

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

日本大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源利用科学専攻

博士後期課程

片岡 涼輔

2021

# 目次

序論	1-9
本論	
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	10-77
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験方法	
1. 供試菌株及び培養・製麴	
2. 1-octen-3-ol 生合成関連遺伝子の配列情報の取得	
3. 各遺伝子における分子系統解析およびドメイン解析	
4. 各遺伝子破壊株および過剰発現株の構築	
5. 麴に含まれる菌体量の定量	
6. 麴に含まれる香気物質の抽出	
7. GCMS を用いた香気物質の分析	
8. 麴からの RNA 抽出	
9. RT-qPCR 法による遺伝子発現解析	
第 3 節 実験結果	
1. 麴における 1-octen-3-ol 生産性の確認	
2. 1-octen-3-ol 生合成関連遺伝子の配列情報の取得および解析	
3. 脂肪酸オキシゲナーゼ <i>Alppo</i> 遺伝子の破壊および過剰発現による 1-octen-3-ol 生合成への影響の解析	
4. ヒドロペルオキシドリアーゼ <i>Alhpl</i> 遺伝子破壊による 1-octen-3-ol 生合成への影響の解析	

5. オレイン酸デサチュラーゼ *AlodeA* 遺伝子破壊による 1-octen-3-ol 生合成への影響の解析

#### 第 4 節 考察

### 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 78-92

#### 第 1 節 緒言

#### 第 2 節 実験方法

1. 供試菌株及び培養
2. 泡盛小仕込み試験
3. SPME-GCMS 法を用いた揮発性物質の分析

#### 第 3 節 実験結果

1. 黒麹菌の脂肪酸オキシゲナーゼ破壊株を用いた泡盛小仕込み試験
2. 蒸留液に含まれる揮発性物質の分析

#### 第 4 節 考察

### 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 93-108

#### 第 1 節 緒言

#### 第 2 節 実験方法

1. 供試菌株及び培養・製麹
2. 香気物質の抽出および GCMS を用いた分析
3. 麹からの RNA 抽出および RT-qPCR 法による遺伝子発現解析

### 第3節 実験結果

1. 黒麹菌転写因子破壊株ライブラリーを用いて作製した麹における香気物質の分析
2. 1-octen-3-ol 生産に関与する転写因子破壊株における生合成関連遺伝子の発現解析
3. 製麹過程における生活環の制御に関わる転写因子 *brlA* の発現動態の解析

### 第4節 考察

総合考察	109-114
引用文献	115-123
謝辞	124

# 序論

## 泡盛醸造と香気成分

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 *Saccharomyces cerevisiae* 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。

近年、泡盛における香気成分の解析が行われており、泡盛の特徴香として 1-octen-3-ol やバニリンが報告されている(1,2)。特に泡盛に含まれる 1-octen-3-ol は、焼酎の10倍以上であるとの報告がある(1)。さらに、黒麹菌の全麹仕込みで醸造した蒸留酒は、白麹菌 *A. luchuensis* mut. *kawachii* (*A. kawachii*) の全麹仕込みで醸造した蒸留酒と比較して、1-octen-3-ol が100倍以上多く含まれることが報告されている(3)。この結果は、泡盛の特徴香である 1-octen-3-ol の生合成には黒麹菌は関与しているが、白麹菌は関与していないことを示唆している。これらのことから、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予想されるが、その詳細は明らかではなかった。

## 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis*

黒麹菌 *A. luchuensis* は、特徴的な黒色の分生子を形成する他、原料米のデンプンを分解する  $\alpha$ -アミラーゼ活性が高い。また、清酒醸造などに用いられる黄麹菌 *Aspergillus oryzae* と比べ、クエン酸生産性が高いためもろみの雑菌汚染を抑制することができる。近年まで黒麹菌は *Aspergillus niger* の近縁種、あるいは異名同種であると考えられていたが、マイコトキシン生産性や複数の遺伝子の塩基配列の比較解析から異なる集団に分類されると報告された (4)。また、焼酎醸造に広く用いられている白麹菌 *A. kawachii* は、黒麹菌のアルビノ変異株であり、分生子の色素合成能が失われており白色の分生子を形成する麹菌の一種である。泡盛醸造においては、沖縄県唯一の種麹製造業者である石川種麹店が製造する 2 種類の黒麹菌株 *A. luchuensis* var. *awamori* (ISH1 株) 及び *A. luchuensis* var. *saitoi* (ISH2 株) を混合した種麹が広く用いられている。*A. luchuensis* var. *saitoi* を使用して調製した米麹の酸度は、*A. luchuensis* var. *awamori* よりも高いと報告されている (5)。この 2 菌株による種麹は、およそ 7 割以上の泡盛酒造所で使用されており、泡盛醸造に使用されている黒麹菌の菌株数は非常に少ない状況にある。これは、醸造における麹菌は「原料の分解者」であり、酒質への影響は少ないという認識が強かったためであると理解することができる。したがって、各黒麹菌株の使用が泡盛の酒質に対してどのような影響を与えるのかを調べることによって、目的の酒質に合わせた泡盛醸造を行うことができると考えられる。デンプン分解活性等の酒造における重要な性質は調べられてきたが、黒麹菌を含む醸造用麹菌が関連した酒類において、香気物質に与える影響についての報告例は未だ多くない状況である。

近年、泡盛の特徴香であるバニリンについて黒麹菌の関与が報告されている。バニリンを合成するための出発物質は、原料米の細胞壁に結合しているフェルラ酸である。以前の研究では、フェルラ酸は黒麹菌によって生成され

たフェルラ酸エステラーゼによって米の細胞壁から放出されることが報告されていたが (2)、最近、黒麹菌によって生成されたフェノール酸デカルボキシラーゼがフェルラ酸の 4-ビニルグアヤコールへの変換に関与していることが示された (6)。4-ビニルグアヤコールは、泡盛の熟成過程における化学反応でバニリンに変換されると考えられている。したがって、黒麹菌が生成する香気物質は泡盛の品質に影響を与えていると考えられ、生合成機構を解明することによって泡盛の品質の制御が可能になると考えられる。



## 香気成分 1-octen-3-ol

C8 の揮発性化合物である 1-octen-3-ol (慣用名 ; マツタケオール) は、きのこ様の香りを示すことが報告されている (7, 8)。本化合物は、きのこ (8-10)、ミントエッセンシャルオイル (11)、七面鳥 (12)、カツオ (13)、トリュフ (14)、植物油 (15)、清酒 (16) など様々な食品に含まれている。1-octen-3-ol 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 (17)。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 (3, 18)。また、1-octen-3-ol は、多くの真菌によって生成されることが報告されている。真菌の中でも *Aspergillus* 属糸状菌においては、*A. niger* (19)、*Aspergillus ochraceus* (19)、*Aspergillus parasiticus* (19)、*A. oryzae* (20)、*Aspergillus nidulans* (21)、*Aspergillus fumigatus* (22)、*Aspergillus flavus* (23)、*Aspergillus sojae* (24) などで 1-octen-3-ol の生成が報告されている。*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 (25)。1-octen-3-ol は、真菌において分生子形成の誘導 (26) や胞子の発芽の阻害 (27) に関連することが報告されている。*A. nidulans* では、1-octen-3-ol が関与するシグナル伝達経路を介して、分生子密度が高い条件下で、菌糸の成長が抑制されることが報告されている (21)。

### *Aspergillus* 属糸状菌における 1-octen-3-ol 生合成経路

近年、*A. 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 (Fig. 0) (28)。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。

オキシリピンは脂肪酸酸化物の総称であり、その種類は数百種類にも及ぶ。また、炎症、抗炎症、神経保護等の様々な生理機能に関与することが知られている。真菌におけるオキシリピンは、主にオレイン酸、リノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸を基質として生合成される(29)。オキシリピンは、糸状菌に対して、細胞の成長、有性生殖と無性生殖の制御、アポトーシスに関与するだけでなく、病原性真菌の感染を媒介する因子でもある (29)。

*Aspergillus* 属糸状菌では、4 種類の Ppo (PpoA、PpoB、PpoC、PpoD) が同定されており、PpoA および PpoC はオキシリピンや 1-octen-3-ol の生合成に関与していると報告されている (30)。1-octen-3-ol 生合成において、1 段階目の反応として Ppo がリノール酸の C-8 位または C-10 位でラジカル生成と酸素原子の挿入に関与し、その結果、8-HPODE (hydroperoxyoctadecadienoic acid) と 10-HPODE が生成される (28)。そして 2 段階目の反応として、10-HPODE の一部は、10-octadecynoic acid と 1-octen-3-ol に変換される (28)。8-HPODE および 10-HPODE からは PpoA または PpoC の関与により複数の脂肪酸酸化物が生合成される。中でも 8-HPODE から生合成されると考えられている 5,8-DiHODE (dihydroxy-octadeca-9,12-dienoic acid) および 8-HODE (hydroxylinoleic acid) は、psi factor (precocious sexual inducer) と呼ばれる。これらのオキシリピン類化合物は、真菌の無性および有性生殖の両方を制御する細胞外シグナルの一つである (28)。*A. nidulans* では、*ppoA* 破壊により分生子形成量が増加し、*ppoC* 破壊により分生子形成量の低下および子嚢形成量の増加が報告された (34)。このことから、Ppo が関与して生合成される psi

factor は有性生殖調節因子 NsdD や無性生殖調節因子 BrlA による発現制御との関連が示唆されている (34)。

最近、マツタケ *Tricholoma matsutake* において、1-octen-3-ol 生合成における 2 段階目の反応に関わると考えられるヒドロペルオキシドリアーゼ Hpl が報告された (31)。 *A. flavus* では、1-octen-3-ol 生合成に関与すると考えられる複数の Ppo 及びリポキシゲナーゼ (LOX) の候補遺伝子を破壊しても 1-octen-3-ol の生成は阻害されなかったことから、Ppo 及び LOX が関与しない別の経路の存在が指摘されている (23)。また、ヒラタケ *Pleurotus ostreatus* では、Ppo を介して生成された 10-HPODE を経て 1-octen-3-ol が生成される経路に加えてもう一つの経路が知られている。その経路とは、リノール酸から LOX によって生成された 13-HPODE を経て、1-octen-3-one が生合成され、さらに酸化還元反応により 1-octen-3-ol が生成される経路が報告されている (32)。植物においては、ヒドロペルオキシドリアーゼの働きにより 13-HPODE から C6 揮発性化合物を生成する報告がある (32)。一方で、1-octen-3-ol がヒドロペルオキシドの非酵素的開裂反応によっても生成されるという報告もある (33)。また、キノコにおいては生合成された 1-octen-3-ol や 1-octen-3-one は酸化反応や還元反応によって 3-octanol や 3-octanone に相互変換されると考えられている (32)。これらのことから、*Aspergillus* 属糸状菌における 1-octen-3-ol 生合成には Ppo や Hpl による関与が推測されるが、その詳細は依然として不明である。また、1-octen-3-ol はオキシリピンと同様に細胞の成長や生活環の制御など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。

## 本研究の目的

上記の研究背景を踏まえ、本研究では、黒麹菌が泡盛における香気物質である 1-octen-3-ol の生成に関与していると推測し、黒麹菌による泡盛中の 1-octen-3-ol 生産への関与を明らかにするとともに、その生合成機構ならびに生合成の制御機構を明らかにすることを目的とした。

まず始めに、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学的観点から知見を得た。最後に、黒麹菌転写因子破壊株ライブラリーを用いた 1-octen-3-ol 生合成関連転写因子のスクリーニングを行い、1-octen-3-ol 生合成の制御機構について検討した。

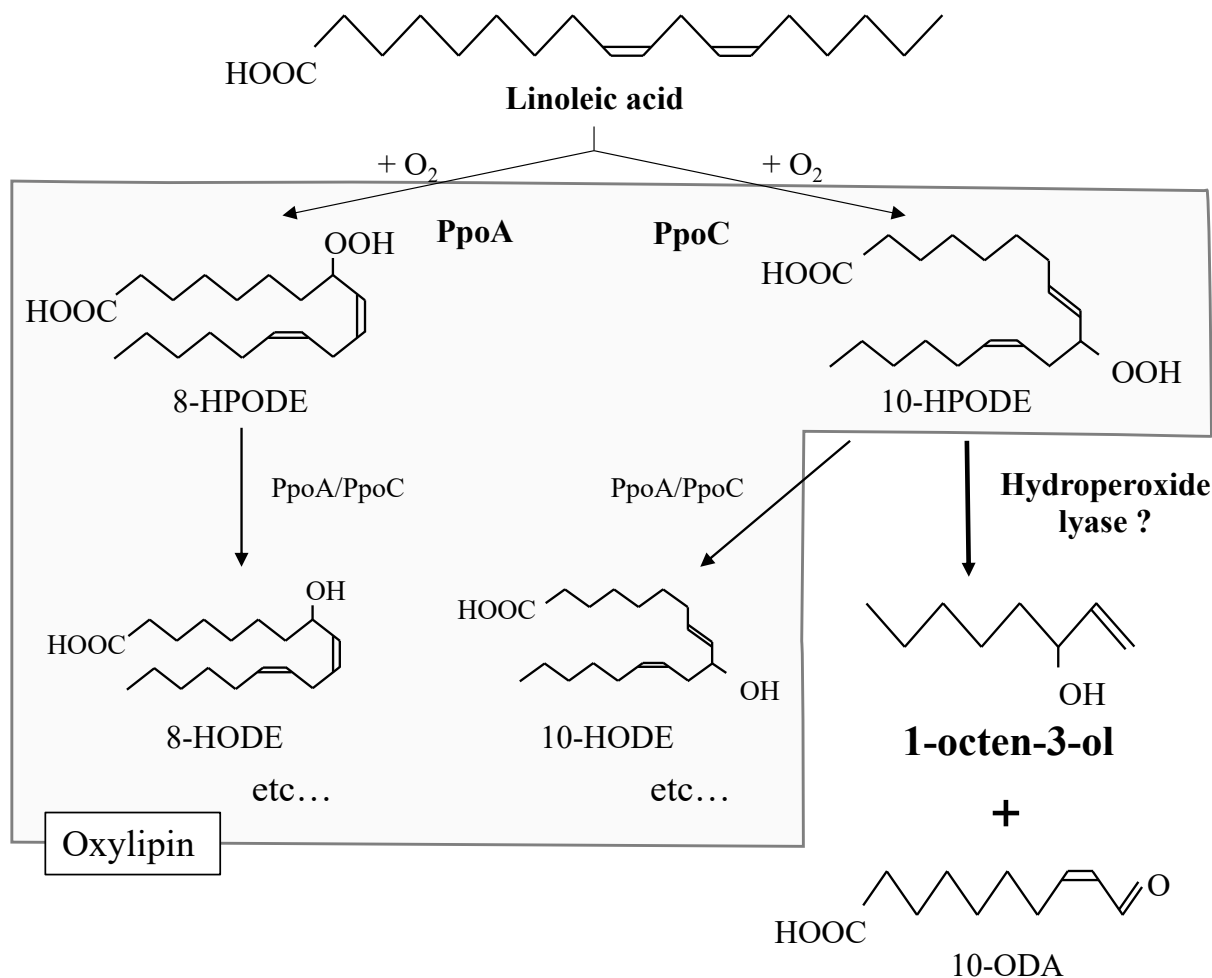


Fig. 0 黒麹菌における1-octen-3-ol生合成予想経路図

不飽和脂肪酸の一種であるリノール酸を出発物質とする2段階の反応により1-octen-3-olは生合成されと考えられる。1段階目の反応には、Ppo (psi producing oxygenase)、PpoC等の脂肪酸オキシゲナーゼが関与し、中間体が生成される。1-octen-3-olは、この中間体ヒドロペルオキシドの一種10-HPODEに対して、ヒドロペルオキシドリアーゼによる開裂反応が起こることにより生成されと考えられる。

