

## しょうゆづくりの歩みと麹菌の関わり

松島健一朗

穀物やその調製物のタンパク質、糖質を異化する目的でカビを接種して培養したものを麹といい、そこに利用されるカビを麹菌という。日本においていわゆる麹菌とは *Aspergillus oryzae*, *A. sojae* をおもに指している。それらのうちタンパク質分解能に優れている株がしょうゆ麹菌としてしょうゆ製造に利用される。本稿の前半ではしょうゆづくりにおいて麹菌がどのように利用されてきたかについて述べ、後半では最近のトピックを紹介しながら、麹菌を利用したしょうゆ製造の将来について考える。

### しょうゆにおける麹菌の役割

しょうゆづくりにおける麹菌の役割を端的に言えば、タンパク質の分解ということになる。調味料としてうまみを醸すためには、大豆などの穀物由来のタンパク質を分解して、可溶性ペプチド・アミノ酸を生成し、うまみの素であるグルタミン酸含量を増加させることが重要である。そのためにプロテアーゼ、ペプチダーゼ、グルタミナーゼを効率的かつ高生産することが麹菌に求められる役割であり、その目的に沿ってしょうゆ麹菌は選択されてきたと考えられる。同じ麹菌を使っても酒造りでは雑味の原因となるアミノ酸は歓迎されず、酵母が効率的にアルコール発酵をするために糖質分解に優れた株が利用されている。もちろん、しょうゆにおいても乳酸菌や酵母の生育のために糖質分解は必要であるが、タンパク質の分解の方が相対的に重要である。こうした目的の違いからしょうゆ麹菌と酒造りのための麹菌とは異なった性質を持つに至ったと考えられる。

### ばらこうじ 撒麹による製麹

日本の製麹における特徴の一つとして撒麹がある。中国大陸では穀物を粉にして水で練って成形することが一般的におこなわれており、それにクモノスカビ (*Rhizopus* sp.), ケカビ (*Mucor* sp.) などのカビをつけた餅麹を使って酒・調味料 (醬, ひしお) が作られていた。一方、日本では穀物を蒸煮する習慣があり、それに麹菌をつけて撒麹で製麹を行ったと考えられている<sup>1)</sup>。田中らの研究によればタンパク質を蒸煮処理するとタンパク質の過変性が起こり、プロテアーゼ活性が強いクモノスカビ

では生育が抑制されるのに対し、麹菌では影響を受けないことがわかった<sup>2,3)</sup>。原料をどのように処理するかという文化的な差が、着生する菌を選抜し、日本における製麹法を決定づけたものと考えられている。

### 友麹による種麹の使用

微生物を利用した醸造・醗酵を産業化する場合、優れた菌株を繰り返し使用することは品質の維持・安定化に重要である。しょうゆや酒の製造においても同様で、優れた品質の製品を作ることができた麹は繰り返し使用された。これを友麹と呼び、微生物の概念がなかった時代に優れた製品製造につながった麹を大事に継代して次の生産にも利用していた。平板寒天プレート発明以前は単一種を継代してゆくことは非常に難しかったが、麹菌の場合その特異な性質ゆえに、雑菌の混入を除くことができた。実績のある麹 (元種) に木灰を振りかけて種麹を培養することで、麹をアルカリ性にして雑菌の生育を阻害したのである。*Aspergillus* 属菌は強いアルカリ抵抗性があるため、麹菌は木灰を振りかけても生育することができた。その結果、優秀な麹を雑菌の混入を防ぎつつ継代することができたのである。木灰による雑菌の防除は実験的にも有効であることが証明されている<sup>1)</sup>。この方法は室町期にすでに利用されていたようである。当時、すでに酒やしょうゆの生産者へ卸すための麹を販売する業者 (もやし屋) が存在し、彼らは友麹と木灰を使って、優れた麹を生産・維持・販売していた。彼らは麹の種類により性質が異なること、雑菌の混入を防ぐことでそれぞれの麹の特性を維持・継代できることに気づき、結果として優良な麹菌の選抜と単一株培養を行っていたのである。

### 日本の製麹法の確立

カビを使って製麹をし、原料に含まれるタンパク質の加水分解を促しアミノ酸の豊富な調味液 (醬) をつくる技術は元々中国から伝わったものと考えられるが、上述のように日本に来てその風土、習慣に合わせて形を変えた。産業史的な経緯はおおよそ次のように考えられている。i) 12世紀に宋から持ち込まれた径山寺味噌から発

