

種麴製造及び製麴における麴菌 *Aspergillus oryzae* の制御因子 KpeA の機能解析

荒川弦矢*・進藤 齊**・穂坂 賢**・徳岡昌文**†

(令和元年8月29日受付/令和元年12月6日受理)

要約: 麴菌の転写因子 KpeA は平板培養でのコウジ酸生産の制御因子として見出されたが、その後、広く二次代謝と分生子形成の制御に関わることが明らかとなった。種麴製造及び製麴は分生子形成の制御を伴う醸造工程であり、また、米麴中の二次代謝物は醸造物の品質や安全性に影響する。そこで本研究では、実際の醸造における培養工程である種麴製造と製麴において、KpeA の遺伝子破壊株と高発現株の形質を調べることで KpeA の醸造における役割を明らかにすることを目的とした。

製造した種麴の性状と遺伝子解析から、KpeA は、分生子形成の主要因子である BrlA の遺伝子発現制御を介して、分生子形成を促進する役割を果たしていることが示された。製麴においても米麴に着生する分生子に差が生じたことから、KpeA は醸造工程においても分生子形成に重要な転写因子であることが分かった。一方、米麴中のコウジ酸量が破壊株で顕著に増加した。コウジ酸の推定生合成酵素 KojA の遺伝子発現解析から、KpeA は平板培養と同様に、製麴においてもコウジ酸生産を転写レベルで制御することが確認された。さらに破壊株の麴抽出液は、コウジ酸が多く含まれるために褐変しにくいことが明らかとなったことから、KpeA の遺伝子破壊によるコウジ酸生産の増加が、米麴の褐変抑制に効果があることが示された。

以上より KpeA は種麴製造と製麴において、分生子形成やコウジ酸生産を制御しており、実際の醸造においても重要な役割を果たす転写因子であることが確認された。KpeA の遺伝子破壊株は、米麴の酵素活性が若干低下するものの、製麴において分生子が形成しにくく、かつ米麴の褐変性が低いといった清酒醸造に使用する麴菌として好ましい特性をもつため、KpeA は醸造における麴菌の育種ターゲットの新しい候補として期待できる。

キーワード: *Aspergillus oryzae*, 米麴, 種麴, コウジ酸, *kpeA*

1. 緒 言

麴菌 *Aspergillus oryzae* は日本の伝統的な醸造物の製造に用いられる糸状菌であり、穀物に生育させた麴として使用される。清酒製造においては精米した米を蒸煮し放冷後、麴菌の分生子を含む種麴を撒き、数時間ごとの攪拌作業などを経て 43~48 時間程で米麴が造られる¹⁾。この作業を製麴といい、一連の作業により品温は種切り時の 32℃ 程度から 42℃ 程度まで上昇するほか、乾燥が進むことが知られる¹⁾。この間麴菌は、高温や乾燥など、実験室での通常の培養では晒されることのない培養環境下で増殖し、これらストレスにより液体培養では生産しない酵素を生産することから^{2,3)}、製麴のような固体培養と、平板培養や液体培養では、麴菌の代謝や酵素生産などは、大きく異なると考えられている。しかし、固体培養における麴菌についての分子レベルの研究は遅れており、先行している平板培養や液体培養での知見を、醸造現場に還元できる研究が求められている。

我々はこれまでに、麴菌転写因子遺伝子破壊株ライブラリーに対するスクリーニング実験から、コウジ酸生産を転写レベルで制御する KpeA を同定した⁴⁾。アミノ酸配列から、KpeA は糸状菌特有の Zn(II)₂-Cys₆ 型転写因子であり、通常、N 末端側に存在する DNA 結合モチーフが配列中央にある新規構造の転写因子である⁴⁾。興味深いことに、KpeA はコウジ酸以外の二次代謝物の生産制御に関わるほか、制御因子 BrlA の転写制御を介して分生子形成を促進することも明らかになり⁴⁾、平板培養や液体培養において麴菌の代謝を広く制御する重要な転写因子であることが示唆された。

そこで本研究では、KpeA の遺伝子破壊株と高発現株を用いて実際に種麴製造と製麴を行い、種麴や米麴の性状や遺伝子発現について調べることで、KpeA の種麴製造と製麴における役割を明らかにすることを目的とした。

* 東京農業大学大学院農学研究科醸造学専攻

** 東京農業大学応用生物科学部醸造科学科

† Corresponding author (E-mail: m3tokuok@nodai.ac.jp)

2. 実験方法

(1) 菌株

Aspergillus oryzae RIB40 株を親株として作製された *kpeA* 破壊株 (破壊株), *kpeA* 高発現株 (高発現株) 及び対照株 ($\Delta ku70::ptrI^+$, $pyrG^+$, $\Delta cybX-pksA$) を用いた^{3,5)}。