中間体10-HPODEおよび8-HPODEはオキシリピン類の化合物であり、これらからは、PpoAまたはPpoCによって10-HODEおよび8-HODEを含む様々なオキシリピン類化合物が生合成されていると考えられる。

HPODE; hydroperoxyoctadecadienoic acid

HODE; hydroxylinoleic acid

ODA; octadecynoic acid

## 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

## 第1節 緒言

近年行われた泡盛における香気成分の解析において、1-octen-3-ol は泡盛の特徴香であると報告された (1)。また、黒麹菌と白麹菌をそれぞれ用いた全麹仕込みの蒸留酒における 1-octen-3-ol 量を比較したところ、黒麹菌で仕込んだ蒸留酒は白麹菌の蒸留酒の 100 倍以上の 1-octen-3-ol が検出されたと報告されている (3)。これらの結果は、黒麹菌が 1-octen-3-ol の生成に関与していることを強く示唆している。本章ではまず、泡盛醸造に用いられるインディカ種の米を用いて、黒麹菌で製麹した麹における 1-octen-3-ol 生産を確かめた。

近年、*A. 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 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。この反応では、中間体 10-HPODE を経て、1-octen-3-ol の生合成が推測されているが、中間体から 1-octen-3-ol への反応の詳細は不明である。一方で、マツタケ *T. matsutake* において、この反応に関わると考えられるヒドロペルオキシドリアーゼ Hpl が報告された (31)。黒麹菌ではこの 1-octen-3-ol 生合成に関与すると考えられている *ppo* や *hpl* は見出されておらず、その生合成機構も未解明である。また、1-octen-3-ol 生合成の基質と考えられているリノール酸は、黒麹菌体内において TCA 回路から得られたクエン酸を用いて飽和脂肪酸が生合成され、ステアリン酸が脂肪酸不飽和化酵素により不飽和化され、オレイン酸を経て生合成される。本経路においてオレイン酸からリノール酸へと不飽和化を行う酵素として、*odeA* が *A. nidulans* において報告されている (34)。

本章では、まず始めに *A. nidulans* の PpoA および PpoC、*A. flavus* の PpoD、*T. matsutake* の Hpl、*A. nidulans* の OdeA のアミノ酸配列情報を元に *A. luchuensis* NBRC 4314 (RIB 2604) 株全ゲノムデータベースより各遺伝子

の探索を行った。得られた配列情報から、配列の相同性及びアミノ酸配列のドメインを解析し、黒麹菌における *ppo* 遺伝子、*hpl* 遺伝子及び *odeA* を見出した。次に、これらの遺伝子が黒麹菌の 1-octen-3-ol 生合成に関与しているか明らかにするために、それぞれの遺伝子破壊株をプロトプラスト-PEG 法およびアグロバクテリウム法による形質転換によって構築した。得られた菌株を用いて調製した各麹における 1-octen-3-ol 生産量について比較することで、各遺伝子が 1-octen-3-ol 生合成に与える影響を解析した。



## 第2節 実験方法

### 1. 供試菌株及び培養・製麹

#### 1-1 供試菌株及び培養

ゲノム決定プロジェクト (35) に用いられた実験室株 *A. luchuensis* NBRC 4314 (RIB 2604) 株を野生株とし、遺伝子破壊株および過剰発現株の構築、1-octen-3-ol 生産の確認に用いた。アグロバクテリウム法 (36) による *A. luchuensis* の形質転換には宿主として *A. luchuensis* NBRC 4314 および *A. luchuensis* NBRC 4314  $\Delta$  *ligD* 株 (*A. luchuensis*  $\Delta$  *ligD* 株)、アグロバクテリウムは *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 株を使用した。

*A. luchuensis* NBRC 4314 はポテトデキストロース (PD) 寒天培地 (Becton, Dickinson and Company) で培養した。各検討における培養条件はそれぞれの段落において記載する。

本研究において使用ならびに構築した黒麹菌株を Table 1-1 に示した。

Table 1-1 本研究に用いた菌株および構築した菌株リスト

Name	Parental strain	Genotype	Reference
NBRC 4314	Wild-type		53
<i>ΔligD</i>	NBRC 4314	<i>ΔligD::ptrA</i>	39
<i>ΔAlppoA</i>	<i>ΔligD</i>	<i>ΔligD::ptrA ΔAlppoA::hph</i>	This study
<i>ΔAlppoC</i>	<i>ΔligD</i>	<i>ΔligD::ptrA ΔAlppoC::hph</i>	This study
<i>ΔAlppoD</i>	<i>ΔligD</i>	<i>ΔligD::ptrA ΔAlppoD::hph</i>	This study
<i>OEAlppoA</i>	NBRC 4314	<i>OEAlppoA::pR-OEAlppoA [P-AogIaI42::AlppoA::T-AoagA::hph]</i>	This study
<i>OEAlppoC</i>	NBRC 4314	<i>OEAlppoA::pR-OEAlppoA [P-AogIaI42::AlppoC::T-AoagA::hph]</i>	This study
<i>OEAlppoD</i>	NBRC 4314	<i>OEAlppoA::pR-OEAlppoA [P-AogIaI42::AlppoD::T-AoagA::hph]</i>	This study
<i>ΔAlodeA</i>	<i>ΔligD</i>	<i>ΔligD::ptrA ΔAlodeA::hph</i>	This study
<i>ΔAlhpl1</i>	<i>ΔligD</i>	<i>ΔligD::ptrA ΔAlhpl1::hph</i>	This study
<i>ΔAlhpl2</i>	<i>ΔligD</i>	<i>ΔligD::ptrA ΔAlhpl2::hph</i>	This study
<i>ΔnsdD</i>	<i>ΔligD</i>	<i>ΔligD::ptrA ΔnsdD::hph</i>	50

*ΔnsdD*株以外の黒麹菌転写因子ライブラリー株についても、*nsdD*と同様に*hph*を選択マーカーとして破壊株が構築された。

## 1-2 蒸米の調製および $\alpha$ 化

### ・第1章第3節1の検討における方法

蒸米の調製には市販のインディカ種の米（タイ米）を使用した。蒸米吸水率（ $[\text{蒸米重量} - \text{生米重量}] / \text{生米重量} \times 100$ ）は35%を目標とした。電子天秤を用いてタイ米を量り取り、洗米をした後に MilliQ 水を用いて 60 分間浸漬を行った。浸漬後、米に付着した水分を軽く拭き取り、乾いた蒸し布に移した。蒸し布に包んだタイ米は、市販の蒸し器（T-fal 社製 ULTRA COMPACT, VC106370）を用いて 15 分間蒸煮した。蒸煮終了後の蒸米は、クリーンベンチ内で冷却した後 500 mL 容ビーカーに移し、蒸米重量を測定した。この重量より、目標の蒸米吸水率に達しているか計算を行った。蒸米吸水率が 35% に達しない場合は、不足重量分の MilliQ 水を蒸米全体に散水し混ぜた後、10 分間浸漬を行った。その後、前述した操作と同様に 15 分間蒸煮し、放冷後に蒸米の重量を測定した。蒸米吸水率が 35% に達した蒸米を、シャーレ 1 枚あたり 10 g ずつ測り取った。

### ・第1章第3節3以降の検討における方法

麴の製麴には市販のインディカ種の米（タイ米）を $\alpha$ 化して使用した。 $\alpha$ 化の実験操作は、まずタイ米をオーブンにて 60°C で一晩乾燥させ、その後 4°C で一晩 MilliQ 水を用いて浸漬した。吸水後のタイ米は、水を切った後、甑（こしき）を用いて 1 時間蒸煮した。蒸煮後の米の重量を測定し、吸水前の米重量との差から吸水率を計算した。この時吸水率は 30% から 40% となることが望ましい。吸水率を確認した後、蒸米の粗熱を取り 60°C で乾燥させた。吸水率が 5% 以下となるまで乾燥させた後、これを $\alpha$ 化米とした。実験に使用するまで 4°C にて保存した。

## 1-3 麴の調製

・第1章第3節1の検討における方法

PD 寒天培地にて培養した菌体及び分生子を1白金耳、竹串を用いてまんべんなく蒸米に植菌した。菌体が蒸米全体に触れるようにシャーレを振り、パラフィルムを巻き空気穴を4カ所開けた。30°Cの培養室にて48時間保温し、出麴とした。1日3回シャーレを振り、蒸米を攪拌した。出麴後は15 mL容ファルコンチューブに保存し、香気物質の分析に使用するまで-80°Cで保存した。

・第1章第3節3以降の検討における方法

麴の調製は焼酎小仕込み試験を行った Setoguchi らの方法を参考にした(37)。

麴の調製には恒温恒湿機やグロースチャンバーを用いた。植菌には、あらかじめ30°C、3から4日間PD寒天培地にて生育させた菌体を用いた。菌が生育した寒天培地から分生子懸濁液を調製し、この溶液を植菌に用いた。製麴はシリコ栓をした100 mL容三角フラスコを用いて $\alpha$ 化したタイ米を10 g、 $2.5 \times 10^6$  spore/5 mLとなるように滅菌水で希釈した分生子懸濁液5 mLを添加して、よく攪拌した後に48時間培養した。製麴中の温度は38°C(0から19時間)、36°C(19から27時間)、34°C(27から48時間)で制御した。湿度は80%(0から27時間)とし、その後は制御しなかった。19時間、27時間で麴をよく攪拌した。48時間以上培養する際は、24時間ごとに麴をよく攪拌した。出麴後の麴は-80°Cにて保存した。

分生子懸濁液は以下の方法で調製した。

黒麴菌植菌後、30°Cで3~4日培養したPD寒天培地において、0.05% Tween80溶液10 mLによりコンラージ棒を用いて懸濁した。懸濁液は寒天培地からセルストレーナー(アズワン、VCX-100)を装着した50 mL容チュー

ブに移し、懸濁液中の菌糸を除去した。懸濁液に含まれる培地成分などを除去するために、遠心分離（室温、3,500 rpm、5分）を行い、上清を除去した。ペレット化した分生子を 0.05% Tween80 溶液 1 mL で再懸濁し、1.5 mL 容チューブに移した。再度、遠心分離（室温、10,000 rpm、5分）を行い、上清除去後に 0.05% Tween80 溶液 1 mL で再懸濁した。本溶液を分生子懸濁液とし、TC20 全自動セルカウンター（Bio-rad）を用いて分生子濃度を測定し、製麴に用いた。

## 2. 1-octen-3-ol 生合成関連遺伝子の配列情報の取得

### 2-1 *Aspergillus* 属における Ppo の配列情報の取得

*Aspergillus* 属における Ppo のアミノ酸配列および塩基配列の取得は、NCBI のデータベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) のキーワード検索によって得た。キーワード検索で得られない配列情報に関しては、*A. nidulans* および *A. flavus* の Ppo アミノ酸配列に基づいて、blastp 検索によってアミノ酸配列情報を取得した。黒麹菌における Ppo 配列情報は *A. luchuensis* NBRC 4314 株全ゲノムデータベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/BCWF00000000.1>) における blastp 検索を行い、得られたアミノ酸配列から tblastn 検索により、アミノ酸配列、塩基配列を取得した。*A. luchuensis* NBRC 4314 株全ゲノムデータベースより見出した各 Ppo は、それぞれ AlPpoA (NCBI における Accession 番号: GAT25971)、AlPpoC (NCBI における Accession 番号: GAT23542)、AlPpoD (NCBI における Accession 番号: GAT24722) と呼称する。

### 2-2 *A. luchuensis* NBRC 4314 株における Hpl の配列情報の取得

*T. matsutake* の Hpl 配列情報は、論文 (31) および特許情報 (<https://patents.google.com/patent/KR20140092284A/en>) から配列情報を取得した。この配列情報を元に、黒麹菌における Hpl 配列情報は *A. luchuensis* NBRC 4314 株全ゲノムデータベースにおける blastp 検索を行い、得られたアミノ酸配列から tblastn 検索により塩基配列を取得した。*A. luchuensis* NBRC 4314 株全ゲノムデータベースより見出した Hpl の配列は、それぞれ AlHpl1 (NCBI における Accession 番号: BCWF01000021 REGION: 3247420-3249216、locus tag; AA1\_Scon\_021\_1185)、AlHpl2 (NCBI における Accession 番号: BCWF01000015 REGION: 848270-850098、locus tag; AA1\_Scon\_015\_0336) と呼称する。

### 2-3 *A. luchuensis* NBRC 4314 株における OdeA の配列情報の取得

*A. nidulans* の OdeA (NCBI における Accession 番号: AAG36933) のアミノ酸配列を、NCBI のデータベースのキーワード検索によって得た。このアミノ酸配列情報に基づいて、*A. luchuensis* NBRC 4314 株全ゲノムデータベースにおける blastp 検索を行い、*A. nidulans* の OdeA に対して最も相同性が高いアミノ酸配列を取得した。得られたアミノ酸配列から tblastn 検索により、塩基配列を取得した。*A. luchuensis* NBRC 4314 株全ゲノムデータベースより見出した OdeA (NCBI における Accession 番号: GAT28472) の配列は、AlOdeA と呼称する。

### 3. 各遺伝子における分子系統解析およびドメイン解析

*Aspergillus* 属における Ppo の分子系統解析を行った。分子系統樹は系統解析ソフトウェア MEGA X (<https://www.megasoftware.net/home>) を用いて作製した。取得した各アミノ酸配列について、Inter Pro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) を用いてドメイン解析を行った。