祥したと言われる湯浅醤油は餅麴にクモノスカビを着生させて製麴をしていた。ii) 16世紀頃、蒸煮した原料を形成した味噌玉麴に麴菌を着生させて製麴されるようになった。iii) 17世紀頃、蒸煮した原料に麴菌を着生させる現在の製麴法に至った<sup>4)</sup>。この間に木灰を使った優良菌株の維持継代などの技術が融合し、本邦における製麴用のカビが*Rhizopus*属菌から*Aspergillus*属菌へ変わったようである。しょうゆ製造法は酒造りの技術が多く転用されており、酒造の副業として始めたしょうゆ製造業者も多い<sup>4)</sup>。江戸末期にはしょうゆの製造工程は原料処理から製麴、仕込み、製成とほぼ現在のものの原型にたどりついている<sup>4)</sup>。

明治維新後日本にも産業革命がおり、しょうゆ産業も機械化された。第二次世界大戦後、大豆の蒸煮による過変性がタンパク質の可溶化を妨げることがわかり、適切な蒸煮法が確立された。また高プロテアーゼ生産菌が育種された。これらの技術革新により、現在タンパク質の原料歩留まりは、終戦頃の60%台と比較して、90%にまで向上している<sup>5)</sup>。

### 麴菌の分子生物学と麴菌の未来

微生物学の発展で、麴とは麴菌というカビの働きによって作られること、また麴菌はプロテアーゼ、アミラーゼなどの酵素を分泌しその働きで原料を分解することが明らかになった。それ以降しょうゆ醸造における麴菌の育種はおもにタンパク質利用率の向上を目標に実施されてきた。麴菌の育種には平板寒天培地培養法と人為的変異が導入されるようになり、しょうゆメーカーにとってはプロテアーゼ高生産菌の育種は現在も続く課題である。

将来のしょうゆ製造を考えた時、麴菌の育種、特に分子生物学的な知見に基づいた育種は不可欠である。実用化にはいまだに越えるべきハードルが多く残っているが、技術的な基盤は整いつつある。後半では麴菌の分子生物学の発展から麴菌利用についての将来展望を考察する。

### 麴菌のゲノム解析

麴は麴菌の働きによって作られている。つまり麴の働きを理解するためには、麴菌を理解する必要がある。その基盤として麴菌の設計図である全ゲノムの塩基配列を決定することは不可欠である。*A. oryzae*の全ゲノムは2005年、*A. nidulans*、*A. fumigatus*と同時に決定された<sup>6)</sup>。その後*A. niger*、*A. flavus*といった産業上あるいは公衆衛生上重要な*Aspergillus*属菌のゲノム配列が相次いで決定された<sup>7)</sup>。しょうゆ麴菌*A. sojae*は2011年に佐藤らによって決定されている<sup>8)</sup>。

表1. *Aspergillus*属菌のゲノム解析<sup>7)</sup>

	Total size (Mb)	GC content (%)	Number of genes
<i>A. nidulans</i>	30.5	50.3	10,658
<i>A. fumigatus</i>	29.4	49.8	9,767
<i>A. oryzae</i>	37.9	48.2	11,886
<i>A. flavus</i>	36.8	48.4	12,604
<i>A. sojae</i> <sup>8)</sup>	39.5	48.1	13,033

麴菌はゲノムサイズが37~39 Mbと他の*Aspergillus*属菌と比較して大きく、遺伝子数も多い(表1)。*A. oryzae*と*A. sojae*を比較すると*A. oryzae*では $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のコピー数が多い一方、*A. sojae*では特異的なプロテアーゼが存在するなど、それぞれの菌の特徴がゲノム情報から伺える(後述)。今後、*A. oryzae*、*A. sojae*に属する多くの株や、他の*Aspergillus*属菌のゲノム解析が進めばそれらの比較から種々な性質の推定、醸造特性の解明、二次代謝産物の生産機構の解明などが進展すると期待される。

