

博士論文

カビ臭低生産麹菌の育種に関する研究

日本大学大学院総合基礎科学研究科

相関理化学専攻

五島路子

目次

【通章序論】	1
醸造に使用される麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i>	2
清酒醸造工程	3
米麴の役割	6
清酒の官能評価	6
食品におけるカビ臭問題	7
清酒におけるカビ臭問題	11
本論文の構成内容	12
第1章 カビ臭生成に関与する麹菌のメチル基転移酵素遺伝子の探索	13
【序論】	14
【材料と方法】	16
菌株と培地	16
分生子懸濁液の調整	16
データベースからの <i>O</i> -メチルトランスフェラーゼ遺伝子の抽出	16
遺伝子破壊用 DNA 断片の作製	17
形質転換	28
密閉系でのシャーレ製麴試験	31
開放系でのシャーレ製麴試験	31
米麴中の TCA 含量測定	31
米麴の各種酵素活性と菌体量の測定	32
【結果及び考察】	33
麹菌の <i>O</i> -メチルトランスフェラーゼ候補遺伝子の選抜	33
<i>O</i> -メチルトランスフェラーゼ候補遺伝子破壊株の TCA 生成能の評価	37
米麴の糖化酵素活性及び菌体量の測定	39
第2章 2,4,6-トリクロロフェノール (TCP) 存在下における麹菌の生育特性	41
【序論】	42
【材料と方法】	43

菌株と培地	43
分生子懸濁液の調整	43
TCP を含んだ液体培地での麴菌の培養 (菌体乾燥重量測定)	43
TCP を含んだ寒天培地での麴菌の培養	43
固体培養方法の検討 (三角フラスコを用いた製麴方法)	44
TCP を含んだ固体培養 (三角フラスコ製麴)での麴菌の培養	44
米麴中の酵素活性の測定	45
米麴中の菌体量の測定	45
米麴の TCA 含量の測定	45
α 米及び RKE 中のミネラル濃度の分析	45
【結果及び考察】	47
液体培地中の <i>A. oryzae</i> の菌糸成長に対する TCP の影響	47
寒天培地上の <i>A. oryzae</i> の菌糸成長及び分生子形成に対する TCP の影響	49
三角フラスコ製麴で行う培養容量の条件検討	53
三角フラスコ製麴で行う水分量と製麴時間の検討	55
三角フラスコ製麴での <i>A. oryzae</i> の菌糸成長に対する TCP の影響	58
第3章 カビ臭物質 TCA を生成しにくい麴菌変異株の作出	61
【序論】	62
【材料と方法】	64
菌株と培地	64
液体培地での菌体重量の測定	64
液体培地での菌糸塊面積の測定	64
寒天培地での培養	65
麴菌の紫外線照射による変異誘発株の作製及び生存率の測定	65
変異誘発株の濃縮	65
変異誘発株の寒天培地におけるカビ臭生成の確認	66
製麴試験	66
米麴の TCA 含量の測定	66
米麴の各種酵素活性の測定	66

清酒小仕込み試験	67
【結果及び考察】	68
<i>A. oryzae</i> の <i>omtT</i> 遺伝子破壊株の TCP 存在下における生育	68
<i>A. oryzae</i> の変異処理と TCP 感受性株の選抜（1次スクリーニング）	73
カビ臭を生成しない変異株の選抜（2次スクリーニング）	77
米麴において TCA を生成しにくい変異株の選抜（3次スクリーニング）	77
TCA 低生産麴菌の醸造特性	79
清酒小仕込み試験	79
総括	83
参考文献	86
謝辞	93

通章序論

醸造に使用される麹菌 *Aspergillus oryzae*

麹菌 *Aspergillus oryzae* は醤油、味噌、清酒、焼酎などの発酵食品や酵素生産、食品産業などの分野で使用される主要な糸状菌である。日本の伝統産業に欠かせない微生物であることから、麹菌は日本醸造学会が 2006 年に「国菌」と認定されている(一島, 2006, 2009)。この麹菌を食品に利用するためには穀物に生育させる必要がある。例えば、米に生育させた場合は米麹、麦の場合は麦麹と呼ばれる。醸造産業に使用される麹菌には *Aspergillus* 属に分類される菌株が使用されるが、その菌種は発酵食品の用途により異なる。清酒には *A. oryzae* が使用され、醤油及び味噌には *A. oryzae* と *Aspergillus sojae* が使用されている。焼酎や泡盛などでは黒麹菌の *Aspergillus luchuensis* やその白色変異株 *A. luchuensis mut. kawachii* が使用されている。同じ *Aspergillus* 属にはマイコトキシンやアフラトキシンなどのカビ毒を生産する有害種の *Aspergillus flavus* など含まれるが、醸造に利用される麹菌は、長い食経験から GRAS (Generally Recognized As Safe) 生物として認識されている。実際、近年の全ゲノム解析の結果から、麹菌はこれらカビ毒を生産する遺伝子クラスターを大規模に消失しており、カビ毒を生産しない安全な微生物であることが示されている (Matsushima *et al.*, 2001; Tominaga *et al.*, 2006; Yamada *et al.*, 2011)。

また、麹菌は“酵素の宝庫”とも言われており、Enzyme Nomenclature (Enzyme Nomenclature, (<https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>)) に記載される全ての酵素が含まれていると推測されている(村上, 1987)。麹菌が生産する酵素は、醸造食品にとって重要な役割を果たしている。清酒では、蒸米中のデンプンを分解する酵素であるアミラーゼの活性が強いものが好まれる。醤油では原料の大豆タンパク質を分解する酵素のプロテアーゼ活性が高く、アミラーゼ活性は比較的低い菌株が好まれる。味噌では、プロテアーゼ活性とアミラーゼ活性が共に高い麹菌株が好まれる。一方、焼酎ではクエン酸を大量に生産し、グルコアミラーゼやセルラーゼなどの酵素活性が高い麹菌株が好まれる。さらに、清酒醸造において麹菌は酵素生産だけではなく、麹菌とともに醸造に関与する酵母や乳酸菌の働きを助長する物質や香味成分の生産の場としても非常に重要な役割を果たしている。そのため、多くの醸造会社は種麹菌会社より市販されている“種もやし”という醸造産業用のスターターを使用している。種もやしの麹菌は、それぞれの醸造に適した酵素を十分に有している優れた菌株が選抜されており、一つの菌株種のための単菌と、複数の菌株種を混ぜ合わせた複菌(村上ら, 1963)がある。複菌は種麹メーカーで各菌株の増殖速度、増殖バランスを確かめた上で、最適な混合比で配合されている(柏木, 2020)。

清酒醸造工程

日本酒の原料は米、米麴、及び水であり、麴菌や酵母、乳酸菌などが繁殖し発酵を促すことで造られる。清酒の醸造は、きわめて複雑であるが、大きく次の工程を経る。①精米 ②洗米・蒸し ③製麴 ④酒母仕込み ⑤醪仕込み（初添、仲添、留添） ⑥発酵 ⑦上槽 ⑧滓引き・ろ過 ⑨火入れ ⑩貯蔵・出荷の10工程を経て清酒が造られる（Fig. 1）。

精米は、酒造好適米の山田錦などの玄米を削って白米にすることであり、玄米の表面に多いタンパク質、脂肪、無機物質、ビタミンなどを取り除くことによって、醪の急激な発酵をおさえ、清酒の香味、色の劣化を防ぐことで、味の良い清酒を得るために行われる（石川, 2009）。洗米は、米に付着した糠を除き蒸米の際のさばけを良くする、いわゆる粘り気のない米にするために行う（石川, 2009）。洗米後は浸漬し、米に水分を含ませてから甑で米を蒸す。蒸すことによって米の中のデンプンが α 型から β 型に変わり、糖化酵素の作用を約5,000倍受けやすくなる（石川, 2009）。製麴とは麴室という専用の部屋で米麴を作る作業である。米麴は、蒸米に麴菌を繁殖させたもので一般的に44~48時間かけて作られる。なお、清酒原料のうち約20%が米麴である。酒母は、清酒のスターターとなる酵母の純粋培養液のことで、米麴と蒸米、水及び酵母を混合し、米麴中の酵素によりデンプンを糖化しながら約10日間かけて酵母を繁殖させたものである。醪仕込みでは、酒母に蒸米・米麴・水を加えて酵母による発酵を行う。酒母で生育した酵母を慎重に増殖させるため、初添、仲添、留添と3回に分けて仕込む“三段仕込み”が行われる。発酵では、蒸米の糖化と酵母の増殖とアルコール発酵のバランスがとれた“平行複発酵”が行われ、この複雑な発酵管理がなされる清酒は、他の醸造酒よりも高い20%を超えるアルコールが生成される。醪の温度が高すぎると蒸米の糖化よりも酵母の増殖が盛んになるため辛口の味のあらぬ酒ができてしまう。そのため、酵母の至適温度よりも低い10~17°Cの低温で長期間発酵が行われる。発酵が進むと醪中の糖分が減少することで酵母は衰弱し、発酵が終了する。

上槽とは、醪を清酒（原酒）と酒粕に分ける、搾り作業のことをいう。上槽後の清酒はデンプン、繊維質、酵母などを含むため、うす濁っている。この濁りは滓といい、貯蔵中の香味の劣化の原因となるため、滓引き・ろ過の作業を行うことにより清澄な清酒が得られる。さらに清酒の品質を保つために、殺菌工程に当たる“火入れ”により清酒の殺菌と酵素の働きを停止させる。火入れ温度が低いとアルコール存在下でも生育する火落ち菌（乳酸菌）により、清酒の混濁や、香味の悪化を引き起こされる。また、酵母が残存した場合は、酵母が死滅した時の臭いや、古漬けの漬物のような劣化臭を有する（佐藤, 2007）。製成後

は、清酒の熟成を目的に一定期間貯蔵することがある。貯蔵中の清酒では、アミノ酸などがメイラード反応により褐色色素に変化し、ストレッカー分解によりアルデヒドが生成することで、清酒の色や香りが進みやすくなる。その一方で、呈味成分の変化は遅いため、清酒の貯蔵は比較的低温で長期間熟成して香、味、色のバランスをとることが望ましい。清酒には、大吟醸酒、吟醸酒、普通酒の名称区分があり、精米歩合や麹菌、酵母の種類、発酵温度や期間などを変えて仕込まれている。特に吟醸酒は、吟醸造り（吟味した醸造）と言われる、すべての工程に手間暇かけた管理が必要である。酒税法上の定義としては精米歩合により、特定名称が区分化されており、吟醸酒は 60%以下、大吟醸酒では 50%以下に精米した白米を使用する決まりがある。本来の半分以上削った米を低温でゆっくり発酵させ、酒粕の割合を高くして、特有の芳香である吟醸香を有するように醸造されている。

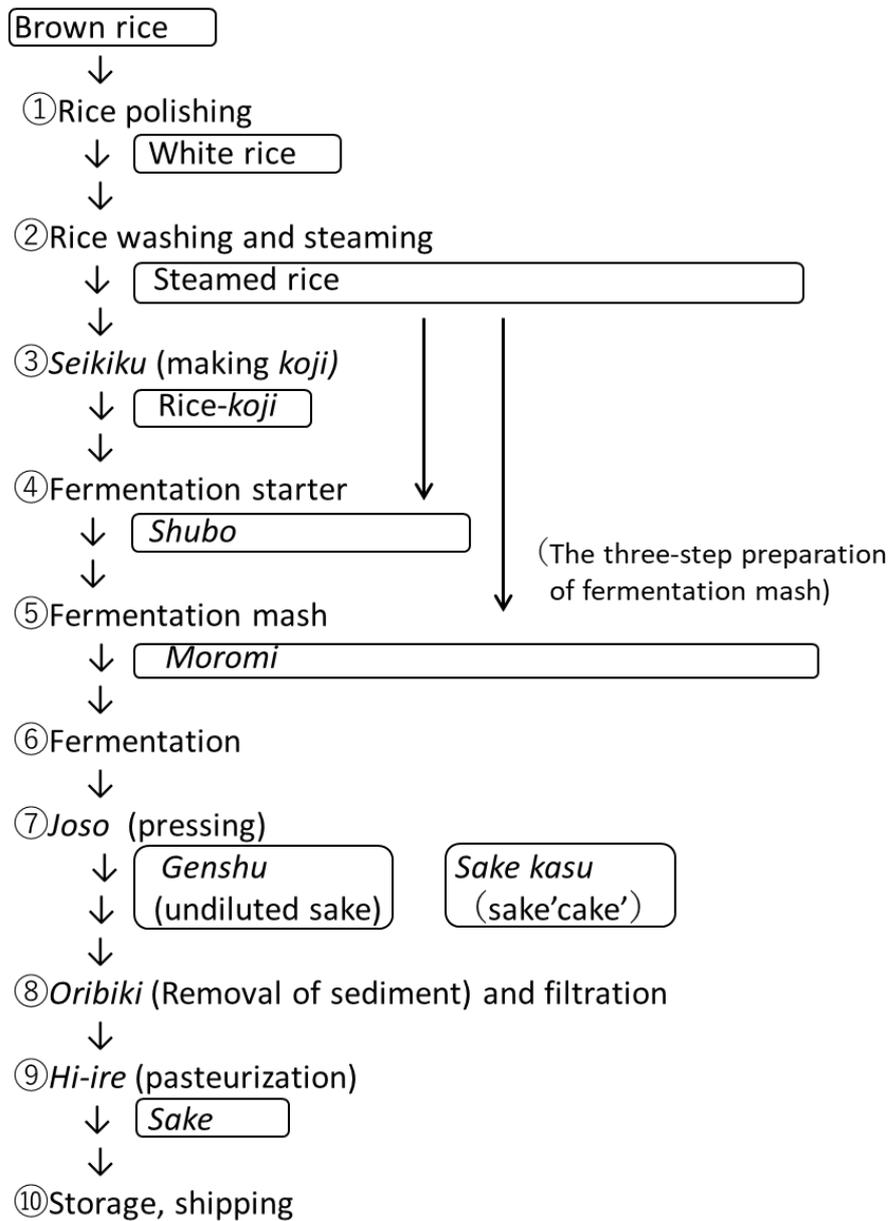


Fig. 1. Flowchart of Standard method for making sake.

The standard process for making sake is as follows. ①Rice polishing. ②Rice washing and steaming. ③ *Seikiku* (making *koji*). ④ Fermentation starter. ⑤ Fermentation mash. ⑥ Fermentation. ⑦ *Joso* (pressing). ⑧ *Oribiki* (Removal of sediment) and filtration. ⑨ *Hi-ire* (pasteurization) . ⑩ Storage and shipping.

米麴の役割

清酒製造における麴菌の主な役割は、蒸米の溶解・糖化を促す酵素を生産し、酵母に栄養を供給することで増殖・発酵を促すことである。麴菌により生産される主な酵素は、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ、及び酸性プロテアーゼである。 α -アミラーゼは、 α -1,4 グリコシド結合を加水分解することでデンプン中のアミロースやアミロペクチンをマルトース及びオリゴ糖に変換する酵素である。蒸米中のデンプンの液化にも関与しており、デンプンが溶け切らなければアルコールに変換されず粕として残存するため、製造コストに最も大きく影響を与える酵素である。グルコアミラーゼも蒸米中のデンプンの液化に関与しており、マルトースなどをグルコースまで分解する酵素である。清酒酵母は主にグルコースを消費するため、米麴を評価する上で両者の酵素活性は重要な指標になる。酸性カルボキシペプチダーゼはタンパク質やペプチドに作用し、カルボキシル末端のアミノ酸を切断する。酸性プロテアーゼは蒸米のタンパク質を溶解させ、種々のペプチドを生じる酵素である。平行複発酵を順調に進めるためには、各種酵素の適切な酵素力価を管理する必要がある。過剰に酵素を生産させた場合は、火入れの際にタンパクが変性して清酒を混濁させてしまう。そのため、麴菌の生育をコントロールすることは非常に大切であり、製麴時には麴菌の種付けする菌体量、蒸米の水分量、温度や湿度管理が慎重に行われている。

製麴作業は、一般的には温度と湿度が管理された木造の部屋の中で大型の木箱（縦 75cm, 横 150cm, 深さ 13cm など）を使用して、①^{ひきこみ}引込み ②^{とこもみ}床もみ ③^{きりかえし・もみ}切返し・盛り ④^{なか}仲仕事 ⑤^{しまい}仕舞仕事 ⑥^{つみかえ}積替え ⑦^{でこうじ}出麴の 7 工程を経て米麴がつくられる。麴菌は床もみの 32°C 程度の蒸米に散布され、約 23 時間後の盛りで米麴になり始める。この時、蒸米は 33°C 前後になり麴菌が生育し始め、いわゆる^{はげ}破精がみられる。30 時間後の仲仕事で 35°C 前後となり破精が 3 割となり、36 時間後の仕舞仕事では 38°C 前後となり破精は 7～8 割となる（石川, 2009）。麴菌の各種酵素の生産温度は異なり、酸性カルボキシペプチダーゼは 32.5～35°C の製麴前半に、 α -アミラーゼとグルコアミラーゼは 37.5°C の仕舞仕事頃に高生産される（石川, 2009）。清酒は米麴の各種酵素活性のバランスに影響されるので、目的とする清酒の品質に適した製麴条件を選定する必要がある。

清酒の官能評価

清酒に含まれる成分は約 500 種類といわれ（吉澤, 1995）、複雑な香りや味の要因となっ

ている。清酒の味や香りは清酒のフレーバーホイールで示された用語により表現される(宇都宮,2012)。清酒の「良い香り」あるいは「不快な香り(オフフレーバー)」は、各成分のバランスにより特徴づけられる。清酒における「良い香り」にはバナナやリンゴのようなフルーティーな香りがあげられる。代表的な化学物質は、バナナ様の香りを呈する酢酸イソアミル、青リンゴを連想させるカプロン酸エチルなどのエステル化合物であり、これらがバランスよく含まれることで吟醸香という清酒を象徴する香りになる。一方、オフフレーバーとしては酸化・劣化臭の日光臭や老香、移り香^{カビ}のカビ臭やゴム臭などがある。清酒中の香気成分は主に清酒酵母により生産されるが、原料や製造道具、あるいは貯蔵中に生成される香りもある。そのひとつである移り香は原材料が生産する匂いとは全く異なるため不快に感じる。特に、カビを連想させる香りはカビ臭といわれ、清酒の品質を著しく低下させてしまうので、非常に問題になっている臭いである。カビ臭の原因物質は2,4,6-トリクロロアニソール(以下TCA)であり、その認知閾値は、清酒で1.7 ng/L (ppt)であるため、ごく微量でカビ臭を感じてしまう(宇都宮ら,2004)。そのため、製造場内でカビ臭の発生が起これると、移り香として全体に影響を及ぼし、簡単に除去することは不可能なため、カビ臭の発生には細心の注意を払って醸造されている。

食品におけるカビ臭問題

カビ臭は清酒以外の食品でも問題となっている。1966年にEngelらが食品中のカビ臭の原因はTCAであると最初に報告して以来、食品(コーヒー(Spadone *et al.*, 1990)、レーズン(Aung *et al.*, 1996)、水道水(Bai *et al.*, 2017; Nyström *et al.*, 1992; Karlsson *et al.*, 1995)、ワイン(Buser *et al.*, 1982)、日本酒(Miki *et al.*, 2005; 池澤, 2000))や包装材料(Hill *et al.*, 1995; Tindale *et al.*, 1989)などにおいて、しばしば検出例が報告されている。

カビ臭の原因物質であるTCAは、2,4,6-トリクロロフェノール(以下TCP)を前駆物質としてカビなどの微生物がO-メチル化することで生成される(Fig. 2)。日本国内では、1977年よりTCPが木材などへの防カビ剤として使用され始めたことにより、1970年代より飲料や缶詰などの食品でカビ臭問題が顕在化した(西島, 2004)。TCA汚染の経路は、製品の流通過程で食品にTCAが移動することや、食品原料や容器包装がすでにTCA汚染していたことが原因であると明らかにされている(馬場ら, 1994; 但馬ら, 1994)。上記の通り、閾値の低いTCAは臭い移りしやすいため、梱包材にTCAが付着していた場合には、食品や容器包装、最終製品から物流段階に至るまでの広範囲にカビ臭被害が拡大する。

そのため、TCA の拡散防止は清酒醸造会社のみならず、多くの食品会社にとって重要な管理項目である。TCA の拡散防止対策として、包材ではポリエチレンテレフタレートやハイバリア・フィルムを使用することで TCA の移行を完全に防止し、物流ではパレット上にアルミシートを敷くこと、さらに TCA や TCP が付着していないプラスチックパレットを使用することが効果的であると報告されている（但馬, 2012）。

TCA の前駆物質である TCP は、*p*-クロロフェノールのオルト位に塩素が共有結合した物質で強いフェノール臭を放つ。また、クロロフェノール自体の毒性は強いが、塩素が付加されることで毒性は顕著に弱くなる（Karlsson *et al.*, 1995）。クロロフェノールは木材パルプの漂白プロセス中にリグニンが分解した中間生成物として生成することが明らかとなっている（Kringstad, 1984）。さらに、クロロフェノールは塩素処理により TCP が生成することも明らかにされている（小野寺, 1977）。つまり、木材の漂白プロセスでリグニンが分解されて、クロロフェノールが生成し、クロロフェノールは塩素処理により塩素化されて TCP が生成される。さらに、TCP は木材用防カビ剤としても使用されていたため、TCP が含まれたパルプ原料の木材を使用することで TCP が含まれた原紙や段ボールが製造されていた。そして、この原紙や段ボールに微生物が生育し、TCP を TCA へと変換することでカビ臭が発生していた。本来、TCP は防カビ剤だが、濃度が低ければ微生物により無毒化されるため TCA が生成される（Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2002）。また、ワインのコルクにおけるカビ臭発生については、防カビ剤として使用している TCP を、コルクに付着したカビが TCA へと変換することが明らかにされている（Maggi; 2008）。さらに、コルクの原料の木材のリグニンは次亜塩素酸で漂白する工程でクロロフェノール化され、殺菌不良のコルク栓にカビが付着することでも TCA に変換される（Vlachos *et al.*, 2008）。コルクに付着したカビが TCP を *O*-メチル化することで無害な TCA に変換したために生じたことが明らかにされている（Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2002）。

上述したような TCP を原因とする被害が報告されたことで現在では、日本木材保存協会が認定している薬剤に TCP に代わる防カビ剤が登録されている。現在使用されている防カビ剤は、有機ヨウ素系の IPBC（ブチルカルバミン酸ヨウ化プロピニル）、ベンゾチアゾール系の TCMTB（2-（チオシアノメチルチオ）ベンゾチアゾール）、そしてチオシアネート系の MBC（メチルベンズイミダゾールカルバメート）である（認定薬剤，認定規程等 | 公益社団法人日本木材保存協会, (<http://www.mokuzaihozon.org/info/yakuzai/>))。これらの薬剤を使用することで TCP が原因であるカビ臭報告は減少している。しかし、以前の

TCP を防カビ剤として使用していた木材で建てられた建造物や道具などには TCP が残存しているため、TCP によるカビ臭汚染が問題となる場合が考えられる。そのため、TCP を原因とするカビ臭発生を防ぐ必要がある。

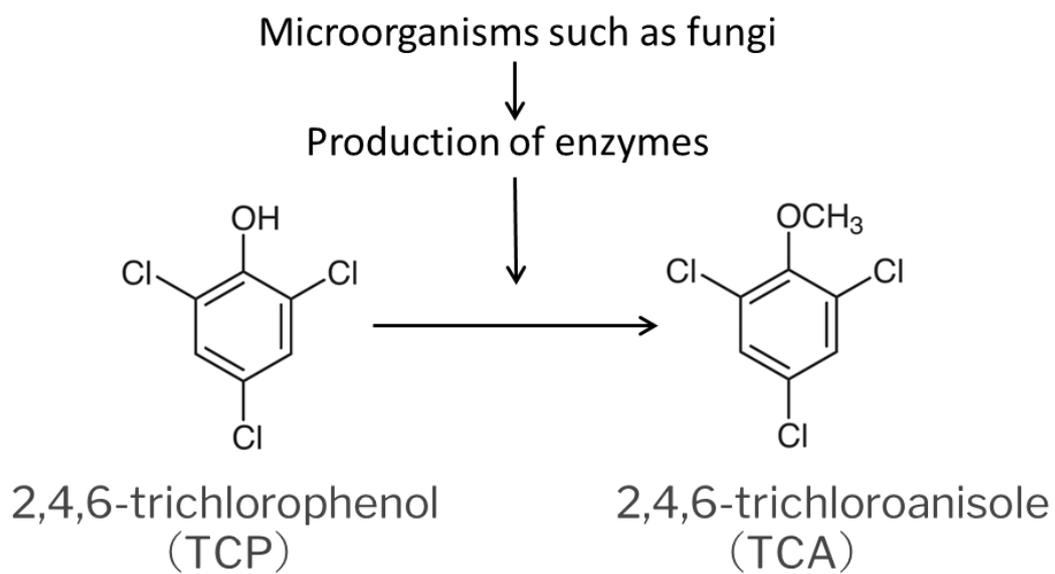


Fig. 2. 2,4,6-trichlorophenol (TCP) to 2,4,6-trichloroanisole (TCA) conversion path.

