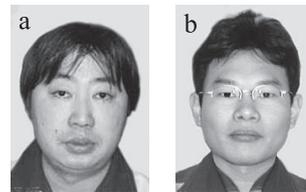


清酒麹菌の分子育種に関する研究

山下 伸雄^{a*}・窪寺 隆文^b



Studies on Molecular Breeding of Sake Koji Mold *Aspergillus oryzae*

NOBUO YAMASHITA* and TAKAFUMI KUBODERA (Research and Development Department, Hakutsuru Sake Brewing Co. Ltd., 4-5-5 Sumiyoshiminamimachi, Higashinada-ku, Kobe 658-0041) *Seibutsu-kogaku* **84**: 89-95, 2006.

The koji mold *Aspergillus oryzae* is one of the main microorganisms used in the Japanese brewing industry. In the sake brewing process, *A. oryzae* produces important hydrolytic enzymes, but also an unfavorable oxidative enzyme that is involved in the development of off-flavor, *mureka* in sake. We purified this trace enzyme (isoamyl alcohol oxidase) and characterized its unique enzymatic properties. We also cloned and characterized the gene encoding isoamyl alcohol oxidase for molecular breeding. This novel gene, *mreA* (GenBank accession No. AB48606), was named after the process of *mureka*. In the next study, to create a novel host-vector system for *A. oryzae*, we cloned the gene that confers pyrithiamine resistance on *A. oryzae* using the shotgun-cloning method and, for the first time with *A. oryzae*, successfully developed a transformation system with a drug-resistant gene (*ptrA*, GenBank accession No.E54863) as the dominant selectable marker. The *ptrA* gene is homologous to the *Saccharomyces cerevisiae* thiazole synthetase gene *THI4* and a mutant allele of the *A. oryzae thiA* gene which has the same function as *THI4*. We further elucidated the mechanism of pyrithiamine resistance: the resistant phenotype was demonstrated to be caused by mutation of the secondary structure of the TPP-riboswitch found for the first time in a eucaryote. Finally, we successfully obtained a non-*mureka*-producing koji mold by disruption of the *mreA* gene of the strain used for industrial sake brewing using a transformation system based on the *ptrA* gene. This molecular breeding method was considered to be more progressive and rational than the classical random mutagenesis method since the obtained *mreA* gene disruptants all have excellent brewing characteristics equal to those of the host strain and have no heterologous DNA sequence.

[Key words: *Aspergillus oryzae*, *mureka*, drug-resistant gene, transformation system]

はじめに

麹菌 *Aspergillus oryzae* はわが国において代表的な発酵工業微生物であり、清酒、醤油、味噌などの伝統食品産業のみならず、食品用酵素剤の給源等、きわめて高い産業的有用性を持つことから「国菌」とも称されている¹⁾。麹菌は清酒醸造において重要な加水分解酵素の生産を行うとともに、種々の代謝産物の生成を通じて、直接あるいは間接的に清酒の香味を形成するという役割を持つ。しかし、その一方では清酒の鉄分着色や酒粕の褐変など好ましくない現象も麹菌由来の代謝産物によって起きる

ことが知られており^{2,3)}、これらの現象を抑制するために欠点解消型の麹菌育種がしばしば行われてきた⁴⁻⁷⁾。これらの育種は変異処理を用いることが多く、親株と同等の清酒醸造特性を保持した株の取得は困難な面があった。そこで本研究においては麹菌に分子育種のアプローチを導入し、その可能性について検討した。具体的には生酒の劣化臭であるムレ香の非生産麹菌の育種を目標とし、①麹菌由来ムレ香生成酵素の生化学、分子生物学レベルでの解明、②野生型 *A. oryzae* を宿主に使用できる新規な形質転換システムの開発、③①で得られた遺伝子情報と②の形質転換システムを用いたムレ香非生産麹菌の分子