### 遺伝子組換え技術の発展

遺伝子組換え技術は望ましい形質の増強・付与、好ましくない形質の抑制・除去を可能とし、将来の育種の基盤技術になると考えられる。麴菌についても1987年に*A. oryzae*でアルギニン要求性をマーカーとした宿主-ベクター系が開発され<sup>9)</sup>、以後さまざまなマーカー、宿主-ベクター系の開発が行われている。しかし麴菌の形質転換には一つ大きな問題があった。相同組換えを利用してゲノムにベクターを組み込もうとすると、予期せぬ遺伝子座にランダムに組み込まれる(非相同組換え)確率が高く、目的の遺伝子座に目的通りにベクターを組み込むジーンターゲットングの効率が低いことである。高橋らは非相同組換えに關与する*ku70*、*ku80*という遺伝子をあらかじめ破壊した株を宿主に使用することで、相同組換え効率を飛躍的に向上させることに成功した<sup>10)</sup>。相同組換え率が向上するとそれを応用した遺伝子操作法が一気に利用可能となった。

①染色体大規模領域の欠失：高橋は*pyrG*遺伝子をポジティブセレクションにもネガティブセレクションにも利用して相同組換え領域をマーカーとともに組み込んだ後、選択圧をかけることで大きな(数10 kb~数100 kb)染色体上の任意の領域を欠失させることに成功した(図1)<sup>11)</sup>。この方法を用いて麴菌の7番染色体の最小化が試みられた<sup>12)</sup>。

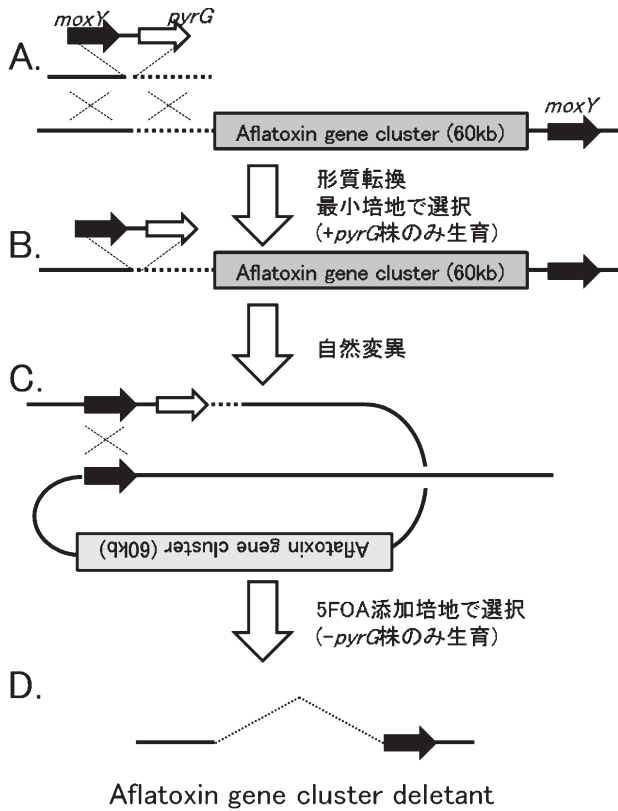


図1. アフラトキシクラスタ欠失株の作製<sup>11)</sup>. *moxY*と*pyrG*を組換えの標的部位で挟んだベクターを構築し*pyrG*株の形質転換を行う(A). ウリジン/ウラシルを含まない培地で選抜すると*moxY-pyrG*を含む組換え株のみが生育する(B). *moxY-pyrG*挿入株の分生子を5-フルオロオロチン酸(5FOA)を含む最少培地に播種する. 導入した*moxY*と生来の*moxY*との間で相同組換えが起こるとその中にある*pyrG*遺伝子とアフラトキシン遺伝子クラスターが脱落する(C). 5FOA培地では*-pyrG*株のみが生育するので, 目的のクラスター欠失株のみ生育する(D).

②遺伝子破壊株ライブラリ: ターゲティングを確実にできるようになると, 個別の遺伝子の破壊株を容易に作製することができるようになった. 小川らはゲノム配列が解読された*A. oryzae* RIB40株から転写因子と予測された約400遺伝子を抽出し, その破壊株ライブラリを作製した. そのライブラリの研究は, 分生子形成に関与する転写因子<sup>13)</sup>や, マンナン資化系を正に制御する転写因子の発見<sup>14)</sup>につながった. また*A. nidulans*においてキナーゼ遺伝子の網羅的破壊株ライブラリが作製され, ささまざまな研究に提供されている<sup>7)</sup>. さらに多くの糸状菌でも網羅的破壊株ライブラリの作製が進めば, ゲノム解読で発見された機能未知の遺伝子のアノテーションが進展し, 麹菌育種の一助になるであろう.

