

平成 30 年度
清酒酵母・麴研究会
講演要旨集

日時 平成 30 年 10 月 9 日 (火)

場所 北とぴあ 第 2 研修室

東京都北区王子 1 丁目 11 番 1 号

清酒酵母・麴研究会

プログラム

- 13:00～13:20 清酒酵母・麴研究会 総会
- 13:20～13:50 「酵素活性に着目した黒麴菌の選抜とその酒質」
株式会社ビオック 白石 洋平
- 13:50～14:20 「UV-LED を用いた清酒酵母の育種」
徳島県立工業技術センター 岡久 修己
- 14:20～14:50 「 α -エチルグルコシド発酵物のコラーゲンスコアへの効果」
金沢工業大学バイオ・化学部 尾関 健二
- 14:50～15:10 ～休憩～
- 15:10～15:40 「協会系酵母とは系統が異なる清酒酵母 Km67 株の醸造特性」
菊正宗酒造株式会社 高尾 佳史
- 15:40～16:45 特別講演「麴菌の酵素生産はどのように制御されているか」
東北大学大学院農学研究科 五味 勝也
- 17:00～ 懇親会 (北とぴあ9階901会議室)

酵素活性に着目した黒麹菌の選抜とその酒質

株式会社ビオック 白石 洋平

【背景・目的】

焼酎製造において酵母は、香気成分やアルコール生成能の違いなどの性質を有している。例えば、鹿児島県酒造組合から販売されている鹿児島2号は耐熱性と耐酸性に優れた酵母であり、鹿児島4号はエステル香が高く、鹿児島5号はアルコール収得量が高い。また、鹿児島6号は果糖資化性が高く黒糖焼酎製造用として使用され、鹿児島香り酵母はイソアミルアルコールと酢酸イソアミル生成能が高い性質を有している。また、公益財団法人日本醸造協会や宮崎県、熊本県、大分県、沖縄県からも個性的な酵母が販売されており、少なくとも15種類の酵母が焼酎製造に使用されている。一方、麹菌は種麹メーカーでそれぞれの所有菌株によって造られた種麹はあるものの、菌株自体のバリエーションは酵母に比べると少ない。また、焼酎麹菌の選抜や育種はクエン酸に関わる報告がみられる程度で、酵素活性に着目した育種や焼酎の香気に関する報告は非常に少ない。

これまでに演者らは、焼酎醪にプロテアーゼ剤を添加して焼酎製造を行うことで、アルコール収得量の向上や香気成分中のアルデヒド類の増加により酒質が変化することを明らかにしてきた。これは醪中の酵素活性が酒質の変化に関与する知見である。

そこで、麹菌が生産するタンパク質分解酵素である酸性プロテアーゼ(以下、AP)および酸性カルボキシペプチダーゼ(以下、ACP)を指標に、酵素活性が高く、従来の焼酎製造に使用している黒麹菌株とは異なる特長を有した菌株を取得することを目的とした。さらに、選抜された黒麹菌株を用いて、芋焼酎の小仕込み試験を行い酒質に与える影響について検討した。

【方法・結果】

○菌株の選抜

株式会社ビオック保有する菌株の中から、黒い分生子を着生し、生育に異常が無く、生酸性を有している糸状菌55株を用いて選抜を行った。選抜方法は糸状菌55株すべて小スケールでの製麹を行い、著しく生酸性が低くなく、かつプロテアーゼ活性の高い菌株を選抜した。また、*Aspergillus luchuensis*と*A. niger*を区別する為にPCRでの簡易判別を行い、*A. luchuensis* type以外の可能性がある糸状菌を除外した。その後、種麹製造試験、酒類総合研究所による黒麹菌判別の結果、*A. luchuensis* KBN4038, KBN4041 および KBN4080 の3株を選抜した。

○選抜株を用いた製麹と芋焼酎の小仕込み試験

選抜された 3 株を用いて酒造メーカーが実際に使用している原料米を用いて 1,000 g スケールの製麴を行った。製麴は恒温恒湿器で行い、品温経過および製麴操作は本格焼酎製造技術を参考に制御し、42 時間出麴とし、得られた麴の麴酸度および酵素活性を測定した。その結果、AP 活性が対照の市販黒麴と比べて選抜株では 1.3~1.7 倍高かった。また、選抜株では AP 活性以外の酵素活性においても対照と比較して全体的に高い活性を示している。しかし、出麴酸度は 3.3~4.6 と対照の 6.8 と比べ低かった。

