

論文の内容の要旨

氏名：片岡 涼輔

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* による香気物質 1-octen-3-ol 生合成機構の解析

序論

泡盛は沖縄県を代表する蒸留酒であり、その製法における特徴の一つは黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* を用いることである。泡盛醸造は、まずインディカ種の米を用いて蒸米を調製し、ここに黒麹菌の種麹を加え、適切に温度と湿度を制御することにより製麹を行う。出来上がった米麹に水、酵母を加えてもろみとし、このもろみを 2 週間程度保温し、アルコール発酵を進行する。その後、単式蒸留によって得られた蒸留液が泡盛となる。泡盛醸造における黒麹菌の役割は、原料米の糖化、ならびにもろみの腐敗を抑制するクエン酸の生産である。泡盛醸造では、全ての原料（蒸米）に対して黒麹菌を生育させる”全麹仕込み”という特徴的な仕込み方法が用いられる。清酒や本格焼酎の醸造では、一部の原料穀物に対してのみ製麹を行うため、泡盛は他の酒類と比較して、黒麹菌の代謝産物が最終産物の酒質に強く反映されると考えられる。

最近、黒麹菌が泡盛における香気物質生成にも関与することが注目されている。1-octen-3-ol（慣用名；マツタケオール）は、泡盛の特徴香を示す化合物の一つとして報告されている。本化合物は 100 ng/L という低い濃度で調味液の風味に影響を与えるとの報告がある。泡盛中の 1-octen-3-ol の濃度は 100 ng/L をはるかに超えるため、本化合物は泡盛の官能特性に影響を与えていることが指摘されている。また、1-octen-3-ol は、*Aspergillus* 属糸状菌を含む真菌によって生成されることが報告されている。このことから、泡盛に含まれる 1-octen-3-ol は黒麹菌によって生産されていることが疑われたが、その詳細は明らかではなかった。

真菌は多くの揮発性 C8 化合物を生成するが、中でも 1-octen-3-ol の生成については、*Aspergillus* 属糸状菌とキノコ類で報告されている。*A. luchuensis* を接種したコーヒー豆から 1-octen-3-ol が検出されたとの報告があるが、その生合成機構は不明であった。近年、*Aspergillus nidulans* において、リノール酸を基質として、脂肪酸オキシゲナーゼ Ppo (Psi producing oxygenase) が関与する 2 段階の反応で 1-octen-3-ol が生成される経路が提案されている。この予測経路において、1-octen-3-ol はオキシリピンの副産物として生産されると考えられている。オキシリピンは真菌の増殖と分化のシグナル伝達分子として機能する脂肪酸酸化物の総称であり、*A. nidulans* では有性生殖と無性生殖の制御に関与することが指摘されている。1-octen-3-ol はそれらの機能に影響を与えている可能性があるが、黒麹菌が本化合物を生産する生理学的意義は不明である。

上記の研究背景を踏まえ、本研究では、泡盛の実醸造における製麹工程を念頭に、黒麹菌による 1-octen-3-ol 生産を米麹にて確認した。次に、黒麹菌における 1-octen-3-ol 生合成機構を解明するために、黒麹菌のゲノムデータベースから 1-octen-3-ol 生合成に関連すると予想される遺伝子を探索し、当該遺伝子の破壊株ならびに過剰発現株を構築した。得られた形質転換体を用いて 1-octen-3-ol 生合成に対する各遺伝子の機能解析を行った。さらに、試験醸造を実施し、泡盛に含まれる 1-octen-3-ol に対する黒麹菌の役割に関して醸造的観点から知見を得た。最後に、1-octen-3-ol 生合成関連遺伝子の発現制御機構を解析した。