TCP is toxic and growth inhibitory to fungi. In the environment, chlorophenols are detoxified by fungi via *O*-methylation, producing chloroanisole.

清酒におけるカビ臭問題

清酒中において、カビ臭が問題とされたきっかけは、酒類総合研究所と日本酒造組合中央会が主催している全国新酒鑑評会でカビ臭の指摘が増えたことからである。全国新酒鑑評会とは、製造技術と酒質の現状を明らかにすることで、清酒の品質及び醸造技術の向上を目指した清酒の鑑評会で、特性がつかみやすい吟醸酒が出品されている。その審査用紙（宇都宮，2007）には、工程管理に問題のある欠点としてカビ臭が挙げられており、審査の中でも注意されている臭いのひとつである。平成14年度に醸造された清酒のうち、TCAの値が閾値以上だった清酒は全体の1.1%だったが、平成19年度では5.0%とカビ臭発生件数が増加した（鑑評会 | 独立行政法人酒類総合研究所，<https://www.nrib.go.jp/data/kan/shinshu/analysis.html>）。平成10年代後半からカビ臭指摘が増えたため、清酒醸造中のカビ臭発生経路の解明とカビ臭発生の対策案が提案された（Miki *et al.*, 2005）。その結果、平成20年代後半からは全国新酒鑑評会で、閾値以上のTCAの指摘は、全体の1.9%に再び減少した（鑑評会 | 独立行政法人酒類総合研究所，<https://www.nrib.go.jp/data/kan/shinshu/analysis.html>）。

清酒の中で最も香りが高く高級である大吟醸酒は、集中した醸造環境の中で約1か月間かけて慎重に製造される。塩素系漂白剤の不使用等でTCAの発生状況はかなり改善したが、大吟醸酒にとって、カビ臭汚染問題はいまだ最大の懸念である。できる限り気を張らずに作ることができれば、製造者の負担は軽減される。そのため、カビ臭汚染リスクを低減した醸造環境が醸造現場から望まれている。清酒中のカビ臭生成を抑えるために提案された対策が次の①～③である（Mikiら，2005.; 岩田ら，2007）。①清酒を保管する木製パレットにTCAが付着していたため、木製パレットをプラスチックに変更する。②木製道具の殺菌にTCPを生成しやすい塩素系殺菌剤を使用していたが、逆性せっけん（塩化ベンザルコニウム）を使用することでTCPの生成が抑えられたので、木製道具の殺菌には逆性せっけんを使用する。③製造に使用される木製道具をプラスチックやステンレスに変えることでTCAの生成が抑えられたので、木製道具の使用を控える。これら3つの対策を実施してもTCAが生成する場合には、清酒を活性炭でろ過してTCAの除去を行う。しかし、活性炭処理した場合は、大吟醸のフルーティーな香りや香味成分も同時に除去するため新たな問題となっている。上述した①～③の対策を行ってもまだTCAが除去できない大きな理由は、米麴に使用されている種麴に原因がある。現在使用されているすべての清酒麴菌には、TCPからTCAへ変換するO-メチル化能があることが明らかとなっている

(岩田ら, 2009)。清酒製造工程において麹菌は平行複発酵を行う上で必須な微生物のため、TCA を生成する能力を失った醸造用麹菌を使用することが望まれる。また、麹菌が生成した TCA は麹室だけでなく米麹運搬の際に醸造場内にも広く拡散するため、TCA 生成能を失った麹菌の使用は、麹室を含む製造場全体での TCA の混入リスクの低減も可能となる。そこで、本論文では清酒に感じられるカビ臭の TCA の生成抑制を目的として、製麹時に用いる麹菌のメチル化能が低下した菌株の作出を行った。

本論文の構成内容

上記の通り、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を使用すること以外に、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麹菌には全て TCP の O -メチル化能があることが報告されている (岩田, 2007)。そこで本論文では、清酒に感じられるカビ臭の発生リスクの低減を目的とし、メチル基転移酵素活性が低い麹菌株を作出することとした。麹菌における TCP の O -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、第 1 章では、その遺伝子の探索を行った。続いて、カビ臭生成発生リスクを低減した菌株のスクリーニングを行う薬剤として TCP を使用することを考えた。しかし、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。そこで、第 2 章では、麹菌の TCP 存在下での生育特性を調査した。第 3 章では、第 2 章で明らかにした TCP の特性を利用して麹菌株から醸造特性を保持したカビ臭低生産麹菌株の作出を試み、本方法で TCP 感受性を利用することで TCA 低生産麹菌の作出が可能であることを考察した。

第 1 章

カビ臭生成に関与する黴菌の メチル基転移酵素遺伝子の探索

【序論】

カビ臭は清酒の品質を著しく損なうため、その防止対策は最重要課題である。カビ臭の原因物質は主として2,4,6-トリクロロアニソール（以下 TCA）で、その認知閾値は清酒で1.7 ng/L (ppt)（宇都宮ら, 2004）、ワインでは2 ng/L (Soleas *et al.*, 2002)と極めて低い。TCA は、毒性の高い2,4,6-トリクロロフェノール（以下 TCP）の水酸基を *O*-メチル化することで生成される（Cserjesi and Johnson, 1972; Gee and Peel, 1974）。この前駆体となる TCP は、防虫・防カビ剤として使用されていたため、醸造器具の木材に付着したまま長く残留していることが多い。また、TCA は塩素酸系殺菌剤による木材中のリグニン分解産物が塩素化されることでも生成することが明らかにされている（西島, 2004）。ワインにおけるカビ臭発生は、コルク栓に生えるカビが TCP を *O*-メチル化（無毒化）して TCA をつくることが原因であることが報告され（Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2002）、黒カビとして知られる *Trichoderma longibrachiatum* から、関連酵素として、*S*-アデノシルメチオニン（SAM）をメチル基供与体とするクロロフェノール-*O*-メチルトランスフェラーゼが同定されている（Coque *et al.*, 2003）。一方、清酒醸造用の麹菌 *Aspergillus oryzae* においては、多くの *O*-メチル化酵素を持っていることが明らかにされている（Machida *et al.*, 2005）。清酒においては市販種麹を用いた試験で、清酒麹菌を含むすべての実用醸造用菌株に TCP のメチル化能があり、TCP が存在すると製麹工程中に TCA が発生することが確認されている（岩田ら, 2009）。しかし、TCP から TCA への変換に関与する酵素はいまだ特定されていない。

カビ臭発生防止対策として、醸造器具に TCP が含まれていない木製用具を使用すること、塩素酸系殺菌剤を使用しないこと等が提唱されている（Miki *et al.*, 2005）。提唱以降は実際にカビ臭発生件数が顕著に減少したことから、有効な対策方法であることが示されているものの、醸造設備や工程を新調する必要があり、醸造会社や蔵人への負担となる。また、根本的な TCA 生成の抑制には至らず、清酒醸造中のカビ臭発生リスクは依然として高いままである。従って、前述の対策に加えて、カビ臭発生リスクを低減させるため、カビ臭生成能がない麹菌株が醸造現場では望まれている。

製麹工程中の TCA 生成抑制は、前駆体 TCP への *O*-メチル化能がない麹菌株を育種することで達成できると推測できる。そこで、第1章では、麹菌における TCP の *O*-メチル化に関与する酵素の同定を目的として、その酵素をコードする遺伝子の探索を試みた。具体的には、麹菌 *A. oryzae* RIB40 ゲノムデータベース（CAoGD | 独立行政法人酒類総合研

究所, (<https://nribf21.nrib.go.jp/CAoGD/>) に登録されているメチル基転移酵素の遺伝子の情報を基にして, 候補となる遺伝子の破壊実験を順次行い, TCA 生産が低下した, つまり TCP の *O*-メチル化能が低下した遺伝子破壊菌株のスクリーニングを行った。

【材料と方法】

菌株と培地

麹菌は、全ゲノム解析が実施され公開されている代表菌株 *A. oryzae* RIB40 (National Research Institute of Brewing Stock Culture; Machida *et al.*, 2005) を用いた。また、遺伝子破壊株の作成には、アデニン要求性に関与する遺伝子 *adeA* (AO080527000383) を欠損した *A. oryzae* NSR- Δ ID2 (*niaD⁻ sC⁻ adeA⁻ Δ ligD*) (Maruyama and Kitamoto, 2008) を用いた。ゲノム DNA 抽出に用いる *A. oryzae* RIB40 株の培養には、2% グルコース、0.1% バクトトリプトン、0.5% 酵母エキス、0.1% NaNO₃、0.05% K₂HPO₄、0.05% MgSO₄·7H₂O、0.001% FeSO₄·7H₂O、pH6.0 の麹菌酵素生産培地を用いた。*A. oryzae* NSR- Δ ID2 株の前培養には麹菌酵素生産培地にアデニンを 0.05% 添加した前培養用麹菌酵素生産培地を使用した。製麹試験用の菌株培養には 2% 寒天麹エキス培地 (RKE) を使用した。RKE は、精米歩合 70% の米を原料とする乾燥麹 (I-70A, 徳島製麹, 徳島) 1 kg に 3 L の水道水を混合して調整した。この混合物を 60°C で 6 時間インキュベートした後、定性濾紙 No.2 (ADVANTEC, 東京) で濾過した。RKE の Brix 値を PAL-JIR Brix メーター (ATAGO, 東京) を用いて測定した。RKE の液体培地及び寒天培地は、RKE を水で希釈して Brix 値を適宜調整した。

分生子懸濁液の調整

直径 6 cm のシャーレの麹菌酵素生産寒天培地または RKE 寒天培地に *A. oryzae* RIB40 株を 30°C で 7 日間培養し、0.05% Tween 80 水溶液を 5 mL 添加して分生子を懸濁後に回収し、菌糸と分生子を分離するためミラクロスで濾過をした。濾液を 1430×g、10 分間の遠心分離後、沈殿した分生子を回収し、10 mL の 0.05% Tween 80 水溶液を加えよく攪拌して分生子懸濁液原液とした。一部の液を採取し滅菌水で 20 倍に希釈して、トーマ氏血球計算盤にて 50 区画の分生子を計測後、分生子懸濁液原液の分生子数を測定した。0.05% Tween80 で分生子懸濁液原液を希釈して、目的の分生子数の分生子懸濁液を調整した。*A. oryzae* NSR- Δ ID2 株ではアデニンを 0.05% 添加した麹菌酵素生産培地を用いて培養し、同様の操作を行い分生子懸濁液を調整した。

データベースからの O-メチルトランスフェラーゼ遺伝子の抽出

A. oryzae RIB40 ゲノムデータベース (CAoGD | 独立行政法人酒類総合研究所,

(<https://nribf21.nrib.go.jp/CAoGD/>) より、SAM 依存性メチルトランスフェラーゼあるいは *O*-メチルトランスフェラーゼをコードしていると推定されている遺伝子を抽出した。さらに、酒類総合研究所が提供する麴菌 EST (Expressed Sequence Tag) データベース (麴菌 EST データベース | 独立行政法人酒類総合研究所, (<http://nribf21.nrib.go.jp/EST2/index.html>)) に存在する米麴由来の遺伝子や米麴で高発現することが確認されている遺伝子(岩下ら, 2007)を優先し、順位付けをおこなった。

遺伝子破壊用 DNA 断片の作製

北本ら (2006)の方法に従い、遺伝子破壊株用 DNA 断片の作製を行った。以下に手順を記す。

ゲノム DNA 抽出用の麴菌酵素生産培地 50mL に *A. oryzae* RIB40 株の分生子を添加し、30°C で 24 時間振とう培養した。菌体を CALBIOCHEM 社製のミラクロスで回収し、滅菌水で洗浄後、菌体をプレス脱水した。80°C で冷却させた乳鉢に菌体を移し、液体窒素を注ぎ凍結させ、直ちに乳棒で粉碎した。粉碎した菌体は QIAGEN 社製の DNeasy Plant Maxi Kit を用いてゲノム DNA を抽出した。ゲノム抽出方法はキット付属の取扱説明書に従って行った。

得られたゲノム DNA を鋳型とし、Fusion PCR 法 (北本ら, 2006)で DNA 断片を作製した (Fig. 1-1)。破壊用 DNA 断片の増幅に使用した PCR プライマー A, B, C, D, A2, D2, *adeA*-F 及び *adeA*-R の配列を Table 1-1 に示した。先にプライマー A 及び D のプライマーを設計するため (Fig. 1-1, (1) ①), プライマー A はターゲット遺伝子の 700 bp 以上上流で隣の遺伝子を含まない 20 bp をデザインし、プライマー D はターゲット遺伝子の 700 bp 以上下流で隣の遺伝子を含まない 20 bp をデザインした。続いてプライマー B はターゲット遺伝子上流に位置しプライマー A に合うプライマー 20bp をデザインし、プライマー C はターゲット遺伝子下流に位置しプライマー D に合うプライマー 20 bp をデザインした (Fig. 1-1, (1) ①)。このとき、ターゲット遺伝子増幅の際の 5' 側プライマー B 及び 3' 側プライマー C に *adeA* 遺伝子の末端部分との相補配列 (26 bp) を付加した。選択マーカーである *adeA* の DNA 断片 (2003 bp) を増幅させるためには、*adeA* の上流側にプライマー *adeA*-F, 下流側に *adeA*-R を使用した (Fig. 1-1, (1) ①)。プライマー A2 及び D2 は 3 つの DNA 断片を Fusion PCR で増幅するために使用するプライマーで、プライマー A2 はターゲット遺伝子の 700 bp 以上上流でプライマー A よりも下流に位置する 20 bp を

デザインし、プライマーD2はターゲット遺伝子の700 bp以上下流でプライマーDよりも上流側に位置する20 bpをデザインした (Fig. 1-1, (2) ③)。PCRの最初のステップとして、ターゲット遺伝子の5' と3' 側に隣接する断片と *adeA* 遺伝子の3つのDNA断片の増幅を行った (Fig. 1-1, (1) ②)。ターゲット遺伝子の5' と3' 側に隣接する断片のPCR反応はTable 1-2に示した反応溶液を用いて、94°C 2分、(94°C 15秒、60°C 30秒、68°C 1.5分) ×27サイクル、68°C 2分の条件で行った (Fig. 1-1, (1) ②)。 *adeA* 遺伝子については、94°C 2分、(94°C 15秒、64°C 30秒、68°C 2分) ×27サイクル、68°C 2分の条件で行った (Fig. 1-1, (1) ②)。

続いて、これらの3つのDNA断片をプライマーA2とD2を使用してFusion PCRにより融合し、ターゲット遺伝子が *adeA* 遺伝子で置換された破壊用DNA断片を作製した (Fig. 1-1, (2) ④)。PCR用酵素には東洋紡績社製のKOD-Plus-Ver.2を使用した。Fusion PCRは反応溶液 (Table 1-3) を作製し、94°C 2分、(94°C 15秒、64°C 30秒、68°C 3分) ×30サイクル、68°C 2分の条件で反応を行った (Fig. 1-1, (2) ④)。最後に、QIAGEN社製のQIAquick PCR Purification Kitを用いてFusion PCR産物の精製と濃縮 (濃度0.2~2 µg/µL) を行った。精製と濃縮はキット付属の取扱説明書に従った。

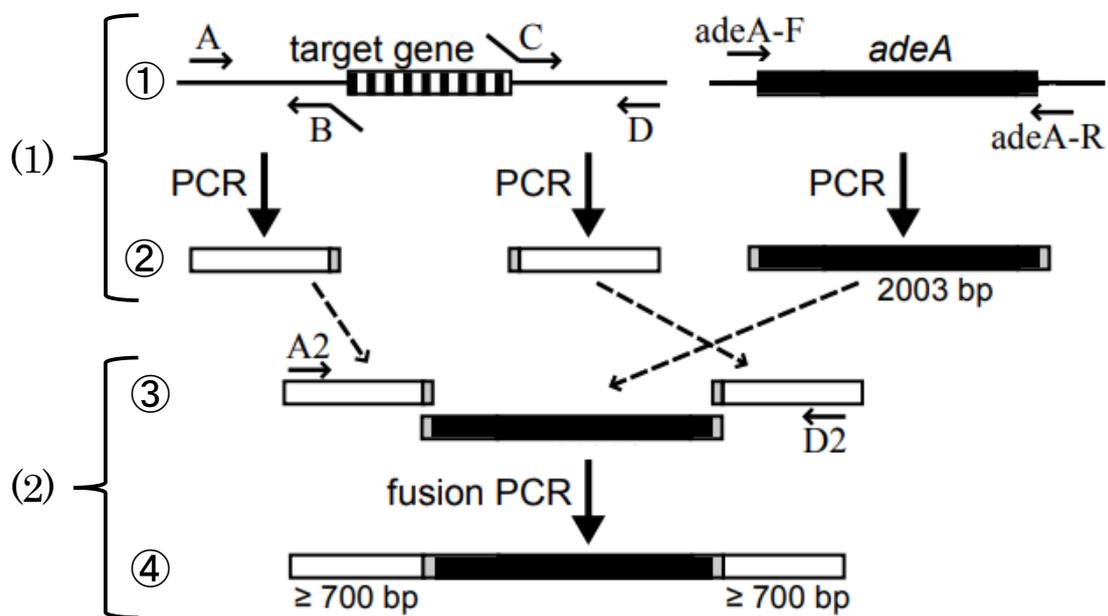


Fig. 1-1. Outline of fusion PCR amplifying DNA fragments used for gene disruption.

(1) Three primary PCR. ① A, B, C, D, *adeA-F* and *adeA-R* indicate the positions of the primers against a target gene and a selectable marker gene (*adeA*). ② Short elongated boxes show the fragments of after the three primary PCR. (2) Fusion PCR for gene disruption. ③ A2 and D2 indicate the positions of the primers for fusion PCR. ④ A elongated box shows gene disruption construct.

Table 1-1. PCR primers.

Primer name	Sequence
<i>adeA</i> -F	5'- CCGTCATGTCCAGGAAGATAGGTCAG-3'
<i>adeA</i> -R	5'- CTGCGCAACAGCATAACGAGTCCACAG-3'
AO080501000038	A 5'- ATCGTGGACTTCCATCTCAAG-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGCGTGGTTCTTTCCGTAGAGG</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGAAAGATGTCTAGCAACACCA</u> -3'
	D 5'- CTACCAGACCATTGACGAAG-3'
	A2 5'- CGTCTGAATGGCGATTCTGTG-3'
	D2 5'- CGGATTTGCAGTTGAGGTGT-3'
AO080501000047	A 5'- GATACAACTCGCTCAAACCC-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGTGGCCTCTTGAGTTACTTCC</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGACTAAGGAGGCTTGTTGA</u> -3'
	D 5'- GCAAGTGAAGAGCATGGTAG-3'
	A2 5'- GACGAAAGGGGATAACAACC-3'
	D2 5'- ATGAACCCCTAAATTACGCA-3'
AO080501000148	A 5'- TTCAAACGAATCTGTGGAGT-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGGCCGTGATTTTCTTAAGTGG</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGTTTGCTATGAGAGCTTGAC</u> -3'
	D 5'- AAGACCCTGAAATCGAGTTAG-3'
	A2 5'- CGCCTCCATTACCCACGATG-3'
	D2 5'- CCAAGCTGCGTATGTTGCCT-3'
AO080503000109	A 5'- GGACCATACATGATAGACGA-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGCGGGTCCGGATATTCACAAG</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGGATGGAAATCGTTCTAGGTG</u> -3'
	D 5'- AACCCAACATCTTACAAGAG-3'
	A2 5'- ATCCCTGGAAGTTTACTACTC-3'
	D2 5'- CATAACCGATTCTGCCTTTG-3'
AO080506000162	A 5'- CAAGGAGACACGGATATGGG-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGAGTGGCTCTTTGTAGCCATT</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGACCCGATTCATCACTAAGG</u> -3'
	D 5'- CTCACCAATGAGCATTGCAG-3'
	A2 5'- TGCCAGTCATGTGCTTAGGG-3'
	D2 5'- AACTCCAACCGTCGTAAGGG-3'
AO080508000176	A 5'- TCTCTACAACACCTCTGTC-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGGCAATAAGGACGTCGCTTAC</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGTACGCCATCAAGTAGATCTC</u> -3'
	D 5'- AGTCAACATGGCTTCTACTC-3'
	A2 5'- CATCCAGGAGCTAGGGTAAG-3'
	D2 5'- GGTCCGAGCTAAATTAGCAG-3'
AO080508000411	A 5'- AACTATGTCCTGCCTTGACC-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGGATGTGCTCCTCTTCGATCT</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGTCTGGCATAAGGCTCTTACC</u> -3'
	D 5'- AGTGACTGGAAGCAAGCTAC-3'
	A2 5'- CTTGACCTCCTACAACCCAA-3'
	D2 5'- GTTCTGGTCTTTGCTGGAGT-3'

Table 1-1. PCR primers (continued).

Primer name	Sequence
AO080508000515	A 5'- TCACAGACCAGTCCCTACAC-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGCCCACAGACTTCTGACGTTTC-3'</u>
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGAGGTAGACCCTGGTCATCCT-3'</u>
	D 5'- CCCACTGGTACCAAGGCTAA-3'
	A2 5'- CGTGACAACCTGGGAGGTACA-3'
	D2 5'- GGTGGCATTCTGTCTGCTCT-3'
AO080509000249	A 5'- GATTCACTCGCCAAACCTAC-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGCTGAAAACCATCTTTGCCTT-3'</u>
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGAAAGAAAAGCAAGGCCGTTGA-3'</u>
	D 5'- ACTGGACCATCTGAACCAAG-3'
	A2 5'- TTAGGTGCATAGCTTACAGG-3'
	D2 5'- AGCTTTTCTCAACAAGGACA-3'
AO080511000342	A 5'- TCACGGACAGAAATATCAGG-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGTCGGTTTCTGTGATCGTAAG-3'</u>
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAG GTAGCATTGCAAACAACCAG-3'</u>
	D 5'- CCTGGATTCTGTTAAGTCGT-3'
	A2 5'- GGCACATAGCAGTTACGTGA-3'
	D2 5'- TCGGCACTAATCAGTAGGGT-3'
AO080515000103	A 5'- TTCTCTCATTGGCCCGTTGT-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGATGTGGCGGCTTCAAGGCTAA-3'</u>
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGCCATTTGCTCGAAGCTCCAA-3'</u>
	D 5'- GTCTCTGGAAGGTCCGTTCT-3'
	A2 5'- ACCCTTGTAGGTGCTGTCCT-3'
	D2 5'- CGCCCATTGCTGATTTCCGGT-3'
AO080517000057	A 5'- GGTCAACGACATCAGCAAAC-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGACGTCAGGACAGCAGATGGA-3'</u>
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGATAGCCATGTAATGCACACA-3'</u>
	D 5'- TCCAAGGAGTCCGAGGTACA-3'
	A2 5'- GCCCTAGACCGTAGTGGGTT-3'
	D2 5'- CGCCCCGCTAAAGTACGTTTC-3'
AO080521000231	A 5'- TGATTTCGAAAGATGAAACCC-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGCTGTCATGGATAAGGTTTCAG-3'</u>
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGTTTAAACCTCTCCAGGTATG-3'</u>
	D 5'- GTCAAAAAGTGCAATACGAGA-3'
	A2 5'- GCTGGTCAAGATGTTGGTTC-3'
	D2 5'- GATGACTGGGTTCTGCTACT-3'
AO080521000293	A 5'- GCACCACATGATCAGGTGAA-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGCACATGTTTCGCAAGGCATAC-3'</u>
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGGACTGGAAACGGTCTCTTGG-3'</u>
	D 5'- TTTTGAATGACGGTGCAGA-3'
	A2 5'- GTGTGGTGCCAGCTTTGAGG-3'
	D2 5'- GGTATCCACGTCGGCGTACA-3'

Table 1-1. PCR primers (continued).

