

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：33302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07463

研究課題名(和文) 麹菌アクリルアミド代謝遺伝子群の解明と実用麹菌での効率的育種法の研究

研究課題名(英文) Study of acrylamide metabolism genes and research on effective breeding method in practical *Aspergillus oryzae*

研究代表者

尾関 健二 (Kenji, Ozeki)

金沢工業大学・バイオ・化学部・教授

研究者番号：40410287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：アクリルアミド(AA)を分解できるアミダーゼ高生産麹菌(セルフクローニング)にアクリル酸(AS)分解候補遺伝子高生産株であるASC5-4の麹菌は、水およびコーヒーでのASの低減化効率が高くなることが分かった。AAの低減化には特に効率が上がる現象は認められなかった。これにより育種した麹菌はAS分解に関連する遺伝子の1つであることが分かった。しかしながらアミダーゼと連動せずに別々で働き、細胞内での各酵素の局在性に問題があると考えられる。アミダーゼ高生産麹菌の繰り返し再利用の条件を確立し、セルロースの担体の廃棄処理を抑える技術開発の目途が付いた。

研究成果の概要(英文)：ASC5-4 which is a high producing strain of acrylic acid (AS) degradation candidate in *Aspergillus oryzae* (Self Cloning) capable of degrading acrylamide (AA) can increase the efficiency of AS reduction in water and coffee I found out. There was no particular phenomenon in which efficiency was improved for reducing AA. It was found that the *Aspergillus oryzae* bred by this was one of the genes related to AS degradation. However, they work separately without interlocking with amidase, and it seems that there is a problem with localization of each enzyme in the cell. Establishment of conditions for repeated reuse of amidase high production *Aspergillus oryzae* and prospect of technological development to suppress the disposal treatment of cellulose carrier.

研究分野：応用微生物

キーワード：麹菌 アクリルアミド アミダーゼ アクリル酸

1. 研究開始当初の背景

米国カリフォルニアでは州法に発ガン物質であるアクリルアミド (AA) がフライドポテト、コーヒーに含有している警告をする義務がある。日本では農林水産省が優先的にリスク管理を行うべき有害化学物質のリストに挙げ、各種研究機関などで種々の加工食品中での低減化が検討されているが、現状では満足いく結果が得られていない (アスパラギンが多い食材ではアスパラギナーゼで分解し、アミノカルボニル反応で生じる AA を低減化できる例もある。国内ではこの酵素が食品添加物として認可されておらず、食品の味の変化を伴い、決してオールマイティな方法でもない)。

2. 研究の目的

研究代表者が 2005 年に大学に赴任後、加熱加工飲食品のうちで既に AA が生成し、特に液体であるコーヒー、ほうじ茶中の AA の微生物分解による技術開発に着手した。麹菌は AA を単一窒素源として利用しやすいことや分解能には各種麹菌でバラエティーがあることなどを報告した。さらに実用的レベルに近づけるためには固定化麹菌でのバッチ式、リアクター式などの方法を検討し、アルギン酸ビーズ包括法よりも多孔性であるヘチマ吸着法のほうが菌体増殖や AA 分解効率が高いことおよびアミダーゼ活性が誘導される条件を見出し、麹菌での菌体処理法が有効であることを報告した。

また研究代表者が所属する研究所で麹菌 DNA マイクロアレイに精通した先生と協力し、AA 分解時に発現が高まるアミダーゼ遺伝子を特定することに成功した。その過程で麹菌のゲノム解析情報には 2 つのアミダーゼ遺伝子が存在していたが、詳細に解析を進めると 1 つのアミダーゼ遺伝子であることが判明した。AA 分解に関わるアミダーゼ遺伝子が特定できたので、麹菌高発現ベクター (大関(株)提供) を利用し、セルフクローニングのアミダーゼ高生産株を育種した。育種麹菌を用いて、ヘチマ菌体処理法でコーヒ

ー中の AA 低減化効率が飛躍的に上昇し、AA の誘導培養が必要がなく、実用化に近づいた。これまでの成果を平成 24 年 11 月に国際コーヒー科学会で発表し、海外から大いに注目される AA 低減化技術としてまとめた。

