

2016年度 生物工学奨励賞（江田賞） 受賞



## しょうゆ醸造に寄与する麹菌由来 グルタミナーゼに関する研究

伊藤考太郎



### Studies on glutaminases of *koji mold*, which are involved in glutamate production during soy sauce fermentation

Kotaro Ito (*Research and Development Division, Kikkoman Corporation, 399 Noda, Noda, Chiba 278-0037*) *Seibutsu-kogaku* **95**: 114–120, 2017.

#### はじめに

しょうゆは大豆と小麦と食塩を原材料とし、微生物発酵によって造られる日本の伝統的な発酵調味料である。しょうゆには300種類を超える香気成分やアミノ酸、有機酸、糖などが含まれ、風味豊かな味わいを持つ<sup>1)</sup>。これら成分の多くは、3種類の異なる微生物、麹菌 (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*)、乳酸菌 (*Tetragenococcus halophilus*)、酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida versatilis*) の複合的な働きにより造られる。現在、しょうゆはその豊かな風味が好まれ、日本食とともに世界中に普及している。また、食品中に含まれる食塩をしょうゆに置き換えることで、NaCl換算で塩分摂取量を低減させることが可能であることが報告され、食品産業の中で改めて注目されている<sup>2,3)</sup>。

しょうゆのおいしさは、「味」「香り」「色」の三位一体から生まれる。その一つであるしょうゆの「味」は、「甘味」「塩味」「酸味」「苦味」「うま味」の基本5味がすべて含まれ、渾然一体となり形成される。これらの味に関わる成分は、原料に含まれるタンパク質やデンプン質が麹菌の生産する酵素によってアミノ酸やブドウ糖に分解され、さらにブドウ糖が乳酸菌により乳酸などの有機酸に、酵母によってエタノールなどのアルコール類へと代謝されて造られる。「甘味」は、ブドウ糖などの糖類、「塩味」は、原材料である食塩、「酸味」は乳酸や酢酸といった有機酸が主体であるが、「甘味」「苦味」「うま味」には、

アミノ酸やペプチドといった原料タンパク質の分解物が少なからず関わっている<sup>1)</sup>。「甘味」は、グリシンなどの甘味アミノ酸、「苦味」は、ロイシンなどの分岐鎖アミノ酸やペプチド、そして「うま味」には約20種類のアミノ酸、中でもグルタミン酸、アスパラギン酸といった酸性アミノ酸やリジン、アラニンなどが大きく働く<sup>1)</sup>。このようにアミノ酸やペプチドは、しょうゆの「味」に深く関わるため、不溶性の原料タンパク質の分解・可溶化は、しょうゆ醸造で重要視される。

大豆や小麦の不溶性のタンパク質は、諸味の中でタンパク質分解酵素（プロテアーゼやペプチダーゼ）によってペプチドを経て、各種アミノ酸にまで分解され可溶化する（可溶化したアミノ酸類を全窒素成分（total nitrogen; TN）という）。古くからしょうゆ造りの重要な工程を表した「一麴、二摺、三火入れ」という言葉があり、「麴造り」は、しょうゆ醸造でもっとも重要な工程といわれている。これは、麴をつくる製麴工程で麹菌に多種多様な酵素を生産させ、その酵素によって、原料タンパク質やでんぷん質が分解され、分解によって生じる成分が直接的な呈味に関わるだけでなく、その後の乳酸発酵、酵母発酵にも影響し、しょうゆの品質（味、香り、色）を左右するからである。そのため、麹菌の生産する酵素は、しょうゆ醸造において、生産性、品質向上を図るうえで、きわめて重要な因子といえる。

