



# 清酒のムレ香生成に関与する麹菌の新規酵素イソアミルアルコールオキシターゼに関する研究

山下, 伸雄

---

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2000-09-22

(Date of Publication)

2014-12-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2450

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002450>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



神戸大学博士論文

清酒のムレ香生成に関与する麹菌の新規酵素  
イソアミルアルコールオキシダーゼに関する研究

平成 12 年 8 月 7 日

山 下 伸 雄

## 目 次

序論	1
第1章 麹菌によるムレ香生成酵素の生産特性	4
第1節 序	4
第2節 液体培養における酵素の生産特性	5
第3節 酵素生産に与える炭素源の影響	8
第4節 酵素の供給源	10
第5節 要約と考察	12
第2章 ムレ香生成酵素の精製とその特性	14
第1節 序	14
第2節 酵素の安定化法の検討	14
第3節 酵素の精製	15
第4節 精製酵素の特性	20
第5節 酵素反応生産物の同定と酵素 (イソアミルアルコールオキシダーゼ) の命名	30
第6節 要約と考察	32
第3章 イソアミルアルコールオキシダーゼ遺伝子の解析	34
第1節 序	34
第2節 イソアミルアルコールオキシダーゼ遺伝子 のクローニング	34
第3節 イソアミルアルコールオキシダーゼ遺伝子の解析	41
第4節 イソアミルアルコールオキシダーゼ遺伝子高発現株 の創製	47
第5節 製麹工程における <i>mreA</i> の発現	51
第6節 <i>Aspergillus</i> 属における遺伝子ホモログの分布	54
第7節 要約と考察	56

第4章	イソアミルアルコールオキシダーゼ低生産性 麹菌変異株の創製	58
第1節	序	58
第2節	変異株の分離と特性	58
第3節	清酒醸造試験および生貯蔵における ムレ香発生の低減化	60
第4節	要約と考察	66
総括		67
要約		72
Summary	(英文要約)	75
参考文献		78
謝辞		82

## 序論

清酒の消費が長期低落傾向にある中において、新鮮な香りと味を特徴とする生酒関連商品（生酒，生貯蔵酒）は着実な愛好者層の広がりを示してきた。生酒および生貯蔵酒は、搾りたてのフレッシュな風味を消費者に届け、冷やして飲む形態を普及させることによって、清酒の新しい需要を掘り起こすことに成功した。また、生酒・生貯蔵酒は夏季における消費が大きいことから、四季醸造工場を有し、通年生産が可能な大手酒造メーカーの重要な商品となっている。

生酒および生貯蔵酒の最大の特長はフレッシュな風味にある。特に、生酒においてはその香りが重視される傾向が強く、生酒を製造する場合、原料米の精白度を高くし、発酵温度を通常より低めにコントロールすることによって、香りが高く淡麗な味わいをもつ酒質に仕上がるよう留意される。また、その風味特性を保持するため、短期間の貯蔵後、火入れと呼ばれる熱処理を行わずに出荷される。

一方、生貯蔵酒は一定期間、生の状態で貯蔵したのち、火入れを行い出荷される。そのため、生貯蔵酒は搾りたての清酒が持つ独特の風味を保ちながら、瓶詰め後の品質が安定するという特長を示す。また、生酒の状態で貯蔵する期間と貯蔵温度を調整することにより、各酒造メーカーが目的とする酒質の製品を生産することが可能である。

しかし、生酒の貯蔵においては、エタノール存在下で生育する火落ち菌による汚染と、生酒中の残存酵素による香味劣化の危険を伴う。これらの問題については、現在では限外濾過処理技術の進歩により、かなり改善された状況にある<sup>1-3)</sup>。しかし、そのための設備導入や運転に際して生ずるコストの大きさなどから、現段階では全国の酒造メーカーに十分普及されていない。したがって、貯蔵や流通段階において管理が不十分な場合、種々の品質劣化が発生する危険性が存在する。特に、常温で貯蔵を行う場合、非常に不快な臭いである「ムレ香」や、ふくらみのない単純な甘みが増加する「甘ダレ」と呼ばれる劣化が生じる<sup>4)</sup>。特にムレ香の発生は品質上の大きな問題とされる。伝統的な清酒製造技術の結集である吟醸酒においても、ムレ香が生じると品質が著しく劣化する。し

たがって、清酒業界においてムレ香の発生を防止することは生酒の品質を安定させる上で大きな課題である。

微生物に起因する酒類のオフフレーバー（劣化臭）については多くの報告がある。例えば、ビールにおいてはダイアセチルや2,3-ペンタジオンなどジケトン類<sup>5,6)</sup>に由来する「未熟臭」や4-ビニルグアイアコールなどに由来する「フェノール臭」<sup>7)</sup>が知られている。またブドウ酒においては、産膜性酵母の汚染に起因するアセトアルデヒドや揮発酸の発生が、ぶどう酒の香味を著しく劣化させることが知られている<sup>8)</sup>。

清酒においても、ダイアセチルに由来する「つわり香」<sup>9,10)</sup>、酢酸に由来する「酸臭」<sup>11)</sup>、アセトアルデヒドに由来する「木香様臭」<sup>12)</sup>などが報告されているが、いずれの場合も、発酵条件が至適化されていない場合に起こる酵母の異常な生理代謝や、腐造性細菌の汚染に起因するものであり、その発生機構は多分に複雑である。これに対して、ムレ香は糸状菌（麹菌）に由来すること、また、その発生機構は麹菌の生産する単一の酵素のみが関与する点でシンプルであり、他のオフフレーバーに比べて極めてユニークであると言える。

西村らは、生酒のムレ香とその発生防止に関する研究を行い、原因物質の同定<sup>13)</sup>、定量方法<sup>13)</sup>、官能閾値<sup>14)</sup>、生成機構<sup>15)</sup>、限外濾過処理による発生防止法<sup>3)</sup>などについて種々の検討を行った。その結果、ムレ香の原因物質はイソバレルアルデヒドが本体を成し、バレリアン酸エチルおよび1,1-ジエトキシ-3-メチルブタンの共存により、ムレ香が増強されることを示した。また、イソバレルアルデヒドは、清酒中に比較的多く含まれるイソアミルアルコールから酵素的酸化により生じることを明らかにした。さらに粗酵素レベルでの検討により、本酸化酵素はアルコールオキシダーゼに属するものと推定し、本酵素は麹菌 *Aspergillus oryzae* に由来することを示した<sup>16)</sup>。

真菌類起源のアルコールオキシダーゼに関しては多くの報告がある。特に、酵母の生産するアルコールオキシダーゼの研究が進んでおり、*Pichia pastoris*<sup>17)</sup>、*Candida boidinii* (*Kloeckera sp.*)<sup>18)</sup>、*Hansenula polymorpha*<sup>19)</sup>などのメタノール資化性酵母由来アルコールオキシダーゼの酵素学的諸性質はすでに、1970年代に明らかにされた。最近、同酵素をコー

ドする遺伝子がクローニングされ，分子生物学的研究成果も報告された<sup>20-22)</sup>．これらのアルコールオキシダーゼは，メタノール，エタノールなどの炭素数の少ない直鎖型アルキルアルコールに高い特異性を示し，反応速度は炭素数の増加とともに低下するという特性を示す．また，担子菌にも同様な特性を示すアルコールオキシダーゼの存在が報告されている<sup>23)</sup>．一方，*Candida* 属酵母<sup>24, 25)</sup> や *Aspergillus* 属糸状菌<sup>26)</sup> からは，炭素数 10 以上の長鎖直鎖型アルコールに作用するオキシダーゼが見いだされている．これまで報告されたアルコールオキシダーゼはすべて，主として直鎖型アルコールに作用し，分枝型アルコールに対しては低い活性しか示さない．また，アルコールを基質とする誘導酵素であり，細胞内酵素であることが明らかにされている．

本研究の対象である麹菌 *A. oryzae* 由来のアルコールオキシダーゼは，分枝型アルコールであるイソアミルアルコールに高い活性を示すなど，既知のアルコールオキシダーゼとは著しく異なる特異な酵素であることが示唆されていた<sup>16)</sup>．しかし，本酵素は微量にしか得られず，精製が困難であったため，その酵素学的諸性質は不明であった．

本研究では，本酵素を大量に取得し，精製標品を得ることによって，酵素化学的諸性質を明らかにするとともに，その遺伝子構造を解析することを目的とした．また，本遺伝子の発現を抑制するため，本酵素低生産株の育種を試みた．

本論文は序論，1～4 章，総括により構成される．第 1 章では，麹菌による本酵素の生産特性や大量取得のための供給源について述べる．第 2 章では，本酵素の単離・精製，精製酵素の特性を述べた後，イソアミルアルコールを基質にした場合の酵素反応生産物の同定について述べる．第 3 章では，本酵素をコードする遺伝子の麹菌ゲノムライブラリーからのクローニングと同遺伝子の解析と発現について述べる．また，*Aspergillus* 属における同遺伝子のホモログ分布を述べる．第 4 章では，本酵素の生合成を抑制した麹菌変異株の育種と，本株を用いて製造した清酒のムレ香の低減化について述べ，以上の結果を総括において総合的に考察する．

# 第1章 麹菌による「ムレ香」生成酵素の生産特性

## 第1節 序

第1章では、西村らによりムレ香生成酵素として報告された麹菌 *A. oryzae* 由来本酵素の生産特性について検討することを目的とする。

粗酵素レベルでの検討結果から、本酵素は清酒中の香气成分イソアミルアルコールを酸化し、ムレ香の本体であるイソバレルアルデヒドを生成することが報告されている。また、この酸化反応時に過酸化水素を発生することなどから<sup>27)</sup>、オキシダーゼ反応であることが予想されている (Fig. 1-1)。すなわち、本酵素はその反応特性からアルコールオキシダーゼに属すると考えられる。

従来報告されている酵母、糸状菌、担子菌に由来するアルコールオキシダーゼは、例外なく中性から弱アルカリ側に至適域、安定域を持つ細胞内酵素であり、酸性側では不安定である。一方、本酵素は清酒中のような酸性下において作用し、安定であることから、比較的安定な細胞外酵素であることが示唆された。そこで、本章ではまず、本酵素が細胞外に分泌されているか否かを液体培養により確認する。次に、基質であるイソアミルアルコールによる酵素の誘導性の有無や本酵素の生産に与える炭素源の影響を検討する。

さらに、本酵素を大量に得るため、麹菌由来の各種培養産物や生酒の限外濾過濃縮液を用いて、酵素の供給源を検討する。

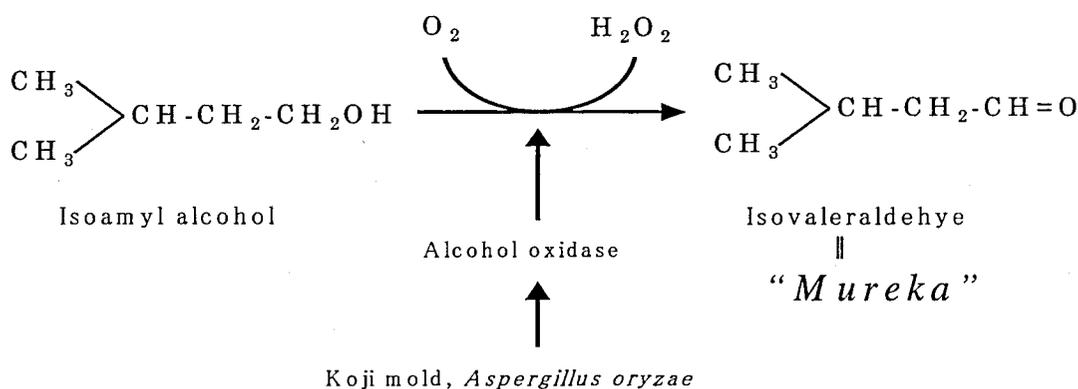


Fig. 1-1. Reaction of the *mureka* formation in non-pasteurized sake.

## 第2節 液体培養における酵素生産特性

### 【方法】

#### 1. 菌株，培地および培養条件

本研究では，白鶴酒造株式会社研究開発室で保存する実用清酒麹菌株 *A. oryzae* HL-1034 を使用した．完全培地として，PDA 培地（ポテト，デキストロース，寒天を含む）（Difco, Franklin Lakes, NJ, USA）または DPY 培地（2% (w/v) デキストリン-1% (w/v) ポリペプトン-0.5% (w/v) 酵母エキス）を使用した．麹菌株を PDA 斜面培地で 1 週間培養し，分生胞子の着生した段階で，同培地に 0.01% (v/v) Tween 80 溶液を加え，ボルテックスにて攪拌した．得られた分生胞子懸濁液を DPY 培地に，分生胞子が約  $2 \times 10^5$  個/ml・培地になるよう接種し，30℃で振とう培養（120 rpm）した．

#### 2. 粗酵素液の調製

培養液をガラスフィルター（3G-2）により濾過して回収した後，濾液を 20 mM 酢酸緩衝液（pH 4.5）（Buffer A）に対して 1 夜透析した．透析液を限外濾過膜（分画分子質量 10 kDa）を用いて 20 倍に濃縮し，粗酵素液とした．無細胞抽出液は次のように調製した．ガラスフィルターにより回収した菌体を濾紙を用いて十分脱水した後，-20℃で凍結した．凍結菌体を，乳鉢に注いだ液体窒素中で破碎し，1 mM のメルカプトエタノールを含む Buffer A を加えて攪拌した．本液を 5℃において， $2,900 \times g$  で 5 分間遠心分離して上清を回収した後，上清を Buffer A に対して 1 夜透析し，得られた透析液を粗酵素液とした．

#### 3. 酵素活性の測定

10 ml 容ヘッドスペースガスクロマトグラフィー用のバイアルに 0.2 M 酢酸緩衝液（pH 4.5）0.83 ml，Dimethyl sulfoxide に溶解した 2 M イソアミルアルコール 0.02 ml，粗酵素液 0.1 ml を加え，バイアルを密封した後，35℃（第 1 章の実験では，30℃）にて静置し，酵素反応を行った．2 時間後（第 1 章の実験では，72 時間後），100℃，2 分煮沸して酵素を失活させた後，内部標準として 200 ppm (mg/l) 3-ペンタノールのエタノール溶液を 0.05 ml を加え（終濃度 10 ppm），バイアル内で生成したイソバレルアルデヒドをヘッドスペースガスクロマトグラフィーにより定量した．ガスクロマトグ

ラフィーは以下のような分析条件で行った。分析装置は Model GC-17A ガスクロマトグラフ (島津製作所, 京都) を用い, 検出は FID により行った。キャリアガスはヘリウムを使用し, 流速は 0.47 ml/min であった。カラムは DB-5 fused silica capillary column (J & W, Folsom, CA, USA) を用いた。分析時のカラム温度は, 35°C で 15 分間保持した後, 1 分間あたり 25°C の割合で 240°C まで昇温させた。サンプル注入および検出器の温度はそれぞれ, 120°C および 280°C に設定した。バイアルを 90°C で 15 分間保温した後, スプリット比 1/10 にてサンプル 0.4 ml を注入した。1 時間に 1  $\mu$  mol のイソバレルアルデヒドを生成する酵素量を 1 unit と定義した。比活性は 1 mg のタンパク質あたりの unit 数とした。

#### 4. タンパク質の定量

プロテイン・アッセイキット (Bio-rad, Hercules, CA, USA) を用い, 牛血清アルブミン (Sigma, St. Louis, USA) を標準液としてタンパク質を定量した。

#### 5. 麹菌体重量の測定

ガラスフィルターで回収したペレット状の菌体を濾紙で十分脱水後, 80°C で 3 時間乾燥し, 重量を測定した。

### 【結果】

#### 1. 麹菌液体培養上清のイソバレルアルデヒド生成活性

麹菌液体培養上清を酵素液として用いた時, 酵素反応液におけるイソバレルアルデヒドの生成量を経時的に測定した結果を Fig. 1-2 に示す。酵素液の添加後, 96 時間まではイソバレルアルデヒド濃度の直線的な増加が認められた。一方, 熱処理した酵素液を添加した対照においては, イソバレルアルデヒドの増加ほとんど認められなかった。

#### 2. 本酵素の分泌性

Fig. 1-3A に示すように, 培養上清中の酵素活性は指数増殖期のかなり早い時期から認められ, 以後本菌の増殖に伴って増加した。本菌の無細胞抽出液においても活性が見られたが, その値は培養上清に比べてかなり少なかった。また, Fig. 1-3B に示すように, 比活性の比較においても培養上清の方が高い値であった。

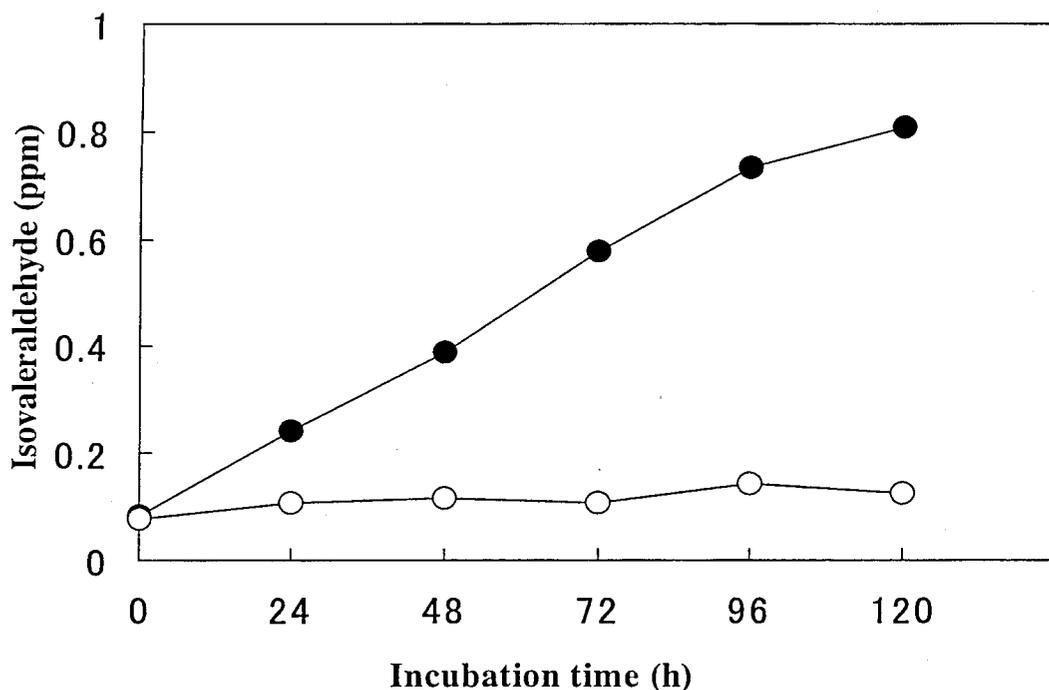


Fig. 1-2. Production of isovaleraldehyde from isoamyl alcohol by an enzyme in the culture supernatant of *Aspergillus oryzae*.

Crude enzyme sample: ●, non-heat treatment; ○, heat treatment at 100°C for 2 min. A crude enzyme sample was concentrated after the dialysis of the culture supernatant against 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.5), and the concentrated solution was added to the reaction mixture containing 0.2 M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 40 mM isoamyl alcohol in a 10-ml vial. Isovaleraldehyde produced was assayed every 24 h by head space gas chromatography.

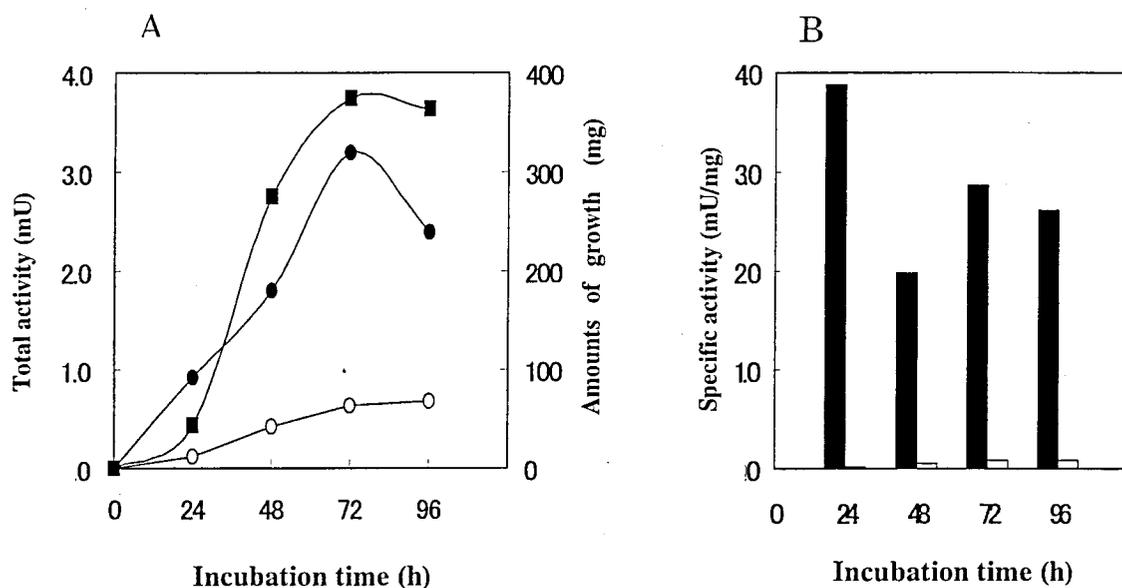


Fig. 1-3. Changes of an isovaleraldehyde-forming activity in the submerged culture of *A. oryzae*.

A, Time course of the total enzyme activities of culture supernatant and cell-free extract. Symbols: ■, amounts of growth; ●, total activity of culture supernatant; ○, total activity of cell-free extract. The sample from culture supernatant was prepared in the same manner as described in Fig. 1-2. The sample from cell-free extract was prepared by its dialysis against 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.5). B, Time course of the specific activities of culture supernatant and cell-free extract. closed bar, specific activity of culture supernatant; open bar, specific activity of cell-free extract.