#### 4. 各遺伝子破壊株および過剰発現株の構築

##### 4-1 *A. luchuensis* のゲノム DNA 抽出 (\*については次ページに組成を記す)

*A. luchuensis* NBRC 4314 株の分生子または菌体をポテトデキストロース (PD) 液体培地 100 mL に植菌し、30°C で 24 から 48 時間振盪培養した。培養した菌体をミラクロスで覆った漏斗で回収し、滅菌蒸留水で菌体を適度に洗浄した。洗浄後に菌体の水分を切り、乳鉢、乳棒を用いて液体窒素で凍結させた菌体を破碎した。菌体破碎物を GE Solution\* 600 µL が入った 1.5 mL 容エッペンドルフチューブに加え、懸濁した。これを恒温水槽で 60°C、60 分間インキュベートした。Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1) (PCI; (株) ニッポンジーン) 500 µL を添加し、5 分間激しく混和してタンパク質を変性させ、12,000 rpm、4°C、10 分遠心分離して水層を別のエッペンドルフチューブに回収した。ここに CI\* 500 µL を添加し、12,000 rpm、4°C、10 分遠心分離して、水層を別のエッペンドルフチューブに回収した。ここにエタ沈 Solution\* 900 µL を加え、混和した。12,000 rpm、4°C、10 分遠心分離して DNA を沈殿させた。上清を除き適度に乾燥させたら、400 µL の RNase TE\* に溶かし、溶けていることを確認してから 37°C で 30 分インキュベートし、RNA を除去した。PCI 400 µL を加えて、タンパク質を変性させ、12,000 rpm、4°C、10 分遠心分離して水層を別のエッペンドルフチューブに回収した。ここに CI を 400 µL 添加し抽出処理を行い、12,000 rpm、4°C、10 分遠心分離して水層を回収した。1 mL のエタ沈 Solution\* を加え、混和後に -80°C で 15 分放置した。12,000 rpm、4°C、10 分遠心分離で DNA を沈殿させた。上澄みを除き、70% エタノールを加え、12,000 rpm、4°C、10 分遠心分離して上清を除き乾燥させた。沈殿物を 50 µL TE\* に溶解し、BioDrop µLITE (BioDrop) で濃度、純度を測定したのち、4°C で保存した。



• 1 M Tris- HCl pH 8.0		最終濃度
Tris ベース (ナカライテスク (株))	60.55 g	1 M
MilliQ 水	up to 500 mL	
Total	500 mL	

pH は 6 N HCl を用いて調整する。

• 0.5 M EDTA pH 8.0		最終濃度
EDTA 粉末 (同仁化学研究所)	93.06 g	0.5 M
MilliQ 水	up to 500 mL	
Total	500 mL	

pH は 5 N NaOH を用いて調整する。

• TE		最終濃度
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	2 mL	0.01 M
0.5 M EDTA (pH 8.0)	0.4 mL	0.002 M
MilliQ 水	up to 200 mL	
Total	200 mL	

• SDS (10% SDS)		最終濃度
SDS (和光純薬工業 (株))	2.0 g	0.1 w/v
MilliQ 水	up to 20 mL	
Total	20 mL	

<u>Tris-フェノール</u>		最終濃度
結晶フェノール (和光純薬工業 (株))	20 mL	
8-キノリノール (和光純薬工業 (株))	0.02 g	0.1%
Total	20 mL	

1 M Tris-HCl, pH 8.0 を等量 (20 mL) 加え、静置後に上清を除去。これを二度行う。

<u>CI</u>		最終濃度
クロロホルム (和光純薬工業 (株))	24 mL	
イソアミルアルコール (和光純薬工業 (株))	1 mL	
Total	25 mL	

<u>GE Solution</u>		最終濃度
0.5 M EDTA pH 8.0	120 $\mu$ L	
10% SDS	60 $\mu$ L	
MilliQ 水	1020 $\mu$ L	
50 mg/mL Proteinase K in dH <sub>2</sub> O (Merck)	1.2 $\mu$ L	
Total	1201.2 $\mu$ L	

エタ沈 Solution	最終濃度
100% エタノール	4 mL
3 M 酢酸ナトリウム, pH 5.2	160 $\mu$ L
Total	4.16 mL

RNase TE	最終濃度
10 mg/mL RNase A (ニッポンジーン (株))	4 $\mu$ L
TE	2 mL
Total	2.004 mL

#### 4-2 プロトプラスト-PEG 法を用いた形質転換による遺伝子破壊株の構築

##### ・黒麹菌 *AlppoA*、*AlppoC* 破壊用 DNA 断片の調製

*AlppoA* 及び *AlppoC* 破壊用 DNA 断片は以下の要領で作製した。その際に使用したすべてのプライマーは Table 1-2 に記載した。

*AlppoA* 遺伝子 ORF の上流側の DNA 断片は、本章第 2 節 3-1 において取得した *A. luchuensis* NBRC 4314 ゲノム DNA を鋳型として、プライマー PalppoA-F<sub>4</sub>, Hph-PalppoA-R<sub>4</sub> を用いて PCR により増幅した。*AlppoA* 遺伝子 ORF の下流断片の増幅には、Hph-TalppoA-F<sub>4</sub>, TalppoA-R<sub>4</sub> のプライマーセットを用いた。

ハイグロマイシン B 耐性カセットは、pBA1\_hph (O. Yamada、未発表データ) プラスミドを鋳型として、プライマー PalppoA-Hph-F<sub>4</sub> および TalppoA-Hph-R<sub>4</sub> を用いて PCR により増幅した。PCR における増幅領域は、pBA1\_hph 上の *hph* (hygromycin B phosphotransferase) 遺伝子の両側にある黒麹菌由来のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (*AlgpdA*) プロモーターから、*hph* および *AlgpdA* ターミネーターまでの領域とした。増幅した DNA 断片は、fusion PCR 法 (38) により、*AlppoA* 遺伝子の ORF 上流域および下流域の間に

連結し、これを *AlppoA* 破壊用 DNA 断片とした。各 DNA 断片の増幅 (First PCR) および Fusion-PCR は Tks Gflex (Takara Bio) を用いて、一般的なプロトコールで行った。*AlppoC* 破壊用 DNA 断片も同様の手順で作製した。各 PCR における DNA 断片の増幅はアガロースゲル電気泳動にて確認した。アガロースゲルは 1% で作製し、100 V で約 30 分間電気泳動を行った。電気泳動後、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  エチジウムブロマイド染色液で 15 分染色を行い、トランスイルミネーターを用いて DNA 断片の増幅を確認した。

Table 1-2 プロトプラスト-PEG法を用いた形質転換に用いたプライマー

Main Purpose	Purpose	Primer	Sequence (5'-3')
<i>AlppoA</i> 破壊用DNA断片 作製	PalppoA 増幅	PalppoA-F <sub>4</sub>	GCTTCATCCGACAGTGTGT
		Hph-PalppoA-R <sub>4</sub>	AACGAAACGAGCTCAATTGCGTATAGGGCTAATA
	TalppoA 増幅	Hph-TalppoA-F <sub>4</sub>	GCGGTACCTTCGCCCTTCAAAATTGTTGATGAATCA
		TalppoA-R <sub>4</sub>	AAATTTCAAGTTAGCCTT
		Hph (for Δ <i>AlppoA</i> ) 増幅	TATTAGCCCTATACGCCAATTGAGCTCGTTTCGTT TGATTCATCAACAATTTGAAGGCCGAAGGTACCCG
<i>AlppoC</i> 破壊用DNA断片 作製	PalppoC 増幅	PalppoC-F <sub>4</sub>	GAGTACACAAGCGTGT
		Hph-PalppoC-R <sub>4</sub>	AACGAAACGAGCTCAAAATTATGATTATACCACCTTA
	TalppoC 増幅	Hph-TalppoC-F <sub>4</sub>	GCGGTACCTTCGCCCTTCGATGATTGAAGATCTAA
		TalppoC-R <sub>4</sub>	GAGTTGGGGTAATAATA
		Hph (for Δ <i>AlppoC</i> ) 増幅	TAAAGTGGTATAATCATAAATTGAGCTCGTTTCGTT TTTAGATCTTCAATCATCGAAGGCCGAAAGGTACCCG
<i>AlppoA</i> 破壊の確認	<i>AlppoA</i> locus増幅	PalpA-FC2	CTAGACCTGAAATAGAGTAGTGTTC
		TalpA-RC	TGAATTGATAGAAAGAGCGGAGGGGA
<i>AlppoC</i> 破壊の確認	<i>AlppoC</i> locus増幅	PalpC-FC2	TACCTGGGCCCTTACTCTTCGATC
		TalpC-RC	TGCTTTCTTGGATTGGAGGATATTTG

・プロトプラスト-PEG法を用いた *A. luchuensis* の形質転換

プロトプラスト-PEG法による形質転換には、宿主として *A. luchuensis*  $\Delta$ ligD 株を用いた。

#### *A. luchuensis* $\Delta$ ligD 株の培養

PD 寒天培地にてスラント保存していた *A. luchuensis*  $\Delta$ ligD 株を、滅菌済竹串を用いて一白金耳分かきとり、DPY 液体培地で 30°C、24 時間培養した (DPY 液体培地 100 mL×4 本)。

・DPY 液体培地		最終濃度
Dextrin (和光純薬工業 (株))	2 g	2%
Polypeptone (日本製薬(株))	1 g	1%
Yeast extract (BD 社 型番 212750)	0.5 g	0.5%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (和光純薬工業 (株))	0.5 g	0.5%
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (和光純薬工業 (株))	0.05 g	0.05%
Milli Q 水	up to 100 mL	
Total	100 mL	

細胞壁溶解酵素による菌体細胞壁の溶解 (\*については次ページ以降に組成を記す)

液体培養した菌体をオートクレーブ滅菌済のミラクロス (Merck) を装着したガラス製漏斗を用いて濾過した。ミラクロス上に溜まった菌体を滅菌済の 0.9% NaCl 約 5 mL を用いて洗浄し、菌体に付着している培地成分を除去した。菌体の水気を滅菌済みのミクロスパーテルで軽く絞り取った後、菌体重量を測定、記録した。この時点での菌体量は 0.45~0.75 g とした。なお、あらかじめミラクロスとロート、ミクロスパーテルはアルミホイルに包んでオートクレーブ処理し、自然乾燥させた後に使用した。

次に Solution 1\*を 10 mL 作製し、回収した菌体 0.45 g~0.75 g を入れ、よく混合した。この時、菌体が溶液内で均一に広がるように注意した。この Solution1 懸濁液を室温、60 rpm で 3 時間穏やかに振とうし、これをプロトプラスト溶液とした。

<u>• Solution 0 pH 5.5</u>		<u>最終濃度</u>
Maleic acid (和光純薬工業 (株))	1.16 g	50 mM
Milli Q 水	up to 200 mL	
Total	200 mL	

pH は NaOH で調整する。オートクレーブ後、室温で保存した。

<u>• Solution 1</u>		<u>最終濃度</u>
Yatalase (Takara Bio)	0.1 g	1%
Lysing enzyme (Sigma-Aldrich)	0.1 g	1%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (和光純薬工業 (株))	0.79 g	0.6 M
$\alpha$ -1,3-glucanase	2.6 $\mu$ g	
(山形大学 矢野成和准教授から供与)		
<u>Solution 0</u>	up to 10 mL	
Total	10 mL	

プロトプラストの回収及び DNA の導入

Solution 1 懸濁液を滅菌済のミラクロスで濾過した。このミラクロスの上から Solution 2\*を 10 mL 添加し、ろ液を回収した。泡立てないように静かに混和し、2,000 rpm、4°C で 8 分間遠心分離を行った。遠心分離後、上清を滅菌済スポイトで除去し、残った沈殿に 5 mL の Solution 2 を加えて、滅菌済ミスポイトで穏やかに懸濁した。2,000 rpm、4°C で 8 分間遠心分離を行った。遠心分離後、上清を滅菌済ミスポイトで除去した。沈殿に 220  $\mu$ L の Solution 2

を加え、滅菌済みスポイトを用いて懸濁した。このうち 20  $\mu\text{L}$  を 1.5 mL エッペンドルフチューブに分注した。分注した 20  $\mu\text{L}$  のうち 10  $\mu\text{L}$  をトーマ血球計算盤に滴下し、位相差顕微鏡にてプロトプラスト数を計測した（プロトプラスト濃度は  $1.0 - 5.0 \times 10^7$  プロトプラスト/mL とした）。新しい 15 mL 容 Corning チューブに 200  $\mu\text{L}$  のプロトプラスト懸濁液を移した。ここに、*AlppoA* 破壊用 DNA 断片を 10  $\mu\text{L}$  (5-10  $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ ) 加え、滅菌済みスポイトを用いて静かに混和した。これを 30 分間氷中に静置した。この間に電子レンジを用いて Top Agar\* を溶かし、滅菌済みスポイトを用いて 8 mL ずつ 15 mL 容チューブに移し、48°C のウォーターバスで保温した。氷中で静置させた懸濁液に 250  $\mu\text{L}$ 、250  $\mu\text{L}$ 、850  $\mu\text{L}$  と 3 回に分けて Solution 3\* を加えた。添加するごとに、滅菌済みスポイトで静かに混和した。この反応液を 20 分間室温で静置し、静置後に 5 mL の Solution 2 を加えて、15 mL 容チューブを上下に反転させて静かに混和した。これを 2000 rpm、4°C で 8 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を滅菌済みスポイトで除去し、沈殿に 500  $\mu\text{L}$  の Solution 2 を加え再懸濁した。48°C に保温していた Top Agar に Hygromycin B Gold (Invivo Gen) を 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度になるように添加した。この Top Agar に再懸濁溶液を加え、15 mL 容チューブを上下させ混和し、すばやく下層培地に重層した。プレートの表面を十分に乾かし、30°C で 3-7 日程度培養した。生育したコロニーに黒い分生子が生えてきた時点で、Hygromycin B Gold (Invivo Gen) 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を含む PD 寒天培地に植え継ぎを行い、形質を安定させた。

$\Delta AlppoC$  株の構築についても、*AlppoC* 破壊用 DNA 断片を用いて同様の操作を行った。



• Solution 2		最終濃度
Sorbitol (Glucitol) (ナカライテスク (株))	87.4 g	1.2 M
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (和光純薬工業 (株))	2.94 g	50 mM
NaCl (和光純薬工業 (株))	0.82 g	35 mM
1M Tris-HCl (pH7.5) (ナカライテスク (株))	4 mL	10 mM
Milli Q 水	up to 400 mL	
Total	400 mL	
• Top Agar		最終濃度
Potato Dextrose Broth (BD 社)	2.4 g	2.4%
1.2 M Sorbitol (ナカライテスク社)	21.86 g	21.86%
Agar (伊那食品工業 (株))	0.8 g	0.8%
Milli Q 水	up to 100 mL	
Total	100 mL	
• Solution 3		最終濃度
PEG 4000 (和光純薬工業 (株))	120 g	60%
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (和光純薬工業 (株))	1.47 g	50 mM
1 M Tris-HCl (pH 7.5) (ナカライテスク (株))	2 mL	10 mM
Milli Q 水	up to 200 mL	
Total	200 mL	