Primer name	Sequence
AO080523000140	A 5'- CTGAGTGAGGGAAAATAGGG-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGGCCGATATCGAGAATCTTG</u> G-3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGTTATGCTTCGATGCCTCAAG</u> -3'
	D 5'- AAGATCCGCAAAGTAGGAC-3'
	A2 5'- CTCCTTCCAGTACGGCCTGG-3'
	D2 5'- ATCACATTGTCCTCCTATC-3'
AO080523000271	A 5'- GATGAGAACAGACCAACGAC-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGCAAACAGCAACAAGATCGAC</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGTTTCAATAGCCGCTGGTTT</u> G-3'
	D 5'- ACCTTGCATAAGACCACTGA-3'
	A2 5'- AAAGAGGGACGTAACATTGG-3'
	D2 5'- GCTTGCATCGCTTACTAGTC-3'
AO080523000826	A 5'- GCCTTGGTTTTAAGCATGAG-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGTTGAAGCTAGAGAATGCAGA</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGTTGCTTGAAGTGTTGATCTG</u> -3'
	D 5'- GAACAAAAGTCAGTTGTCGT-3'
	A2 5'- CACCGTAAGTATCGACAGAG-3'
	D2 5'- ATGACTCTTCAGCTAACCC-3'
AO080525000026	A 5'- GCGCTAAGGAAGTATCGTCT-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGGAATTCTCCCCTCAATCCTG</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGCTTTGATGTCTGTTGTATCC</u> -3'
	D 5'- GCATTCATTGCAAATCTGTC-3'
	A2 5'- TTTCTGGCGCTTCTTCCGT-3'
	D2 5'- TGGCGCAAATAGCGGATCCT-3'
AO080527000009	A 5'- CTATCCTTCAGTTGCTTCGT-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGACTCAGTCTGATGTAGACCT</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGTTTCGCATTCTACACTAGCA</u> -3'
	D 5'- CCTGTGAGATCAACTAACCC-3'
	A2 5'- CCAGCGTGTGAAAACCGAA-3'
	D2 5'- GCGCTGCTCTTTCAGAGTCA-3'
AO080530000067	A 5'- ATAAGGAAGCGTCTGGATAG-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGGAAAGACTACAGATAGGTC</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGCGAACAGAGAAGCAATGGGT</u> -3'
	D 5'- CGATCCACAGTTTAAAGAGG-3'
	A2 5'- ATGACCCTCTAGGTTGGAGT-3'
	D2 5'- GGGAGAAGTGGTCACACAG-3'
AO080530000071	A 5'- TCCTTGCAACTAATATCGCT-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGGCGAATTTTGGTAAGTTCGT</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGATGTATTCATCTGGCTCACT</u> -3'
	D 5'- TTCTGTGAACAGACTAGACC-3'
	A2 5'- ACGCAGAGGATCTTTGTGTC-3'
	D2 5'- CAGACCAGCCACATACCTTC-3'

Table 1-1. PCR primers (continued).

Primer name	Sequence
AO080530000086	A 5'- CCTTATTTAGCCAAACAGAG-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGATTATCCGATGGTAGTGAAG</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGGAGATTCCAAAGCCCGATAG</u> -3'
	D 5'- TGCTATGTCATACAGTAACC-3'
	A2 5'- AGAGCGGGATATGTCTACAC-3'
	D2 5'- TCCTCTATTCACAAGGATGA-3'
AO080531000003	A 5'- AAGCTACAAATGCGATACCC-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGTGGCCTCAATTGTGACTGTG</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGTCTCAGGATCAAGAGACACA</u> -3'
	D 5'- TGACCCATATGTAGGACCAA-3'
	A2 5'- GAACGCCGCGGAATCACTAC-3'
	D2 5'- GCGAGGAATCCCCAAGCAC-3'
AO080531000021	A 5'- GGAGAAAGTCAGACGCTGTT-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGGATAGAGGCGGCTTCGAGTT</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGTTTGGGTTGCTGCTAATTTTCGTC</u> -3'
	D 5'- ATGACGAGTGGAGAGCTAGT-3'
	A2 5'- GTCACCTCATATGGCCATGAC-3'
	D2 5'- GAGGGATAATGGAGGACAAC-3'
AO080532000547	A 5'- GAAATCTTCCACGATACCC-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGTGGTCTTTTATGACGCTGAA</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGTATGGCACACTATTGCCTTT</u> -3'
	D 5'- TGATCCGGTATTTGGCTATG-3'
	A2 5'- AAACGCCCATGACACGCTAA-3'
	D2 5'- GCCGTGATCAAGGAAACGCT-3'
AO080538000120	A 5'- CTTAATCTGTCCCCACCTAC-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGTTTCCGGTAAATTGGACT</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGCTAGACACAAACATTAGGCA</u> -3'
	D 5'- CTATAGCGATGGAAGAAGGA-3'
	A2 5'- TCGACATGTATTTGAGACAG-3'
	D2 5'- TACTGTATACACAGGCATGA-3'
AO080538000120	A 5'- ATCTTAAGTGGGGACTAACC-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGTCCGTGGATTTGATATCCTG</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGCAACCAAATCAAACACCATC</u> -3'
	D 5'- GGCAAATTTCCATTATCGTC-3'
	A2 5'- GGACATACGTCAATGGTGAA-3'
	D2 5'- GTTCGTAACCTATCCGAAGT-3'
AO080541000381	A 5'- ACTCACTTTATCTCTTGCGA-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGTGTGACAGAGTCAAGTTAGG</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGTGCCATAATCATAGAAGAGG</u> -3'
	D 5'- CTGATGCTTAACTCAACAGG-3'
	A2 5'- GAAGAGAGGTCATCGAGACA-3'
	D2 5'- TGTAGGGAGAGAAGTGAGAC-3'

Table 1-1. PCR primers (continued).

Primer name	Sequence
AO080542000045	A 5'- ATTA ACTCGG ACCAGTCTGT-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGTTGCA</u> ATTACTGTGGCAGTT-3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGT</u> TACTACTCCATCTTATGCC-3'
	D 5'- ATCATTCGTTGGAGACTCTG-3'
	A2 5'- CGACTGTTTGACCTACGCTT-3'
	D2 5'- ACCCGAAATGCAACTACCAC-3'
AO080546000376	A 5'- GTATGAATGCACGTTAACCC-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGGACAGGGAGAA</u> GAAGAGAC-3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGATAGT</u> CGACCCACTACACTCT-3'
	D 5'- TCTTCAGAAATCAGGAACCA-3'
	A2 5'- GAAGGATCGAAAATTACGTC-3'
	D2 5'- GACTAGTGTAACCATGAGTG-3'
AO080549000266	A 5'- GAACTCTATGACAAACCATC-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGGAAGAACA</u> ATACCACAGACA-3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGAC</u> CCCTATTACTTTGACAACC-3'
	D 5'- TTTACAGATGTACGCTACTC-3'
	A2 5'- GCAATTGCCCTCTCCCTAGA-3'
	D2 5'- CACCGAAACTAAGCCCTTAC-3'
AO080555000091	A 5'- TCCTGCAAGTAGATACGTGA-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGTCGTGT</u> ACATTGTATACGCT-3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGTAGG</u> CGGAATATCTGTGTCT-3'
	D 5'- GCTGGAGATTGTTTCGGATT-3'
	A2 5'- CGACGGACACAACACCATAC-3'
	D2 5'- GCAGGATACGACGATGGCAA-3'
AO080568000164	A 5'- AGGGTGATAGAGCAGAAGTG-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGGAATTG</u> CTTCCAGGTCCTAGT-3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGT</u> CAGGTGCGTGGATGCTAAC-3'
	D 5'- TTCGCCAAATTGAGATTCCC-3'
	A2 5'- GAAACTCTCCATCCACGACA-3'
	D2 5'- GAGAATCGTACGGTGTTCCTCA-3'
AO080570000109	A 5'- AGAAGGCATTATCGGCTACA-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGGGATT</u> ACTCACCAGACGAA-3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGTT</u> CCTATCCAAAGGTGCTCT-3'
	D 5'- TGGTCACATTCCAAGCAATC-3'
	A2 5'- TGGCTTCATCTTCTTTGCGA-3'
	D2 5'- TTTGGACACGGTGTGAGTG-3'
AO080550000061	A 5'- ACTGGTCGCTGACACCTAGA-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGGGTCGT</u> GGTCTTTGCACAAG-3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGT</u> CGCAGTGGGATGCCATCCT-3'
	D 5'- GGAGCGAGATGGACTGGAAC-3'
	A2 5'- TGCTCCCTATTTGGAAGCAC-3'
	D2 5'- CAGCGTCCATATCCAGTCAG-3'

Table 1-1. PCR primers (continued).

Primer name	Sequence
AO08056000035	A 5'- CGGTATCGACATTGTTTGGG-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGTCGTGTATTACTCGGACGTT</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGTTTCCACTGTGATTGCAAGT</u> -3'
	D 5'- TTGTCACCTCTGATACGGTT-3'
	A2 5'- TCCATTCACGGGATATCGAG-3'
	D2 5'- AGATATGCACGGTCCGTATG-3'
AO080554000312	A 5'- CACCTGCGAAGTGTCTTGTG-3'
	B 5'- <u>CTGACCTATCTTCCTGGACATGACGGAAATACCCCAGGCACCAAAG</u> -3'
	C 5'- <u>CTGTGGACTCGTATGCTGTTGCGCAGAGTACATATGCTGCCTCAAG</u> -3'
	D 5'- ACCTGACCCGACTTCAATCC-3'
	A2 5'- GATACTGGCGAGGAAGTGAG-3'
	D2 5'- TAGCAAATCTCGCGAGTACC-3'

Table 1-2. PCR reaction solution for 5' side fragment, 3' side fragment and *adeA* fragment.

Components	Volume
10× PCR buffer for KOD-plus	2.5 μL
2mM dNTPs	2.5 μL
25mM MgSO ₄	1.5 μL
Primer (10 μM each)	0.75 μL × 2
<i>A. oryzae</i> RIB40 genomic DNA (10 μg/μL)	0.5 μL
DMSO	1 μL
Water	15 μL
KOD-plus	0.5 μL
Total	25 μL

Table 1-3. Fusion PCR gene disruption fragment.

Components	Volume
10× PCR buffer for KOD-plus	5 µL
2mM dNTPs	5 µL
25mM MgSO ₄	3 µL
Primer A2 (10 µM)	1.5 µL
Primer D2 (10 µM)	1.5 µL
Template DNA (5' side fragmentt)	1 µL
Template DNA (3' side fragment)	1 µL
Template DNA (<i>adeA</i> fragment)	1 µL
DMSO	2 µL
Water	30 µL
KOD-plus	1 µL
Total	52 µL

形質転換

北本ら（2006）が報告した方法に従い、作製した DNA 断片を *A. oryzae* NSR- Δ ID2 株にプロトプラスト法で導入した。以下に簡単な手順を記す。

プロトプラストの調整のために、麴菌酵素生産培地 200 mL に *A. oryzae* NSR- Δ ID2 株の分生子約 1×10^8 個を接種し、30°C、105 rpm で 24 時間振とう培養を行った。培養液を CALBIOCHEM 社製のミラクロスで濾過して菌体を回収し、20 mL のプロトプラスト化溶液（0.5% Yatalase（タカラバイオ社製、滋賀）、0.8 M NaCl、10 mM リン酸緩衝液（pH 6.0））が入った遠沈管に移し、30°C、80 rpm で 3 時間振とうした。その後、ミラクロスとガラスフィルター（3G1, AGC TECHNO GLASS (IWAKI), 東京）で濾過して菌体残渣を除去し、濾液を回収した。濾液を 4°C、1430 \times g で 5 分間遠心分離し、沈殿のプロトプラストに溶液 1（0.8 M NaCl、10 mM CaCl₂、10 mM Tris-HCl（pH 8.0））を添加してプロトプラストが 2.4×10^8 個/mL になるよう懸濁した。

DNA 断片の導入には、最初にプロトプラスト懸濁液 50 μ L に溶液 2（40% ポリエチレングリコール 4000、50 mM CaCl₂、10 mM Tris-HCl（pH 8.0））12.5 μ L と破壊用 DNA 断片 5 μ L を加え、ゆるやかに混合し、氷上で 30 分間静置した。対照として、*adeA* 遺伝子（*adeA*-F と *adeA*-R の PCR 産物、Fig. 1-1, (1) ②）を DNA 断片として添加したもの、及び DNA 断片を添加しないものも同様に調整した。次に、溶液 2 を 500 μ L 加え、ゆるやかに混合し、室温で 15 分間静置した。最後に、溶液 1 を 1 mL 加え、ゆるやかに混合した。この一部を 2% 選択寒天培地（2% グルコース、0.3% L-グルタミン酸 3 g、0.05% KCl、4.675% NaCl、0.05% MgSO₄ · 7H₂O、0.002% FeSO₄ · 7H₂O、0.15% L-メチオニン、2% 寒天（pH 5.5））の上に接種した後、2% 選択寒天培地と同じ組成の 0.7% 軟寒天選択培地 5~10 mL を加えて重層し、30°C で 1 週間培養した。コロニーが現れたら 0.05% の NaCl を含んだ 2% 寒天選択培地に数回植えつぎ、形質を安定させた。

遺伝子破壊の確認のために、寒天培地上の形質転換株を回収し、50 μ L の Buffer（100mM Tris-HCl（pH9.5）、1M KCl、10mM EDTA）に入れた。ボルテックスミキサーで 3 分間懸濁し、95°C で 10 分間熱処理し、再びボルテックスミキサーで 3 分間懸濁した。懸濁液を 2291 \times g で 2 分間遠心分離し、上清を鋳型 DNA とした。東洋紡績社製の KOD-FX を用いて取扱説明書に従ってダイレクト PCR を行った。PCR プライマーはそれぞれの遺伝子破壊株について、A2 と D2、*adeA*-F と D、及び A と *adeA*-R（Table 1-1, 4）の 3 つの組み合わせを用いた。PCR は 94°C 3 分、（98°C 10 秒、60°C 30 秒、68°C 4 分） \times 30

サイクル, 68°C 2分の条件で行った。

Table 1-4. PCR reaction solution.

Components	Volume
2 × PCR buffer for KOD FX	12.5 μL
2mM dNTPs	5 μL
Primer (10 μM each)	0.75μL × 2
Template DNA	1 μL
Water	4.5 μL
KOD FX	0.5 μL
Total	25 μL

密閉系でのシャーレ製麴試験

実験室スケールの製麴試験は、既報に従い（岩田ら, 2009）, 以下の通り実施した。直径 9 cm のガラスシャーレに徳島製麴社製の α 米（精米歩合 70%）(AA-70, 徳島製麴, 徳島) 15 g をはかりとり, 95°C で 2 時間乾熱滅菌後放冷し, TCP (10 ng/mL) を含有した 0.05% Tween 80 水溶液を 7.5 mL 添加し, 分生子を α 米 1 g 当たり約 1×10^6 個接種した。これを恒温恒湿器 (THE101FA, アドバンテック東洋, 東京) に入れ, 温度 35°C, 湿度 80% で 44 時間製麴を行った (岩田ら, 2009; 岡崎ら, 1978)。なお, シャーレはビニールテープで密封して TCP と TCA の飛散を防ぎ, 18, 23, 27 時間目に蓋を開け, 酸素の供給と攪拌を行った。

開放系でのシャーレ製麴試験

直径 15 cm のガラスシャーレに α 米 100 g をはかりとり, 95°C で 2 時間乾熱滅菌後放冷し, TCP (10 ng/mL) を含有した 0.05% Tween 80 水溶液を 43.3 mL 添加し, 分生子を α 米 1 g 当たり約 1×10^6 個接種した。これを恒温恒湿器に入れ, 48 時間製麴を行った (岡崎ら, 1978)。恒温恒湿器は開始から 24 時間は温度 32°C, 湿度 95%, 24~30 時間は 34°C, 95%, 30~35 時間は 38°C, 90%, 35~38 時間は 42°C, 85%, 38 時間以降は 42°C, 80% に設定した。設定変更時 (24, 30, 35, 38 時間目) にはシャーレの蓋を開け, 酸素の供給と攪拌を行った。なお, シャーレは製麴開始から 24 時間はガラスの蓋をし, 24~35 時間はアドバンテック社製の定性濾紙 No.2 (直径 285 mm) を被せた上にガラスの蓋をし, 35 時間以降はろ紙のみで蓋をした。

米麴中の TCA 含量測定

TCA の抽出は以下の通り実施した。米麴 1 g をバイアルに採り, 50% エタノール水溶液を 9 mL 添加した後, 4°C で 24 時間静置し, 1430 \times g, 15 分間遠心分離した。TCA 量の測定は SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction) 法 (Ochiai *et al.*, 2001; Hayasaka *et al.*, 2003) で行った。すなわち, TCA 抽出液 2 mL に純水 8 mL と 2 g の NaCl を添加し, ポリジメチルシロキサンをコーティングした攪拌子 (Twister, GERSTEL, DE) に TCA を吸着させるため 30°C, 800 rpm, 60 分間攪拌した。Twister に吸着した TCA は既報 (岩田ら, 2009) に示す条件で Gerstel 社製 TDS (加熱脱着) システム付きガスクロマトグラフ質量分析装置 (5973, Agilent, USA) を用いて測定した。定量は 10% アルコール水溶液を用いて 2 ng/L

及び5 ng/L の TCA 標準溶液を調整し検量線を作成して行った。測定は麴 1 g 当たりの含量を算出し、2～3 回の試行から平均値で結果は示した。

米麴の各種酵素活性と菌体量の測定

米麴からの酵素の抽出は、酒類総合研究所標準分析法に記載されている酵素液の調整 111-5-2 (固体こうじ|酒類総合研究所標準分析法 | 独立行政法人酒類総合研究所, (<https://www.nrib.go.jp/bun/pdf/bun/nb111.pdf>)) に従って麴の酵素液を調整した。酵素活性測定は、キッコーマンバイオケミファ社製の α -アミラーゼ測定キット、糖化力 (グルコアミラーゼ活性と α -グルコシダーゼ活性を合わせたもの) 測定キット、及び酸性カルボキシペプチダーゼ測定キットを使用してそれぞれを測定した。また、酸性プロテアーゼは酒類総合研究所標準分析法の酸性プロテアーゼ 111-10 (固体こうじ|酒類総合研究所標準分析法 | 独立行政法人酒類総合研究所, (<https://www.nrib.go.jp/bun/pdf/bun/nb111.pdf>)) に従って測定した。麴の菌体重量は、キッコーマン社製の麴菌量測定キットを使用して測定した。測定は 3 回行い、結果は平均値で示した。また、t 検定による有意差検定を行った。

【結果及び考察】

麴菌の O-メチルトランスフェラーゼ候補遺伝子の選抜

麴菌の TCA 生産に関与する遺伝子を特定するために、Coque (2003) らの報告と同様に、麴菌もメチル基転移酵素遺伝子をターゲットにして探索を行った。麴菌に存在する SAM 依存性メチルトランスフェラーゼあるいは O-メチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子について、酒類総合研究所から公表される *A. oryzae* RIB40 ゲノムデータベース (CAoGD | 独立行政法人酒類総合研究所, (<https://nribf21.nrib.go.jp/CAoGD/>)) を用いて探索した結果、76 遺伝子が候補として抽出された。

TCA は、製麴工程の中盤・仲仕事以降急激に増加することが知られている (Miki *et al.*, 2005; 岩田ら, 2007)。このことから TCP の TCA への変換に関与する酵素をコードしている遺伝子発現は、同時期に急激に増加すると考えられた。そこで、EST データベースの米麴ライブラリーに属する遺伝子、あるいは米麴のトランスクリプトーム解析 (岩下ら, 2007) における製麴の盛りから出麴の間に高発現する遺伝子に着目し、37 遺伝子を選抜した (Table 1-5)。これらの遺伝子の TCA 生産への関与を調べるため、遺伝子破壊株の作製を試みた。その結果、34 遺伝子について 2 株以上の遺伝子破壊株が得られた。選択培地上のコロニーは遺伝子破壊株と対照株 (*A. oryzae* NSR- Δ ID2 に *adeA* を相補した株 (以下 *adeA*⁺) で同様の形態を示し、外見上の生育への影響は認められなかった。なお、遺伝子番号 AO080550000061, AO080554000312, AO080560000035 の 3 遺伝子については破壊株が得られなかった。AO080554000312 はリボゾーム RNA メチルトランスフェラーゼをコードしている遺伝子とも推定されており、これらの遺伝子は生育に必要な機能を有するメチルトランスフェラーゼをコードしている可能性がある。

Table 1-5. List of genes assigned as methyltransferases in the *Aspergillus oryzae* RIB40 genome database.

Gene ID assigned as a methyltransferase	Gene disruption experiment	Contig(cultivation conditions) in the <i>Aspergillus oryzae</i> EST database
AO080501000038	※	AoEST04790 (liguid culture (with glucose,37°C))
AO080501000047	※	
AO080501000056		
AO080501000146		
AO080501000147		
AO080501000148	※	
AO080502000073		
AO080503000109	※	
AO080503000314		AoEST06106 (solid culture (wheat))
AO080504000021		
AO080505000104		
AO080506000162	※	
AO080506000278		
AO080508000176	※	
AO080508000411	※	
AO080508000515	※	
AO080508000522		
AO080509000116		
AO080509000249	※	
AO080511000042		
AO080511000342	※	
AO080515000103	※	
AO080517000057	※	
AO080517000058		
AO080521000075		
AO080521000097		
AO080521000231	※	AoEST07474 (solid culture (rice))
AO080521000293	※	AoEST01723 (liquid culture (with glucose), solid culture (rice))
AO080522000001		
AO080523000140	※	
AO080523000155		

Table 1-5. List of genes assigned as methyltransferases in the *Aspergillus oryzae* RIB40 genome database. (continued)

Gene ID assigned as a methyltransferase	Gene disruption experiment	Contig(cultivation conditions) in the <i>Aspergillus oryzae</i> EST database
AO080523000271	※	AoEST06838 (solid culture (wheat)), AoEST03195 (solid culture (wheat))
AO080523000826	※	AoEST05823 (solid culture (wheat))
AO080525000026	※	AoEST02535 (solid culture (wheat))
AO080525000333		
AO080525000410		
AO080525000443		
AO080527000009	※	AoEST01337 (liquid culture (with glucose), solid culture (wheat)), AoEST01146 (liquid culture (with glucose,37°C))
AO080530000067	※	
AO080530000071	※	
AO080530000086	※	
AO080531000003	※	AoEST03341 (solid culture(rice))
AO080531000021	※	
AO080531000061		
AO080531000062		
AO080531000332		
AO080532000547	※	
AO080532000557		
AO080537000014		
AO080538000120	※	
AO080541000175		
AO080541000188		
AO080541000189		
AO080541000203	※	AoEST01247 (solid culture(wheat or rice))
AO080541000381	※	
AO080541000486		
AO080542000045	※	
AO080542000056		
AO080546000124		
AO080546000341		

Table 1-5. List of genes assigned as methyltransferases in the *Aspergillus oryzae* RIB40 genome database (continued).