### 第3節 酵素の生産に与える炭素源の影響

#### 【方法】

本章第2節の方法1で述べたDPY培地において、デキストリンの代わりに同濃度のグルコースおよびグリセロールで置き換えた培地を用いて、それぞれ30℃、2日間振とう培養した。培養上清より粗酵素液を調製し、活性を測定した。

酵素生産に与えるイソアミルアルコールの影響は、本菌を

30℃で60時間培養して、指数増殖期末期に達した段階でイソアミルアルコールを終濃度で0.01, 0.02, 0.05% (w/v)になるように培地中に添加することによって調べた。イソアミルアルコールを添加後、25℃で48時間培養した後、培養上清の総活性を測定した。

### 【結果】

酵素生産に与える炭素源の影響を Table 1-1 に示す。炭素源の相違は、本菌の生育量にはあまり影響を与えなかった。しかし、酵素の生産量においては相違が見られた。すなわち、グリセロールを炭素源とした時、最も高い酵素生産を示し、その値はデキストリンを炭素源として用いた場合の約3倍であった。また培養上清中の総タンパク量はデキストリンを炭素源とした培地において最も多かった。

酵素生産に与えるイソアミルアルコールの影響を Table 1-2 に示す。イソアミルアルコール添加後、24時間毎に培養上清中の活性を測定したが、イソアミルアルコールの添加量に関わらず、無添加の対照に比較して、活性の上昇は認められなかった。

Table 1-1. Comparison of enzyme productivity among different carbon sources

Carbon source	Mycelium (mg)	Total activity (mU)	Total protein (mg)	Specific activity (mU/mg)
2%(w/v) Dextrin	277	1.80	0.92	1.96
2% (w/v) Glucose	223	3.40	0.60	5.67
2%(w/v) Glycerol	241	5.28	0.52	10.2

Table 1-2. Effect of isoamyl alcohol on enzyme productivity

Isoamyl alcohol (%, w/v)	Total activity (mU)	
	24 h <sup>a</sup>	48 h
0	1.7	3.0
0.01	1.6	2.9
0.02	1.8	3.1
0.05	1.7	2.8

<sup>a</sup> Incubation time after the addition of isoamyl alcohol.

#### 第4節 酵素の供給源

##### 【方法】

##### 1. 米麴および粗酵素液の調製

米麴の調製は白米（日本晴，精米歩合 70%）150 g を用いてシャーレ内で行い，分生胞子を白米に接種後，VP-200 型プログラム付恒温恒湿機（ナガノ科学，大阪）にて培養した．32℃，相対湿度（RH）95%で 19 時間培養した後，35℃，RH 95%にて 6 時間培養した．さらに，38℃，RH 90 で 10 時間培養後，38℃，RH 85%で時間培養した．合計 45 時間培養した．出麴後，国税庁所定分析法によって酵素抽出液を調製した．この抽出液を Buffer A に対して 1 夜透析し，限外濾過膜（分画分子質量：10 kDa）で 20 倍に濃縮して粗酵素液とした．米麴の菌体量は麴菌体量測定キット（キッコーマン，野田）を用いて測定した．

##### 2. タカジアスターゼからの粗酵素液の調製

タカジアスターゼ原沫（三共，東京）を 5%（w/v）になるよう Buffer A に溶解し，2,900×g で 15 分遠心分離して得られた上清を 2 μm のメンブレンフィルターで濾過した．濾液を限外濾過膜（分画分子質量 10 kDa）で 10 倍濃縮し，粗酵素サンプルとした．

##### 3. 生酒の濃縮液の調製

白鶴酒造の清酒製造に使用する限外濾過装置（分画分子質量 30kDa）を用いて，火入れ前の新酒（原酒）を約 200 倍に濃縮し，濃縮液を粗酵素液として使用した．

##### 【結果】

Table 1-2 に示すように、試験したすべての酵素供給源において酵素活性が見いだされた。中でも、生酒の濃縮液は最も高い酵素活性を示した。米麴培養（固体培養）の場合、菌体量当たりの本酵素活性は液体培養に比較して 57 倍に達した。

Table 1-2. Evaluation of enzyme sources

Source	Activity (mU/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity	
			(mU/mg·protein)	(mU/mg·mycelia)
5 % (W/V) Takadiastase soln.	0.04	3.36	0.01	-
Culture supernatant <sup>a</sup>	0.04	0.02	2.00	0.0065
Rice koji extract <sup>b</sup>	0.71	0.15	7.83	0.37
UF-concentrated sake	61.51	6.39	9.62	-

<sup>a</sup> Supernatant was collected by centrifugation at  $2,900 \times g$  for 15 min of *A. oryzae* HL-1034 culture after incubation for 2 d.

<sup>b</sup> Extract was prepared by the National Tax Administration Agency prescript method.

## 第 5 節 要約と考察

麹菌 *A. oryzae* の液体培養上清中に、イソアミルアルコールからイソバレルアルデヒドを生成する酵素活性を見いだした。本酵素は、指数増殖期前期から培養上清中に活性が検出されること。全増殖期間において総活性、比活性とも、培養上清中の活性が無細胞抽出液より高い値を示したことから、本酵素は麹菌により細胞外に分泌生産されることがわかった。本酵素はアルキルアルコールに作用を示す分泌型のオキシダーゼとしては最初の報告例である。また、本酵素はイソアミルアルコール非存在下の培地でも構成的に生合成されることを見いだした。構成的に生合成されるアルコールオキシダーゼは、本研究以外では報告されていない。

酵素生産に与える炭素源の影響を調べた結果、グリセロール、グルコース、デキストリンの順で、高い酵素生産性を示した。Wakayama らは醤油麹菌 *Aspergillus soyae* による D-アミノ酸オキシダーゼの生産性を検討し、グリセロールが炭素源として最も有効であることを報告している<sup>29)</sup>。本酵素の生産性についても醤油麹菌の場合と同様、グリセロールが良好な炭素源であることがわかった。

本酵素を大量に得るため、酵素の供給源を検討した結果、生酒の濃縮液において最も高い酵素活性を見いだした。また、固体培養物である米麹の場合、菌体量当たりの本酵素生産量は液体培養した場合に比較して 57 倍に達した。一般に、麹菌由来の種々の酵素は、液体培養より固体培養において生産性が高くなることが報告されている<sup>30,31)</sup>。本酵素の場合も同様な傾向を見いだした。しかし、本酵素の生産量はアミラーゼやプロテアーゼなどの加水分解酵素に比べ、ごく微量であると考えられた。

また、生酒の濃縮液は最も高い酵素活性を示したことから、本濃縮液が酵素精製のための供給源として使用できることがわかった。特に、単位容量当たりの活性が、他の供給源に比べて際だって高かった。このことから、本酵素が限外濾過処理によりかなり効率的に分画、濃縮されていると考えられた。またこれらの結果から、本酵素が清酒中において比較的安定な状態で存在していること、酒粕画分に移行しにくい親水性のものであること、分子質量が 30 kDa より大きいタンパク質で

あることがわかった。

## 第 2 章 ムレ香生成酵素の精製とその特性

### 第 1 節 序

第 2 章では、イソアミルアルコールを基質としイソバレラルデヒドを生成する酵素の精製を行い、その酵素学的諸特性を明らかにすることを目的とする。

本酵素は比較的安定であったが、さらに安定化させるための条件を検討する。次に、生酒の限外濾過濃縮液を用いて各種のクロマトグラフィーにより本酵素の精製を行う。精製酵素の単一性を確認した後、その特性を検討する。本酵素は新規な酵素であることが予想されるため、酵素反応生産物を同定し、本酵素の反応機構を明らかにする。

また、精製酵素標品を清酒中に添加することにより、清酒中でイソバレラルデヒドが発生することを GC-MS 分析により確認する。

### 第 2 節 酵素の安定化法の検討

#### 【方法】

限外濾過濃縮液を Buffer A で透析置換した粗酵素液に、保護剤として終濃度 10% (v/v) グリセロールまたはエタノールを加え、4℃で 14 日間保存した。保存前後の酵素活性を相対値で比較した。

#### 【結果】

Table 2-2 に示すように Buffer A 中で 5℃、14 日間保存した場合、本酵素は特に保護剤を添加しなくても、グリセロールやアルコールを添加した場合と同様、顕著な活性の低下は見られなかった。したがって本酵素のカラム分画および活性画分の保存は pH 4.5 の 20mM 酢酸緩衝液中で行うことにした。

Table 2-2. Stabilization of the enzyme by the addition of organic solvents

	Remaining activity (%)	
	7 d <sup>a</sup>	14 d
None	95.4	92.1
10% (w/w) Glycerol	94.9	93.8
10% (w/w) Ethanol	95.0	91.8

<sup>a</sup> Storage period at 5°C.

### 第3節 酵素の精製

#### 【方法】

#### 1. 酵素精製

酵素精製における各種カラムクロマトグラフィー操作は5°C以下で行った。

#### (1) 生酒の限外濾過濃縮液からの粗酵素サンプルの調製

約200倍に濃縮した生酒の限外濾過濃縮液20 literにBuffer Aを80 liter加え、十分混和後、パイロットスケールの限外濾過濃縮装置（分画分子質量30 kDa, 神鋼パンテック, 加古川）を用いて10 literまで濃縮した。これに90 literのBuffer Aを加え、循環濾過しながら再度10 literまで濃縮した。この方法により、本酵素を総活性で原酒レベルの約400倍含むBuffer A溶液として得た。このうちの1 literを粗酵素液として以後のカラムクロマトグラフィーに供した。

(Fraction 1, 1 liter)

#### (2) SP-Toyopearl 550C 陽イオン交換クロマトグラフィー

Fraction 1の500 mlを、Buffer Aで平衡化したSP-Toyopearl 550C（東ソー, 東京）を充填したカラム（5.0×26 cm）にアプライした。1 literの同緩衝液でカラムを洗浄した後、0~0.2 M NaClを含む2 literの同緩衝液を用いてリニアグラジエント法により、流速2.5 ml/minで酵素を溶出した。各フラクション（20 ml/tube）の酵素活性およびタンパク質を測定した。高活性画分を集め0°C（非凍結）で保存した。この操作を2回行い、計2回分のクロマトグラフィーで得られた活性画分を次の疎水クロマトグラフィーに供した。

(Fraction 2, 390 ml)

### (3) Butyl-Toyopearl 650M 疎水クロマトグラフィー

Fraction 2 を限外濾過膜 (分画分子質量 10 kDa) にて 4 倍に濃縮し, 40% 飽和になるよう硫酸を加えた. 飽和溶液 100 ml を, 40% 飽和の硫酸を含む Buffer A で平衡化した Butyl-Toyopearl 650M (東ソー) を充填したカラム (2.5×42 cm) にアプライした. 40% 飽和の硫酸を含む Buffer A (400 ml) で洗浄した後, 800 ml の 40~0% 飽和の硫酸を含む Buffer A を用いてリニアグラジエント法により, 流速 1.5 ml/min で酵素を溶出した. 各フラクション (15 ml/tube) の酵素活性およびタンパク質を測定し, 高活性画分を集めた. (Fraction 3, 59 ml)

### (4) SP-Toyopearl 650S 陽イオン交換クロマトグラフィー

Fraction 3 を 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.3) に対して, 1 夜透析した. 透析内液を同緩衝液で平衡化した SP-Toyopearl 650S (東ソー) を充填したカラム (2.5×54 cm) にアプライした. 600 ml の同緩衝液で洗浄した後, 0~0.2 M NaCl を含む 900 ml の同緩衝液を用いてリニアグラジエント法により, 流速 1.2 ml/min で酵素を溶出した. 各フラクション (15 ml/tube) の酵素活性およびタンパク質を測定した. 最も高い活性を示したフラクション No. 62 を得た (Fig. 2-1).

(Fraction 4, 15 ml)

### (5) Toyopearl HW-55S ゲル濾過クロマトグラフィー

Fraction 4 を限外濾過膜 (分画分子質量 10 kDa) により 2 ml まで濃縮し, 0.2 M NaCl を含む Buffer A で平衡化した Toyopearl HW-55S (東ソー) を充填したカラム (2.5×93 cm) にアプライした. 同緩衝液を用いて流速 0.7 ml/min で酵素を溶出した. 各フラクション (4ml/tube) の酵素活性およびタンパク質を測定した. ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一のバンドを示したフラクションを回収した. (Fraction 5, 16 ml)

## 2. 電気泳動

### (1) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

Davis らの方法に基づいて<sup>32)</sup>, 5-20% (w/v) ポリアクリルアミド濃度勾配スラブゲル (NPG-520, アトー, 東京), 泳動用緩衝液 (25 mM Tris-192 mM glycine) を用いて, 20 mA/ゲルの条件で 1.5 時間泳動した. タンパク質の染色は 0.25%

(w/v) Coomassie brilliant blue R-250/メタノール-酢酸-水 (5:1:4) 溶液中で 2 時間染色後, メタノール-酢酸-水 (3:1:6) 溶液中で 1 夜脱色した.

## (2) SDS- PAGE

Laemmli の方法により<sup>33)</sup>, 5-20% (w/v) ポリアクリルアミド濃度勾配スラブゲル (SPG-520, アトー), Tris-glycine 泳動用緩衝液 (25 mM Tris-192 mM glycine-0.1% SDS) を用いて, 20 mA/ゲルの条件で 1.5 時間泳動した. 染色および脱色は, (1)で述べた方法によった.

## 【結果】

### 1. 酵素の精製

SP-Toyopearl 650S (Fig. 2-1), Toyopearl HW-55S (Fig. 2-2) による各クロマトグラムを示す. また, 各精製段階における酵素活性およびタンパク質量を Table 2-2 に示す. 最終調製酵素は 1.1% の収率で 29 倍に精製された. 最終調製酵素の比活性は 0.22 U/mg であった.

精製酵素をポリアクリルアミド電気泳動に供した結果, 1 本のバンドを示した (Fig. 2-3). また, SDS-PAGE においても 1 本の明瞭なバンド示した. これらの結果から, 最終調製酵素は単一であるとみなした.

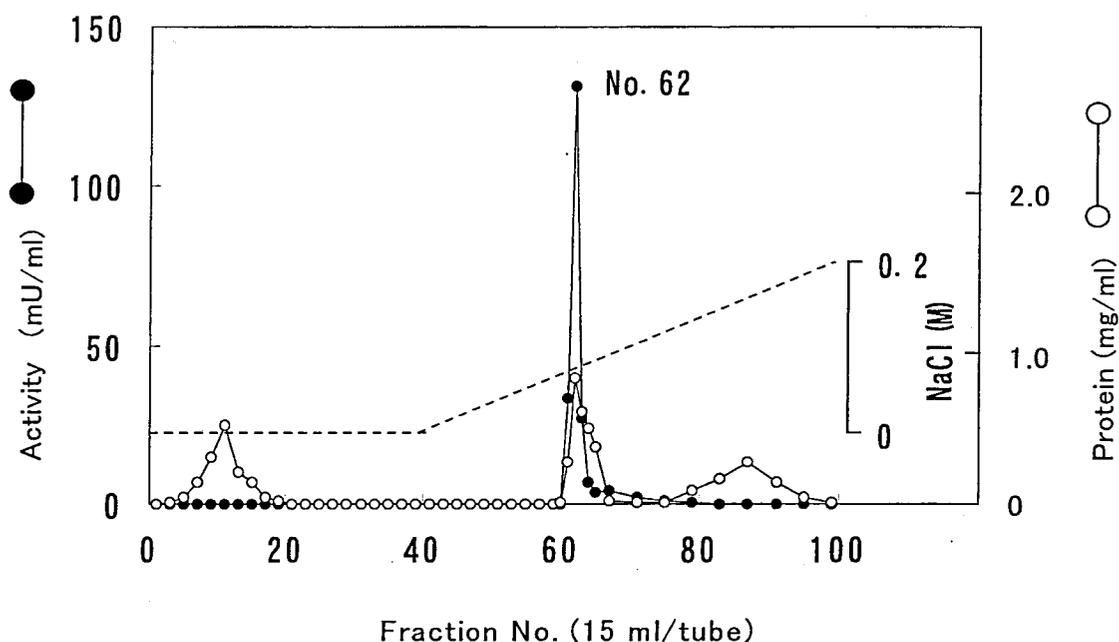


Fig. 2-1. Column chromatography of the enzyme on SP-Toyoperal 650S.

Symbols: -●-, activity; -○-, protein. Experimental condition of the chromatography are described in the text.

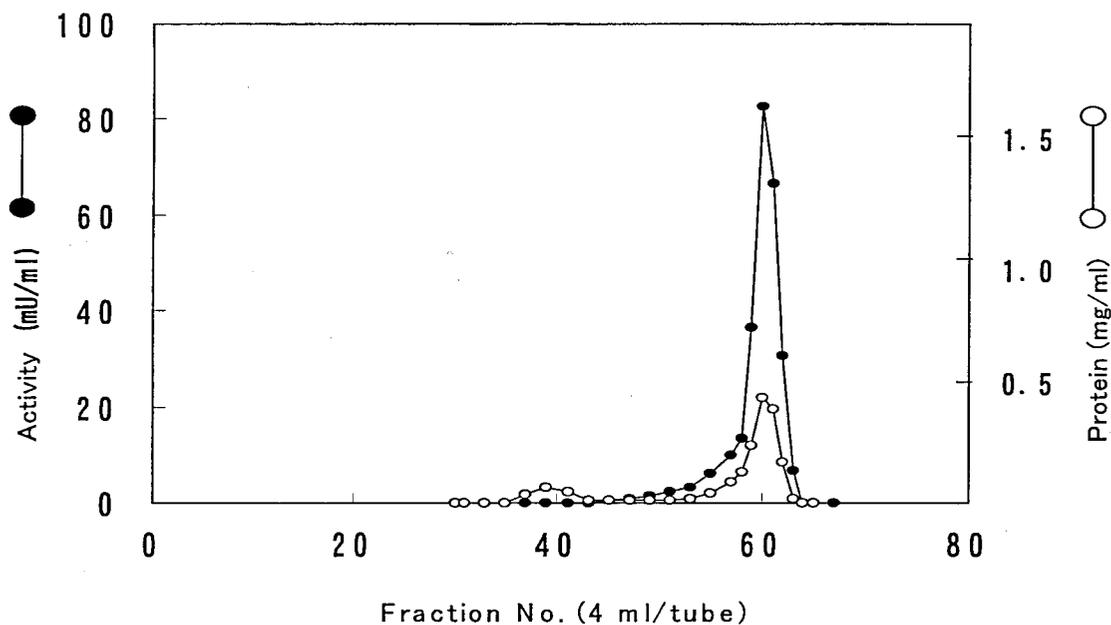


Fig. 2-2. Column chromatography of the enzyme on Toyopearl HW-55S.

Symbols: -●-, activity; -○-, protein. Experimental condition of the chromatography are described in the text.

Table 2-2. Summary of enzyme purification

Fraction	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
1: Crude enzyme	98	13,000	0.0075	1	100
2: SP-Toyopearl 550C	27	2,000	0.014	1.9	28
3: Butyl-Toyopearl 650M	12	120	0.10	13	12
4: SP-Toyopearl 650S	2	12	0.17	23	2.0
5: Toyopearl HW 55S	1.1	5	0.22	29	1.1

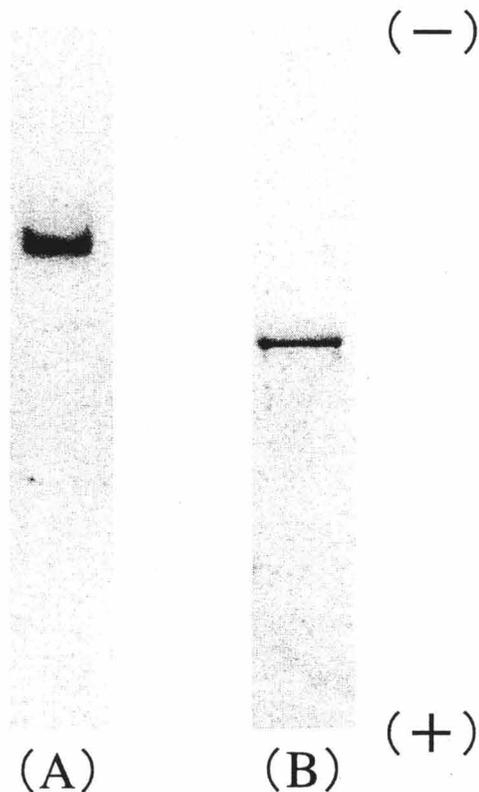


Fig. 2-3. Polyacrylamide (A) and SDS-polyacrylamide (B) gel electrophoresis of the purified enzyme.

Experimental conditions of the electrophoresis are described in the text.

## 第4節 精製酵素の性質

### 【方法】

#### 1. pHおよび熱安定性

##### (1) 酵素活性に与える pH の影響

pH 3.0~8.0 は McIlvaine 広域緩衝液を用い, pH 8.5, 9.0 は, 同緩衝液に Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol) を加えて調製した.

##### (2) pH 安定性

各 pH の緩衝液に酵素を加え, 25℃で 24 時間処理した後, 残存活性を測定した. 緩衝液は, (1)で使用した緩衝液を用いた.

##### (3) 熱安定性

20~70℃にて 15 分間処理した後, 残存活性を測定した.

#### 2. 物理化学的性質

##### (1) SDS-PAGE による分子質量の測定

SDS-PAGE は本章第3節方法2によった. タンパク質分子質量マーカーは, 「第一」・II (第一化学薬品, 東京) 使用した. すなわち, ミオシン (分子質量 200 kDa),  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (116 kDa), 牛血清アルブミン (66,3 kDa), アルドラーゼ (42,4 kDa), カルボニックアンヒドラーゼ (30 kDa), ミオグロビン (17.2 kDa) であった.

##### (2) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたゲル濾過法による分子質量の測定

精製酵素 40  $\mu$ g を G-3000 SW<sub>XL</sub> プロテインカラム (0.78  $\times$  30 cm, 東ソー) にアプライし, 600E 型 HPLC システム (Waters, Milford, USA) を用いて行った. 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いて流速 0.7 ml/min でタンパク質を溶出した. タンパク質分子質量マーカーは, ゲル濾過スタンダード (Bio-rad) を使用した. すなわち, チログロブリン (670 kDa),  $\gamma$ -グロブリン (158 kDa), オボアルブミン (44 kDa), ミオグロビン (17 kDa) であった.

