

平成20年度 生物工学奨励賞（江田賞）受賞



清酒醸造工程における  
酵母のペプチド輸送調節と、  
その機構に着目した酵母の育種



山田 翼

Peptide Transport Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* in Sake Brewing,  
and Isolation of the Mutant of Sake Yeast That Paid Attention to the Mechanism

Tasuku Yamada (General Research Laboratory of Kiku-Masamune Sake Brewing Co. Ltd, 1-8-6 Uozaki-nishimachi Higashinada-ku Kobe 658-0026) Seibutsu-kogaku 87: 9-15, 2009.

はじめに

清酒醸造の主発酵工程である醪は開放発酵系であるため、酒造に悪影響を及ぼす雑菌に汚染される危険性が高いが、充分量の酵母と乳酸を含んだ酒母とそれに続く三段仕込によって安定な醸造を可能にしている。酒屋万流と言われるように酒母にもさまざまな製法が存在するが、乳酸の取得方法により2つのグループに大別される。一つのグループは乳酸菌によって乳酸を生成させる伝統的な手法で生醪系酒母と呼ばれており、もう一つは速醸系酒母と呼ばれる仕込時に醸造用乳酸を添加する方法で、近代になって開発された手法である。生醪系酒母は微生物管理が複雑で製造日数も長いために、現在では速醸系酒母が主流となっているが、生醪系酒母には培養した酵母のアルコール耐性が高いことや枯らしがきく等の特徴があり<sup>1,2)</sup>、また生醪系酒母特有の風味があるとも言われているので、一部の醸造蔵では使用されている。

生醪系酒母の特徴の一つとして酒母完成時のアミノ酸度が速醸系酒母の3倍ほどになることが知られており、その原因について以前から多くの研究がなされ<sup>3-8)</sup>、近年その機構の全容がほぼ明らかになった<sup>9,10)</sup>。アミノ酸度が高い生醪系酒母であるが、生醪系酒母を用いて醪を仕込み醸造した酒がアミノ酸度の高い、雑味の多い酒になるとは言われていない<sup>11,12)</sup>。本稿では、その原因が酵母のペプチド取込能の変化にあることを示すとともに、ペ

プチド取込能が低下した新しいタイプの清酒酵母の育種について紹介する。

生醪を用いた醪のペプチド濃度に与える酵母の影響<sup>13)</sup>

清酒醸造において醪に使用する時の生醪のアミノ酸度は6~7程度であり、速醸醪は2前後である。酒母歩合を7%として、使用醪の差がそのまま生成酒に移行すると仮定すると、生醪を用いた酒のアミノ酸度は速醸醪よりも0.3程度高くなる。生成酒においてアミノ酸度0.3の違いはかなり大きな差である。そこで、当社醸造蔵で製造した生醪と速醸醪の酒母を用いて、実験室で全く同じ条件で醪を仕込み、経日的に遊離アミノ酸濃度とペプチド態アミノ酸濃度を測定した。その結果、使用時には生醪の遊離アミノ酸濃度は速醸醪の4倍ほどあったが、段仕込を経るに従いその差は小さくなり、留2日目以降はほとんど同じ濃度で推移した。一方、ペプチド態アミノ酸濃度は使用時には生醪の方が速醸醪に比べて2/3ほどしかなかったが、仲仕込から留仕込の間に逆転し、留仕込後は生醪醪の方が5 mM程度高いまま推移した(図1)。この現象は段仕込による希釈効果では説明できない。清酒醪中では溶出する遊離アミノ酸やペプチド態アミノ酸の1/3から1/2は酵母により取り込まれるので<sup>14)</sup>、まず酵母の影響を検討するために生醪と速醸醪を用いて通常の発酵系の醪と酵母を除いた溶解系の醪を作製し、三段仕込時における遊離アミノ酸濃度とペプチド態アミノ酸濃

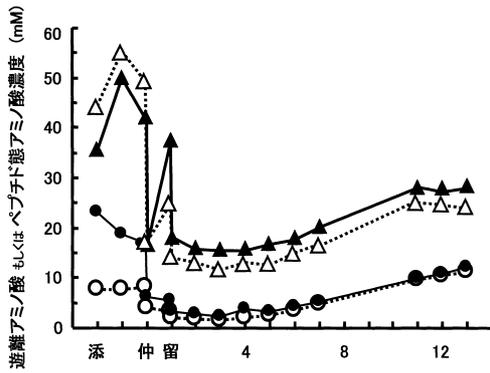


図1. 生醗を用いた清酒醗と速醗醗を用いた清酒醗の遊離アミノ酸およびペプチド態アミノ酸の濃度経過。▲, 生醗を用いた醗のペプチド態アミノ酸; △, 速醗醗を用いた醗のペプチド態アミノ酸; ●, 生醗を用いた醗の遊離アミノ酸; ○, 速醗醗を用いた醗の遊離アミノ酸。