• Bottom Agar (下層培地)		最終濃度
Potato Dextrose Broth (BD 社)	2.4 g	2.40%
1.2 M Sorbitol (ナカライテスク (株))	21.86 g	21.86%
Agar (伊那食品工業 (株))	1.5 g	1.50%
<u>Milli Q 水</u>	<u>up to 100 mL</u>	
Total	100 mL	

オートクレーブ処理後、Hygromycin B Gold (Invivo Gen) を 50 µg / mL となるように添加し、シャーレー一枚当たりの培地量が 15 mL になるように作製した。

#### 4-3 アグロバクテリウム法を用いた形質転換による遺伝子破壊株、過剰発現株の構築

- ・ 遺伝子破壊および過剰発現に用いるプラスミドの構築

遺伝子破壊に用いたプラスミド pRIE- $\Delta$ AlppoD、pRIE- $\Delta$ Alhpl1、pRIE- $\Delta$ Alhpl2、pRIE- $\Delta$ AlodeA、遺伝子過剰発現に用いたプラスミド pR-OEAlppoA、pR-OEAlppoC、pR-OEAlppoD は以下のように作製した。全てのプライマー一覧は Table 1-3 に示す。

遺伝子破壊プラスミドについては、標的遺伝子の ORF 上流域および下流域 1 kb を *A. luchuensis* NBRC 4314 のゲノム DNA を鋳型とする PCR によって増幅した。選択マーカーとして *hph* を用いて、hygromycin B 耐性は pBA1\_ *hph* (O. Yamada, unpublished data) を制限酵素 KpnI で消化することで *hph* 断片を得た。*AlodeA* および *Alhpl* 破壊時には PCR によって *hph* 断片を得た。破壊用プラスミドのベクターとなるプラスミド pRIE を制限酵素 EcoRI で消化したものと前述の 3 断片を In fusion 法で繋げることで各遺伝子破壊用プラスミドを構築した。

遺伝子過剰発現プラスミドについては、酒類総合研究所で構築された *A. oryzae* 由来のグルコアミラーゼ遺伝子プロモーターを用いた過剰発現カセット pRglaA142 を使用した。pRglaA142 の開裂には制限酵素 SalI を使用し、In fusion 法で目的遺伝子 ORF 断片を挿入、連結した。これを各遺伝子過剰発現用プラスミド (pR-OEAlppoA、pR-OEAlppoC、pR-OEAlppoD) として以降の実験に用いた。

- ・ *A. tumefaciens* C58C1 への遺伝子破壊および過剰発現プラスミドの導入

*A. tumefaciens* C58C1 株へのプラスミドの導入はエレクトロポレーション法によって行った。エレクトロポレーションには Gene Pulser および Gene

Pulser Xcell (Bio-rad) を用いて行った。導入条件は、電圧 2.0 V、電気容量 25  $\mu$ F、抵抗値は 200  $\Omega$  もしくは $\infty$ で行った。反応液はアグロバクテリウムコンピテントセル 5  $\mu$ L、10% グリセロール 40  $\mu$ L、各プラスミド DNA 50 ng (1  $\mu$ L) を混合し、0.1 cm もしくは 0.2 cm キュベットに気泡が入らないように全量を入れ、反応を行うまで氷上で保存した。エレクトロポレーション反応後、SOC 培地 500  $\mu$ L を反応液と混合し、25°C、140 rpm で 2 時間振盪培養した。培養液 100  $\mu$ L を LB + 100  $\mu$ g/mL Kanamycin + 20  $\mu$ g/mL Rifampicin 寒天培地に塗抹した。25°C で 3~4 日培養し、カナマイシン耐性によってスクリーニングした。

・アグロバクテリウム法を用いた *A. luchuensis*  $\Delta$ ligD 株に対する遺伝子破壊株の構築

遺伝子破壊株の構築は、*A. luchuensis*  $\Delta$ ligD 株を用いてアグロバクテリウム法 (36、39) によって行った。

*A. luchuensis*  $\Delta$ ligD 株の前培養

1.5 mL チューブに 0.05% Tween 80 を 100  $\mu$ L を入れ、事前に PD 寒天培地に生育させた黒麹菌分生子を竹串でかき取り (先端に黒い分生子がついていると確認できるくらい)、1.5 mL チューブ内 0.05% Tween 80 に懸濁した。菌糸・分生子懸濁液 5.0  $\mu$ L をピペットマンで PD 寒天培地中央に滴下し、30°C で約 4 日間培養した。

*A. tumefaciens* 目的プラスミド導入株の前培養

LB + 100  $\mu$ g/mL Kanamycin + 20  $\mu$ g/mL Rifampicin 液体培地を 50 mL 容チューブに 10 mL 調製した。そこにあらかじめ LB + 100  $\mu$ g/mL Kanamycin + 20  $\mu$ g/mL Rifampicin 寒天培地に生育させたアグロバクテリウムを一白金耳分 LB + kanamycin + rifampicin 液体培地に植菌し、25°C で振盪機に斜めに固定し、

130 rpm、24 時間、振盪培養した。

感染誘導のためのアグロバクテリウムのプレインキュベーション

IM+AS 寒天培地調製のための Agar をオートクレーブ滅菌した。

・IM+AS 寒天培地用 Agar	分量 (100 mL 分)	終濃度
Agar	2 g	2%
MilliQ 水	90 mL	
Total	90 mL	

IM 液体培地及び IM+AS 寒天培地に用いる IM 寒天培地用液を調製した(以下 2 サンプル分の場合で記載)。クリーンベンチ内で以下の試薬を 50 mL 容チューブで混和し 5 mL を 2 本と 10 mL を 1 本に分注した。寒天培地用 IM 液も同様に 50 mL 容チューブに調製した。

・IM 液体培地	分量 (20 mL)
K buffer	16 $\mu$ L
MN buffer	400 $\mu$ L
1% CaCl <sub>2</sub>	20 $\mu$ L
0.01% FeSO <sub>4</sub>	160 $\mu$ L
Trace EL×200	100 $\mu$ L
20% NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	50 $\mu$ L
50% グリセロール	200 $\mu$ L
1×MES buffer	800 $\mu$ L
20% グルコース	200 $\mu$ L
滅菌水	18.054 mL
Total	20 mL

IM 寒天培地用液	分量 (9.93 mL)
K buffer	80 $\mu$ L
MN buffer	2.0 mL
1% CaCl <sub>2</sub>	100 $\mu$ L
0.01% FeSO <sub>4</sub>	1 mL
Trace EL×200	500 $\mu$ L
20% NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	250 $\mu$ L
50%グリセロール	1.0 mL
1×MES buffer	4.0 mL
20%グルコース	1.0 mL
Total	9.93 mL

1.25 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	分量 (50 mL)	終濃度
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (和光純薬工業(株))	10.885 g	1.25 M
MilliQ 水	up to 50 mL	
Total	50 mL	

K buffer (pH 4.8)	分量 (100 mL)	終濃度
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17.01 g	1.25 M
MilliQ 水	up to 100 mL	
Total	100 mL	

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> をビーカーに入れ MilliQ 水を 60 mL 加え、湯煎しながら溶解させ、1.25 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を使用して pH4.8 に調整した。

• MN buffer	分量 (100 mL)	終濃度
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O (和光純薬工業(株))	3.0 g	0.122 M
NaCl (和光純薬工業(株))	1.5 g	0.26 M
MilliQ 水	up to 100 mL	
Total	100 mL	

• 1% CaCl <sub>2</sub>	分量 (100 mL)	終濃度
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O (和光純薬工業(株))	0.1 g	6.8 mM
MilliQ 水	up to 100 mL	
Total	100 mL	

• 0.01% FeSO <sub>4</sub>	分量 (100 mL)	終濃度
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O (和光純薬工業(株))	0.1 g	3.6 mM
MilliQ 水	up to 100 mL	
Total	100 mL	

• IM Trace EL	分量 (200 mL)	終濃度
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.02 g	0.35 mM
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0.02 g	0.4 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.02 g	1.6 mM
MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0.028 g	0.6 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.02 g	0.4 mM
MilliQ 水	up to 100 mL	
Total	100 mL	

上記試薬はすべて和光純薬工業 (株)のものを使用した。

• 20% NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	分量 (100 mL)	終濃度
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (和光純薬工業(株))	20 g	2.5 M
MilliQ 水	up to 100 mL	
Total	100 mL	

• 50% グリセロール	分量 (100 mL)	
グリセロール (和光純薬工業(株))	50 mL	
MilliQ 水	up to 100 mL	
Total	100 mL	



1 M MES buffer	分量 (100 mL)	終濃度
C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> S (和光純薬工業(株))	19.5 g	1 M
MilliQ 水	up to 100 mL	
Total	100 mL	

20% グルコース	分量 (100 mL)	終濃度
グルコース (和光純薬工業(株))	20 g	1.1 M
MilliQ 水	up to 100 mL	
Total	100 mL	

0.2 M Acetosyringone は、Acetosyringone (3',5'-ジメトキシ-4'-ヒドロキシアセトフェノン、Merck) をジメチルスルホキシド (和光純薬工業(株)) で 0.2 M となるように溶解し、ろ過滅菌した後に 1 mL ずつ分注し、-20°C で遮光保存した。

使用直前に、分注された 0.2 M Acetosyringone の入ったチューブを 1 本取り出した。取り出す際は部屋の照明を落とし、すぐにアルミホイルで包んで遮光した。使用時までには氷上に保存した。氷上ではほとんど溶解しないため、使用直前に室温でしばらく放置して溶解させてから使用した。

前培養したアグロバクテリウムのチューブをインキュベーターから取り出し、インキュベーターの温度の設定を 28°C に設定した。前培養したアグロバクテリウムを 4,000 rpm、5 分で遠心分離し、培養上清を除去した。遠心分離をしている間に、アグロバクテリウム溶液の OD<sub>600</sub> を測定するために 40 倍希釈液を調製し、OD<sub>600</sub> を測定した。Blank の測定は MilliQ 水で行った。測定した濁度に基づいて、懸濁液による植菌後の IM 液体培地 5.0 mL

中において  $OD_{600}=0.3$  となるよう、使用するアグロバクテリウム懸濁液量を算出した（計算式：必要液（ $\mu\text{L}$ ） =  $37.5/\text{希釈液 } OD_{600}$ ）。

算出した必要液量のアグロバクテリウム懸濁液を新しい 1.5 mL 容チューブに分注し、遠心分離（室温、5 分、4,000 rpm）をし、上清を除去した。遠心分離中及び次の操作までに 0.2 M Acetosyringone を溶解し、5 mL に分注した IM 液体培地にこれを 5  $\mu\text{L}$  添加した。上清を除去したアグロバクテリウムペレットに先程調製した IM+AS 液体培地（5 mL）を 500  $\mu\text{L}$  用いて再懸濁し、残りの 4.5 mL の IM+AS 液体培地に懸濁液全量に戻し、植菌した。アルミホイルを巻き、28°C に設定したインキュベーター内の振とう機にチューブが真横になるように固定し、28°C、5 時間、100 rpm でプレインキュベートした。

#### IM+AS 寒天培地の作製（5 枚分）

あらかじめオートクレーブ滅菌した Agar 水を放熱し、ある程度冷めたら調製した IM 寒天培地用液と 0.2 M Acetosyringone 200  $\mu\text{L}$  を添加してシャーレに約 20 mL ずつ分注した。寒天培地の乾燥なども遮光の状態で行った。寒天培地が完成したらアルミホイルで遮光して保存した。

#### 黒麹菌分生子懸濁液の調製

*A. luchuensis* の生えた PDA 培地の菌体の生えていないところに 0.05% Tween 80 を 5.0 mL を入れ、コンラージ棒で分生子（菌糸を含む）を懸濁した。50 mL 容チューブにセルストレーナーを設置し、分生子懸濁液を注いだ。ここに、5.0 mL の 0.05% Tween 80 を加え、菌糸を除去した。分生子を含む濾液が入った 50 mL 容チューブを遠心機で遠心分離した（室温、5 分、10,000 rpm）。上清をデカンテーションで除去し、ここに 0.05% Tween 80 を 1.0 mL を入れ再懸濁した。

分生子懸濁液の濃度を測定するために、新しい 1.5 mL チューブに 0.05% Tween 80 を 990  $\mu\text{L}$ 、分生子懸濁液を 10  $\mu\text{L}$  入れ十分に懸濁した。この分生子懸濁液の 100 倍希釈液に含まれる分生子濃度をセルカウンターで測定した。最終的に、1.5 mL 容チューブに  $1.0 \times 10^7$  cells/mL になるように分生子懸濁液を調製した。

アグロバクテリウム懸濁液の調製、黒麹菌への感染および培養

アグロバクテリウム前培養液を 1 mL 取り、 $\text{OD}_{600}$  を測定した。これを参考に 800  $\mu\text{L}$  中に  $\text{OD}_{600}=0.8$  になるよう新しい 1.5 mL 容チューブで調製した。調製後、遠心分離し（室温、5 分、10,000 rpm）、上清 550  $\mu\text{L}$  を除去し、残りの 250  $\mu\text{L}$  をよく懸濁した。このアグロバクテリウム懸濁液 100  $\mu\text{L}$  と黒麹菌分生子懸濁液 100  $\mu\text{L}$  を新しい 1.5 mL 容チューブにて混合した。IM+AS 寒天培地上に、ピンセットを用いて Hybond N<sup>+</sup>膜を丁寧に敷いた。このメンブレン上に混合菌液を 100  $\mu\text{L}$  滴下し、コンラージ棒でメンブレン全体に菌液が行き渡るように塗抹した。プレート周囲にパラフィルムを巻き、アルミホイルで遮光し、25°C で 2 日間培養した。

CD + 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hygromycin + 0.2 mM cefotaxime 寒天培地に 150  $\mu\text{L}$  の抗生物質溶液をコンラージ棒で塗抹した。この上に 2 日間培養後の Hybond N<sup>+</sup>膜を滅菌ピンセットで移した。さらにこのメンブレンの上に 150  $\mu\text{L}$  の抗生物質溶液を塗り広げた。アルミホイルで遮光し、30°C で 4 日間培養した。培養後、この選択培地上に生育した形質転換体を分離した。

・ CD Trace EL	分量 (200 mL)	終濃度
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	1.76 g	0.03 M
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0.08 g	1.6 mM
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	0.011 g	0.27 mM

MnSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0.032 g	0.67 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.014 g	0.29 mM
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.2 g	3.6 mM
MilliQ 水	up to 200 mL	
Total	200 mL	