##### (3) 糖含量の測定

ペプチド *N*-グリコシダーゼ, エンド-*O*-グリコシダーゼ, シアリダーゼ A を含む複合酵素剤である GLYCOPRO DEGLYCOSYLATION KIT (Prozyme Inc., San Leandro, CA, USA) を用いて, 精製酵素の結合糖鎖を完全に除去した後,

SDS-PAGE を行い分子質量を測定した。糖鎖の除去前後の分子質量差から糖含量を算出した。また、糖含量はマンノースを標準物質としてフェノール-硫酸法によっても測定した。

#### (5) 等電点の測定

Multphor II 電気泳動システム (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いた。泳動用ゲルは Ampholine PAGplate (2.2% (w/v) Carrier ampholite, 同上) を使用した。泳動条件は、2,000 V 定電圧, 2.5 mA で 2.5 時間であった。pI マーカーとして、グルコースオキシダーゼ (pI 4.15), 大豆トリプシンインヒビター (4.55),  $\beta$ -ラクトグロブリン (5.20) を使用した。

#### (5) 吸収スペクトルの測定

300~600 nm における吸光度を DU-640 シングルビーム分光光度計 (Beckman, Fullerton, CA, USA) を用いて測定した。

#### (6) N-末端アミノ酸配列の分析

精製酵素約 70 pmol を Prosorb<sup>TM</sup> (PE Biosystems, Foster City, USA) を用いて、メーカーのプロトコールに基づき PVDF 膜に吸着させた。PPSQ-10 気相式プロテインシーケンサー (島津製作所) により分析した。

### 3. 触媒的性質

#### (1) 基質特異性

炭素数 C1~C10 の直鎖アルコールおよび C3~C6 の分岐鎖アルコールを用いて、西村らによって報告されたロイコパテントブルーバイオレット (LPBV)-ペルオキシダーゼ (POD) 法<sup>27)</sup> を一部改変して酵素活性を測定した。すなわち、50 mM PIPES-NaOH 緩衝液 (pH6.5) 1.132 ml, 20 mM LPBV

(Sigma) 0.012 ml, 5000 U/ml の POD (Sigma) 溶液 0.012 ml, 2 M の各アルコール (dimethyl sulfoxide 溶液) 0.024 ml から成る反応液に 40  $\mu$ g の酵素を含む溶液 0.02 ml を添加して、35°C で 1 時間反応させた。熱処理 (100°C, 2 分間) により反応を停止させ、639 nm における吸光度の増加により活性を比較した。

#### (2) 酵素活性に与える各種試薬の影響

酵素の活性に与える金属イオン、阻害剤等の影響を調べた。前項で述べた改変 LPBV-POD 法に基づいて行った。本酵素を

含む反応液に、終濃度が 1 mM になるように各種化合物を添加した。30℃で 5 分間反応した後、終濃度が 40 mM になるようにイソアミルアルコールを加えて、残存酵素活性を測定した。

## 【結果】

### 1. 一般的性質

#### (1) 酵素活性に与える pH の影響

本酵素は pH 4.5 において最も高い活性を示した。しかし、pH 3.0 以下および pH 6.5 以上では低い活性を示した (Fig. 2-4A)。

#### (2) pH 安定性

本酵素は pH 3.0~6.0 の緩衝液中において 90% 以上の残存活性を示した。しかし、pH 6.5 以上では急激に安定性が低下した (Fig. 2-4B)。

#### (3) 温度安定性

本酵素は 45℃ までは 95% 以上の活性を維持した。しかし 50℃ を越えると急激に不安定となり、65℃、15 分の処理では完全に失活した (Fig. 2-5)。

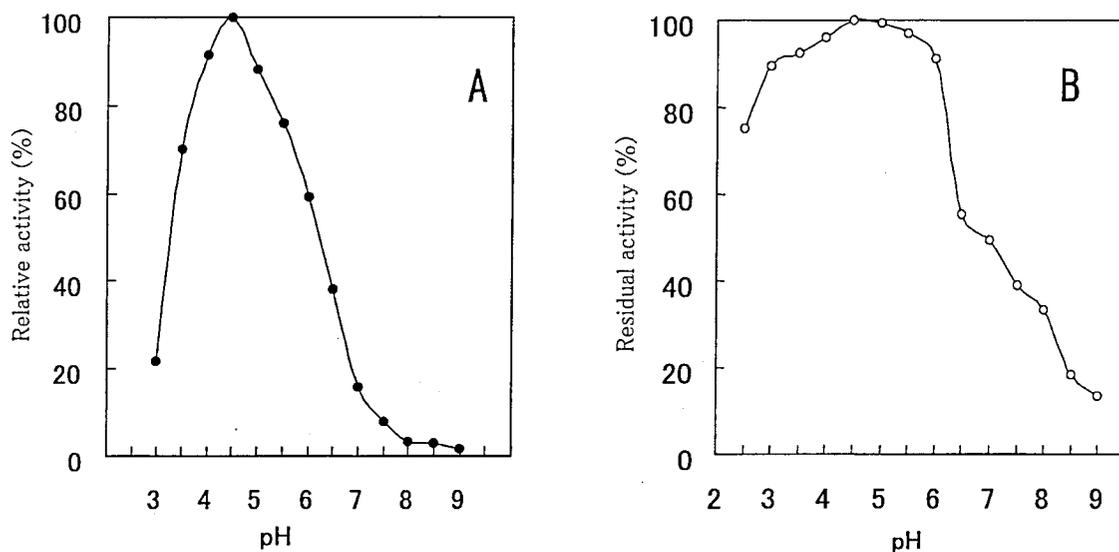


Fig. 2-4. Effects of pHs on the activity and stability of the enzyme

A, Optimum pH, the enzyme activity was measured in McIlvaine buffer (pH 3.0-8.0) and McIlvaine buffer+0.1 M Tris (pH 8.5-9.0). B, pH stability, after incubation at various pHs (pH 2.5-8.0: McIlvaine buffer, pH 8.5-9.0: McIlvaine buffer+0.1 M Tris) at 25°C for 24 h, each enzyme solution was adjusted to pH 4.5 and the residual activity was measured.

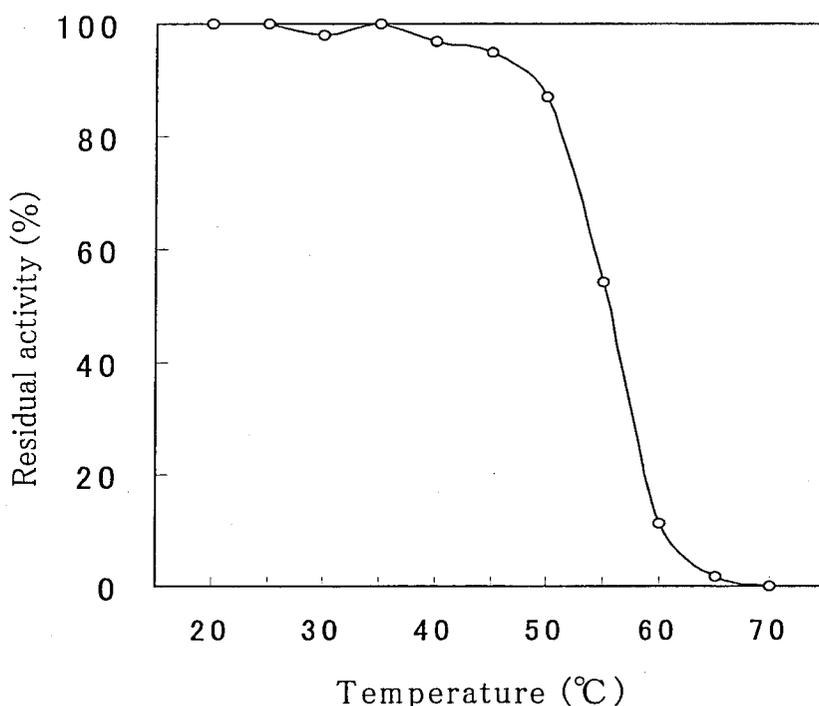


Fig. 2-5. Effects of temperature on the stability of the enzyme.

The residual activity was measured after the incubation of the enzyme in 0.2 M sodium acetate buffer (pH 4.5) at 20-70°C for 15 min.

## 2. 物理化学的性質

### (1) 分子質量

SDS-PAGEにより測定した本酵素の分子質量は 73 kDa であった (Fig. 2-6 A). また HPLC を用いたゲル濾過法では 87 kDa であり (Fig. 2-6 B), この結果から本酵素は単量体であることがわかった.

### (2) 糖含量

糖鎖分解酵素による糖鎖除去後, SDS-PAGEにより測定した本酵素の分子質量は 59 kDa であった (Fig. 2-6 A). 本法により算出された糖含量は 19.2% (w/w) であった. また, フェノール-硫酸法で測定した値は 21.8% (w/w) であった.

### (3) 等電点

本酵素の等電点は 4.61 であった (Fig. 2-7).

#### (4) 吸収スペクトル

本酵素溶液は測定した 300~600 nm においては 354 nm と 438 nm に吸収極大を示した (Fig. 2-8). 438 nm の吸収ピークは 50 mM (終濃度) ハイドロサルファイトナトリウムの添加により速やかに消失した.

#### (5) N末端アミノ酸配列

本酵素のN末端アミノ酸配列は ADSSS であった.

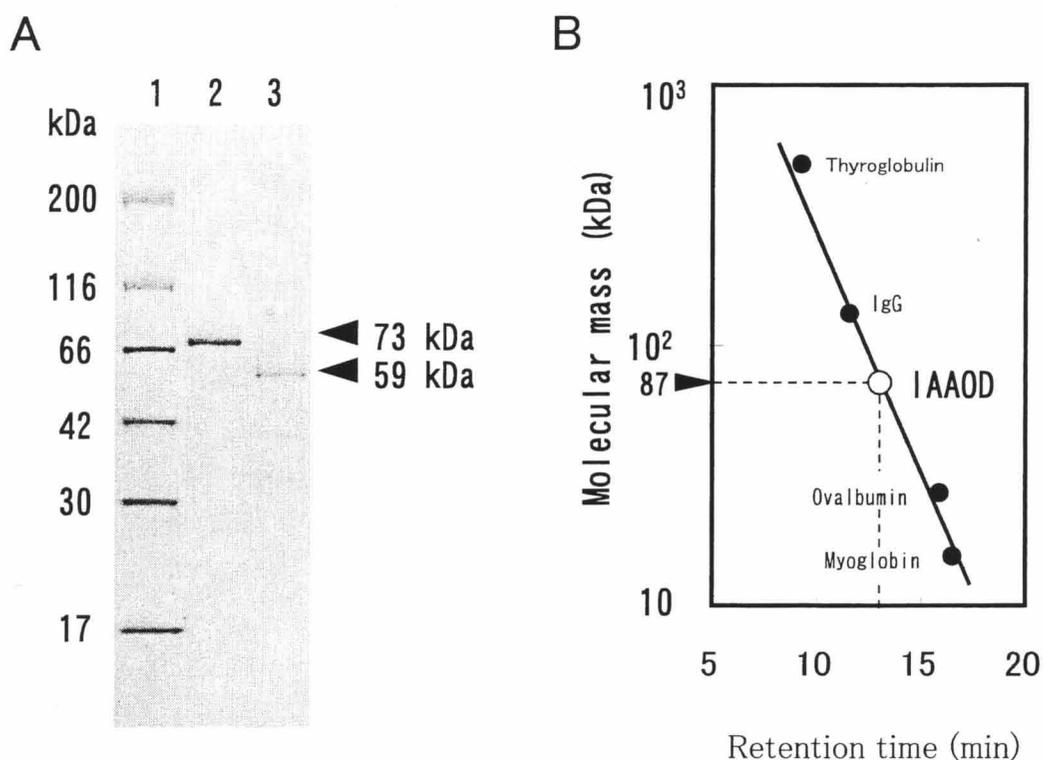


Fig. 2-6. Estimation of molecular mass of the enzyme.

A, SDS-PAGE of the enzyme. Lane 1: markers, myosin (200 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), aldolase (42.4 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), myoglobin (17.2 kDa); lane 2: purified enzyme; lane 3: deglycosylated purified enzyme. B, Gel filtration of the enzyme by HPLC.

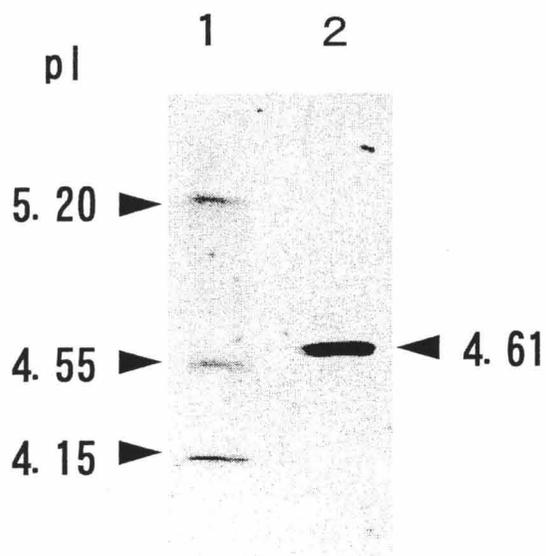


Fig. 2-7. Isoelectric focusing of the enzyme.

Lane 1: markers, glucose oxidase (pI 4.15), soybean trypsin inhibitor (4.55),  $\beta$ -lactoglobulin (5.20), lane 2: purified enzyme.

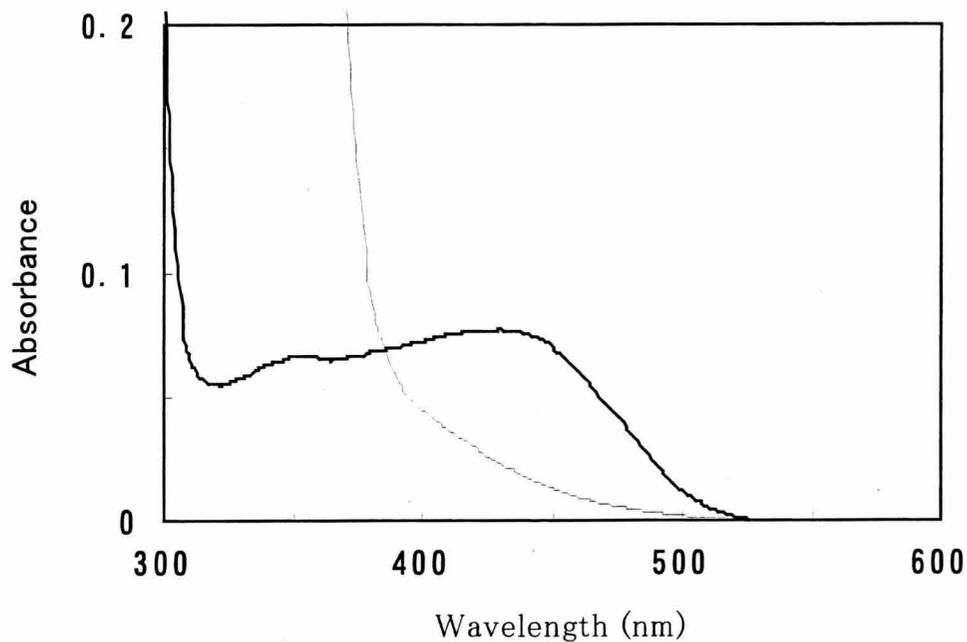


Fig. 2-8. Absorption spectra of the enzyme.

Solid line, native enzyme (0.4 mg/ml); broken line, native enzyme (0.4 mg/ml) in 50 mM sodium hydrosulfite.

### 3. 触媒化学的性質

#### (1) 基質特異性

本酵素は試験したアルキルアルコールのうち，C5の分枝鎖アルコールであるイソアミルアルコールにのみ高い活性を示した．*n*-アミルアルコール(C5)およびイソプロパノール(C6)，*n*-プロパノール(C6)にも若干の活性を示したが，炭素数1～4および7～10のアルキルアルコールには全く活性を示さなかった (Table 2-3)．

#### (2) 各種試薬の影響

本酵素に与える各種化合物の影響を Table 2-4 に示す．本酵素は  $\text{Hg}^{2+}$ ， $\text{Cu}^{2+}$ ， $\text{Cd}^{2+}$ ， $\text{Ag}^+$ ，などの重金属イオンによって強く阻害され，特に  $\text{Hg}^{2+}$  により完全に活性を失った．また， $\text{Fe}^{2+}$ ， $\text{Zn}^{2+}$  も阻害を示した．一方，調べた金属イオンの中では  $\text{Mn}^{2+}$  のみが酵素活性を増加させた．

また，本酵素は SH 基修飾試薬である *p*-クロロマーキュリ-安息香酸 (PCMB) によって顕著な阻害を受けたが，5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸) (DTNB) およびモノヨード酢酸は本酵素を阻害しなかった．また酸化防止剤である L-アスコルビン酸塩，メタ重亜硫酸ナトリウム，還元剤であるヒドラジン，ヒドロキシルアミンにより強い阻害を受けたが，試験したキレート剤では阻害されなかった．

#### (3) 動力学定数

本酵素のイソアミルアルコールに対する  $K_m$ ， $V_{max}$  値は，それぞれ 30 mM，11.3  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  であった．

Table 2-3. Substrate specificity of the enzyme

Substrate (40 mM)	Relative activity <sup>a</sup> (%)
Methanol	0
Ethanol	0
<i>n</i> -Propanol	0
Isopropanol	0
<i>n</i> -Butanol	0
Isobutanol	0
<i>n</i> -Amyl alcohol	4.1
Isoamyl alcohol	100
<i>n</i> -Hexanol	4.9
Isohexanol	5.9
<i>n</i> -Heptanol	0
<i>n</i> -Octanol	0
<i>n</i> -Nonanol	0
<i>n</i> -Decanol	0

<sup>a</sup> Enzyme activity was assayed by the LPBV-POD method. Experimental conditions are described in the text.

Table 2-4. Effects of Various compounds on the enzyme activity

The enzyme (40  $\mu$ g) was incubated with each compound at 30°C for 5 min. Enzyme reaction was started by adding 24  $\mu$ l of 2 M isoamyl alcohol. After incubation for 60 min, absorbance at 639 nm was monitored.

Material (1mM)	Remaining activity (%)	Reagent (1mM)	Remaining activity (%)
None	100	None	100
LiCl	105	PCMB	1.9
CaCl <sub>2</sub>	103	DTNB <sup>a</sup>	100
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	100	Iodoacetate	106
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	189	NaN <sub>3</sub>	83
FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	26	<i>o</i> -Phenathroline	97
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	77	EDTA	65
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.7	L-Ascorbate	0
ZnCl <sub>2</sub>	27	Metabisulfate	12
AgNO <sub>3</sub>	4.9	Hydrazine	7.6
HgCl <sub>2</sub>	0	Hydroxylamine	8.9
CdCl <sub>2</sub> ·2.5H <sub>2</sub> O	2.2	PMSF <sup>b</sup>	100

<sup>a</sup> 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoate). <sup>b</sup> Phenylmethanesulfonyl fluoride.

## 第5節 酵素反応反応生産物の同定と酵素（イソアミルアルコールオキシダーゼ）の命名

### 【方法】

単一に精製した本酵素溶液  $50\ \mu\text{l}$  ( $100\ \mu\text{g}$ ) を熱処理した清酒（18% (v/v) エタノール）1 ml に添加して，1.5 ml 容のマイクロチューブ中で  $30^\circ\text{C}$  で反応させた．酵素溶液の代わりに Buffer A を加えたものを対照とした．4 日間の反応後，清酒中の香気成分を酢酸エチルで抽出して，HP5970B 型 GC-MS システム（Agilent technology, Paloalto, CA, USA）で分析した．イオン化は EI 法で行い，イオン化ポテンシャルは  $70\text{eV}$  であった．

### 【結果】

Fig. 2-9 A, B に GC-MS 分析により得られた酵素添加サンプルおよび酵素を加えない対照サンプルのガスクロマトグラムをそれぞれ示す．酵素添加サンプルでは，保持時間 8.76 分にピーク（peak 1）が生じたが，酵素を添加しないサンプルでは本ピークは認められなかった．peak 1 のマススペクトラムを Fig. 2-9 C に，イソバレルアルデヒド標品のマススペクトラムを Fig. 2-9 D に示す．Fig. 2-9 C と Fig. 2-9 D における開裂パターンは一致したことから，peak 1 を示す化合物をイソバレルアルデヒドと同定した．この結果から，本酵素は清酒中で作用し，ムレ香の本体であるイソバレルアルデヒドを発生させることが証明できた．また本酵素は，イソアミルアルコールに対して特に高い活性を示したことから，本酵素をイソアミルアルコールオキシダーゼと命名した．

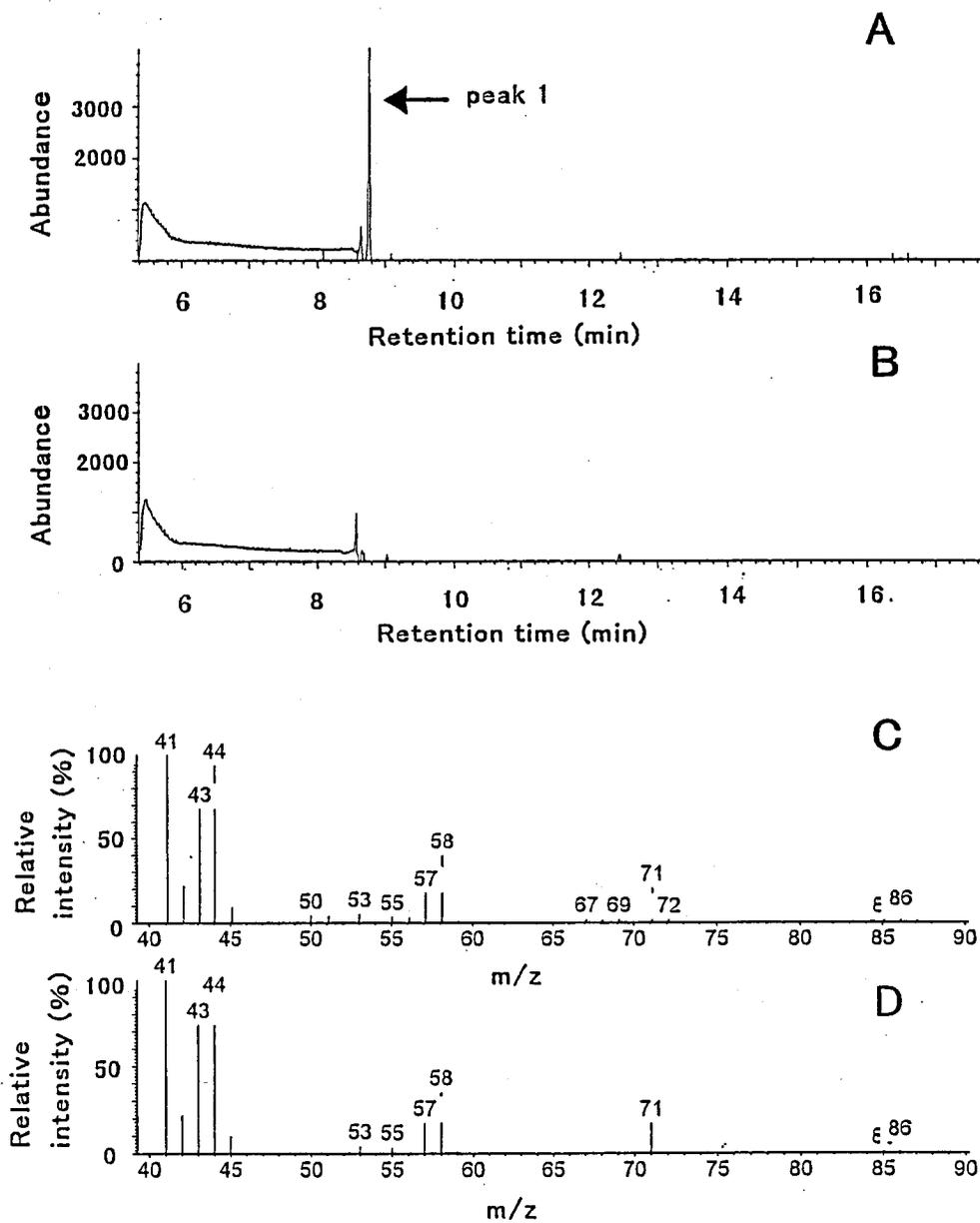


Fig. 2-9. Production of isovaleraldehyde in sake by the enzyme.