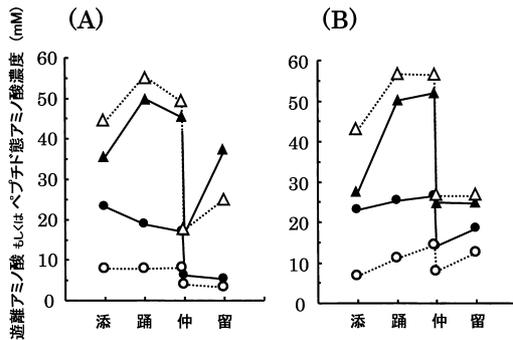


図2. 発酵系の醗 (A) と酵母を除いた溶解系の醗 (B) の三段仕込時における遊離アミノ酸濃度およびペプチド態アミノ酸濃度経過。▲, 生醗を用いた醗のペプチド態アミノ酸; △, 速醗醗を用いた醗のペプチド態アミノ酸; ●, 生醗を用いた醗の遊離アミノ酸; ○, 速醗醗を用いた醗の遊離アミノ酸。

度の推移を比較した。その結果、溶解系の醗では仲仕込から留仕込の間に生醗を用いた醗のペプチド態アミノ酸濃度が速醗醗を用いたものより多くなる現象は見られなかった (図2)。したがって、この現象には酵母による遊離アミノ酸やペプチドの取り込みが大きく関わっていると考えられた。

### 清酒酵母のペプチド輸送に対するアミノ酸の影響<sup>15)</sup>

生醗を用いた醗のペプチド態アミノ酸濃度が速醗醗を用いたものよりも高くなる現象に酵母が関わっていると考えられたので、生醗のように遊離アミノ酸濃度が高い液体培地で培養した酵母と、速醗醗のようにペプチド態アミノ酸の方が遊離アミノ酸よりも多く含まれる液体培地で培養した酵母の遊離アミノ酸 (Leu, Glu) の取込能とペプチド (Gly-Leu, Glu-Glu) の取込能を比較した。その結果、遊離アミノ酸の取込能はどちらの培地で培養した酵母も差がなかったのに対し、ペプチドの取込能は遊離アミノ酸濃度が高い培地で培養した酵母では抑えら

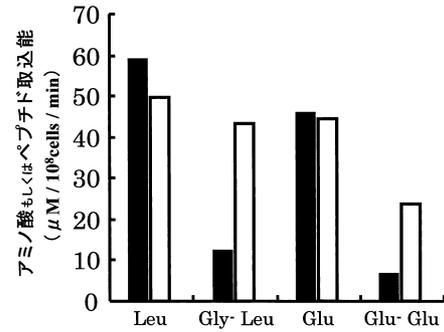


図3. アミノ酸培地で培養した酵母 (■) とペプチド培地 (□) で培養した酵母の遊離アミノ酸 (Leu, Glu) およびペプチド (Gly-Leu, Glu-Glu) の取込能。ペプチド培地は Wickerham の最小培地の窒素源を米のタンパク質を米麹から精製したの酸性プロテアーゼで分解したものに置き換え作製した。アミノ酸培地は Wickerham の最小培地の窒素源をペプチド培地のアミノ酸組成を参考にして遊離アミノ酸を添加して作製した。使用酵母はキクマサ酵母 (Km601), 培養条件は 15°C, 4日。

れた (図3)。したがって、生醗のような高濃度の遊離アミノ酸が存在する環境で生育した酵母はペプチド取込能が抑えられるために、醗での酵母増殖期にペプチドをあまり取り込まず、結果として生成酒中のペプチド態アミノ酸濃度が高くなる可能性が考えられた。