原料タンパク質の分解によって生じる各種アミノ酸やペプチドは、さまざまな呈味を与える。中でも、しよ

うゆのうま味の中心的な役割を果たすのがグルタミン酸である。しょうゆ中のグルタミン酸は、以下の二つの経路から生成すると考えられている。すなわち、(1) 原料タンパク質がプロテアーゼ、ペプチダーゼによって分解され、直接遊離する経路と、(2) 原料タンパク質の分解により生じたグルタミンがグルタミン酸に変換される経路である。原料タンパク質中に含まれるグルタミンとグルタミン酸の割合はおおよそ等量であり<sup>4)</sup>、グルタミンは、非酵素的な化学反応によって、比較的速やかにうま味のないピログルタミン酸へと変換する<sup>5)</sup>。そのため、しょうゆ中のグルタミン酸含量を高め、うま味の強いしょうゆを造るためには、グルタミンをグルタミン酸に変換する(2)の経路が重要である。グルタミナーゼは、グルタミンを加水分解し、グルタミン酸とアンモニアを生成する酵素であり、さまざまな生物種に存在する。グルタミナーゼ活性の高い麹菌を用いると、しょうゆ諸味のグルタミン酸含量が増加すること<sup>6)</sup>、麹菌の不溶性画分(菌体結合型)のグルタミナーゼ活性としょうゆ諸味中のグルタミン酸との間に正の相関が見られることから<sup>7)</sup>、しょうゆ醸造におけるグルタミンのグルタミン酸への変換には、麹菌のグルタミナーゼが深く関わっていることが知られている。そのため、古くから麹菌グルタミナーゼの研究は行われており、いくつかグルタミナーゼ活性を持つタンパク質が精製され、遺伝子も単離されている<sup>8-10)</sup>。麹菌には、複数のグルタミナーゼが存在することが明らかになっているが、どのグルタミナーゼがしょうゆ醸造で作用しているかは未だ不明である。また、麹菌のグルタミナーゼ活性を持つタンパク質がすべて精製されているわけでもない。しかし、麹菌のグルタミナーゼは、生産量が低く、菌体に結合しており、かつ、プロテアーゼ分解を受けやすい性質から酵素精製が非常に困難であり、タンパク質側からしょうゆ醸造に寄与するグルタミナーゼを探すアプローチは難しい状況にあった。

麹菌 *A. oryzae*<sup>11)</sup> および *A. sojae*<sup>12)</sup> の全ゲノム解析が報告され、遺伝子配列情報の全容が明らかとなった。一方で、麹菌における遺伝子破壊などの分子生物学的な研究手法も著しく進歩し<sup>13)</sup>、遺伝子レベルの研究が活発に行われるようになってきている。そこで筆者らは、ゲノム配列情報を活用し、真にしょうゆ醸造に寄与するグルタミナーゼを遺伝子側から明らかにするアプローチで研究を行った。

#### 酵母由来の耐塩性グルタミナーゼ遺伝子の単離<sup>14)</sup>

麹菌のグルタミナーゼは、原料タンパク質の分解に関わる麹菌のアルカリプロテアーゼなどと比較して活性が低く、至適pHがややアルカリ側であり、耐塩性に乏し

いという問題点が明らかにされた<sup>15,16)</sup>。そのため、麹菌のグルタミナーゼが重要視される一方で、しょうゆ醸造に適した耐塩性に優れるグルタミナーゼも求められていた。当社における過去の研究で、さまざまな微生物種から耐塩性グルタミナーゼのスクリーニングが行われ、*Cryptococcus* 属酵母 (*C. albidus*, *C. nodaensis*) にその活性が見いだされていた<sup>16,17)</sup>。そこで、筆者らは、これらの酵素を精製して遺伝子をクローニングした。単離した遺伝子をパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主に用いて発現させ、グルタミナーゼ・アスパラギナーゼ活性を持つことを確認した。遺伝子解析した結果、アミノ酸配列中にアミダーゼモチーフを持つという特徴を有し、amidase signature enzymes family に属するが、相同性のあるタンパク質はすべて機能未知タンパク質であり、独立したサブファミリーを形成した。一次構造で他に類似した既知遺伝子の報告がなかったため、新規のグルタミナーゼとして *gah* (glutamine amidohydrolase) 遺伝子と名付けた(図1)。

#### 麹菌ゲノム配列情報からの グルタミナーゼ遺伝子の探索<sup>18,19)</sup>

麹菌ゲノム配列情報が明らかとなったため、既知のグルタミナーゼと相同な遺伝子を *in silico* で探索した。その結果、麹菌 *A. oryzae* RIB40 株のゲノム配列中には、上記の *Cryptococcus* 属酵母由来のグルタミナーゼ・アスパラギナーゼと相同性のある Type I (*gah* タイプ)、*Bacillus subtilis* 由来の  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性を持つグルタミナーゼと相同性のある Type II (*ggt* タイプ)、*A. oryzae* から初めてグルタミナーゼとして同定された *gtaA* 遺伝子<sup>9)</sup> と相同性のある Type III (*gta* タイプ)、*Micrococcus luteus* 由来の耐塩性グルタミナーゼと相同性のある Type IV (*gls* タイプ) の、酵素特性の異なる四つのタイプ、計12個のグルタミナーゼ遺伝子が存在した(表1)。Type IV の *Aogls* 遺伝子以外は複数のパラログ遺伝子が存在した。Type I の *AogahA* 遺伝子は麹菌の EST (expressed sequence tag) 解析で炭素源飢餓液体培養 (LS library; liquid carbon-starved library) での発現が確認されたので、そのオルソログ遺伝子 (*AsgahA* 遺伝子) を *A. sojae* よりクローニングした。単離した *AsgahA* 遺伝子を *A. oryzae* を宿主に用いて強制発現させ、酵素の精製および諸性質の決定を行った。*AsgahA* 遺伝子は耐塩性および耐熱性に優れるグルタミナーゼと相同性が高い遺伝子であったが、*AsGahA* タンパク質は耐塩性も耐熱性も認められなかった。一方で、基質特異性に特徴があり、遊離のグルタミンやアスパラギンを脱アミド化するだけでなく、ペプチドのC末端に