得られた選抜株麴を用いた芋焼酎の小仕込み試験では、対照と比べて遜色のない発酵経過となり、問題なく焼酎製造が行えることが明らかとなった。醪中の pH は対照が 4.2 と最も低く、酸度も 6.2 と最も高かった。これは、対照の出麴酸度が選抜株と比較して、1.5~2.0 倍高かったためである。また、麴の AP 活性に相応して醪中のアミノ酸総量が 1.25 倍に増加する結果が得られた。

○選抜株を用いた芋焼酎の香気成分と官能評価

選抜株を用いた芋焼酎の香気成分は、醪中のアミノ酸増加により高級アルコール類やアルデヒド類が増減する可能性が期待されたが、対照と比べて顕著な差は認められなかった。しかし、最も特徴的に増加した成分として 1-オクテン-3-オールが見出され、選抜株で最も濃度が高かった KBN4038 では対照の 16 $\mu\text{g/L}$ に対して 32 倍の濃度となった。1-オクテン-3-オールは麴菌由来の香気成分であると考えられ、本研究で選抜を行った黒麴菌のひとつの特長であると示唆される。

官能評価では、香りは対照と比較して KBN4038 および KBN4041 は甘香や麴香が強く、KBN4080 では果実香などが強い。味では概ね対照と類似していたものの、KBN4038 および 4041 では甘さと濃厚さがありまるやかとの評価、KBN4080 は甘くまるやかとの評価であった。

【まとめ】

本研究の結果から、芋焼酎製造で使用する麴菌株を変えることで、酒質を大きく変えることが出来ることがわかった。また、有用焼酎麴菌選択の指標としてプロテアーゼ活性(酵素活性)に着目することが有効であることが示唆された。

芋焼酎の酒質は、これまで原料サツマイモや酵母、製造工程でのアプローチが主であったが、麴菌の菌株選抜も香味へ影響を与え、酒質の多様化への貢献が期待できる。

UV-LED を用いた清酒酵母の育種

徳島県立工業技術センター 岡久 修己

1. 開発等の概況

清酒酵母の育種には水銀ランプを用いた紫外線照射やエチルメタンスルフォネート等の薬剤処理により、突然変異を誘発し、変異株を取得する方法が一般的に行われている。近年、UV-LED の高出力化によって、LED を用いた紫外線照射が微生物の育種に利用できる可能性が考えられ、当センターでは、平成 25 年度より LED を用いた紫外線照射による清酒酵母の育種試験に取り組み、カプロン酸エチルを高生産し、発酵力が親株と同程度の清酒酵母を複数株取得し、このうちの 3 株について、平成 27 年度より「LED 夢酵母」として徳島県内の酒造企業に頒布している。

2. UV-LED を用いた清酒酵母の育種^{1) 2)}

UV-LEDを光源とする紫外線の照射距離を自在に調整可能な微生物育種用UV-LED照射装置を試作した。UV-LED光源として、主波長280nmのLED (2mW) を2つ用いた。親株として清酒酵母きょうかい901号を使用し、生菌数が約50%となる照射距離50mm、照射時間4分の条件で、酵母懸濁液に対し、LEDを用いて紫外線を照射した。照射後の菌液をセルレニン含有YPD寒天培地に塗布し、生育したコロニーをセルレニン耐性株として分離した。分離したセルレニン耐性株について、麴汁培地による発酵試験を行い、カプロン酸エチルを高生産し、炭酸ガス減少量が親株と同程度の株を複数株選抜した。選抜株を用いて総米200gの清酒小仕込み試験を用い、香りと味に特徴がある3643株と3826株を選抜した。