しかしながらアミダーゼ高生産麹菌として利用する場合、次の分解産物である AS で止まってしまう、この物質は AA 以上の毒物であり、AS の分解酵素 (アセトチオキナーゼ?) 遺伝子を特定し、利用することにより効率よく炭酸ガスと水まで分解できる。AS 分解酵素遺伝子については、アクリル酸の濃度差および培養時間差での DNA マイクロアレイおよびリアルタイム PCR で遺伝子を取得でき、AA および AS 代謝経路に働く麹菌遺伝子群を解析することにより、どの遺伝子が AS 分解に寄与するか、ほぼ特定の段階まで来ている。遺伝子が特定できれば AA と AS の遺伝子破壊株と高生産株の取得は容易であり、これらの株を用いて、AA と AS の薬剤耐性度から、実用の麹菌から AA と AS の高生産株の育種、その他の食品用微生物での AA と AS の高生産株の育種利用に発展でき、微生物の代謝経路の解明だけでなく、アクリルアミド低減化食品の開発につながる。

3. 研究の方法

平成 27 年度は麹菌の AS 分解は以前の予備試験の結果、AA よりも 100 倍程度麹菌では毒性が高く生育阻害が認められた。AS が入った培地で生育できる濃度と時間を変化させた麹菌から常法により RNA を抽出、mRNA を取得後、DNA マイクロアレイ実験を数回行うことにより、AS 分解に関与する遺伝子群は取得可能である。また取得した遺伝子群についてはリアルタイム PCR 実験を行い、確実に AS 分解条件の時に発現が高い遺伝子であることを確認する。遺伝子が特定できれば、どのような培養条件での発現が高いか、また金属塩の添加の有無での発現強度に違いがあるかなど各種条件でリアルタイム PCR 実験を繰り返し、発現が高い培養条件を選択する。

AA 分解に関連するアミダーゼ遺伝子の特定に成功し、アミダーゼ高生産セルフクローニング麹菌の育種は既に完了している。麹菌のアミダーゼ高生産条件（pH、培地組成、金属塩の有無など）の検討が始められ、遺伝子の発現とアミダーゼ活性の両方からデータを得ることが可能である。これまでの実験結果は、ヘチマ吸着麹菌のバッチ式では、ほうじ茶およびコーヒー中の AA 濃度 10ppm（標準添加法で HPLC で分析）を数時間でほぼ 0ppm まで分解できる条件を確立できており、またリアクター試験ではアルカリ誘導処理を行うことにより、3 回の連続的なほうじ茶の AA 低減化処理が可能であることが分かっている。

上記アルカリ誘導による菌体処理法とアミダーゼ高生産麹菌での菌体処理法でアミダーゼ活性およびコーヒーやほうじ茶中の AA の低減化効率を比較する実験から始め、連続処理回数など実験へと進める。アミダーゼ高生産麹菌のメリットは AA を用いたアルカリ誘導処理をする必要がなく（低減化試験時、菌体を良く水で洗浄し AA の持込みを抑えていた）、そのままの麹菌体が利用できる。また重要な実験としてコーヒーやほうじ茶中の AA 低減化処理後のヘチマ菌体の再利用実験（何回利用でき、栄養培地で培養により再利用が可能かなど）が考えられる。

平成 28 年度はアミダーゼ高生産麹菌に別のマーカー遺伝子を利用して AS 分解酵素高生産を併せ持つ麹菌を育種する。またアミダーゼと AS 分解遺伝子破壊麹菌を育種する。高生産と破壊麹菌の AA と AS の生育耐性を各種培地組成により検討し、変異処理条件を決定する。また安定化に各種金属塩などの影響も十分考えられるのでその評価も重要である。

平成 29 年度はこれまで育種したアミダーゼ + AS 分解酵素高生産麹菌の菌体処理法およびそれぞれの抽出酵素剤を利用して、コーヒーやほうじ茶に AA を添加した試料あるいは無添加の試料で、試料の官能に変化がなく、且つ最短時間での処理方法を各種検討する。麹菌を始め

とする各種実用微生物で変異処理により、AA および AS の分解効率の高い微生物を育種する。またこれまでのアレイ実験、各種の低減化実験の結果を受けて、麹菌による AA および AS の代謝経路を解明し、それに関連する代謝遺伝子群の発現・酵素生産に影響する因子についての結果をまとめる。