*著者紹介 白鶴酒造株式会社研究開発室 (主任研究員) E-mail: yamashita@hakutsuru.co.jp

育種を行った。さらに本研究の遂行過程において新規かつ興味深い学術的知見が得られたので、本稿ではその概要についても解説する。

ムレ香生成酵素の生化学および分子生物学的説明

ムレ香生成酵素の精製と諸特性の説明⁸⁾ 生酒のムレ香は青臭い香りのオフフレーバーであり、一度発生すると生酒の品質は著しく劣化する。このためムレ香の発生防止法としては貯蔵や流通段階において品温管理に注意が払われる他、限外ろ過 (UF) により生酒中の残存酵素を除去する方法が確立されている⁹⁾。ムレ香の主体成分であるイソバレルアルデヒド (*i*-Val) は生酒中において麹菌 *A. oryzae* により生産される酸化酵素 (ムレ香生成酵素) によりイソアミルアルコール (*i*-AmOH) から生成することが明らかにされていた¹⁰⁾。しかし本酵素は精製がなされておらず、その諸性質については長い間、不明であった。そこで著者らは本酵素の特性を解明すべく精製を試みた。酵素の精製に際し、出発物質となる粗酵素給源を麹菌の各培養物から求めようとしたが、本酵素はどの培養物においても微弱な活性しか検出されなかった。一方、生酒の UF 濃縮画分において本酵素活性は比較的高いレベルで検出されたため、本画分を粗酵素給源として用いた。製造現場で取得した UF 濃縮画分をさらにパイロットスケールの UF 濃縮装置 (分画分子質量 30 kDa) で最終的に原酒レベルの約 400 倍にまで濃縮し、同時に 20 mM の酢酸緩衝液 (pH 4.5) で置換したものを粗酵素標品とした。これより各種カラムクロマトグラフィーにより精製を進め、電気泳動的に均一な精製酵素標品を得ることができた。

精製酵素標品の分子質量は SDS-PAGE において約 73 kDa、HPLC-サイズ排除クロマトグラフィーにおいて約 87 kDa であり、このことから本酵素は単量体であると考えられた。また酵素を用いた糖鎖除去処理により SDS-PAGE での分子質量は約 59 kDa にシフトしたことから、約 20% の糖質を含むと考えられた (図 1)。一方、本酵素の至適 pH は 4.5 付近にあり、pH 3.0~6.0 の弱酸性域で安定であった。清酒の pH は通常 4.2~4.5 であることから本酵素の pH 特性は清酒中において安定かつ反応しやすいものであると考えられた。また本酵素の基質特異性は非常にユニークであり、炭素数 5 の分岐鎖アルコールである *i*-AmOH に対し、突出して高い反応性を示した (表 1)。このような基質特異性を持つ酵素は未報告であるため、本新規酵素を isoamyl alcohol oxidase (IAAOD) と命名した。加えて本酵素の N 末端はブロックされておらず Ala-Asp-Ser-Ser-Ser- であった。本酵素の諸特性を表 2 に示した。既知の酵母由来アルコールオキシダーゼ¹¹⁾

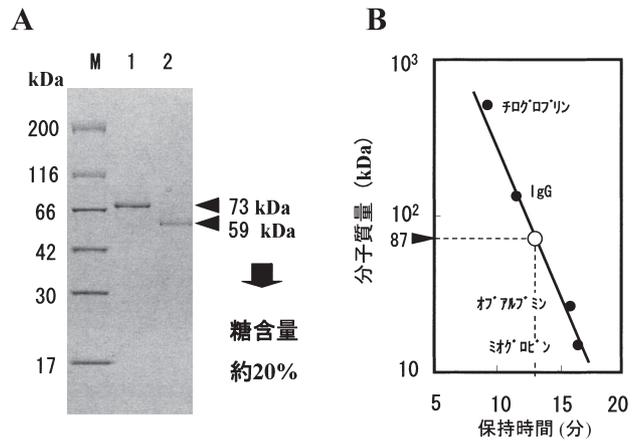


図 1. ムレ香生成酵素 (IAAOD) の分子質量. (A) SDS-PAGE. M, 分子量マーカー; 1, 精製標品; 2, 精製標品 (糖鎖除去後). (B) HPLC サイズ排除クロマトグラフィー.

表 1. ムレ香生成酵素 (IAAOD) の基質特異性

反応基質 (40 mM)	炭素数	相対活性 (%)
メタノール	1	0
エタノール	2	0
<i>n</i> -プロパノール	3	0
<i>i</i> -プロパノール	3	0
<i>n</i> -ブタノール	4	0
<i>i</i> -ブタノール	4	0
<i>n</i> -アミルアルコール	5	4
<i>i</i> -アミルアルコール	5	100
<i>n</i> -ヘキサノール	6	5
<i>i</i> -ヘキサノール	6	6
<i>n</i> -ヘプタノール	7	0
<i>n</i> -オクタノール	8	0
<i>n</i> -ノナノール	9	0
<i>n</i> -デカノール	10	0