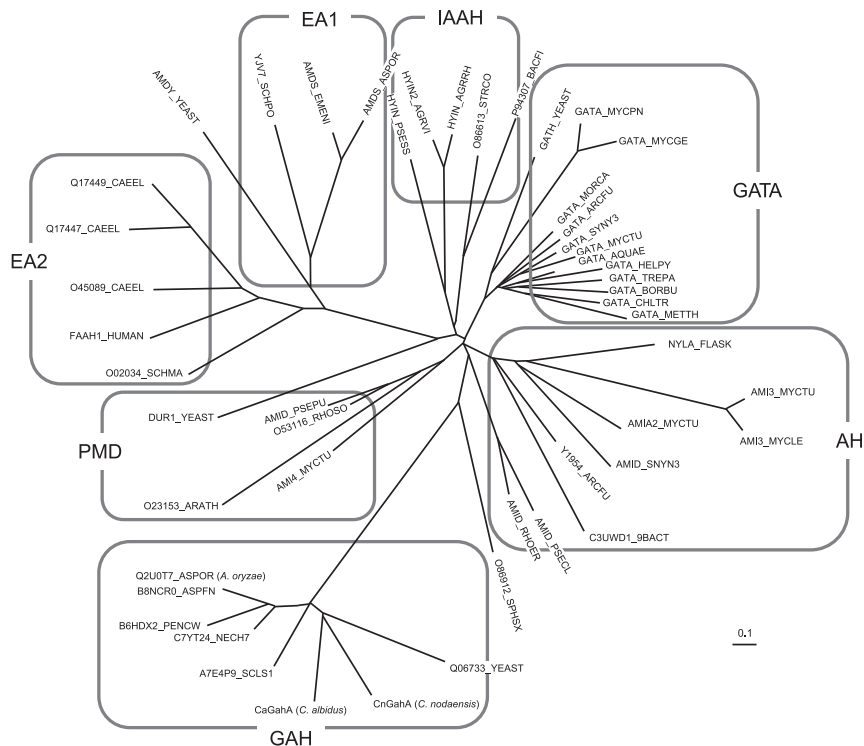


図1. アミダーゼドメインを持つタンパク質 (amidase signature enzymes family) の系統樹解析<sup>25)</sup>. タンパク質のアミノ酸配列は UNIPROT データベースより入手し、マルチプルアライメントは Clustal W でデフォルトパラメーターを使用して行った。系統樹は Tree View を使用して作製した。Box は、amidase signature enzymes family のサブファミリーを表し、過去の文献を参考に分類した。Glu-tRNA<sup>Gln</sup> amidotransferase Subunit A (GATA) family: GATA\_MYCGE, GATA\_MYCPN, GATA\_MYCTU, GATA\_ARCFU, GATA\_SYNY3, GATA\_MORCA, GATA\_AQUAE, GATA\_HELPHY, GATA\_BORBU, GATA\_TREPA, GATA\_METTH, GATA\_CHLTR; peptide amidase (PMD) family: AMID\_RHOER, AMID\_PSECL, AMID\_PSEPU, Q23153\_ARATH, Q53116\_RHOSO, O86912\_SPHSX, AMIA\_MYCTU, DUR1\_YEAST; indole-acetamide hydrolase (IAAH) family: HYIN2\_AGRVI, HYIN\_AGRRH, HYIN1\_AGRVS, HYIN\_PANNY, HYIN1\_PSESS, P94307\_BACFI, O86613\_STRCO; 6-aminohexanoate-cyclic dimer hydrolase (AH) family: C3UWD1\_9BACT, Y1954\_ARCFU, AMID\_SNYN3, AMIA2\_MYCTU, NYLA\_FLASK, AMI3\_MYCLE, AMI3\_MYCTU; eukaryotic amidase 1 (EA1): AMDS\_ASPOR, AMDS\_EMENI, AMDY\_YEAST, YJV7\_SCHPO; eukaryotic amidase 2 (EA2, fatty acid amide hydrolase (FAAH) family): Q17449\_CAEEL, Q17447\_CAEEL, O45089\_CAEEL, FAAH1\_HUMAN, O02034\_SCHMA; glutaminase (GAH) family: CnGahA, CaGahA, A7E4P9\_SCLS1, B6HDX2\_PENCW, B8NCR0\_ASPFN, C7YT24\_NECH7, Q2KH33\_9PEZI, Q2U0T7\_ASPOR, Q06733\_YEAST.