Gas chromatograms of the extract (A) from sake stored at 30°C for 4 d with purified isoamyl alcohol oxidase and the extract (B) without the enzyme. Mass spectra of peak 1(C) in Fig. 2-9A and authentic isovaleraldehyde (D).

## 第6節 要約と考察

生酒の限外濾過濃縮液より各種カラムクロマトグラフィーを行い、電気泳動的に単一な酵素を得ることができた。本酵素は分子質量 73 kDa の単量体であった。酵母 *P. pastoris* のアルコールオキシダーゼは分子質量 300 kDa のホモ 4 量体であり<sup>17)</sup>、*C. boidinii* や *H. polymorpha* の酵素は分子質量 670 kDa のホモ 8 量体と報告されている<sup>19)</sup>。また、担子菌 *Basidiomycete* のアルコールオキシダーゼは分子質量 300 kDa 以上の多量体である<sup>23)</sup>。このように既報のプライマリーアルコールオキシダーゼはすべてサブユニット構造をとる細胞内酵素であり、麹菌由来の本酵素はこの点でも特異なアルコールオキシダーゼと言える。

本酵素は糖鎖を約 20% 含む糖タンパク質であった。エンド-H-グリコシダーゼ単独では十分に糖鎖を除去できず、ペプチド N-グリコシダーゼ、エンド-O-グリコシダーゼ、シアリダーゼ A の共存下で完全に糖鎖を分解・除去ができたことから、一般的な N 結合型糖鎖とは異なるタイプの糖鎖が結合していると考えられる。多量の糖鎖の結合は、タンパク質分子の立体構造を安定化し、酵素の pH 安定性や温度安定性の向上に寄与する<sup>34)</sup>。また、糖鎖の結合により酵素の親水性が増加する。本酵素においても、糖鎖の結合が清酒中での安定性や溶解性に寄与していると考えられる。

本酵素の吸収スペクトルと還元剤の添加による吸収スペクトルの変化から、本酵素はフラビントタンパク質であると推察された<sup>35)</sup>。しかし、トリクロロ酢酸による処理でもフラビン化合物は遊離されなかったことからフラビン化合物は本酵素に共有結合している考察した。

本酵素は pH 4.5 において最大活性を示した。また、pH 3.0 ~ 6.0 で安定であった。清酒の pH は通常 4.2 ~ 4.5 の範囲にあり、このような pH 特性は、本酵素が清酒中で作用しやすく、失活しにくいものであることを示している。

本酵素は 45°C までは活性を保持したが、50°C を越えると急激に安定性は低下し、65°C、15 分間の処理で失活した。この結果は、通常の清酒の火入れ（熱処理）条件で本酵素を完全に失活させることができることを示している。

本酵素は C5 の分枝鎖アルコールであるイソアミルアルコ

ールに対して、突出して高い活性を示した。本酵素は C5 の直鎖アルコールと C6 の直鎖あるいは分枝鎖アルコールに対して微弱な活性を示したが、C4 以下また、C7 以上の炭素数を持つアルキルアルコールに対しては全く活性を示さなかった。このような基質特異性を示すアルコールオキシダーゼはこれまでに未報告であり、本酵素は基質に関しても極めて特異なアルコールオキシダーゼと言える。

本酵素の精製標品を清酒に添加することによってムレ香の本体であるイソバレルアルデヒドが顕著に発生することを GC-MS により証明した。この結果および基質特異性の基づいて、本酵素をイソアミルアルコールオキシダーゼと命名した。

イソアミルアルコールを基質とした場合、本酵素の  $K_m$  値は 30 mM であった。この値は他のアルコールオキシダーゼと比較して 2 桁高かった。清酒中のイソアミルアルコール濃度は通常、1.25~3 mM であることを考慮すると<sup>36)</sup>、生酒中におけるムレ香発生の反応は緩慢に進むと考えられる。

## 第3章 イソアミルアルコールオキシダーゼ遺伝子の解析

### 第1節 序

第3章では、麴菌の生産する新規酵素，イソアミルアルコールオキシダーゼをコードする遺伝子をクローニングし，その遺伝子を解析することを目的とする。

本酵素の内部部分アミノ酸配列に基づいて合成したプライマーを用いて，PCRにより得たDNA断片を増幅する。得られたDNA断片をプローブとして，*A. oryzae* RIB 40のゲノムライブラリーより目的とする遺伝子のスクリーニングを行う。得られたクローンの解析を行った後，タカアミラーゼプロモーター下で遺伝子を高発現にさせることによって，本遺伝子が麴菌において本酵素を実際に発現することを確認する。また製麴における本酵素の発現を遺伝子の転写レベルと酵素の活性レベルから把握するとともに，*Aspergillus*属近縁種における遺伝子ホモログの分布に関して検討する。

### 第2節 イソアミルアルコールオキシダーゼ遺伝子のクローニング

#### 【方法】

#### 1. 使用菌株，プラスミドベクター，培地

ファージベクターλ DASH II (Stratagene, La Jolla, USA)を用いた *A. oryzae* RIB 40ゲノムライブラリーは創価大学の李秉魯博士より分譲を受けた。大腸菌は，ファージ感染用としてXL1-Blue MRA P2 (Stratagene)，プラスミドによる形質転換用としてDH5α (宝酒造，京都)を使用した。プラスミドベクターはpBluescript II SK+ (Stratagene)を使用した。大腸菌の培養は，LB培地 (1% (w/v) トリプトン-0.5% (w/v) 酵母エキス-1% (w/v) NaCl, pH 6.8-7.0)を用い，必要に応じてアンピシリンを50 μg/mlになるよう添加して行った。またその形質転換はHanahanの方法によった<sup>37)</sup>。

#### 2. 酵素の内部部分アミノ酸配列の決定

精製酵素 (250 μg) 溶液 100 μlを，2 M Tris-HCl-5 M グアニジン塩酸 (pH 8.5) に対して透析後，ジチオスレイトール存在下でモノヨード酢酸により，タンパク質中のCysをカルボキシメチル化した。反応液を2 M尿素を含む50 mM N-

エチルモルフォリン緩衝液 (pH 9.0) に対して透析した。得られた透析内液にリジルエンドペプチダーゼ

(*Achromobacter protease I*, 和光純薬, 大阪) 1 $\mu$ gを加え, 37 $^{\circ}$ Cで16時間反応させた<sup>38)</sup>。反応液を $\mu$ Bondsphere C18カラム (Waters) にアプライし, 0~60% (v/v)のアセトニトリルを含む0.05% (v/v)トリフルオロ酢酸溶液を用いたリニアグラジエント法により, 流速0.2ml/minにてペプチドを分離した。Fig. 3-1で示すクロマトグラムにおいて, 保持時間26.649分, 37.071分, 42.441分にピークを示した3画分(それぞれP1, P2, P3と称す)を選択した。ペプチドのN末端アミノ酸配列はエドマン法を用いて決定した。

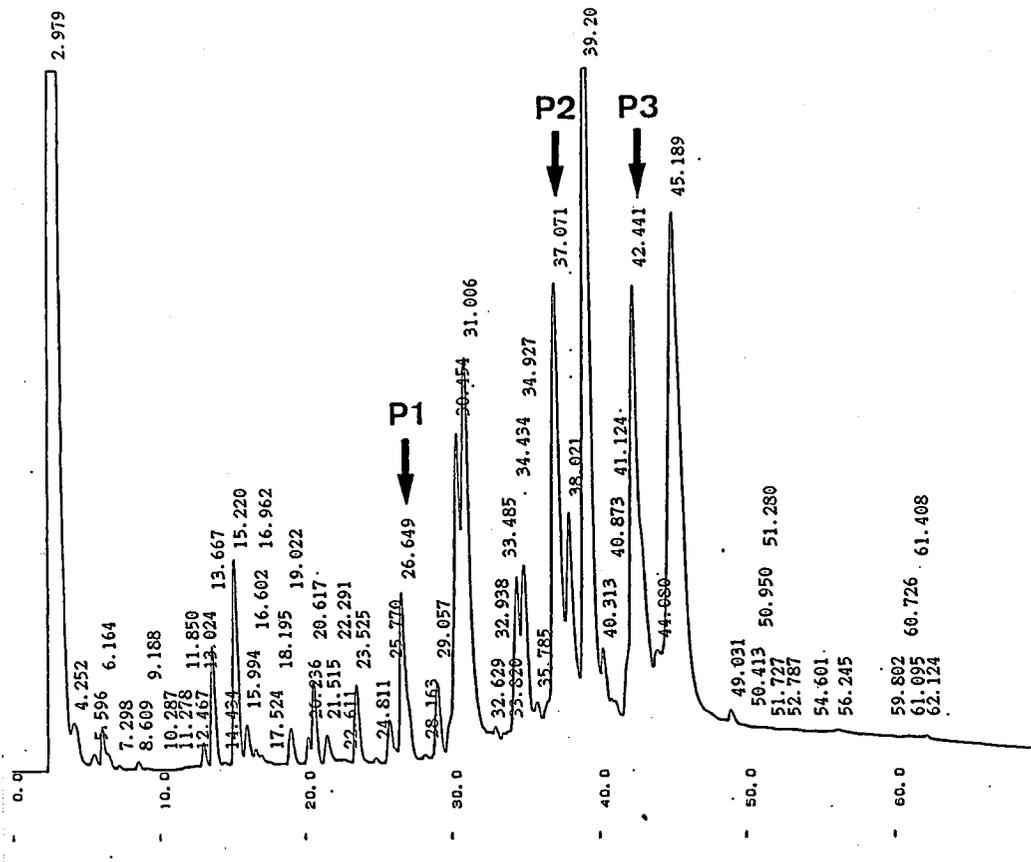


Fig. 3-1. Fractionation of peptides from carboxymethylated isoamyl alcohol oxidase by the digestion with lysyl endopeptidase.

### 3. 麹菌ゲノム DNA の調製

PCRにおける鋳型やゲノミックサブロット解析に用いた麹菌ゲノム DNA は、以下の方法で調製した。 *A. oryzae* RIB40 より分生胞子を回収し、100 ml の GPY broth 培地 (2% (w/v) グルコース-1% (w/v) ポリペプトン-0.5% (w/v) 酵母エキス) に接種後、30℃ で 24 時間振とう培養した。生育したペレット状の菌糸体をガラスフィルター (3G-3) にて濾過・回収し、冷滅菌水で 3 回洗浄した。洗浄した菌糸体を濾紙等で十分脱水後、乳鉢に注いだ液体窒素中で粉碎した。粉状化した菌糸体 (0.5 g) を、5 ml の TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl-1mM EDTA, pH 8.0) で均一になるよう懸濁し、5 ml の溶菌緩衝液 (2% (w/v) SDS-0.1 M NaCl-10mM EDTA-50mM-Tris-HCl, pH 7.5) を加えて混和した。室温にて 15 分間静置して十分溶菌を進行させてから、遠心分離 (2,900 × g, 10 分, 4℃) により上清を得た。得られた上清に等量の PCI (中和フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール (25:24:1)) を加え、室温で 15 分間混和後、遠心分離 (2,900 × g, 30 分, 室温) により、水層を得た。得られた水層に 2.5 容の冷エタノールを加え、混和後、-80℃ で 10 分間静置し、DNA を沈殿させた。遠心分離 (2,900 × g, 30 分, 4℃) により、沈殿を回収し、減圧下で乾燥した後、2 ml の TE 緩衝液に溶解した。この溶解液に 2 μl の 10mg/ml RNase A (ニッポンジーン, 富山) を加え、37℃ で 1 時間インキュベートした。反応液に等量の PCI を加え混和後、遠心分離 (2,900 × g, 5 分, 室温) を行い水層を得た。この操作を 2 回繰り返した後、等量の CI (クロロホルム-イソアミルアルコール (24:1)) を加え、PCI 抽出と同様に 1 回抽出を行った。得られた水層に 2.5 容のエタノールと 0.1 容の 5 M NaCl を加え、混和後、遠心分離 (2,900 × g, 30 分, 4℃) して沈殿を回収した。70% (v/v) 冷エタノールで沈殿を洗浄した後、遠心分離 (2,900 × g, 5 分, 4℃) を行い、得られた沈殿を減圧下で乾燥した。乾燥沈殿を 0.1 ml の TE 緩衝液に溶解し、精製 DNA サンプルとして -20℃ で保存した。

### 4. アガロースゲル電気泳動

電気泳動用ゲルは、SeaKem GTG アガロース (BMA, Rockland, USA) を 0.8% (w/v) になるよう TAE 緩衝液 (40

mM Tris-HCL-20 mM acetate-1.8 mM EDTA , pH 8.0) に加熱溶解し, 冷却後, ミニゲル作製用プレートに流し込み作製した. 電気泳動は, TAE 緩衝液を泳動用緩衝液として Mupid (コスモバイオ, 東京) にて行った. 泳動条件は通常 100 V, 45~60 分泳動にて, ゲノミックサザンプロット解析や断片回収を行う場合は分離能を高めるため 50 V, 約 1.5 時間とした. 泳動後, ゲルを 0.5  $\mu$ g/ml のエチジウムブロマイド溶液で約 15 分間染色し, 紫外線を照射して DNA の検出した. ただし, 泳動後のゲルから DNA 断片を回収する場合は, 予めエチジウムブロマイドを終濃度 0.1  $\mu$ g/ml になるようゲル中に添加した. サイズマーカーは  $\lambda$  Hind III digest または 200 bp DNA Ladder (宝酒造) を使用した.

## 5. PCR

本節 2 で述べた *A. oryzae* RIB 40 より調製したゲノム DNA 50~100 ng を鋳型 DNA として使用した. プライマーは, Fig. 3-2 で示すセンスプライマーとアンチセンスプライマーの組み合わせで用い, 反応液中の濃度は 0.5  $\mu$ M に設定した. また,  $Mg^{2+}$  濃度は 1.5 mM とした. PCR は rTaq (宝酒造) および PC-800 サーマルサイクラー (アステック, 福岡) を用いて行った. 94°C で 5 分間保温した後, 94°C 1 分, 55°C 2 分, 72°C 3 分で 35 サイクル反応させた. アガロース電気泳動で特異的増幅断片を確認し, T-ベクター pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) とのライゲーションを行った後, *E. coli* TOP10F' (Invitrogen) を形質転換した.

## 6. ヌクレオチド配列の決定

Cy5 AutoCycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) および ALFexpress automated DNA sequencer (同) を用いて, ジデオキシ法でヌクレオチド配列を決定した.

## 7. プラークハイブリダイゼーション

プラークをナイロンメンブレン Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech) にトランスファーし, プレートとの接触面を上にしてメンブレンを変性液 (0.5 M NaOH-1.5 M NaCl) で湿らせたワットマン 3MM 濾紙上で 5 分間静置した. 次に中和液 (1.5 M NaCl-1 M Tris) で湿らせた同濾紙上で 5 分間静置した後, 2 $\times$ SSC 中に約 3 分間浸漬した. 濾紙上で風乾後, 80°C で 2 時間ベーキングし, フェージ DNA をナイロン

メンブレンに固定化した． ECL direct nucleic acid labeling and detection system (Amersham Pharmacia Biotech) を用いてプローブ DNA を蛍光標識し，ハイブリダイゼーションおよび陽性クローンの検出を行った． ハイブリダイゼーション，洗浄およびシグナル検出の条件は ECL system のプロトコールによった．

#### 8. $\lambda$ DNA の抽出精製

陽性クローンから調製したファージを大腸菌に感染させ，LB 平板培地にプラークを形成させた． これに 3 ml の SM 緩衝液 (0.1 M NaCl-8 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O-50 mM Tris-HCl (pH 7.5)-0.01% (w/v) ゼラチン) を添加し，室温で 3 時間放置してファージライセートを調製した． ファージライセート 1.5 ml より Lambda DNA purification Kit (東洋紡，大阪) を用いて  $\lambda$  DNA を抽出し，精製した．

#### 9. サザンブロット解析

VacuGene XL 核酸ブロッティングシステム (Amersham Pharmacia Biotech) を用い，0.4 M NaOH を転写液として，電気泳動後のアガロースゲルより，ナイロンメンブレン Hybond-N+ に DNA をトランスファーした． この時次に本節方法 7 と同様に ECL direct nucleic acid labeling and detection system を用いて，プローブ DNA を蛍光標識し，ハイブリダイゼーション後，検出を行った．

### 【結果】

#### 1. 内部部分アミノ酸配列とプライマーのデザイン

精製した本酵素をリシルエンドペプチダーゼ処理後，HPLC により分取した P1, P2, P3 画分 (方法の項参照) に含まれるペプチドの N-末端アミノ酸分析を行った． P1, P2, P3 画分のペプチドのアミノ酸配列はそれぞれ，TAFFGNNYD, ADSSSCRCFPGD, EVAGDVDNAVNP であった． 各アミノ酸に対するコドン数を考慮して，P1 と P3 画分に含まれるペプチドのアミノ酸配列より，Fig. 3-2 で示すプライマー (P3FW, P1RV) を作製した．

#### 2. プローブ DNA の調製

*A. oryzae* RIB-40 由来のゲノム DNA を鋳型とし，P3FW, P1RV (Fig. 3-2) をプライマーとして用いた PCR を行った．

増幅した約 0.3 kb の DNA 断片のヌクレオチド配列を決定した結果，得られた配列にプライマーの作製に用いたペプチドのアミノ酸配列をコードする部分を見いだした．このことから PCR 増幅 DNA 断片はイソアミルアルコールオキシダーゼ遺伝子の一部であることがわかった．同 DNA 断片を以後の実験にプローブとして用いた．

(Peptide from P3 fraction)

E V G D V D N A V N P  
5'-GAYGTIGAYAAAYGCIGTIAAYCC -3'  
Sense primer, P3FW

(Peptide from P1 fraction)

T A F F G N N Y D  
5'-TTYTTYGGIAAYAAYTAYGA-3'  
3'-AARAARCCITTRTTRATRCT-5'  
Antisense primer, P1RV

Fig. 3-2. NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequences of peptides in the P1 and P3 fractions (Fig. 3-1) and their corresponding primer sequences.

I, R, and Y in primer sequences indicate inosine, A or G, and C or T, respectively.