酵母のペプチド取込能がアミノ酸によって抑えられる現象をさらに詳細に検討するために、ペプチド輸送体を破壊した清酒酵母を作製した。これまでに報告されている酵母のペプチド輸送体にはジペプチドやトリペプチドを取り込む PTR2 ともう少し大きなオリゴペプチドを取り込む OPT1 が存在することが知られている<sup>16,17)</sup>。しかし、清酒に含まれるペプチドは低分子のものがほとんどであること<sup>18,19)</sup>、また清酒醗のような酸性条件下では麴の酸性プロテアーゼは米の貯蔵タンパク質をすばやくジペプチドやトリペプチドに分解する<sup>9)</sup>ことから PTR2 が清酒醗における酵母の主要なペプチド輸送体である可能性が高いと考え、協会7号酵母の単相体 (ATCC44893株) の PTR2 破壊株 (*Aptr2* 株) を作製した。*Aptr2* 株は調べた限りのジ・トリペプチドの取込能をほとんど失い、また *Aptr2* 株で仕込んだ清酒のペプチド態アミノ酸濃度は親株に比べて著しく増えたことから、PTR2 が清酒醗における酵母の主要なペプチド輸送体であると考えられた。そこで、PTR2 の発現が、培地に含まれるペプチドとアミノ酸割合に影響されるかどうか検討したところ、培地のアミノ酸の割合が高くなるにしたがって、PTR2 の発現は抑えられ、ペプチド取込能は低下していた (図4)。したがって、酵母のペプチド取込能がアミノ酸によって抑えられる現象は PTR2 の発現レベルで制御されていると考えられた。

PTR2 の発現を抑えるのはすべてのアミノ酸か一部の

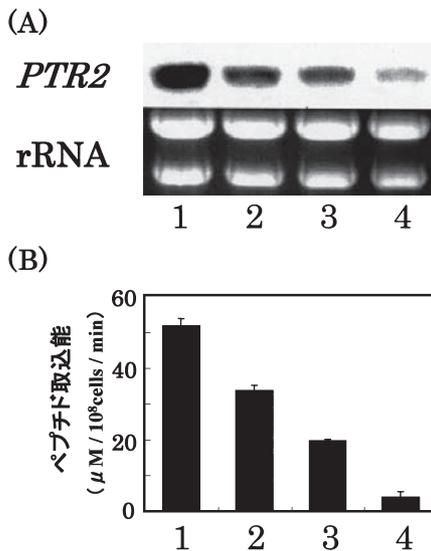


図4. アミノ酸/ペプチド比が異なる培地で培養した酵母の *PTR2* 発現 (A) とペプチド取込能 (B). 各培地のペプチド態アミノ酸と遊離アミノ酸の比は以下のとおり: レーン1, 42 mM : 2 mM; レーン2, 21 mM : 23 mM; レーン3, 11 mM : 33 mM; レーン4, 0 mM : 44 mM. 使用酵母は K-701, 培養条件は 15°C, 3日.

アミノ酸なのかを検討するために, 最少培地に 5 mM の各アミノ酸 (タンパクを構成する 20 種のアミノ酸と清酒中に著量含まれる  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) およびオルニ

チンの計 22 種) を添加した培地でそれぞれ培養した酵母 (協会 701 号: K-701 株) の *PTR2* 発現とペプチド取込能を測定した. 図 5 に示すように, グルタミン (Gln), アスパラギン (Asn), セリン (Ser) を添加したときはアミノ酸無添加の培地で培養した酵母に比べて *PTR2* 発現が低下し, それとともにペプチド取込能も大きく減少していたが, リジン (Lys) やアルギニン (Arg) を添加したときには *PTR2* 発現の低下は見られないにもかかわらずペプチド取込能は低下していた. また, トリプトファン (Trp) やヒスチジン (His) を添加すると *PTR2* の発現は上昇するが, ペプチド取込能が上昇することはなかった. このようにアミノ酸が清酒酵母の *PTR2* 発現やペプチド取込能に与える影響はアミノ酸の種類によって異なると考えられた. Asn を添加した場合に関して添加濃度が *PTR2* 発現やペプチド取込能に与える影響を検討したところ, 培地に 2 mM の Asn を添加すると *PTR2* の発現が低下し, それに伴いペプチド取込能も半分以下に低下した (図 6). Gln や Ser を添加した場合でも同様の結果が得られた. 当社季節蔵において測定した使用時の生酛の Asn, Ser, Gln の濃度はそれぞれ 1.9 mM, 3.0 mM, 1.8 mM であり, 速醸酛ではそれぞれ 0.19 mM, 0.4 mM, 0.3 mM であった. したがって, 2 mM 程度以上のこれらのアミノ酸の存在が生酛で育った酵母のペプチド取込能の低下

