

平成 24 年度
清酒酵母・麴研究会
講演要旨集

日時 平成 24 年 9 月 25 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 「焼酎酵母のゲノム解析」
三和酒類(株)三和研究所 梶原 康博
- 13:50～14:20 「清酒酵母の孢子非形成性メカニズム」
秋田県立大学生物資源科学部 中沢 伸重
- 14:20～14:50 「京都市の清酒酵母開発に関する取組」
京都市産業技術研究所 廣岡 青央
- 14:50～15:10 休憩
- 15:10～15:40 「23BYの種麴と麴」
(株)菱六 助野 彰彦
- 15:40～16:45 特別講演 「麴菌プロテアーゼ遺伝子とその産物」
東京農工大学農学研究院 竹内 道雄
- 17:00～ 懇親会 (於 北とぴあ 14階カナリアホール)

焼酎酵母のゲノム解析

三和酒類株式会社 梶原 康博

〈はじめに〉

日本の伝統的な蒸留酒である焼酎は、様々な穀類等を主原料として造られており、原料由来の香味の多様性を楽しむことが出来る。

清酒醸造とは、麹菌を用いて原料の糖化を行い、平行複発酵を行うという点では共通しているが、実際の焼酎製造は、雑菌汚染を防ぐためのクエン酸性条件下での発酵、清酒と比べて高温条件化での発酵、最終的には蒸留工程が含まれるという点で大きく異なっている。また、差しもとによる酵母の再利用という点でも両者の製造法には違いが見られる。

1996年に出芽酵母 S288C のゲノムの全塩基配列が明らかになって以来、様々な酵母のゲノム解析が行われてきた。清酒酵母についても、きょうかい清酒酵母 7号についてのゲノム解析プロジェクトが立ち上げられ、現在ではその情報が公開され、広く活用できるようになっているが、焼酎酵母についてはそれらの情報はほとんど公開されていない状況にある。

そこで今回我々は、焼酎酵母のアイデンティティに關与するゲノムの情報を明らかにすべく、今回、我々は代表的な焼酎酵母の一つである SH-4 株 (RIB1019) と鹿児島酵母に由来する弊社所有の焼酎酵母 BAW-6 株についてゲノム解析を進めており、これまでに得られた知見について紹介する。

〈結果〉

Roche 社 454GS FLX を用いてゲノム配列の決定を試みたところ、SH-4 株からは 713,135 本 (総塩基数 176,633,192、平均長 247.7bp)、BAW-6 株からは 725,054 本 (総塩基数 183,488,966、平均長 253.1bp) のリードが得られた。得られた配列を Newbler によりアセンブルした結果、それぞれ 1,270 本 (1kb 以上は 870 本) と 1,131 本 (1kb 以上は 693 本) のコンティグが得られた。長さの総和はそれぞれ 11,400,704bp、11,480,335bp で、GC 含量はともに 38.1% と出芽酵母 S288C 株と同じであった。SH-4 株についてはペアエンド法によりさらにデータの蓄積を行ったところ、最終的に 1,139,919 本 (総塩基数 265,923,137) のリードが得られ、ラージコンティグ (>500b) 364 本、スキュフォールド (>2kb) 69 本となった。S288C 株の各染色体をクエリーとし、BLASTN により相同性を算出した結果、両酵母はともに 1 番染色体とミトコンドリアに対して 80% 台の相同性であり、それ以外の染色体では 95% 以上の相同性であった。

次に S288C 株の 5,880 個の ORF を学習セットとし、Glimmer2 により ORF の抽出を行った結果、それぞれ 9,074 個、8,145 個の ORF を抽出することができた。アミノ酸データベース nr に対してホモロジー検索を行った結果、E-Value $\leq 10^{-4}$ でヒットした ORF 全体の約 30% の ORF が 41°C の高温で生育で

きる酵母 YJM789 株に対してトップヒットであった。

また、S288C と相同性の低いコンティグ配列の中から、焼酎酵母に特異的な ORF の抽出を試みたところ、SH-4 株と BAW-6 株に共通に存在し、S288C で相同性の低い ORF として、ビオチン合成系酵素やエポキシド加水分解酵素、アセチルトランスフェラーゼ GNAT 等を見出した。しかしながら、これらの遺伝子は清酒酵母 K7 においてもその存在が確認されていることから、焼酎酵母特異的な遺伝子ではなかった。また、SH-4 株、BAW-6 株にはそれぞれ特徴的な遺伝子の存在が示唆された。