(2) 種麴の製造

玄米を 4℃で一晩水に浸漬し, 2 時間の水切り後, 30 分間蒸した。蒸米を室温まで冷まし, 生米 30 g 相当を 300 ml 容三角フラスコに入れ, 綿栓をしてオートクレーブで 121℃で 15 分間滅菌した。その後, Potato Dextrose Agar 培地 (Difco Laboratories) で 30℃, 7 日培養した各株のコロニーの一部をクリーンベンチ内で寒天培地ごと 5 mm 角に切り出し, 上記の三角フラスコ内の玄米に接種し, 35℃の恒温機で培養した。12 時間, 18 時間及び 24 時間で手入れを行い, 24 時間以降は 30℃で 5 日間静置したのち, 出麴した。種麴 1 g 当たりの分生子数はトーマ氏血球計を用いて計数した。

(3) 製麴

恒温恒湿機エンピロス KCL-2000W (東京理化工機株式会社) を用いて小規模製麴を行った。精米歩合 70% の一般米を室温で 3 時間浸漬し, 2 時間の水切り後, 25 分間蒸した。生米換算で 50 g の蒸米に約 4.0×10^7 個の分生子になるように種麴を加えてよく攪拌して種切りとし, 恒温恒湿機に入れた。製麴工程中の温度及び湿度経過は図 1 の通りとした。手入れは種切り後 12 時間に切り返し, 18 時間に盛, 24 時間に伸仕事, 36 時間に仕舞仕事を行い, 46 時間で出麴した。また, 出麴した米麴の一部を 35℃で 72 時間まで培養した。

(4) 酵素活性測定及び麴菌体量測定

α -アミラーゼ及び酸性プロテアーゼの活性測定は国税庁所定分析法に従って行った⁶⁾。グルコアミラーゼ及び α -グルコシダーゼの活性測定は糖化力分別定量キット (キッコーマンバイオケミファ株式会社) を用いて行った。チロシナーゼ活性測定は大場らの方法⁷⁾, 麴菌菌体量の測定は藤井らの方法により測定した⁸⁾。

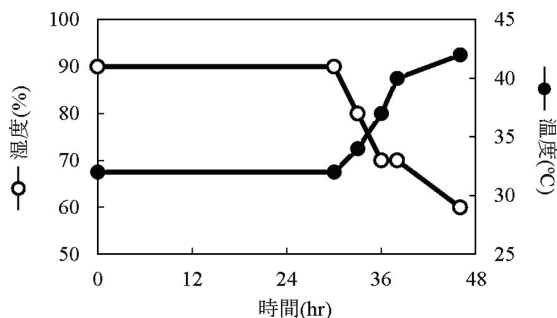


図 1 製麴の温度及び湿度条件

(5) コウジ酸及びデフェリフェリクリシンの定量

米麴 0.2 g を超純水 1 ml に入れ, グライNDER で破碎することで, 米麴からのコウジ酸抽出を行った。コウジ酸の定量は前報と同様に HPLC により UV (270 nm) の吸収で検出した⁴⁾。デフェリフェリクリシンの定量は佐藤らの方法で行った⁹⁾。

(6) qRT-PCR 解析

米麴からの total RNA の抽出は赤尾らの方法で行い¹⁰⁾, チオシアン酸グアニジン緩衝液として ISOGEN (株式会社ニッポンジーン) を用いた。逆転写は Superscript III (Invitrogen) を用いて行い, qRT-PCR は KAPA SYBR Fast qPCR Kit (KAPA biosystems) 及び CFX Connect™ Real Time PCR Detection System (BioRad) を用いて行った。*brlA* 及び *kpeA*, *kojA*, *dffA*, *tef1* のプライマーとして TMbrl1AFW (TATGCCCGACTTTCTGTCCG) 及び TMbrl1ARV (ATGGGAGGCTGTGTGTTCCA), qrtkpeAF (GCGCCAATAACGATAAGTTATGA) 及び qrtkpeAR (TGCCGGCATATCTCATAGTTTCATA), qrtkojAF (CCGAAGTAGTCGCCACCAT) 及び qrtkojAR (ACATCCCTGAATGCCTCATC), qrtdffAF (TTGCTGTTCCGATGCCTTG) 及び qrtdffAR (AGTGCCACGCGAATGTTTC), TMtef1FW (AGCCCATGTGTGTGGAGTCTT) 及び TMtef1RV (ACCGACTTGATAACTCCGACG) をそれぞれ用いた。PCR 及び融解曲線解析は前報⁴⁾と同様に行った。

(7) 麴の褐変性評価

麴抽出液は大場らの方法で作製した¹¹⁾。すなわち, 米麴 2 g に 10 ml の蒸留水を加え, 室温で 1 時間静置後に 5C ろ紙 (アドバンテック東洋株式会社) でろ過した。抽出液はメンブレンフィルター DISMIC : 25CS (アドバンテック東洋株式会社) でろ過したのち, 4℃で静置し, 2 週間後の色から褐変性を評価した。麴抽出液へのコウジ酸添加試験は対照株の麴抽出液 1 ml に 0.024 mg のコウジ酸 (東京化成工業株式会社) を添加し, その褐変性を評価した。