第1章 米麴における黒麴菌の 1-octen-3-ol 生合成必須遺伝子の探索

黒麴菌を用いて調製した米麴に対して SPME-GCMS 分析を行った結果、1-octen-3-ol 生産が確認されたため、本菌による 1-octen-3-ol 生合成機構に関する研究を開始した。*A. nidulans* 等の知見から、その生合成には脂肪酸オキシゲナーゼ Ppo の関与が予想された。その予測経路によれば、Ppo はリノール酸を基質として中間体ヒドロペルオキシドを生成し、この中間体にヒドロペルオキシドリアーゼ Hpl が作用することにより 1-octen-3-ol が生成されると考えられている。また、Ppo の基質であるリノール酸を生合成するオレイン酸デサチュラーゼ OdeA の関与が疑われた。そこで、黒麴菌ゲノムデータベースを用いた関連遺伝子の探索を行った結果、*Alppo* (*AlppoA*, *AlppoC*, *AlppoD*)、*Alhpl* (*Alhpl1*, *Alhpl2*)、*AlodeA* を見出した。

脂肪酸オキシゲナーゼ Ppo は、*Aspergillus* 属糸状菌において 4 種類 PpoA、B、C、D が報告されている。これらの Ppo はいずれも N 末端領域にヘムペルオキシダーゼドメイン、C 末端領域にシトクロム P450 ドメインが保存されており、それらの活性部位のアミノ酸配列の違いにより PpoA-D に分類される。代表的な *Aspergillus* 属糸状菌について、Ppo の保有パターンを調べたところ、種によってその保有パターンは異なることが明らかとなった。*Aspergillus* 属糸状菌における Ppo の系統樹は、系統解析ソフトウェア MEGA X を用いて作製した。その結果、PpoA、PpoC、PpoD は独立したクレードを形成し、各クレード内に今回見出された黒麴菌の各種 *Alppo* も含まれることが確認された。

次に 3 種類の *Alppo* 遺伝子破壊株 (Δ *Alppo* 株) および過剰発現株 (OE*Alppo* 株) を構築し、得られた菌株を用いて麴を調製した。麴における各株の 1-octen-3-ol 生産量を麴に含まれる菌体量あたりで評価した結果、 Δ *AlppoA* 株は親株の 1.22 倍、 Δ *AlppoD* 株は親株の 1.40 倍の生産量を示したが、 Δ *AlppoC* 株の麴からは 1-octen-3-ol は検出されなかった。したがって、*AlppoC* は 1-octen-3-ol 生合成必須因子であることが明らかになった。一方、*Alppo* 過剰発現株を用いて調製した麴における 1-octen-3-ol 生産量は、OE*AlppoC* 株で最も高く、OE*AlppoA* 株、OE*AlppoD* 株では、親株をわずかに下回ることが示された。これらのことから、*AlppoC* は 1-octen-3-ol 生合成に直接的に関与する遺伝子であることが確認された。また、*AlppoA*、*AlppoD* の遺伝子破壊によって 1-octen-3-ol 生産量は増加傾向にあるのに対して、これらの過剰発現によって 1-octen-3-ol 生産量は低下傾向が認められた。したがって、*AlppoA*、*AlppoD* は、1-octen-3-ol 生合成を負に制御していることが示唆された。

次に、製麴過程における 1-octen-3-ol 生合成と各 *Alppo* 遺伝子の発現動態との関連性について検討した。全 96 時間の製麴過程における 1-octen-3-ol 生産量は、培養 27 時間までに急激な増加を示した後、48 時間以降では減少していくことが明らかとなった。各 *Alppo* の発現動態を比較すると、いずれの *Alppo* 遺伝子とも培養後期である 48 時間以降に発現上昇が確認されたが、*AlppoC* は培養初期である 19 時間後に最も高い発現量を示したことから、1-octen-3-ol 産生における *AlppoC* の発現の関与が改めて確認された。