位置するグルタミンやアスパラギンにも作用する新規なペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼであった。

### A. sojae のグルタミナーゼ遺伝子とその単独遺伝子破壊株の作製<sup>19,20)</sup>

次に *A. oryzae* RIB40 株で見いだされた 12 個のグルタミナーゼ遺伝子が、しょうゆ麹菌 *A. sojae* にも存在するか調べた。その結果、*A. oryzae* と同様に四つのタイプに分かれて、10 個のグルタミナーゼ遺伝子が存在することが明らかとなった (表 1)。次に、どのグルタミナーゼがしょうゆ醸造に効果があるのかを明らかにするため、各遺伝子の単独破壊株を作製した。*A. sojae* は、*A. oryzae* と比較してグルタミナーゼ活性が高く<sup>21)</sup>、グルタミナーゼ遺伝子の数も少ない。このことから、検証しやすさを考慮して、宿主には *A. sojae* を用いた。各グルタミナーゼ破壊株のグルタミナーゼ活性を測定した結果、Type I

の *AsgahB* 遺伝子を破壊するとグルタミナーゼ活性が 1/10 以下に低下した (図 2)。この遺伝子破壊の効果は、*A. oryzae* でも確認され、しょうゆ麹における麹菌の主要なグルタミナーゼ活性は *AsgahB* 遺伝子由来であることが明らかとなった。麹菌のグルタミナーゼ活性としょうゆ諸味のグルタミン酸含量は正の相関にある<sup>7)</sup> という知見から、*AsgahB* 遺伝子破壊株を用いたしょうゆのグルタミン酸含量は低下すると予想した。しかし、*AsgahB* 遺伝子破壊株を含め、単独遺伝子破壊株を用いて試験醸造したしょうゆのグルタミン酸含量はどれも低下しなかった。これら 10 個の遺伝子はすべてグルタミナーゼ活性を持つと予想されるため、単独遺伝子破壊では、その他の遺伝子由来のグルタミナーゼ活性により補完される可能性が考えられた。

表1. 麴菌のグルタミナーゼ遺伝子<sup>26)</sup>

	相同性検索に利用した 遺伝子/タンパク質	遺伝子ID ( <i>A. oryzae</i> RIB40)	<i>A. sojae</i> NBRC4239における オルソログ遺伝子の有無	
Type I	glutaminase-asparaginase ( <i>Cryptococcus nodaensis</i> )	<i>gahA</i>	AO090003001406	+
		<i>gahB</i>	AO090011000310	+
		<i>gahC</i>	AO090011000138	-
		<i>gahD</i>	AO090701000634	+
Type II	$\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( <i>Bacillus subtilis</i> )	<i>ggtA</i>	AO090005000169	+
		<i>ggtB</i>	AO090023000537	-
		<i>ggtC</i>	AO090113000029	+
		<i>ggtD</i>	AO090009000211	+
Type III	glutaminase ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	<i>gtaA</i>	AO090020000289	+
		<i>gtaB</i>	AO090003000638	+
		<i>gtaC</i>	AO090001000625	+
Type IV	glutaminase ( <i>Micrococcus luteus</i> )	<i>gls</i>	AO090010000571	+

*A. oryzae* RIB40株および*A. sojae* 4239株における既知のグルタミナーゼ遺伝子と相同性のある遺伝子を示す。相同性検索は、AspGDおよびNCBIのデータベースに対し、既知のグルタミナーゼの遺伝子またはアミノ酸配列 (*C. nodaensis* (Accession No. A610785), *B. subtilis* (E433299), *A. oryzae* (AB029552), *M. luteus* (DQ019448)) を用いて行った。相同性の有無はE値で判断し、E<sup>-40</sup>以下を相同性のある遺伝子とした。+は*A. sojae* 4239株においてオルソログ遺伝子が存在することを意味し、-は存在しないことを意味する。

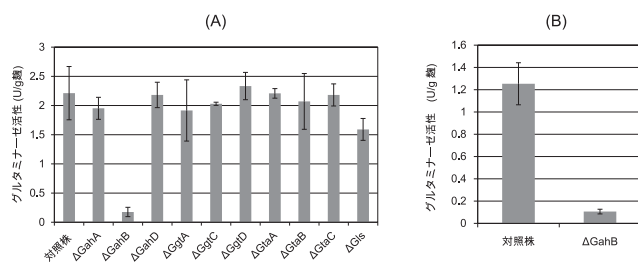


図2. 各グルタミナーゼ遺伝子破壊株のグルタミナーゼ活性<sup>26)</sup>. *A. sojae*を宿主にしたグルタミナーゼ遺伝子破壊株のグルタミナーゼ活性 (A) と、*A. oryzae*を宿主にしたグルタミナーゼ遺伝子破壊株のグルタミナーゼ活性 (B). 対照株と破壊株を30°C、4日間、フラスコで培養し、得られた麴の菌体結合型グルタミナーゼ活性を測定した。測定は独立して3回行った。