3. 結果

(1) 種麴製造における *kpeA* 破壊及び高発現の影響

KpeA は平板培養において分生子形成に関わることが示されているため⁴⁾, 清酒醸造において分生子調製の工程である種麴の製造において機能解析を行った。初めに, 破壊株, 高発現株及び対照株を用いて種麴を製造し, その状態を比較した。すべての株において種切り後 12 時間で, 肉眼で確認できる菌糸が米表面に観察されたが, 分生子形成については高発現株及び対照株で 48 時間後, 破壊株では 72 時間後に観察された。種切り後 144 時間後の出麴時では, すべての株で旺盛に分生子形成が観察されたが, 破壊株は高発現株及び対照株と比較して空中菌糸が非常に長く, 分生子が少なかった (図 2)。分生子数を計数したところ, 対照株と高発現株では約 3.0×10^9 個/g・koji と一般的な種麴 (8×10^8 個/g・koji) 以上であり, 種麴として十分な量

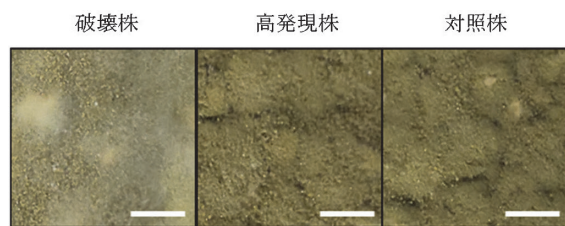


図2 各株の種麴の性状
スケールバーは1cmを示す。

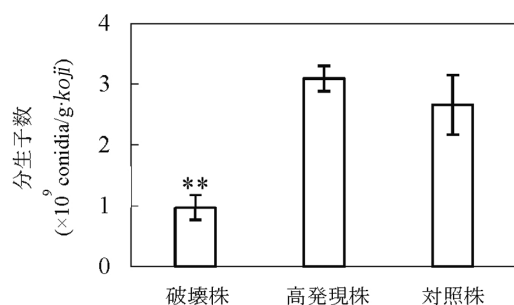


図3 各株の種麴の分生子数
** : $p < 0.01$

の分生子を形成したが、破壊株は対照株の約 1/3 であった (図3)。

麹菌の分生子形成は転写因子 BrlA の発現がトリガーとなることが知られている¹²⁾。平板培養での実験から、KpeA が BrlA の発現を促進することが示されていることから⁴⁾、種麴製造においても同様のメカニズムによる制御が機能しているかを調べた。種麴において分生子形成が進む 24~72 時間における *kpeA* の遺伝子発現を調べたところ、対照株においては 24 時間ですでに発現し、72 時間までに発現が誘導されることが確認された (図4A)。高発現株では *kpeA* は構成的で強いプロモーターにより発現していることから、対照株の 72 時間時点よりも 2 倍ほど強い発現が維持された (図4A)。次に *brlA* の遺伝子発現を調べた結果、すべての株において、48 時間で一時的に強く誘導される特徴を示し、48 時間における発現強度は破壊株では対照株より弱く、高発現株では高かった (図4B)。これらの結果から、*kpeA* は平板培養と同様に *brlA* の発現促進に関わり、種麴製造では、48 時間における一時的な *brlA* の高発現と、それに伴う分生子形成に関わっていることが明らかになった。

(2) 米麴における *kpeA* 破壊及び高発現の影響

米麴は清酒の品質に直接的に影響するほか、酒母や醪の発酵への影響も大きいので、製麴には特に注意が払われる。*kpeA* は種麴の製造工程において遺伝子発現が確認されたことから、同様に米粒での培養を行う製麴においても機能していると考えられた。そこで、米麴の品質との関わりを検討するために各株で製麴を行い、分生子形成、酵素力価、二次代謝物及び褐変性の各観点から *kpeA* の機能解析を行った。

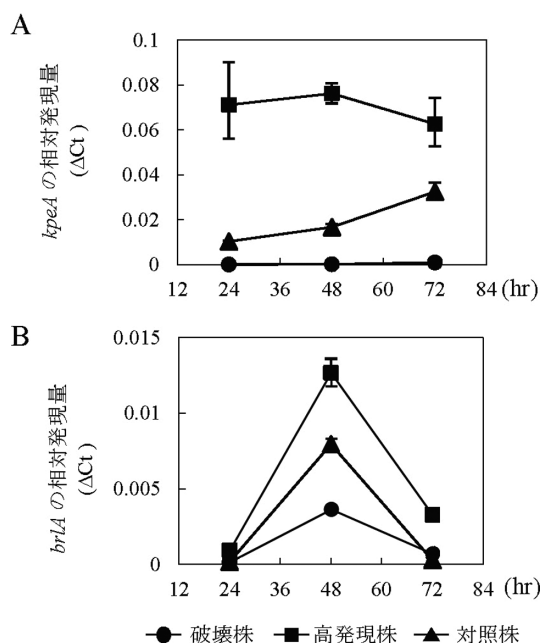


図4 種麴における分生子形成期間における *kpeA* (A) 及び *brlA* (B) の発現
相対発現量は qRT-PCR により求め、リファレンス遺伝子として *tef1* を用いた。*kpeA* については全ての時間において、危険率 5% で対照株と有意差があった。*brlA* については 48 時間において危険率 1% で対照株と有意差があった。