近年、清酒酵母のゲノム解析の成果を用いて、清酒酵母の高泡形成や清酒もろみ中でのエタノール高生産といった様々な表現型を特徴付ける遺伝子についての解析が進行しているが、それらに関与している遺伝子群について焼酎酵母のゲノム情報との比較した結果についても一部紹介したい。

清酒酵母の胞子非形成性メカニズム

秋田県立大学 生物資源科学部
応用生物科学科 醸造微生物学研究室
中沢 伸重

1) はじめに

清酒、ビールやワイン醸造などに用いられている出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 株、いわゆる醸造酵母は、胞子形成能が弱いため接合能を有する胞子クローンを取得することは難しく、このことは性的交雑による育種の障害となっている。私達は胞子形成開始の鍵となる遺伝子 *IME1* に着目して、醸造酵母の代表格である清酒酵母協会 7 号 (以下 **K7**) の胞子非形成性メカニズムの解析を進めてきた。本講演では、胞子非形成性メカニズムの解析と、解析によって得られた知見を基に考案した免疫抑制剤ラパマイシン処理による胞子形成能の回復について紹介する。

2) *IME1* 遺伝子導入による胞子形成能の回復

ノーザン解析により、胞子形成条件下における **K7** の *IME1* 遺伝子の転写は誘導されていないことから、**K7** で *IME1* 遺伝子を高発現させれば胞子形成能が回復すると考えた。しかし、**K7** で *IME1* 遺伝子を高発現させてもほとんど胞子を形成しなかった。

3) **K7** の *IME1* 遺伝子は正常

胞子形成条件下で **K7** の *IME1* 遺伝子が誘導されない原因としては次の二つが考えられる。第一は **K7** の *IME1* 遺伝子に異常がある場合、第二に *IME1* 遺伝子に伝達されるシグナル伝達経路に異常がある場合である。そこで **K7** からクローン化した *IME1* 遺伝子を、*IME1* 遺伝子を破壊した二倍体 **a/α** 型実験室株に導入し、得られた形質転換体の胞子形成を調べたところ、胞子が観察された。この結果は **K7** の *IME1* 遺伝子は正常であることを示しており、私達は栄養源のシグナル伝達経路に異常があると推察した。

4) 胞子形成条件下においても **Cln3** タンパク質が存在する

Cdc28-Cln3 タンパク質リン酸化酵素は *IME1* 遺伝子の転写を抑制するとともに、**Ime1** タンパク質の核への局在を妨げている。すなわち、栄養源が豊富なうちは、**Cdc28-Cln3** タンパク質リン酸化酵素は減数分裂の開始を抑え、細胞周期を進行させることで細胞を増殖させている。**K7** において、栄養源シグナルの伝達系に異常があるならば、胞子形成条件下であっても **Cln3** タンパク質が存在し、

Cdc28-Cln3 タンパク質リン酸化酵素が作用して、*IME1* 遺伝子の転写を抑制していると考えた。

実験室株においては、胞子形成条件下では Cln3 タンパク質が消失することが知られている。K7 において胞子形成条件下で Cln3 タンパク質が存在するかどうかを調べたところ、驚いたことに胞子形成条件下に移して 4 時間後でも Cln3 タンパク質の存在が確認された。この事実は K7 においては胞子形成条件下でも Cdc28-Cln3 タンパク質リン酸化酵素が作用して、*IME1* 遺伝子の転写を抑制していることを想像させる。

5) *CLN3* 遺伝子の破壊は K7 の胞子形成能を回復させる

K7 において胞子形成条件下で Cln3 タンパク質が存在するのであれば、*CLN3* 遺伝子を破壊することで *IME1* 遺伝子の転写抑制が解除されてその転写が上昇し、胞子形成能が回復すると予想した。

K7 の *CLN3* 遺伝子破壊株を造成して *IME1* 遺伝子の転写と胞子形成を調べた。その結果、*CLN3* 遺伝子破壊株では、栄養条件下に比べて *IME1* 遺伝子の転写量は 1.6 倍に上昇した。さらに、K7 の胞子形成率は 0.8% であるのに対して、*CLN3* 遺伝子破壊株では 2.1% の頻度で 4 胞子を含む子嚢の形成が観察された。これらの結果から、K7 の胞子非形成性は、胞子形成条件下においても Cln3 タンパク質が蓄積し、*IME1* 遺伝子の転写誘導が抑制されることによると結論した。