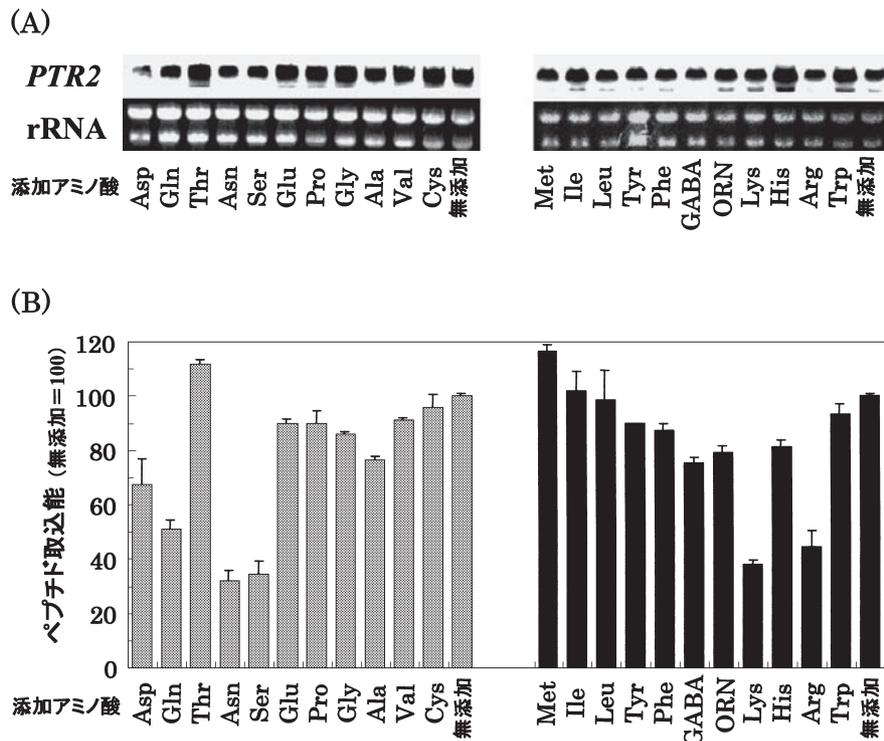


図 5. 酵母の *PTR2* 発現およびペプチド取込能に与える培地への添加アミノ酸の影響. Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfate に complete supplement mixture (CSM) および 2% グルコースを加えた培地を基本培地 (アミノ酸無添加) としそれぞれ 5 mM の各アミノ酸を添加した培地で 15°C, 3日培養した酵母 (K-701) の *PTR2* 発現 (A) およびペプチド取込能 (B) を測定した.

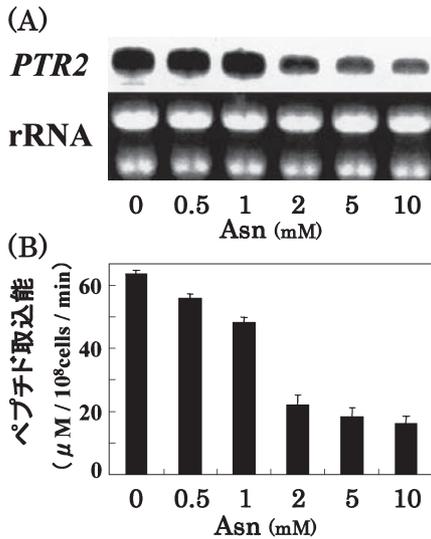


図6. 酵母の*PTR2*発現およびペプチド取込能に与えるAsn濃度の影響. 実験条件は図5と同様.

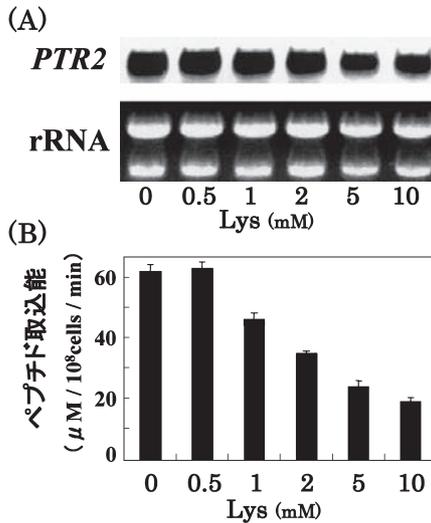


図7. 酵母の*PTR2*発現およびペプチド取込能に与えるLys濃度の影響. 実験条件は図5と同様.