a) 分生子形成

製麴における KpeA の役割を明らかにするために、種切り後 46 時間で出麴した米麴と、分生子形成させることを目的に出麴後に 35°C で 72 時間まで培養した米麴において、分生子形成への影響を調べた。対照株では種切り後 72 時間において黄緑色の分生子を形成したのに対して、高発現株では種切り後 46 時間後の時点ですでに分生子を形成していた。一方、破壊株では、72 時間後においても分生子が形成されなかった (図5)。以上より *kpeA* は製麴工程においても分生子形成を促進する機能を有していることが確認されたほか、種麴における培養では観察されなかった高発現株における分生子形成の促進が観察された。

b) 酵素活性

近年の報告により、分生子形成を促進する転写因子 FlbC が固体培養での酵素生産に関わることが示された¹³⁾。FlbC と同様に KpeA も分生子形成の促進因子であるため、KpeA の固体培養における酵素生産への関与について調べた。種切り後 46 時間で出麴した各株の米麴の各種酵素 (α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ及び酸性プロテアーゼ) の酵素活性を調べたところ、表1に示す通り、破壊株のグルコアミラーゼと、高発現株のグルコアミラーゼ及び α -グルコシダーゼの活性が有意に減少した。また、有意差はないが破壊株と高発現株の α -アミラーゼと酸性プロテアーゼの活性も減少しており、測定した全ての酵素活性が減少傾向を示した。この結果から、*kpeA* の破壊や高発現は固体培養における酵素生産を若干減少させることが示された。

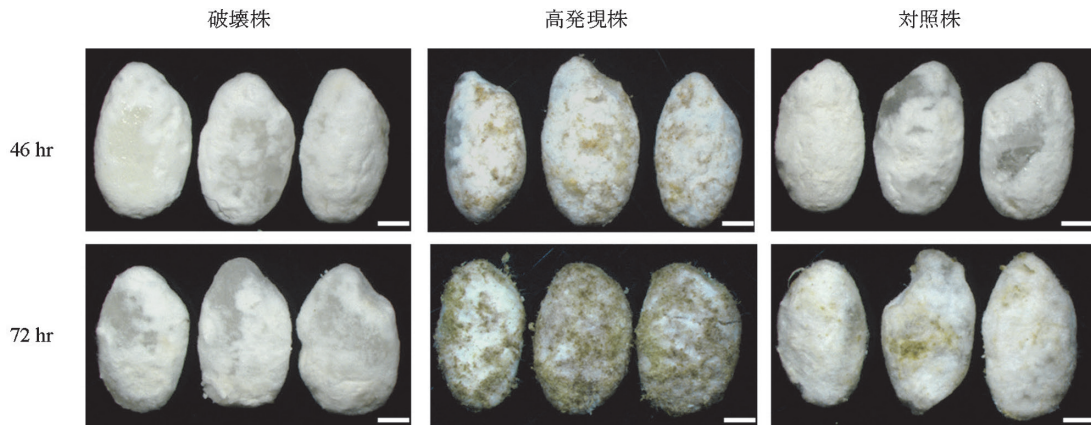


図 5 種切り後 46 時間及び 72 時間の米麴の状貌
スケールバーは 1 mm を示す。

表 1 各株の米麴の菌体量及び酵素活性

	cell (mg/g·koji)	α -amylase	glucoamylase	α -glucosidase	acidic protease
		(U/g·koji)			
破壊株	2.0 (± 0.2)	1678 (± 177)	213* (± 5)	0.14 (± 0.01)	1658 (± 61)
高発現株	2.0 (± 0.2)	1605 (± 85)	182** (± 14)	0.12* (± 0.01)	1709 (± 170)
対照株	2.1 (± 0.2)	1869 (± 171)	248 (± 11)	0.18 (± 0.02)	1951 (± 158)

括弧内数値は標準偏差を示す。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

c) コウジ酸及びデフェリフェリクリシン生産

製麴を含む麴菌の固体培養における二次代謝制御についての遺伝子レベルでの研究報告は少ない。麴菌が生産する二次代謝物は多数知られるが¹⁴⁾、本実験ではコウジ酸、及び清酒の着色に関わるデフェリフェリクリシンについて⁹⁾、*kpeA* が関わるかを調べた。HPLC による定量により、対照株の米麴からコウジ酸 27.8 mg/kg·koji が検出された (表 2)。一方、破壊株の米麴からは対照株の 4.5 倍検出されたのに対し、高発現株の米麴では検出限界 (1 ppm) 以下であった。コウジ酸生合成酵素の遺伝子と推定されている *kojA* の発現を qRT-PCR により調べた結果¹⁵⁾、破壊株では対照株の 1.5 倍、高発現株では対照株の半分程度の発現が確認された (図 6A)。これらの結果は KpeA がコウジ酸生産を転写レベルで抑制する因子として発見されたことと一致し、液体培養や平板培養と同じように、製麴においても *kpeA* がコウジ酸生産を抑制する重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