3643株：カプロン酸エチル高生産、酢酸イソアミル低生産、酸度が低く、すっきりした味わい。発酵力は強く、もろみ後半のキレが良い。

3826株：カプロン酸エチル高生産、酢酸イソアミル低生産、リンゴ酸が高く、酸味に特徴がある。

3. 波長による育種効率³⁾

UV-LED 光源として、主波長 260nm(18.7mW)、270nm(7.3mW)、280nm(4.5mW)、330nm(4.3mW)の UV-LED を1つずつ使用し、波長による優良酵母取得効率への影響を検討するとともに、さらなる優良酵母の取得を図った。LED による紫外線照射によって酵母生菌数が約 50%となる時間は、照射距離 50mm で、260nm は 1.5 分、270nm は 2 分、280nm は 4.5 分であった。330nm は 120 分の連続照射でも生菌数の減少が見られなかったため、照射時間 60 分で育種試験を行った。

LED による紫外線照射によって得られたセルレニン耐性株の数は、260nm は 294 株、

270nm は 454 株、280nm は 372 株、330nm は 182 株であった。麴汁培地による発酵試験の結果、カプロン酸エチルを親株の 3 倍以上生産する株の取得数は、260nm は 8 株、270nm は 11 株、280nm は 9 株、330nm は 6 株であった。このうち炭酸ガス減少量が親株と同等以上の株を 14 株選抜し、総米 200 g の清酒小仕込み試験を行った。小仕込み試験の結果、カプロン酸エチルを親株の 3 倍以上生産し、もろみ日数、アルコール、日本酒度が親株と同程度の株が、280nm は 2 株、270nm は 3 株、330nm は 3 株取得できたが、260nm では該当する株は取得できなかった。LED の波長により変異酵母の取得数や、香气成分高生成能と発酵力を兼ね備えた優良酵母の取得効率に差がある可能性が示唆されたが、優良酵母の取得数が少ないことや、使用した LED の出力が異なるため、今後は同出力で試験を行い、波長による影響を確認する必要がある。取得した優良酵母の中から、270nm で育種した 4206 株を実用化した。

4206 株：3643 株と同様に、カプロン酸エチルを高生産し、酢酸イソアミルは低め、酸は低くすっきりした味わい。3643 株と比較してやや発酵力が強く、もろみ後半のキレが良い。

3643 株、3826 株、4206 株の 3 株は、平成 27 年度から「LED 夢酵母」として徳島県内の酒造企業に頒布され、平成 29 年度は 8 社が使用し、37 銘柄が販売された。



LED 夢酵母ロゴマーク

4. 参考文献

- 1) 岡久修己, 宮崎絵梨, 日開野輔, 中村怜. 徳島県立工業技術センター研究報告, 2015, 24, p. 23-25.
- 2) 岡久修己, 山本澄人, 宮崎絵梨, 日開野輔, 中村怜. 特許第 6339005 号
- 3) 岡久修己, 池田絵梨, 中村怜. 徳島県立工業技術センター研究報告, 2017, 25, p. 41-44.

α-エチルグルコシド発酵物のコラーゲンスコアへの効果

金沢工業大学 バイオ・化学部 応用バイオ学科 教授 尾関健二

【はじめに】日本酒の第三成分であるα-エチルグルコシド(α-EG)はマウスの飲用実験で、紫外線による角質層の荒れ肌改善効果が細胞レベルであることを報告した¹⁾。またα-EGはヒトの尿中で発見され、ラットの動物実験で小腸のグルコーストランスポーターを介して、α-EGとして吸収²⁾され血管から全身の毛細血管に行き渡る。前記の効果は表皮細胞までα-EGが浸透していることが推測でき、真皮層の線維芽細胞に影響を及ぼしているのではないかと予測した。そこでヒト成人線維芽細胞実験でα-EGが0.48μM(0.00001%)と超低濃度で、細胞増殖の賦活化およびコラーゲン生産の活性化共に効果があり、関連遺伝子発現にも効果があることを報告した³⁾。ヒトでコラーゲン量を画像化と数値化できる装置を導入して、α-EG発酵物として学生及び年配層パネラーでの外用(塗布)および内用(飲用)でコラーゲンスコアにどの程度効果があるかを検証した。