酵素活性は LPBV-POD 法⁸⁾ によるオキシダーゼ活性測定法で行い、*i*-アミルアルコールに対する活性を 100% とした

とは、かなり異なる性質を持つものであることが分かる。

ムレ香生成酵素遺伝子の単離と解析^{12,13)} 清酒醸造において有用な酵素をコードする遺伝子は 1990 年代までにその多くが単離され、その転写制御機構などが分子生物学レベルで解明されつつある¹⁴⁻¹⁹⁾。著者らも分子育種への展開とともに本酵素の遺伝子レベルでの解析を目的としてムレ香生成酵素 (IAAOD) の単離を目指した。まず精製酵素標品の内部部分アミノ酸配列より、degenerate PCR 法で約 0.3 kb の IAAOD 遺伝子断片を取得した。本遺伝子断片をプローブとして *A. oryzae* RIB40 株のゲノムライブラリーをスクリーニングし、目的とする遺伝子を取得した (図 2)。ORF の解析を行った結果、

表2. ムレ香生成酵素 (IAAOD) の特性

	IAAOD	AOD
分子質量	73 kDa	673 kDa
至適基質	<i>i</i> -AmOH	MeOH
至適 pH	4.5	8.0-9.0
pH 安定性	3.0-6.0	—
熱安定性	~ 45°C	~ 43°C
等電点	—	—
糖含量 (w/w)	20%	—
補欠分子族	FAD	FAD
分布	細胞外	細胞内

IAAOD, イソamilアルコールオキシダーゼ; AOD, 酵母のアルコールオキシダーゼ¹¹⁾; *i*-AmOH, イソamilアルコール; MeOH, メタノール.

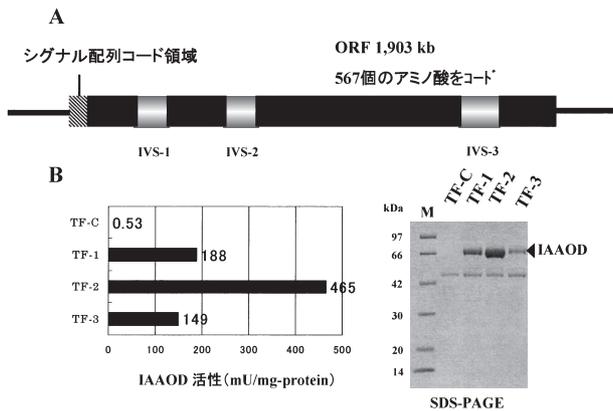


図2. *mreA* 遺伝子の単離と過剰発現. (A) 遺伝子構造, (B) 形質転換体・培養上清の IAAOD 活性と SDS-PAGE. TF-C, ベクターのみ; TF-1~3, *mreA* 高発現ベクターでそれぞれ形質転換.

成熟タンパクのN末端解析の結果から24個のアミノ酸残基からなるシグナル配列と考えられる領域が見いだされた. また3個のイントロンを含み, 567個のアミノ酸をコードすることが分かり, 分子質量は約60 kDaと概算された. これは糖鎖除去後の分子質量 (約59 kDa) と概ね一致する. 加えて9個のNリンク型糖鎖の結合モチーフ (Asn-X-Ser or Thr) が見いだされた.

本遺伝子のORFがIAAODをコードしていることを確認するためにORFを高発現プロモーター *PamyB*²⁰⁾ の制御下になるよう連結したキメラ遺伝子を含む高発現ベクターで *A. oryzae* M-2-3 (*argB*⁻)²¹⁾ を形質転換し, デキストリンを炭素源とする培地で過剰発現させた結果, 培養上清中のIAAOD活性は最高で宿主株の約800倍以上上昇し, SDS-PAGEにおいても明瞭な高分泌生産が確認された. このことより単離遺伝子はIAAODをコードすることが明らかになり, 本遺伝子をムレ香に因んで *mreA*

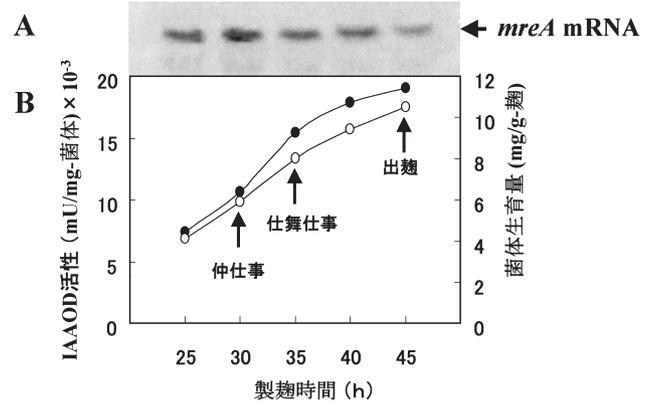


図3. 製麹工程における *mreA* 遺伝子の転写発現. (A) ノザンブロット解析, (B) 酵素活性. ●, 米麹の IAAOD 活性; ○, 菌体生育量.