Gene ID assigned as a methyltransferase	Gene disruption experiment	Contig(cultivation conditions) in the <i>Aspergillus oryzae</i> EST database
AO080546000376	※	AoEST02555 (liquid culture (with glucose or alkaline pH), solid culture (wheat or rice)), AoEST04712 (liquid culture (with glucose,37°C))
AO080549000266	※	
AO080550000061	※	
AO080550000110		
AO080553000015		
AO080553000163		
AO080554000312	※	AoEST05423 (solid culture (wheat))
AO080555000091	※	
AO080560000035	※	AoEST00270 (solid culture (rice)), AoEST00224 (solid culture (rice))
AO080562000001		
AO080562000002		
AO080562000067		
AO080562000068		
AO080562000080		AoEST03534 (liquid culture (with glucose))
AO080568000164	※	AoEST06249 (solid culture (wheat))
AO080570000109	※	AoEST05626 (liquid culture (with maltose))

O-メチルトランスフェラーゼ候補遺伝子破壊株の TCA 生成能の評価

麹菌が O-メチル化に関する遺伝子を欠損したことにより、カビ臭の生成を抑制しているか、また製麹中の麹菌の破精込み具合などの状況や酵素活性が低下していないか調べるために、作成した遺伝子破壊株を使用して製麹試験を実施した。34 遺伝子破壊株全てについて、麹を同時につくるのが困難であるため、7 回に分け、その都度対照株の *adeA*⁺株もあわせて製麹を行った。菌株はそれぞれの形質転換で得られた 2 株、及び参考のために *A. oryzae* RIB40 株を使用した。各麹の TCA 含量を測定し、使用した 2~3 株の数値を平均し、対照株の *adeA*⁺株の TCA 含量 (麹 1 g 当たり 2.1 ng) を 1 とする相対値で表した (Fig. 1-2)。また、既報 (Miki *et al.*, 2005; 岩田ら, 2007) で TCP を添加して製麹を行い、TCP の添加量と TCA の生成量との関係が検討された結果、 α 米への TCP の添加量が増えるに従って TCA の生成量も増えたとの報告があることから、今回の試験においては TCP をこの範囲内の α 米 1 g 当たり 5 ng となるように添加した。その結果、全ての菌株について外観的に正常な麹ができ、使用菌株による麹の状貌の違いは認められなかった。

米麹中の TCA 含量を測定した結果、AO080508000515, AO080538000120, 及び AO080542000045 の各遺伝子破壊株は、対照株の約 0.6 倍、AO080541000203 の遺伝子破壊株は 0.45 倍、AO080521000231 の遺伝子破壊株は 0.12 倍に TCA の生成量が減少し、これら 5 株の遺伝子破壊株において TCP の O-メチル化能が低下していた。一方、TCA の生成量が対照株と比較して顕著に増加した遺伝子破壊株もいくつか存在し、AO080555000091 の遺伝子破壊株の場合は約 2 倍であった。AO080555000091 はステロールメチルトランスフェラーゼをコードしていると推定されている遺伝子であり、遺伝子破壊によって細胞膜を構成するステロールの構造が変化することにより、基質の TCP の菌体内への取り込みが増加、あるいは O-メチルトランスフェラーゼを菌体外に放出したことにより菌体外で TCP のメチル化が起こり TCA の生成量が増加した可能性が考えられる。なお、TCP を添加した α 米に分生子を接種せず、同様の製麹操作を行った場合、TCA は検出されなかった。この結果は、Bai ら (2017) の報告と一致しており、TCP は真菌のような微生物なしでは TCA に変換できないことを示唆している。

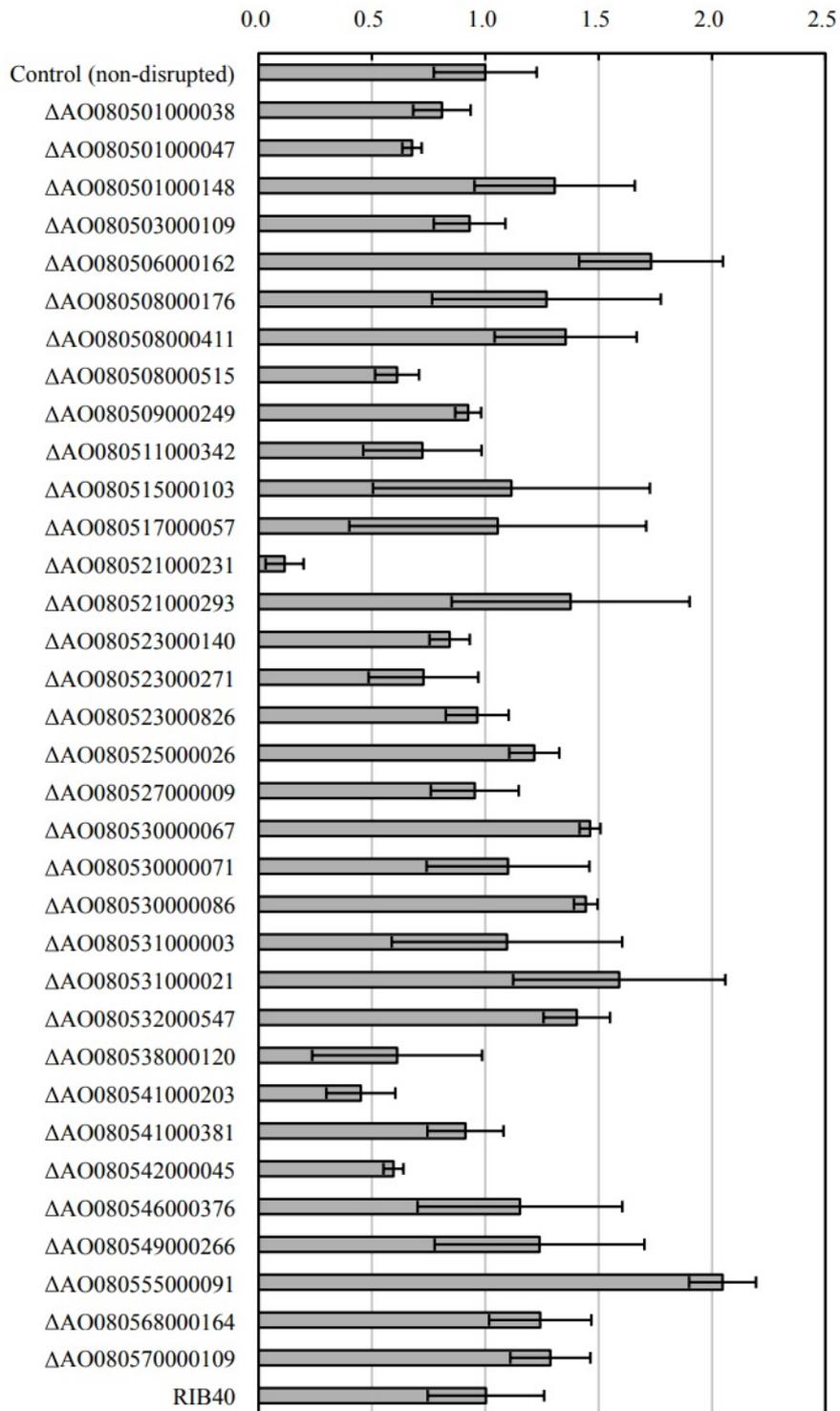


Fig. 1-2. Relative concentrations of TCA in rice-*koji* made using gene disrupted strain in the presence of TCP.

Bars indicate means \pm SD (n = 2 or 3) .

米麴の糖化酵素活性及び菌体量の測定

米麴は多くの酵素を持っており、麴菌の TCP を *O*-メチル化に関する遺伝子を欠損させたことで、主要な酵素 (α -アミラーゼ, グルコアミラーゼ活性と α -グルコシダーゼ活性を合わせた糖化力, 酸性カルボキシペプチダーゼ, 及び酸性プロテアーゼ) の活性に影響を与えていないか確認する必要がある。TCA の生成が特に低下した AO080521000231 の遺伝子破壊株, 対照株の *adeA*⁺株及び *A. oryzae* RIB40 株を使用し, TCP を添加せず, 実際に近い温度と湿度の条件で新たに製麴を行った後, 麴の各種酵素活性と菌体量を測定した。その結果, α -アミラーゼ活性, グルコアミラーゼ活性と α -グルコシダーゼ活性を合わせた糖化力, 酸性カルボキシペプチダーゼ活性, 酸性プロテアーゼ活性, 及び菌体量において明確な差は認められなかった (Table 1-6)。これらの結果から, AO080521000231 の遺伝子破壊株は, 正常な米麴をつくる能力を維持したまま TCP の *O*-メチル化能が低下していることが明らかとなった。さらに, *A. oryzae* RIB40 株はゲノム解析により DNA 配列が決定されており, EST データベースが作成されている。このデータベースの中から AO080521000231 に対応する EST は AoEST07474 であり, AO080521000231 は米麴においても発現することを確認した。つまり, AO080521000231 遺伝子が製麴中に 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る。しかし, AO080521000231 の遺伝子破壊によって TCA の生成が完全には抑制されなかったことから, 他の遺伝子にコードされる酵素の関与も示唆される。

先に記載した通り, カビ臭生成に関係する酵素として, *T. longibrachiatum* のクロロフェノール *O*-メチルトランスフェラーゼ (CMT1) をコードする遺伝子 *cmt1* (GenBank accession no. FN554867) が報告されている (Feltre *et al.*, 2010)。CMT1 の推定アミノ酸配列を AO080521000231 と比較してみると, 相同性 (identity) は 27% に過ぎなかった。つまり, 両者は同じ *O*-メチルトランスフェラーゼと推定されるが, 麴菌の酵素 AO080521000231 の性質は CMT1 と異なっていることが推測される。

麴菌における酵素の諸性質については詳細な検討が必要であるが, 少なくとも AO080521000231 の遺伝子破壊によって麴菌は顕著に TCA 生成能を失うことが明らかとなった。従って, AO080521000231 を *O*-methyltransferase TCP (*omtT*) と命名する。今後は, TCP の *O*-メチル化能力が低減し TCA の生産が低下している実用麴菌の育種として, *omtT* を標的とした *A. oryzae* RIB40 の育種が有望視される。

Table 1-6. Various enzyme activities and mycelial content of rice-*koji*.

	RIB40	Control <i>A. oryzae</i> NSR- Δ ID2 (<i>adeA</i> ⁺)	Disruptant (AO090010000551 (Δ <i>omtT</i>))
α -Amylase (U/g <i>koji</i>)	1288 \pm 41	1178 \pm 23	1123 \pm 22
Glucoamylase + α -glucosidase (U/g <i>koji</i>)	224 \pm 12	194 \pm 8	192 \pm 4
Acid carboxypeptidase (U/g <i>koji</i>)	2899 \pm 192	3423 \pm 34	3242 \pm 80
Acid protease (U/g <i>koji</i>)	4540 \pm 132	4196 \pm 102	4164 \pm 102
Mycelial content (mg/g <i>koji</i>)	6.6 \pm 0.35	7.0 \pm 1.50	6.3 \pm 0.15

Values are means \pm SD (n = 3).

第2章

2,4,6-トリクロロフェノール (TCP) 存在下における 麴菌の生育特性

【序論】

2,4,6-トリクロロフェノール (TCP) はかつて木材の防カビ剤として使用されており、塩素化されているため水に溶けやすい性質を持つことから環境中に広く存在している。また、TCP はクロロフェノール類であり微生物だけではなく人体にも影響を与える。米国の国立生物工学情報センター (NCBI) が管理している化学分子データベースによると、ヒトが TCP を吸引すると、呼吸器系の影響、肺機能の変化、さらに肺病変を引き起こすと報告されており、ヒトへの発がん性が予想されている (2,4,6-trichlorophenol | National Library of Medicine, (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6914>))。

環境中の真菌は、TCP などのクロロフェノール類を *O*-メチル化して 2,4,6-トリクロロアニソール (TCA) などのクロロアニソールを生成することで細胞毒性を回避 (解毒化) することができるが (Cserjesi and Johnson, 1972; Gee and Peel, 1974)、高濃度のクロロフェノール類に対しては解毒化できず、真菌の生育が阻害される。クロロフェノール類の抗真菌活性は、その化学構造や対象となる真菌の種類にも依存すると考えられている ((Cserjesi and Johnson, 1972; Gee and Peel, 1974; Miki *et al.*, 2005; Tindale *et al.*, 1989; Whitfield *et al.*, 1991))。しかし、TCP が真菌の生育に及ぼす影響について詳細な報告がされているのは寒天培養である (Ruckdeschel and Renner, 1986)。しかし、*Aspergillus oryzae* についての生育特性はほとんど明らかにされていない。TCA への変換能力の低い菌株は、TCP に対する感受性が親株に比べて高いことが推測される。

第 1 章では、製麴工程で TCP から TCA への変換に関与する主要な *A. oryzae* の *O*-メチルトランスフェラーゼ遺伝子 (AO080521000231 (別名 AO090010000551), *omtT*) を見出し、その遺伝子破壊株 ($\Delta omtT$) は、カビ臭の原因となる TCA 生成をしにくいことを示した (遠藤ら, 2011)。つまり、TCP を無毒化しにくい $\Delta omtT$ 株が、TCP に対して感受性があり、生育が困難であるなどの特徴的な生育を示せば、その特徴からカビ臭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。

そこで本章では、カビ臭を生成しにくい麴菌をスクリーニングするための培養条件の検討を行った。まず、麴菌 *A. oryzae* の TCP に対する生育特性が明らかになっていないことから、TCP を含む液体培養、寒天培養さらに固体培養の製麴条件で *A. oryzae* RIB40 株を培養し、その状貌を観察することによって TCP に対する生育特性を観察した。続いて、把握した生育特性からカビ臭を生育しにくい麴菌をスクリーニングするための形態的特徴を考察し、培養方法を検討した。

【材料と方法】

菌株と培地

菌株は *A. oryzae* RIB40 を用いた。培地には、Czapek-Dox 培地 (0.3% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.05% KCl, 0.001% FeSO₄·7H₂O, 3% グルコース; pH6.0) と米麴エキス培地 (RKE) を用いた。RKE は、第 1 章と同様に調整した。RKE の液体培地及び寒天培地は、RKE を水で希釈して、それぞれ Brix 値を 2% 及び 10% にした。必要に応じて TCP を培地に加えた。

分生子懸濁液の調整

直径 6 cm のシャーレの RKE 寒天培地に *A. oryzae* RIB40 株を 30°C で 7 日間培養し、0.05% Tween 80 水溶液を 5 mL 添加して分生子を懸濁して回収し、菌糸と分生子を分離するため、メッシュサイズ 40 µm のセルストレーナー (VCS-40, AS ONE, 大阪) で濾過をした。濾液を 1430×g, 10 分間の遠心分離後、沈殿した分生子を回収し、10 mL の 0.05% Tween 80 水溶液を加えよく攪拌して分生子懸濁液原液とした。分生子は 1 章に示したトーマ氏血球計算盤にて同様に測定し、分生子懸濁液を調整した。

TCP を含んだ液体培地での麴菌の培養 (菌体乾燥重量測定)

高濃度の TCP が *A. oryzae* に及ぼす影響を調べるために、*A. oryzae* RIB40 株の分生子を 1×10⁶ 個/mL となるように、異なる濃度の TCP (0, 10, 20, 30, あるいは 40 µg/mL) を含む 30 mL の Czapek-Dox または RKE (Brix 2%) に加え、100 mL バッフル付き三角フラスコに入れた。この培養液を 30°C, 130 rpm で 24 時間振とう培養した。より低濃度の TCP の効果を調べるために、100 個/mL の *A. oryzae* RIB40 株を Czapek-Dox で 48 時間、または RKE (Brix 2%) で 24 時間培養した。両培地とも 0~10 µg/mL の TCP 濃度となるように調整した。所定の時間経過後、培養液を孔径 0.45 µm のメンブレンフィルター (アドバンテック東洋, 東京) で濾過し、回収した菌糸体を蒸留水で洗浄した後、60°C で恒量となるまで乾燥させて乾燥菌体重量を測定した。測定は 3 回行い、結果は平均値で示した。

TCP を含んだ寒天培地での麴菌の培養

直径 5 cm のシャーレに入った Czapek-Dox または RKE (Brix 10%) の 2% 寒天培地の中央に *A. oryzae* RIB40 株の分生子を 3000 個接種して 30°C で 7 日間培養し、菌糸の生育

と孢子形成状況を写真に撮影し、肉眼で観察した。コロニー面積の測定にはソフトウェア Image J を用いた (Schneider *et al.*, 2012)。必要に応じて 0~50 µg/mL の TCP を培地に加えた。測定は 5 回行い、結果は平均値で示した。

固体培養方法の検討 (三角フラスコを用いた製麴方法)

200 mL 三角フラスコに α 米 20 g または 30 g を入れ、95°C で 3 時間加熱殺菌をした。

三角フラスコでの α 米の使用量の検討には、殺菌した α 米 30 g または 20 g に TCP 0 及び 10 ng/mL を含有した 0.05% Tween 80 水溶液 12 mL または 8 mL (蒸米水分量 22.7%) を添加し、*A. oryzae* RIB40 株の分生子を α 米 1 g あたり約 1×10^6 個接種した。恒温恒湿機 (日報社製の超音波加湿器 NP408-00 と湿度センサー HS1-1 (日報社, 埼玉) を接続した恒温器 CRB-14A (日本フリーザー, 東京)) に入れ、35°C, 80% の湿度で 48 時間培養した。三角フラスコは TCP と TCA の飛散を防ぐためにアルミホイルで覆い、19, 23, 27 時間後に蓋を開けて酸素を補給し、攪拌した。なお、TCP を添加していない 0.05% Tween 80 水溶液を添加したものを対照とした。

添加水分量 (蒸米水分量) の検討には、殺菌済みの α 米 20 g に上記条件の TCP 水溶液を 7 及び 8 mL (蒸米水分量 18.3% 及び 22.7%) を添加し、*A. oryzae* RIB40 株の分生子を α 米 1 g あたり約 1×10^6 個接種して 54 時間培養した。培養中に酸素供給のため、1, 19, 27 時間目に攪拌をした。また、TCP を添加していない 0.05% Tween 80 水溶液を添加し、アルミホイルで覆ったものと、シリコ栓をしたものについても同様に製麴をした。

製麴時間の検討には、殺菌済みの α 米 20 g に上記条件の TCP 及び分生子濃度を添加してアルミホイルで覆い、それぞれ 48, 60, 72 時間まで培養した。酸素供給はそれぞれ 1, 6, 24, 30, 48, 60 時間目に攪拌をした。TCP を添加していない 0.05% Tween 80 水溶液を添加したものを対照とした。

TCP を含んだ固体培養 (三角フラスコ製麴) での麴菌の培養

殺菌済みの α 米 20 g を入れた 200 mL の三角フラスコに TCP (0, 0.1, 1, 10, 100 あるいは 300 µg/mL) を含有した 0.05% Tween 80 水溶液を 7 mL 添加し、*A. oryzae* RIB40 株の分生子を α 米 1 g あたり約 1×10^6 個接種した。この三角フラスコを、恒温恒湿機に入れ、35°C, 80% の湿度で 44 時間培養した。三角フラスコは TCP と TCA の飛散を防ぐためにアルミホイルで覆い、1, 6, 24, 30 時間後に蓋を開けて酸素を補給し、攪拌した。なお、

TCP を添加していない 0.05% Tween 80 水溶液を添加したものを対照とした。製麴試験は各 TCP 濃度について 3 回行った。

米麴中の酵素活性の測定

α -アミラーゼ、糖化力（グルコアミラーゼ活性と α -グルコシダーゼ活性を合わせたもの）、及び酸性カルボキシペプチダーゼの測定は、第 1 章と同様に、キッコーマンバイオケミファ社製の各種醸造分析キットを用いた。測定は 1～3 回行い、結果は平均値で示した。

米麴中の菌体量の測定

菌体量の測定については、米麴にタカラバイオ社製の糸状菌細胞壁溶解酵素 Yatalase を作用させ、菌体から遊離する N-アセチルグルコサミン (N-GlcNAc) を定量した (Fujii *et al.*, 1992; Reissing *et al.*, 1955)。すなわち、米麴 5 g を採取し、100°C で 1 時間乾燥後、粉碎した。粉碎した米麴 2 g を蓋つきの試験管に採取し、50 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) を 10 mL 加え洗浄後、遠心分離 (1430×g, 10 分) を行った。沈殿物に 10 mg Yatalase を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) を 10 mL 加え、37°C で 1 時間振とう後、遠心分離 (1430×g, 10 分) を行い、上清を回収した。上清を 0.5 mL 採取し 0.8 M ホウ酸カリウム溶液を 0.1 mL 加え、100°C で 3 分間加熱後、氷冷した。p-ジメチルアミノベンズアルデヒドを 3 mL 加え、37°C で 20 分間反応後、反応液を冷却し、直ちに 585 nm の吸光度を測定した。N-GlcNAc 標品 (ナカライテクス, 京都) にて検量線を作成し、N-GlcNAc 量 139 μ g を菌体量 1 mg として計算を行った。測定は 2～3 回行い、結果は平均値で示した。

米麴の TCA 含量の測定

米麴中の TCA 含量の測定は第 1 章と同様に行った。すなわち、SBSE 法で米麴中の TCA を Twister に吸着させ、吸着させた TCA を TDS システム付きガスクロマトグラフ質量分析装置にて測定した。定量は 10% アルコール水溶液を用いて 2 ng/L および 5 ng/L の TCA 標準溶液を調整し検量線を作成して行った。測定は 3 回行い、結果は平均値で示した。

α 米及び RKE 中のミネラル濃度の分析

α 米及び RKE (Brix10%) 中のミネラル濃度は、既報に記載された奥田ら (2014, 2015) の手順に従った。すなわち、マイクロ波消化システム (MLS-1200 MEGA, Milestone,

Bergamo, IT) を用いて湿式灰化した後、誘導結合プラズマ発光分光分析法 (ICP-AES, ICPS-9000E, Shimadzu, 京都) を用いて分析した。

【結果及び考察】

液体培地中の *A. oryzae* の菌糸成長に対する TCP の影響

A. fumigatus と *A. niger* については、生育が阻害される寒天培地中の TCP 濃度が報告されている (Ruckdeschel and Renner, 1986)。しかし、TCP 存在下での *A. oryzae* の生育特性は液体培養、寒天培養などでもこれまでに明らかにされていない。

そこで、*A. oryzae* RIB40 株を用い、培地中の TCP 濃度と *A. oryzae* の生育条件との関係を調べた。麹菌は液体培地中では、菌糸を伸長することはできるが新たな分生子は形成しない。そのため、麹菌の生育を調べる方法として、菌体重量を測定する方法、菌糸塊面積を測定する方法などがある (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2002 ; Feltrer *et al.*, 2010 ; Miyazawa *et al.*, 2016)。今回は簡易に測定できる乾燥菌体重量を測定して麹菌の生育を測定することにした。TCP を含む液体培養中での *A. oryzae* RIB40 株の生育の様子を観察するため、TCP 濃度が 40 µg/mL までの影響を調べた (Fig. 2-1A)。その結果、分生子を 1×10^6 個/mL を接種してから約 24 時間後、*A. oryzae* RIB40 株の生育阻害は TCP 濃度に依存することが確認され、10 µg/mL までに大幅に抑制された。10 µg/mL の TCP を含む Czapek-Dox と 30 µg/mL の TCP を含む RKE では、*A. oryzae* RIB40 株の増殖が有意に抑制された ($p < 0.05$)。データは示していないが、30 µg/mL 以上の TCP を含む両培地では、7 日間培養しても菌糸の成長は認められなかった。Álvarez-Rodríguez ら (2002) は、ワインのコルク臭の原因となる *Trichoderma longibrachiatum* を用いた実験において、10 µg/mL の TCP を含む液体培地で 30 時間程度までの培養においては微生物の成長は阻害されたが、TCP が TCA に変換されて TCP 濃度が充分下がった段階で成長を再開させたことを報告している。従って、*A. oryzae* もまた、TCP を無毒性の TCA に変換しながら成長すると考えられ、高濃度の TCP は *A. oryzae* の成長を一時的に阻害する効果しかないことが示唆される。

次に、低濃度の TCP が *A. oryzae* RIB40 株の孢子(初期接種量 = 100 個/mL)の成長に及ぼす影響を Fig. 2-1B 及び 1C に示した。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 µg/mL 以上、RKE で 0.3 µg/mL 以上であった ($p < 0.05$)。また、興味深いことに、RKE の 1~2 µg/mL で急激に相対乾燥重量が低下する現象がみられた。*A. oryzae* RIB40 株では 1~2 µg/mL の範囲における TCP 濃度で生育阻害を顕著に受けていると考えられ、TCA への変換に時間を要していることが示唆される。

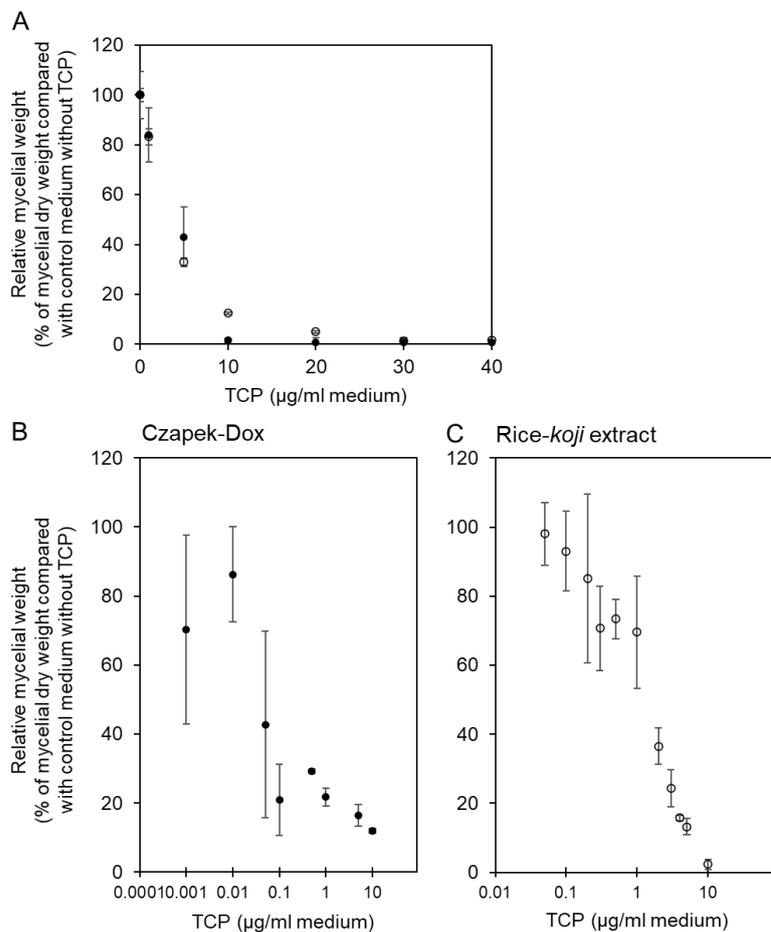


Fig. 2-1. Effect of 2,4,6-trichlorophenol TCP on the mycelial growth of *Aspergillus oryzae* RIB40 in liquid media.