【方法】コラーゲンスコアの装置(DemaLab)を用い、各試験前後で各週での真皮層の超音波画像診断でのスコアと画像を解析した。

【結果と考察】図1に1.7%α-EG純米酒を180mL、8日間飲用(食事制限なし)、学生(22歳;男子6名+女子3名)のコラーゲンスコアの週間変化を示した。1週目からの速効性と4週までの継続性があることをヒト試験で初めて検証した。図2はある学生の同じ箇所画像データの各週変化であり、飲用前に比べ1週目で明らかに白や黄色の部分が増え、学生において真皮層のコラーゲン密度の上昇が非常に大きくなるのが分かった。

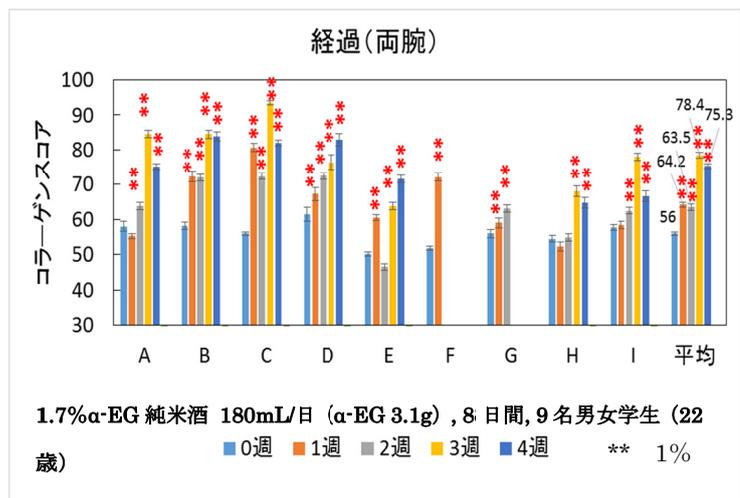


図1 学生純米酒飲用試験のコラーゲンスコア

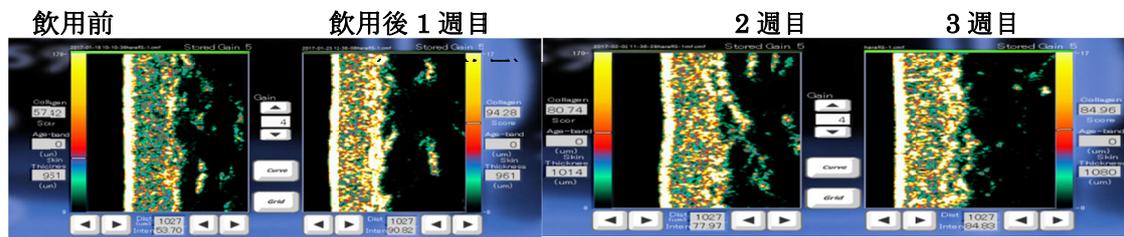
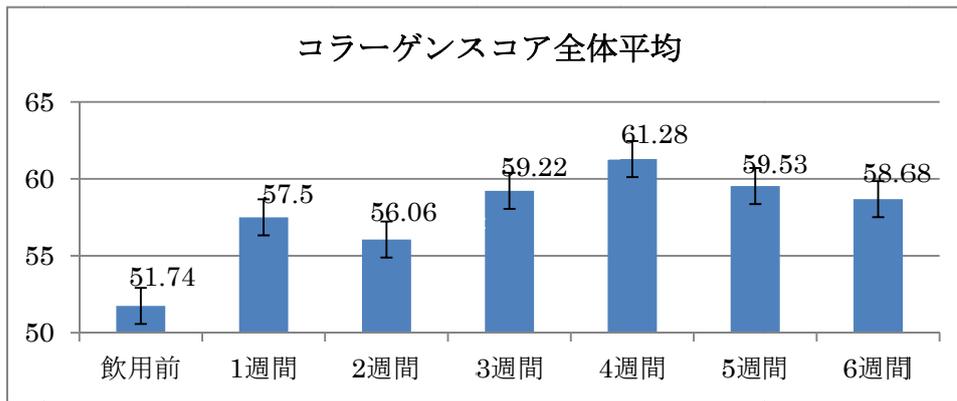


図2 コラーゲンスコアの画像(左の白線は表皮、その内側は全て真皮層)