上記試薬はすべて和光純薬工業(株)のものを使用した。

<u>• CD+hygromycin+cefotaxime 寒天培地</u>	<u>分量 (100 mL)</u>	<u>終濃度</u>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (和光純薬工業(株))	0.1 g	
グルコース (和光純薬工業(株))	2.0 g	
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (和光純薬工業(株))	0.3 g	
CD Trace EL	100 μL	
KCl (和光純薬工業(株))	0.05 g	
Milli Q	up to 100 mL	
(KOH で pH 6.5 に調整)		
<u>Agar (伊那食品工業(株))</u>	<u>2.0 g</u>	<u>20 mg/mL</u>
Total	100 mL	

以下の試薬はオートクレーブ処理後に添加し、シャーレに分注した。

1 M MgSO <sub>4</sub>	200 μL	2.0 mM
50 mg/mL hygromycin B	200 μL	100 μg/mL
0.2 M cefotaxime	100 μL	0.2 mM

<u>• 抗生物質溶液</u>	<u>分量 (1.1 mL)</u>	<u>終濃度</u>
50 mg/mL hygromycin B	2.2 μL	100 μg/mL
0.2 M cefotaxime	1.1 μL	0.2 mM
10 mg/mL spectinomycin	5.8 μL	527.3 μg/mL

MilliQ 水	1090.9 $\mu\text{L}$
----------	----------------------

---

Total	1100 $\mu\text{L}$
-------	--------------------

Table 1-3 アグロバクテリウム法を用いた形質転換に用いたプライマー

Main Purpose	Purpose	Primer	Sequence (5'-3')
AlppoD 破壊用プラスミド 作製	PalppoD 増幅	pRIE-PAlppoD-F hph-PAlppoD-R	CGTTTTTAATGAATTATCAGGGCAGAGTACCAGCTTTCGG GAGCTCAATGGCCCAATTCAGGAAGCGGAGGTAAGCGGAGG
	TalppoD 増幅	hph-TAlppoD-F2 pRIE-TAlppoD-R2	TGGACCCCGAAGGGGAGCTCTACAATAATACCTCCGCC AGTTTAAACTGAATGTGCCCGAAAACCTCCATAACTCTC
	AlppoD locus 増幅	AlppoD_FC hph-166_FC AlppoD-RC	GCGTTGCAATTCCTCATGCAAGAATAATGG GTTCCGGTTTCAGGCAGGCTTTCGAAC AGTTTAAACTGAATTCCTCTCTGCTCGCTTTCCTTCCCTTG
AlppoA 過剰発現プラスミド作成	AlppoA ORF 増幅	pOEAlppoA-F pOEAlppoA-R	GTCGAAACAAGTCGAATGTCTGGCTCAAATAATCATTCATTGTGAACGGC CCGCAAGCTTGTTCGATCAGTTCGTAGCAAGACTTGGCAGATCGC
	AlppoC 過剰発現プラスミド作成	pOEAlppoC-F pOEAlppoC-R	GTCGAAACAAGTCGAATGTTCGCGAGATTCCTTCGACGTTCAAAAAATCG CCGCAAGCTTGTTCGATCAAGCAGTTGTGACCTGCCGCTTGG
AlppoD 過剰発現プラスミド作成	AlppoD ORF 増幅	pOEAlppoD-F pOEAlppoD-R	GTCGAAACAAGTCGAATGAGCTCCATTTTATTGCACCTTCCTCTGCC CCGCAAGCTTGTTCGACTAGTCTCTGCTTCTGCTTCTCTGCTTC
	各過剰発現株 の構築の確認	OEPlgaA-TagdA-FC OEPlgaA-TagdA-RC	CGCATCGTGGTTCATCGTCCACG GCTAATAGGATTCGCTTCCTGCTCAACG
AlodeA 破壊用プラスミド 作製	PalodeA 増幅	pRIE-PAlodeA-F hph-PAlodeA-R	CGTTTTTAATGAATTGCAGATTAACCTCCTAGCACCTTGCCAGATG GAGCTCAATGGCCCGGTTGAAGCTTGCCCAACAAGAATGTGTTCTCG
	hph cassette 増幅	hph cassette_pRIE-F hph cassette_pRIE-R	CGGGCCATTGAGCTCGTTTCGTTTCTTTG CGCCTTCGGGGTCCAGCCAC
	TalodeA 増幅	hph-TAlodeA-F pRIE-TAlodeA-R	TGGACCCCGAAGGGCAGCATGTCTGCTAGATAGAACGAGTGTG AGTTTAAACTGAATTTCTGGAAGGTGGGCTGAGGGG
	Alhpl1 破壊用プラスミド 作製	Palhpl1 増幅	pRIE-PAlhpl1-F hph-PAlhpl1-R
Talhpl1 増幅		hph-TAlhpl1-F pRIE-TAlhpl1-R	TGGACCCCGAAGGGCGGTTTCTGCCGCTTCGCC AGTTTAAACTGAATTTATGTAGATTTATTCCGTAGATGTCGCATGC
Palhpl2 増幅		pRIE-PAlhpl2-F hph-PAlhpl2-R	CGTTTTTAATGAATTCTGGTGAATTAATTTGTGGCAGAACTGCG GAGCTCAATGGCCCGGTTGTGTCACCCGCTGGCAG
Alhpl2 破壊用プラスミド 作製	Talhpl2 増幅	hph-TAlhpl2-F pRIE-TAlhpl2-R	TGGACCCCGAAGGGGTTAAGTGGTGGGATAATGGAAAGGG AGTTTAAACTGAATTCAGGGATAGTCAATTCGCTCCCATC

## 5. 麩に含まれる菌体量の定量

麩に含まれる菌体量は、菌体の細胞壁に含まれる N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 量を定量することで算出した。まず菌体中に含まれる GlcNAc 量を指標に検量線を作成し、それを基に麩中の菌体量を求めた。

### 5-1 菌体中に含まれる GlcNAc 定量 (\*については次ページ以降に組成を記す)

GlcNAc 定量には PD 液体培地で 30°C、72 時間培養した菌体を使用した。培養後の菌体は、洗菌後に 50 mL 容ファルコンチューブに移した。菌体に含まれる水分を除去するために、凍結乾燥機 FDU-1200 (東京理科器械株式会社) を用いて一晩凍結乾燥を行った。乾燥後の菌体は、乳鉢乳棒および液体窒素を用いて均一に細くなるよう破碎した。この乾燥菌体粉末を 1.5 mL 容チューブに 0.1 mg、0.5 mg、1 mg、5 mg 測り取った (無添加も実施した)。これらに 50 mM リン酸 buffer (pH 7.0) \* を 1 mL 加え、転倒混和した後に 4°C、12,000 rpm、15 分遠心分離し、上清を 900  $\mu$ L 除去した。ここに Yatalase 液\* を 900  $\mu$ L 加え、転倒混和した。1.5 mL 容チューブを 37°C、100 rpm で振盪させながら 1 時間保温した。1 時間の保温後に、4°C、12,000 rpm、15 分遠心分離し、上清 300  $\mu$ L を 1.5 mL 容チューブに移した。ここに 0.8 M 四ホウ酸カリウム溶液 (pH 9.97) \* を 60  $\mu$ L 加え混和した後、ヒートブロックを用いて 100°C で 3 分間保温した。保温後に室温程度になるまで放冷した。1×Reissig 試薬\* 1 mL を新しい 1.5 mL 容チューブに用意し、ここに上記反応液を 200  $\mu$ L を加え混和した。これを 37°C で 20 分間保温し、この反応液 800  $\mu$ L を 1 mL 容ガラスセルに移し、OD<sub>585 nm</sub> を測定した。OD<sub>585 nm</sub> の測定には紫外可視分光光度計 GENESYS™ 10S UV-Vis-P (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

• <u>50 mM リン酸水素二ナトリウム</u>		最終濃度
リン酸水素二ナトリウム (無水)	1.78 g	50 mM
(和光純薬工業 (株))		
<u>MilliQ 水</u>	up to 250 mL	
Total	250 mL	

• <u>50 mM リン酸二水素ナトリウム</u>		最終濃度
リン酸二水素ナトリウム (無水)	1.5 g	50 mM
(和光純薬工業 (株))		
<u>MilliQ 水</u>	up to 250 mL	
Total	250 mL	

• <u>50 mM リン酸 buffer (pH 7.0)</u>		最終濃度
50 mM リン酸水素二ナトリウム	250 mL	
<u>50 mM リン酸水素二ナトリウム</u>	約 250 mL	
Total	約 500 mL	

リン酸水素二ナトリウム溶液に対して、リン酸二水素ナトリウム溶液を添加し、pH を 7.0 に調整した。オートクレーブ処理後、室温で保存した。

• <u>Yatalase 液</u>		最終濃度
Yatalase (Takara Bio)	0.01 g	1.1 mg/mL
<u>50 mM リン酸 buffer (pH 7.0)</u>	up to 9 mL	
Total	9 mL	



・ 0.8 M 四ホウ酸カリウム溶液 (pH 9.1)	最終濃度	
四ホウ酸カリウム四水和物 (関東化学 (株))	2.44 g	0.8 M
MilliQ 水	up to 10 mL	
Total	10 mL	

KOH で pH 9.1 に調整する。ただし、本研究では四ホウ酸カリウム四水和物 2.44 g を 10 mL に溶解させた時点で pH が 9.97 であったため、pH 調整は行わずに実験に用いた。溶解後は室温で保存した。

・ 10×Reissig 試薬	最終濃度	
氷酢酸 (和光純薬工業 (株))	8.75 mL	
10 N 塩酸 (和光純薬工業 (株))	1.25 mL	
<i>p</i> -ジメチルアミノベンズアルデヒド (和光純薬工業 (株))	1 g	
Total	10 mL	

-20°C で冷凍保存した。使用時は 1×で用いるため、使用直前に氷酢酸を用いて 10 倍希釈し、1×Reissig 試薬とした。

## 5-2 麴中に含まれる菌体量の定量

GlcNAc 定量は本章本節 5-1 に示した方法に従った。5-1 で用いた乾燥菌体の代わりに麴を用いた。5-1 と同様に凍結乾燥機 FDU-1200 (東京理科器械株式会社) を用いて乾燥後、乳鉢乳棒を用いて乾燥麴が均一に細くなるまで破砕した。GlcNAc 定量には麴 0.01 g を乾燥させ、破砕物の全量を用いて定量した。得られた OD<sub>585 nm</sub> の値を用いて、本章本節 5-1 において作成した検量線より麴中に含まれる菌体量を定量した。各麴に含まれる菌体量の定量は 3 連で行った。

## 6. 麴に含まれる香気物質の抽出

### ・第1章第3節1の検討における方法

麴由来の揮発成分の抽出には、固相マイクロ抽出法 (SPME 法) を用いた。20 mL 容ガラスバイアル (SUPELCO 社、SU860097) に 2 g の麴を入れて密封し、60°C で 30 分間プレインキュベートした。その後、SPME ファイバー (SUPELCO 社、57326-U 65  $\mu$ m PDMS/DVB (Stable flex/SS) ) をガラスバイアルのヘッドスペースに挿入し、60°C で 30 分間揮発成分を吸着させた。

### ・第1章第3節3以降の検討における方法

清酒麴中の香気成分分析において報告のあるジクロロメタンを用いた抽出法により行った (20)。麴 3 g を 22 mL 容ガラスバイアル (5183-4313, Agilent Technologies) にとり、ジクロロメタン (和光純薬工業 (株)) 4.0 mL を 20 mL 容メスシリンダーを用いて加えた。GCMS 分析および 1-octen-3-ol の定量における内部標準として、4-hepten-1-ol (東京化成工業株式会社) を、12.75  $\mu$ g 相当となるように溶液を添加した。ガラスバイアルにパラフィルムを巻き、4°C にて一晩静置した。ガラスバイアル中の抽出液をガラスろ過器 (GF-30M, アズワン株式会社) により 14 mL 容ネジ付試験管 (イワキ株式会社) へろ過した。ろ過した抽出液に硫酸ナトリウム (無水) (和光純薬工業 (株)) を 0.67 g 加え、脱水した。閉じたキャップにパラフィルムを巻き、4°C にて保存した。

## 7. GCMS を用いた香気物質の分析

### ・第 1 章第 3 節 1 の検討における方法

SPME ファイバーを用いて抽出した、麴から放出される揮発性物質の同定と定量には、JMS-Q1500GC 質量分析器 (JEOL) を連結した Agilent 7890B GC System ガスクロマトグラフィー (Agilent) を用いた。すべての質量スペクトルは電子イオン化法によって得られた。GCMS 分析条件は以下の通りである。

### GCMS 分析条件

Equipment	Agilent 7890B GC System (Agilent Technologies)
Column	HP-5、30 m×0.25 mm i.d. 0.25 µm film (Agilent Technologies)
Carrier gas	Helium、1.5 mL/min, constant flow mode
Oven	50°C (1.5 min) to 300°C at 10°C /min and carried out at 300°C for 2 min, Injection 30 sec、Pulsed splitless、250°C
MS	JMS-Q1500GC (日本電子株式会社)
Ion	Electron Ionization
Mode	TIC

### ・第 1 章第 3 節 3 以降の検討における方法

麴から抽出した香気物質の同定には、JMS-Q1500GC 質量分析器 (日本電子株式会社) を連結した Agilent 7890B GC System ガスクロマトグラフィー (Agilent Technologies) を用いた。2 mL 容ガラスバイアル (SU860009、シグマ アルドリッチ ジャパン) に抽出液を約 1 mL 入れ、青色ポリプロピレン製キャップ赤 PTEF/白シリコン付き (SU860009、シグマ アルドリッチ ジャパン) で蓋をして分析に用いた。GCMS 分析条件は以下の通りである。

## GCMS 分析条件

Equipment	Agilent 7890B GC System (Agilent Technologies)
Column	HP-INNOWax、30 m×0.25 mm i.d. 0.25 μm film (Agilent Technologies)
Carrier gas	Helium、1.5 mL/min, constant flow mode
Oven	40°C (0.5 min) to 240°C at 5°C /min Injection 1 μL、Pulsed splitless、230°C
MS	JMS-Q1500GC (日本電子株式会社)
Ion	Electron Ionization
Mode	SIM
m/z	1-octen-3-ol 72, 99 4-hepten-1-ol 81, 96

