

論文の内容の要旨

氏名：五 島 路 子

博士の専攻分野の名称：博士（理学）

論文題名：カビ臭低生産麹菌の育種に関する研究

清酒醸造の過程において、カビを連想させる香り（カビ臭）が発生することがあり、製品品質を著しく低下させるため問題となっている。カビ臭の原因物質は、主として2,4,6-trichloroanisol (TCA)で、その認知閾値は清酒で1.7 ng/Lと極めて微量である。清酒に関してカビ臭は、吟醸酒等の高級酒で多く発生することや、同じ蔵で何年も続いて発生するという特徴がある。TCAは塩素系殺菌剤により木材のリグニンが分解され塩素化されることで2,4,6-trichlorophenol (TCP)が生成されること、さらに古い木材に含まれる防カビ剤のTCPが、麹菌などの微生物の持つメチル基転移酵素により修飾を受けTCPを無毒化するために、TCAへと変換することが報告されている。

カビ臭を発生させないためには、製麹工程においてTCPが含まれていない木製用具の使用や、麹菌によるTCA生成を防止することが必要である。しかし、酒造りに用いられる市販の麹菌には全てTCPのメチル化能があることが報告されている。そこで本研究では、清酒に感じられるカビ臭の生成抑制を目的とし、メチル基転移酵素活性が低い麹菌を作出することとした。第1章では、麹菌のTCPのメチル化に関与する酵素をコードする遺伝子はまだ同定されていないため、その遺伝子の探索を行った。第2章では、TCPは細胞毒性を示すことが知られているが、麹菌における詳細は明らかになっていないため、麹菌がTCP存在下で示す生育特性を調査した。第3章では、紫外線照射によりカビ臭であるTCAの生成を抑制した菌株の作出を試みた。

第1章 カビ臭の生成に関与する麹菌のメチル基転移酵素遺伝子の探索

ワインにおいては *Trichoderma longibrachiatum* からメチル化に関与する酵素として CMT1 が見つまっている。麹菌においてはその変換に関与する酵素は特定されていない。本研究では、*Aspergillus oryzae* について TCP のメチル化に関与する酵素をコードする遺伝子の探索を試みた。まず、麹菌のゲノムデータベースに存在するメチル基転移酵素のうち、製麹時に高発現する遺伝子を選抜し順次破壊し、TCP のメチル化能が低下した遺伝子破壊株のスクリーニングを行った。具体的には、*A. oryzae* NSR- Δ 1D2 株 (*niaD*⁻ *sC*⁻ *adeA*⁻ Δ *ligD*) を用いて、37 候補遺伝子の破壊を試みたところ、34 遺伝子についての破壊株が得られた。遺伝子破壊株全てについて TCP を添加した製麹試験を実施し、TCA 生成量を測定した。その結果、A0090010000551 (別名 A0080521000231, *omtT*) の遺伝子破壊株が最も TCA 生成量が低くなり、親株の 0.12 倍に減少した。*omtT* 遺伝子が TCP の TCA への変換に関与する主要な O-メチルトランスフェラーゼをコードしている可能性が示唆された。さらに、*omtT* 遺伝子破壊株は清酒用米麹として十分な酵素を有しているか確認するため、米麹の各種酵素活性と菌体量を測定した。その結果、*omtT* 遺伝子破壊株は正常な麹をつくる能力を維持したまま TCP のメチル化能が低下していることが明らかとなった。

第2章 2,4,6-trichlorophenol (TCP) 存在下での麹菌 *A. oryzae* の増殖特性

第1章で、TCAの生成に関与している *omtT* 遺伝子を同定し、本遺伝子が欠損しても米麹の酵素力価には問題がないことを述べ、TCA生成を抑制した菌株は醸造に使用できる可能性を示した。一般的に真菌はTCPの殺菌効果により増殖が抑えられることが知られている。しかし、TCPが *A. oryzae* の生育にどのような影響を与えるかは明らかになっていない。第2章では、生育特性からTCAを生成しにくい菌株を取得するための特徴を把握できるか検討するために、*A. oryzae* RIB40株を用いて、TCPが麹菌の成長抑制に及ぼす影響を調べた。液体培養で分生子を100個/mLで培養 (Czapek-Dox:30°C 2日間, Brix 2の米麹抽出液 (RKE): 30°C 1日間) した結果、菌体重量がTCP無添加時よりも有意に小さくなった濃度は、Czapek-Doxで0.05 μ g/mL以上、RKEで0.3 μ g/mL以上であった。興味深いことに、RKEの1[~]2 μ g/mLで急に相対乾燥重量が低下する現象がみられた。寒天培養 (30°Cで7日間) では、50 μ g/mL以上のTCPを含むCzapek-DoxおよびBrix10のRKEで成長が抑制された。一方、固体培養である製麹条件では、高濃度のTCPを含む α 化米でも