The relative mycelial weight means % of mycelial dry weight compared with control medium without TCP. Conidia were cultured in Czapek-Dox or rice-*koji* extract media containing 0–40 $\mu\text{g/ml}$ of TCP for 24 h (A), in Czapek-Dox medium containing 0–10 $\mu\text{g/ml}$ of TCP for 48 h (B), and in rice-*koji* extract media containing 0–10 $\mu\text{g/ml}$ of TCP for 24 h (C). Data are expressed as means \pm standard deviations of three independent experiments. Symbols: solid circles, Czapek-Dox medium; open circles, rice-*koji* extract medium.

寒天培地上の *A. oryzae* の菌糸成長及び分生子形成に対する TCP の影響

寒天培地では TCP の飛散を防ぐためにパラフィルムで密閉すると、酸素不足になるため TCP を添加していない培地においても菌糸の成長が極端に遅くなることや、孢子形成をしない菌株があった。そのため、酸素供給ができ、TCP の飛散が起こらないよう、同じ TCP 濃度を含有した寒天培地を同じ容器に入れて培養し、菌糸の成長及び分生子の形成を観察した。その結果、寒天培地も液体培地での結果と同様に、TCP を多く含む培地ほど *A. oryzae* RIB40 株の菌糸成長と分生子形成を高いレベルで阻害した (Fig. 2-2A)。50 µg/mL の TCP を含む Czapek-Dox 及び RKE では、7 日間の培養後も菌糸は観察されなかった。Mueller-Hinton 寒天培地上で生育する *A. fumigatus* 及び *A. niger* では、22°C で 10 日間培養した場合、TCP 濃度がそれぞれ 0.25 µmol/mL (約 50 µg/mL) 及び 0.5 µmol/mL (約 100 µg/mL) で、菌糸の成長が完全に阻害されることが報告されている (Ruckdeschel and Renner, 1986)。今回の結果は、*Aspergillus* 属の糸状菌に対する TCP の効果と一致している。

10 µg/mL 以下の濃度の TCP で *A. oryzae* RIB40 株を培養した場合、2 µg/mL の低濃度の TCP を含む両培地で菌糸の生育阻害が観察された (Fig. 2-2B)。Czapek-Dox では培養 3 日目の 6 µg/mL 以上の TCP 濃度ではコロニー直径が TCP 無添加培地よりも 54% 小さく、菌糸の成長が遅くなった。RKE では TCP 濃度が高くなるにつれ、コロニー直径が小さくなり、菌糸の成長が遅くなった。さらに、Czapek-Dox と RKE でのコロニー径を比較した結果、4 µg/mL の TCP では、RKE 上で Czapek-Dox よりも多くの菌糸が成長したが、8 µg/mL 以上の TCP では、RKE 上では Czapek-Dox のコロニーと比較して小さいコロニーが観察された。これまで湖水中の微生物による TCP の TCA への *O*-メチル化に関する研究では、Mn²⁺ 及び Mg²⁺ の 2 価の金属カチオン、TCP 濃度、温度、基質である SAM 及び pH によって影響を受けることが示唆されている (Zhang *et al.*, 2016)。Czapek-Dox と RKE 培地中の Mn と Mg の含有量を測定した結果、Czapek-Dox には Mg が 49 µg/mL 含まれているのに対し、RKE には Mn が 1 µg/mL、Mg が 9 µg/mL 含まれていた。このように、高濃度の TCP を含む RKE 上で生育する *A. oryzae* RIB40 株では、2 価の金属イオンの供給が不十分であり、すべての TCP を TCA に *O*-メチル化するのに時間を要した結果、生育が遅くなったと推察される。

また、分生子については、TCP の有無にかかわらず RKE 培地の方がよく着生していた (Fig. 2-2C)。菌糸の発育には微量金属の Fe²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺ が必須である。特に Cu²⁺

は緑色の孢子形成に必須であるが、 Mn^{2+} の存在なしでは孢子が形成されない (Yoshimura, 1936)。RKE には Cu 及び Mn がそれぞれ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含まれているが、Czapek-Dox には両元素とも含まれていないため、あまり孢子形成されなかったと推察される。

さらに、RKE については 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までで菌糸の生育阻害を観察した結果、TCP 添加により菌糸の成長は阻害されていたが、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの濃度では目視での判断は困難であった (Fig. 2-3)。 *A. oryzae* RIB40 株を 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の TCP を含む両寒天培地で培養すると、コロニー形成が遅くなったことから、TCA への変換に時間を要していると考えられる。しかし、6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の TCP を含む培地から生成されるカビ臭は強烈であり、実験室環境の汚染の危険性があるため、カビ臭を生成しにくい変異株をスクリーニングする条件として、TCP 添加濃度を 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までとした。

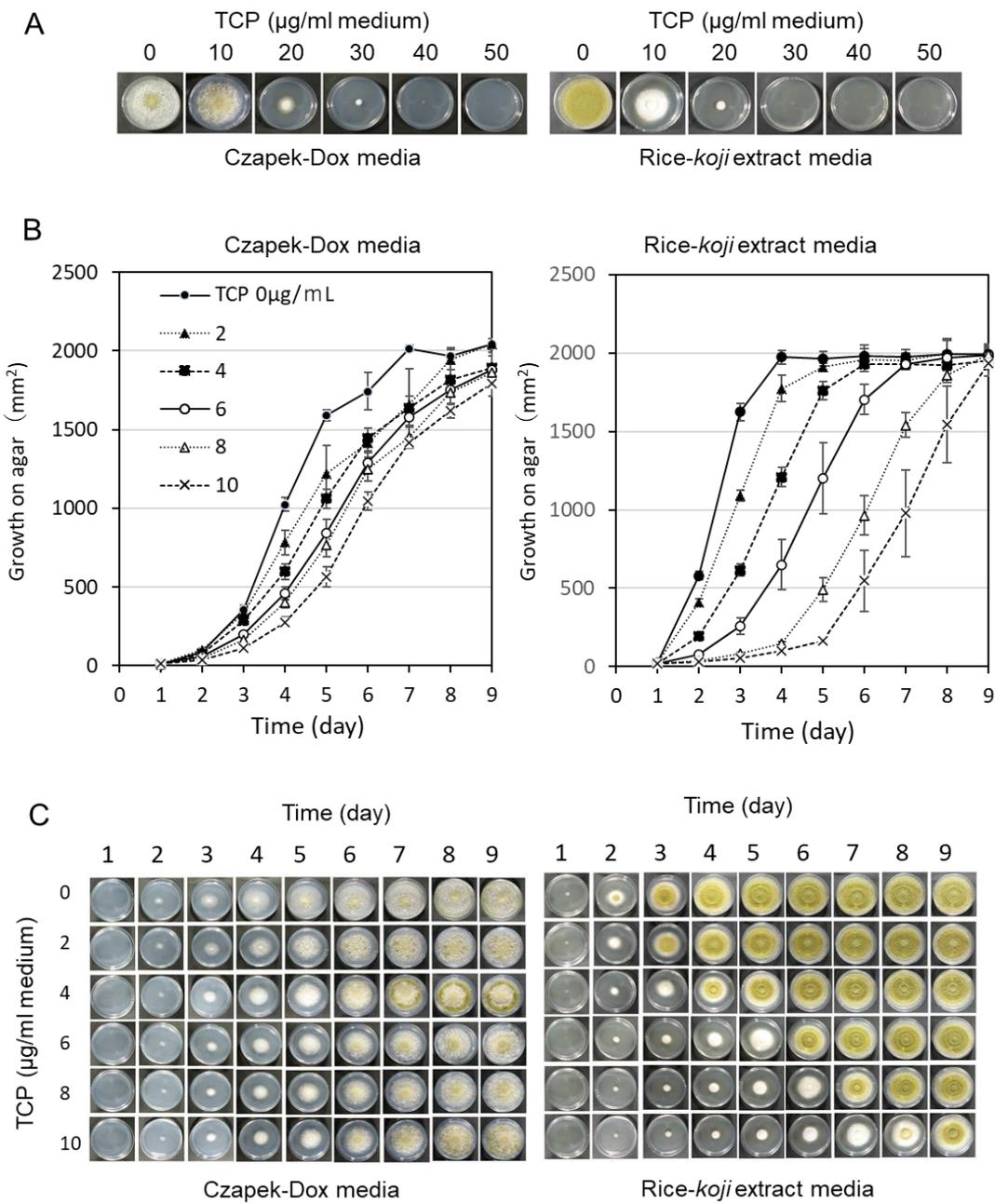


Fig. 2-2. Effect of 2,4,6-trichlorophenol (TCP) on mycelial growth and conidia formation of *Aspergillus oryzae* RIB40 growing on agar media.

Conidia were cultured on Czapek-Dox or rice-*koji* extract media (Brix 10%) containing 0–50 $\mu\text{g/ml}$ of TCP for 7 days (A) or 0–10 $\mu\text{g/ml}$ (B, C) of TCP for 9 days.

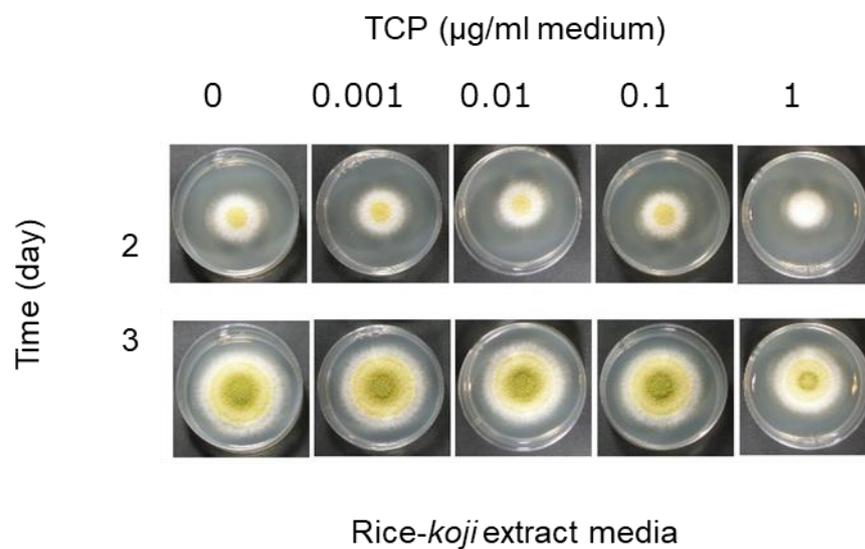


Fig. 2-3. Effect of 2,4,6-trichlorophenol (TCP) on mycelial growth and seedling formation of *Aspergillus oryzae* RIB 40 grown on rice-*koji* extract media (Brix 10%) agar medium. Conidia were cultured on rice-*koji* extract media (Brix 10%) containing 0–50 $\mu\text{g/ml}$ of TCP for 3 days .

三角フラスコ製麹で行う培養容量の条件検討

麹菌の酵素活性は、酸素供給量と関係があり、 α -アミラーゼやグルコアミラーゼは二酸化炭素が多いと活性が下がる（柳内ら, 1993）。そのため、蒸米量に対して空隙が少ない密閉した環境で製麹を行うと、酸素供給が不足して生育が抑制されると推測された。そこで、固体培養の製麹には第1章で行った密閉系でのシャーレ製麹試験を行わず、空隙の大きい三角フラスコを用いて製麹を行うこととした。三角フラスコを用いた密閉系での試験では、ゴム栓にて密栓培養した場合、米の容量に対して10倍以上の容量の容器で二酸化炭素濃度が低下し、菌糸の生育が良好になることが報告されている（秋山ら, 1961）。しかし、TCPのような毒性のある薬剤を混入した製麹は行われていない。そこで、三角フラスコを用いた密閉系での製麹でTCAを添加して培養しても麹菌が生育し、さらにTCAを測定可能か、また α -アミラーゼなどの酵素活性が十分であるか検討した。

初めに、TCAは揮発性が高く臭いが移りやすいため、三角フラスコにアルミホイルで密栓をしてもTCAの臭いが移らないか確認した。すなわち、TCPを添加した三角フラスコとTCPを添加していない三角フラスコを同時に製麹し、TCPを添加していない米麹にTCAの臭いが移っていないか米麹中のTCA生成量を測定した。TCP添加した米麹のTCA生成量は 0.596 ± 0.207 ng/g *koji*で、TCP無添加の米麹は 0.075 ± 0.001 ng/g *koji*であった（Table 2-1）。一方、TCAの臭い移りを避けるためにTCP無添加の米麹を単独で製麹した場合のTCA生成量は 0.059 ± 0.020 ng/g *koji*であり、TCPを添加した米麹と同時に製麹したTCP無添加の米麹とほぼ同等であった。つまり、三角フラスコを用いて製麹してもTCAの臭いは他の米麹に移ることはなかった。また、培養時間が長くなってもTCPを添加していない米麹が生成するTCA量は大幅な増加が認められなかった。そのため、アルミホイルによる密栓でTCAの揮発及び溶解込みはない事が明らかとなった。さらに、200 mL三角フラスコに用いる α 米容量を検討するためTCP添加時の α -アミラーゼ活性を測定した結果、麹菌1g当たりの α アミラーゼの比活性の参考値（岩野ら, 1978）が870~1700 U/g *koji*であるのに対し、 α 米30gでは48時間目で405 U/g *koji*、54時間目で396 U/g *koji*で α -アミラーゼは低い値を示したが、20gではTCPを添加しても比活性は参考値と同等であることを確認した（Table 2-1）。これは前述した秋山ら（1961）の報告と一致した。実際、今回は*A. oryzae* RIB40株を用いて200 mL三角フラスコに20gの α 米で製麹を行うことで、 α -アミラーゼの比活性は参考値と比較してほぼ遜色が無いことが明らかとなった。

Table 2-1. The amount of α -rice suitable for *rice-koji* making in a triangular flask was determined by measuring TCA production and α -amylase.

	α -rice		single culture	Simultaneous culture	Simultaneous culture (+TCP)
TCA (ng/g <i>koji</i>)	30g	48H	0.059±0.020	0.075±0.001	0.596±0.207
		54H	0.054±0.030	0.085±0.008	0.621±0.1
α -Amylase (U/g <i>koji</i>)	30g	48H		886	405
		54H		803	396
	20g	48H		617	968
		54H		902	1145

The volatility and odor transfer of TCA were investigated. For the measurement of TCA, rice malt was used in which 8 mL of spore suspension was added to 15 g of α -rice (steamed rice moisture content: 22.7%) and incubated for 48 or 58 hours. Values are means \pm SD (n = 3).

The volatility and odor transfer of TCA were investigated. For the measurement of α -amylase, rice malt in which 12 mL of spore suspension was added to 30 g of α -rice (steamed rice moisture: 22.7%) and incubated for 48 or 58 hours was used. In addition, 20g of α -rice (steamed rice moisture: 22.7%) to which 8mL of spore suspension was added was also measured in the same way. Data are expressed as means \pm standard deviations of once or two independent experiments.

三角フラスコ製麴で行う水分量と製麴時間の検討

通常、製麴初期の床もみ時には蒸米水分量は 33% で、後半になるにつれ蒸米水分量は低下し、出麴では 17% になる (石川, 2009)。また蒸米水分量や温度により菌体量や酵素活性が変わることから水分量調節は重要である。麴菌の活性のうち糖化に最も関係のある α -アミラーゼは蒸米水分量が 24% の仕舞仕事相当で活性が高くなるが、TCP を添加した環境でさらに密閉することで活性が異なることが考えられる。そこで、TCA を添加して密閉製麴した際の適した水分量を検討するため、TCA 生成量及び α -アミラーゼ活性を測定した。まず、200 mL の三角フラスコに α 米 20 g を加えた時の水分量を 8 mL (蒸米水分量 22.7% で仕舞仕事相当) 及び 7 mL (蒸米水分量 18.3% で出麴相当) で検討をした (Table 2-2)。水分量が多いほど α -アミラーゼ活性は高くなったが、すべての蒸米水分量で 870~1700 U/g *koji* の比活性参考値範囲内 (岩野ら, 1978) であった。また、TCA 生成量は水分量による影響は認められなかった。今後の実験には、実際の製麴と同じ水分量の米麴を得たいため、出麴相当の 7 mL の水分を添加して製麴時間を検討することとした。続いて、製麴時間を検討した結果、製麴時間が長い程、酵素活性及び菌体量が高くなった (Table 2-3)。しかし、培養 72 時間目になると、酵素チロシナーゼの作用により米麴が黒く変化 (黒変化) したため、培養時間は 48~60 時間が最適であった。

以上の結果から、密閉した製麴により密閉及び TCP の影響を受けることなく酵素活性及び TCA の生成を測定するには、200 mL 三角フラスコに α 米 20 g (容量の 1/10)、7 mL の水分 (蒸米水分量 18.3% で出麴相当) を添加し 48~60 時間で製麴する条件が最適であることが明らかとなった。

Table 2-2. The amount of water suitable for *rice-koji* making in a triangular flask was investigated.

Amount of water	cover	2,4,6-Trichlorophenol addition in rice- <i>koji</i> making	TCA (ng/g <i>koji</i>)	α -Amylase (U/g <i>koji</i>)
8mL	Sirico stopper		0.099	1443
	Aluminum foil		0.052	1072
	Aluminum foil	+	0.560	1143
7mL	Sirico stopper		0.149	938
	Aluminum foil		0.048	944
	Aluminum foil	+	0.587	992

To 20 g of α -rice, 7, and 8 mL of 0.05% Tween 80 solution containing 10 ng/mL of TCP (moisture content of steamed rice: 18.3%, and 22.7%) were added, and approximately 10^6 microbial cells per 1 g of α -rice were inoculated and incubated for 54 hours. Measurements were taken once.

Table 2-3. Amount of enzyme activity produced at each *rice-koji* making time.

	2,4,6-Trichlorophenol addition in rice- <i>koji</i> making	rice- <i>koji</i> making time		
		48H	60H	72H
α -Amylase (U/g <i>koji</i>)		614 ± 89	732 ± 150	911 ± 359
	+	865 ± 146	843 ± 454	775 ± 217
Glucoamylase + α -glucosidase (U/g <i>koji</i>)		140 ± 20	154 ± 10	197 ± 117
	+	182 ± 4	155 ± 115	141 ± 58
Acid carboxypeptidase (U/g <i>koji</i>)		3193 ± 1048	4373 ± 584	5003 ± 1404
	+	3956 ± 125	3511 ± 2425	4345 ± 1139
Mycelial content (U/g <i>koji</i>)		7.4 ± 5.1	9.1 ± 5.0	9.2 ± 5.6
	+	8.5 ± 4.1	7.4 ± 1.5	8.2 ± 2.0

To 20 g of α -rice, 7 mL of 0.05% Tween 80 solution containing 10 ng/mL of TCP was added, and about 10^6 conidia were inoculated per 1 g of α -rice. The enzymes of the rice malt were measured at 48, 60, and 72 hours. Values are means \pm SD (n = 2).

三角フラスコ製麴での *A. oryzae* の菌糸成長に対する TCP の影響

固体培養では、寒天培養と同様に菌糸を気中に伸長させる。寒天培地は固体培養のモデル培養として利用されているが、栄養分や水分は液体培養と同一で寒天を含むか含まないかの違いのみである。固体培養である製麴では、水分活性や表面張力などの多くの因子が関係しているため、特異的に発現する遺伝子が存在する (Ishida *et al.*, 1998; Obata *et al.*, 2004; 秦, 2002)。今回は、TCP 存在下での生育特徴を把握するため、菌糸の状貌 (破精具合) 及び菌体量と α -アミラーゼ活性を測定した。製麴は 20 g の α 米に TCP (0, 0.5, 1, 10, 100 あるいは 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 7 mL 添加して、 α 米 1 g あたりに 0.18, 0.35, 3.5, 35 または 105 μg の TCP を含有させた。尚、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の TCP 溶液は 1%エタノール水溶液中に TCP が溶解する限界の濃度である。米麴の破精込み具合、菌体量及び α -アミラーゼ活性を測定した (Fig. 2-4)。 α 米 1 g 当たり 3.5 μg までの TCP 添加では、TCP 無添加の米麴と破精回り等の見かけは変わりなく、Fujii らが報告している一般的な米麴の菌体量と比較しても遜色なかった (Fujii *et al.*, 1992)。上述した液体培地や寒天培地での結果 (Fig. 2-1A, 1B, 2A, 2B)と同様に、 α 米中の TCP 濃度が高いほど、*A. oryzae* RIB 40 株の菌糸成長の抑制レベルが高くなった。 α 米 1 g 中に TCP を 35 及び 105 μg 添加した α 米を 44 時間培養した結果、TCP を添加していない α 米と比較して、菌体量はそれぞれ 64%及び 84%の減少が認められた。固体培養では 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの TCP 水溶液を α 米に添加すると、麴菌の増殖が見られたが、同じ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の TCP 濃度の液体培地 (Fig.2-1) や寒天培地 (Fig.2-2B) では 1~2 日間の培養で生育が大幅に抑制されており、固体培養で観察されたものとは異なっていた。固体培養の製麴では高濃度の TCP 濃度を用いなければ生育差が認められなかった。そのため、固体培養ではカビ臭を生成しにくい変異株をスクリーニングする条件を検討することは困難であった。

A. oryzae RIB 40 ゲノムデータベース (CAoGD | 独立行政法人酒類総合研究所, (<https://nribf21.nrib.go.jp/CAoGD/>)) によると、*omtT* は液体培地よりも米麴で強く発現している。以上の結果から、*A. oryzae* RIB40 株の生育に対する TCP の効果は、培地中の菌糸成長に重要なミネラル成分などの条件や固体の米麴中に発現する麴菌の遺伝子に依存することが示唆された。また、TCP の存在に応答して生育が遅れることは、清酒製造時にカビ臭を発生させない菌株を開発する上で有用な形質であると考えられる。今回、液体培養での *A. oryzae* RIB40 株は TCP 1~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む RKE 液体培養で急激に生育を抑制するような特徴的な生育を示した。以上より、麴菌の TCP に対する形態的特徴から、カビ臭

を生産しにくい麹菌をスクリーニングするには、液体培養が有効な方法であると推察された。

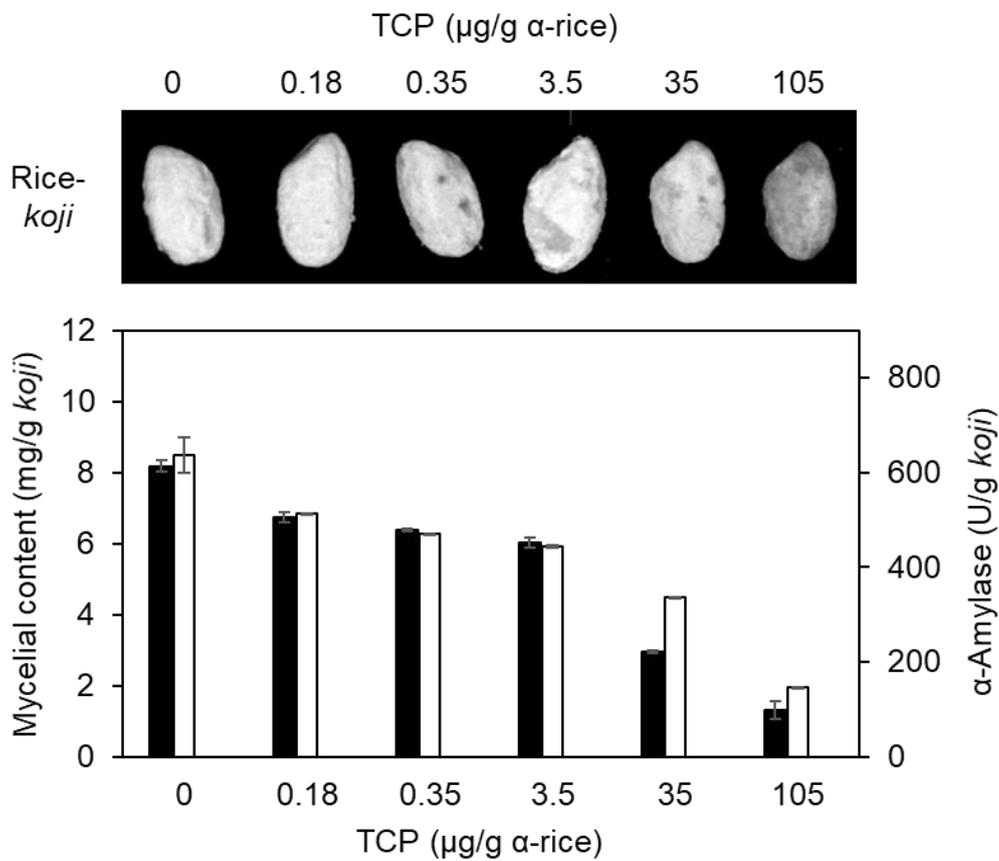


Fig. 2-4. Effect of 2,4,6-trichlorophenol (TCP) on mycelial growth and α -amylase production of *Aspergillus oryzae* RIB40 growing on α -rice.