## 8. 麴からの RNA 抽出

### ・ 麴からの total RNA の抽出

-80°C で凍結保存していた米麴約 10 粒を乳鉢に移し、乳棒を用いて破碎した。この麴破碎粉末を、Isogen 15 mL が入った 50 mL 容チューブに移し、均一になるようにピペティング等でよく懸濁した。10 分間 55°C でインキュベート後、遠心分離（室温、12,000 rpm、5 分）した。上清を新しい 50 mL 容チューブに移し、3 mL のクロロホルムを加え、30 秒間よく攪拌した。遠心分離（室温、12,000 rpm、15 分）を行った後、再度、水層を新しい 50 mL 容チューブに移した。水層と等量のフェノール/クロロホルム/イソミルアルコールを添加し、よく混ぜ合わせた。遠心分離（室温、12,000 rpm、10 分）を行い、再度、水層を新しい 50 mL 容チューブに移し、水層と等量の冷やした 4 M LiCl を加え、軽く混和した。30 分程度氷上で静置した後、遠心分離（4°C、12,000 rpm、30 分）し、上清を除去し白色のペレットを得た。このペレットに 400  $\mu$ L の冷 DEPC 処理水を添加し、先端を切った 1000  $\mu$ L チップでピペティングしてペレットを完全に懸濁した。懸濁後に 65°C で 5 分加熱して沈殿した RNA をよく溶解した。400  $\mu$ L の 100%イソプロパノールを加え、軽く転倒混和し、遠心分離（4°C、15,000 rpm、15 分）した。上清を除去し、600  $\mu$ L の冷 70%エタノールを加え、再度、遠心分離（4 °C、15,000 rpm、10 分）し、上清を除去した。400  $\mu$ L の冷 DEPC 処理水を加え、良く懸濁した。等量のフェノール/クロロホルム/イソミルアルコールを添加し、よく混ぜ合わせた後、遠心分離（室温、12,000 rpm、10 分）を行った。水層を新しい 1.5 mL 容チューブに移し、この操作を繰り返した。得られた水層に対して、30  $\mu$ L の 3 M 酢酸ナトリウム、750  $\mu$ L の冷 100%エタノールを加え、転倒混和した。遠心分離（4 °C、15,000 rpm、20 分）を行い、上清を除去した。600  $\mu$ L の冷 70%エタノールを加えた後、遠心分離（4°C、15,000 rpm、5 分）した。上清を

除去した後 100  $\mu\text{L}$  の冷 DEPC 処理水で懸濁した。65°C、5 分の加熱により沈殿した RNA を完全に溶解させた。得られた total RNA 溶液を RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて、標準的なプロトコルに従って精製した。精製後に BioDrop  $\mu\text{LITE}$  (BioDrop) で濃度、純度を測定した。約 10 粒の麴から total RNA は 50~150 ng/ $\mu\text{L}$ 、A260/A280 は 1.7 以上で抽出された。

## 9. RT-qPCR 法による遺伝子発現解析

- total RNA の逆転写反応による cDNA の合成

PrimeScript RT reagent Kit (perfect real time) (Takara Bio) を用いて、標準的なプロトコルに従って cDNA を合成した。cDNA 合成に用いた total RNA 量は 500 ng とした。反応後、cDNA 溶液は -20°C で保存した。

- RT-qPCR 法による遺伝子発現解析

RT-qPCR にはリアルタイム PCR CFX96 (BioRad) を使用した。THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (東洋紡) を用いて qPCR 反応を行った。反応組成は一般的なプロトコルに従い、10 ng もしくは 100 ng 相当の cDNA を鋳型として用いた。反応条件は、初期変性として 95°C、60 秒、変性として 95°C、15 秒、伸長として 60°C、30 秒とし、変性と伸長は 40 サイクル行った。その後融解曲線分析を行った。使用したプライマーは Table 1-4 に示した。

遺伝子発現解析には、 $\Delta\Delta Ct$  法を用いた。 $\Delta\Delta Ct$  法により標的遺伝子の発現を比較定量した。リファレンス遺伝子には、actin (*AlactA*: BCWF01000035 REGION: 195097-196936) を用いた。具体的には、各サンプルにおいて、標的遺伝子の Ct 値から actin の Ct 値を引くことにより、 $\Delta Ct$  値を算出した。各試料における標的遺伝子の  $\Delta Ct$  値から、基準とした試料における標的遺伝子の  $\Delta Ct$  値を引くことにより、各試料における  $\Delta\Delta Ct$  値を算出した。例えば、試料 A における  $\Delta\Delta Ct$  値が X のとき、試料 A と基準試料における標的遺伝子由来の cDNA 量の差は、 $2^X$  と表現することができる。即ち、 $\Delta\Delta Ct$  値が 1 のとき、試料 A と基準試料における標的遺伝子由来の cDNA 量の差は、2 倍となる。得られた各試料における標的遺伝子の  $\Delta\Delta Ct$  値を比較することにより、標的遺伝子の発現量を評価した。

Table 1-4 RT-qPCRに用いたプライマー

Purpose	Primer	Sequence (5´-3´)
<i>AlactA</i> 増幅	AlactA-RT-F	GGTATGGGTCAGAAGGACTC
	AlactA-RT-R	CTCCATGTCATCCCAGTTCCG
<i>AlppoA</i> 増幅	AlppoA-RT-F	TTGCCCGACATCAAACGACTTG
	AlppoA-RT-R	AGTAGGCTTCGGGACCCAGTC
<i>AlppoC</i> 増幅	AlppoC-RT-F	CTCAGAAACAACATCGACGTGTCTG
	AlppoC-RT-R	ACTCAAGAGGGCGGTCAAGG
<i>AlppoD</i> 増幅	AlppoD-RT-F	AGCTGTCCAAGGACCTGAACC
	AlppoD-RT-R	GCGTTCATGCTGCCAGACTC
<i>Albr1A</i> 増幅	Albr1A-RT-F	TCAACCAATCGCCAGTTTATCGC
	Albr1A-RT-R	CAACCAGGCTCCTTGCACTTG



### 第3節 実験結果

#### 1. 麴における 1-octen-3-ol 生産性の確認

*A. luchuensis* における 1-octen-3-ol 生産性を SPME-GCMS 分析により確認した。タイ米の蒸米に *A. luchuensis* NBRC 4314 を植菌して麴を調製した。対象として 25 ng/mL 1-octen-3-ol の標品（東京化成工業株式会社）20  $\mu$ L、植菌していない蒸米を用いた。

SPME-GCMS 分析の結果、蒸米では、標品で示された 1-octen-3-ol の保持時間にピークは検出されなかった。一方、麴においては標品と同様の保持時間（RT= 05:18）にピークが示された（Fig. 1-1）。

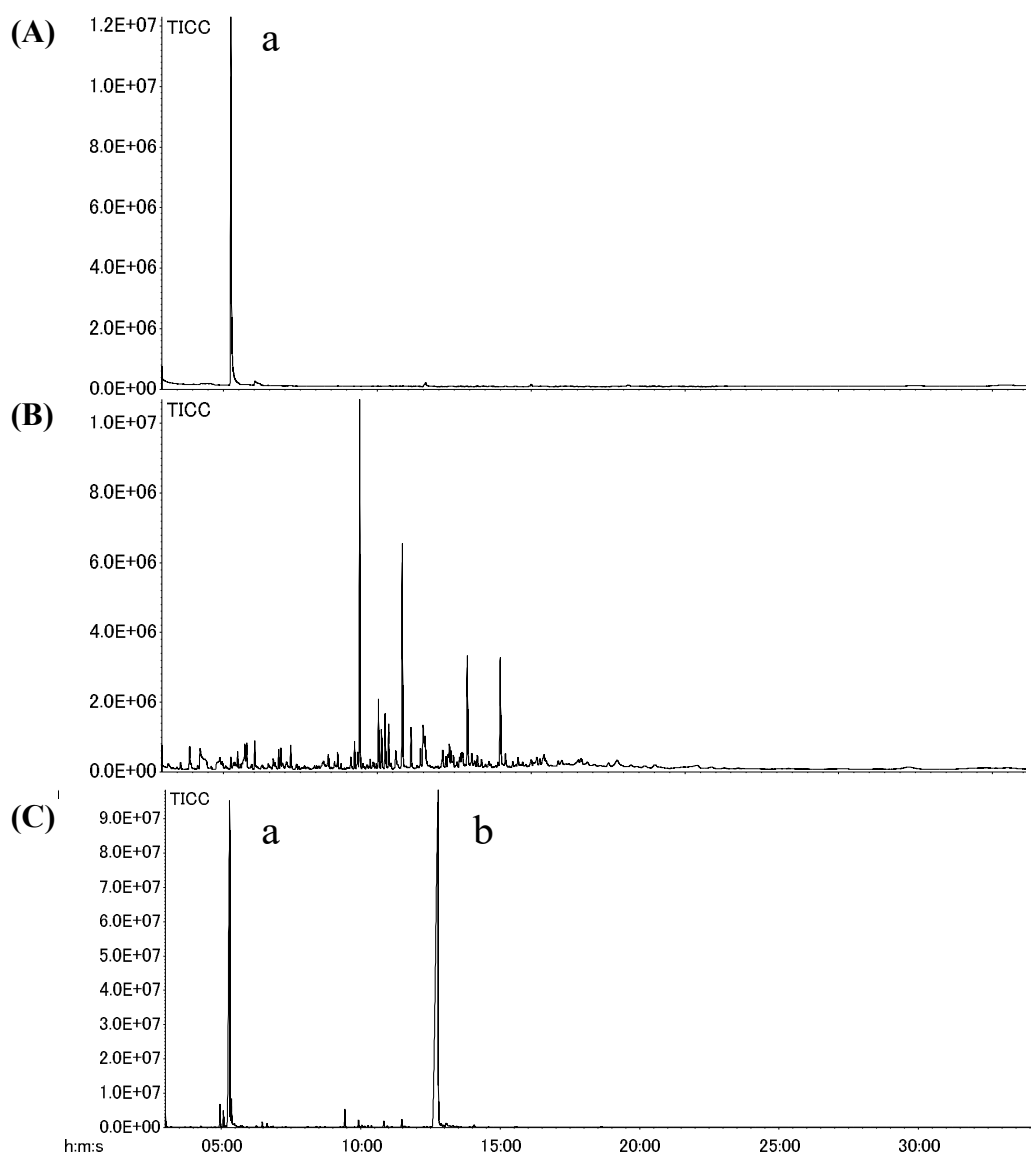


Fig. 1-1 *A. luchuensis*を用いて調製した麴における1-octen-3-ol生産性の確認

(A) 1-octen-3-ol標品におけるSPME-GCMS分析によるクロマトグラム,

(B) 蒸米におけるSPME-GCMS分析によるクロマトグラム,

(C) *A. luchuensis* NBRC 4314の麴におけるSPME-GCMS分析によるクロマトグラム

a: 1-octen-3-ol

b: 2-carboxymethyl-3-hexylmaleic acid anhydride

## 2. 1-octen-3-ol 生合成関連遺伝子の配列情報の取得および解析

*Aspergillus* 属糸状菌における脂肪酸オキシゲナーゼ Ppo として、PpoA、PpoB、PpoC、PpoD の 4 種類が報告されている (30)。*A. nidulans* および *A. flavus* における各 Ppo のアミノ酸配列をリファレンスとする BLAST 検索を用いて、主要な *Aspergillus* 属糸状菌のゲノムデータベースから各 *Aspergillus* 属糸状菌における Ppo の有無および配列情報を得た (Table 1-5)。PpoC は黒麹菌 *A. luchuensis* には保存されていたが、その白色変異株である白麹菌 *A. luchuensis* mut. *kawachii* には保存されていなかった。

4 種類の 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 (Fig. 1-2)。

黒麹菌ゲノムデータベースにおいて、PpoA、PpoC、PpoD と高い相同性を示すタンパク質が見出された。*A. nidulans* PpoA に対して 49.4%、*A. nidulans* PpoC に対して 71.5% の identity を示す 1110 アミノ酸をコードする遺伝子 (GAT23542) が見出され、この遺伝子を *AlppoC* (*A. luchuensis ppoC*) と名付けた。*A. nidulans* PpoA に対して 73.7%、*A. nidulans* PpoC に対して 44.4% の identity を示す 1080 アミノ酸をコードする遺伝子 (GAT25971) が見出され、この遺伝子を *AlppoA* (*A. luchuensis ppoA*) と名付けた。*A. flavus* PpoD に対して 64.9% の identity を示すタンパク質をコードする遺伝子 (GAT24722) を *AlppoD* (*A. luchuensis ppoD*) と名付けた。

*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麹菌の各種 Ppo も含まれることが確認された (Fig. 1-3)。

Table 1-5 *Aspergillus*属糸状菌におけるPpoの有無

	PpoA	PpoB	PpoC	PpoD
<i>A. luchuensis</i>	○	–	○	○
<i>A. luchuensis</i> mut. <i>kawachii</i>	○	–	–	○
<i>A. nidulans</i>	○	○	○	–
<i>A. flavus</i>	○	○	○	○
<i>A. oryzae</i>	○	○	○	○
<i>A. fumigatus</i>	○	○	○	–
<i>A. niger</i>	○	–	○	○

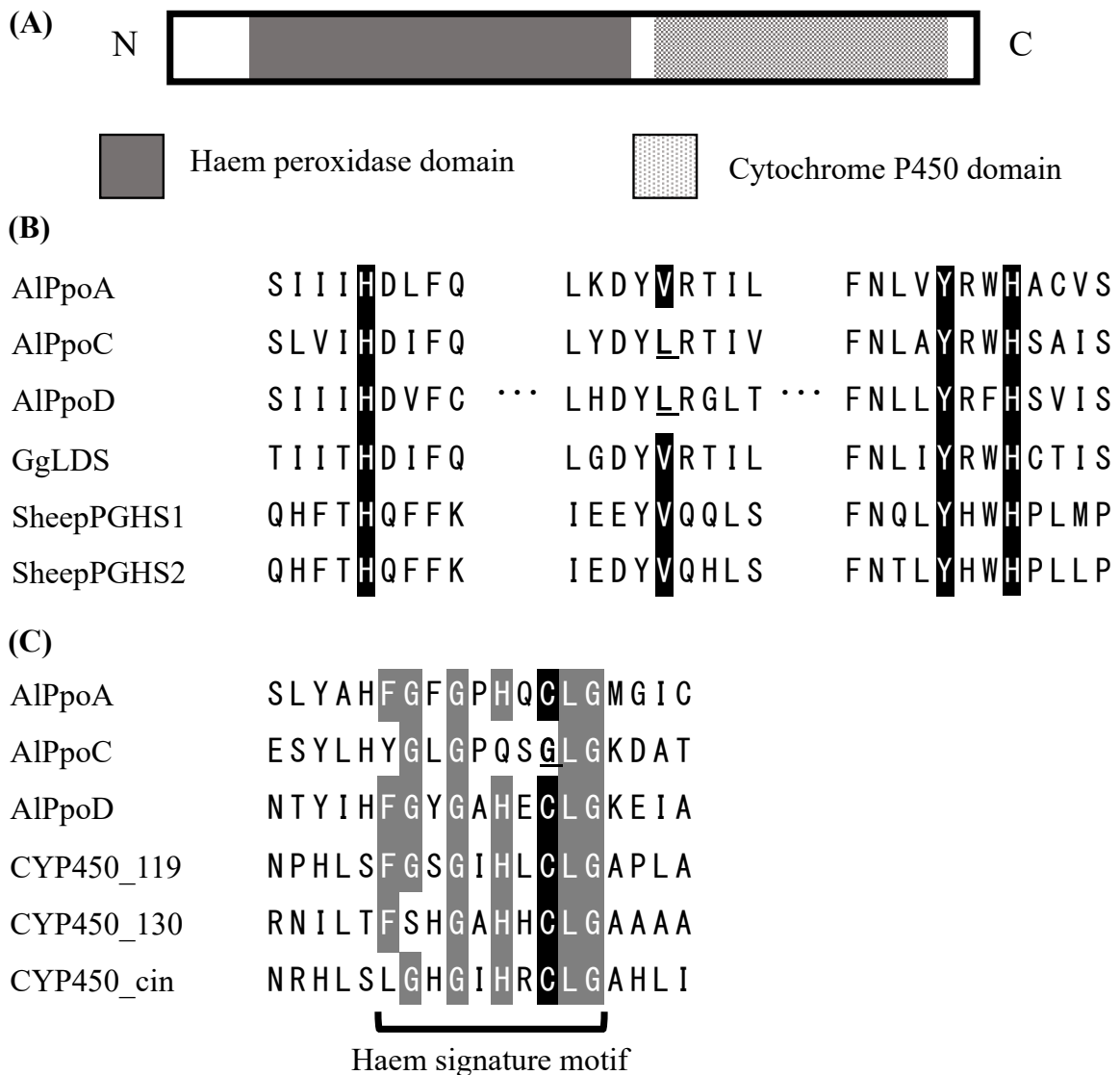


Fig. 1-2 黒麴菌におけるPpoのドメイン解析および触媒活性部位

(A) *A. luchuensis*のPpoCにおけるドメイン解析結果の模式図。各Ppoは、N-末端領域にヘムペルオキシダーゼドメイン、Cytochrome C末端にはP450ドメインが共通して存在する。