に影響を与えていると考えられた. 一方, Lys を添加した場合は *PTR2* の発現はあまり低下せずに, ペプチド取込能のみが低下した (図7). 季節蔵において測定した使用時の生酏および速醸酏のLys濃度はそれぞれ0.2 mMと0.4 mMであったため, Lysが生酏で育った酵母のペプチド取込能の低下に影響を与えているとは言えないが (ただし, Lysは酵母が最もよく取り込むアミノ酸である<sup>20)</sup> ため, 生酏で育った酵母は大量のLysを取り込んだ可能性はあり, それがペプチド取込能に影響を与えている可能性も否定はできない), アミノ酸による酵母のペプチド取込能低下には *PTR2* 発現抑制以外の経路も存在することを示している.

アミノ酸による *PTR2* 発現抑制に関して *PTR2* プロ

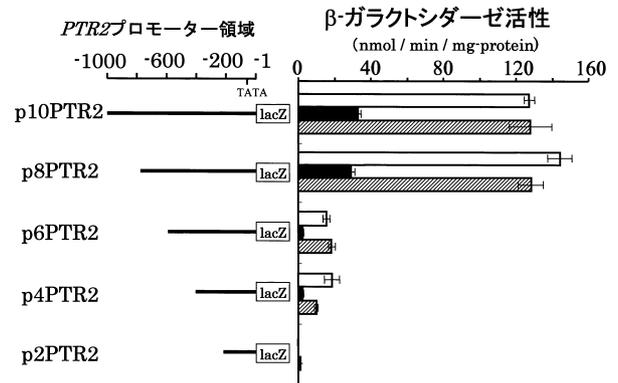


図8. *PTR2* プロモーター領域のレポーターアッセイ. デリレーションした *PTR2* プロモーター領域と大腸菌の *lacZ* を融合したプラスミドを作製し ATCC44893 株に導入した形質転換株を 15°C で  $A_{660}$  が 1.0 に達するまで培養後  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した. 培地は基本培地 (□) および基本培地に 10 mM の Asn (■) もしくは Lys (▨) を添加したものを使用した.

モーター領域の影響を検討するために, *PTR2* プロモーター領域のデリレーションシリーズと *lacZ* を融合したプラスミドを作製し, ATCC44893 株に導入してそのレポーター活性を調べた (図8). Asn を添加するとレポーター活性が大きく落ち, Lys 添加では落ちなかったことから, Lys は *PTR2* 発現抑制によらずにペプチド取込能を低下させていることが証明された. また, Asn による発現抑制は *PTR2* の ATG から上流 400bp まで存在すれば起こることから, この間に Asn による抑制を感知する領域が存在すると考えられた. また, -770 から -600 の間を欠失するとレポーター活性が大きく低下することから, この間に *PTR2* の発現を大きくエンハンスする領域が存在すると考えられた.

以上のように, 生酏を用いた醗のペプチド濃度が高くなるという現象は, 生酏中に著量含まれる一部のアミノ酸が清酒酵母の *PTR2* 発現を抑制するためにペプチド取込能の低下が起こり, 酵母増殖期にペプチドをあまり取り込まなくなることが主因で起こると考えられた.

#### ペプチド取込能低下酵母の育種<sup>21)</sup>

生酏酵母の特徴の一つとしてペプチド取込能が低下していることが明らかになったので, ペプチドが多い, 生酏タイプの清酒を簡便に醸造するために, ペプチド取込能低下酵母の育種を検討した. ペプチド取込能低下酵母として前節で示した *Δptr2* 株があげられる. *Δptr2* 株で仕込んだ清酒は親株で仕込んだ清酒に比べて遊離アミノ酸濃度が低く, ペプチド態アミノ酸濃度は非常に高かった. 清酒中のペプチドの中にはさまざまな機能性を持つペプチドが存在すると報告されているので<sup>22,23)</sup> *Δptr2* 株のようなペプチド取込能が低下した酵母で清酒を醸造すれ