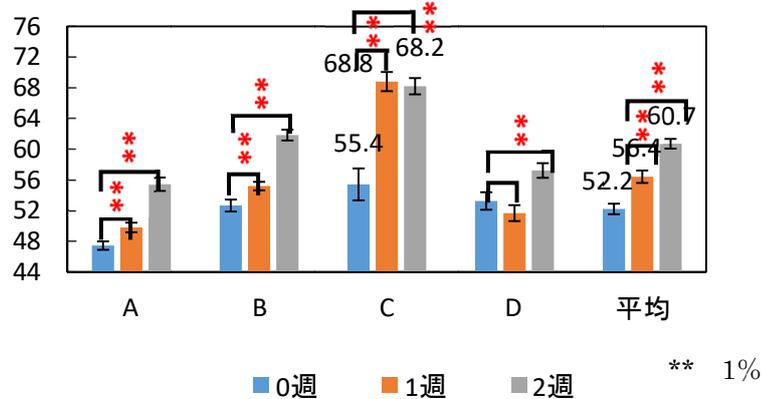
図3は1.1%α-EG純米酒を55mL、6日間飲用(食事制限なし)、20-40代の女性5名のコラーゲンスコアの週間変化を示した。1週目で1%の危険率で有意に上昇し、6週間継続することが分かった。従って、学生(22歳)ではα-EGで3.1g/日、普段日本酒をあまり飲用していない年配層(20-40代)では、0.55g/日で1週目で速効性的コラーゲン生産が増強され、飲用を止めた後でもさらに4-5週間に渡ってコラーゲンスコアが高い状態を維持できることをヒトで実証した。



1.1% α -EG 純米酒 50mL/日 (α -EG ; 0.55g) 6日間 : 女性 5名, 20~40代 1-6週 1%有意差

図3 年配層純米酒飲用試験のコラーゲンスコア

図4は純米酒酒粕(0.6% α -EG)を100g/日(50g甘酒などで朝晩2回、食事制限なし)飲用試験で、パネラーは40-50代女性で7日間飲用後、1週目と2週目のコラーゲンスコアの結果を示した。4名の平均で1週目から速効性のコラーゲン密度が上昇する結果が得られた。1名1週目では差がなかったが2週目で有意に上昇した。4名共に3週目以降も継続すると推測できる。



0.6% α -EG 酒粕 100g/日 (α -EG ; 0.6g) 7日間 : 女性 4名, 40-50代

図4 酒粕甘酒飲用試験のコラーゲンスコア

図5は酒粕甘酒飲用試験でコルネオメーターにより角質水分量を測定した結果を示した。その結果1週目で有意差が認められ、2週目では水分量の上昇が大きくなるのが分かり、 α -EGが真皮層から表皮細胞に浸透することが分かった。

従って日本酒を多く飲用する杜氏、蔵人、力士など「肌にハリとツヤがある」と伝承的に言われていたことを、今回の実験で α -EGの効果であることを学術的に証明できたと考えている。

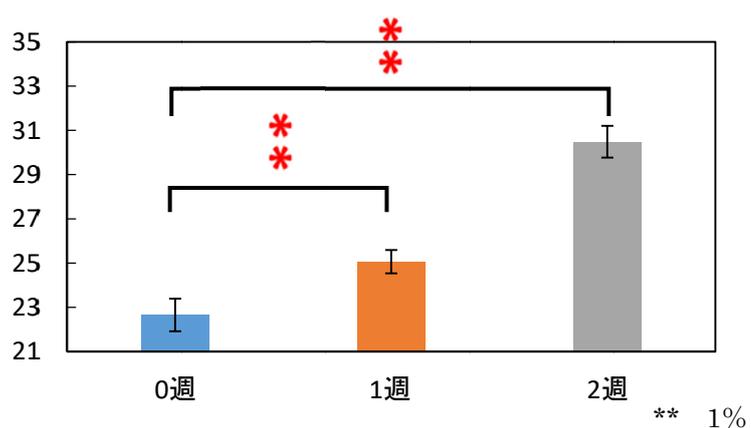


図5 酒粕甘酒飲用試験の角質水分量 (%)