### 3. 陽性クローンのスクリーニング

約 12,000 プラークからプローブとハイブリダイズする 2 個の陽性クローン (λ1, λ2) を得た．両クローンから DNA を調製し，麴菌由来の挿入断片の解析を行った結果，同じ制限酵素地図を示した．またサザンロット解析により，これらの挿入断片中の 5.7 kb の *Apa*I 断片に目的の遺伝子が存在することが予想された．

### 4. サブクローニングおよび制限酵素地図の作成

λ1 から 5.7-kb *Apa*I 断片を切り出し，これを pBluescript II SK+ の *Apa*I 部位にサブクローニングすることにより pMR1 を構築した．pMR1 に含まれる *Apa*I 断片の制限酵素地図を作製し，サザンロット解析を行うことにより，遺伝

子の存在位置を推定した。その結果，Fig. 3-3 で示すように 3.8 kb *Apa*I-*Acc*I 領域に構造遺伝子が存在することがわかった。

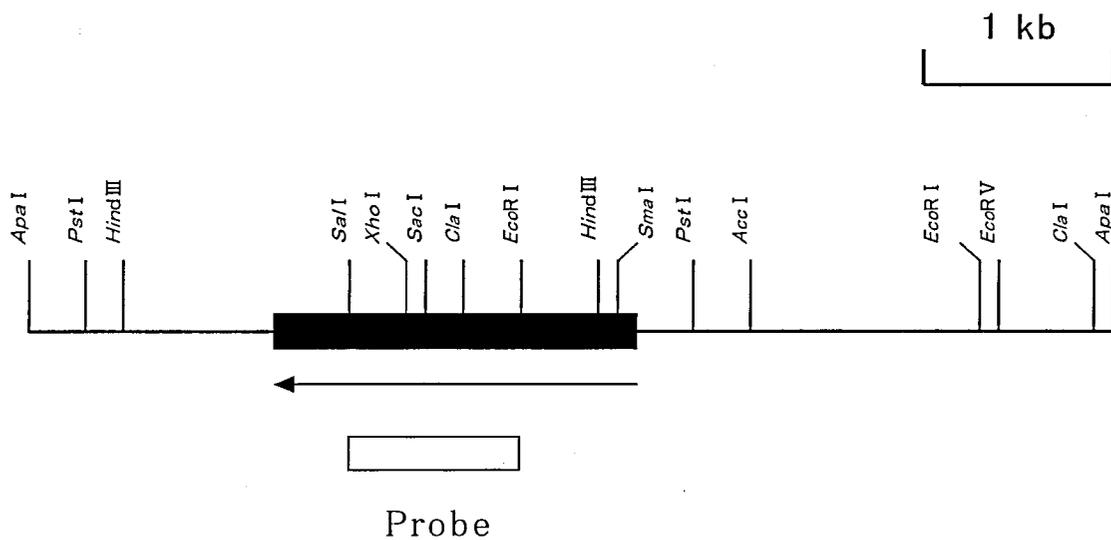


Fig. 3-3. Restriction map of a DNA fragment containing isoamyl alcohol oxidase gene (*mreA*).

The closed box indicates a coding region and the transcription direction is indicated by an arrow. The open box indicates a probe for Southern or northern blot analysis.

### 第3節 イソアミルアルコールオキシダーゼ遺伝子の解析

#### 【方法】

#### 1. ヌクレオチド配列の決定

第2節方法6により行った。

#### 2. アミノ酸配列への翻訳とホモロジー検索

ヌクレオチド配列のアミノ酸配列への翻訳は、遺伝子解析ソフト GENETYX-WIN ver. 3.0 (ソフトウェア開発, 東京) を用いて行った。ホモロジー検索には、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST サービスを利用した。

#### 3. ゲノムサザンプロット解析

第2節方法2により調製した麹菌のゲノム DNA を各種制限酵素で完全消化後、同節方法3にしたがって電気泳動を行った。3.8 kb *ApaI*-*AccI* 領域存在する 0.8 kb の *EcoRI*-*SaII* 断片 (Fig. 3-3) をプローブとして、第3節方法7によりサザンプロット解析を行った。

#### 【結果】

#### 1. 遺伝子の全ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の解析

Fig. 3-4 に、本遺伝子の全ヌクレオチド配列およびエクソン領域の推定アミノ酸配列を示す。この断片中に 1,903 bp から成るオープンリーディングフレーム (ORF) を見いだした。同 ORF 中に、3つの推定イントロン領域を見いだした。これらの領域にはいずれも、真核生物のイントロンのコンセンサス配列である 5'-GTPuNGT...PyAG-3'配列<sup>39)</sup> および 3'末端側に、ラリアット構造を形成するための 5'-PuCTPuAPy-3'配列<sup>40)</sup> が保存されていた。同 ORF の上流には、翻訳開始コドンの -343 領域に TATA 様配列、-367 領域に CAAT 様配列が存在していたが、典型的な TATA 配列 (TATAAA) は見いだせなかった。

エクソン領域の推定アミノ酸配列から、本遺伝子は 567 残基のアミノ酸をコードすることがわかった。この配列内に、ペプチドシーケンサーにより決定した精製酵素の内部部分アミノ酸配列を全て見いだすことができた。このことより、イソアミルアルコールオキシダーゼをコードする本遺伝子を *mreA* と命名した。また、成熟タンパク質の N 末端アミノ酸

(Ala)の上流にはMetで始まる疎水性の高い24残基のアミノ酸から成る配列を見いだした。さらに、567残基のアミノ酸配列中には9カ所のN結合型糖鎖結合モチーフ(Asn-X-Ser(またはThr))が存在した。

## 2. 麴菌ゲノムにおける遺伝子のコピー数の解析

Fig. 3-5に、*A. oryzae* RIB 40のゲノムサザン解析の結果を示す。0.8 kbのEcoRI-SaII断片(Fig. 3-3)をプローブとし、同断片を切断しない6種類の制限酵素で*A. oryzae* RIB 40のゲノムDNAを完全消化した。いずれの制限酵素で処理した消化物においても、プローブとのハイブリダイゼーションを示したシグナルは1本であった。この結果より、本研究においてクローニングした遺伝子は、麴菌ゲノム中にシングルコピーで存在することがわかった。

## 3. アミノ酸配列の類似性検索

本酵素の推定アミノ酸配列に高い類似性を示すタンパク質は見いだすことができなかった。しかし部分的には最近、ドイツで報告された*Claviceps purpurea* (麦角菌)の推定オキシダーゼ(CPOX1)<sup>41)</sup>を始めとして、シロイヌナズナのベルベリン・ブリッジ・エンザイム(BBE)<sup>42)</sup>や*Arthrobacter oxidans*の6-ヒドロキシ-D-ニコチンオキシダーゼ<sup>43)</sup>などFAD依存型酵素として報告されているいくつかのオキシダーゼに相同性の高い領域を見いだした。本酵素と上記の3つの酵素の保存領域を比較した結果をFig. 3-6に示す。

-540 cctcccaagccacgtaatggcggcattgtgacaggaatggggccaaaagccgacccacgggtatccctggttcggttaaggcattaga  
 -450 aactagacgagatcgtgggaaaccgttcccttggccgggttaacccaaatgggagatattcatgcatatcagatcgggggtcaatggtt  
 -360 tttcccttctgacgtttatactcgggtggtcttaatcgccttgggtcattcctgctaaaacacggcgaatgatcattcatacctgca  
 -270 gactgcagcattccccgtatttagtaatcctaactaggtcgttaaatgggtggggccgagattccggcatcatttcgctagagaaggctg  
 -180 gggccatgctaaccctatgccatttgctcctcctgattagcggcattagctagctaaacaggagatttgctcgagtcgggaatggtcgt  
 -90 agtaagcgagcagaccttaagtaatccttcaactcctcgtcagttatcttcatccctgccaaaacattaccaggcaagatcaccactccca  
 1 ATGCCATCATTAAAGCACCTCAAACCTGGGGCTTTCCTCGGCCTTGCTGCCATTGCCCCCTCGATTGAGGCAGCTGACAGCTCATCTTGC  
 1 M P S L S T L K L G A F L G L A A I A P S I E A A D S S S C  
 91 CGTTGTTTCCCCGGGATGATTGCTGGCCGTCAGTTTCGACCTGGGATGCTTCAACCAGTCTGTCGATGGACGCTTGTGCCACTGTA  
 31 R C F P G D D C W P S V S T W D A F N Q S V D G R L V A T V  
 181 CCCCTCGCAACGCCGTGCCACACTCCCAACTACGATCAAACGAAATGTGAAGCTTTGAAAGAGGACTGGCTGTTGCCAGAGGACCAgtaa  
 61 P L A T P C H T P N Y D Q T K C E A L K E D W L L P E D H  
 271 gttcttggattgagattcctccccacgaagaatatcagagaatattaacaactccagCTATCAATCCTCTTCTGCTCTGATGGCTCCA  
 90 Intron 1 Y Q S S S S L M A P  
 361 TGGTTCACAAATGGCACATGCGACCCATACCACCCTGTTTCTCAGCCATGCACCTCTGGTAATTTTCGTCGGATATGCGGTGAATGTCTCC  
 100 W F T N G T C D P Y H P V S Q P C T L G N F V R Y A V N V S  
 451 ACGCCTGCCATGTGGCCAAGACATTGCAATTTGCCAATGAGCACAATATCCGTTTTGTTATTTCGTAACACCGGCCATGAgtagacc  
 130 T P A H V A K T L Q F A N E H N I R F V I R N T G H D  
 541 ccctgaacttgcagaaacttattcaatccggttataactaacgtacttagCTACAACGGAAAATCCACCGGTGCAGGTGCTCTTTCCG  
 157 Intron 2 Y N G K S T G A G A L S  
 631 GTCTGGACACACCACCTTAAAGGTATCGAATTCAGGATTGGAAGGACGAACATTACACAGGAAAGGCTGTGAAACTCGGAGCAGGTGTC  
 169 V W T H H L K G I E F K D W K D E H Y T G K A V K L G A G V  
 721 CAGGGTTTTGAGGCCTATGAGGCAGCAACCGCAGGGGCTTCGCGTGGTAGGTGGAGAGTGCCTTCCGTCGGTATTGCTGGCGGATAT  
 199 Q G F E A Y E A A N A Q G L R V V G G E C P S V G I A G G Y  
 811 AGCCAGGAGGTGGTCACTCTTCTGTCGTCGATGTGACTGGGTGGGACCAGGTCCTCGAGTGGGAGGTGATCGATGGTACTGGT  
 229 S Q G G G H S F L S S M Y G L G A D Q V L E W E V I D G T G  
 901 AGGCTCCTCGTCGGAACCGTCAAACAACACTGATCTCTACTGGGACTGTCTGGTGGCGGGGTGGGACCTATGGTGTGTCTGGTCT  
 259 R L L V A N R Q N N T D L Y W A L S G G G G G T Y G V V W S  
 991 ATGACCTTAAGGCTTATCCCGATAGTCAGGTATCTGGTTTGAACCTGACGTTCCACCACACTGGCATTCTGACGACAGTTCTACAAA  
 289 M T S K A Y P D S Q V S G L N L T F T T T G I S D D T F Y K  
 1081 GCCGTGGAGCTCTACAATGCTGCTTTGCCTTCTTTCTGGATCAGGGTATCATGAGTCTGAACTTCATGACCAACGTCCTCTCTCTCTC  
 319 A V E L Y N A R L P S F V D Q G I M S L N F M T N V S F S L  
 1171 TCACCGATGACTGCACCTGGTATGCCCTGGAGAAGCTCGAGAGCCTTATTAAGCCATTCCTCAATGAACTGAAGGCCCTTGGCATCAAG  
 349 S P M T A P G M P L E K L E S L I K P F L N E L K A L G I K  
 1261 TATCAATATCACGCGGAGAGTTTCCCGCTTACCTTGACCAATTCAATGCCAGCGCCACTCGTTGAAATTCAGTGGCCAGTATGGC  
 379 Y Q Y H A E S F P A Y L D Q F N A Q A P L V E I A V A Q Y G

1351 AGCTGGCTCCTCCCCGGTCTGTCGCGAGAACAACAGCACTAACCGTGAAGTATCCAGTCCATATCGGACTATCCTCTCTACGGGTGCT  
409 S W L L P R S V V E N N S T N R E L I Q S Y R T I L S T G A  
1441 AACTTCACCAATGTGGGTCTTAAGGTGTCAAAGGAAGTCGCTGGCGACGTCGACAACGCCGTGAATCCGGCATGGCGCAATGCAATTTCC  
439 N F T N V G L K V S K E V A G D V D N A V N P A W R N A I S  
1531 CACATGCTTCTGTATACCGGCTGGGAGTTTGACCAGCGAGAGAAGATGGTTGAGGCCAGAAAATTGATACCGAGGCTTGGTCCCTGCC  
469 H M L L Y T G W E F D Q R E K M V E A Q K L M T E V L V P A  
1621 TTCAGCAAATAGCCCCGGAGTCTGGCGCTTACTTGAACGAGgatgactacaatttcattttcgatcgttgattcctgcacagccttga  
499 F S K L A P E S G A Y L N E Intron 3  
1711 cacatgctcaccactgtatctatagGCCGACTTCCACCAGCCTGACTTCAAGACTGCCTTCTTCGGCAACAACTACGACAAGTCCGCCG  
513 A D F H Q P D F K T A F F G N N Y D K L R A  
1801 AATCAAGGCCAAATACGATCCCAACGATCTTCTATGGCTGACAGCTGTTGGCTCTGATGAGTGGACCGTCTCGGAAAGTGAAGAAT  
535 I K A K Y D P N D L F Y A L T A V G S D E W T V S E S G R M  
1891 GTGCCGTGTTaaacccggacgccaatgcatccaagattgcctatgctggtgaataggtaaaaggctggcacaactccttgaactct  
565 C R V \*  
1981 tataaagcggacctgagaacggattggctcccactattcatcttgccttggaccattcagaatctaaggagcgggaaagccagtgaga  
2071 tagaagatcactcactctggattctatttgtttatgcatcatgtactacatagagttgaccccttgaagccgagaggccggttcaa  
2161 cctcgtacttcactaatacagccgttccaacccccatttggataatgctgtacatatttggaaaggaactcggggagtacttaatacaag  
2251 agagtttgcctcaaaattaactactatccttcgatttggattataaccatcttgaaggcttcatgccctgaggctcttttgccttgcga  
2341 attttttatttcttctgctattgctactcttctctgagaaactcttgactaaccgaagccatactttataactcggctcttggta  
2431 taaatgccctaggatatttattcgtctcagacagtttcagaacttcatcaagtegggtgcaaagggtatactttgagtgaagcttagag  
2521 gacagcgagaagccaagtacttgactttcttcaatacaagcgttgatctgggagccgagtacatagccaagccaagagagatgtagt  
2611 ttagagcaccaatgccaggctctcgccgtattcttctgtccagacttgggcatgtggagagaaggatgtacaataccocaaaggctgc  
2701 agccatgtaaatggcaaccaccataacgatataattctgtaacaaagaattgtaagggcgaaaagatgccaatcgtaaccgtgtcggcag  
2791 agactcgtctgattactactcgtgacttcttctcgcaggatacgtgggttctctctgtttgagcaagactggtatatactcgcgtat  
2881 gaagacacagccgactcgcacaacttgcggccatgctcgtggaat~~aaa~~acatccatcgccatggtgtacgctcagtaatccaacc

Fig. 3-4. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *mreA* gene.

The putative TATA and CAAT sequences and putative polyadenylation signal in 5'- and 3'- non-coding regions are double-underlined. The consensus sequence involved in splicing in putative introns are single-underlined. The presumed signal peptide is wave-underlined. The amino acids determined by direct sequencing and the potential N-glycosylated asparagine residues are bold-single-underlined. The stop codon is indicated by asterisk.

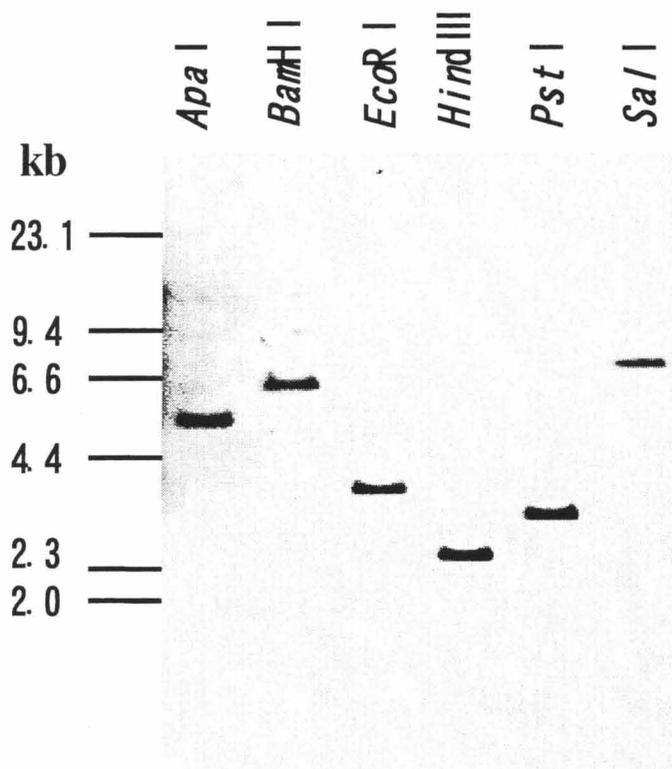


Fig. 3-5. Genomic Southern blot analysis of *A. oryzae* DNA fragments.

Approximately  $5 \mu\text{g}$  of genomic DNA from *A. oryzae* RIB40 was digested with several enzymes and separated by 0.8% agarose electrophoresis, followed by transfer onto a Hybond- $\text{N}^+$  nylon membrane. Southern hybridization was performed with the 0.8-kb *EcoR* I -*Sal* I fragment (see Fig. 3-3) as a probe, which was labeled with an ECL direct labeling system.

A	NIRFVI RNTGHDYNGKSTGAGALS V W T H H L K G I ----- E F K D W K D E H Y T G K	190
B	NLR L V I K N T G H D S A G R S S A P H S F Q I H T S L L Q N I S L H K N F I A R G S T T G R G P	86
C	NLELRIRSGGHDYEGESYTSPPVFVILDMYFNFKIDIN-----MKDE	147
D	GLEISVRSGGHNPNGYATNDGGIVLDLRLMMSIHIDT-----AGS	100
A	AVKLGAGVQGF EAYEAANAQ--GLRVVGGECP SVGIAGGYSQGGG-HSFL	237
B	AVTLGAGVMQWQAYVHGAKN--GYTILGGECP TVGAVGGFLQGGGVSSIH	134
C	TVWIQSGASLGQLY YN I A S K S K V H A F P A G V C P K V G A - G G H F S G G G - F G N L	195
D	RARI GGGV I S G D L V K E A A K F G -- L A A V T G M H P K V G F - C G L A L N G G - V G F L	156
A	SSMYGLGADQVLEWEV I D G T G R L L V A N R Q N N T D L Y W A L S G G G G G T Y G V V W	287
B	SLTRGLAVDQVLEYQVVSANGDLITANEDNNQDLFWALKGGGGGTFGVVT	184
C	MRKYGLSIDHIIDAQIMDANGKVVYRNRQAMGEDVFWAIRGGGGGSYGVIL	245
D	TPKYGLASDNI LGATLVTATGDVIYCSDDERPELFWAVRGAG-PNFGVVT	195

Fig. 3-6. Alignment of amino acid sequences of MreA with those of three FAD dependent oxidases.

A, MreA from *Aspergillus oryzae*; B, CPOX1 (putative oxidase) from *Claviceps purpurea*; C, berberine bridge enzyme from *Arabidopsis thaliana*; D, 6-hydroxy-D-nicotine oxidase from *Arthrobacter oxidans*. The histidine residue to which FAD is covalently linked in the enzyme from *A. oxidans* is indicated by a closed circle and the identical residues in the sequence are denoted by white letters in black boxes.

## 第4節 イソアミルアルコールオキシダーゼ遺伝子高発現株の創製

### 【方法】

#### 1. 使用菌株，ベクター，培地

形質転換の宿主として用いたアルギニン要求性麹菌 *A. oryzae* M-2-3 (*argB*)<sup>44)</sup> および麹菌発現ベクター pTAex3<sup>45)</sup> は国税庁醸造研究所より分譲を受けた。形質転換株選抜培地として 0.8 M NaCl を含む Czapek-Dox 寒天培地を使用した。

#### 2. 遺伝子高発現ベクターの構築

イソアミルアルコールオキシダーゼは第1章で述べたように培養系において微量にしか生産されないため，活性の確認方法が煩雑である。そこでクローニングした遺伝子が酵素活性をコードするものであることを確認するため，遺伝子の ORF 領域を pTAex3 が持つ強力なタカアミラーゼプロモーター (PamyB) 下で高発現させることにより，酵素活性の増大が見られるか調べることにした。

イソアミルアルコールオキシダーゼ遺伝子の両端に制限酵素サイトを結合した DNA 断片を得るため，遺伝子の開始コドンおよび終始コドンに隣接する *KpnI* サイトを結合したセンスプライマー (MRN, 5'-CCA GGT ACC ATG CCA TCA TTA AGC ACC CTC AAA C-3') とアンチセンスプライマー (MRC, 5'-CGT GGT ACC TTA AAC ACG GCA CGC GCG GAG CTT G-3') を作製した。*A. oryzae* RIB 40 のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い，目的とする 1.9 kb の DNA 断片を得た。この断片を *KpnI* で処理し，pTAex3 の *KpnI* サイトに挿入することにより高発現ベクター pTAMR を構築した (Fig.3-7)。

#### 3. 麹菌の形質転換

五味らのプロトプラスト-PEG 法にて行った<sup>44)</sup>。対照としてベクター (pTAex3) のみを用いた形質転換を行った。

### 【結果】

#### 1. 形質転換株の分離とゲノムサザン解析による遺伝子導入の確認

構築した高発現ベクター pTAMR を用いて *A. oryzae* M-2-3 を形質転換し，アルギニン要求性の相補されたクローン，TF-1, TF-2, TF-3 株を選抜した。また，pTAex3 で形質転換

した対照株 (TF-C) を分離した。これらの株のゲノムサザン解析の結果を Fig. 3-8 に示す。TF-1, TF-2, TF-3 株には、TF-C 株の 2.6-kb の位置に見られる本来のイソアミルアルコールオキシダーゼ遺伝子の他に、形質転換により染色体に組み込まれた同遺伝子を見いだした。

## 2. 形質転換株におけるイソアミルアルコールオキシダーゼの生合成

形質転換株の培養上清中の酵素活性を Table 3-1 に示す。TF-1, TF-2, TF-3 株は対照株 TF-C に比べ、総活性で約 150 ~ 880 倍、比活性で約 70 ~ 160 倍の活性を示した。また、各形質転換株の活性は Fig. 3-8 に示すサザンブロット解析におけるシグナル濃度に相関していた。Fig. 3-9 に、SDS-PAGE を用いた各形質転換株培養上清中のタンパク質の分析結果を示す。高発現株においては、本酵素の分子質量 73 kDa を示すバンドが顕著に濃くなっており、その濃度は本酵素の活性値と相関関係を示すことが確認できた。

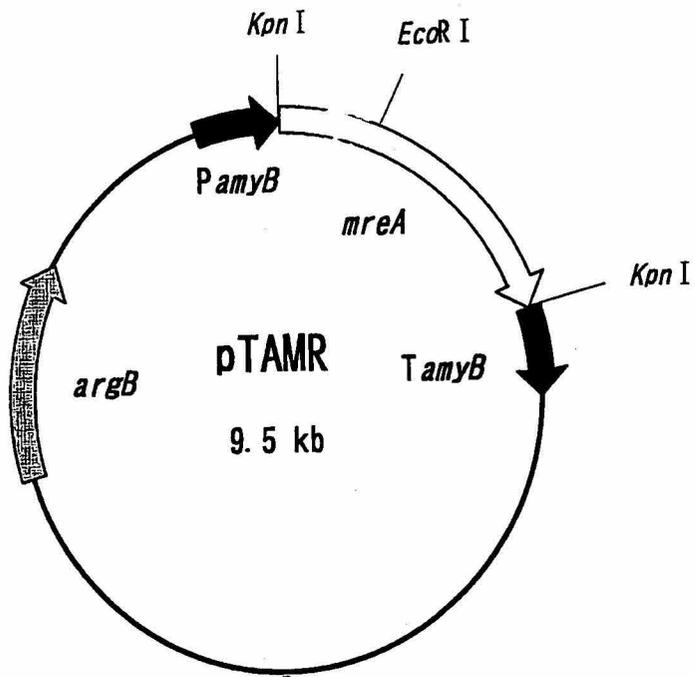


Fig. 3-7. Structure of the *mreA* over-expression plasmid pTAMR.