### グルタミナーゼ多重遺伝子破壊株を用いた しょうゆの試験醸造<sup>20)</sup>

そこで、この10個のグルタミナーゼ遺伝子について、タイプ別に多重に破壊した株、それぞれのタイプを組み合わせることで多重に破壊した株、さらにすべてのグルタミナーゼ遺伝子を破壊した株を作製した。Type I, Type II およびType IVを同時に破壊した7重遺伝子破壊株 (KGd-T124) および全グルタミナーゼ遺伝子破壊株 (KGd-Tall10) はグルタミナーゼ活性が1/100以下に低下した (図3)。それらを用いて試験醸造したしょうゆでは、グルタミン酸含量が60%減少し、同時にピログル

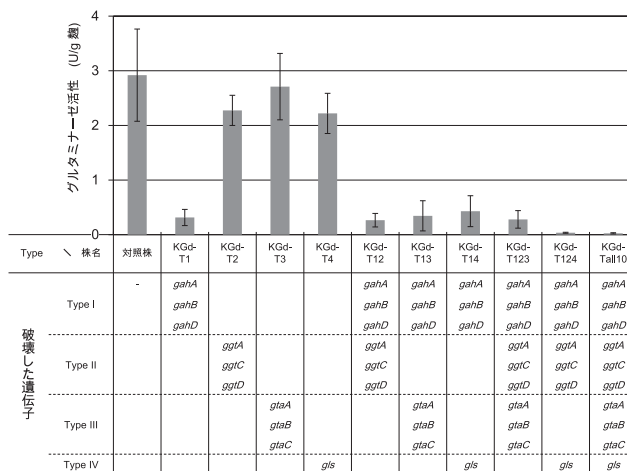


図3. グルタミナーゼ多重遺伝子破壊株の菌体結合型グルタミナーゼ活性<sup>27)</sup>. 各多重遺伝子破壊株を用いて、板蓋で製麴し、得られたしょうゆ麴の菌体結合型グルタミナーゼ活性を測定した。

タミン酸含量が増加した (図4)。このグルタミン酸の減少量は、筆者らが推定したグルタミナーゼ反応により生成される量 (第2経路) とほぼ一致した。さらに、7遺伝子の中からさまざまな組合せで多重に破壊した株を作製した結果、Type Iの *AsgahA*, *AsgahB*, Type IIの *AsggtA* およびType IVの *Asgls* の4遺伝子を同時に破壊すると7重遺伝子破壊株と同様の結果が得られた (図5)。また、この4重遺伝子破壊株 (KGd-NT124-4株) を用

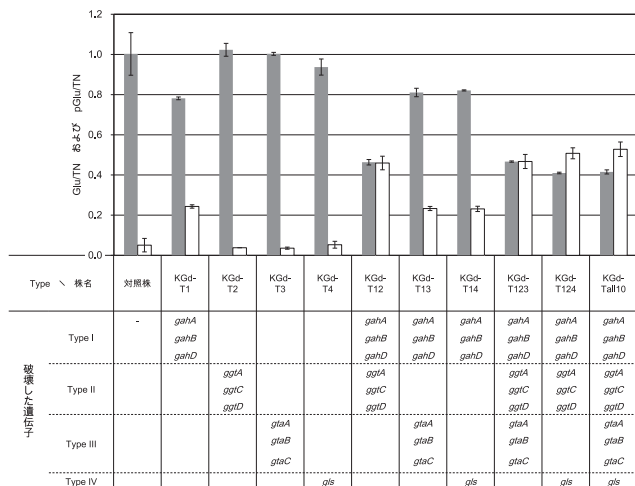


図4. 多重遺伝子破壊株を用いたしょうゆの試験醸造<sup>27)</sup>. 多重遺伝子破壊株を用いて、板蓋で製麴し、通常の仕込み条件でしょうゆの試験醸造を行った。全窒素成分はケルダール法を用いて測定し、グルタミン酸およびピログルタミン酸は酵素法およびHPLC法で定量した。全窒素成分当たりのグルタミン酸およびピログルタミン酸量を表す。■：グルタミン酸量(%) / 全窒素成分(%) (Glu/TN), □：ピログルタミン酸量(%) / 全窒素成分(%) (pGlu/TN)。