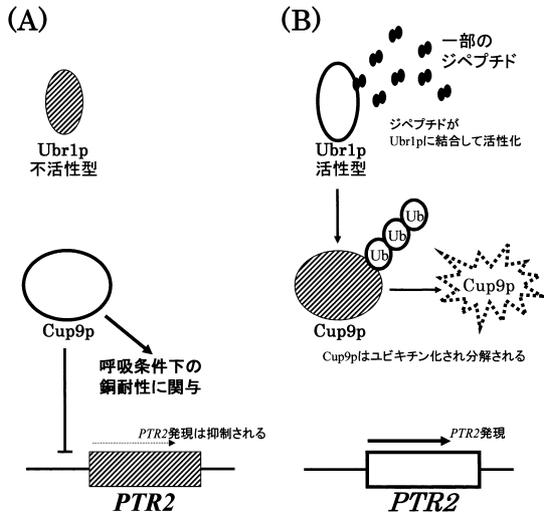


図9. ユビキチン-プロテアソーム系による酵母のPTR2の発現制御機構。培地に特定のジペプチドが存在しない条件ではPTR2発現はCup9pにより抑制されている(A)。培地に特定のジペプチドが存在すると活性化されたUbr1pによりCup9pはユビキチン化され分解されるため、PTR2発現は脱抑制される(B)。

ば、機能性の面でも味覚的にも特徴のある清酒を醸造することが可能であると考えられた。しかし、嗜好品である清酒の醸造において遺伝子破壊株を用いることは消費者の理解を得ることが難しい。そこで、突然変異によってペプチド取込量が低下した酵母を取得することとした。

PTR2の発現は転写因子Cup9pにより抑制される(図9A)<sup>24)</sup>。Cup9pはジペプチド存在下で活性化されるUbr1pによってユビキチンを付加され、これを認識したプロテオソームにより分解される(図9B)<sup>25)</sup>。したがって、清酒醪のような多量のジペプチドが存在する環境ではCup9pは分解されているため、PTR2の発現は脱抑制され、酵母はペプチドを取り込めるようになっている(図9B)。そのため、米のタンパクから生成したペプチドの半分近くは酵母に取り込まれてしまい、清酒には移行しない。また、Cup9pは呼吸条件下での銅耐性獲得に関与していることも知られている(図9A)<sup>26)</sup>。そこで、ジペプチドが存在する呼吸条件下で銅耐性のある酵母を取得すればCup9pが分解されないため、PTR2が常に抑制され、ペプチド取込量が低下した酵母が得られると考えた。

上記理論をもとに清酒酵母(キクマサ酵母: Km601)を親株としてメタンサルホン酸エチル(EMS)で変異処理後、ジペプチドが存在する呼吸条件下で銅耐性のあるものを選択してきたところ、選択してきたほとんどの酵母のペプチド取込量は親株に比べて顕著に低下していた。特にペプチド取込量が低下した4株についてPTR2発現を測定したところ、1株は予想通りPTR2発現も低下していたが、あとの3株はPTR2発現が低下することなく、ペプチド取込量が低下していた(図10)。

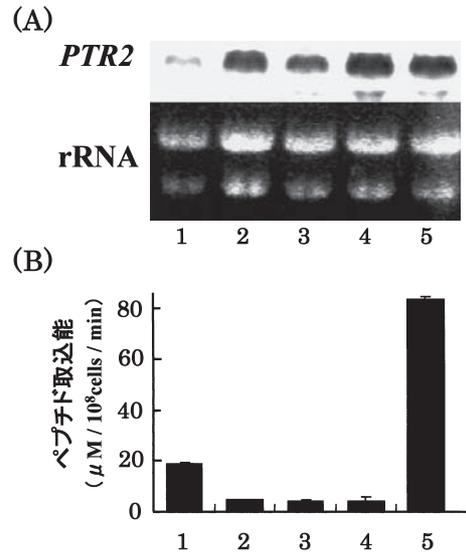


図10. 銅耐性によって選抜した変異株のPTR2発現(A)とペプチド取込能(B)。レーン1, Cu4; レーン2, Cu20; レーン3, Cu32; レーン4, Cu34; レーン5, Km601(親株)。実験条件は図5の基本培地と同様。

### ペプチド取込能低下酵母によるペプチドが多い清酒の醸造<sup>21)</sup>

ペプチド取込能低下酵母が得られたので、実験室レベルでの清酒の試験醸造を行った。その結果、PTR2発現の低下に伴ってペプチド取込量が低下した株(Cu4株)も、PTR2発現が低下することなくペプチド取込能だけが低下していた株(Cu32株)も生成酒のペプチド態アミノ酸濃度は親株の約1.5倍に増加しており、本ペプチド取込能低下株を使用することによってペプチドの多い清酒が醸造可能であることが確認された(表1)。逆に遊離アミノ酸濃度は親株の約0.6倍に低下した。これは、ペプチドを利用することができなくなった酵母がアミノ酸を代わりに多く利用したためと考えられる。また、ペプチド取込能低下株は醪初期に発酵が停滞したため発酵日数が2~3日延びた。これは通常の清酒酵母ならば、米の溶