(GenBank Accession No.AB48606) と命名した. *mreA* 遺伝子の製麹における転写プロファイルを調べた結果, 引き込み後, 約30時間の仲仕事に当たる頃に最も転写が強くなったが, 製麹期間を通して, ほぼ構成的に転写され, それに伴って米麹の IAAOD 活性も出麹時まで増加した (図3).

***mreA* 遺伝子のホモログ分布** *mreA* 遺伝子を単離した1999年当時, その翻訳アミノ酸配列 (MreAp) に対し, 高い相同性を示す配列はデータベース上に見いだせなかった. しかし, 近年の各種糸状菌におけるゲノムプロジェクトの進展により, 他の糸状菌が *mreA* ホモログを持つことが分かった. 著者らが確認しているだけでも *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea* などがある. しかしその機能について言及した報告はなく, 糸状菌特異的に見いだされる本配列の生理的機能の解明に興味を持たれる. また *A. oryzae* の EST (Expression Sequence Tag) データベース²²⁾ から, MreAp に60%という高い相同性を示すタンパク質をコードする cDNA 配列が見いだされた²³⁾. 本配列は IAAOD のアイソザイムをコードしていることが示唆されたので, その機能について検討を行っている.

野生型 *A. oryzae* を宿主とした新規形質転換システムの開発^{24,25)}

ピリチアミン耐性遺伝子の単離と解析 *A. oryzae* は種々の薬剤に対し, 強い抵抗性を示すことから, 有効な薬剤耐性マーカーの取得例がなかった. このことから宿主は何らかの遺伝子マーカーの付与された変異株 (*argB*²¹⁾, *niaD*²⁶⁾, *sC*²⁷⁾, *pyrG*²⁸⁾ など) に限られていた. このため *A. oryzae* においても任意の野生型株を宿主として採用できる形質転換システムの開発が望まれていた. 著者らは *A. oryzae* がチアミンの代謝拮抗阻害剤であるピリチ

アミンに対し、きわめて鋭敏な生育感受性を示す一方、比較的高頻度で明瞭な耐性変異株が出現する現象を見いだした。また感受性株との細胞融合実験を行った結果などから、ピリチアミン耐性が優性の一遺伝子支配であることが強く示唆された。そこで自然耐性変異株 *A. oryzae* PTR-26 株より自律複製プラスミド pDHG25²⁹⁾ をベクターとするゲノムライブラリーを作製し、*A. oryzae* RIB128 (wt) および *A. nidulans* FGSC-89 (*argB*⁻) にピリチアミン耐性を付与する DNA 断片 (後に *ptrA* (GenBank Accession No. E54863) と命名) をショットガンクローニング法により単離した (図4)。

得られた遺伝子の塩基配列を決定した結果、約 2.0 kb の ORF が 1 つ見いだされた。cDNA の解析より ORF は 58 bp のイントロンを 1 つ含み 327 個のアミノ酸をコードすることが分かった。また PTR-26 株の親株 (HL-1034 (wt)) の該遺伝子との比較より、ORF 上流 -68 位の塩基である A が G に変異していることが分かった。

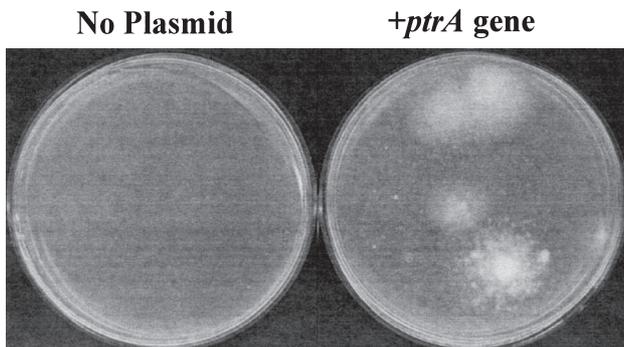


図4. *ptrA* 遺伝子の導入による麹菌へのピリチアミン (PT) 耐性付与。 *A. oryzae* RIB128 (wt) に *ptrA* 遺伝子を持つプラスミドを導入し、0.1 µg/ml の PT を含む最小培地に塗抹した (30°C、5 日間再生後)。

また翻訳アミノ酸配列のホモロジー検索を行った結果、*Saccharomyces cerevisiae* のチアゾール合成遺伝子 *THI4*³⁰⁾ および *Fusarium solani* のストレス誘導遺伝子 *sti35*³¹⁾ とそれぞれ、63%、72% の identity が認められ、*THI 4* ファミリーと呼ばれるホモログ集団に属することが分かった (図5)。