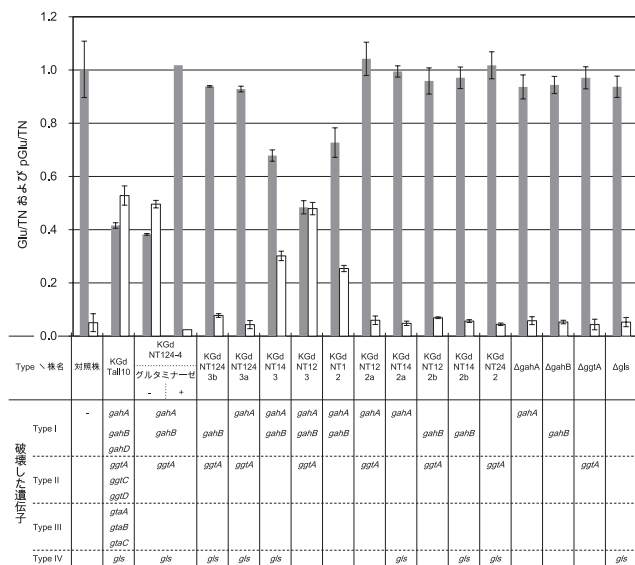


図5. 四つのグルタミンナーゼ遺伝子の多重遺伝子破壊株を用いたしょうゆの試験醸造<sup>27)</sup>. しょうゆ醸造に寄与する四つのグルタミンナーゼ遺伝子をさまざまに組み合わせた多重遺伝子破壊株を用いて、板蓋で製麴し、通常の仕込み条件でしょうゆの試験醸造を行った。全窒素成分はケルダール法を用いて測定し、グルタミン酸およびピログルタミン酸は酵素法およびHPLC法で定量した。全窒素成分当たりのグルタミン酸およびピログルタミン酸量を表す。■：Glu/TN, □：pGlu/TN。

いた試験醸造では、仕込み初期に市販のグルタミンナーゼ製剤を添加すると、グルタミン酸含量およびピログルタミン酸含量は対照株と同等の値を示した(図5)。以上の結果から、しょうゆ醸造のグルタミン酸生成には、これら四つのグルタミンナーゼが相補的かつ相互に作用してい

ることが明らかとなった。

次に、これら四つのグルタミンナーゼの中で2重、3重遺伝子破壊株を作製し、しょうゆの試験醸造を行った。その結果、AsGahBタンパク質もしくはAsGahAタンパク質が残存する3重遺伝子破壊株(KGd-NT124-3a(Δ*gahA*-Δ*ggtA*-Δ*gls*), KGd-NT124-3b(Δ*gahB*-Δ*ggtA*-Δ*glsgahA*-Δ*gahB*))では20-30%のグルタミン酸含量の低下が観察された(図5)。これら2種のグルタミンナーゼには共通した性質を持つことが推測されたため、AsGahBタンパク質についても酵素精製し、諸性質を決定した。その結果、AsGahAタンパク質と同様に、しょうゆ醸造に適した性質(耐塩性、至適pHが低いなど)はなかったが、ペプチドのC末端に位置するグルタミンにも作用するペプチドグルタミンナーゼであることが明らかとなり、しょうゆ醸造で高いグルタミン酸含量を得るには、この酵素反応が重要であることが明らかとなった。

### しょうゆ醸造におけるグルタミン酸生成機構

本研究を踏まえて、しょうゆ醸造におけるグルタミン酸生成機構をまとめた(図6)。大豆と小麦由来のタンパク質は、麴菌由来のプロテアーゼ(アルカリプロテアーゼ、中性プロテアーゼ、酸性プロテアーゼ)によってペプチドに分解される。タンパク質分解によって生じたペプチドは、麴菌由来のペプチダーゼ(ロイシニアミノペプチダーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ)によってアミノ酸にまで分解される。ここでグルタミン酸は異なる経路を経て生成される。第1の経路は、グルタミン酸が原料タンパク質の構成アミノ酸の一種であることから、このペプチドの分解により、タンパク質中に含まれるグルタミン酸が直接遊離する経路である(図6-(1))。第2の経路は、同じくペプチドの分解によって生じたグルタミンがグルタミンナーゼによる加水分解反応によって生じる経路である(図6-(2))。ここでは、麴菌の四つのグルタミンナーゼ(GahAタンパク質、GahBタンパク質、GgtAタンパク質、Glsタンパク質)が関与する。仕込み初期のしょうゆ諸味は、中性付近のpHを示す。この期間では、酵素の至適pHが高いアルカリプロテアーゼや中性プロテアーゼ、ロイシニアミノペプチダーゼなどとともに効率良く四つのグルタミンナーゼが作用できると考えられる。さらに第3の経路として、GahAタンパク質およびGahBタンパク質のペプチドグルタミンナーゼ反応により、ペプチドのC末端のグルタミン残基が脱アミド化されてグルタミン酸に変換され、その後遊離する経

