ. 醸協, 100 (5) , 355-361 (2005)
- 30)K. Iwano, K. Fukuda, S. Shiinoki and T. Shimada : The properties of various enzymes of *shochu koji* (*Aspergillus kawachii*). *J. Brew. Soc. Jpn.*, 81, 490-494 (1986)
- 31)今井泰彦: 麴中のグルコアミラーゼ活性測定法. 醸協, 90 (11) , 823-927 (1995)
- 32)今井泰彦, 徳武昌一, 山次信幸, 鈴木勝: 麴中のグルコアミラーゼ活性測定法. 醸協, 91 (1) , 51-57 (1996)
- 33)鈴木英之, 今井泰彦, 鈴木勝: 清酒麴中の酸性カルボキシペプチダーゼ活性の新規測定法. 醸協, 94 (7) , 588-592 (1999)
- 34)E. Ichishima, H. Maeba, T. Amikura and H. Sakata : Multiple forms of protyrosinase from *Aspergillus oryzae* and their mode of activation at pH 3.0. *Biochim. Biophys. Acta*, 786, 25-31 (1984)

- 35)五味勝也, 岡崎直人, 田中利雄, 熊谷知栄子, 井上博, 飯村穰, 原昌道: 麴菌細胞壁溶解酵素を用いた米麴中の菌体量の測定. 醸協, 82 (2), 130-133 (1987)
- 36)春日正史: 醤油麴菌体量の簡便測定法. 醸協, 94 (2), 122-125 (1999)
- 37)今井泰彦, 徳武昌一, 山次信幸, 鈴木勝: 麴中のグルコアミラーゼ活性測定法. 醸協, 91, 51-57 (1996)
- 38)藤井史子, 尾崎健二, 神田晃敬, 浜地正昭, 布川弥太郎: 市販酵素剤を利用した麴菌体量簡易測定法. 醸協, 87 (10), 757-759 (1992)
- 39)春日正史, 今井泰彦, 竹澤啓介, 堀内達雄, 藤井三治: 醤油麴菌体量の簡便測定法. 醬研, 24 (1), 29-34, (1998)
- 40) M. M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254 (1976)
- 41)N. J. Nelson: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153, 375-380 (1944)
- 42)栗山一秀, 芦田晋三, 斉藤義幸, 秦洋二, 杉並孝二, 今安聰: 清酒に関する酵素の研究 VII もろみにおけるカプロン酸エチル生成に対する酵母と麴菌の役割. 醱酵工学, 64 (4), 253-259 (1986)
- 43)村中文人, 岩間直子, 斉藤知明, 殿内暁夫, 赤田辰治, 武田潔: カプロン酸エチル高生産株を用いたリンゴ搾り粕からのフレーバーアルコール生産. 醸協, 101 (9), 711-716 (2006)
- 44)U. K. Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685 (1970)
- 45)M. E. Taylor and K. Drickamer (監訳: 西村紳一郎, 門出健次): Introduction to Glycobiology (糖鎖生物学入門). 化学同人, 1-115 (2005)

- 46)日本生化学編：新生化学実験講座第3巻 糖質 I 糖タンパク質（上）．東京化学同人, 95-161（1990）
- 47)R. M. Zacharius, T. E. Zell, J. H. Morrison and J. J. Woodlock : Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **30** (1) , 148-152 (1969)
- 48)寺田弘 編集：電気泳動法 基礎と実験. 廣川書店, 255-305 (1988)
- 49)M. F. Chapin and J. F. Kennedy (監訳：川崎敏祐) : Carbohydrate analysis — a practical approach— (糖質分析の実験マニュアル) . 廣川書店, 151-216 (1995)
- 50)Y. Hata, H. Ishida, E. Ichikawa, A. Kawato, K. Sugunami and S. Imayasu : Nucleotide sequence of an alternative glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Gene*, **207**, 127-134 (1998)
- 51)Y. Hata, H. Ishida, Y. Kojima, E. Ichikawa, A. Kawato, K. Sugunami and S. Imayasu : Comparison of two glucoamylases produced by *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (*Koji*) and in submerged culture. *J. Ferment. Bioeng.*, **84**, 532-537 (1997)
- 52)J. H. Pazur, B. Liu, S. pyke and C. R. Baumrucker : The Distribution of carbohydrate side chains along the polypeptide chain of glucoamylase. *J. Protein. Chem.*, **6** (6) , 517-527 (1987)
- 53)M. Goto, M. Tsukamoto, I. Kwon, K. Ekino and K. Furukawa : Functional analysis of O-linked oligosaccharides in threonine/serine-rich region of *Aspergillus* glucoamylase by expression in mannosyltransferase-disruptants of yeast. *Eur. J. Biochem.*, **260**, 596-602 (1999)