また *ptrA* 遺伝子の野生型遺伝子 (*thiA*) はチアミンの存在下で強い発現抑制を受けるが、変異型である *ptrA* 遺伝子はチアミンの有無に関わらず構成的に発現しており、このことがピリチアミンに対する耐性化 (拮抗阻害の解除) につながる。さらに上記の A-68G の変異がチアミン脱抑制を引き起こすメカニズムは著者らが真核生物において初めて確認したりボスイッチである TPP (Thiamine pyrophosphate) riboswitch^{32,33)} の 2 次構造変異による TPP 結合能の解除に起因することが Sudarsan らの報告により示されている³⁴⁾。図 6 に TPP-riboswitch の変異とピリチアミン耐性の関係を簡単に示

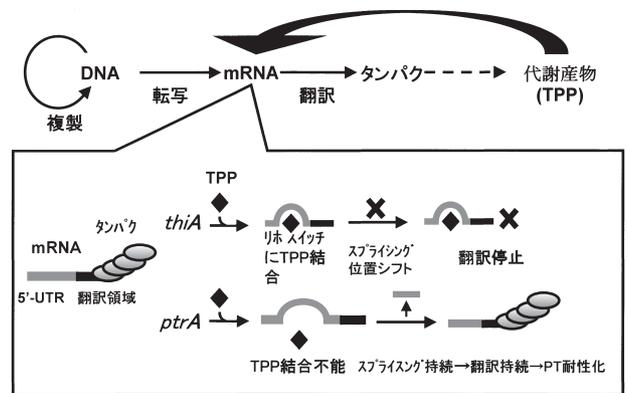


図6. 麹菌の TPP-リボスイッチとその変異によるピリチアミン耐性化

<i>A. oryzae ptrA</i>	1: MSPPAAIYEPTVAATGLKGVVSE TVPV-EGASQTKLLDHFQKWFDFKFAPIRESQVS	59
<i>S. cerevisiae THI4</i>	1: MS-----ATSTATSTSASQLHLNSTPVTHCLSDIVKKEEDWSDFKFAPIRESTVS	49
	60: RAMTRRYFEDLDKYAE SDVVI VVAGSGGLS TAYVLA KARPD LKIAI V EASVSPGGGAWL G	119
	50: RAMTSRYFKDLDKFAVSDV I I VVAGSSGLS AAYVIA RNPDLKVC I I E SSVAPGGGSWL G	109
	120: GQLFSAMVMRPAEVFLNELGVPEEDANPNYVVVKHASLFTSTLMSKVLSEFPNVKLFNA	179
	110: GQLFSAMVMRPAHILFLQELIPEY E --DEGDYVVVKHAALFISTVLSKVLQLFPNVKLFNA	167
	180: TAVEDLITR-PTENGNPQIAGVVVNWTLVTLHDDHSCMDPNTI-----N-A---P--	225
	168: TCVEDLVTRPPTERGEVTVAGVVINWTLVTOAHGTQCMDPNVIELAGYKNDGTRDLSQK	227
	226: -V I I -S T T G H D G P F G A F C A K R L V S M G S V D K L G G M F G L D M N S A E - D A I V K N T R - E V T K G L I	281
	228: H G V I I S T T G H D G P F G A F C A K R I V D I D Q N Q K L G G M F G L D M N H A E H D V V I H S G A Y A G V D N M Y	287
	282: I G G M E L S E I D G E N R M G P T F G A M V L S G V K A A E A L K V F D E R Q R E C A E	327
	288: F A G M E V A E I L D G I N R M G P T F G A M L S G V H A A E Q I L K H E A A -----	326

図5. *ptrA* 遺伝子の翻訳アミノ酸配列

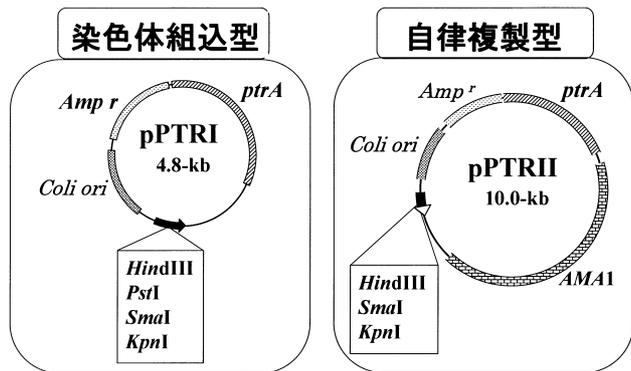


図7. *ptrA* 遺伝子を持つ麹菌形質転換用プラスミド

表3. pPTR I, pPTR IIによる各種糸状菌の形質転換効率

菌株	プラスミド	
	pPTR I	pPTR II
<i>A. nidulans</i> FGSC89	760	18000
<i>A. oryzae</i> RIB128	66	3500
<i>A. kawachii</i> IFO4308	8	650
<i>A. terreus</i> IFO30537	8	1000
<i>A. fumigatus</i> TIMM1776	6	420
<i>Trichoderma reesei</i> IFO31326	80	4900