6) 免疫抑制剤ラパマイシンによる胞子形成能の回復

S. cerevisiae において、TOR (Target of rapamycin) 経路は環境の窒素源および炭素源の変化に対する細胞内応答に関与している。TOR 複合体には二種類あり、そのうちの一つである TOR complex 1 (TORC1) は免疫抑制剤ラパマイシンの標的タンパク質である。ラパマイシン処理や *TOR* 遺伝子を欠損させると、*CLN3* 遺伝子や他の G1 サイクリンの翻訳が減少することが報告されている。これらの知見から、私達は胞子形成条件下で K7 をラパマイシン処理すれば、TORC1 が不活化され Cln3 タンパク質が消失し、*IME1* 遺伝子の転写が上昇することによって胞子形成能が回復すると考えた。

胞子形成条件下で K7 を最終濃度 100 ng/ml でラパマイシン処理し、*IME1* 遺伝子の転写と胞子形成を調べた。ラパマイシン処理によって *IME1* 遺伝子の転写が見られ、胞子形成が観察された。興味深いことに、得られた胞子嚢はすべて 2 胞子を含んでいた。マイクロマニピレーターで得られた子嚢から胞子クローンの分離を試みたところ、35.5% の発芽率で 22 の胞子クローンを取得した。このように、K7 を胞子形成条件下でラパマイシン処理することで胞子形成能を回復させ、胞子クローンが取得できることが分かった。

京都市の清酒酵母開発に関する取組

京都市産業技術研究所 廣岡 青央

1. はじめに

京都市産業技術研究所では過去に産技研1号及び2号酵母を単離し、1960年代から分譲を行っている。また、泡なし酵母の解析により得られた情報から、それらの酵母の泡なし株を取得、現在2号泡なし株を分譲している。近年では市内酒造業者からの要望により、カプロン酸エチルや酢酸イソアミル等の吟醸香を高生産する特定名称酒製造用酵母の開発を行ってきた。2003年には遺伝子解析技術やタンパク質解析技術を駆使し、カプロン酸エチル生成量の増加した新規酵母「京の琴」を開発した。京の琴は2004年から分譲を開始し、現在主に吟醸酒製造に利用され、製造された清酒は香味のバランスのとれた製品として販売されている。また、2007年には酢酸イソアミル高生産酵母として「京の華」を開発し、この酵母も研究所から分譲を行っている。京の華は香とともに酸生成についても特徴的であり、従来とは異なる香味の清酒製造が可能のため、純米酒を中心とした個性的な商品開発に利用されている。

本日は主に京都市で行った酵母のタンパク質発現解析について、さらにはそれらの結果を受けた「京の琴」や「京の華」等の清酒酵母の開発について報告する。

2. 清酒酵母のタンパク質発現解析

新規な清酒酵母の開発を行う上で、既に実用化された優良な形質を有する酵母の特性を把握することが重要であると考えた。実用化されている様々な清酒酵母間の特性の差は、遺伝子上での微少な違いによって発現タンパク質量が変化することに起因し、そのタンパク質発現様式の差がそれぞれの酒造用酵母を特徴づけていると考えられる。このことから、酵母の発現タンパク質を網羅的に解析することにより、酒造用酵母の特徴を解析することが可能であると考えた。

タンパク質発現解析には、二次元電気泳動法を用いることで発現タンパク質の分離を行い、更に分離したタンパク質のアミノ酸配列分析を行うことでその配列情報を得、スポットタンパク質の同定を行った。

タンパク質発現解析の結果の一例として、ロイシンアナログである5',5',5'-トリフルオロロイシン耐性を指標に取得された酢酸イソアミル高生産酵母を解析した結果、それらの薬剤に感受性である酵母と比較して発現量が増加しているスポットが検出された。内部アミノ酸配列解析の結果、そのスポットタンパク質はLeu2pであると推測された。Leu2pはイソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼであり、ロイシン合成系の酵素である。このタンパク質発現量の増加は、ロイシンアナログ耐性に起因していると考えられ、さらにはこの酵母のイソアミルアルコール生成量の増加に寄与していると考えられた。この例のようにタンパク質発現と代謝物は密接に関連しており、清酒酵母の代謝解析に二次元電気泳動が大変有効な手段であることを示している。