- 54)A. L. Tarentino, C. M. Gomez and T. H. Plummer. Jr : Deglycosylation of asparagines-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry*, **24** (17) , 4665-4671 (1985)
- 55)T. H. Plummer. Jr and A. L. Tarentino : Purification of the oligosaccharide-cleaving enzymes of *Flavobacterium meningosepticum*. *Glycobiology*, **1** (3) , 257-263 (1991)
- 56)F. Maley, R. B. Trimble, A. L. Tarentino and T. H. Plummer. Jr : Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal. Biochem*, **180** (2) , 195-204 (1989)
- 57)P. Robbins, et al : Primary structure of the *Streptomyces* enzyme endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H. *J. Biol. Chem.*, **259** (12) , 7577-7583 (1984)
- 58)H. Nishibe and N. Takahashi : The release of carbohydrate moieties from human fibrinogen by almond glycopeptidase without alteration in fibrinogen clottability. *Biochim. Biophys. Acta*, **661** (2) , 274-279 (1981)
- 59)A. L. Tarentino and T. H. Plummer.Jr : Oligosaccharide accessibility to peptide:N-glycosidase as promoted by protein-unfolding reagents. *J. Biol. Chem.* , **257** (18) , 10776-10780 (1982)
- 60)M. Goto, E. Kuwano, W. Kanlayakrit and S. Hayashida : Role of the carbohydrate moiety of a glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. *kawachi* in the digestion of raw starch. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59** (1) , 16-20 (1995)
- 61)K. Fukuda, Y. Teramoto and S. Hayashida : The Hyperdigestion of raw starch by a carbohydrate-rich glucoamylase from a protease- and glycosidase-negative mutant of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* F-2035.

- Biosci. Biotech. Biochem.*, 56 (1) , 8-12 (1992)
- 62)K. N. Neustroev, A. M. Golubev, L. M. Firsov, F. M. Ibatullin, I. I. Protasevich and A. A. Makarov : Effect of modification of carbohydrate component on properties of glucoamylase. *FEBS Letters*, 316 (2) , 157-160 (1993)
- 63)<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>
- 64)M. Tominaga, Yun-Hae Lee, R. Hayashi, Y. Suzuki, O. Yamada, K. Sakamoto, K. Gotoh, and O. Akita : Molecular Analysis of an inactive aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB strains. *Appl. Environ. microbiol.*, 72 (1) , 484-490 (2006)
- 65)K. Iwashita : Recent studies of protein secretion by filamentous fungi (Review) . *J. Biosci. Bioeng.*, 94 (64) , 530-535 (2002)
- 66)H. Ishida, Y. Hata, E. Ichikawa, A. Kawato and K. Suginami : Regulation of the glucoamylase-encoding gene (*glaB*) , expressed in solid-state culture (*Koji*) of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Bioeng.*, 86, 301-307 (1998)
- 67)H. Ishida, Y. Hata, A. Kawato, Y. Abe, K. Suginami and S. Imayasu : Identification of functional elements that regulate the glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Curr. Genet.*, 37, 373-379 (2000)
- 68)H. Ishida, Y. Hata, A. Kawato, Y. Abe and Y. Kashiwagi : Isolation of a novel promoter for efficient protein production in *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 68 (9) , 1849-1857 (2004)
- 69)H. Ishida, Y. Hata, A. Kawato and Y. Abe : Improvement of the *glaB* promoter expressed in solid-state fermentation (SSF) of *Aspergillus oryzae*.

- Biosci. Biotech. Biochem.*, 70 (5) , 1181-1187 (2006)
- 70)T. Minetoki, H. Tsuboi, A. Koba and K. Ozeki : Development of high expression system with the improved promoter using the *cis*-acting element in *Aspergillus* species (Review) . *J. Biol. Macromol.*, 3 (3) , 89-96 (2003)
- 71)吉沢淑, 石川雄章:清酒醸造における脂質の動向と香気エステル生成への影響. 醗酵工学, 63 (2) , 161-173 (1985)
- 72)Y. Hata, K. Tsuchiya, K. Kitamoto, K. Gomi, C. Kumagai, G. Tamura, and S. Hara : Nucleotide sequence and expression of the glucoamylase-encoding gene (*glaA*) from *Aspergillus oryzae*. *Gene*, 108, 145-150 (1991)
- 73)秦洋二, 石田博樹 : 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) のグルコアミラーゼ遺伝子に関する研究. 生物工学会誌, 78 (4) , 120-127 (2000)
- 74)T. Nakamura, Y. Maeda, N. Tanoue, T. Makita, M. Kato and T. Kobayashi : Expression profile of Amylolytic Genes in *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 70(10), 2363-2370 (2006)
- 75)T. Minetoki, K. Gomi, K. Kitamoto, C. Kumagai and G. Tamura : Characteristic expression of three amylase-encoding genes, *agdA*, *amyB*, and *glaA* in *Aspergillus oryzae* transformants Containing multiple copies of the *agdA* genes. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59 (12) , 2251-2254 (1995)
- 76)T. Minetoki, C. Kumagai, K. Gomi, K. Kitamoto and K. Takahashi : Improvement of promoter activity by the introduction of multiple copies of the conserved region III sequence, involved in the efficient expression of *Aspergillus oryzae* amylase-encoding genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 459-467 (1998)
- 77)Y. Hata, K. Kitamoto, K. Gomi, C. Kumagai and G. Tamura : Functional

elements of the promoter region of the *Aspergillus oryzae glaA* gene encoding glucoamylase. *Curr. Genet.*, **22**, 85-91 (1992)