(形質転換体 / 10 μg プラスミド)

した。

ptrA 遺伝子を用いた新規形質転換システムの開発

ptrA 遺伝子の導入により *A. oryzae* はピリチアミンに対し、耐性化することが分かった。そこで我々は *ptrA* 遺伝子を選択マーカーとして含む *A. oryzae* 形質転換用ベクターとして染色体組込型プラスミド pPTR I および遊離型プラスミド pPTR II を構築して、各種糸状菌の形質転換実験に供した (図7)。その結果、本形質転換システムは *A. oryzae*, *A. nidulans* 以外のピリチアミン感受性を示す供試糸状菌 (*A. kawachii*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *Trichoderma reesei*) においてもピリチアミンへの耐性を指標とする形質転換体の選択マーカーとして使用できることが確認できた (表3)。本ベクターは実用化され、各種糸状菌の分子育種など、分子生物学研究に広く利用されている³⁵⁻³⁹⁾。

ムレ香非生成麹菌の分子育種⁴⁰⁾

***mreA* 遺伝子破壊株の取得** 著者らは以前、紫外線照射を用いた変異処理法によりムレ香非生成麹菌を取得したが、分生子着生能が顕著に低下しており実用化には至らなかった⁷⁾。そこでムレ香の原因遺伝子である *mreA* 遺

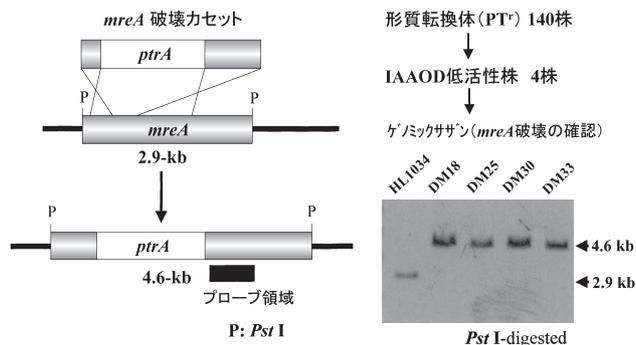


図8. 清酒麹菌実用株 HL-1034 における *mreA* 遺伝子の不活化

伝子を特異的に破壊にすることより不活化する方法を検討した。*ptrA* 遺伝子を含む置換型 *mreA* 破壊カセットを構築し、清酒麹菌実用株 HL-1034 に導入した。ピリチアミン耐性を指標に選抜した形質転換体候補株 140 株について、米麹の IAAOD 活性を測定し、活性が親株に比べ、明瞭に低下した株を 4 株得た。(DM-25, DM-28, DM-30, DM-33) この 4 株からゲノム DNA を抽出し、*Pst* I で消化後、サザン解析に供した結果、4 株とも目的とする *mreA* 遺伝子破壊株であることが判明した (図8)。

***mreA* 遺伝子破壊株の醸造特性** 得られた 4 株の *mreA* 遺伝子破壊株は、いずれも培地上での生育や分生子の着生能力が宿主である実用株 HL-1034 と同様であった。このことから *mreA* 遺伝子は *A. oryzae* の正常な生育において必須ではないものと考えられた。

これらの破壊株を用い、ラボスケールで製麹試験を行い、主要酵素力価など、米麹の品質を分析した結果、IAAOD 活性が低いことを除いて親株とほぼ同等であった (表4)。また製麹中の麹より mRNA を抽出し、*mreA* 遺伝子の経時的なノザン解析を行った結果、HL-1034 においては仲仕事に当たる製麹 25 ~ 30 時間で強い転写が認められたが、破壊株 DM-25 では菌体生育量は HL-1034 とほぼ同様なレベルであったにもかかわらず *mreA* 遺伝子の転写はまったく認められなかった (データ略)。