- 1) M. Hirotsune *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 948-952 (2005)
- 2) 三嶋智之, 尾関健二, *FFI Journal*, 219, 275-280 (2014)
- 3) T. Bogaki *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 81, 1706-1711 (2017)

協会系酵母とは系統が異なる清酒酵母 Km67 株の醸造特性

菊正宗酒造株式会社 高尾佳史

【背景】

現在の清酒醸造では、その大半で日本醸造協会より頒布されている協会 7 号酵母を代表とする協会系酵母に由来する株を用いていると考えられる。協会系酵母は優れた醸造特性を有しており、これらが広く使用されるようになったことで、吟醸酒などの新たなカテゴリーが生まれるなど、それまでに比べて清酒の品質が向上したと考えられる。一方で、協会系酵母が頒布される以前はそれぞれの清酒醸造蔵に住みついた、いわゆる蔵付酵母を利用した清酒醸造が行われていた。そのため、使用される清酒酵母は多様性に富み、出来上がった清酒の味わいの幅も現在に比べて大きかったものと考えられる。

菊正宗酒造株式会社では同社の嘉宝蔵で 1966 年から 1973 年の間に分離された清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC32694 株を育種した清酒酵母 *S. cerevisiae* Km67 株を現在でも多くの製品の清酒醸造に使用している。これまでに協会系酵母以外の蔵付酵母由来の株の醸造特性について報告した例は少ないことから、Km67 株の醸造特性や醸造された清酒の特性についても協会系酵母との比較を行った。今回はこの結果を報告する。

【遺伝子の違いとストレス耐性】

協会系酵母には特徴的な DNA 配列または構造を有する 3 つの遺伝子 (*RIM15*, *MSN4*, *PPT1*) が存在することが報告されており、協会系酵母の判別マーカーとして利用可能であるとされている。Km67 株について、これらの遺伝子の DNA 配列を調べたところ、協会系酵母で見られるような変異 (*rim15*^{5055insA}, *msn4*^{C1540T}, *ppt1::Ty2*) は見られなかった。さらに、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を行い、塩基配列の不一致率を基にした系統解析を行ったところ、Km67 株は協会系酵母とは別の系統群に分類されることが明らかとなった。

これらの 3 つの遺伝子はストレス耐性と関連した遺伝子であることが分かっているため、ストレスに対する耐性試験を行った。その結果、Km67 株は熱ストレス (54 °C) やエタノールストレス (22%) を与えた際に、協会系酵母に比べて死滅率が低くなっていた。この結果から、協会系酵母で特徴的な 3 つの遺伝子の変異がないために、Km67 株はストレス耐性が高くなっていることが示唆された。

さらに、醗末期の高エタノール濃度条件下での酵母の死滅率について調べるために、留 15、20、25 日での醗中の酵母のメチレンブルー染色率を調べたところ、Km67 株では K701 株に比べてメチレンブルー染色率が最大で 40%程度低下しており、Km67 株では醗末期における死滅率が低いことが示唆された。また、老ねやすさの指標とされる DMTS 生成ポテンシャルも Km67 株の清酒では大きく低下していることが確認された。

次に、酵母で主要な Stress response element (STRE)、Heat shock element (HSE) を介

したストレス応答について、これらの酵母間で差があるのか調べた。*lacZ* レポーター遺伝子を用いて醗中（留 7 日目）での STRE、HSE 依存的遺伝子発現の違いを・ガラクトシダーゼアッセイによって調べた結果、STRE、HSE とともに K701 株に比べて Km67 株と実験室株である X2180 株では活性が高くなっており、Km67 株では K701 と異なり、STRE、HSE を介したストレス応答が起きていることが示唆された。

【小仕込み試験と生成酒の成分】

酵母間での発酵経過などの差を見るため、Km67 株と協会系酵母を用いて総米 1 kg、仕込み温度 15 °C で小仕込み試験を行った。その結果、Km67 株と協会系酵母の間で発酵経過は大きな差は見られず、一般分析値にもほとんどの項目において差が見られなかったが、Km67 株の生成酒では酸度が高く、アミノ酸度が低い傾向が見られた。発酵経過やアルコール度数に差が見られなかったことから、Km67 株は協会系酵母と比べてそんな発酵能を有しているものと考えられた。