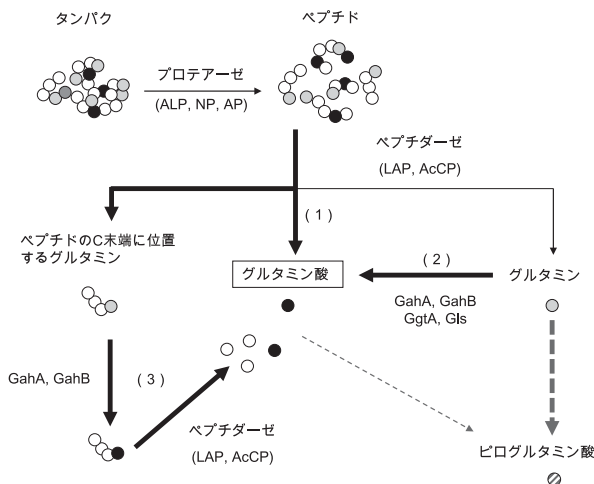


図6. しょうゆ醸造におけるグルタミン酸の生成<sup>27)</sup>. (1) タンパク質分解により直接遊離する経路, (2) グルタミナーゼ反応によってグルタミン酸に変換される経路, (3) ペプチドのC末端のグルタミンをグルタミン酸に変換する経路. ○は各種アミノ酸を表し, ⊙はグルタミンを, ●はグルタミン酸を表している. ALP: アルカリプロテアーゼ, NP: 中性プロテアーゼ, AP: 酸性プロテアーゼ, LAP: ロイシニアミノペプチダーゼ, AcCP: 酸性カルボキシペプチダーゼを表す. グルタミンやグルタミン酸は, 非酵素的な反応により, うま味成分ではないピログルタミン酸⊙へと変換されるが, グルタミンの方が容易に変換される(太い点線で表記).

路がある(図6-(3)). グルタミナーゼは, 醸造期間中に麴菌自身のプロテアーゼによる分解やアルコールなどにより失活することが推測される. グルタミナーゼが失活する前にペプチドの段階でグルタミン酸に変換することにより, 失活後にロイシニアミノペプチダーゼがゆっくりとペプチドを分解してもグルタミン酸として遊離される.

また, 原料タンパク質からの酸性アミノ酸の遊離やしょうゆ乳酸菌により生産される乳酸や酢酸といった有機酸の生成により, しょうゆ諸味のpHは徐々に低下する. それとともに酸性側に至適pHを持つ酸性プロテアーゼやC末端側からアミノ酸を遊離させる酸性カルボキシペプチダーゼが活発化し, C末端がグルタミン酸に変換されたペプチドからグルタミン酸が遊離する. したがって, ペプチドの状態でもグルタミン酸に変換するペプチドグルタミナーゼ反応がしょうゆ醸造でグルタミン酸含量を高めるうえで重要な因子であると考えられる.

### おわりに

麴菌のゲノム配列情報が開示され, 遺伝子解析のアプローチにより, しょうゆ醸造で作用するグルタミナーゼを特定することができた. 本研究で明らかになったしょうゆ醸造に寄与する四つのグルタミナーゼのうち, 三つ(GahA タンパク質, GahB タンパク質およびGls タンパ

ク質)はゲノム配列情報が明らかになって初めて見いだされたものである. 麴菌グルタミナーゼとして初めて単離報告されたGtaA タンパク質がしょうゆ醸造では機能していないことから, 酵素活性を持っていたとしても必ずしも醸造で効果を発揮するとは限らないことも明らかとなった. しょうゆ醸造では不溶性(菌体結合型)のグルタミナーゼが重要と考えられていたが, 主に作用したGahA タンパク質, GahB タンパク質, GgtA タンパク質は, アミノ酸配列情報から菌体外酵素と予測され, 強制発現株でも分泌酵素(遊離型)としての局在性を示した<sup>18,19)</sup>. しかし, 強制発現株の菌体結合型のグルタミナーゼ活性は高く維持されていたことから, それらの酵素の一部は菌体表面にトラップされて留まることが予想される. そのため, 以前から推測されていたように, 遊離型と菌体結合型のグルタミナーゼは同一であり, self-digestionにより菌体から遊離していると考えられる<sup>8,9,22)</sup>. 一方で, アミノ酸配列情報および強制発現株でも菌体内酵素として局在性を示したGls タンパク質がしょうゆ醸造で機能していることも明らかとなった. この酵素は, 寄与率は低いが他の酵素とは異なり耐塩性を持つため<sup>23)</sup>, 菌体内から徐々に漏れ出て醸造後期に効果を発揮するのかもしれない.

しょうゆ醸造において, 過剰な麴菌の酵素は火入れ坯形成を促進する可能性があり<sup>24)</sup>, しょうゆの歩留まりを低下させるため, しょうゆ醸造中で作用する酵素のみを麴菌に生産させる必要がある. ゲノム配列情報を活用することで, 真にしょうゆ醸造でのグルタミン酸生成に寄与する酵素を明らかにすることができ, しょうゆ醸造で効果のある酵素活性を強めた麴菌の育種が可能となった. 今後は, タンパク質加水分解酵素や多糖類分解酵素などのさまざまな酵素に対して, しょうゆ醸造で真に作用する酵素遺伝子を明らかにし, 醸造過程で効果のある酵素を必要量作る理想の麴菌の育種を目指していく必要がある.