AA を分解する微生物の報告は種々あるが、最近のものでも *Bacillus cereus* であり、これまでの報告と同様に食品加工には利用できない微生物である。一方麹菌は安全性が極めて高く、セルフクローニングの遺伝子組換え利用の食品加工用の酵素剤とした場合では、各省庁のハードルは非常に低くなり、実用化は可能と考えている。また実用化段階では、共同研究先の大関（株）での食品安全委員会への申請、使用許可が必要となる。但し大関（株）では麹菌の別の遺伝子でのセルフクローニングで申請、使用許可の実績がある。コーヒー製造企業とも連携して、現実的な AA 低減化処理法として技術開発へと繋げて行きたいと考えている。

4. 研究成果

AS 分解候補遺伝子を絞り込むために、単一炭素源として AS 濃度と時間を変化させて培養条件からの麹菌 DNA マイクロ解析を行った。AS 分解に関与する可能性が高い遺伝子を実験室アミダーゼ高生産セルフ麹菌に遺伝子導入した麹菌（ASC5-4）を育種した。この育種株、アミダーゼ高生産セルフ麹菌（4copy）、親株の RIB40 で AS および AA を添加した水およびコーヒーでの低減化試験を行った。セルロース担体（東レ CA タイプ）は、乾燥状態では板状で麹菌孢子懸濁液を分散時に、立方体を形成し、この際孢子が担体内部に入り込む培地濃度、時間、温度を変化させ、孢子が発芽し菌糸がより強固な足場をしっかりと形成する条件を検討した。その後栄養培地で担体の外側まで菌糸を生育させ、菌体重量が多くなる条件および低減化試験後の再利用できる培養条件を検討した。

ASC5-4 の麹菌は水およびコーヒーでの AS の低減化効率が高くなることが分かった。また AA の低減化には特に効率が上がる現象は認められなかった。これにより育種した麹菌は AS 分解に関連する遺伝子の 1 つであることが分かった (図1と2)。しかしながらアミダーゼと連動せずに別々で働き、細胞内での各酵素の局在性に問題があると考えられる。アミダーゼ高生産麹菌の繰り返し再利用の条件を確立し、セルロースの担体の廃棄処理を抑える技術開発の目途が付いた (図3)。

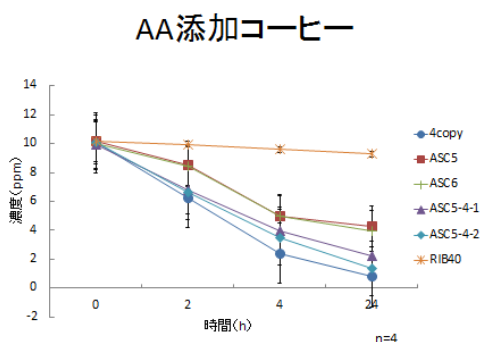


図1 各種麹菌での AA 低減化試験

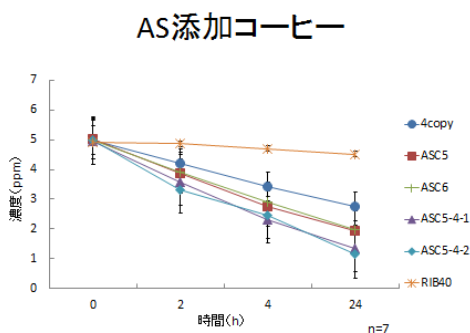


図2 各種麹菌での AS 低減化試験

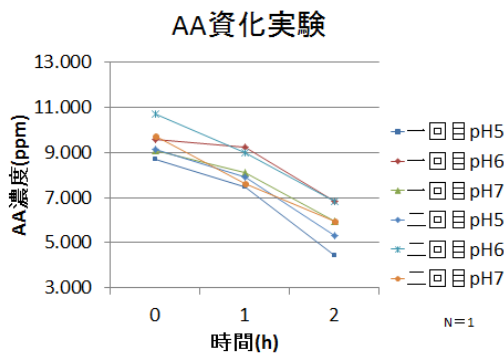


図3 繰り返し AA 低減化試験

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)
平成 28 年日本生物工学会 (富山)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
尾関 健二 (Kenji, Ozeki)

金沢工業大学・バイオ・化学部・教授

研究者番号：40410287

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()