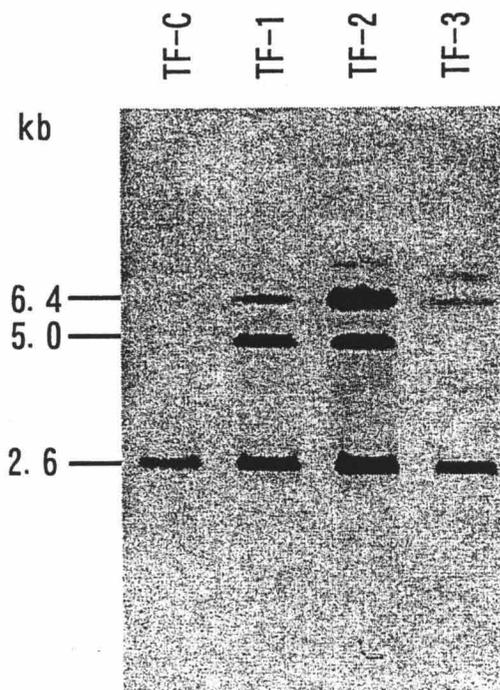


Fig. 3-8. Southern blot analysis of transformants.

Approximately  $2 \mu\text{g}$  of genomic DNA of the transformants was digested with *Hind* III. Southern blot analysis was performed in the same manner as described in Fig. 3-5.

Table 3-1. Isoamyl alcohol oxidase activity of the culture supernatant of *A. oryzae* transformants carrying pTAMR

Strain	Plasmid	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity (mU/mg·protein)
TF-C	pTAex3 (control)	0.53	26
TF-1	pTAMR	190	2,700
TF-2	pTAMR	470	4,200
TF-3	pTAMR	79	1,700

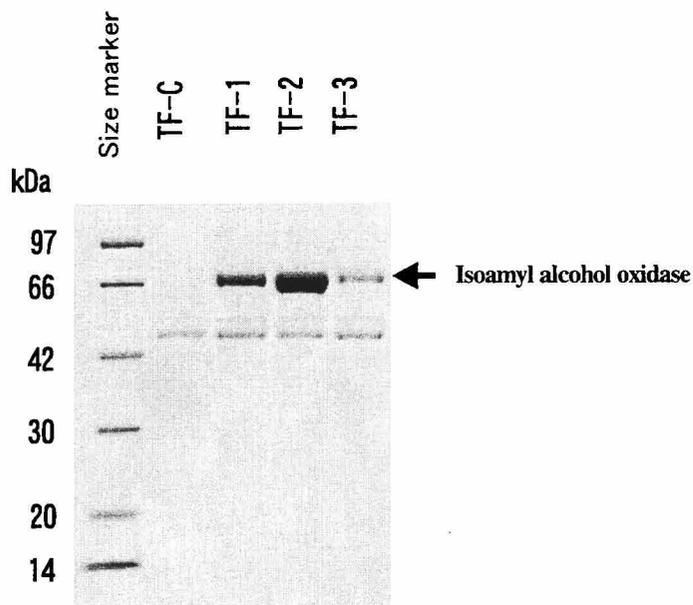


Fig. 3-9. SDS-PAGE analysis of the culture supernatant from *A. oryzae* transformants.

Each transformant was grown in DPY broth at 30°C with shaking for 2 d. Protein secreted from each transformant was concentrated by ultrafiltration. Each concentrated protein sample (6  $\mu$ l) was separated by electrophoresis on a slab of 5-20% (w/v) gradient polyacrylamide gel by the method of Laemmli and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. The bands corresponding to isoamyl alcohol oxidase are indicated by an arrow.

## 第5節 製麴工程における *mreA* の発現

### 【方法】

#### 1. 製麴条件

品温条件等は第1章第5節方法1によった。20時間目に切り返し，30時間目に仲仕事，35時間目に仕舞仕事を行い，45時間目に出麴した。

#### 2. 麴からの全 RNA の調製

培養開始後，25～45時間において5時間毎に米麴のサンプリングを行った。米麴1gを液体窒素中で破碎・粉状化し，10mlのISOGEN試薬（ニッポンジーン）を用いて麴菌の全RNAを抽出した。抽出液を室温にて，4分間，氷上で1分間それぞれ静置後，4,200×g，40分間遠心分離し水層を採取した。水層に対して，0.5容の1.2M NaCl-0.8M クエン酸ナトリウム溶液および0.5容のイソプロパノールを加えて激しく攪拌した後，室温で5分間静置した。これを4,200×g，15分間遠心分離し，得られた沈殿を，diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理した滅菌水に溶解した後，再度0.5容の1.2M NaCl-0.8M クエン酸ナトリウム溶液および0.5容のイソプロパノールを加えて同様に攪拌した。得られた沈殿を70%エタノールで洗浄し，乾燥後，100μlのDEPC処理水を加え，55℃，10分間静置して沈殿を完全に溶解した。これを氷上で5分間静置し，多糖類などの不純物を析出させた後，4,200×g，30分間遠心分離してRNAを含む上清を回収した。この方法で米麴1gから300～400μgのRNAを得た。

#### 3. ノザンプロット解析

米麴より得られた全RNA 20μgを電気泳動により分画した。泳動には1.5%ホルマリン変性アガロースゲルを用いた。1.5gのアガロースを74mlの0.1% (v/v) DEPC処理水に加えて溶解後，10×MOPS緩衝液（0.2M 3-(*N*-Morpholino) propanesulfonic acid-50mM 酢酸ナトリウム-10mM EDTA-0.02% (v/v) DEPC, pH 7.0) 10mlおよびホルムアルデヒド16mlを加え，ゲル槽へ流し込んだ。泳動用緩衝液として，16% (v/v) のホルムアルデヒドを含む1×MOPS (DEPC処理水で調製) を用い，50V定電圧で泳動した。泳動後，本章第2節方法9により，20×SSCを用いてRNAをゲルからHybond N+にブロットした。プローブはFig 3-4に示す0.8 kb DNA

断片を使用した。ハイブリダイゼーションおよび mRNA の検出は ECL-direct nucleic acid labeling and detection kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いた。

## 【結果】

### 1. *mreA* の転写量の変化

Fig. 3-10 B に製麴中期以降 5 時間毎の *mreA* の経時的な転写量の変化を示す。仲仕事に相当する培養開始後 30 時間目で mRNA の転写量が最も多くなった。それ以後、転写量は徐々に減少し、培養開始後 45 時間目（出麴）では、かなり減少した。

### 2. イソアミルアルコールオキシダーゼ活性の変化

Fig. 3-10 C に本酵素活性と菌体量の変化を示す。酵素活性は菌体量にほぼ相関して上昇したが、製麴末期に近づくとその増加速度は減少した。

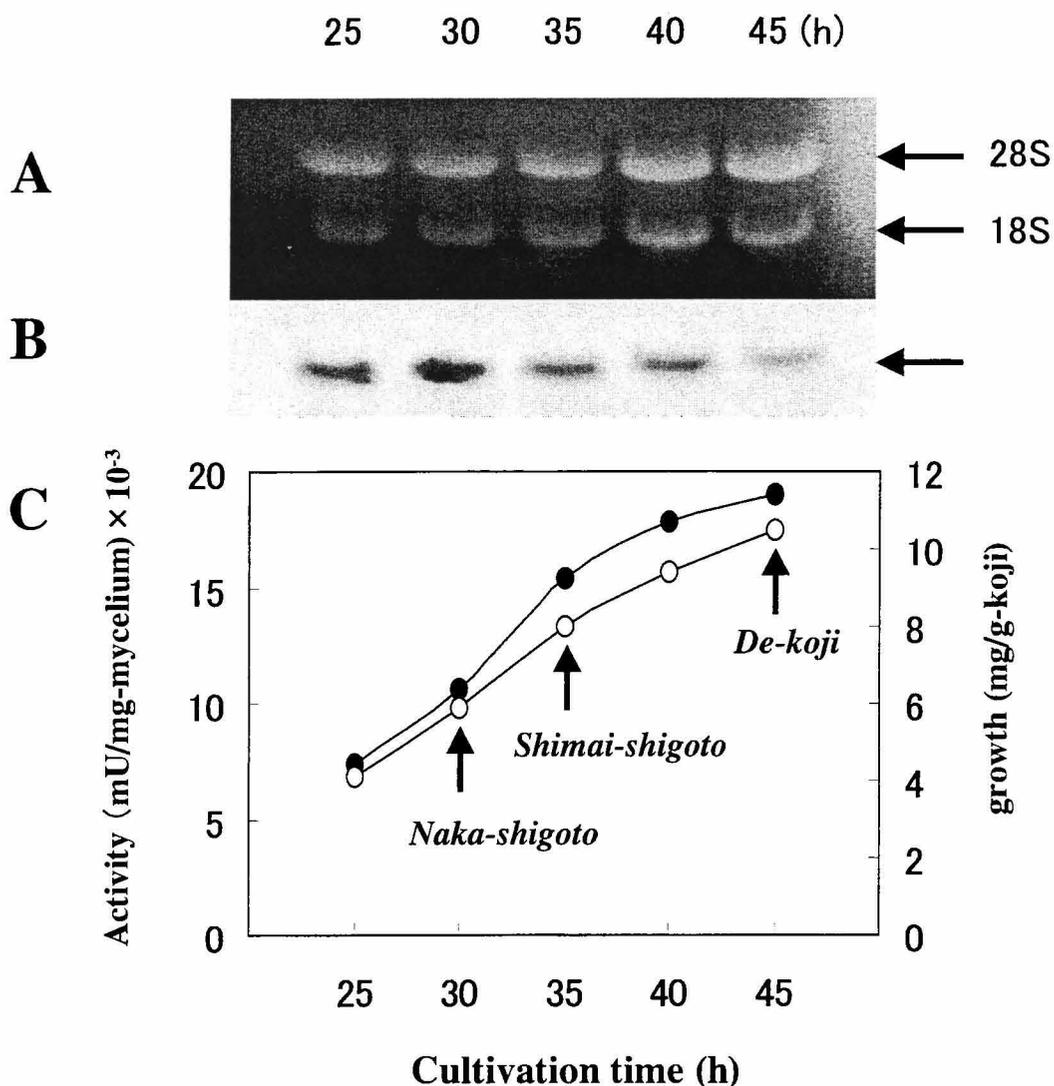


Fig. 3-10. Changes of isoamyl alcohol oxidase activity and mRNA transcription of *mreA* from the middle to final stage in koji making.

A, Gel stained with ethidium bromide. Ribosomal RNAs are indicated by arrows. B, Northern blot analysis of *mreA* transcription. Hybridization signals corresponding to mRNA of *mreA* are indicated by an arrow. C, Time course of enzyme production and growth of mycelium in koji making between 25 and 45 h (*de-koji*) after inoculation.

●, enzyme activity; ○, growth.

## 第6節 *Aspergillus* 属における *mreA* ホモローグの分布

### 【方法】

#### 1. 使用菌株

本節で使用した菌株のうち，麹菌 *A. oryzae* は白鶴酒造株式会社研究開発室の保存株を使用した。その他の *Aspergillus* 属菌株は，国税庁醸造研究所，発酵研究所，東京大学分子細胞生物研究所より分譲を受けた。

#### 2. ゲノムサザン解析

ゲノム DNA の調製は本章第2節方法2によった。ゲノム DNA は *Hind*III で完全消化後，本章第4節方法3にしたがって，サザンブロット解析を行った。

### 【結果】

#### *Aspergillus* 属における *mreA* ホモローグの分布

Fig. 3-11 に麹菌を含む *Aspergillus* 属菌株のサザンブロット解析の結果を示す。*A. oryzae* に属する菌株はすべて，2.6 kb の位置にハイブリダイゼーションに基づくシグナルバンドを示した。また，醤油麹菌 *A. tamarii* やアフラトキシン生産菌 *A. flavus* も同位置にシグナルを示した。また醤油麹菌 *A. sojae* やアフラトキシン生産菌 *A. parasiticus* では，異なる位置にシグナルを生じた。しかし，*A. nidulans* および黒麹菌に属する *A. niger* や *A. kawachii* ではシグナルを示さなかった。

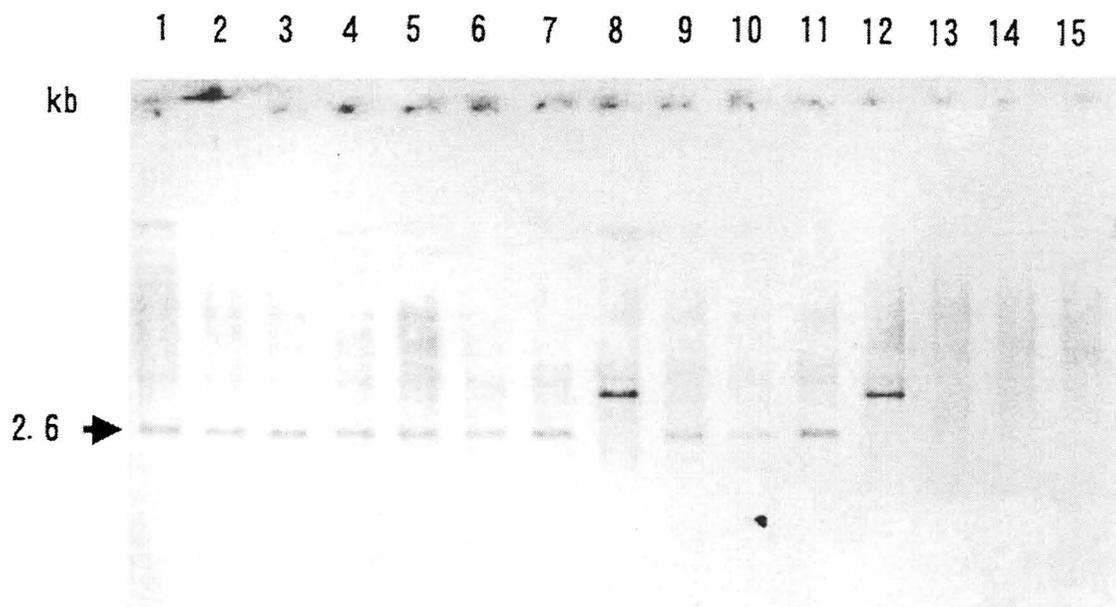


Fig. 3-11. Distribution of *mreA* homologue in *Aspergillus* strain.

Lane 1-7, *A. oryzae* strains; lane 8, *A. sojae* RIB 1045; lane 9, *A. tamaris* IAM 2502; lane 10, *A. flavus* IFO 30106; lane 11, *A. flavus* IFO 30107; lane 12, *A. parasiticus* IAM 13888; lane 13, *A. nidulans* FGSC 89; lane 14, *A. niger* IAM 2561; lane 15, *A. kawachii* IFO 4308.

## 第7節 要約と考察

当該遺伝子 *mreA* を含む DNA 断片中に見いだした 1,903 bp の ORF は 3 つの推定イントロン領域を含み、エクソン領域は 567 個のアミノ酸をコードすると推定された。成熟タンパク質の N 末端上流には Met で始まる 24 残基の疎水性に富む領域が存在し、これは本酵素の分泌シグナルを司るプレプロ配列と考える。本酵素は分泌性のタンパク質であり、ここで見いだした同配列は、本酵素の細胞外への分泌に関与すると考察した。

また、本酵素の推定アミノ酸配列中に N 結合型糖鎖結合モチーフである Asn-X-Ser (または Thr) を 9 カ所見いだした。本酵素は糖含量の高い糖タンパクであることから、酵素分子中の糖鎖は、上記モチーフ中の Asn 残基に結合していることが予想される。

推定アミノ酸配列の類似性検索を行った結果、本酵素に高い類似性を示すタンパクは、既報のアルコールオキシダーゼ含めて見いだせなかった。このことから本酵素は他のアルコールオキシダーゼとは分子進化上、異なる系統より発生したことが推察される。

*mreA* のプロモーター領域には、タカアミラーゼ遺伝子などの高発現遺伝子<sup>46-49)</sup>で見られる真核生物の典型的な転写因子認識配列 TATAAA は見いだせなかった。しかし、翻訳開始コドンから 300 bp 以上上流に TATA 様、CAAT 様配列が各 1 カ所認められた。これらの結果から、麹菌の生産するイソアミルアルコールオキシダーゼが微量であるのは、本遺伝子の転写活性の低さに起因すると考察した。そこで、本遺伝子の ORF 領域をタカアミラーゼプロモーター下に連結し、デキストリンを炭素源とする培地で誘導したところ、麹菌培養上清中のイソアミルアルコールオキシダーゼ活性を 800 倍に上昇させることができた。この結果より、本酵素の分泌生産が微量である要因は本遺伝子のプロモーター活性の低さにあると結論した。

製麹工程において本遺伝子に由来する mRNA の転写量を調べた結果、仲仕事に当たる 30 時間目で最大となった。

*mreA* ホモログは、試験した *Aspergillus* 属菌株のうち黄麹菌に属する菌株にはすべて分布した。しかし、*mreA* を含

む DNA 断片の示すシグナル位置により, *A. oryzae* 型 (*A. oryzae*, *A. tamarisii*, *A. flavus*) とそれ以外のタイプ (*A. sojae*, *A. parasiticus*) に分類された. *A. oryzae* は *A. flavus* と *A. sojae* は *A. parasiticus* とそれぞれ, DNA レベルで相同性が高いことが報告されている<sup>50)</sup>. また黒麹菌に属する菌株では *mreA* ホモローグは検出されなかった. これらの結果は, *mreA* 遺伝子が各菌株の持つ遺伝的背景を反映することを示している.