(B)ヘムペルオキシダーゼドメインの活性部位。触媒活性に重要な4つのアミノ酸残基はPpoAで保存されている。一方、PpoCとPpoDではValがLeuに置き換わっている。

GgLDS; *Gaeumannomyces graminis* 7,8-linoleate diol synthase

PGHS; prostaglandin G/H synthase

(C)シトクロムP450ドメインの活性部位。活性部位にあるCys残基はPpoAとPpoDではGly残基で置換されているが、PpoCではGly残基で置換されている。

CY; cytochrome

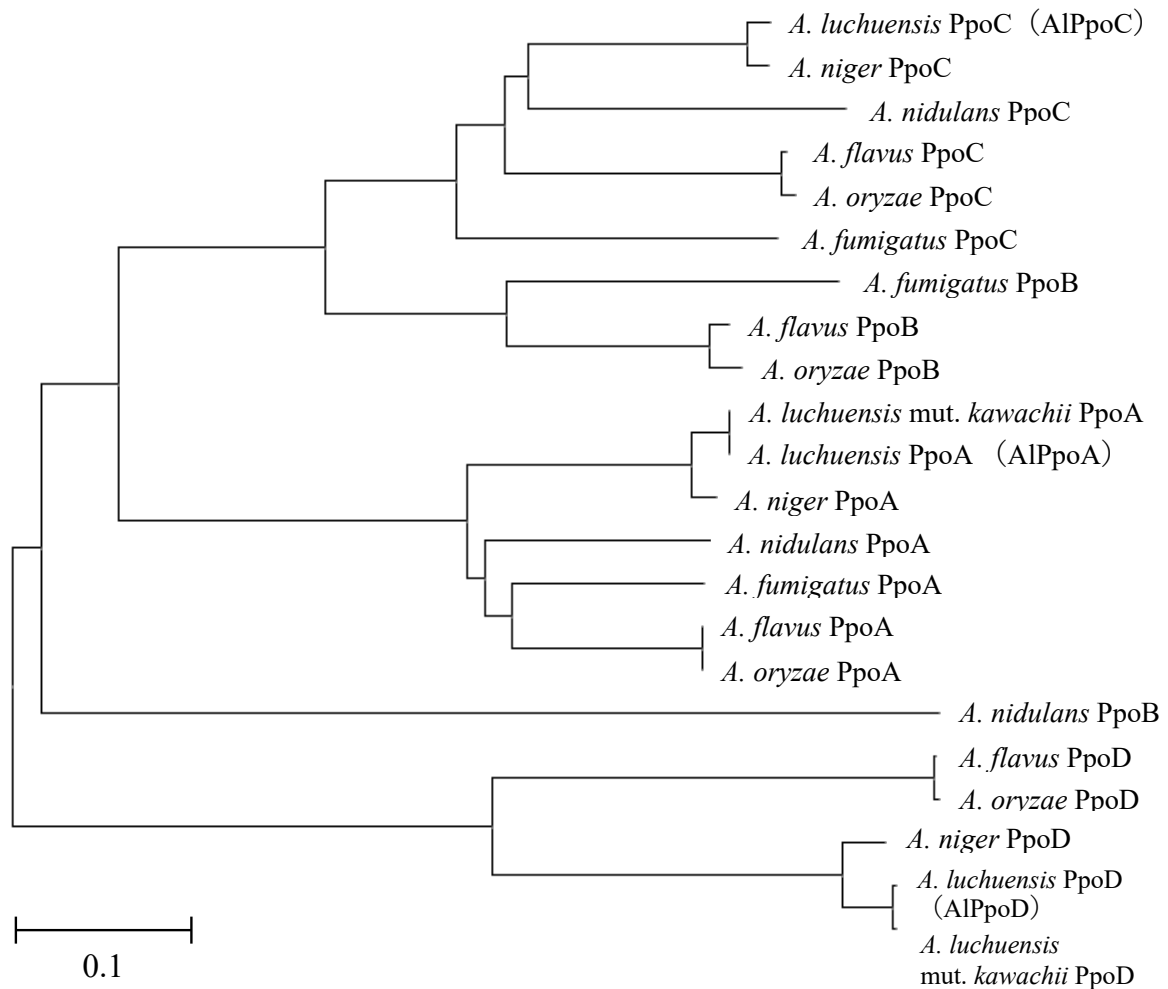


Fig. 1-3 *Aspergillus*属糸状菌におけるPpoの分子系統解析

予測されたPpoタンパク質のアミノ酸配列は、ClustalWを使用してアライメントさせ、系統樹はMEGA Xを用いて作成した。

アミノ酸配列データは、以下のNCBIにおけるAccession番号でNCBIデータベースに提出されているものを用いた。

*A. luchuensis* PpoA, GAT25971; *A. luchuensis* PpoC, GAT23542; *A. luchuensis* PpoD, GAT24722; *A. luchuensis* mut. *kawachii* PpoA, GAA82986; *A. luchuensis* mut. *kawachii* PpoD, GAA91201; *A. nidulans* PpoA, Q6RET3; *A. nidulans* PpoB, XP\_663924; *A. nidulans* PpoC, AAT36614; *A. flavus* PpoA, KAB8242267; *A. flavus* PpoB, XP\_002384783; *A. flavus* PpoC, XP\_002374553; *A. flavus* PpoD, XP\_002376130; *A. oryzae* PpoA, XP\_001820231; *A. oryzae* PpoB, XP\_023094242; *A. oryzae* PpoC, XP\_001819914; *A. oryzae* PpoD, XP\_023091571; *A. fumigatus* PpoA, XP\_751750; *A. fumigatus* PpoB, XP\_746438; *A. fumigatus* PpoC, XP\_754409; *A. niger* PpoA, XP\_001401954; *A. niger* PpoC, XP\_001399926; *A. niger* PpoD, XP\_001395220.

### 3. 脂肪酸オキシゲナーゼ *Alppo* 遺伝子の破壊および過剰発現による 1-octen-3-ol 生合成への影響の解析

既存の配列情報と黒麹菌ゲノムデータベースを用いて、*A. luchuensis* において *AlppoA*、*AlppoC*、*AlppoD* 遺伝子を見出した。本検討ではまず、各 *Alppo* 遺伝子の破壊株および過剰発現株を取得した。*AlppoA* および *AlppoC* 破壊株は、*A. luchuensis*  $\Delta ligD$  株を親株とするプロトプラスト-PEG 法を用いた相同組換えによる形質転換によって取得した (Fig. 1-4A、C)。遺伝子破壊はゲノム PCR により確認した (Fig. 1-4B、D)。また、*AlppoD* 破壊株および *AlppoA*、*AlppoC*、*AlppoD* 過剰発現株は、*A. tumefaciens* を用いたアグロバクテリウム法による形質転換によって構築した (Fig. 1-5A、1-6A)。遺伝子破壊および過剰発現株の取得はコロニーダイレクト PCR によって確認した (Fig. 1-5B、1-6B、C、D)。

1-octen-3-ol 生産に対する *Alppo* 遺伝子破壊の影響を調べるために、各  $\Delta Alppo$  株を用いて米麴を調製した。また、遺伝子破壊による生育への影響を調べるために、麹菌の菌糸量を定量した (データは示さず)。各破壊株の菌糸量は、親株 ( $\Delta ligD$ ) の菌糸量と有意な差はなかった。この製麴条件では、遺伝子破壊による生育への影響はないことが示された。

各麹から香気物質をジクロロメタンによって抽出し、GCMS で分析した。親株と各  $\Delta Alppo$  株を用いて調製した麴中の 1-octen-3-ol の量を GCMS のピーク面積に基づいて定量した (Fig. 1-7)。親株である  $\Delta ligD$  は 65.2 ng/mg -mycelial content の値を示した。 $\Delta AlppoA$  株では、79.7 ng/mg -mycelial content を生成した (親株の 1.22 倍)。 $\Delta AlppoC$  株を用いて調製した麴からは、1-octen-3-ol は検出されなかった (1-octen-3-ol 検出限界の 5 ng/g -koji 以下であった)。このことより、*AlppoC* は *A. luchuensis* における 1-octen-3-ol 生合成必須因子であることが明らかになった。 $\Delta AlppoD$  株においては、91.2 ng/mg -mycelial

content (親株の 1.40 倍) の値を示した。

*AlppoA*、*AlppoC*、*AlppoD* の各遺伝子について、過剰発現株を構築し、それらを用いて調製した麴における 1-octen-3-ol 含有量について GCMS 分析を行った (Fig. 1-8)。その結果、親株である *A. luchuensis* NBRC4314 株では 67.4 ng/mg -mycelial content であったのに対し、OE*AlppoA* 株で調製した麴において、26.8 ng/mg -mycelial content を生成した (親株の 0.40 倍)。OE*AlppoC* 株で調製した麴では最も 1-octen-3-ol が高濃度で検出され、その値は 127.5 ng/mg -mycelial content を生成した (親株の 1.89 倍)。OE*AlppoD* 株で調製した麴においては、43.7 ng/mg -mycelial content を生成した (親株の 0.65 倍)。

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 時間以降では減少を示した (Fig. 1-9)。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 (Fig. 1-10)。

以上の結果より、*AlppoC* は *A. luchuensis* の製麴過程における 1-octen-3-ol 生合成必須因子であることが明らかになった。また、*AlppoC* の発現動態と 1-octen-3-ol の生産量の経時変化には相関が見られた。この結果からも、*AlppoC* は 1-octen-3-ol 生産において重要な因子であることが示された。



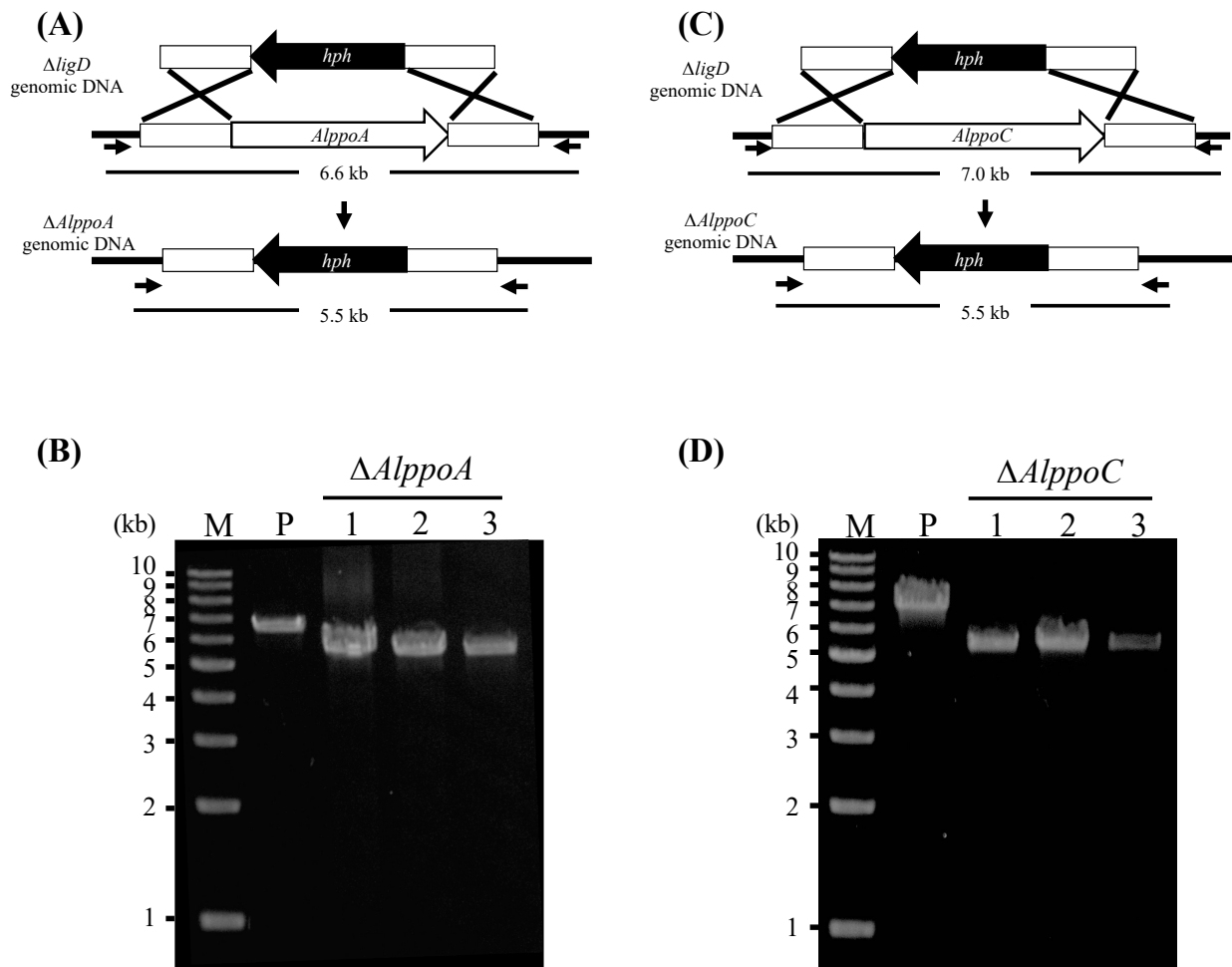


Fig. 1-4  $\Delta AlppoA$ 株及び $\Delta AlppoC$ 株の構築と遺伝子破壊の確認

(A) *AlppoA*と(C) *AlppoC*遺伝子の構築ストラテジー。黒矢印は遺伝子破壊を確認するために使用したプライマーを示した。

(B)  $\Delta AlppoA$ と(D)  $\Delta AlppoC$ の取得確認のため、ゲノムPCRから得た増幅DNA断片のアガロースゲル電気泳動。

