

## 論文審査の結果の要旨

氏名：遠藤（五島）路子

博士の専攻分野の名称：博士（理学）

論文題目：カビ臭低生産麹菌の育種に関する研究

審査委員：(主査) 澤田博司

(副査) 岩本政明

(副査) 垣田浩孝

日本酒の原料は米、米麴、および水であり、麴菌や酵母などが繁殖し発酵を促すことで造られる。清酒醸造の過程において、カビ臭が発生することがあり、このカビ臭は製品品質を著しく低下させ、特に吟醸酒などの高級酒で多発するため問題となっている。カビ臭とはカビなどの微生物が生産するカビを連想させる臭いであり、カビなどの微生物がもつ酵素により 2,4,6-トリクロロフェノール (TCP) がメチル化されることで生成される、2,4,6-トリクロロアニソール (TCA) がその原因物質である。TCP は有毒なクロロフェノールのオルト位に塩素が結合した有機塩化物で、木材の防カビ剤として使用されており、木材に付着した微生物が有毒な TCP の無毒化のために TCA へと変換していることが明らかとなっている。TCA の認知閾値は清酒で 1.7 ng/L と極めて低く、ごく微量でカビ臭を感じ、臭い移りもしやすく、製造場内でカビ臭が発生してしまうと、簡単に除去することができない。そのため、カビ臭を発生させないよう細心の注意を払って醸造されているが、酒造りに用いられる市販の麹菌には全て TCP に対するメチル化能がある。本論文は、このメチル化に関与する遺伝子に着目し、清酒中の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り、通章序論と総括を含めた以下の 5 章からなっている。

通章序論では、醸造に使用される麹菌 (*Aspergillus oryzae*)、麹菌の役割、醸造工程、食品や清酒におけるカビ臭の問題などを詳細に説明している。その上で、解決すべき問題点とその生物学的、醸造学的意義を明確にし、本研究の目的を示している。

第 1 章では、清酒醸造に使用しているすべての麹菌は TCP を TCA へと変換するメチル基転移酵素を持っていることが明らかになっていたが、その遺伝子は特定されていなかった。そこで、麹菌のゲノムデータベースを検索し、37 の TCA 生成に関連性のある推定上の *O*-メチルトランスフェラーゼ (*omtT*) 遺伝子を特定し、その全ての遺伝子の破壊株を作出し、TCA の生成を測定した。その結果、*omtT* 遺伝子を欠損させた遺伝子破壊株の中で TCA の生成が親株より 0.12 倍に抑制した 1 つの株を見出し、この株の *omtT* 遺伝子が TCP から 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を示した。また、*omtT* 遺伝子を破壊しても醸造に関与する有用酵素の活性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を提言している。

第 2 章では、TCP の *O*-メチル化能が低い麹菌株をスクリーニングするための条件を

検討するため、TCP 存在下での麹菌の生育特徴を調査した。その結果、麹菌を TCP 存在下で培養すると、TCP 濃度が高くなるほど TCP の毒性が強くなるため菌糸の生育や分生子の形成が遅れることを明らかにした。そして、麹エキス (RKE) の液体培養において、急激に菌糸の生育が抑制される TCP 濃度が存在することを見出した。この急激に TCP の毒性を受ける濃度範囲においては、麹菌は生育を止め、TCP から TCA への変換に時間を要しているため生育が遅くなっており、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を示した。

第3章では、*omtT* 遺伝子破壊株を用いて TCP 存在下での生育と育種の可能性について検討を行った。その結果、*omtT* 遺伝子破壊株のような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を示した。また、この条件を利用し、麹菌に対して紫外線により変異を導入し、低濃度 TCP を含む RKE 培地で液体培養を行い、親株より TCA 生成が低い麹菌株を3株選抜した。これらの変異株を用いて製造した米麹は、通常の米麹と遜色なく醸造に必要な酵素の活性を有していた。最も TCA 生成量が少なかった変異株 (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 ORF に3つのアミノ酸置換を伴う変異があり、さらにそのプロモーター領域にも多数の変異を見出した。No. 0.5-6 株は、これらの変異により、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を示した。更に、取得した変異株が清酒醸造に使用できる菌株であるかを評価するため、No. 0.5-6 株とその親株の米麹を用いて小仕込み試験を行った。その結果、No. 0.5-6 株では、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された。

総括では、1章から3章を詳細にまとめ、それらの結果から紫外線を照射して得られた変異株を、RKE 培地に TCP を添加した選抜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と育種について総合的に考察を行い、同時に残された問題と共に実用的な観点でも検討を行っている。

以上のように、本論文は、麹菌によるカビ臭の生成に関わる *omtT* 遺伝子を特定し、その破壊株ではカビ臭が極端に抑制されるが日本酒醸造に関与する有用酵素の活性には影響がないことを初めて示した。また、カビ臭を生成しない麹菌株の選抜法を開発し、実用化のために、遺伝子組換え技術ではなく、古くから行われている紫外線照射により得られた、カビ臭が極端に少ない変異麹菌株を選抜し、そこから *omtT* 遺伝子に変異した株の取得に成功した。更に、この変異株は、清酒醸造において遜色がないことも確認し、カビ臭低生産麹菌の育種の可能性も示しており、本論文は非常に高く評価できる。

よって本論文は、博士 (理学) の学位を授与されるに値するものと認められる。

以上

令和4年1月7日