## 第4章 イソアミルアルコールオキシダーゼ低生産性麹菌 変異株の創製

### 第1節 序

第4章では、イソアミルアルコールオキシダーゼ低生産性変異株を育種し、これを使用して限外ろ過処理の操作の不要なムレ香の発生しにくい清酒を醸造することを目的とする。

清酒麹菌の育種例としては鉄イオンによる着色防止を目的としたデフェリフェリクローム非生産性麹菌<sup>51)</sup>、アミノ酸による雑味や貯蔵劣化の防止を目的とした酸性カルボキシペプチダーゼ低生産性麹菌<sup>52)</sup>、吟醸酒用麹菌<sup>53)</sup>などの報告があるが、劣化臭の発生防止を目的とした育種例はない。高いグルコアミラーゼ活性を持つ清酒麹菌 *A. oryzae* RIB 128 の分生胞子に紫外線を照射し、イソアミルアルコールオキシダーゼ活性が低下した変異株を得る。本変異株の分生胞子を用い、スケールアップした製麹テストにおいて、蒸米における変異株の増殖性、各種の酵素活性等を評価する。

また、変異株を用いて製造した麹を用いて、総米 1 kg スケールの清酒醸造仕込み試験を行う。醪を液体部分と固体部分に分離（上槽操作）した後、得られた新酒の酒質について一般分析、官能検査を行う。さらに、イソアミルアルコールオキシダーゼが作用しやすい温度条件で生酒を貯蔵し、イソバレルアルデヒドの生成試験および官能検査を経時的に行う。

### 第2節 変異株の分離と特性

#### 【方法】

#### 1. 変異処理

*A. oryzae* RIB 128 を PDA 培地で 7 日間培養し、着生した分生胞子を回収後、0.01% (w/v) Tween 80 溶液に  $2 \times 10^6$  個/ml になるよう懸濁した。懸濁液 5 ml をアルミ製の小型秤量皿に移し、紫外線の光源 (15 W) から 15 cm の位置において、攪拌しながら 4 分間照射した。照射後約 1 時間、光を遮断して静置し、変異処理した懸濁液を希釈して PDA 平板培地の塗抹した。

#### 2. 麹中のイソアミルアルコールオキシダーゼ活性の評価

10 ml 容ヘッドスペースガスクロマトグラフィー用バイア

ル瓶に、滅菌した $\alpha$ 化米 2.5 gを加え、 $\alpha$ 化米 1 gあたり分生胞子が $10^6$ 個になるよう分生胞子懸濁液を接種し、 $35^{\circ}\text{C}$ 、42時間培養して麴を調製した。これに、0.2 M 酢酸緩衝液(pH 4.5) 7.5 ml, イソアミルアルコール 10  $\mu\text{l}$ , アンピシリン(終濃度 100  $\mu\text{g/ml}$ )を添加し、 $30^{\circ}\text{C}$ で5日間静置反応させた。熱処理( $100^{\circ}\text{C}$ , 2分)を行い、酵素反応を停止させた後、生成したイソバレルアルデヒドをガスクロマトグラフィーにより定量した。

## 【結果】

1. *A. oryzae* 菌株のイソアミルアルコールオキシダーゼ活性  
既知の *A. oryzae* 属菌株の中でイソアミルアルコールオキシダーゼ低生産性株を得るため、本酵素活性の生産性を調べ、結果を Fig. 4-1 に示す。対照として、*Aspergillus* 属の 7 菌株を用いた。*A. oryzae* に属する 3 菌株は同酵素活性が際だって高く、*A. oryzae* に近縁な醤油麴菌 *A. tamarii* も比較的高い活性を示した。また、黒麴菌に属する *A. niger*, *A. shirousamii*, *A. kawachii* は黄麴菌に属する *A. oryzae*, *A. soyae*, *A. tamarii*, *A. fluvus*, *A. parasiticus* に比較して、活性は低かった。Fig. 4-1 には示していない *A. oryzae* 属の 30 菌株について本酵素活性を測定したが、低生産性株は見いだせなかった。
2. イソアミルアルコールオキシダーゼ活性の低い変異株の分離

*A. oryzae* RIB 128 の分生胞子に紫外線照射を行い、生存コロニー 1,000 株を得た。生存率は約 0.3%であった。得られた菌株の中から、親株に対して 1/2 以下のイソアミルアルコールオキシダーゼ活性を示し生育良好な 5 株を選抜した。5 株のうち、蒸米 150 g を用いた製麴試験において、生育が良好で高いグルコアミラーゼ活性を示した 128-161<sup>54)</sup> および 128-651 株を最終的に得た。これらを PDA 培地で 10 回継代培養し、形質の安定性を確認した。

これらの株は親株に比較して、一般的な形態的、生理学的特徴に違いは見られなかったが、麴の褐変性が低く、寒天培地培養時も、培地の着色が少ないという特徴が見られた。

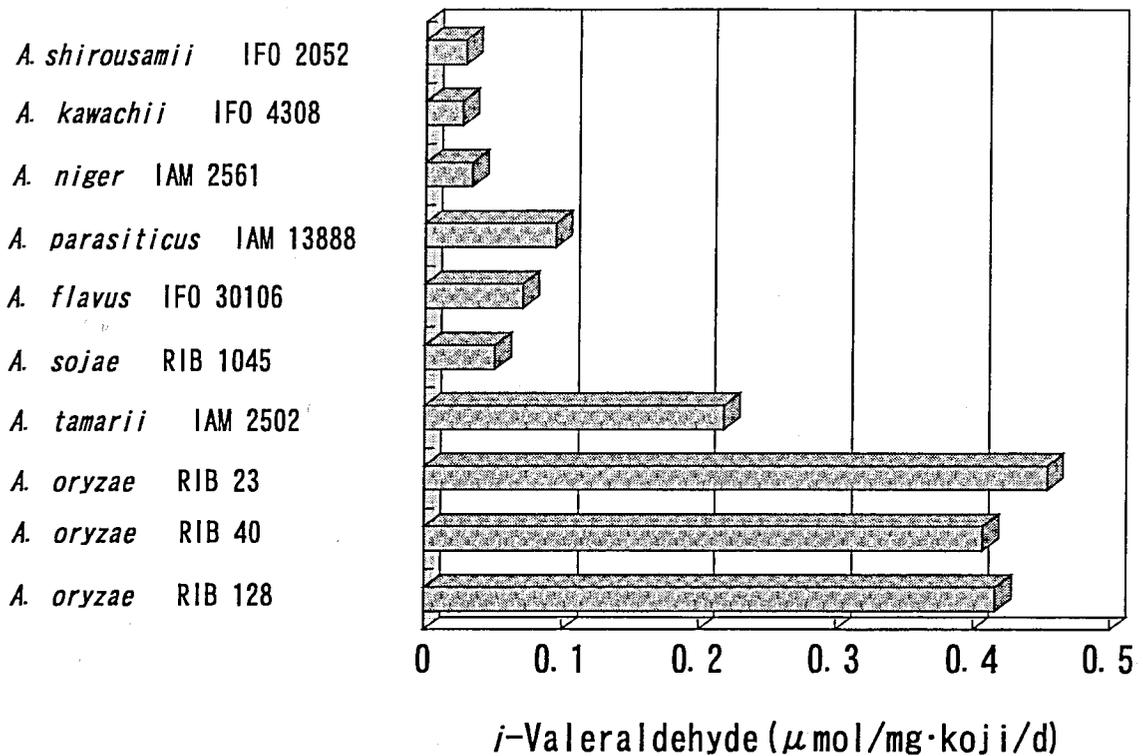


Fig. 4-1. Comparison of isoamyl alcohol oxidase activity among *Aspergillus* strains.

### 第3節 清酒醸造試験および生貯蔵におけるムレ香の低減化 【方法】

#### 1. 粉状もやしの調製

変異株 128-161 および 128-651、親株 *A. oryzae* RIB 128 を用いて、粉状もやしの大量調製を行った。蒸米（90%（w/w）精米）に対して 1%（w/w）木灰を加えた後、オートクレーブ殺菌し、これに各菌株から得た分生胞子を接種した。30℃で3日間培養し、分生胞子が十分着生した米粒（粒もやし）を得た。回収した米粒を減圧下で乾燥した後、ふるいにかけて、分生胞子を米粒から回収した。これを粉状もやしとして製麴実験に使用した。

#### 2. 製麴試験

スケールアップした製麴試験はシャーレ法で行った。白米は精米歩合 70% の日本晴を使用した。前項で調製した粉状もやしを散布する形で蒸米に接種し、VP-200 型プログラム付恒温恒湿機（ナガノ科学）で製麴を行った。分生胞子の接種量

は約  $10^6$  個/蒸米・g とした。製麴条件， $32^{\circ}\text{C}$ ，RH 95%（24 時間）， $35^{\circ}\text{C}$ ，RH 90%（10 時間）， $38^{\circ}\text{C}$ ，RH 85%（8 時間）で 42 時間培養後，出麴した。

### 3. 麴の分析

麴中の  $\alpha$ -アミラーゼ，グルコアミラーゼ，酸性プロテアーゼ，酸性カルボキシペプチダーゼは、国税庁所定分析法<sup>55)</sup>により分析した。麴の褐変度は、麴を 0.2M 酢酸緩衝液

(pH5.0)-0.5 M NaCl にて抽出し，残渣を濾紙上に 2 日間放置したのち，目視にて判定した。

### 4. 清酒醸造仕込み試験

Table. 4-1 に示す仕込み配合により，総米 1 kg の清酒醸造を行った。協会 701 号清酒酵母を使用した酵母仕込みによった。発酵温度は  $15^{\circ}\text{C}$  であった。

### 5. 新酒の分析および官能検査

一般分析は国税庁所定分析法に従った。新酒中の香気成分はヘッドスペースガスクロマトグラフィーにより定量した<sup>56)</sup>。官能検査は 7 名の試験者で行い，5 点法で評価した。

### 6. 生酒貯蔵試験および官能検査

生酒 100 ml を  $0.2\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターにて濾過滅菌後，300 ml 容の褐色瓶に入れ， $30^{\circ}\text{C}$  で 5 週間貯蔵した。貯蔵後の官能検査は，ムレ香を明瞭に認知できる試験者 6 名で行い，ムレ香強度を 3 段階で評価した。

Table 4-1. Comparison of starting materials for sake brewing tests.

Starting material		Step			Total
		<i>Hatsu-zoe</i>	<i>Naka-zoe</i>	<i>Tome-zoe</i>	
Total rice	(g)	175	325	500	1000
Steamed rice	(g)	125	275	400	800
Rice koji	(g)	50	50	100	200
Water	(ml)	249.4	375	700	1324.4
Lactic acid	(ml)	0.6			0.6
Yeast suspension <sup>a</sup>	(ml)	25			25

<sup>a</sup> Kyokai No. 701,  $2 \times 10^8$  cells/ml

## 【結果】

### 1. 製麴試験

Table 4-2 に、シャーレ内で調製した麴の分析結果を示す。変異株で調製した麴のイソアミルアルコールオキシダーゼ活性は、親株で調製した麴および市販麴の 1/3 であった。また、両変異株で調製した麴において、清酒醪発酵の律速となるグルコアミラーゼ活性は市販麴より高い値を示した。従って、変異株で調製した麴は、清酒醸造に用いることが可能であった。褐変度試験の結果、変異株 128-161 は親株の持つ褐変性を消失していた。

### 2. 変異株を用いた清酒醸造仕込み試験

清酒醸造仕込み試験において、炭酸ガスの減少量が 325 g に達した時点で上槽を行った。変異株 128-161 から調製した麴を用いると、親株に比べ醪日数が 3 日、変異株 128-651 の場合には 2 日、それぞれ長くなった。しかし、市販麴に比べると両変異株由来の麴を用いた場合は 1~2 日短かった。上槽、濾過した後の新酒の一般分析値、官能検査平均値、香氣成分組成分析値を Table 4-3 に示す。変異株由来麴を用いて醸造した新酒は、酸度、アミノ酸度が、親株、市販麴を用いた場合に比べて低かった。官能検査においても、異味異臭のマイナス評価はなく、評価平均値は親株、市販麴を用いて醸造した新酒に比べてやや高かった。また、香氣成分はイソバレルアルデヒドを除いて、変異株および親株由来麴、市販麴間に

において顕著な差は見られなかった。

### 3. 生酒貯蔵中におけるイソバレルアルデヒドの変化

生貯蔵中におけるイソバレルアルデヒド濃度の変化を Fig. 4-2 に示す。親株および市販麹菌を使用して醸造した生酒中のイソバレルアルデヒド濃度は、貯蔵開始後、直線的に増加し、28日後、ムレ香の官能閾値である 1.8ppm<sup>14)</sup>に達した。一方、変異株 128-161, 128-651 を用いて醸造した生酒は、親株や市販麹に比べて増加速度が遅く、貯蔵開始 35 日後においても、128-161 株が 0.48 ppm, 128-651 株が 0.50 ppm であり、官能閾値を大きく下回った。

### 4. 貯蔵生酒の官能検査による評価

官能検査の評価結果を Table 4-5 に示す。親株および市販麹菌を使用して醸造した生酒は試験者全員がムレ香を指摘したが、128-161 株を使用して醸造した生酒に対してはムレ香の指摘はなかった。128-651 株の場合には 1 名の指摘があったが、そのムレ香強度は親株や市販麹に比べて低かった。

Table 4-2. Properties of rice koji prepared using mutants.

		Mutant		Parent RIB 128	Rice koji <sup>c</sup>
		128-161	128-651		
$\alpha$ -Amylase	(U/g·koji)	680	763	1,100	1,000
Glucosylase	(U/g·koji)	190	272	320	180
Acid protease	(U/g·koji)	2,100	2,300	2,600	2,400
ACPase <sup>a</sup>	(U/g·koji)	3,300	6,800	10,000	7,000
Isoamyl alcohol oxidase		1.4 <sup>b</sup>	1.9	4.3	4.5
Browning degree (-, +, ++)		-	+	++	-
Weight of mycelium (mg/g·koji)		6.0	6.4	6.9	6.5

<sup>a</sup> Acid carboxypeptidase.

<sup>b</sup> Isovaleraldehyde,  $\mu$  mol/g of koji·d.

<sup>c</sup> Obtained commercially.

Table 4-3. Composition of fresh sake in brewing test.

	Mutants		Parent RIB 128	Rice koji <sup>b</sup>
	128-161	128-651		
Fermentation days	13	12	10	14
Sake meter (+, -)	-0.4	-1.2	-2.4	-0.8
Alcohol (% v/v)	18.7	18.6	18.8	18.7
Acidity (ml)	2.5	2.6	2.9	2.7
Amino acidity (ml)	1.4	1.6	2.0	1.8
Sensory evaluation <sup>a</sup>	2.1	2.4	2.9	2.7
<i>n</i> -Propyl alcohol (ppm)	110	120	130	100
Isobutyl alcohol (ppm)	65	76	68	71
Isoamyl alcohol (ppm)	160	180	180	190
Ethylacetate (ppm)	65	78	66	64
Isoamylacetate (ppm)	5.3	5.8	6.0	5.9
Ethylcaproate (ppm)	0.87	0.82	0.76	0.76
Isovaleraldehyde (ppm)	0.19	0.24	0.39	0.41

<sup>a</sup> Measured by 7 panels. See the text for details.

<sup>b</sup> Obtained commercially.

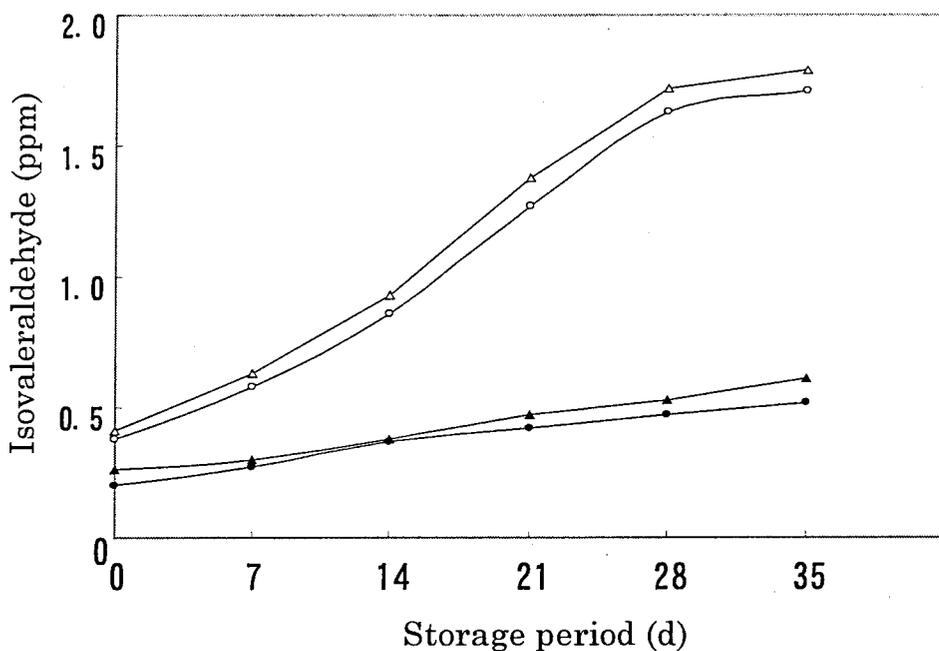


Fig. 4-2. Changes of the concentration of isovaleraldehyde in non-pasteurized sake during the storage at 30°C.

●, non-pasteurized sake produced using mutant 128 - 161 ; ▲, mutant 128-651 ; ○, parent strain; △, koji obtained commercially.

Table 4-4. Sensory evaluation of *mureka* in non-pasteurized sake after the storage at 30°C for 30 d.

Panel <sup>a</sup>	Mutants		Parent strain RIB 128	Rice koji <sup>c</sup>
	128-161	128-651		
a	- <sup>b</sup>	-	++	++
b	-	-	++	++
c	-	-	+	++
d	-	-	++	++
e	-	+	++	++
f	-	-	+	+

<sup>a</sup> Six panels joined in the tests.

<sup>b</sup> *Mureka* intensity: -, non; +, weak; ++, strong.

<sup>c</sup> Commercially obtained.

#### 第4節 要約と考察

*Aspergillus* 属各菌株を用いて調製した米麴中のイソアミルアルコールオキシダーゼ活性は、*A. oryzae* に属する菌株において特に高い活性を示した。紫外線を用いた変異処理法により、清酒麴菌 *A. oryzae* RIB 128 からイソアミルアルコールオキシダーゼ低生産性変異株 2 株 (128-161, 128-651) を得た。2 株の醸造特性を調べた結果、親株に比べて主要酵素活性が低下していたが、市販麴を用いた場合と比較すると、グルコアミラーゼ活性やや高いレベルにあり、醪の発酵性や新酒の酒質は良好であった。

上述したように、上記 2 株は本酵素を含め、主要酵素活性が親株より有意に低下していた。このことから、両株は酵素タンパク質の生合成系もしくは分泌系に何らかの異常を生じた変異株であると考察した。しかし、その生理学的な変異機構についての検討は十分なされていない。したがって、本変異株のイソアミルアルコールオキシダーゼ低生産機構については本酵素をコードする遺伝子レベルでの解析を含め今後の検討課題と考える。

生酒貯蔵試験において変異株を用いて醸造した生酒中のイソバレルアルデヒド量は、親株および市販麴に比べて 1/3 であり、30℃で 1 ヶ月貯蔵後もムレ香の官能閾値を大きく下回っていた。ムレ香の官能検査を行った結果、親株および市販麴を使用して醸造した生酒に対しては、試験者全員がムレ香を指摘したが、変異株 2 株を使用して醸造した生酒に対してはムレ香の指摘がほとんどなかった。

以上の結果から、本章で得られた変異株はムレ香の発生しない生酒の製造に極めて有効であると結論した。

## 総括

本論文では生酒の劣化臭であるムレ香の本体，イソバレルアルデヒドの生成に関与する麹菌 *A. oryzae* 由来新規アルコールオキシダーゼの諸特性の解明と，その低減化を目的として研究を進め，以下のような成果を得ることができた。

麹菌の液体培養上清中に，イソアミルアルコールからイソバレルアルデヒドを生成する酵素活性を見いだした。本酵素は，指数増殖期前期から培養上清中に活性が検出されること，全増殖期間において総活性，比活性とも，培養上清中の活性が無細胞抽出液より高い値を示したことから，本酵素は麹菌の細胞外に分泌生産されることがわかった。本酵素はアルキルアルコールに作用を示す分泌型のオキシダーゼとしては最初の報告例である。また，本酵素はイソアミルアルコール非存在下の培地においても構成的に生合成されることを見いだした。構成的に生合成されるアルコールオキシダーゼは，本研究以外では報告されていない。

酵素生産に与える炭素源の影響を調べた結果，グリセロール，グルコース，デキストリンの順で，高い酵素生産性を示した。

本酵素を大量に得るため，酵素の供給源を検討した結果，生酒の限外濾過による濃縮液において最も高い酵素活性を見いだした。また，本菌の固体培養物である米麹の場合，菌体量あたりの本酵素生産量は液体培養した場合に比較して 57 倍に達した。また，生酒の濃縮液が最も高い酵素活性を示したことから，本濃縮液が酵素精製のための供給源として使用できることがわかった。特に，単位容量あたりの活性が，他の供給源に比べて際だって高かった。このことから，本酵素が限外濾過処理によりかなり効率的に分画，濃縮されていると考えらる。またこれらの結果から，本酵素は清酒中において比較的安定であること，酒粕画分に移行しにくいこと，分子質量が 30 kDa より大きいタンパク質であることがわかった。

生酒の限外濾過濃縮液を精製のための出発物質として各種カラムクロマトグラフィーを行い，電気泳動的に単一な酵素を得ることができた。本酵素は分子質量 73 kDa の単量体で

あった。酵母 *P. pastoris* のアルコールオキシダーゼは分子質量 300 kDa のホモ 4 量体であり<sup>17)</sup>、*C. boidinii* や *H. polymorpha* の同酵素は分子質量 670 kDa のホモ 8 量体と報告されている<sup>19)</sup>。また、担子菌 *Basidiomycete* のアルコールオキシダーゼは分子質量 300 kDa 以上の多量体である<sup>23)</sup>。このように既報のアルコールオキシダーゼはすべて、サブユニット構造をとる細胞内酵素であり、麴菌由来の本酵素はこの点でも特異なアルコールオキシダーゼと言える。

本酵素は糖を約 20% 含む糖タンパク質であった。ペプチド *N*-グリコシダーゼ、エンド-*O*-グリコシダーゼ、シアリダーゼ A の 3 種のグリコシダーゼ共存下でのみ、糖鎖を分解・除去ができたことから、一般的な *N* 結合型糖鎖とは異なるタイプの糖鎖が結合していると考えられる。多量の糖鎖の結合は、タンパク質分子の立体構造を安定化し、酵素の pH 安定性や温度安定性の向上に寄与する<sup>32)</sup>。また、糖鎖の結合により酵素の親水性が増加する。本酵素においても、糖鎖の結合が清酒中での安定性や溶解性に寄与していると考えられる。

本酵素の吸収スペクトルと還元剤の添加による吸収スペクトルの変化から、本酵素はフラビントタンパク質であると考えられる<sup>33)</sup>。しかし、トリクロロ酢酸による処理でもフラビン化合物は遊離しなかったことから、フラビン化合物は本酵素に共有結合している考察した。

本酵素は pH 4.5 において最大活性を示した。また、pH 3.0 ~ 6.0 で安定であった。清酒の pH は通常 4.2 ~ 4.5 の範囲にあり、このような pH 特性は、本酵素が清酒中で作用しやすく、失活しにくい酵素タンパク質であることを示している。本酵素は 45℃ までは活性を保持したが、50℃ を越えると急激に安定性は低下し、65℃、15 分間の処理で完全に失活した。この結果は、通常清酒の火入れ（熱処理）条件において、本酵素を完全に失活させることができることを示している。

本酵素は C5 の分枝鎖アルコールであるイソアミルアルコールに対して、突出して高い活性を示した。本酵素は C5 の直鎖アルコールと C6 の直鎖あるいは分枝鎖アルコールに対して微弱な活性を示したが、C4 以下、C7 以上の炭素数を持つアルキルアルコールに対しては全く活性を示さなかった。このような基質特異性を示すアルコールオキシダーゼはこれ

までに未報告であり，本酵素は基質特異性に関しても極めて特異なアルコールオキシダーゼと言える。

本酵素の精製標品を清酒に添加することによって，ムレ香の本体であるイソバレルアルデヒドが顕著に発生することをGC-MSにより証明した。本結果および基質特異性に基づいて，本酵素をイソアミルアルコールオキシダーゼと命名した。イソアミルアルコールを基質とした場合，本酵素の  $K_m$  値は 30 mM であった。この値は他のアルコールオキシダーゼと比較して 2 桁高かった。清酒中のイソアミルアルコール濃度は通常，1.25～3 mM であることを考慮すると<sup>34)</sup>，生酒中におけるムレ香発生の反応は緩慢に進むと考えられる。