米麴中のデフェリフェリクリシン量については、破壊株は対照株より 30% 程度少なく、高発現株は対照株と有意な差がなかった (表 2)。デフェリフェリクリシン生合成酵素遺伝子である *dffA*¹⁶⁾ の遺伝子発現を調べた結果、生産量とは一致せず、高発現株で発現量が 30% 程度低く、破壊株では有意な差は検出できなかった (図 6B)。

d) チロシナーゼ活性

チロシナーゼは麴の褐変を引き起す他、酒粕が黒くなる黒粕の原因となるため¹⁷⁾、醸造現場ではチロシナーゼ活性が低い麴菌が望まれる。麴抽出液の褐変は麴の褐変と相関があり¹⁸⁾、麴の褐変は 1 ヶ月近く掛かるのに対し、麴抽出

表 2 各株の米麴に含まれる二次代謝物量

	コウジ酸	デフェリフェリクリシン
	(mg/kg·koji)	
破壊株	124.1* (± 74.5)	95.0* (± 15.5)
高発現株	N.D	138.7 (± 16.2)
対照株	27.8 (± 3.4)	131.6 (± 23.9)

括弧内は標準偏差を示す。*: $p < 0.05$, N.D = 不検出

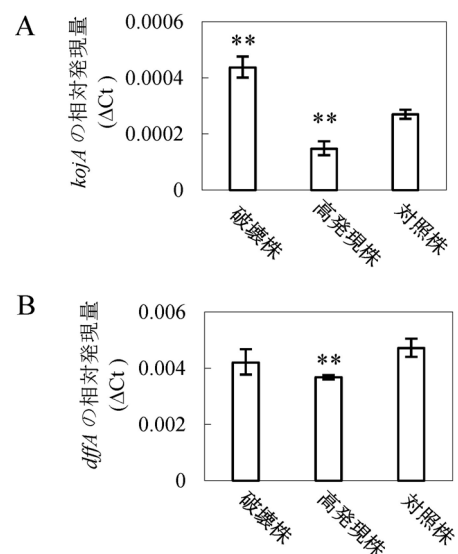


図 6 各株における二次代謝物生合成酵素の遺伝子発現量：
kojA (A), *dffA* (B)
** : $p < 0.01$

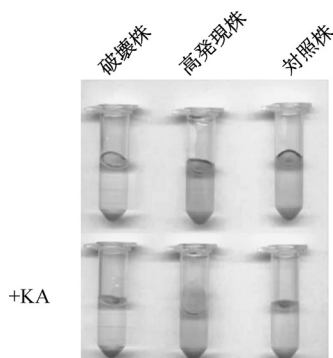


図 7 麴抽出液の褐変
+KA：コウジ酸添加

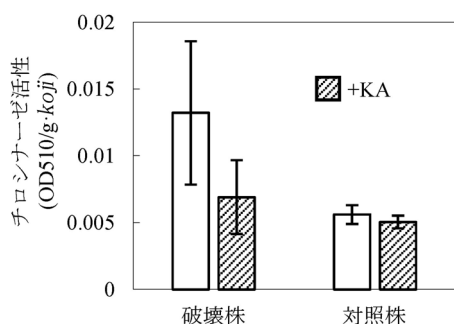


図 8 米麴のチロシナーゼ活性
+KA：コウジ酸添加

液の褐変は数日から数週間で褐変性がわかる。KpeA と麴の褐変性に関連があるかを調べるため、種切り後 46 時間で出麴した各株の米麴の麴抽出液の褐変を調べた。驚くべきことに、高発現株及び対照株の麴抽出液は褐変したが、破壊株の麴抽出液は褐変しなかった (図 7, 上段)。チロシナーゼ活性を調べてみると、破壊株は対照株の 2.4 倍の活性を示し (図 8)、褐変性とは一致しない結果となった。コウジ酸はチロシナーゼの阻害作用により、黒色素であるメラニンの生成を抑制することが知られていることから^{19,20)}、破壊株の米麴中のコウジ酸量が多いために麴抽出液の褐変が抑制された可能性について検討した。対照株の麴抽出液に破壊株の米麴と同量のコウジ酸 (0.12 mg/g·koji) を添加したところ、全く褐変しなかった (図 7 下段)。これら結果より、破壊株では米麴中に含まれるコウジ酸が褐変を抑制していることが確認された。一方、対照株においてコウジ酸をチロシナーゼ活性測定の実験液に添加しても、チロシナーゼ活性はほとんど変わらなかった (図 8)。これらの結果から、麴抽出液の褐変は、測定したチロシナーゼ活性のみでは説明ができず、コウジ酸に阻害される反応を経て生じていることが分かった。

4. 考 察

これまでの研究から KpeA が液体培養及び平板培養において分生子形成と二次代謝の制御に関わることが示されていたことから⁴⁾、本研究では、醸造現場における種麴製造及び製麴においても同様の重要な役割を果たすと予想し