これらの生成酒の味についても調べるために、官能評価を行ったところ、Km67 株は協会系酵母に比べて酸味が強く、濃淡が濃い傾向が見られた。さらに詳しく調べるために、味認識装置での分析を行ったところ、酸味センサーの値と清酒では味の濃さを示す塩味センサーの値が強くなっており、官能評価結果と一致しているものと考えられた。

生成酒中の親水性低分子化合物を対象として、GC/MS を用いて網羅的解析を行った。GC/MS 分析データを用いて主成分分析を行ったところ、Km67 株生成酒は協会系酵母株生成酒とは大きく離れて位置しており、Km67 株生成酒には Citramalic acid や Turanose などの成分と高い相関が見られた。さらに、PLS 判別分析においてもこれらの成分が Km67 株生成酒判別に寄与していることが示され、これらの成分が Km67 株生成酒において特徴的な成分であると考えられた。

Km67 株生成酒に特徴的な成分の味への影響を調べるために K701 株生成酒へ成分を添加し、味認識装置による分析を行った。その結果、Citramalic acid 添加により濃度依存的に塩味センサーの値が高くなっており、Citramalic acid は清酒の味を濃く感じさせる効果があるものと考えられた。この結果は Km67 株生成酒の特徴とも一致しており、Citramalic acid が Km67 株生成酒の味を特徴づけている可能性が示唆された。

これらの結果から、Km67 株は遺伝的な背景だけではなく、生成酒の味についても協会系酵母とは異なる特質をもっていることが分かった。近年の清酒業界では自社の蔵や花など、様々な場所から分離された酵母を用いた醸造も広がりを見せており、今後も協会系酵母以外の酵母による清酒醸造が広がり、これまでも増して様々なタイプの日本酒が出てくることが期待される。

麴菌の酵素生産はどのように制御されているか

東北大学大学院農学研究科 五味勝也

麴菌は日本酒や醤油、味噌などのわが国の発酵食品製造に1,000年以上の昔から利用されてきており、わが国を代表する産業微生物と言っても過言ではない。醸造上の麴菌の大きな役割は、原料に含まれているデンプンやタンパク質を分解する酵素を供給することであり、特に日本酒製造では麴菌の生産するデンプン分解酵素が最も重要である。デンプン分解酵素の生産はデンプンやその分解産物であるマルトオリゴ糖によって誘導され、最終分解産物であるグルコースによって抑制されることが古くから知られていたが、その生産制御の分子機構については、演者らが麴菌の遺伝子組換え系を開発し、遺伝子のクローニングやプロモーターの解析などを行うまでは不明であった。本講演では、主として麴菌のデンプン分解酵素の遺伝子発現制御機構について、演者らが明らかにしてきた遺伝子発現制御に関わる複数の転写因子 (AmyR, MalR, FlbC, CreA) の機能や役割に焦点をあてて紹介することとしたい。なお、講演の一部は10年前に本研究会で発表した内容と重複することをあらかじめご了承ください。

1. デンプン分解酵素遺伝子の発現に必須の二つの転写因子 AmyR と MalR

はじめにデンプン分解酵素 (α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ) の遺伝子プロモーター解析から発現制御に必要なシスエレメントを明らかにするとともに、そのシスエレメントに結合し、デンプン存在下における誘導高発現に必要な転写因子 AmyR を見出した。一方、*amyR* 破壊株はマルトース培地で野生株と同様の生育を示すことから、デンプン分解産物のマルトースを資化するためのシステムが別に存在していると考え、この予想のもとに、Expressed sequence tag (EST) 解析及びゲノム解析データを検索した結果、麴菌染色体中に酵母のマルトース資化に関与する *MAL* クラスタに類似した遺伝子クラスターを見出した。このクラスターに含まれる遺伝子 (*malR*, *malP*, *malT*) の機能解析から、*malP* はマルトース輸送体、*malT* は菌体内 α -グルコシダーゼ、また *malR* はこれらの遺伝子の発現を正に制御する転写因子をコードしており、麴菌のマルトース資化に関与していることが明らかとなった。興味深いことに、この遺伝子クラスターは単に麴菌のマルトース資化に関わっているだけでなく、デンプン分解酵素の誘導生産の初期ステップにも重要な役割をしていることが分かった。すなわち、*MalP* と *MalT* 及びその発現を制御する転写因子 *MalR* の欠損株では、マルトース培地だけでなく、デンプン培地での生育が *amyR* 破壊株と同様に悪くなっており、マルトースを含む液体培地で α -アミラーゼの誘導生産を行わせたところ、誘導初期におけるアミラーゼ生産に遅れが認められた。*malR* 及び *malP* 破壊株では細胞内へのマルトース取り込みに比例して α -アミラーゼ生産が回復してきたことから、*MalP* によるマルトースの細胞内への取り込みが α -アミラーゼ遺伝子の発現誘導に必須の過程であるこ