つぎに *mreA* 遺伝子破壊株を用いて調製した米麹を用いて、総米 800 g の清酒醸造小仕込み試験を実施した。得られた新酒の一般分析値、香り成分分析値を調べた結果、イソバレルアルデヒドが低いことを除いて親株とはほぼ同等の酒質を持つ新酒が得られた。これらの新酒各 300 ml をろ過滅菌した後、無菌的に 20°C および 30°C で生貯蔵し、経時的に酒中イソバレルアルデヒド濃度の変化を調べた。対照である HL-1034 株を用いた酒はイソバレルアルデヒド濃度が経時的に増加し、20°C では 42 日、30°C では 21 日でムレ香の上立香の官能閾値である 1.8 ppm¹⁰⁾ に達したが、*mreA* 遺伝子破壊株 4 株を用いた酒ではイソバレルアルデヒドの増加が著しく緩慢であり、

表4. *mreA*遺伝子破壊株を用いた米麴の性質

	宿主		<i>mreA</i> 遺伝子破壊株		
	HL-1034	DM-18	DM-25	DM-30	DM-33
IAAOD (Δi -Val nmol/g \cdot koji \cdot d)	44	17	12	16	13
α -アミラーゼ (U/g \cdot koji)	1057	1055	1049	1029	1039
グルコアミラーゼ (U/g \cdot koji)	189	180	188	183	182
酸性プロテアーゼ (U/g \cdot koji)	1579	1719	1666	1802	1711
酸性カルボキシペプチダーゼ (U/g \cdot koji)	3735	4462	4302	4310	4330
菌体量 (mg/g \cdot koji)	7.95	7.91	7.56	7.56	7.51

IAAOD, イソアミルアルコールオキシダーゼ; U, 国税庁所定分析法による酵素単位.

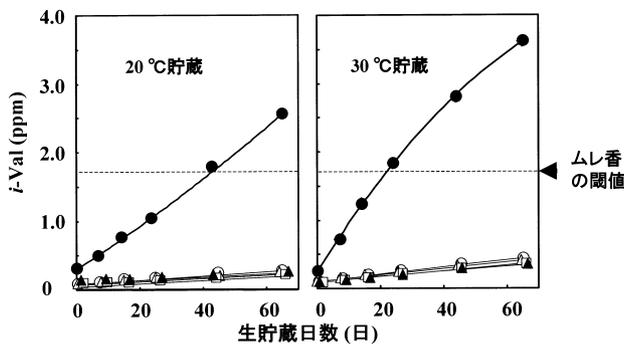


図9. 製成酒の生貯蔵における*i*-Val (イソバレルアルデヒド) の変化. ●, 宿主実用株HL-1034; ○, ▲, △, □, *mreA*破壊株.

30°C, 63日という極端な貯蔵条件においても0.25~0.3 ppmとムレ香の上立香官能閾値を大きく下回っていた(図9). 生貯蔵2ヶ月後の官能検査においてもHL-1034を用いた酒では20°C, 30°C貯蔵とも非常に強いムレ香が発生していたが, 破壊株4株を用いた酒では同条件においてムレ香の発生はまったく認められなかった. 以上のように本破壊株はムレ香生成酵素であるIAAODの活性は明瞭に低下していたが宿主である実用株のすぐれた醸造特性はまったく損なわれていなかった.

おわりに

著者らは清酒の劣化臭であるムレ香生成の抜本的な防止を目的として, ムレ香非生産麹菌の分子育種を行った. その過程において, 長い間, 未解明であった麹菌のムレ香生成酵素の特性を明らかにし, 分子生物学レベルでの解明を行った. 一方, ピリチアミンに着目した新規な形質転換システムの開発に成功し, *A. oryzae*においても任意の野生型株を形質転換の宿主とすることが可能となった. 本システムは, 麹菌*A. oryzae*の分子育種など, 分子生物学レベルでの研究において大いに活用されている. また本システムは*A. oryzae*以外のピリチアミン感受性系

状菌においても利用可能であり, 糸状菌全般の分子生物学研究用ツールとして広く利用されることが期待される.

本研究を遂行するにあたり, 貴重なご助言および実験材料等を賜りました, 東北大学の五味勝也博士, 独立行政法人酒類総合研究所の秋田 修博士, 東京大学の北本勝ひこ博士および創価大学(現 Medical College of Georgia)の李 秉魯博士に厚く御礼申し上げます. また本研究を実施する機会と多大なご協力を頂いた白鶴酒造株式会社花本秀生取締役生産本部長, 中井進執行役員生産管理部長, 西村 顕研究開発室室長をはじめとする関係各位に深く感謝申し上げます.