機能解析を行った。一連の結果から、KpeA は種麴製造及び製麴において分生子形成を促進する因子であり、平板培養と同様に *brlA* の制御を介して分生子形成を制御することが示唆された (図 2~5)。さらに *kpeA* は製麴においてもコウジ酸生産を遺伝子発現レベルで制御する重要な因子であることが明らかとなり、破壊株では対照株の 4.5 倍のコウジ酸を生産することで結果的に褐変性を示さない株となることも明らかとなった (表 2 及び図 6~8)。したがって KpeA は、清酒醸造において、米麴品質に関わる麴菌の分生子形成と一部の二次代謝を制御する重要な転写因子であることが確認された。麴菌を含むアスペルギルス属糸状菌において、分生子形成は転写因子 *BrlA* 及びその下流の *AbaA* や *WetA* などによるシグナルカスケードにより誘導され²¹⁾、その中で *BrlA* の遺伝子発現はフィードバック制御を受ける。本実験でも、種切り 48 時間後に *kpeA* の発現に応じて *brlA* が誘導された後は、*kpeA* の発現とは関係なく 72 時間後に *brlA* の発現が低下したことから (図 4)、*kpeA* が関与しないフィードバックによる発現抑制が起きたと考えられる。*brlA* による分生子形成のシグナルカスケードの初期は頂のうの成熟が進むことから、発現初期の *brlA* の発現が弱いと、頂のうが十分に形成されない、もしくは未熟となる可能性がある。そのため、*brlA* 発現が低いことが破壊株において分生子数が少ない原因と考えることができる。種麴における頂のうの計数は困難であり確認はできなかったものの、平板培養において *kpeA* の破壊株は頂のうの数が少なく、サイズも小さいことが分かっており⁴⁾、種麴においても同様の現象が理由で分生子数が減少したと考えられる。一方、高発現株において、種麴では分生子数は変わらず、製麴においては増加した。種麴製造は、分生子形成が促進される培養環境であるのに対して、清酒醸造の製麴工程は手入れなどを頻繁に行うため、分生子形成が抑えられる。これら培養条件の違いに加えて、使用している米の精米歩合も異なるため、栄養条件も大きく異なる。*kpeA* 高発現の影響が異なる理由はこれらの条件の違いであろうと考えられる。

KpeA はコウジ酸生産を促進する転写因子として見出されたが、コウジ酸以外にもシクロピアゾン酸やペニシリンの生成を抑制する因子であることが示されており⁴⁾、複数の二次代謝物の生産制御に関わる。しかし、RIB40 株はシクロピアゾン酸非生産性株であり、また、ペニシリンは製麴条件とは異なる窒素源が豊富な培地で生産されることから米麴ではそもそも生産されないため、米麴におけるこれらの二次代謝物の生産性との関連は分からなかった。米麴中のコウジ酸量は前報の液体培地での結果と一致し、破壊株において増加した (表 2)。コウジ酸生産は *BrlA* により抑制されることが示されており⁴⁾、製麴においても、*kpeA* 破壊により *brlA* 発現が低下することでコウジ酸生産の抑制が弱まり、米麴中コウジ酸量が増加したと考えられる。

コウジ酸の定量は、一般的な出麴時間である種切り後 46 時間で出麴した麴を試料として行った。これまでにも米麴に含まれるコウジ酸についての報告はあるが、種切り後 5 日以上引伸ばした米麴や出麴後 30℃ で培養した米麴

など^{22,23)}、通常の米麴に含まれるコウジ酸量は定量されておらず、長らく通常の米麴におけるコウジ酸量は明らかでなかった。本研究結果は 27.8 mg/kg・koji と測定された。定量値としては寺本らの 50 mg/kg・koji 以下という報告²²⁾の範疇であり妥当と考えるが、コウジ酸は菌株により生産性が大きく異なるため、平均的であるかについては結論付けられない。

デフェリフェリクリシンについては、米麴からの検出量と生合成遺伝子の発現量が相関せず、解釈が難しい結果となった。デフェリフェリクリシンは鉄をキレートすることで清酒着色の原因となる極めて重要な二次代謝物であるにもかかわらず、米麴における生産制御機構は未解明な点が多いことから、今後より詳細な解析が求められる。

本研究により米麴に含まれるコウジ酸が米麴の褐変性に大きく影響することが示唆された(図 7)。米麴の褐変は麹菌の生産するチロシナーゼが原因であることが示されており、特にグルコアミラーゼ高生産株は褐変性が高いなどの経験則が知られ、注意が払われている。コウジ酸はチロシナーゼの補因子となる Cu^{2+} をキレートすることで活性を阻害すると報告されているが¹⁹⁾、本実験においてはチロシナーゼによる反応とは異なる過程に作用し、褐変性に影響することが判明した。チロシナーゼはチロシンをドーパキノンとする反応を触媒し、それ以降は非酵素的な酸化によって褐色のメラニンが合成される。コウジ酸はメラニンの前駆物質である 5,6-dihydroxyindole と直接反応してメラニン合成を阻害することも報告されており²⁰⁾、コウジ酸による褐変の抑制については、非酵素的な酸化過程を含めて、作用点の再検討が必要かもしれない。また、清酒醸造において実際にコウジ酸がどれほど褐変抑制に寄与しているかについては興味深く、今後の研究課題としたい。

KpeA の破壊株と高発現株の米麴の酵素活性について調べたところ、測定した全ての酵素活性が若干減少した。分生子形成や二次代謝の制御に関わる KpeA がなぜ酵素生産に影響するのは興味深いだが、破壊株では気中菌糸が増加することで、相対的に酵素生産の場となる基底菌糸が減ったこと、高発現株では二次代謝や分生子形成の活性化に伴うエネルギー消費のために酵素生産量が減少したことなどが可能性としてあげられる。また、破壊株と高発現株の酵素活性は、清酒醸造に用いる米麴として問題がない力価であった²⁴⁾。