3. 新規酵母の開発

京都市内中小企業を中心にカプロン酸エチル生成能の向上した京都独自の吟醸用酵母の開発が求められていたことから、タンパク質発現解析技術を用い、既に開発されていた吟醸用酵母の解析をすすめた。その結果、カプロン酸エチル高生産株では HSP26 等のタンパク質が高発現していた。それらの情報等から、新規酵母「京の琴」の開発を行った。開発した京の琴の特性は、弊所で過去に開発した酵母と比較してカプロン酸エチルを高生産するとともに、酢酸イソアミルの生成量も高い酵母であった。酸生成については、現在使用されている主な吟醸酵母と比較するとその組成に特徴的な特性を有する酵母であった。それらの特徴から京の琴を使用し製造された清酒は現在使用されている主な吟醸酵母と比較して、香味に関して特徴的な酒質となる傾向にあり、鑑評会への出品酒というよりは、飲用適性のある吟醸酒製造に向いていると考えている。

上記の京の琴は現在吟醸香の主流となっているカプロン酸エチルの香を基調とした吟醸酒製造には適しているものの、個性的な製品開発にはやや不向きであった。そこで京の琴とは異なる個性的な清酒製造に使用できる酵母の開発を進めた。特性としては酢酸イソアミルを高生産する酵母の取得を目的とし、既に実用化されている酵母のタンパク質発現解析を行ったところ酢酸イソアミルを高生産する吟醸酵母では HSP12 等のタンパク質が高発現していることがわかった。それらの情報等を利用し、スクリーニング法を開発した。取得した酵母は酢酸イソアミル高生産性の酵母であるが、イソアミルアルコールの生成量は親株と同等であり、さらに親株と比較して酸生成量が増加しており組成についても従来酵母とは異なる特徴を有している酵母である。現在「京の華」という名称で分譲し、主に純米酒用として使用されている。

京の華の開発に引き続き取得した酢酸イソアミル高生産酵母の特性把握をすすめた。まず、細胞表層タンパク質に着目し表層の発現タンパク質の解析を行った。その結果、Ahp1p 等の過酸化脂質還元酵素など数種のタンパク質が高発現していた。この情報をもとに、Ahp1p を標的とする膜脂質の過酸化に対する酵母の挙動を調べたところ、取得した酢酸イソアミル高生産酵母では膜脂質の過酸化に対する防御機能が有意に上昇していることが判明した。また、これらの防御機構の亢進が酢酸イソアミル高生産へと導いている可能性が示唆された。

これらの情報から酵母の銅耐性を調べたところ、取得した酢酸イソアミル高生産酵母は銅耐性を有していることが判明した。そこで、銅耐性を指標に酵母を数株取得したところ、酢酸イソアミル高生産酵母を効率よく取得することが可能であった。それらの銅耐性酵母は香気の生成という観点以外では京の華とは異なる醸造特性を有する可能性があることから、小仕込試験による酸生成の特性を調べたところ、有機酸の組成としてリンゴ酸の比率が増加していた。これらの結果から京の華とは異なる特性を有する清酒製造に利用できる可能性が示唆された。

このように、酵母の解析からはじまり、酵母の育種を行い、さらに開発酵母の解析を進めるという手法により様々な酵母を取得できる可能性が示唆され、今後も清酒の品質多様化に対応できる酵母の開発を進めていく予定である。

23BYの種麴（もやし）と麴

株式会社 菱六

助野 彰彦

平成18年10月12日、日本醸造学会において、麴菌は国菌に認定されました。麴菌を培養し、種麴（もやし）を製造販売している弊社にとっては、非常にありがたいことであり、冬にブームとなった「塩麴」を特集したテレビ放送でも「麴菌は国菌」と紹介されているのを聞くと非常に誇らしい気持ちになりました。と同時に日本の食文化の根底を支えている存在として、大きな責任を再自覚しました。本日は「23BYの種麴（もやし）と麴」と題して、23BYに販売面で感じたことを紹介したいと思います。