Conidia were cultured for 44 h. Solid and open bars show the mycelial content (mg/g *koji*) and α -amylase activity (U/g *koji*) of rice-*koji*, respectively. Data are expressed as means \pm standard deviations of three independent experiments.

第3章

カビ臭物質 TCA を生成しにくい麹菌変異株の作出

【序論】

カビ臭を発生させないための方策として、2,4,6-トリクロロフェノール (TCP) が含まれていない木製用具を使用することが効果的であるが、通章序論でも記載した通り、それでも TCP の混入が抑えられない場合もある。そこで製麹工程での TCA 生成を極力防止するため、TCP のメチル化能の低い、つまりカビ臭生成を抑制した麹菌の育種が望まれる。通常、有用菌株を作出するには、薬剤、紫外線や γ 線などにより変異を誘発させて育種される。これまでに紫外線を照射して実用麹菌株の育種を行った例として、原ら (1975) により火落ち菌の増殖の原因となるメバロン酸を生産しない麹菌や、山下ら (1996) によりムレ香の原因となるイソアミルアルコールの生産性が低い麹菌が報告されている。また、紫外線や γ 線よりも DNA への変異誘発効果が高いイオンビームを照射した例として、高デンプン分解性の黒麹菌やセレン耐性麹菌株が作出されている (Kojo *et al.*, 2017; Toyoshima *et al.*, 2012)。しかし、麹菌の変異株の作出にはいくつか課題がある。例えば、麹菌が多核であることも効率的な育種の障害となっている (Maruyama, 2000; 五味, 1989)。また、細菌や酵母と異なり、増殖している細胞に致死的に作用する薬剤が少ないこともある。そのため、麹菌が菌糸状に生育する特徴を生かし、変異処理後に、変異株のみが生育する条件で濃縮培養することで有用菌株の取得効率を高めることが可能である。例えば、栄養要求性株を作出するには、紫外線処理後、最小培地の Czapek 培地で繰り返し培養する (五味, 1989)。目的の栄養要求性の菌株は Czapek 培地で未分化状態なままでいるのに対し、野生株は菌糸を形成するのでこの菌糸を除去し、未分化な分生子が選出できる。選出された分生子は目的の栄養を付加した培地で培養することで栄養要求性株を作出できる (Oda *et al.*, 1963; 五味, 1989)。

第2章では、TCP 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、麹菌 *Aspergillus oryzae* は TCP 存在下でどのような生育特徴を示すか調査した。*A. oryzae* を TCP 存在下で液体培地で培養した結果、急激に菌糸の生育が抑制される TCP 濃度を特定した (Endo *et al.*, 2021)。そのような急激に TCP の毒性を受ける濃度では、麹菌は一旦生育を止め、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いると推測された。TCP を無毒化しにくい $\Delta omtT$ 株のような TCA 生産が低下している TCP 感受性株にも、急激に TCP の毒性を受ける濃度があり、この TCP 濃度から生育が遅い株を選抜することで、カビ臭を生成しにくい麹菌を作出できる可能性がある。

TCP メチル化能が低い麹菌株を作出するにあたって、例えば *A. oryzae* RIB40 株に遺伝子操作を行う際には適したマーカー遺伝子がないため、遺伝子改変を行うことは極めて困難である。そのため、麹菌の遺伝子改変には遺伝子操作がしやすいように、もともとマーカー遺伝子の *adeA* などを欠失している菌株の *A. oryzae* NSR- Δ ID2 株などに、マーカー遺伝子 (*adeA* など) を適宜選択し、相補させて使用される。しかし、遺伝子組換え菌株は使用場所や扱いが制限されるため実用的ではない。そのため、麹菌から実用性の高い有用菌株を作出することはとても困難である。

そこで、本章では、TCP 存在下で Δ *omtT* 株の生育が対照の *A. oryzae* NSR- Δ ID2 株に *adeA* を相補させた *adeA*⁺ 株に比べて生育の遅れる培養条件を検討し、TCP メチル化能が低い麹菌株のスクリーニング条件を決定した。最後に、本スクリーニング条件の実用性を検討するために、*A. oryzae* の実用菌株からカビ臭の生成を抑制した菌株の作出を行った。また、得られた菌株については全ゲノム解析などを行い、カビ臭非生産株としての遺伝子的な裏付けをするとともに、 α -アミラーゼなどの酵素活性等の清酒醸造麹菌としての評価を行った。さらに、作出した麹菌株で清酒小仕込み試験を行い清酒中の TCA 生成量及び一般成分を測定し、TCA 低生産麹菌株の作出と育種の可能性について考察した。

【材料と方法】

菌株と培地

菌株は *A. oryzae* RIB40, *A. oryzae* NSR- Δ 1D2 (*niaD*⁻ *sC*⁻ *adeA*⁻ Δ *ligD*) の遺伝子破壊株 Δ *omtT* (*A. oryzae* NSR- Δ 1D2 Δ AO090010000551::*adeA*), 及び遺伝子破壊の親株 (*A. oryzae* NSR- Δ 1D2::*adeA* (以下 *adeA*⁺)) の 3 株を必要に応じて使用した (遠藤ら, 2011)。培地は米麴エキス培地 (RKE) を用いた。液体培地は RKE の Brix を 3% に, 寒天培地は 10% に調整した。また, Sigma-Aldrich 社製の TCP を必要に応じて培地に添加した。

清酒小仕込み試験には, 日本醸造協会から頒布される, きょうかい酵母®1801 号 (K-1801) を使用した。酵母の培養には YPD 培地 (2% グルコース, 2% ポリペプトン, 1% 酵母エキス) を使用した。

液体培地での菌体重量の測定

第 2 章で示した乾燥菌体重量の測定法を同様に行った。TCP (0, 1, 2, 3, 4, あるいは 5 μ g/mL) を含む RKE (Brix 3%) 30 mL に *A. oryzae* RIB40 株の分生子を 100 個/mL となるように植菌し, 100 mL バッフル付き三角フラスコにて 30°C, 130 rpm で振とう培養し 24 時間 30°C で培養した。培養液から菌体を回収し, 乾燥菌体重量を測定するには, 第 2 章で示した乾燥菌体重量の測定法を同様に行った。培養は 3 回行い, 結果は平均値で示した。

液体培地での菌糸塊面積の測定

TCP (0, 0.5, 1, あるいは 5 μ g/mL) を含む RKE (Brix 3%) 30 mL に Δ *omtT* 株及び *adeA*⁺ 株の分生子を 100 個/mL となるように植菌し, 100 mL バッフル付き三角フラスコにて 30°C, 130 rpm で振とう培養し, 14 時間後から 24 時間後まで 2 時間おきに培養液を直径 9 cm のシャーレに移して写真撮影し, 菌糸塊面積を測定した。測定にはソフトウェア Image J を用いた (Schneider *et al.*, 2012)。菌糸塊 50 個の面積を測定し, 上位と下位それぞれ 15 個を除外した 20 個の値を平均し, 1 個の値として算出した。なお, TCP (0, 1, 2, 3, 4, あるいは 5 μ g/mL) を含む RKE (Brix 3%) も *A. oryzae* RIB40 株の分生子を添加して同様に培養し 24 時間後の菌糸塊面積を測定した。それぞれ培養は 3 回行い, 結果は平均値で示した。

寒天培地での培養

直径 5 cm のシャーレに入った TCP (0, 0.5, あるいは 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む RKE (Brix 10%) の 2% 寒天培地の中央に $\Delta\text{omt}T$ 株及び adeA^+ 株の分生子を 3000 個接種して 30°C で 4 日間培養し、菌糸の生育と孢子形成状況を観察した。

麹菌の紫外線照射による変異誘発株の作製及び生存率の測定

直径 5 cm のシャーレに入った RKE 寒天培地で *A. oryzae* RIB40 株を 30°C で 7 日間培養した後、0.01% Tween 80 溶液 5 mL を加え、分生子を懸濁して回収した。分生子はメッシュサイズ 40 μm のセルストレーナー (VCS-40, AS ONE, 大阪) で濾過し、分生子懸濁液を得た。1 \times 10⁶ 個/mL に調整した分生子懸濁液を直径 3 cm のシャーレに 2.5 mL 加え、マグネチックスターラー上で攪拌しながら、クリーンベンチの 15W 殺菌ランプ (GL15, TOSHIBA, 東京) の紫外線を 20 cm の距離から 2~5 分間照射した。その後、光を 30 分間遮断し、直径 9 cm のシャーレに入った RKE 寒天培地に 0.3 mL を塗布し、30°C で 7 日間培養した。菌糸が成長し分生子を形成したら、培地に 0.01% Tween 80 溶液 10 mL を加え、分生子を懸濁して回収した。セルストレーナー VCS-40 でろ過して菌糸を除き、分生子を含んだろ液を 1430 \times g で 10 分間遠心分離し、変異誘発株の分生子懸濁液を得た。

生存率の測定には、変異誘発株の分生子懸濁液を段階的に希釈して RKE 寒天培地に塗布し、30°C で 3 日間培養後、出現したコロニーを数えた。紫外線を照射していない *A. oryzae* RIB40 株の分生子懸濁液も同様に培養しコロニーを数えた。

変異誘発株の濃縮

TCP (0.5, 1, あるいは 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む RKE (Brix 3%) 30 mL に、変異誘発株の分生子を 1 \times 10⁷ 個/mL となるように接種し、100 mL バッフル付き三角フラスコにて 30°C, 130 rpm で振とう培養した。分生子が発芽し菌糸の生育が観察された時点で、培養液をセルストレーナー VCS-40 にてろ過し、未発芽の分生子を回収した。ろ液を 1430 \times g で 10 分間遠心分離し、下層部の分生子液を約 5 mL 回収し、菌糸が現れなくなるまで液体培養を繰り返し行い、分生子を濃縮した。さらに単核化された分生子を得るため、2 つ連結させた孔径 5 μm の酢酸セルロースフィルター (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) で分生子懸濁液をろ過して、ろ液を回収した (Hara *et al.*, 2002)。回収した分生子は 1430 \times g で 10 分間遠心分離後、下層部 3 mL を回収し、直径 9 cm のシャーレに入った

RKE (Brix 10%) の 2%寒天培地に 300 μ L ずつ塗布し、コロニーが現れるまで 30°C で培養した。

変異誘発株の寒天培地におけるカビ臭生成の確認

直径 5 cm のシャーレに入った TCP (1 μ g/mL) を含む RKE (Brix 10%) の 2%寒天培地の中央に上記変異株のコロニー由来分生子を接種し、シャーレの周囲をパラフィルムで巻いて 30°C で培養した。培養 7 日後に分生子が生育した菌株のシャーレの蓋を開け、培地中のカビ臭の有無を官能検査的に確認した。分生子が生育していない菌株は一度蓋を開け、空気を入れ替えてからまた蓋をし、分生子が生育したらカビ臭の有無を確認した。

製麴試験

200 mL 三角フラスコに α 米 20 g をはかりとり、95°C で 3 時間乾熱滅菌後、放冷した。TCP (0 または 10 ng/mL) を含有した 0.05% Tween 80 水溶液に、麴菌の分生子を懸濁し、滅菌した α 米に 7 mL 添加した。分生子は α 米 1 g 当たり約 1×10^6 個となるように接種した。このフラスコを恒温恒湿機に入れ、35°C、湿度 80% で 60 時間培養し、製麴を行った。なお、三角フラスコはアルミ箔で蓋をして TCP と TCA の飛散を防ぎ、1, 6, 24, 30, 48 時間目に蓋を開け、酸素の供給と攪拌を行った。製麴は各株について 3 回行った。

米麴の TCA 含量の測定

米麴中の TCA 含量の測定は第 1 章と同様に行った。すなわち、SBSE 法で米麴中の TCA を Twister に吸着させ、吸着させた TCA を TDS システム付きガスクロマトグラフ質量分析装置にて測定した。定量は 10% アルコール水溶液を用いて 2 ng/L 及び 5 ng/L の TCA 標準溶液を調整し検量線を作成して行った。測定は 2~3 回行い、結果は平均値で示した。

米麴の各種酵素活性の測定

α -アミラーゼ、糖化力(グルコアミラーゼ活性と α -グルコシダーゼ活性合わせたもの)、及び酸性カルボキシペプチダーゼの測定は、第 1 章と同様に、キッコーマンバイオケミファ社製の各種醸造分析キットを用いた。測定は 3 回行い、結果は平均値で示した。

清酒小仕込み試験

原料米は α 米を用い、米麴は三角フラスコにて製麴した米麴を使用した。米麴には TCP を添加した米麴と TCP 無添加の米麴を使用した。小仕込みは総米 100 g の一段仕込み（麴歩合 20%，汲水歩合 130%）で行った。添加する酵母は YPD 培地で前培養した K-1801 を 8×10^5 cfu/mL となるように接種した。仕込み温度は 15°C で一定で行い、二酸化炭素を 33.5 g 発生した時点で発酵の終了とした。清酒中の一般成分である日本酒度、アルコール度、酸度、アミノ酸度の分析は、酒類総合研究所標準分析法の清酒 3-3-2, 3-4-2, 3-5-2, 及び 3-6-3,（清酒 | 酒類総合研究所標準分析法 | 独立行政法人酒類総合研究所, (<https://www.nrib.go.jp/bun/pdf/bun/nb03.pdf>) に従って測定した。TCA 量の測定は、アルコール濃度を 10% に調整した清酒を 10 mL 採取し、2 g の NaCl を添加して、1 章に示した TCA の測定と同様に Twister に TCA を吸着させ測定を行った。対照として *A. oryzae* RIB40 株で作成した米麴も同様に小仕込み試験を行った。試験は 3 回行った。

【結果及び考察】

A. oryzae の *omtT* 遺伝子破壊株の TCP 存在下における生育

第2章では、TCPを用いたスクリーニングを行うために、*A. oryzae* RIB40株の生育特性を調査した。その結果、*A. oryzae* RIB40株は、TCPを0.3 µg/mL以上を含むRKE (Brix 2%)の液体培養で有意に生育が遅れたこと、また、TCP濃度が高いほど生育が抑制されたことを述べた (Endo *et al.*, 2021)。*A. oryzae* RIB40株のTCPに対する生育特性を明らかにしたことで、TCAの生産を抑制した菌株をスクリーニングする薬剤にTCPを使用することが可能であることが示唆された。

ワインのコルク臭の原因菌のひとつである *Trichoderma longibrachiatum* (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2002)と同様に、*A. oryzae*もまた、ある程度のTCP濃度で一旦生育を弱め、TCPをTCAに変換して無毒化した後に生育する。しかし、TCPが過剰の場合は、生育許容濃度へのTCPの変換に時間がかかり、生育が不可能となると推測できる。従って、カビ臭であるTCAを生成しにくい菌株は、有毒なTCPの変換能が低く、ほかの麹菌が許容するTCP濃度を含む培地等での生育も悪くなると推測された。

そこで、さらにTCPによるスクリーニング効果を上げるために、 $\Delta omtT$ 株を用いて経時的に生育を観察した。液体培養中の菌体重量を経時的に測定することは困難なため、培養24時間目の菌体乾燥重量との関連性を調査した結果、菌糸塊面積と相関性が認められた (Fig. 3-1)。菌糸塊面積を経時的に測定し、生育を観察することが可能であった。 $\Delta omtT$ 株と親株の *adeA*⁺株を対照株として用いてTCP (0, 0.5, 1, あるいは5 µg/mL)を含むRKE (Brix 3%)で分生子を100個/mLとして24時間培養し、菌糸塊面積を経時的に測定した。その結果、TCP無添加培地では $\Delta omtT$ 株の菌糸塊面積は対照株の *adeA*⁺株と同様に、時間とともに増加した (Fig. 3-2)。一方、TCP 0.5 µg/mLを含む培地では、予想通り、対照株の *adeA*⁺株よりも $\Delta omtT$ 株の生育が遅れ、菌糸塊面積は培養開始後18-22時間で有意に小さかった ($p < 0.05$)。またTCP 1 µg/mLを含む培地では、両株とも概ね20時間以降で生育が遅れたが、菌株間の有意差はなかった ($p > 0.05$)。TCP 5 µg/mLを含む培地では両菌株とも菌糸塊面積の増大が著しく遅かった。また、データは示していないが、RKE培地濃度をBrix 2にして同様に培養しても、0.5 µg/mLで $\Delta omtT$ 株の生育は遅れた。 $\Delta omtT$ 株は、TCP 0.5 µg/mLに対して *adeA*⁺株より感受性が高かったことから、 $\Delta omtT$ 株は液体培養におけるTCPの変換 (無毒化) に寄与していることを明らかにした。

一方、第2章においては、*A. oryzae* RIB40株はRKE (Brix 10%)の寒天培地条件下では、TCP 2 µg/mL以上で菌糸の生育は遅れ、分生子も着生しにくくなり、*A. fumigatus*と*A. niger*における報告と同様に (Ruckdeschel and Renner, 1986), TCP 50 µg/mL以上の条件下では生育しなかった (Endo *et al.*, 2021)。 $\Delta omtT$ 株と対照株の*adeA*⁺株を用いて、RKE寒天培地により低濃度のTCP (0, 0.5, あるいは1 µg/mL)を添加して培養した結果、両菌株間で生育の違いは認められなかった (Fig. 3-3)。従って、寒天培地においては $\Delta omtT$ 株の親株である*adeA*⁺株よりも高いTCP感受性を確認することはできなかった。

TCPを含む液体培地で $\Delta omtT$ 株は親株の*adeA*⁺株よりも生育が遅くなることを明らかにした。TCPを無毒化しにくい $\Delta omtT$ 株はO-メチル化能が低下しているが、メチル化に関与する他の遺伝子は欠損していない為、TCP存在下でも生育が可能であったと推測された。以上の結果から、カビ臭を生成しにくい変異株の作出条件としては、低濃度のTCPを含む液体培養を用いて、生育の違いを利用することにより、スクリーニングが可能であることが示唆された。

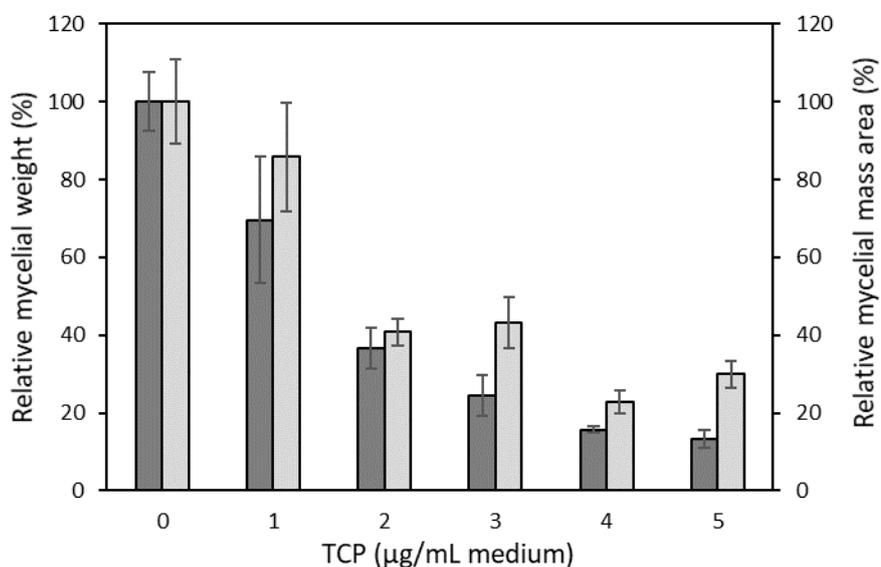


Fig. 3-1. Effect of 2,4,6-trichlorophenol (TCP) on mycelial growth of *Aspergillus oryzae* RIB 40 in liquid medium in terms of mycelial dry weight and mycelial mass area.

Conidia were cultured in rice-*koji* extract media containing 0, 1, 2, 3, 4, 5 µg/mL of TCP for 24 hours. The relative mycelial weight means the ratio of mycelial dry weight in each medium containing TCP compared with that in the control medium without TCP. The relative mycelial mass area means the ratio of mycelial mass areas in each medium containing TCP compared with that in the control medium without TCP. Data are expressed as means \pm standard deviations of three independent experiments. Symbols: black bars, mycelial dry weight; gray bars, mycelial mass area

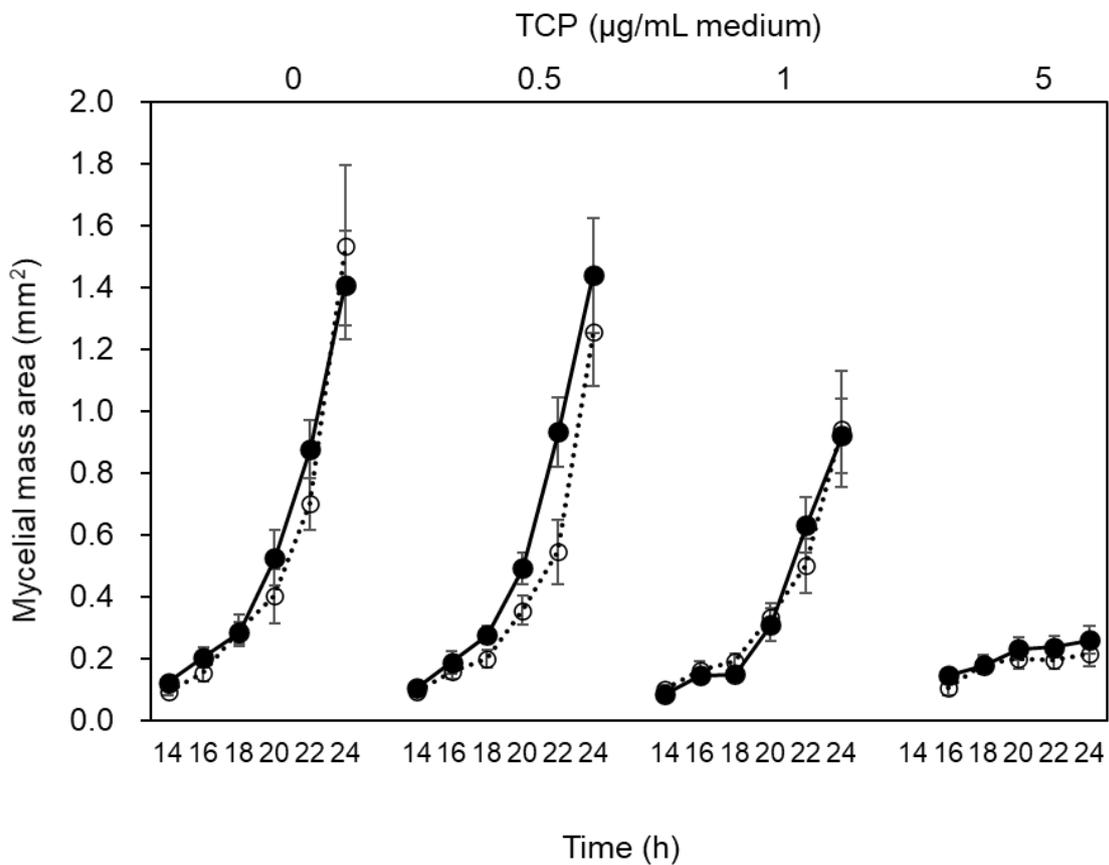


Fig. 3-2. Effect of *O*-methyltransferase gene disruption on mycelial growth of *Aspergillus oryzae* in liquid media containing 2,4,6-trichlorophenol (TCP).