本研究により *kpeA* の種麹製造及び製麴における機能が明らかとなった。破壊株は種麹の分生子数が 1/3 程度に減少する点を除くと、各種酵素活性は醸造現場で使用される米麴と遜色なく²⁴⁾、出麴を極端に引っ張っても分生子を形成しない、褐変しにくいといった特徴を有しており、分生子形成や着色が忌避される甘酒等に使用する麹菌には特に向いた形質を備えた株として活用できる可能性がある。今後、実際の清酒製造とその評価に基づいた *kpeA* の機能解析を進めることで、新しい麹菌育種のターゲットとしての実用的な成果が期待できる。

謝辞：本研究を遂行するにあたり、小規模の種麹作製の方

法をご指導いただいた(株)ビオックの和久豊氏に深甚なる謝意を表します。

参考文献

- 1) 村上英也 (1986) 麹学, 製麹法. 日本醸造協会, 東京, pp. 217-314.
- 2) OBATA H, ISHIDA H, HATA Y, KAWATA A, ABE Y, AKAO T, AKITA O, ICHISHIMA E (2004) Cloning of a novel tyrosinase-encoding gene (*melB*) from *Aspergillus oryzae* and its overexpression in solid-state culture (Rice Koji). *J. Biosci. Bioeng.* **97**: 400-405.
- 3) HATA Y, ISHIDA H, ICHIKAWA E, KAWATO A, SUGINAMI K, IMAYASU S (1998) Nucleotide sequence of an alternative glucoamylase-encoding gene (*glab*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Gene* **207**: 127-134.
- 4) ARAKAWA G, KUDO H, YANASE A, EGUCHI Y, KODAMA H, OGAWA M, KOYAMA Y, SHINDO H, HOSAKA M, TOKUOKA M (2019) A unique Zn(II)₂-Cys₆-type protein, KpeA, is involved in secondary metabolism and conidiation in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* **127**: 35-44.
- 5) TAKAHASHI T, JIN F J, SUNAGAWA M, MACHIDA M, KOYAMA Y (2008) Generation of large chromosomal deletions in koji molds *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* via a loop-out recombination. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 7684-7693.
- 6) 注解編集委員会 (1993) 第 4 回改正 国税庁所定分析法注解, 固体こうじ. 日本醸造協会, 東京, pp. 211-228.
- 7) 大場俊輝, 佐藤和夫, 鹿毛政史, 原 昌道, 菅間誠之助 (1974) 米麴チロシナーゼの簡易測定法と酵素産生条件の検討. 日本醸造協会雑誌 **69**: 56-58.
- 8) 藤井史子, 尾関健二, 神田晃敬, 浜地正昭, 布川弥太郎 (1992) 市販酵素剤を利用した麹菌体量簡易測定法. 日本醸造協会誌 **87**: 757-759.
- 9) 佐藤 信, 大場皓蔵, 蓼沼 誠 (1967) 清酒中の着色物質に関する研究 (第 5 報) 清酒および米麴中の Ferrichrome 類化合物とその非含鉄化合物の迅速定量法. 日本醸造協会雑誌 **62**: 875-880.
- 10) AKAO T, GOMI K, GOTO K, OKAZAKI N, AKITA O (2002) Subtractive cloning of cDNA from *Aspergillus oryzae* differentially regulated between solid-state culture and liquid (submerged) culture. *Curr. Genet.* **41**: 275-281.
- 11) 大場俊輝, 村上英也, 原 昌道, 横関公男, 牧野正則, 江頭勇次 (1969) 米麴の褐変に関する研究 (第 1 報) 褐変現象とその条件. 日本醸造協会雑誌 **64**: 1074-1080.
- 12) YAMADA O, LEE B R, GOMI K, IMURA Y (1999) Cloning and functional analysis of the *Aspergillus oryzae* conidiation regulator gene *brlA* by its disruption and misscheduled expression. *J. Biosci. Bioeng.* **87**: 424-429.
- 13) TANAKA M, YOSHIMURA M, OGAWA M, KOYAMA Y, SHINTANI T, GOMI K (2016) The C₂H₂-type transcription factor, FlbC, is involved in the transcriptional regulation of *Aspergillus oryzae* glucoamylase and protease genes specifically expressed in solid-state culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**: 5859-5868.
- 14) RANK C, KLEJNSTRUP M L, PETERSEN L M, KILDGAARD S, FRISVAD J C, HELD G C, OSTENFELD L T (2012) Comparative Chemistry of *Aspergillus oryzae* (RIB40) and *A. flavus* (NRRL 3357). *Metabolites* **5**: 39-56.
- 15) TERABAYASHI Y, SANO M, YAMANE N, MARUI J, TAMANO K, SAGARA J, DOHMOTO M, ODA K, OHSHIMA E, TACHIBANA K, HIGA Y, OHASHI S, KOIKE H, MACHIDA M (2010) Identification and characterization of genes responsible for biosynthesis