1、麴の歴史（はじまり）

- ・「播磨風土記」（713年）に、

神様にお供えした御飯（当時は蒸したお米）にカビが生え、それで酒を醸して宴会をした、との記述。

清酒醸造に米麴を使用するようになったのは8世紀初めの頃と考えられている。

2、種麴（もやし）の歴史（はじまり）

- ・「延喜式」（927年）に、麴（よねのもやし）の記載。当時は「友種式」。

「友種式」とは、前回できた麴の一部を次回の麴造りに種麴として利用する方法のこと。

- ・「麴座」の成立と衰退

平安時代の終わり頃から、密造酒の取締りと酒税収入の確保のために、朝廷や幕府が設置。許可を得たものだけが、麴の製造と販売を行うことができた。

京都北野天満宮の北野麴座は有名。酒用だけでなく、味噌・醤油・甘酒製造用の麴まで取り仕切っていた。

1400年代中頃まで続くが、「文安の麴騒動」で崩壊。一部が残り、種麴屋へ。現在に至っている。

3、酒造用種麴について

- ・菌株の安全性

カビ毒アフラトキシンを生産するか否か、が過去問題になった。村上先生らのご尽力により醸造用に使用している麴菌の非生産性が確認された。

一方、遺伝子レベルでの解析も進み、酒類総合研究所等のご尽力により非生産性が確認されている。（醸造協会誌第103巻 第9号 p665～669）

弊社に於いても、使用菌株の遺伝子解析を酒類総合研究所に委託し、安全性を

確認している。

- ・使用菌株について（酵素力価、褐変度）

弊社の場合、10数種類を使用している。使用に際して検討される事項としては、グルコアミラーゼ力価を中心に、褐変度、増殖速度等が挙げられる。

酵素力価については、どの酵素も数値が高ければ良いわけではなく、特に高級酒向けの種麴にはG/A比等酵素力価のバランスの検討も加える。

また、褐変度も非常に重要な選択要因で、酒粕の人気がある現在、板粕として販売できるか否かは大きい。褐変度の検討は、近年非常に重要な項目であると位置づけている。

なお酒造用種麴の製造については、「清酒こうじ菌の問題点（醸造協会誌第64巻 第4号 p277～279）」を参考にしている。基本的に単菌培養を行っている。

4、23BYの種麴の動き

- ・高グルコアミラーゼ麴菌の増加（清酒用）

年々増加傾向にある。グルコアミラーゼ力価が高い麴菌の要望が多い。

全国新酒鑑評会の傾向がそうさせているのか不明であるが、甘味に対する要望は年々増加傾向である。

一方で、グルコアミラーゼ力価が高い麴菌はどうしても黒粕リスクが高くなる。

その説明は必ず行うようにしている。

- ・「塩麴」ブームによる非褐変白系種麴の増加

昨年秋頃から流行し始め、各種メディアが特集を組み、取り上げたことで、年明け以降は爆発的ブームとなった。

味噌メーカーをはじめとして塩麴を製造されるメーカーが増えるとともに、「塩麴に色がつく」という声が増加した。メーカーとしては味（甘味）を出したいがために酵素力価が高い種麴を使用し、その結果として見た目の悪い商品となってしまったようである。塩麴を通して、「見た目」の大事さを痛感させられた。

得意先に聞き取りをしてみると、消費者は見た目の良い「白い」塩麴を好む傾向があり、弊社では非褐変性の白色胞子の種麴を勧めるようにしている。

5、麴の他用途利用について（経済産業省 地域イノベーション創出事業等）

- ・京都市、京都大学、京都府立大学等研究機関と、市内清酒メーカー、市内洋菓子メーカー、市内和菓子メーカーが参加して、平成20年度から継続して商品開発を行っている。目的は、市内清酒メーカーの工場稼働率を平均化することである。酒造期が終わる春から夏の間にはできることがないか検討している。近畿圏の食材を利用したノンアルコール麴飲料や米麴シロップ、米麴パウダーの試作、販売を行っている。
- ・「塩麴」が調味料として市民権を得た。（伝統塩こうじ 競争激化：京都新聞夕刊 7/31）調味料としての塩麴だけでなく、塩麴を使った加工食品が販売されるようになってきた。

麹菌プロテアーゼ遺伝子とその産物

竹内道雄（東京農工大学・農学研究院）

プロテアーゼはペプチド結合に作用し、タンパク質、ペプチドを加水分解する酵素の総称で、タンパク（質）分解酵素（**proteolytic enzyme**）、ペプチダーゼとも呼ばれ、生物に普遍的に存在している酵素である。このプロテアーゼは、その存在が知られる以前から、味噌、醤油、魚醤、チーズなどの食品の製造に広く使われていた酵素で産業的に重要であるばかりでなく、生理的にも重要な機能素子、制御素子であることから、その構造と活性について多くの研究がなされてきた。プロテアーゼは、基質ペプチドに対してエンド型に作用するエンドペプチダーゼ（プロテイナーゼとも呼ばれていた）とエキソ型に作用するエキソペプチダーゼに大きく分けられ、エンドペプチダーゼはその触媒残基から4つに大きく分けられ、最近では、触媒残基がスレオニン残基であるプロテアーゼ、グルタミン酸残基であるプロテアーゼなども見いだされている。触媒残基近傍のアミノ酸配列は高度に保存されている。また、エキソペプチダーゼは、その基質に対する作用様式により分類されている。