78) 峰時俊貴, 北本勝ひこ : 清酒用麹菌アミラーゼ遺伝子のプロモーター解析. 醸協, **95** (8), 560-568 (2000)

79) 秦洋二, 石田博樹 : 清酒麹菌の固体培養 (麹造り) で大量に発現するグルコアミラーゼ遺伝子について. 醸協, **93** (12), 922-931 (1998)

80) Y. Fujita, Y. Uraga and E. Ichishima : Molecular cloning and nucleotide sequence of the protyrosinase gene, *melO*, from *Aspergillus oryzae* and expression of the gene in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1261**, 151-154 (1995)

81) H. Obata, H. Ishida, Y. Hata, A. Kawato, Y. Abe, T. Akao, O. Akita and E. Ichishima : Cloning of a novel tyrosinase-encoding gene (*melB*) from *Aspergillus oryzae* and its overexpression in solid-state culture (rice koji) . *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 400-405 (2004)

82) H. Ishida, K. Matsumura, Y. Hata, A. Kwato, K. suginami, Y. Abe, S. Imayasu and E. Ichishima : Establishment of a hyper-protein production system in submerged *Aspergillus oryzae* culture under tyrosinase-encoding gene (*melO*) promoter control. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 131-137 (2001)

83) T. Akao, K. Gomi, K. Goto, N. Okazaki and O. Akita : Subtractive cloning of cDNA from *Aspergillus oryzae* differentially regulated between solid-state culture and liquid (submerged) culture. *Curr. Genet.*, **41**, 275-281 (2002)

84) M. Machida, K. Asai, M. Sano, T. Tanaka, T. Kumagai, G. Terai, K. Kusumoto, T. Arima, O. Akita, Y. Kashiwagi, K. Abe, K. Gomi, H. Horiuchi, K. Kitamoto, T. Kobayashi, M. Takeuchi, D. W. Denning, J. E. Galagan, W. C.

Nierman, Jiujiang Yu, D. B. Archer, J. W. Bennet, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, N. D. Fedorava, O. Gotoh, H. Horikawa, A. Hosoyama, M. Ichinomiya, R. Igarashi, K. Iwashita, P. R. Juvvadi, M. Kato, Y. Kato, T. Kin, A. Kokubun, H. Maeda, N. Maeyama, J. Maruyama, H. Nagasaki, T. Nakajima, K. Oda, K. Okada, I. Paulsen, K. Sakamoto, T. Sawano, M. Takahashi, K. Takase, Y. Terabayashi, J. R. Wortman, O. Yamada, Y. Yamagata, H. Anazawa, Y. Hata, Y. Koide, T. Komori, Y. Koyama, T. Minetoki, S. Suharnan, A. Tanaka, K. Isono, S. Kuhara, N. Ogasawara and H. Kikuchi : Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, **438** (7071) , 1157-1161 (2005)

85)K. oda, D. Kakizono, O. Ymada, H. Iefuji, O. Akita and K. iwashita : Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl. Environ. microbiol.*, **72** (5) , 3448-3457 (2006)

86)R. te Biesebeke, N. van Biezen, W. M. de Vos, C. A. M. J.. J. van den Hondel, and P. J. Punt : Different control mechanism regulate glucoamylase and protease gene transcription in *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67**, 75-82 (2005)

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、主指導教官として終始ご指導ご鞭撻を賜りました弘前大学農学生命科学部 武田潔教授、弘前大学農学生命科学部 宮入一夫教授に謹んでお礼申し上げます。本論文のご校閲とご教示を賜りました、岩手大学農学部 応用生物学科 若尾紀夫教授及び磯部公安教授、山形大学農学部生物生産学科 上木勝司教授に謹んでお礼申し上げます。また、本論文のご校閲とリアルタイム PCR 解析技術のご指導をして頂きました弘前大学農学生命科学部 殿内暁夫助教授に謹んでお礼申し上げます。

更に、育種用の麴菌株試料を分譲していただきました株式会社秋田今野商店、アミノ酸組成及び糖鎖組成の分析にご協力頂きました青森県工業総合研究センター 奈良岡哲志氏、内沢秀光氏に厚くお礼申し上げます。

最後に、本研究にあたり、数々のご協力を頂きました青森県工業総合研究センター弘前地域技術研究所生命科学研究部の皆様に、心よりお礼申し上げます。