Conidia were cultured in rice-*koji* extract media containing 0, 0.5, 1, 5 µg/mL of TCP for 24 hours. Mycelial mass areas are expressed as means \pm standard deviations of three independent experiments. Symbols: solid circles, a non-disrupted control strain; open circles, an *O*-methyltransferase gene disruptant ($\Delta omtT$).

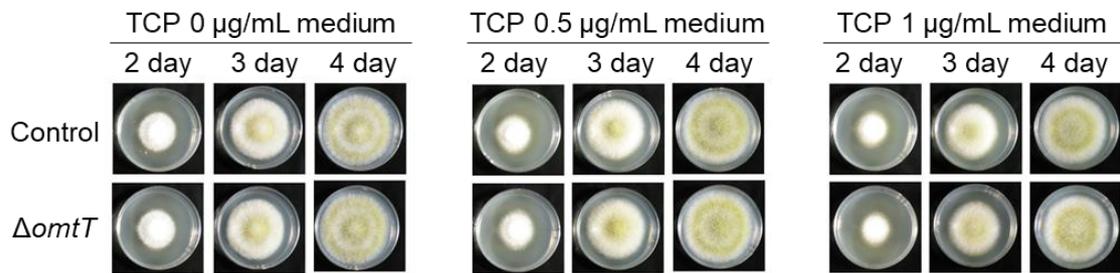


Fig. 3-3. Effect of *O*-methyltransferase gene disruption on mycelial growth and conidia formation of *Aspergillus oryzae* on agar media containing 2,4,6-trichlorophenol (TCP). A non-disrupted control strain (Control), and an *O*-methyltransferase gene disruptant (ΔomtT) were used. Conidia were cultured in rice-*koji* extract media (Brix 10%) containing TCP (0, 0.5, 1 $\mu\text{g/mL}$) for 4 days.

***A. oryzae* の変異処理と TCP 感受性株の選抜（1次スクリーニング）**

ここでは、*A. oryzae* RIB40 株から TCA 低生産麹菌を作出するための指標として TCP 感受性株を選抜するために、Fig. 3-4 に示す3段階のスクリーニングを計画した。まず、変異誘導をしても遺伝子組換え菌株とならない変異処理方法であり、最も簡易に行うことができる紫外線で *A. oryzae* RIB40 株の変異誘導を行った。一定量の菌株に変異が誘導されたか確認するためには、紫外線照射後の生存率を求めればよいとされている。例えば、*A. oryzae* の分生子は 15W 殺菌灯で紫外線を 20 cm の距離から 4~5 分間照射すると、生存率 0.1~1%（五味, 1989）、15 cm の距離から 4 分間照射すると、生存率約 0.3%になることが報告されている（山下ら, 1996）。変異条件については使用変異原等に応じた最適条件を検討する必要がある。今回、醸造に関係する他の有用遺伝子に欠損を与えないようにやや穏やかな条件になるように、クリーンベンチ内で殺菌灯の紫外線を 20 cm の距離から 2~5 分間照射した。変異処理した分生子（以下変異誘導分生子）を RKE 寒天培地で培養して、生育したコロニーを数えた結果、生存率は 0.1~8%となった。*A. nidulans* を用いた紫外線による変異株の取得においては、20~50%の生存率になるような穏やかな処理条件が良いという報告がある（Bos, 1987）。一方、生存率は 1×10^{-3} %が良いという報告もある（斎藤, 1964）。

続いて、変異誘導分生子を用いて、五味（1989）が報告した *A. oryzae* が菌糸状に生育するという形態的特徴を利用した濃縮法を参考に、変異誘導分生子の濃縮を試みた（Fig. 3-4）。具体的には、Fig. 3-2 の 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の生育特徴で示したように、TCP を添加した液体培地では、正常株は生育してペレット状になるのに対し、TCP のメチル化能が低下した分生子（菌株）は生育が遅れて菌糸が小さい、あるいは分生子のままでいると考えられる。 ΔomtT 株は 1 及び 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の TCP を含んだ培地中では親株の *adeA*⁺株と同様の生育だったことから、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度の TCP で TCA の生成を抑制した菌株を取得できると仮定している。この仮定を立証するためにも 1次スクリーニングとして、TCP（0.5, 1, あるいは 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を含む RKE（Brix 3%）液体培地に、変異誘導分生子を接種し、振とう培養した。

変異誘導分生子が発芽し、菌糸の生育が観察された時点（6~24 時間）で、培養液をろ過することにより、発芽した正常株の菌体を除いて未発芽の分生子を回収した。菌糸が現れなくなるまで液体培養を繰り返し行い、変異誘導分生子を濃縮した。その後、変異誘導分生子を RKE（Brix 10%）寒天培地に塗布して培養した。出現したコロニーの菌株は TCP 感受性株とし、出現したコロニー数を Table 3-1 に示した。取得率はそれぞれの培

地で $2.5 \times 10^{-7}\%$, $4.2 \times 10^{-7}\%$, $4.4 \times 10^{-7}\%$ だった。1 及び 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の TCP では, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に比べて発芽しない分生子が多く残った。その原因として, 1 及び 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の TCP では RIB40 株にとって死滅する程の濃度ではなく, 長時間生育を停止している濃度だと示唆した。

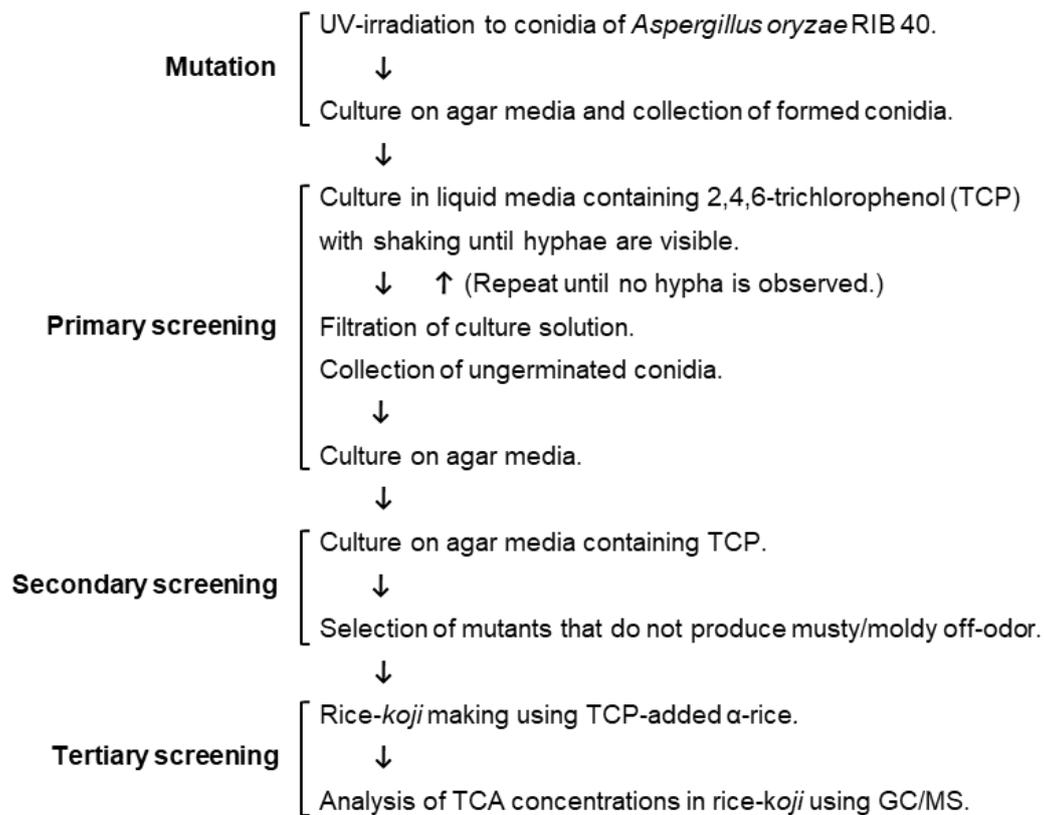


Fig. 3-4. Flowchart of procedure for acquiring *Aspergillus oryzae* mutants with low productivity of 2,4,6-trichloroanisole.

Table 3-1. Numbers of *Aspergillus oryzae* strains acquired in each screening.

Screening process	2,4,6-Trichlorophenol (TCP) added to liquid media in		
	1 st screening		
	0.5 µg/mL	1 µg/mL	5 µg/mL
Ultraviolet-treated conidia (spores)	1.7×10^{10}	9.0×10^9	2.0×10^{10}
TCP-sensitive strains (1 st screening)	42	38	88
No musty/moldy odor produced strains (2 nd screening)	13	21	36
Low 2,4,6-trichloroanisole produced strains (3 rd screening)	2	1	0
Acquisition rate (%)	1.2×10^{-8}	1.1×10^{-8}	0

カビ臭を生成しない変異株の選抜（2次スクリーニング）

1次スクリーニングで得られた TCP 感受性株からカビ臭を生成しない菌株を簡易的に選抜した。つまり、TCP を含む RKE 寒天培地の中央に分生子を接種して培養後、シャーレの蓋を開けてカビ臭の有無を確認した。その結果、カビ臭を感じなかった株は、1次スクリーニング条件の TCP 0.5 µg/mL で 42 株中 13 株、1 µg/mL で 38 株中 21 株、5 µg/mL で 88 株中 36 株だった (Table 3-1)。

米麴において TCA を生成しにくい変異株の選抜（3次スクリーニング）

2次スクリーニングでカビ臭を感じなかった TCP 感受性株と親株の *A. oryzae* RIB40 株を用いて、TCP を添加した製麴試験を実施し、麴中の TCA 量を測定した。その結果、親株と比べて TCA 生成量が有意に減少 ($p < 0.05$) したのは、1次スクリーニングでの TCA 濃度が TCP 0.5 µg/mL の場合の 2 株 (No. 0.5-4 株及び No. 0.5-6 株) と、1 µg/mL の場合の 1 株 (No. 1-7 株) のみであった。それらの TCA 生産量は親株の約 32~52%であった (Table 3-1 及び Fig. 3-5)。その他は、親株と同等である菌株が多く、中には増加している菌株も存在した。1次スクリーニングの培養条件が TCP 5 µg/mL の変異株からは、TCA 生成量が減少した菌株は得られなかった。

1次及び2次スクリーニングで選抜したカビ臭を生成しない TCP 感受性株の多くが、3次スクリーニングでは TCA を親株の *A. oryzae* RIB40 株と同等またはより多く生成した。その原因は、培養方法の違いによるものと考えられた。つまり、これらの TCP 感受性株では固体培地での培養（すなわち米麴）においては液体培地や寒天培地と異なり、メチルトランスフェラーゼが高発現したためだと推測される。

さらに、紫外線による変異導入は、ゲノム上にランダムに変異誘導を起こすため、目的の遺伝子以外の遺伝子も欠損している。そのため、TCP の O-メチル化を抑制する関連遺伝子が欠損された場合は、TCA の生成を促進する遺伝子が優勢になり TCP 耐性菌株が出現し TCP の無毒化が促進されたことも一つの要因だと推測される。

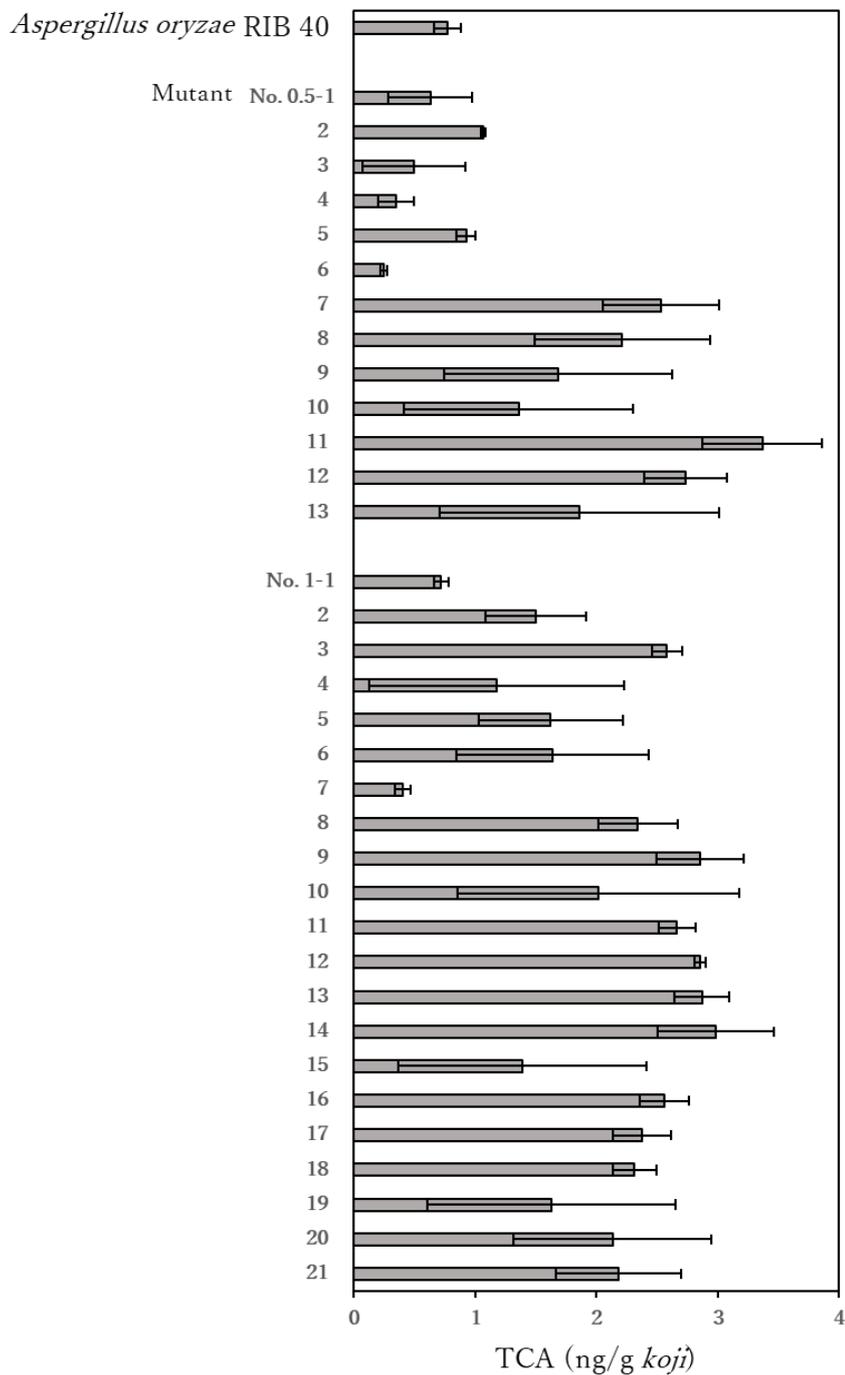


Fig. 3-5. Concentrations of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) in rice-*koji* made using *Aspergillus oryzae* mutant strains in the presence of 2,4,6-trichlorophenol.

Data are expressed as means \pm standard deviations of three independent experime.

TCA 低生産麹菌の醸造特性

作出した3株を使用して作られた米麴について、 α -アミラーゼ活性、糖化力（グルコアミラーゼ活性と α -グルコシダーゼ活性を合わせたもの）、及び酸性カルボキシペプチダーゼ活性を測定した。その結果、いずれも親株の *A. oryzae* RIB40 株と同等以上の活性を示し（Table 3-2）、清酒造りに必要な酵素を保持していた。

また、最も TCA 生成を抑制していた変異株 No. 0.5-6 株について次世代シーケンスによる全ゲノム解析を行った。その結果、親株の *A. oryzae* RIB40 株と比較して約 18 万塩基の変異が確認され、そのうち約 1.2 万の遺伝子に変異があった。第 1 章で選抜したメチル基転移酵素関連遺伝子の 76 遺伝子のうち 67 遺伝子に変異しており、アミノ酸置換を伴う変異を生じたのは 6 遺伝子だった。6 遺伝子の中には *omtT* が含まれていた。親株の *A. oryzae* RIB40 株と比較して *omtT* の推定 ORF に 3 つのアミノ酸置換を伴う変異 (V42A, L180I 及び E337D) が生じ、さらに、そのプロモーター部位にも多数の変異があった。従って、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あるいは活性が低下し、TCA 生成能が低下した可能性が推察される。

清酒小仕込み試験

TCA を含んだ米麴で清酒小仕込みを行った場合、醪中の TCA は仕込み中に揮発する。さらに醪に含まれている TCA は上槽の際には約 10% が清酒に移行し、大半は酒粕に存在することが報告されている (岩田, 2007)。今回、取得したカビ臭低生産性を示した No. 0.5-6 株を用いて清酒小仕込みを行い、清酒中の TCA 量及び一般成分を分析することで清酒醸造に利用可能か検討をした。

最も TCA 生成を抑制していた変異株の No. 0.5-6 株及び対照の *A. oryzae* RIB40 株の米麴中の TCA 量、酵素活性を Table 3-3 に、清酒中の一般成分を Table 3-4 に示した。No. 0.5-6 株の米麴中の TCA 生成量は TCP の有無にかかわらず、TCP を添加しない *A. oryzae* RIB40 株で製麴した米麴と同等で、TCA の生成を抑制していたが、 α -アミラーゼ活性および糖化力は比活性の参考値 (岩野ら, 1978) よりも低かった (Table 3-3)。清酒中の TCA 生成量については、No. 0.5-6 株で 0.77 ± 1.13 ng/L、*A. oryzae* RIB40 株で 2.88 ± 0.52 ng/L であった (Table 3-4)。一般成分のうちアルコール、酸度、アミノ酸度は全ての清酒で同等の値を示した。発酵日数は TCP を含んでいない米麴の清酒においては 19 日程度で、TCP を含んだ米麴の清酒は 1 日以上発酵が遅い傾向が認められた。

作出した No. 0.5-6 株の米麴で醸造した清酒は、TCP を添加しても TCA は閾値以下で、TCP を添加して米麴を作成した親株の *A. oryzae* RIB40 株の清酒と同等の一般成分を示した。しかし、TCP を添加することで糖化に関する酵素の α -アミラーゼ活性及び糖化力の酵素活性が低下したため、小仕込み試験では発酵が遅れた。糖化は清酒醸造で重要な働きであるため、 α -アミラーゼ活性は高い方が好ましいが、清酒の一般成分に問題は認められなかった。

本研究では、実用菌株の *A. oryzae* RIB40 株を使用して、TCP に対する生育特徴を把握することで、カビ臭低生産の変異株を濃縮し、糖化酵素の活性などの醸造特性を維持した TCA 低生産麴菌株を作出した。実用菌株から有用菌株を作出するには、マーカーとなる遺伝子が使用できないため、カビ臭低生産麴菌株として TCA 低生産性を示す遺伝子破壊株である $\Delta omiT$ 株と対照株 $adeA^+$ の生育差を明らかにし、比較的低濃度 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の TCP を添加した RKE 培地で TCP 感受性株の選抜が可能であることを見出した。この生育差を指標に紫外線照射による変異株の濃縮を行い、実用菌株 *A. oryzae* RIB40 株から TCA 生成能が低い変異株を 3 株得た。最も TCA 生産能が低い菌株の No. 0.5-6 株は、*omtI* の 3 つのアミノ酸及びプロモーターが変異していたが、酵素活性は問題なく、清酒の小仕込み試験を行っても発酵及び清酒の一般成分は対照株の *A. oryzae* RIB40 株と同等の酒質を示した。以上より、他の菌株でも本方法で TCA 低生産麴菌株の作出とその麴種は可能であることが強く示唆される。

Table 3-2. Various enzyme activities of rice-*koji*.

<i>Aspergillus oryzae</i> strain used for rice- <i>koji</i>	2,4,6-Trichlorophenol addition in rice- <i>koji</i> making	α -Amylase (U/g <i>koji</i>)	Glucoamylase + α -glucosidase (U/g <i>koji</i>)	Acid carboxypeptidase (U/g <i>koji</i>)
RIB 40		902 \pm 175	249 \pm 64	4637 \pm 536
RIB 40	+	865 \pm 89	220 \pm 42	4700 \pm 141
Mutant No. 0.5-4	+	1234 \pm 385	330 \pm 110	4880 \pm 310
Mutant No. 0.5-6	+	893 \pm 296	266 \pm 110	4784 \pm 803
Mutant No. 1-7	+	1574 \pm 56	401 \pm 15	5100 \pm 656

Values are means \pm SD (n = 3).

Table 3-3. Concentrations of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) and various enzyme activities of rice-*koji*.

<i>Aspergillus oryzae</i> strain used for rice- <i>koji</i>	2,4,6- Trichlorophenol addition in rice- <i>koji</i> making	2,4,6- Trichloroanisole (ng/g <i>koji</i>)	α -Amylase (U/g <i>koji</i>)	Glucoamylase + α -glucosidase (U/g <i>koji</i>)	Acid carboxypeptidase (U/g <i>koji</i>)
RIB 40		0.08 ± 0.01	717 ± 19	157 ± 4	3509 ± 148
Mutant No. 0.5-6		0.02 ± 0.01	721 ± 15	169 ± 3	4501 ± 41
RIB 40	+	0.29 ± 0.05	643 ± 11	139 ± 1	3211 ± 138
Mutant No. 0.5-6	+	0.07 ± 0.01	533 ± 5	122 ± 7	4129 ± 87

Values are means ± SD (n = 3).

Table 3-4. Components of sake mash fermented with low TCA-producing rice-*koji* strains.

<i>Aspergillus oryzae</i> strain used for rice- <i>koji</i>	2,4,6- Trichlorophenol addition in rice- <i>koji</i> making	2,4,6- Trichloroanisole (ng/g <i>koji</i>)	day	Sake meter (-)	Alcohol (%)	Acidity (mL)	Amino acid (mL)
RIB 40		1.55 ± 1.45	19.3 ± 0.58	5.4 ± 1.32	17.8 ± 0.21	2.7 ± 0.23	2.5 ± 0.06
Mutant No. 0.5-6		no data	19.3 ± 0.58	7.1 ± 1.31	17.9 ± 0.25	2.6 ± 0.17	2.8 ± 0.06
RIB 40	+	2.88 ± 0.52	20.7 ± 0.58	1.7 ± 1.91	17.1 ± 0.31	2.8 ± 0.10	2.5 ± 0.06
Mutant No. 0.5-6	+	0.77 ± 1.13	23.3 ± 0.58	5.2 ± 0.83	17.6 ± 0.15	2.8 ± 0.06	2.8 ± 0.12

Values are means ± SD (n = 3).