本酵素遺伝子 *mreA* を含む DNA 断片中に見いだした 1,903 bp の ORF は，3 つの推定イントロン領域を含み，エクソン領域は 567 個のアミノ酸をコードすると推定した。成熟タンパク質の N 末端上流には Met で始まる 24 残基の疎水性に富む領域が存在し，これは本酵素の分泌シグナルを司るプレプロ配列と考えられた。本酵素は分泌性のタンパク質であり，ここで見いだした同配列は，本酵素の細胞外への分泌に関与すると考察した。また，本酵素の推定アミノ酸配列中に N 結合型糖鎖付加モチーフである Asn-X-Ser (または Thr) を 9 カ所見いだした。本酵素は糖含量の高い糖タンパク質であることから，酵素分子中の糖鎖は，上記モチーフ中の Asn 残基に結合していることが予想される。

推定アミノ酸配列の類似性検索を行った結果，本酵素に高い類似性を示すタンパク質は，既報のアルコールオキシダーゼ含めて見いだせなかった。このことから本酵素は他のアルコールオキシダーゼとは分子進化上，異なる系統より発生したことが予想される。

*mreA* のプロモーター領域には，タカアミラーゼ遺伝子などの高発現遺伝子で見られる真核生物の典型的な転写因子認識配列 TATAAA は見いだせなかった。しかし，翻訳開始コドンから 300 bp 上流に TATA 様，CAAT 様配列が各 1 カ所認められた。これらの結果から，麹菌の生産するイソアミルアルコールオキシダーゼが微量であるのは，本遺伝子の転写活性の低さに起因すると推察した。そこで，本遺伝子をタカアミラーゼプロモーター下に連結し，デキストリンを炭素源とす

る培地で酵素生成を誘導したところ、培養上清中のイソアミルアルコールオキシダーゼ活性を、本遺伝子を連結しない場合と比較して 800 倍に上昇させることができた。

製麴工程において本遺伝子に由来する mRNA の転写量を調べ、仲仕事に当たる 30 時間目で最大となることを示した。

*mreA* ホモローグは、試験した *Aspergillus* 属菌株のうち黄麴菌に属する菌株にはすべて分布していた。しかし、*mreA* を含む DNA 断片の示すシグナル位置により、*A. oryzae* 型 (*A. oryzae*, *A. tamarisii*, *A. flavus*) とそれ以外のタイプ (*A. sojae*, *A. parasiticus*) に分類された。*A. oryzae* は *A. flavus* と、*A. sojae* は *A. parasiticus* とそれぞれ、DNA レベルで相同性が高いことが報告されている<sup>48)</sup>。また黒麴菌に属する菌株には *mreA* ホモローグは検出されなかった。これらの結果は、*mreA* 遺伝子が各菌株の持つ遺伝的背景を反映することを示している。

*Aspergillus* 属各菌株を用いて調製した米麴中のイソアミルアルコールオキシダーゼ活性は、*A. oryzae* に属する菌株において特に高い活性を示した。紫外線を用いた変異処理により、清酒麴菌 *A. oryzae* RIB 128 からイソアミルアルコールオキシダーゼ低生産性株 2 株を得た。2 株の醸造特性を調べた結果、親株に比べて主要な酵素の活性が低下していたが、市販麴を用いた場合と比較すると、グルコアミラーゼ活性はやや高いレベルにあり、醪の発酵性や新酒の酒質は良好であった。

生酒貯蔵試験において、変異株を用いて醸造した生酒中のイソバレルアルデヒド量は親株および市販麴に比べて 1/3 であり、30℃ で 1 ヶ月貯蔵した後もムレ香の官能閾値を大きく下回っていた。ムレ香の官能検査を行った結果、親株および市販麴を使用して醸造した生酒に対しては試験者全員がムレ香を指摘したが、変異株 2 株 (128-161, 128-651) を使用して醸造した生酒に対しては、ムレ香の指摘はほとんどなかった。以上の結果から、本研究で得られた変異株はムレ香の発生しない生酒の製造に極めて有効であると結論した。

上記 2 株は本酵素を含め、主要酵素活性が親株より有意に低下していた。このことから、両株は酵素タンパク質の生合成系もしくは分泌系に何らかの異常を生じた変異株であると

考察した。

今後の課題として、基礎的な領域としては未だ不明な本酵素の生理的意義の解明であり、応用開発の領域では分子育種法によるムレ香非生成麹菌の育種である。2つの課題は、本研究において取得した *mreA* 遺伝子を有効に活用することにより達成することが可能である。すなわち、本遺伝子を破壊したヌル変異株を得た後、それらを用いた製麹試験や醸造試験を経てムレ香を生成しない新規な変異株を選択することができると考える。しかしながら、このような変異株は遺伝子組換え体となる。現状において、わが国では遺伝子組換え体を用いた食品に対する消費者の容認意識はまだまだ厳しいものがある。この点については、将来、意識の緩和が予想されるが、現段階では遺伝子組換え麹菌を使用した清酒が市場において容易に受け入れられる可能性は低い。したがって、当面は本研究において古典的な手法で取得したイソアミルアルコールオキシダーゼ低生産性変異株の実用化、およびその改良という課題の達成が重要と考える。

## 要約

本論文では、麹菌 *Aspergillus oryzae* の生産するムレ香生成酵素の諸特性を解明した。本酵素は新規な細胞外アルコールオキシダーゼであり、イソアミルアルコールに対して特異的に活性を示すことがわかった。その触媒特性から本酵素をイソアミルアルコールオキシダーゼと命名した。また、本酵素をコードする遺伝子 (*mreA*) のクローニングと解析を行った。更に、生酒におけるムレ香の発生防止を目的として、本酵素活性の低下した変異株を創製した。

まず、麹菌によるムレ香生成酵素の生産について検討した。液体培養において、本酵素の活性は指数増殖期初期から培養上清中に見いだされ、定常期において最大となった。

また、培養期間を通じて、総活性、比活性とも培養上清中の活性が細胞抽出液中の活性よりも、明瞭に高い値を示した。これらの結果より、本酵素は細胞外酵素であると結論した。

また本酵素は基質であるイソアミルアルコールにより誘導されなかった。一方、グリセロールは本酵素生産の増加に対し、最も有効な炭素源であった。

次に、本酵素の精製を目的として、粗酵素の供給源について比較検討した。検討した供給源の中で、限外ろ過により濃縮した生酒が最も高い酵素活性を示した。生酒の限外ろ過濃縮液を初発粗酵素として、SP-Toyopearl 550C, Butyl-Toyopearl 650M, SP-Toyopearl 650S, Toyopearl HW-55S を用いたカラムクロマトグラフィーを行い、単一な精製酵素標品を得た。

本酵素は糖成分を 20% 含む分子質量 73 kDa の単量体酵素であった。本酵素はイソアミルアルコールに対し、特異的に高い活性を示した。同炭素数の *n*-アミルアルコールや *n*-ヘキサノール、イソヘキサノールに対して微弱な活性を示したが、それ以外の供試したアルキルアルコール類には全く活性を示さなかった。また本酵素は pH 3.0~6.0 の酸性下では安定であり、至適 pH は 4.5 であった。Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup> のような重金属イオン、SH 酵素阻害剤である *p*-クロロマーキュリー安息香酸、還元剤であるヒドラジン、ヒドロキシルアミン、抗酸化剤である L-アスコルビン酸などの試薬は本酵素を強く阻

害した。

本酵素の精製標品を加熱処理後の清酒に添加することにより、ムレ香の本体成分であるイソバレルアルデヒドが顕著に生成することを GC-MS により確認した。このことから、本酵素が清酒中におけるムレ香の発生に直接関与すると結論した。これらの知見およびその基質特異性などから、本酵素をイソアミルアルコールオキシダーゼと命名した。

次に精製酵素の部分アミノ酸配列に基づき作製した DNA プローブを用いて、イソアミルアルコールオキシダーゼをコードする遺伝子を麹菌からクローニングした。取得した遺伝子は推定イントロン領域を含む 1,903 bp のオープンリーディングフレームから成り、567 残基のアミノ酸をコードすると考えられた。成熟タンパク質の N 末端配列上流には 24 残基のシグナルペプチドと考えられる配列が見いだされた。更にアミノ酸コード領域には N 結合型糖鎖付加モチーフが 9 箇所存在した。翻訳アミノ酸配列についての類似性検索の結果、本酵素は一部の FAD 依存性酵素において見いだされる保存配列を有していることがわかった。また、ゲノムサザンプロット解析により、本遺伝子は麹菌の染色体中にシングルコピーで存在することがわかった。

本遺伝子を高いプロモーター活性をもつタカアミラーゼプロモーター下で過剰発現させた結果、培養上清中の本酵素活性は 800 培上昇した。この結果より、取得した遺伝子はイソアミルアルコールオキシダーゼをコードしていると結論し、本新規遺伝子を *mreA* と命名した。製麹工程におけるイソアミルアルコールオキシダーゼ活性は麹菌の増殖と相関して増加した。さらに、ノザンプロット解析により、*mreA* の mRNA の転写量は、製麹開始後、30 時間後に最大となることがわかった。生酒におけるムレ香の発生を防止するため、紫外線照射処理により、イソアミルアルコールオキシダーゼ低生産株の分離を試みた。スクリーニングの結果、得られた 2 株の変異株は、米麹のイソアミルアルコールオキシダーゼ活性が親株に比べ、1/3 に低下していた。これらの変異株を用いて、清酒醸造試験を行い官能的に良好な新酒を得た。得られた新酒を生貯蔵し、生酒中のイソバレルアルデヒド生成テストを実施した。上記の変異株 2 株を使用した酒は、親株を使用し

た酒に比べ、イソバレルアルデヒドの生成は明瞭に少なく、30℃、1ヶ月貯蔵後もムレ香の官能閾値を大きく下回っていた。貯蔵後の官能検査においてもムレ香の指摘はなかったことから、本変異株は生酒のムレ香発生防止に有効であると結論した。

## Summary

In this thesis, I aimed at the elucidation of molecular and catalytic properties of a *mureka*-forming enzyme produced from koji-mold, *Aspergillus oryzae*. I found that the enzyme was a novel extracellular alcohol oxidase acting specifically on isoamyl alcohol. On the basis of its catalytic characteristics, I named this enzyme isoamyl alcohol oxidase. The cloning and analysis of a gene encoding the enzyme and the construction of mutants lacking the enzyme activity are also described.

I first examined the production of a *mureka*-forming enzyme by *A. oryzae*. In submerged culture, the enzyme activity was observed at the early exponential phase and reached to the maximum at the stationary phase. The total and specific activities in the cultural supernatant were much higher than those in the cell-free extracts, indicating that this enzyme was secreted into the culture. Although the enzyme was not induced with isoamyl alcohol, glycerol was an effective carbon source for the enzyme production.

I searched for several sources for the enzyme purification. Brewed sake concentrated by ultrafiltration showed the highest enzyme activity of the enzymatic sources examined. I purified the enzyme from the concentrated sake to homogeneity by successive chromatography using SP-Toyopearl 550C, Butyl-Toyopearl 650M, SP-Toyopearl 650S, and Toyopearl HW-55S. This enzyme was a monomeric protein containing 20% carbohydrate with the molecular mass of 73 kDa by SDS-PAGE.

This enzyme showed high activity exclusively toward isoamyl alcohol, and a little toward *n*-amyl alcohol, *n*-hexanol, and isohexanol. However, it did not act on other alcohols tested. This enzyme was stable between pH 3.0 and 6.0 at 25°C. The optimum pH was 4.5 at 35°C. Heavy metal ions, *p*-chloromercuribenzoate, hydrazine,

hydroxylamine, and anti oxidants like L-ascorbate strongly inhibited the enzyme.

Isovaleraldehyde identified by GC-MS was produced copiously in the pasteurized sake by adding the purified enzyme. Therefore, I concluded that the enzyme caused the formation of *mureka*, an off-flavor of sake, the main component of which is isovaleraldehyde. On the basis of these findings, I named the enzyme isoamyl alcohol oxidase.

I cloned a genomic DNA sequence encoding isoamyl alcohol oxidase from *A. oryzae*, using a PCR-amplified DNA fragment corresponding to the partial amino acid sequences of the purified protein as a probe. The cloned gene comprised 1,903 bp of an open reading frame with three putative introns and encoded 567 amino acid residues with a presumed signal peptide consisting of 24 amino acid residues at the N-terminal region. Moreover, nine potential N-glycosylation sites were present. Homology search on the amino acid sequences showed that isoamyl alcohol oxidase has a region significantly similar to those conserved in only FAD-dependent oxidoreductases but not in other alcohol oxidases. Southern hybridization analysis revealed that the cloned gene exists as a single copy in the *A. oryzae* chromosome. The cloned gene was overexpressed under the control of the *amyB* promoter in *A. oryzae*. The isovaleraldehyde-producing activity in the culture supernatant of one transformant was over 800 times as high as that of a transformant with the control vector. This result demonstrates that the cloned gene encoded isoamyl alcohol oxidase. I named this novel alcohol oxidase gene *mreA*.

In koji making, isoamyl alcohol oxidase activity increased in correlation with the growth of mycelia of *A. oryzae*. In addition, northern blot analysis using partial fragment of *mreA* gene as a probe revealed that the transcribed mRNA from *mreA* reached to the maximum

after 30 h cultivation.

In order to prevent *mureka* development, I mutated *A. oryza* by irradiating its conidia with UV light. I obtained two mutants that showed lower isovaleraldehyde-forming activity by one third than the parent strain. I carried out sake brewing tests using these mutants. The produced non-pasteurized sake was stored for the tests liberating an isovaleraldehyde flavor. The sake brewed using the mutants produced isovaleraldehyde at a much lower rate than the sake brewed using the parent strain. In addition, the amount of the isovaleraldehyde produced after the storage at 30°C for 30 days was below the threshold value detectable.

## 参考文献

- 1) 近藤恭一, 草間 透, 中沢英五郎, 竹村茂三, 醸協, 79, 142-143 (1984).
- 2) 近藤恭一, 大場俊輝, 中村欽一, 醸協, 79, 267-270 (1984).
- 3) 西村 顕, 醸協, 84, 583-587 (1989).
- 4) 近藤恭一, 草間 透, 中沢英五郎, 竹村茂三, 醸協, 78, 303-305 (1983).
- 5) T. INOUE and Y. YAMAMOTO, Rept. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd., 14, p. 55 (1971).
- 6) H. J. NIEFIND and G. Spath, Proc. Congr. Eur. Brew.Conv., p. 459 (1971).
- 7) P. G. MEADEN and N. R. TAYLOR, J. Inst. Brew., 97, 353-357 (1991).
- 8) 原 昌道, 飯村 穰, 大塚謙一, 農化, 57, 897-907 (1980).
- 9) K. Yoshizawa, Agric. Biol. Chem., 28, 279-285 (1964).
- 10) 慶田雅洋, 醸協, 61, 888-891 (1966).
- 11) 山田正一, 藤井竜二, 吉沢 淑, 農化, 33, 195-197(1959).
- 12) 土肥和夫, 宮内俊一, 川本雅之, 醗酵工学, 52, 416-422(1974).
- 13) 西村 顕, 近藤恭一, 中沢英五郎, 三島秀夫, 竹村茂三, 醗酵工学, 67, 237-244 (1989).
- 14) 西村 顕, 元吉 徹, 近藤恭一, 中沢英五郎, 三島秀夫, 竹村茂三, 醸協, 85, 576-579 (1990).
- 15) 元吉 徹, 西村 顕, 近藤恭一, 中沢英五郎, 三島秀夫, 竹村茂三, 醗酵工学, 69, 1-6 (1991).
- 16) 西村 顕, 窪寺隆文, 元吉 徹, 近藤恭一, 生物工学, 74, 91-96 (1996).
- 17) R. N. Patel, C. T. Hou, A. I. Laskin, and P. Derelanko, Arch. Biochem. Biophys., 210, 481-488 (1981).
- 18) Y. Tani, T. Miya, and K. Ogata, Agric. Biol. Chem., 26, 76-83 (1972).
- 19) N. Kato, Y. Omori, Y. Tani, and K. Ogata, Eur. J.

- Biochem., 64, 341-350 (1976).
- 20) P. Koulz, G. R. Davis, C. Stillman, K. Barringer, J. Cregg, and G. Thill, *Yeast*, 5, 167-177 (1989).
  - 21) Y. Sakai and Y. Tani, *Gene*, 114, 67-73 (1992).
  - 22) A. M. Ledebøer, L. Edens, J. Maat, C. Visser, J. W. Bos, C. T. Verrips, Z. Janowicz, M. Eckart, R. Roggenkamp, , and C. P. Hollenberg, *Nucl. Acid Res.*, 13, 3063-3082 (1985).
  - 23) F. W. Janssen and H. W. Ruelius, *Biochim, Biophys. Acta*, 151, 330-342 (1968).
  - 24) R. Hommel and C. Ratledge, *FEMS Microbiol. Lett.*, 70, 183-188 (1990).
  - 25) F. M. Dickson and C. Wadforth, *Biochem. J.*, 282, 325-331 (1992).
  - 26) J. Savitha and C. Ratledge, *FEMS Microbiol. Lett.*, 80, 221-224 (1991).
  - 27) 西村 顕, 近藤恭一, 三島秀夫, 竹村茂三, 醸協, 90, 151-153 (1995).
  - 28) 第四回改正国税庁所定分析法注解 p. 214, 日本醸造協会 (1993).
  - 29) M. Wakayama, Y. Takeuchi, K. Tasaka, K. Sakai, and M. Moriguchi, *J. Ferment. Bioeng.*, 82, 177-179 (1996).
  - 30) 坂口謹一郎, 岡崎 浩, 竹内増親, 農化, 29, 349-353 (1955).
  - 31) T. Nakadai and S. Nasuno, *J. Ferment. Technol.*, 66, 525-533 (1988).
  - 32) B. J. Davis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404-427 (1964).
  - 33) U. K. Laemmli, *Nature*, 227, 680-685 (1970).
  - 34) R. D. Marshall, *Annu. Rev. Biochem.*, 41, 673-681 (1972).
  - 35) V. Massey, F. Muller, R. Feldberg, M. Schuman, P. A. Sullivan, L. G. Holl, S. G. Mayhew, R. G. Matthews, and G. P. Foust, *J. Biol. Chem.*, 244, 3999-4006 (1969).

- 36) 醸造物の成分 p. 21, 日本醸造協会 (1999).
- 37) D. Hanahan, *J. Mol. Biol.*, 166, 557 (1983).
- 38) S. Tsunasawa, T. Masaki, M. Hirose, M. Soejima, and F. Sakiyama, *J. Biol. Chem.*, 264, 3832 (1989).
- 39) S. J. Gurr, S. E. Unkles, and J. R. Kinghorn, "The Structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi." IRL Press, Oxford, p. 93-139 (1987).
- 40) J. Rambosek and J. Leach, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 6, 357-393 (1987).
- 41) P. Tudzynski, K. Holter, T. Correia, C. Arntz, N. Grammel, and U. Keller, *Mol. Gen. Genet.*, 261, 133-141 (1999).
- 42) H. Dittrich, and T. M. Kutchan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 66, 9969-9973 (1991).
- 43) R. Brandsch, V. Bichler, L. Mauch, and K. Decker, *J. Biol. Chem.*, 268, 12724-12729 (1993).
- 44) K. Gomi, , Y. Iimura, and S. Hara, 51, 2549-2555 (1987).
- 45) T. Fujii, H. Yamaoka, K. Gomi, K. Kitamoto, and C. Kumagai, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1869-1874 (1995).
- 46) S. Tada, Y. Iimura, K. Gomi, K. Takahashi, S. Hara, and K. Yoshizawa, *Agric. Biol. Chem.*, 53, 593-599 (1989).
- 47) Y. Hata, K. Tsuchiya, K. Kitamoto, K. Gomi, C. Kumagai, G. Tamura, and S. Hara, *Gene*, 108, 145-150 (1992).
- 48) Y. Hata, H. Ishida, E. Ichikawa, A. Kawato, K. Suginami, and S. Imayasu, *Gene*, 207, 127-134 (1998).
- 49) K. Gomi, K. Arikawa, N. Kamiya, K. Kitamoto, and C. Kumagai, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 1095-1100 (1993)
- 50) C. P. Kurtzman, M. J. Smiley, C. J. Robnet, and D. J. Wicklow, *Mycologia*, 78, 955 (1986).

- 51) 原 昌道，菅間誠之助，本郷和男，大場俊輝，長谷川佳広，村上英也，醗酵工学，52, 306-313 (1974).
- 52) 田中利雄，岡崎直人，五味勝也，今野 宏，井出光彦，醸協，79, 274-278 (1984).
- 53) 五味勝也，飯村 穰，辻 巖，井上 博，原 昌道，82, 425-429 (1987).
- 54) 窪寺隆文，山下伸雄，永井英雄，近藤恭一，特開平 9-70287.
- 55) 第四回改正国税庁所定分析法注解 p. 211, 日本醸造協会 (1993).
- 56) 第四回改正国税庁所定分析法注解 p. 273, 日本醸造協会 (1993).

## 謝 辞

本論文をまとめるにあたり，終始ご懇篤なるご指導，ご鞭撻を賜りました神戸大学青木健次教授，利根川孝教授，清水晃教授，福田秀樹教授に厚く御礼申し上げます．また有益なご教示を頂きました村上周一郎博士に感謝致します．

本研究の遂行にあたり，常にご配慮していただきました，白鶴酒造株式会社嘉納秀郎代表取締役社長，木下善郎取締役常務，花本秀生生産管理部部長，近藤恭一営業企画部次長，西村顕研究開発室長，元吉徹課長代理に深く感謝致します．

最後に本論文第4章の共同研究者である窪寺隆文氏をはじめとする白鶴酒造株式会社研究開発室の現スタッフ，OB諸氏には何かとご支援，ご協力を頂きました．この場を借りまして皆様に感謝の意を表します．