AlodeA 遺伝子破壊株 (Δ *AlodeA* 株) における 1-octen-3-ol 生産量を検討した結果、 Δ *AlodeA* 破壊株の生産量は親株の 3 分の 1 以下まで低下した。この結果は、黒麴菌細胞内のリノール酸生合成能力の欠損が 1-octen-3-ol 生産性を大幅に低下させることを示唆した。即ち、黒麴菌を用いて製麴した米麴に含まれる 1-octen-3-ol の大部分は、黒麴菌の脂肪酸合成経路によって細胞内で生合成されたリノール酸を基質として生合成されることが示唆された。2 種類の *Alhpl* (*Alhpl1*, *Alhpl2*) 遺伝子破壊株 (Δ *Alhpl* 株) を構築し、1-octen-3-ol 生産性への関与を検討した。 Δ *Alhpl* 株はいずれも親株と同程度の生産量を示し、*hpl* 単独の破壊では 1-octen-3-ol 生合成に影響を及ぼさないことが示された。

第2章 泡盛に含まれる 1-octen-3-ol に対する黒麹菌の役割に関する醸造学的解析

泡盛実醸造の観点から、最終産物に含まれる香气成分に対する黒麹菌の影響を評価することは極めて重要である。そこで、 $\Delta Alppo$ 株を用いて泡盛の小仕込み試験を実施し、得られた蒸留液、即ち泡盛中の香气成分 1-octen-3-ol の含有量に対する各 *Alppo* 破壊の影響を調べた。

各 *Alppo* 遺伝子破壊株を用いて調製した麴、泡盛酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Aw101 株、水を用いてもろみを調製した。このもろみの重量を発酵開始から 24 時間ごとに測定し、アルコール発酵時の二酸化炭素生成によるもろみ重量の減少を確認した。もろみの発酵終了時のアルコール濃度は約 16.0% であり、アルコール発酵の進行速度について菌株間に明確な違いは確認されなかった。水蒸気蒸留装置を用いて、発酵後の各もろみ全量を蒸留した。即ち、約 180 g のもろみを常圧蒸留し、約 90 mL の蒸留液を採取した。各蒸留液中のアルコール濃度は約 28.4% であり、アルコール濃度に対する各遺伝子破壊の影響は観察されなかった。

各蒸留液におけるアルコール濃度が 20% になるように加水した後、SPME-GCMS 分析により 1-octen-3-ol 濃度を定量した。 $\Delta AlppoA$ 株、 $\Delta AlppoD$ 株から得られた蒸留液における 1-octen-3-ol 濃度は親株の 1.2 倍であったのに対し、 $\Delta AlppoC$ 株から得られた蒸留液からは、1-octen-3-ol は検出されなかった。1-octen-3-ol 以外の主要な香气成分は、カプロン酸エチル、カプリル酸エチル、 β -フェネチルアルコールが検出された。これらの化合物の検出値について、親株および各 *Alppo* 破壊株から得られた蒸留液の間に有意差は認められなかった。 $\Delta AlppoC$ 株から得られた蒸留液において 1-octen-3-ol が検出されなかったことから、製麴後の泡盛醸造プロセスにおいて、1-octen-3-ol の生産性に影響を与える因子は存在しないことが示唆された。したがって、*AlppoC* は泡盛醸造過程における 1-octen-3-ol の生産に重要な役割を果たしていることが改めて確認された。

第3章 黒麹菌転写因子破壊株ライブラリーを用いた 1-octen-3-ol 生合成関連遺伝子の発現制御機構の解析

ここまでの検討により、黒麹菌における 1-octen-3-ol 生合成には脂肪酸オキシゲナーゼ *AlppoC* が必須であることが明らかとなったことから、*AlppoC* の発現制御は 1-octen-3-ol 生産性を制御する上で重要であると考えられた。そこで、酒類総合研究所より分与された黒麹菌転写因子破壊株ライブラリー 114 株を用いて製麴した各麴における 1-octen-3-ol 含有量を調べ、1-octen-3-ol 生合成の制御に関与する転写因子の選抜を試みた。その結果、親株に対して含有量が 2 分の 1 以下に減少したライブラリー株は 16 株、2 倍以上に増加したライブラリー株は 2 株選抜された。1-octen-3-ol 含有量が低下したライブラリー株の中には分子形成に関わる転写因子破壊株が複数存在した。一方で、最も含有量の増加を確認した菌株は *nsdD* 破壊株 ($\Delta nsdD$ 株) であった。*NsdD* は糸状菌の有性生殖と無性生殖の制御に関わる転写因子として知られている。*Ppo* が関与して生産されるオキシリピン類化合物は菌類の分化に関わることが指摘されており、オキシリピン生合成と *NsdD* の関連性についても注目される。そこで、 $\Delta nsdD$ 株を用いて製麴した麴における 1-octen-3-ol 生産量の経時変化および *AlppoC* の発現動態について検討した。