- of kojic acid, an industrially important compound from *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* **47** : 953-961.
- 16) YAMADA O, NA NAN S, AKAO T, TOMINAGA M, WATANABE H, SATOH T, ENEI H, AKITA O (2003) *dffA* Gene from *Aspergillus oryzae* Encodes L-Ornithine N^5 -Oxygenase and Is Indispensable for Deferriferrichrysin Biosynthesis. *J. Biosci. Bioeng.* **95** : 82-88.
- 17) 村上英也, 河合美登利 (1958) 麹の着色に関する酵素学的研究 (第5報) 麹菌酸化酵素について. 日本醸造協会雑誌 **53** : 88-92.
- 18) 大場俊輝, 水頭幸太郎, 村上英也, 原 昌道, 高橋利郎, 加藤明彦 (1970) 米麹の褐変に関する研究 (第2報) 褐変前駆物質の検索. 日本醸造協会雑誌 **65** : 425-432.
- 19) MISHIMA Y, HATTA S, OHYAMA Y, INAZU M (1988) Induction of Melanogenesis Suppression : Cellular Pharmacology and Mode of Differential Action. *Pigment Cell Res.* **1** : 367-374. f
- 20) 三嶋 豊, 芝田孝一, 瀬戸英伸, 大山康明, 波多江慎吉 (1994) コウジ酸のメラニン生成抑制作用と各種色素沈着症に対する治療効果. 皮膚 **36** : 134-150.
- 21) ADAMS TH, WIESER JK, YU JH (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62** : 35-54.
- 22) 寺本四郎, 橋田 度, 大塚親男 (1953) 麹酸生産菌株による清酒の試醸並びにその抗火落性に就て. 日本醸造協会雑誌 **48** : 195-200.
- 23) 荻田修一, 梅原康夫, 矢野善嗣, 浜地正昭, 布川弥太郎 (1991) Bio Gel P-2 カラムによる米麹中の麹酸の定量. 日本醸造協会誌 **86** : 884-885.
- 24) 布川弥太郎, 椎木 敏, 岩野君夫, 斉藤和夫 (1981) 米麹の酵素力価と清酒もろみの発酵特性. 日本醸造協会雑誌 **76** : 350-353.

Functional Analysis of Transcriptional Factor, KpeA, in *Aspergillus oryzae* during Rice and Seed *koji* Making

By

Genya ARAKAWA*, Hitoshi SHINDO**, Masaru HOSAKA**
and Masafumi TOKUOKA**†

(Received August 29, 2019/Accepted December 6, 2019)

Summary : We previously identified a novel transcription factor, KpeA, in *Aspergillus oryzae*. KpeA is involved in secondary metabolism and conidiation when *A. oryzae* is cultured in liquid or agar medium. To clarify the role of KpeA in sake brewing, we analyzed the functionality of KpeA in rice *koji* making and seed *koji* making. In seed *koji* making, the *kpeA* disruption ($\Delta kpeA$) strain showed longer aerial hyphae and the number of conidia was one-third that of the control strain. In accordance with conidiation, expression of *brlA*, a pivotal gene for conidiation, was also decreased in the $\Delta kpeA$ strain, whereas it was increased in the *kpeA* overexpression (OE) strain. These results suggested that, similar to the phenomenon that occurs in agar culture, KpeA induced conidiation via positive regulation of *brlA* expression in seed *koji* making.

Rice *koji* samples made with $\Delta kpeA$ strain, OE strain, and control strain were analyzed for conidiation, enzyme activity, and secondary metabolites. The OE strain and the control strain formed conidia after 46 and 72 h of inoculation, respectively, whereas the $\Delta kpeA$ strain did not. In contrast, activities of representative hydrolytic enzymes in rice *koji* did not differ among the strains. Regarding secondary metabolism, we confirmed that *kpeA* is responsible for the enhanced kojic acid production via inducing the expression of the putative biosynthesis gene, *kojA*. Notably, the browning of rice *koji* extract was not observed in the $\Delta kpeA$ strain sample. We confirmed that additional dosage of kojic acid at the level of the rice *koji* of the $\Delta kpeA$ strain prevented the browning of rice *koji* extract of the control sample. As a result, *kpeA* disruption led to increased kojic acid amount in rice *koji*, which consequently prevented the browning of rice *koji*.

Taken together, our results showed that KpeA regulates secondary metabolism and conidiation of *A. oryzae* during rice *koji* making and seed *koji* making. Although enzyme activities of the $\Delta kpeA$ strain were reduced slightly, we consider that the observed phenotypes, such as suppressed conidiation or repression of the browning of rice *koji*, are beneficial for rice *koji* or rice *koji* making. Thus, we propose that *kpeA* could be a new target for the breeding of *A. oryzae* for traditional brewing.

Key words : *Aspergillus oryzae*, rice *koji*, seed *koji*, kojic acid, *kpeA*

* Department of Fermentation Science and Technology, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

** Department of Fermentation Science, Faculty of Applied Biosciences, Tokyo University of Agriculture

† Corresponding author (E-mail : m3tokuok@nodai.ac.jp)