とを示唆している。また、*malT*破壊株ではマルトースが細胞内に取り込まれるにもかかわらず生育がほとんどできない上に α -アミラーゼ生産も誘導されなかったことから、MaIP によって取り込まれたマルトースは MaIT によってグルコースに分解され資化・利用されるだけでなく、MaIT がマルトースから AmyR の転写活性化の直接の基質と考えられるイソマルトースへの変換の働きを担っていることを示している。このような解析から、麴菌では基底レベルでわずかに発現している MaIP が細胞外のマルトースを取り込み、これによって MaIR の転写活性化が起こり、その結果 MaIP と MaIT が誘導生産されることにより、さらにマルトースの取り込みが活発になるとともに、マルトースからイソマルトースへの変換も促進され、AmyR の転写活性化につながって最終的なデンプン分解酵素遺伝子の発現が誘導される、という転写因子の活性化カスケードモデルが考えられる。

2. 固体培養（麴培養）で生産される醸造有用酵素の遺伝子発現に必須の転写因子 F1bC

デンプン分解酵素のうち、日本酒製造で最も重要なグルコアミラーゼ B (GlaB) は液体培養ではほとんど生産されず、固体培養で大量に生産される。同様に醤油製造に必要なタンパク質分解酵素も固体培養で高生産されることが知られていた。*amyR*破壊株では固体培養でも GlaB は生産されないことから、AmyR が必要であることが分かるが、固体培養における生産には AmyR 以外の転写因子の関与が考えられる。そこで、演者らは麴菌の転写因子破壊株ライブラリーから GlaB 生産能を失った破壊株をスクリーニングすることにより、分生子形成に関与すると報告のあった転写因子 F1bC が *glaB* の発現にも関わっていることを明らかにした。*f1bC*破壊株では液体培養でも生産される α -アミラーゼ遺伝子発現にはほとんど影響がない一方で、酸性プロテアーゼ (*pepA*) や中性プロテアーゼ (*nptB*) 遺伝子の発現が失われることが認められ、日本酒や醤油、味噌醸造に必要な酵素の麴培養における生産に F1bC というもう一つの転写因子が重要な役割を果たしていることが示された。

3. カーボンカタボライト抑制転写因子 CreA の破壊による酵素高生産

麴菌のアミラーゼをはじめとする糸状菌が菌体外に生産する多糖類分解酵素は、カーボンカタボライト抑制 (CCR) 機構によってグルコース存在下で生産が抑制されるため、生産量が制限されることが知られている。そこで、麴菌において CCR に関わる遺伝子破壊株を作製したところ、*creA* だけでなく CreA の脱ユビキチン化に関与すると考えられている脱ユビキチン化酵素遺伝子 (*creB*) も同時に破壊した二重破壊株で α -アミラーゼ生産が顕著に上昇することを見出した。*creA* と *creB* の二重破壊株ではキシラナーゼや β -グルコシダーゼなどのバイオマス分解酵素の生産量も向上していた。また、興味深いことに、野生株では液体培養でペレット状の菌糸形態をとるのに対して、*creA*破壊株ではパルプ状を呈することから、菌体量が増加したことが考えられた。*creA*破壊によりパルプ状の菌糸形態での増殖が可能となり高密度培養につながるため、*creA*破壊株はタンパク質のみならず低分子化合物などの有用物質高生産用宿主として有用であると考えられる。