### 謝 辞

本研究は, キッコーマン株式会社および, (公財)野田産業科学研究所において, 多くの方々に支えていただきながら行われたものです. キッコーマン株式会社 常務執行役員 松山旭研究開発本部長, (公財)野田産業科学研究所 小山泰二所長に深く感謝致します. また, 多大なるご助言とご指導を賜りました半谷吉識氏, 小熊哲哉博士, 松島健一郎博士, 海防玄龍博士に深くお礼を申し上げます. また, 共に同じ部屋で熱い議論をさせていただいた同僚の皆様に深謝いたします. 私の手となり足となり, 研究をサポートしていただいた遠藤奈穂子氏, 中村友紀氏に深く感謝いたします. Gls タンパク質に関する研究は, 大分大学との共同研究で行われたものです. 森口充暲大分大学名誉教授, 吉宗一晃博士(現:日本大学生産

工学部准教授), 増尾直久博士 (現: 興人ライフサイエンス (株)) に心よりお礼申し上げます。最後に, 本研究での確かな助言を頂き, また, 研究に没頭する私を温かい目で支え続けてくれた伊藤咲良博士に心からお礼申し上げます。ここに記載できなかった多くの皆様にも支えていただき, その支えなくして, この賞を頂くことはできませんでした。ここに深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) 河野友美: 生活の科学シリーズ, (財) 科学技術教育協会, **24**, p. 6–14 (1990).
- 2) Kremer, S., Mojet, J., and Shimojo, R.: *J. Food Sci.*, **74**, S255–262 (2009).
- 3) McGough, M. M., Sato, T., Rankin, S. A., and Sindelar, J. J.: *Meat Sci.*, **91**, 185–194 (2012).
- 4) 栃倉辰六郎: 醤油の科学と技術, p. 7, (財) 日本醸造協会 (1988).
- 5) 黒島英三郎, 大山義朗, 松尾隆治, 杉森恒武: 醗酵工學雑誌, **47**, 693–700 (1969).
- 6) Yamamoto, S. and Hirooka, H.: *J. Ferment. Technol.*, **52**, 564–569 (1974).
- 7) 四方日出男, 安井卓男, 石上有造, 大森邦英: 醬研, **5**, 21–25 (1979).
- 8) Yano, T., Ito, M., Tomita, K., Kumagai, H., and Tochikura, T.: *J. Ferment. Technol.*, **66**, 137–143 (1988).
- 9) Koibuchi, K., Nagasaki, H., Yuasa, A., Kataoka, J., and Kitamoto, K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 59–68 (2000).
- 10) 特許第4651203号
- 11) Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D. W., Galagan, J. E., Nierman, W. C., Yu, J., Archer, D. B., Bennett, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Fedorova, N. D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P. R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J. R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N., and Kikuchi, H.: *Nature*, **438**, 1157–1161 (2005).
- 12) Sato, A., Oshima, K., Noguchi, H., Ogawa, M., Takahashi, T., Oguma, T., Koyama, Y., Itoh, T., Hattori, M., and Hanya, Y.: *DNA Res.*, **18**, 165–176 (2011).
- 13) Takahashi, T., Masuda, T., and Koyama, Y.: *Mol. Genet. Genomics.*, **275**, 460–470 (2006).
- 14) Ito, K., Umitsuki, G., Oguma, T., and Koyama, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **75**, 1317–1324 (2011).
- 15) 古屋 武, 寺本淳身, 石毛雅夫, 内田一生, 吉野 宏: 醬研, **11**, 109–114 (1985).
- 16) 横塚 保, 岩浅 孝, 藤井三治: 醬研, **13**, 18–25 (1987).
- 17) Sato, I., Kobayashi, H., Hanya, Y., Abe, K., Murakami, S., Scorzetti, G., and Fell, J. W.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 127–132 (1999).
- 18) Ito, K., Matsushima, K., and Koyama, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**: 5182–5188 (2012).
- 19) Ito, K., Hanya, Y., and Koyama, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 8581–8590 (2013).
- 20) Ito, K., Koyama, Y., and Hanya, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1832–1840 (2013).
- 21) 林 和也, 寺田 勝, 水沼武二: 醬研, **7**, 166–172 (1981).
- 22) Ito, K. and Koyama, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 253–255 (2014).
- 23) Masuo, N., Yoshimune, K., Ito, K., Matsushima, K., Koyama, Y., and Moriguchi, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 576–578 (2005).
- 24) 橋本彦堯, 横塚 保: 醸協, **71**, 496–499 (1976).
- 25) 伊藤考太郎: 醬研, **38**, 279–289 (2012).
- 26) 伊藤考太郎: 醬研, **42**, 213–226 (2016).
- 27) 伊藤考太郎, 小山泰二, 半谷吉識: 醬研, **42**, 339–352 (2016).