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、その存在が知られる以前から、清酒、味噌、醤油、など日本の伝統的な発酵食品の製造に麹として利用され、日本の食文化を支えてきた重要な微生物である。このことから「国菌」と呼ばれている。

麹菌のゲノム解析が2001年8月から日本のグループにより行われ、2005年に終了し、麹菌ゲノムサイズは37.6Mbでこの中には約12,000の遺伝子がコードされていることが明らかにされた。また、*A. nidulans*、*A. fumigatus*、*A. niger*、*A. sojae*などのゲノム解析についても報告され、さらに最近では、次世代シーケンサーを用いて多くの糸状菌ゲノムの解析が進められている。

ここでは、約12,000の麹菌遺伝子中から、塩基配列および塩基配列から推定されるアミノ酸配列の相同性、触媒残基近傍に保存されている活性中心モチーフなどを指標として、プロテアーゼ遺伝子を検索し、プロテアーゼ遺伝子を特定し、それぞれの遺伝子産物について解析を進め、性質を明らかにするとともに遺伝子と遺伝子産物の関係を明らかにする **Proteolytic Enzyme** 解析とその利用を目的に解析を進めてきたので紹介する。

麹菌ゲノム解析結果が公表される直前の2005年4月末に遺伝子と遺伝子産物の関係が明らかになっていた麹菌プロテアーゼは18のみであったが、麹菌ゲノム情報をもとに解析した結果、麹菌ゲノムにはエキソ型ペプチダーゼ69、エン

ド型ペプチダーゼ 57 合計 126 のプロテアーゼ遺伝子がコードされ、全遺伝子の約 1% に相当することが明らかになった。この値は、他の糸状菌のゲノムよりも多くのプロテアーゼ遺伝子をコードしていることを示している。

麴菌プロテアーゼ遺伝子は、8本の染色体に均一に分散して存在し、約半数の遺伝子産物がシグナル配列を有していると推定された。また、酸性で作用すると推定されるプロテアーゼをコードする遺伝子が 36 存在していた。さらに、多数のパラログが存在し、パラログの中には相同性の高いものも存在しており、相同性の高いパラログで推定されるイントロンの位置は保存されていた。麴菌は長い年月をかけて酵素生産の高い菌株が育種されてきた。以上のことなどから、麴菌は遺伝子重複によりパラログが生成され多種のプロテアーゼ遺伝子を獲得したものと推定された。また、パラログ同士の mRNA について解析した結果、窒素源の違いにより発現に変化が認められた。

パラログを麴菌の強力な発現プロモーター支配下で強制発現して調べたところ、発現効率に違いが認められた。さらに、その発現産物を精製して調べたところ、それぞれ異なった基質特異性、酵素化学的性質を示した。126 のうち 31 遺伝子産物については精製タンパク質を取得できたにもかかわらず、このタンパク質は一般的なプロテアーゼの基質には作用しなかったが、73 遺伝子の遺伝子産物での酵素化学的性質を明らかにすることができた。

プロテアーゼは基質ペプチド中の 20 種のアミノ酸残基に対応して多様な基質特異性を示す必要があることから、アミラーゼのように一つの酵素を大量に生産するのではなく遺伝子重複により多種の酵素を生産するように進化してきたのかもしれない。

2007 年の赤尾らの EST 解析の結果では、EST の見いだされない遺伝子が多数存在していた。一方、2010 年の次世代シーケンサーを用いた Wang らの解析では、発現の強弱はあるものの、126 プロテアーゼ遺伝子中 115 遺伝子の mRNA が検出されていた。しかし、Wang らの解析で発現の確認されていないプロテアーゼ遺伝子でも、PCR により半定量的に解析した結果では、発現していることが明らかになった。ほぼ全てのプロテアーゼ遺伝子が mRNA として発現しているものと推定された。次に、mRNA として発現していた麴菌プロテアーゼ遺伝子の cDNA を取得し、その塩基配列を確認したところ、5 つの遺伝子で、イントロンのスプライシングがゲノム解析で予測されたイントロンとは異なることが明らかになった。さらに、オルタナティブスプライシングにより、一つの遺伝子から異なるタンパク質を生産すると推定された遺伝子も存在していた。

本研究の一部は、生研センター基礎研究推進事業の一環として行われたものである。