生育が可能だった。今回の結果から、生育の違いが顕著に表れる $0.3 \mu\text{g/mL}$ 以上の TCP を含む RKE 液体培養の生育の違いを利用することにより、TCA を生成しにくい変異株を取得できる可能性が示唆された。

第3章 カビ臭物質 TCA を生成しにくい麹菌変異株の取得

第2章では、 $1\sim 2 \mu\text{g/mL}$ の TCP を含む RKE 液体培地で急激に相対乾燥重量が低下する現象がみられたことから、TCP を含む液体培養で TCA を生成しにくい麹菌変異株の選抜が可能なが示唆された。第3章では、TCP の TCA への変換に関与すると推定される *omtT* 遺伝子破壊株を用いて TCP 存在下での生育を観察したところ、TCP $0.5 \mu\text{g/mL}$ を含む RKE 液体培地 (Brix 3) でやや生育の遅れが見られた。したがって、メチル転移酵素活性低減株は、TCP が低濃度の時はメチル化が遅れ、生育が遅れる可能性が示唆された。TCA を生成しにくい麹菌を取得するため、この条件を利用し、麹菌に紫外線により変異導入し、 $0.5\sim 5 \mu\text{g/mL}$ の低濃度 TCP を含む RKE 培地で液体培養を行った。さらに、生育が遅れた 70 株を用いて TCP を添加した寒天培養と製麹試験を行い、親株より TCA 生成が低い麹菌株を $0.5 \mu\text{g/mL}$ 条件から 2 株、 $1 \mu\text{g/mL}$ 条件から 1 株選抜した。これらの変異株を用いて製造した米麹は、すべて通常の米麹と遜色ない酵素活性を有していた。また、最も TCA 生成量が少なかった $0.5 \mu\text{g/mL}$ のスクリーニングから得た変異株 (No. 0.5-6) について次世代シーケンスによるゲノム解析を行った結果、*omtT* 遺伝子の推定 ORF に 3 つのアミノ酸置換を伴う変異 (V42A, L180I, 及び E337D) があった。さらにそのプロモーター領域にも多数の変異があることがわかった。No. 0.5-6 株についてはこれらの変異により、*omtT* にコードされるメチル基転移酵素の発現量あるいは活性が低下し、TCA 生成が低下した可能性が推察された。

取得した変異株が清酒醸造に使用できる品種菌株であるかを評価するため、No. 0.5-6 株と RIB40 株の米麹を用いて小仕込み試験を行った。その結果、TCA 生産量は RIB40 株では 2.9ng/L で閾値以上を示し、No. 0.5-6 株は 0.77ng/L で閾値以下だった。つまり、製麹工程で TCP が残存していても TCA の生成は抑えられることが示唆され、カビ臭の発生リスクが抑えられることで、品質管理が容易になると推察された。

総括

本論文は、清酒中のオフフレーバーであるカビ臭の原因物質である TCA の生成を抑制した麹菌株の作出を目的として実験を行い、その結果をまとめたものである。第1章では、麹菌について TCP のメチル化に関与する酵素をコードする遺伝子の探索を行い、*omtT* 遺伝子を破壊した株は TCP から TCA 変換能が著しく低下し、*omtT* 遺伝子がカビ臭生成に強く関与することが明らかとなった。また、本酵素遺伝子を破壊しても醸造用有用酵素生産にはほとんど影響がなかったことから、カビ臭生成を抑制した麹菌の作出が可能であることが強く示唆された。第2章では、TCP が *A. oryzae* の成長抑制に及ぼす影響を調べ、RKE の液体培地で $1\sim 2 \mu\text{g/mL}$ の TCP を含んだ際に、著しく相対乾燥重量が低下する現象がみられたことから、TCP を含む液体培養で TCA を生成しにくい麹菌変異株の選抜が可能であることが判明した。第3章では、 $\Delta omtT$ 実験室株を用いて TCP を含んだ液体培養での生育特徴から設定した条件である、 $0.5 \mu\text{g/mL}$ の TCP を含んだ RKE 液体培地で生育の遅い菌株を選抜し、臭気確認及び製麹試験を行うことでカビ臭生成抑制株を 3 株取得した。さらに、最も TCA 生成量が少なかった菌株について清酒醸造試験を行ったところ、製成酒の TCA 量は閾値以下を示した。以上より、紫外線を照射した変異株から、TCP を添加した RKE 培地を使用することで TCA 生成を抑制できる麹菌株の作出が可能となった。