$\Delta nsdD$ 株を用いて製麴した麴における 1-octen-3-ol 生産量を、菌体量あたりで評価した。その結果、 $\Delta nsdD$ 株の 1-octen-3-ol 生産量は、全 96 時間における製麴過程のどの時間においても実験室株である NBRC 4314 株の生産量を上回っていた。中でも、培養 48 時間における $\Delta nsdD$ 株の 1-octen-3-ol 生産量は、実験室株と比較して 4.4 倍高い値を示した。また、 $\Delta nsdD$ 株における *AlppoC* の発現動態は、実験室株と同様の傾向を示し、培養前半である 19 時間および 27 時間においてその発現が高いことが明らかとなった。各培養時間における

AlppoC 発現量を比較してみると、 $\Delta nsdD$ 株における *AlppoC* の発現量は、製麴過程全体にわたって実験室株における *AlppoC* の発現量を上回っていた。この結果は、*nsdD* は製麴過程において *AlppoC* の発現を負に制御する転写因子であり、*nsdD* 破壊によって *AlppoC* への発現抑制が解除された結果、1-octen-3-ol 生産性が高まったと考えられた。したがって、*nsdD* は *AlppoC* の発現制御を介して 1-octen-3-ol 生合成を制御する転写因子であることが示唆された。

AlppoC の発現を負に制御していた *nsdD* は、菌類の有性生殖における菌核形成を制御する転写因子である。また、*Aspergillus* 属糸状菌が生産するオキシリピンは、有性生殖調節因子である *nsdD* の発現を負に制御することが報告されている。さらに、オキシリピンは無性生殖（分生子形成）調節因子の一つである *brlA* の発現を正に制御することが報告されている。これらのことから、*brlA* も *AlppoC* の発現制御に関わっている可能性があると考えた。実験室株である黒麹菌 NBRC 4314 株を用いて製麴した麴における *AlppoC* の発現動態と *AlppoC* の制御が推測される *brlA* の発現動態を解析した。その結果、*AlppoC* と *brlA* の発現変動は同様の傾向を示していた。以上の結果から、黒麹菌において、有性生殖および無性生殖に関与することが予想される転写因子が *AlppoC* の発現制御を介して 1-octen-3-ol 生産を制御していることが示唆された。このことは、黒麹菌が 1-octen-3-ol を生産する生理学的意義を理解する上で重要な手がかりとなる可能性があると考えている。

総括

本研究によって、黒麹菌を用いて製麴した米麴において黒麹菌が 1-octen-3-ol を生産すること、製麴後の醸造工程には 1-octen-3-ol を生成する因子は存在しないことが確認された。黒麹菌による 1-octen-3-ol 生合成には脂肪酸オキシゲナーゼ *AlppoC* が必須因子であり、その反応基質として考えられていたリノール酸の多くは黒麹菌の細胞内における脂肪酸生合成経路により供給されていることが示唆された。1-octen-3-ol 生合成の中核を担う *AlppoC* 遺伝子の発現制御には、黒麹菌の有性生活環ならびに無性生活環の制御に関与することが予想される転写因子である *nsdD* や *brlA* が関与していることが示唆された。

これまでに、麹菌が生産する香気物質に着目して醸造飲食品の製造に応用させた例はあるが、香気物質の生合成経路を科学的に理解した上で応用した例は稀有である。製麴工程では一般に、原料中の基質の分解に重きが置かれているが、今後は本研究を一例として、麹菌由来の香気物質の生産性を制御すること、並びにこれら機能を高めた育種菌株を利用した風味嗜好性の高い醸造飲食品の開発に発展することが期待される。