表1. ペプチド取込能低下酵母を用いた清酒小仕込試験の成分分析

	Cu4	Cu32	Km601
醸造日数	18	17	15
日本酒度	-17.8	-14.9	-15.8
アルコール濃度(%)	16.4	17.1	16.1
酸度(ml)	4.7	4.6	3.7
アミノ酸度(ml)	1.9	1.8	2.2
遊離アミノ酸濃度(mM)	14.5	13.3	21.5
ペプチド態アミノ酸濃度(mM)	47.8	46.2	30.6

解が進んでいないためにアミノ酸不足になる醗初期にもペプチドを利用することによって増殖できるのであるが、ペプチド取込能低下酵母はペプチドを利用できないため、窒素源を得られず、増殖が遅れたためであると考えられる。

短鎖ペプチドが持つ機能性の中で有名なものに血圧を正常に保つ効果が期待されるアンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性がある<sup>27)</sup>。これは、人の血圧制御システムの中で最も重要であるといわれているレニン・アンギオテンシン系のキー酵素であり、血圧を高め誘導するACEを阻害する活性である。そこで我々は、ペプチド取込能低下酵母(Cu32株)を用いて醸造したペプチドが多い酒のACE阻害活性を親株(Km601株)で醸造した酒と比較した(表2)。なお、ACE阻害活性を測定する際、アルコールが夾雑すると正確に活性を測定することができないので、サンプルは清酒を凍結乾燥後、蒸留水により元の容量に戻したものをを用いた。また表1とペプチド態アミノ酸濃度が異なるのは、まったく別の機会に異なる原料米を用いて醸造した酒であるためである。ACE阻害活性は実験に用いた反応系においてACE活性を50%阻害する清酒(脱アルコールし、元の容量に戻した清酒)の量もしくはペプチド態アミノ酸濃度で表した(IC<sub>50</sub>)。その結果、Cu32株で醸造した酒は親株を用いて醸造した酒と比べて1/3以下の量(1.5 μl/5.4 μl)で親株を用いて醸造した酒と同等のACE阻害活性を示した。また、この活性を生成酒に含まれるペプチド態アミノ酸濃度で見えてみると、ペプチド高含有酒で5.9 mM、対照酒で11.9 mMであった。これまでにACE阻害活性が確認された低分子ペプチドのIC<sub>50</sub>は0.2 μM~20 μM程度であるため<sup>28)</sup>、清酒に含まれるペプチドのうちACE阻害活性を示すものは数百から数千種類にひとつであることが伺える。しかし、本法によって醸造されたペプチド高含有清酒のペプチド態アミノ酸濃度当たりのACE阻害活性が通常の清酒に比べて2倍以上高かったということは、数百種類にひとつしか存在しない血圧を正常に保つペプチドが選択的にこのペプチド高含有清酒に残存していることを示している。

表2. 生成酒のACE阻害活性

酵母	生成酒中のペプチド態アミノ酸濃度 (mM)	ACE 阻害活性 (IC <sub>50</sub> )	
		サンプル溶液当たり* (ml)	ペプチド態アミノ酸当たり (mM)
Cu32	59.1	1.5	5.9
Km601	33.1	5.4	11.9

\* 本実験の反応系でACE活性を50%阻害するのに必要なサンプルの量

## おわりに

本研究では生配造りで見られる高いアミノ酸度が清酒酵母のペプチド取込能を抑制し、醗や酒質にも影響を与えることをペプチド輸送体遺伝子(PTR2)の発現レベルから明らかにした。また、簡便にペプチド取込能低下酵母を取得する方法を確立し、その変異株を用いて味覚的にも機能性の面からも特徴があるペプチドが多い清酒の醸造を可能にした。