### グルタミナーゼの研究

しょうゆのうまみの主因はタンパク質原料に由来する

グルタミン酸と考えられている. グルタミン酸の生成経路はペプチダーゼの作用により原料から直接遊離する経路と, 原料から遊離したグルタミンがグルタミナーゼにより加水分解されて生成する経路があると推測されている. グルタミンは非酵素的に呈味性のないピログルタミン酸へ変換するので, グルタミンをグルタミナーゼへ変換するグルタミナーゼはしょうゆ製造において重要な酵素である. 伊藤らは*Cryptococcus*由来グルタミナーゼとの相同性を利用して麹菌ゲノムから新規なグルタミナーゼ遺伝子*gahB*をクローニングした<sup>15)</sup>. 麹菌にはグルタミナーゼ遺伝子が10~12種類存在するが, 麹中でそれらがコードする酵素のうちどれが寄与しているかは今まで分からなかった. 伊藤らは*A. oryzae*および*A. sojae*において種々のグルタミナーゼ遺伝子破壊株を作製したところ, *gahB*破壊株で麹中のグルタミナーゼ活性が90%低下することを確認し, *GahB*が麹中で主要なグルタミナーゼであることを示した. *GahB*をはじめとした種々のグルタミナーゼの発現をコントロールすることで, グルタミン酸含量の高い高付加価値のしょうゆ・調味料の製造に結びつくことが期待される.

### 加水分解酵素

麹菌は多量の糖質分解酵素を分泌し, 原料の多糖・オリゴ糖を分解する. それらは乳酸発酵, アルコール発酵の基質となり, 有機酸, 香気成分, アルコールなどしょうゆの風味を構成する上で不可欠な成分を生成する. 一方, 分解されなかった糖質は圧搾工程後残渣となる. この圧搾残渣は飼料や燃料などの用途はあるものの, 基本的には不要なものでできれば少ないに越したことはない. したがって, しょうゆ醸造においては糖質の分解がより効率的に行われることが求められる.

一般的に*A. sojae*の糖質分解能は*A. oryzae*と比較して低いことが知られている. ゲノム解析によって, *A. oryzae*は $\alpha$ -アミラーゼを3コピー持っているのに対し, *A. sojae*は1コピーしか持っていないことが判明している. これだけで*A. sojae*の糖質分解能が低い理由とするのは早計かもしれないが, 今後*A. sojae*, *A. oryzae*双方でより多くの菌株における酵素生産がゲノムレベルで検討され, *A. oryzae*と*A. sojae*の酵素生産性を制御するメカニズムが解明されることを期待したい.

小川らは麹菌転写因子破壊ライブラリからマンナン分解活性の低下した株をスクリーニングして, マンナン分解制御因子*manR*を見いだした<sup>14)</sup>. *manR*によってコードされる転写因子*ManR*は $\beta$ -マンナンの分解産物であるマンノビオースによって誘導され, マンナーゼなど



多数のマンナン分解系酵素にとどまらず、バイオマス分解などへの応用も期待される。

しょうゆ製造において麹菌にもっとも大きく期待される役割は、上述したように、原料のタンパク質をアミノ酸や可溶性ペプチドにまで分解することである。そのためプロテアーゼ（プロテイナーゼ、ペプチダーゼ）の機能向上（分泌量向上あるいは比活性改善、耐塩性付与）や制御はしょうゆの研究において常に重要な課題である。しょうゆ麹において機能しているプロテアーゼは、ゲノム解読以前はエンド型ペプチダーゼ（プロテイナーゼ）7種類、エクソ型ペプチダーゼ11種以上と見積もられていた<sup>16)</sup>。しかし*A. oryzae*のゲノムが解読されると、エンド型69種、エクソ型57種の計126種ものプロテアーゼ遺伝子があることが明らかとなった<sup>5)</sup>。この数字は*A. niger*とほぼ同程度（127）で、*A. nidulans*（85）や*A. fumigatus*（94）よりも多かった。これらの遺伝子の翻訳産物の性質についてもその性質を明らかにするための研究が行われており<sup>17)</sup>、しょうゆ中での寄与について明らかにされることが期待される。