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 2,4,6-トリクロロアニソール (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。

カビ臭とは微生物が生産するカビを連想させる臭いであり、その原因物質は TCA である。TCA は前駆物質の 2,4,6-トリクロロフェノール (TCP) をカビなどの微生物がもつ酵素により *O*-メチル化することで生成される。TCP は有毒な *p*-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いた。木材に付着した微生物が有毒な TCP を無毒化することで、TCA へと変換していることが明らかとなっている (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2002)。TCA の認知閾値は清酒で 1.7 ng/L (ppt) と極めて低く、ごく微量でカビ臭を感じる (宇都宮ら, 2004)。さらに、臭い移りもしやすく、製造場内でカビ臭が発生すると、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に注意して醸造される。

ワインにおけるカビ臭発生源の調査研究から、コルク栓に付着していた微生物の *Trichoderma longibrachiatum* によって TCP から TCA へと変換されるメチル基転移酵素 (CMT1) が特定されている (Coque *et al.*, 2003)。また、清酒醸造に使用しているすべての麹菌 *Aspergillus oryzae* は TCP を TCA へと変換するメチル基転移酵素を有していることが明らかにされている (岩田ら, 2007)。清酒麹菌も TCA を生成する遺伝子を有していると推定されているが、いまだ特定されていない。また、清酒においてカビ臭の発生を防ぐために TCP が含まれていない木製用具を使用することが必要である。しかし、TCP は防カビ剤として使用されていた時期もあるため、古い醸造場の木材には TCP が含まれていることが多い。特に製麹工程では木造の室で麹菌を使って米麹がつくられるため TCA が生産されやすい環境にある。そのため、カビ臭生成能を抑制した菌株が望まれている。具体的には、麹菌の TCP の *O*-メチル化によって麹由来の TCA は生成することから、この機能を失うことでカビ臭生成を抑制することが可能であると考えられ、TCP の *O*-メチル化能が低い麹菌の育種方法について検討した。

まず第 1 章では、*A. oryzae* において TCA の生成に関与する遺伝子を同定した。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遺伝子を欠損させた菌株を作成し、TCA の生成を測定した。その結果、AO080521000231 (別名 AO090010000551, *omtT*)

を欠損させた遺伝子破壊株 ($\Delta omiT$) で TCA の生成が抑制されたことから、この遺伝子が 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唆した (遠藤ら, 2011)。また、本酵素遺伝子を破壊しても醸造に関与する有用酵素の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示唆された。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、*A. oryzae* は TCP 存在下でどのような生育特徴を示すか調査した。*A. oryzae* 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た。特に、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が明らかとなった (Endo *et al.*, 2021)。この急激に TCP の毒性を受ける濃度範囲において麹菌は生育を停止する。これは 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と推測した。第 3 章では、TCP の O-メチル化能が低い麹菌株の作出を行った。最初に TCA 低生産株である $\Delta omiT$ 株においても、TCP の毒性を受ける濃度を有する TCP 感受性であることを確認した。また、*A. oryzae* RIB40 株より TCP 低生産性菌株を作出するために、紫外線で変異処理を行い、 $\Delta omiT$ 株で検討した TCP 濃度で生育が遅い分生子を濃縮し、寒天培養でカビ臭の有無を判断後、製麹試験にて TCA の生成を測定した (Endo *et al.*, *in press*)。本方法で、実用菌株から酵素活性や醸造特性を保持したままの TCP の生産が低下した菌株を 3 株得た。最も TCA の生成を抑制した菌株 (No. 0.5-6 株) は、紫外線を 5 分間照射 (生存率 0.1%) し、TCP 濃度 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の RKE 液体培養で TCP 感受性株の分生子を濃縮することで作出された。TCA 低生産麹菌株は、TCP 感受性であるため TCP を含んだ液体培養下では菌糸を形成しにくい形態的性質を利用することで作出が可能であった。

TCA 低生産麹菌を作出するには以下の 3 工程を行った。①変異誘発 ②TCP を含んだ液体培養による TCP 感受性株の濃縮 ③製麹試験による米麹中の TCA 量の測定及び酵素活性の確認, である。TCA 低生産株を作出する際に最も重要なのは TCP を用いることだが、さらに効率よく TCP 感受性株の選抜率を上げるためには、5 μm のフィルターを使う事、製麹試験を行う前にカビ臭の有無の確認を取得プロセスに組み込んだ。①の変異誘発では最も TCA 生成量が低下した変異株 No. 0.5-6 株の生存率が 0.1%であったが、ゲノム解析で *A. oryzae* RIB40 の総塩基数約 37 万 bp 中、約 18 万 bp の変異があっても製麹及び酵素活性に問題はなかった。生存率 0.1%であれば製麹に有用な酵素を失活させることなく変

異株を取得することが可能である。②の変異誘発株から TCA 低生産変異株を選抜するには、菌糸の生育が遅くなる 0.5 µg/mL 程度の TCP を含む RKE (Brix 3%) で分生子の濃縮を行う。さらに、濃縮の最後には、5 µm のフィルターを使用して TCP 感受性を現しやすすい単核の分生子のみを回収する。これは TCP 感受性が劣性であるため多核の状態では表現されにくいいため、単核の分生子のみを回収をする。さらに、カビ臭がしない菌株を簡単に選抜するためには、TCP を含有した寒天培地に単核化した誘発株を 1 株ずつ培養し、カビ臭がしない菌株を官能的に絞り込むことで可能となる。③製麴試験は、揮発性成分である TCA の飛散を防ぐとともに、通気の良い三角フラスコを用いて密閉製麴を行った。TCA の測定は SBSE 法で測定したが、固相マイクロ抽出法 (Solid Phase Micro Extraction, SPME) (向井ら, 2015) でも測定可能である。

本法により、実用菌株から TCA 低生産麴菌株に成功した。今後、様々な種麴菌株から TCA 低生産麴菌株を作出することが望まれる。特に、多くの種麴は複数の麴菌を混ぜ合わせて使用するため、使用するすべての麴菌株で TCA の生成能力が低下した菌株を使用する必要がある。そのため、種麴菌は醸造特性に優れており、有力な遺伝子を欠損させることなく TCA 低生産性の麴菌変異株を作出しなければならず、本論文で作成したプロセスでも菌株取得率が悪い点においては課題が残る。本方法の紫外線照射最大時間 5 分、0.5~5 µg/mL の TCP で濃縮した菌株の各種酵素活性を測定した結果から醸造特性は保持されていた。本条件であれば、醸造特性を保持したままで TCA 低生産麴菌の作出が可能であると推察した。また、将来的にゲノム編集技術を麴菌に応用することで簡単に解決されるかもしれない。しかしながら、現状として遺伝子組換え技術によらない取得方法であるため、そのまま醸造現場で使用することが可能であることに利点がある。また、カビ臭問題は食品業界全体の問題であり、適切に条件を設定することで、他の *Aspergillus* 属麴菌への応用も可能であると考えられる。

参考文献

- Álvarez-Rodríguez, M. L., López-Ocaña, L., López-Coronado, J. M., Rodríguez, E., Martínez, M. J. Larriba, G., and Coque, J.J.R. (2002) Cork taint of wines: role of the filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by *O* methylation of 2,4,6-trichlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 5860-5869.
- Aung, L.H., Smilanick, J.L., Vail, P.V., Hartsell, P.L., and Gomez, E. (1996) Investigations into the origin of chloroanisoles causing musty off-flavor of raisins. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3294-3296.
- Bai, X., Zhang, T., Qu, Z., Li, H., and Yang, Z. (2017) Contribution of filamentous fungi to the musty odorant 2,4,6-trichloroanisole in water supply reservoirs and associated drinking water treat plants. *Chemosphere*. **182**, 223-230.
- Bos C. J. (1987) Induction and isolation of mutants in fungi at low mutagen doses. *Curr. Genet.*, **12**, 471-474.
- Buser H.R., Zanier C., and Tanner H. (1982) Identification of 2,4,6-trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine. *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 359-362.
- Coque, J.J.R., Álvarez-Rodríguez, M.L., and Larriba, G. (2003) Characterization of an inducible chlorophenol *O*-methyltransferase from *Trichoderma longibrachiatum* involved in the formation of chloroanisoles and determination of its role in cork taint of wines.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5089-5095.
- Cserjesi, A. J., and Johnson, E. L. (1972) Methylation of pentachlorophenol by *Trichoderma virgatum*. *Can. J. Microbiol.*, **18**, 45-49.
- Endo, M., Matsui, C., Maeta, N., Uehara, Y., Matsuda, R., Fujii, Y., Fujita, A., Fujii, T., and Yamada, O. (2021) Growth characteristics of *Aspergillus oryzae* in the presence of 2,4,6-trichlorophenol. *J. Gen Appl. Microbiol.*, **67**, 256-259.
- Engel. C., Groot. A. P. D., and Weurman, C. (1966) Tetrachloroanisole: A source of musty taste in eggs and broilers. *Science*, **154**, 270-271.
- Feltre, R., Álvarez-Rodríguez, M.L., Barreiro, C., Godio R.P., and Coque, J.J.R. (2010) Characterization of a novel 2,4,6-trichlorophenol- inducible gene encoding chlorophenol *O*-methyltransferase from *Trichoderma longibrachiatum* responsible for

- the formation of chloroanisoles and detoxification of chlorophenols. *Fungal Genet. Biol.*, **47**, 458-467.
- Fujii, F., Ozeki, K., Kanda, A., Hamachi, M., and Nunokawa, Y. (1992) A simple method for the determination of grown mycelial content in rice-*koji* using commercial cell wall lytic enzyme, yatalase. *J. Brew. Soc. Japan.*, **87**, 757-759
- Gee, J. M., and Peel, J.L. (1974) Metabolism of 2,3,4,6-Tetrachlorophenol by Microorganisms from Broiler House Litter. *Microbiology*, **85**, 237-243.
- Hara, S., Tsuji, R. F., Hatamoto, O., and Masuda, T. (2002) A simple method for enrichment of uninucleate conidia of *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 693-696.
- Hayasaka, Y., Kevin M., Gayle, A. B., Randell, L. T., and Alan, P.P. (2003) Application of stir bar sorptive extraction for wine analysis. *Anal. Bioanal. Chem.*, **375**, 948-955.
- Hill, J. L., Hocking, A. D., Whitfield, F. B. (1995) The role of fungi in the production of chloroanisoles in general purpose freight containers. *Food Chemistry.*, **54**,161-166.
- Ishida, H., Hata, Y., Ichikawa, E., Kawato, A., Sugitani, K., and Imayasu, S. (1998) Regulation of the Glucoamylase-encoding gene (*gluB*), expressed in solid-state culture (*koji*) of *Aspergillus oryzae*. **86**, 301-307.
- Karlsson, S., Kaugare, S., Grimvall, A., Borén, H., and Sävenhed, R. (1995) Formation of 2,4,6-trichlorophenol and 2,4,6-trichloroanisole during treatment and distribution of drinking water. *Water Sci. Tehnol.*, **31**, 99-103.
- Koji, T., Kadooka, C., Kkomohara, M., Onitsuka, S., Tanimura, M., Muroi, Y., Kurazono, Y., Shiraishi, Y., Kazuhiro, I, Onoue, M., Okutsu, K., Yoshizaki, Y., Takamine, K., Futagami, T., Mori, K., and Takaki, H. (2017) Characterization of amylolytic enzyme overproducing mutant of *Aspergillus luchuensis* obtained by ion beam mutagenesis. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **63**, 339-346.
- Kringstad, K. P., and Lindström. K., (1984) Spent liquors from pulp bleaching. *Environ Sci Technol.*, **18**, 236A-248A
- Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi,

- T., Takeuchi, M., Denning, D. W., Galagan, J. E., Nierman, W. C., Yu, J., Archer, D. B., Bennett, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Fedorova, N. D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P. R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J. R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N., and Kikuchi, H. (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, **438**, 1157–1161.
- Maggi, L., Mazzoleni, V., Fumi, M.D., and Salinas, M.R. (2008) Transformation ability of fungi isolated from cork and grape to produce 2,4,6-trichloroanisole from 2,4,6-trichlorophenol. *Food additives and contaminants*, **25**, 265-269.
- Maruyama, J. and Kitamoto, K. (2008) Multiple gene disruptions by marker recycling highly efficient gene-targeting background (Δ *ligD*) in *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Lett.*, **30**, 1811-1817.
- Maruyama, J., Nakajima, H., and Kitamoto, K. (2000) Visualization of Nuclei in *Aspergillus oryzae* with EGFP and Analysis of the Number of Nuclei in Each Conidium by FACS. *J. Biosci. Bioeng.*, **65**, 1504-1510.
- Matsushima, K., Chang, P. K., Yu, J., Abe, K., Bhatnagar, D., and Cleveland, T. (2001) Pre-termination in *aflR* of *Aspergillus sojae* inhibits aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. microbiol.*, **55**, 585–589.
- Miki, A., Isogai, A., Utsunomiya, H., and Iwata, H. (2005) Identification of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) causing a musty/muddy off-flavor in sake and its production in rice *koji* and *moromi* mash. *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 178-183.
- Miyazawa, K., Yoshimi, A, Zhang. S., Sano, M., Nakayama, M., Gomi, k., and Abe, K. (2016) Increased enzyme production under liquid culture conditions in the industrial fungus *Aspergillus oryzae* by disruption of the genes encoding cell wall α -1,3-glucan synthase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**. 1853-1863.
- Nyström, A., Grimvall, A., Krantz-Rülcker, C., Sävenhed, R., and Åkerstrand, K. (1992) Drinking-water off-flavor caused by 2,4,6-trichloroanisole. *Water Sci. Technol.*, **25**,

241-249.

- Obata, H., Ishida, H., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., Akao, T., Akita, O., and 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.
- Ochiai, N., Sasamoto, K., Takino, M., Yamashita, S., Daishima, S., Arnd, H and Andreas, H. (2001) Determination of trace amounts of off-flavor compounds in drinking water by stir bar sorptive extraction and thermal desorption GC-MS. *Analyst.* **126**, 1652-1657.
- Oda, K. and Iguchi, N. (1963) Genetic and Biochemical Studies on the Formation of Protease in *Aspergillus sojae*: Part I. Genetic Studies Part II. Biochemical Studies (1). *Agric. Biol. Chem.*, **27**, 758-772.
- Reissig, J. L., Storminger, J. L, and Leloir, L. F. (1955) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J Biol Chem.* **217**. 959-66.
- Ruckdeschel, G. and Renner, G. (1986) Effects of pentachlorophenol and some of its known and possible metabolites on fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 1370-1372.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods.* **9**. 671-675
- Soleas, G. J., Yan, J., Seaver, T., and Goldberg, D. M. (2002) Method for the gas chromatographic assay with mass selective detection of trichloro compounds in corks and wines applied to elucidate the potential cause of cork taint. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1032-1039
- Spadone, J. C., Takeoka, G., and Liardon, R., (1990). Analytical investigation of Rio off-flavor in green coffee. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 226-233.
- Tindale, C. R., Whitfield, F. B., Levingston, S.D., and Nguyen, T. H. L. (1989). Fungi isolated from packaging materials: Their role in the production of 2, 4, 6-trichloroanisole. *J. Sci. Food Agric.*, **49**, 437-447.
- Tominaga, M., Lee, Y. H., Hayashi, R., Suzuki, T., Yamada, O., Sakamoto, K., Gotoh, K., and Akita, O. (2006) Molecular analysis of an Inactive Aflatoxin Biosynthesis Gene Cluster in *Aspergillus oryzae* RIB Strains. *Appl. Environ. microbiol.*, **72**, 484-490.
- Toyoshima, Y., Takahashi, A., Tanaka, H., Watanabe, J., Mogi, Y. *et al.* (2012) Lethal and

- mutagenic effects of ion beams and gamma-rays in *Aspergillus oryzae*. *Mutation Research.*, **740**, 43-49.
- Vlachos, P., Stathatos, E., Lyberatos, G., and Lianos, P. (2008) Gas-phase photocatalytic degradation of 2,4,6-trichloroanisole in the presence of a nanocrystalline titania film. Applications to the treatment of cork stoppers. *Catal. Commun.*, **9**, 1987-1990.
- Whitfield, F.B., Nguyen, T.H.L. and Last, J.H. (1991), Effect of relative humidity and chlorophenol content on the fungal conversion of chlorophenols to chloroanisoles in fibreboard cartons containing dried fruit. *J. Sci. Food Agric.*, **54**, 595-604.
- Yamada, O., Takara, R., Hamada, R., Hayashi, R., Takahara, M., and Mikami, S. (2011) Molecular biological researches of Kuro-*Koji* molds, their classification and safety. *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 233-237.
- Yoshimura, F. (1936) The Action of Copper and Manganese upon the Formation and Color of Conidium of Some Species of *Aspergillus*. *J. Fac. Sci., Hokkaido Univ.*, Ser. 5, Botany, **4**, 117-139.
- Zhang, K., Luo, Z., Zhang, T., Mao, M., and Fu, J. (2016) Study on formation of 2,4,6-trichloroanisole by microbial *O*-methylation of 2,4,6-trichlorophenol in lake water. *Environ. Pollut.*, **219**, 228-234.
- 秋山裕一, 長沢 稔 (1961) 製麴と CO₂ との関係についての一考察. 醸協. **69**, 1046-1042.
- 池澤和美 (2000) 栃木県食品工業指導所研究報告, 14, 26-28.
- 一島英治 (2006) 麴菌は国菌である. 醸協. **101**. 798-799.
- 一島英治 (2009) 農芸化学と産業-“国菌”コウジキンの研究. 化学と生物. **47**. 499-505.
- 石川雄章(2009) 増補改訂 清酒製造技術. 公益財団法人日本醸造協会, 102-157.
- 岩下和裕, 大北由佳, 河野美乃里, 西浦未華, 富村健太, 坂本和俊, 山田 修, 三上重明
(2007) 米麴作りのポストゲノム解析. 第 59 回日本生物工学会大会講演要旨集, **162**
- 岩野君夫, 布川弥太郎 (1978) 清酒醸造に関連する所酵素の研究 (第 11 報) . 醸協, **73**.
555-557.
- 岩田 博, 三木淳史, 磯谷敦子, 宇都宮 仁 (2007) 清酒中のカビ臭汚染経路の解明とその防止法. 醸協, **102**, 90-97.
- 岩田 博, 神田涼子, 遠藤路子, 藤田晃子, 磯谷敦子 (2009) 全国新酒鑑評会出品酒におけるカビ臭汚染 (TCA,TBA) の状況. 醸協, **104**, 777-786.

- 宇都宮 仁, 磯谷敦子, 岩田 博 (2004) 清酒に添加した匂い物質の閾値 (第1報). 醸協, **99**, 652-658
- 宇都宮 仁 (2007) 清酒の官能評価に関わるにおい・かおりについて. におい・かおり環境学会誌, **38**, 352-360
- 宇都宮 仁 (2012) パネルによる官能特性表現. 化学と生物, **50**, 897-903.
- 遠藤路子, 藤田晃子, 磯谷敦子, 神田涼子, 岩下和裕, 山田 修, 岩田 博, 須藤茂俊 (2011) カビ臭の生成に関与する麴菌のメチル基転移酵素遺伝子の探索. 醸協, **8**, 556-561.
- 岡崎直人, 弘中吉雄, 嶋崎順一, 菅間誠之助 (1978) 蒸米上における麴菌の増殖 (第3報) α 米を用いる標準製麴法の設定. 醸協, **73**, 402-404.
- 奥田将生, 上用みどり, 福田 央, 後藤奈美 (2014) 精米による酒造用原料米の向き元素濃度の変化. 醸協. **109**, 887-990.
- 奥田将生, 上用みどり, 福田 央, 後藤奈美 (2015) 清酒製造における無機元素原料米から清酒への移行. 醸協, **110**, 357-367.
- 小野寺祐夫, 加藤淳子, 掃部関陽子, 石倉俊治 (1977) 塩素処理による水中有機物の化学変化 (第2報) フェノールおよびクロロフェノールに対する遊離型残留塩素の作用. 衛生化学, **23**, 331-338.
- 柏木 豊 (2020) 味噌醸造における麴菌. 日本海水学会誌, **74**, 92-98.
- 北本勝ひこ, 丸山潤一 (2006) 発酵・醸造食品の最新技術と機能性. (シーエムシー出版, 東京), 95-103
- 五味勝也 (1989) 麴菌のアミノ酸要求株の取得法. 醸協, **84**, 465-470.
- 斎藤日向 (1964) 微生物突然変異の取り方. 化学と生物, **2**, 212-218.
- 佐藤 信, 川嶋 宏 (2007) 増補改訂 最新酒造講本. 公益財団法人日本醸造協会, 231
- 但馬良一, 馬場亜希, 峯 孝則, 天知輝夫, 増田正裕, 泉 哲男 (1994) 食品へのカビ臭移行防止 (第2報) 移行メカニズム解明とその対策. 日本包装学会誌, **3**, 45-55.
- 但馬良一 (2012) コルクからのカビ臭原因物質 (ハロアニソール) 除去技術. 醸協, **107**, 177-184.
- 西島基弘 (2004) 食品に関わるカビ臭 (TCA) その原因と対策. 特定非営利活動法人日本国際生命科学協会. 2-6
- 秦 洋二 (2002) 麴菌の固体培養での遺伝子発現特性. 日本農芸学会誌, **76**, 715-718.
- 馬場亜希, 西端綾子, 田島良一, 峯 孝則, 天知輝夫, 増田正裕, 泉 哲男 (1994) 食品への

- カビ臭移行防止（第1報）カビ臭関連物質（TCA,TCP）の同時定量方確立と物流使用材中の含有量実態調査. 日本包装学会誌, **3**, 35-44.
- 原昌道, 菅間誠之助, 村上英也 (1975) メバロン酸非生産麹菌変異株による清酒醸造試験. 醗酵工学, **53**, 12-17.
- 向井伸彦, 韓 錦順, 山田 修, 家藤治幸. (2015) ヘッドスペース固相マイクロ抽出とガスクロマトグラフ質量分析計による単式蒸留焼酎中の 2,4,6-トリクロロアニソール (TCA) の分析と汚染状況. 醸協, **110**, 453-458.
- 村上英也, 大脇京子. (1963) 製麹による麹の褐変と新菌株の出現 黄麹菌の諸性質(2). 醸協, **58**, 156-565.
- 村上英也 (1987) 麹学. 日本醸造学会, 89
- 柳内敏靖, 福田 潔, 清川良文, 若井芳則 (1993) 製麹における炭酸ガスの影響. 醸協, **88**, 475-481.
- 山下伸雄, 窪寺隆文 (2006) 清酒麹菌の分生子育種に関する研究. 生物工学会誌, **84**, 89-95.
- 吉澤 淑 (1995) 酒の科学. 朝倉書店. 80.
- Enzyme Nomenclature, (<https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>) (2021.12.01)
- CAoGD, (<https://nribf21.nrib.go.jp/CAoGD/>) (2010.12.19)
- 鑑評会 | 独立行政法人酒類総合研究所, (<https://www.nrib.go.jp/data/kan/shinshu/analysis.html>) (2021.12.01)
- 麹菌 EST データベース | 独立行政法人酒類総合研究所, (<http://nribf2.nrib.go.jp/EST2/index.html>) (2010.12.20)
- 固体こうじ | 酒類総合研究所標準分析法 | 独立行政法人酒類総合研究所, (<https://www.nrib.go.jp/bun/pdf/bun/nb111.pdf>) (2021.12.01)
- 清酒 | 酒類総合研究所標準分析法 | 独立行政法人酒類総合研究所, (<https://www.nrib.go.jp/bun/pdf/bun/nb03.pdf>) (2021.12.01)
- 認定薬剤, 認定規程等 | 公益社団法人日本木材保存協会 (<http://www.mokuzaihozon.org/info/yakuzai/>) (2021.12.01)
- 2,4,6-trichlorophenol | National Library of Medicine, (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6914>) (2021.12.01)

謝辞

本論文を作成するにあたり、多くの方々にご指導とご助言を賜りましたことを、心より感謝申し上げます。

主査として審査を快くお引き受け頂き、助言、激励いただいた、日本大学文理学部生命科学科 澤田博司教授には言葉では表現できないほど心より感謝の意を表します。副査として快く審査をお引き受け頂いた日本大学文理学部化学科 垣田浩孝教授、生命科学科 岩本政明教授に御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、終始有益なご助言、ご指導、ご教示を頂きました米子工業高等専門学校物質工学科 藤井雄三教授、独立行政法人酒類総合研究所 品質・評価研究部門 部門長 山田修先生、副部門長 藤田晃子先生、並びに醸造技術研究部門 副部門長 磯谷敦子先生に深く感謝致します。また、酒類総合研究所 岩田博先生、須藤茂俊先生、藤井力先生、岩下和裕先生、奥田将生先生にはご指導賜りました。

本研究の共同研究者として酒類総合研究所 池田優理子博士、神田涼子さん、寺田聡子さん、米子工業高等専門学校物質工学科学生の伊藤蓮さん、松井千佳さん、伊勢綾加さん、前田菜緒美さん、大山美里さん、植田真也さん、山村萌衣さん、上原由梨奈さん、松田稜哉さん、金田侑貴さん、前田瞳さんには実験にご協力いただきました。本実験を行うことができたのは皆様のご協力があったからです。本当にありがとうございました。

本学位取得にあたり、日本大学文理学部化学科 藤森裕基教授、米子工業高等専門学校物質工学科 青木薫教授には親身になりご指導いただきました。心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり惜しみないご協力、応援をいただきました、米子工業高等専門学校・物質工学科、寮務部、地域テクノセンター、ソフトテニス部顧問の皆様には厚く御礼申し上げます。

最後に、長年の間、私の研究生生活を見守り、支え、応援してくださいました父、母に心より感謝します。ありがとうございました。