一般的な清酒にはペプチドは0.12~0.25%ほど含まれている。この含量は水、アルコール、糖類に次いで、遊離アミノ酸や有機酸とほぼ同じ程度であり、ペプチドは清酒のかなり主要な成分である。しかし、これまで清酒における意義はあまり分かっていなかった。これはペプチドの多様性とそれに伴う個々のペプチドの量的少なさによるものと思われる。現在、分析技術は日々進歩し、それを解析するソフトウェアも進歩している。清酒における多様なペプチドもその意義や有用性を更に解明することができるかと期待される。

本研究の機会と御鞭撻を賜りました菊正宗酒造株式会社元常務取締役 原昌道博士、執行役員総合研究所長 溝口晴彦博士、生産部長 家村芳次博士、生産部課長 古川恵司博士をはじめとする関係各位に深く感謝申し上げます。本賞受賞に際しまして学会への推薦をしていただきました白鶴酒造株式会社松永将義研究開発室室長に厚く御礼申し上げます。また、本研究は身近に生配造りを行う酒造蔵が存在したからこそ可能であった研究です。生配造りを守り続けている当社生産部をはじめ嘉宝蔵の皆様にも深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) 溝口晴彦, 池田 朋, 原 昌道: 生物工学, **72**, 355-361 (1994).
- 2) 佐藤俊一, 田中裕之, 山崎教和, 梁瀬文弘, 下飯 仁, 斉藤和夫, 家藤浩幸, 蓼沼 誠: 醸協, **84**, 183-187 (1989).
- 3) 杉田 脩, 国定則之, 蔭山公雄: 醸酵工学, **34**, 138-148 (1956).
- 4) 秋山裕一: 農化, **33**, 1-6 (1959).
- 5) 秋山裕一, 千野潤雄: 醸協, **54**, 696-691 (1959).
- 6) 鈴木明治, 布川弥太郎, 馬場国男, 伊藤雄太郎: 醸協, **53**, 532-529 (1958).
- 7) 布川弥太郎, 西谷尚道, 鈴木明治: 醸協, **54**, 342-335 (1959).
- 8) 竹内五男, 中村精二: 醸協, **63**, 1155-1158 (1968).
- 9) Iemura, Y., Yamada, T., Takahashi, T., Furukawa, K., and Hara, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 276-280 (1999).
- 10) Iemura, Y., Takahashi, T., Yamada, T., Furukawa, K., and Hara, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 531-535 (1999).
- 11) 関東信越国税局鑑定官室: 醸協, **56**, 1168-1174 (1961).
- 12) 関東信越国税局鑑定官室: 醸協, **57**, 1111-1117 (1962).
- 13) Iemura, Y., Yamada, T., Takahashi, T., Furukawa, K., and Hara, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 679-681 (1999).

- 14) 家村芳次, 片岡浩平, 原 昌道: 醸協, **91**, 130–135 (1996).
- 15) Yamada, T., Furukawa, K., Hara, S., and Mizoguchi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 383–389 (2005).
- 16) Perry, J. R., Basrai, M. A., Steiner, H. Y., Naider, F., and Becker, J. M.: *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 104–115 (1994).
- 17) Hauser, M., Narita, V., Donhardt, A. M., Naider, F., and Becker, J. M.: *Mol. Membr. Biol.*, **18**, 105–112 (2001).
- 18) 高橋 暲, 能勢惟一: 醸酵工学, **35**, 318–320 (1957).
- 19) 北本勝ひこ, 梶原勝之, 大場俊輝, 難波康之祐, 中村欽一: 醸協, **77**, 665–669 (1982).
- 20) 秋田 修, 大場俊輝, 中村欽一: 醸協, **81**, 403–408 (1982).
- 21) Yamada, T., Furukawa, K., Hara, S., and Mizoguchi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 460–465 (2005).
- 22) Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A., and Imayasu, S.: *Bio-sci. Biotech. Biochem.*, **58**, 812–816 (1994).
- 23) Saito, Y., Ohura, S., Kawato, A., Suginami, K., and Imayasu, S.: *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 720–724 (1997).
- 24) Byrd, C., Turner, G. C., and Varshavsky, A.: *EMBO J.*, **17**, 269–277 (1998).
- 25) Turner, G. C., Du, F., and Varshavsky, A.: *Nature*, **405**, 579–582 (2000).
- 26) Knight, S. A., Tamai, K. T., Kosman, D. J., and Thiele, D. J.: *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 7792–7804 (1994).
- 27) Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N., Suzuki, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1405–1409 (1985).
- 28) Fujita, H., Yokoyama, K., Yoshikawa, M.: *J. Food Science*, **65**, 564–569 (2000).