さらに*A. sojae*のゲノムを解析し、プロテアーゼ遺伝子の数を比較した。しばしばしょうゆ麹菌として用いられる*A. sojae*はタンパク質分解酵素を多く分泌することが知られているので、*A. oryzae*と比較するとプロテアーゼの数や分布などに何らかの変化があるのでは、と期待されていた。しかし*A. sojae*と*A. oryzae*の間で総プロテアーゼ数の違いは見いだせなかった<sup>8)</sup>。詳細に調べると、*A. sojae*特異的なセリンカルボキシペプチダーゼやアスパルティックプロテアーゼが存在することがわかった。これらの特異的ペプチダーゼの働きや、醸造に対する寄与に関しては今後の研究が待たれる。現在のところゲノムの比較からは麹菌のタンパク質分解酵素・糖質分解酵素生産の違いや制御を説明することは難しいが、酒用麹菌としょうゆ麹菌双方で、より多くの株のゲノム解読が進むとともに、ウェットでの実験結果が蓄積していくことで、大きな進展があることを期待したい。

### 麹菌の二次代謝

糸状菌は多くの二次代謝産物を産生する。それらの中にはペニシリンのように有用なものがある一方、マイコトキシンと呼ばれる人間にとって有毒な物質もある。*A. flavus*、*A. parasiticus*はアフラトキシンと呼ばれる強い

発がん性物質を生産する。その近縁種である麹菌がアフラトキシンを生産しない理由は、長年の間不明であった。著者らはアフラトキシン生合成に必須の転写因子AflRが*A. sojae*においてナンセンス変異をしていること、そのために転写因子としての活性を失っていること、さらにはAflRの発現誘導が行われていないことを明らかにし<sup>18)</sup>、*A. sojae*におけるアフラトキシン非生産性を分子生物学的に証明した。さらに*A. sojae*のアフラトキシンクラスター欠失株が作製されている<sup>11)</sup>。

駆け足ではあるが、しょうゆの歴史に始まって、麹菌の過去から将来の展望まで見渡してみた。穀物を調味料にするために麹菌を利用した先人たちの慧眼には驚くばかりである。麹菌が日本の風土、文化的な背景のもとに選択されてきたことを考えるとまさに国菌<sup>19)</sup>と呼ぶにふさわしい。麹菌の研究が今後さらに発展し、しょうゆをはじめとするさまざまな調味料の製造の発展に寄与するとともに、新たな産業の創出につながることを期待している。

### 文 献

- 1) 小泉武夫：麴カビと麴の話，光琳（1984）。
- 2) 田中利雄：岡崎直人醱酵工学，**60**，11（1982）。
- 3) 田中利雄ら：醸造協会誌，**77**，831（1982）。
- 4) 川田正夫：日本の醤油，三水社（1991）。
- 5) 林 和也：近代日本の創世史，**5**，14（2008）。
- 6) Machida, M. *et al.*: *Nature*, **438**, 1157 (2005).
- 7) <http://www.fgsc.net/>
- 8) Sato, A. *et al.*: *DNA Res.*, **18**, 165 (2011).
- 9) Gomi, K. *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2549 (1987).
- 10) Takahashi, T. *et al.*: *Mol. Genet. Genomics*, **275**, 460 (2006).
- 11) Takahashi, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 7684 (2008).
- 12) 小山泰二ら：化学と生物，**50**，577（2013）。
- 13) Ogawa, M. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 10 (2010).
- 14) Ogawa, M. *et al.*: *Fungal Genet. Biol.*, **49**, 987 (2012).
- 15) Ito, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 8581 (2013).
- 16) 枡倉六三郎（編）：醤油の科学と技術，（財）日本醸造協会（1988）。
- 17) 竹内道雄，北本勝ひこ（編）：改訂版分子麹菌学，（公財）日本醸造協会，188（2012）。
- 18) Matsushima, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 771 (2001).
- 19) 日本醸造学会：<http://www.jozo.or.jp/koujikinnituite2.pdf>