文 献

- 1) 一島英治: 醸協, **99**, 83 (2004).
- 2) Tadenuma, A. and Sato, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 1482-1489 (1967).
- 3) Ohba, T., Murakami, H., and Hara, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 674-681 (1971).
- 4) 原 昌道, 菅間誠之助: 醸協, **70**, 169-173 (1975).
- 5) 原 昌道, 菅間誠之助: 醸協, **70**, 235-238 (1975).
- 6) 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).
- 7) 山下伸雄, 窪寺隆文, 永井英雄, 近藤恭一: 生物工学, **74**, 375-379 (1996).
- 8) Yamashita, N., Motoyoshi, T., and Nishimura, A.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1216-1222 (1999).
- 9) 西村 顕: 醸協, **84**, 583-587 (1989).
- 10) 西村 顕: 生物工学, **73**, 213-223 (1995).
- 11) Kato, N., Omori, Y., Tani, Y., and Ogata, K.: *Eur. J. Biochem.*, **64**, 341-350 (1976).
- 12) Yamashita, N., Motoyoshi, T., and Nishimura, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 522-527 (2000).
- 13) 山下伸雄, 窪寺隆文, 西村 顕: 生物工学, **78**, 311-315 (2000).
- 14) Tada, S., Iimura, Y., Gomi, K., Takahashi, K., Hara, S., and Yoshizawa, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 593-599 (1989).
- 15) Tada, S., Gomi, K., Kitamoto, K., Takahashi, K., Tamura, G., and Hara, S.: *Mol. Gen. Genet.*, **229**, 301-306 (1992).

- 16) Gomi, K., Arikawa, K., Kamiya, N., Kitamoto, K., and Kumagai, C.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1095–1100 (1993).
- 17) Hata, Y., Ishida, H., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K., and Imayasu, S.: *Gene*, **207**, 127–134 (1998).
- 18) Ishida, H., Hata, Y., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K., and Imayasu, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **86**, 301–307 (1998).
- 19) Kitano, H., Kataoka, K., Furukawa, K., and Hara, S.: *J. Bioeng.*, **93**, 563–567 (2002).
- 20) Tsuchiya, K., Tada S., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., Jigami, Y., and Tamura, G.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 109–114 (1992).
- 21) Gomi, K., Imura, Y., and Hara, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2549–2555 (1987).
- 22) Machida, M.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **51**, 81–106 (2002).
- 23) 大西智子, 山下伸雄, 西村 颯, 赤尾 健, 山田 修, 秋田 修: 日本生物工学会大会講演要旨集, p.137 (2002).
- 24) Kubodera, T., Yamashita, N., and Nishimura, A.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1416–1421 (2000).
- 25) Kubodera, T., Yamashita, N., and Nishimura, A.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 404–406 (2002).
- 26) Minetoki, T., Nunokawa, Y., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., and Tamura, G.: *Curr. Genet.*, **30**, 432–438 (1996).
- 27) Yamada, O., Lee, R. B., and Gomi, K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1367–1369 (1997).
- 28) Mattern, I. E., Unkles, S., Kinghorn, J. R., Pouwels, P. H., and van den Hondel, C. A.: *Mol. Gen. Genet.*, **210**, 460–461 (1987).
- 29) Gems, D. H., Johnstone, L., and Clutterbuck, A. J.: *Gene*, **98**, 61–68 (1991).
- 30) Praekelt, U. M., Byrne, K. L., and Meacock, P. A.: *Yeast*, **10**, 481–490 (1994).
- 31) Choi, G. H., Elzbieta, T. M., Schardl, C. L., Richey, M. G., Chang, S., and Smith, D. A.: *J. Bacteriol.* **172**, 4522–4528 (1990).
- 32) Kubodera, T., Watanabe, M., Yoshiuchi, K., Yamashita, N., Nishimura, A., Nakai, S., Gomi, K., and Hanamoto, H.: *FEBS Lett.*, **555**, 516–520 (2003).
- 33) 窪寺隆文: バイオサイエンスとインダストリー, **63**, 312–315 (2005).
- 34) Sudarsan N., Barrick, J. E., and Breaker, R. R.: *RNA*, **9**, 644–647 (2003).
- 35) 鈴木 聡, 柏木 豊: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 169 (2002).
- 36) Yamada, O., Suthamas, N. N., Akao, T., Tominaga, M., Watanabe, H., Satoh, T., Enei, H., and Akita, O.: *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 82–88 (2003).
- 37) Kanamasa, S., Yamaoka, K., Kawaguchi, T., Sumitani, J., and Arai, M.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 2661–2663 (2003).
- 38) 木村多江, 楠本憲一, 北本則行, 鈴木 聡, 柏木 豊: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 2 (2004).
- 39) Akazawa, S., Karino, T., Yoshida, N., Katsuragi, T., and Tani, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 5882–5890 (2004).
- 40) Kubodera, T., Yamashita, N., and Nishimura, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 40–44 (2003).