レーンM; 1 kb ラダー DNA マーカー、レーンP; 親株 ( $\Delta ligD$ )、レーン1-3; 形質転換体

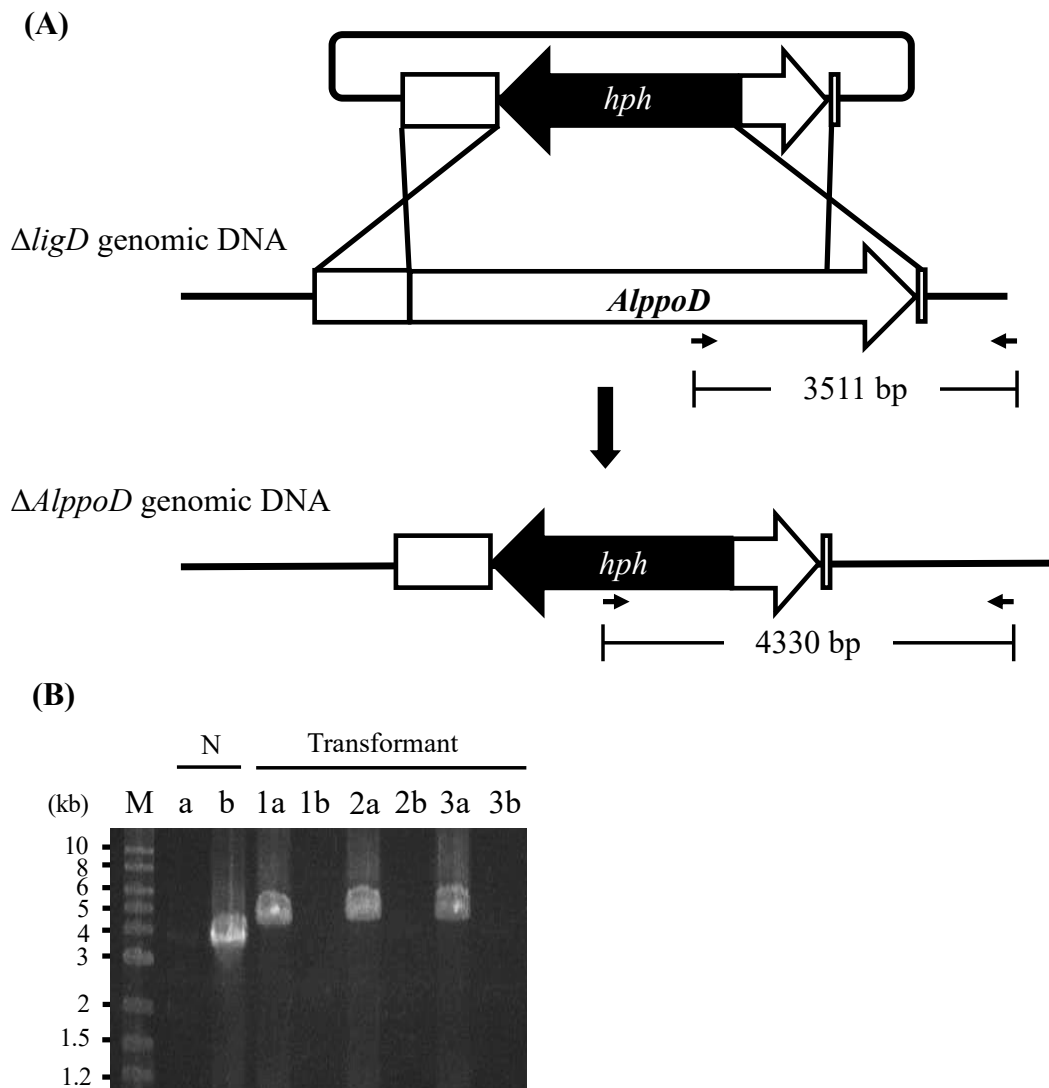


Fig. 1-5  $\Delta AlppoD$ 株の構築 と遺伝子破壊の確認

(A) *AlppoD*破壊のためのストラテジー。黒矢印は、コロニーダイレクトPCRで遺伝子破壊を確認するために使用したプライマーの位置を示している。

(B) *AlppoD*の破壊を確認するためのコロニーダイレクトPCRで増幅されたDNA断片のアガロースゲル電気泳動。

レーンM; 1 kb ラダー DNA マーカー、レーン N; 親株 ( $\Delta ligD$ )、レーン 1-3; 形質転換体、レーンa; *hph*領域を増幅するためのプライマー、レーンb; *AlppoD* ORFを増幅するためのプライマー

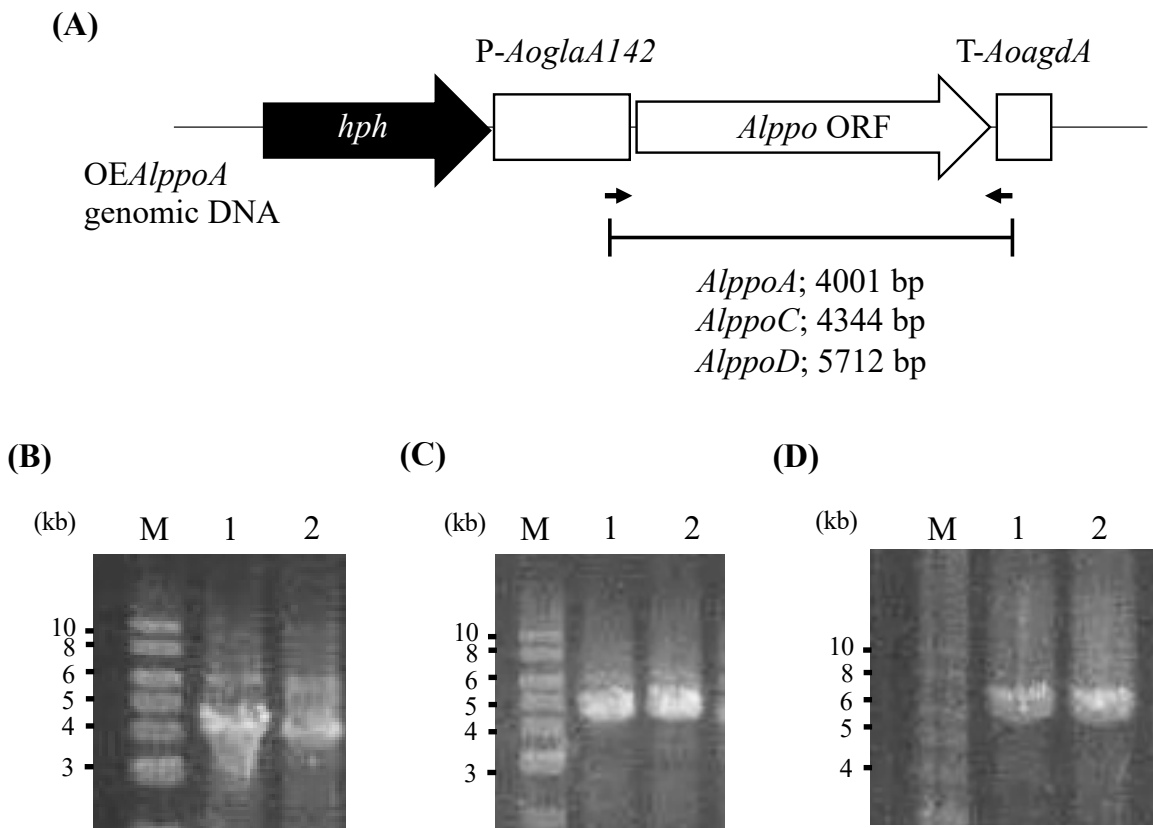


Fig. 1-6 *OEAlppo*株の構築と遺伝子過剰発現カセットの導入の確認

(A) *Alppo*過剰発現株構築のためのストラテジー。黒矢印は、コロニーダイレクトPCRで過剰発現カセットの導入を確認するために使用したプライマーの位置を示している。*AlppoA*、*AlppoC*、*AlppoD*それぞれのORFの差長は異なるため、PCR増幅鎖長はそれぞれ4001 bp、4344 bp、5712 bpである。

(B) *AlppoA*、(C) *AlppoC*、(D) *AlppoD*過剰発現カセットの導入を確認するためのコロニーダイレクトPCRで増幅されたDNA断片のアガロースゲル電気泳動。レーンM; 1 kb ラダー DNA マーカー、レーン 1、2; 形質転換体

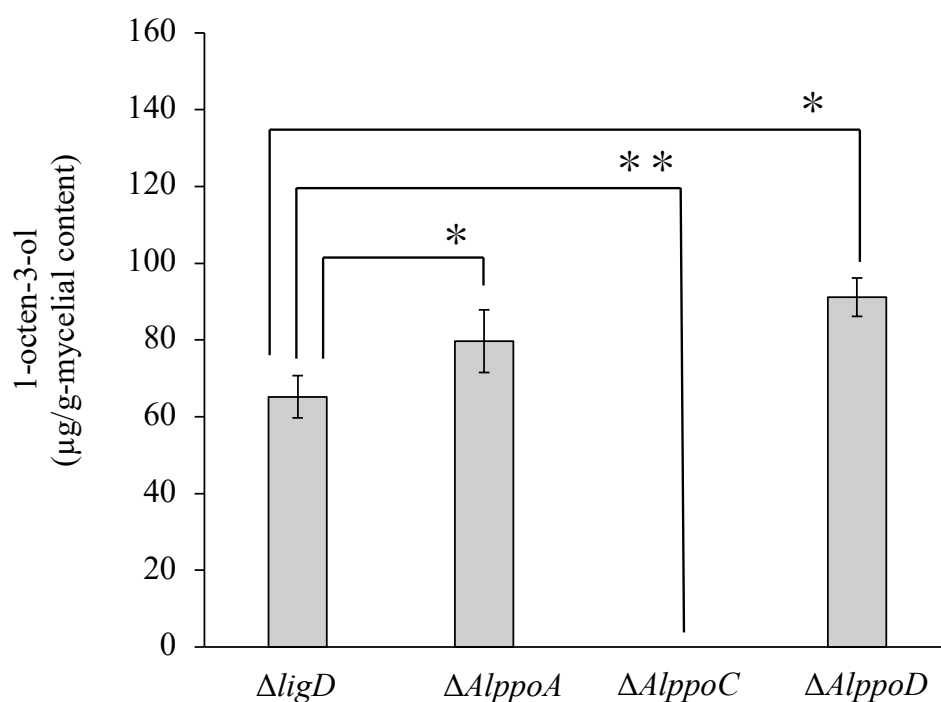


Fig. 1-7 黒麹菌 $\Delta Alppo$ 株を用いて調製した麴における1-octen-3-ol生産量

$\Delta ligD$ 株、 $\Delta AlppoA$ 株、 $\Delta AlppoC$ 株、 $\Delta AlppoD$ 株を用いて調製した麴から、ジクロロメタンで抽出した1-octen-3-ol生産量をGCMSを用いて定量した。1-octen-3-ol生産量は、乾燥菌体重量に対して均一化した。エラーバーは、3連のデータにおける標準偏差を示す。Student's t-testにより有意差を\*で示した (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )。

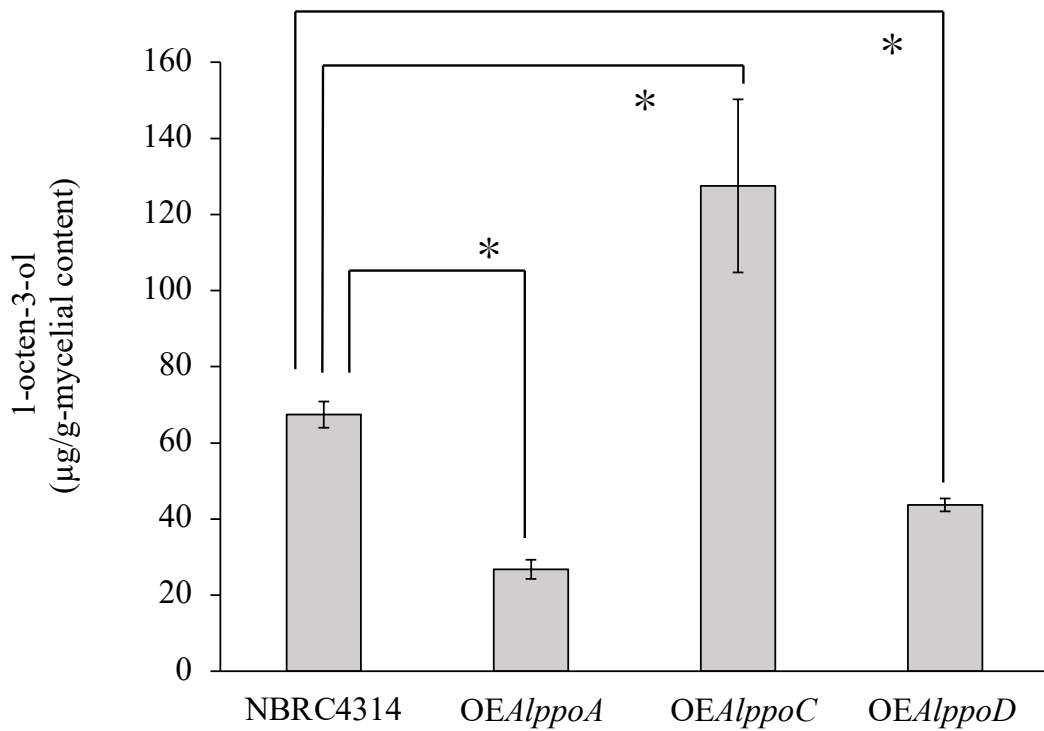


Fig. 1-8 黒麹菌OEAlppo株を用いて調製した麴における1-octen-3-ol生産量

*A. luchuensis* NBRC 4314株、OEAlppoA株、OEAlppoC株、OEAlppoD株を用いて調製した麴から、ジクロロメタンで抽出した1-octen-3-ol生産量をGCMSを用いて定量した。1-octen-3-ol生産量は、乾燥菌体重量に対して均一化した。エラーバーは、3連のデータにおける標準偏差を示す。Student's t-testにより有意差を\*で示した (\* $p < 0.05$ )。

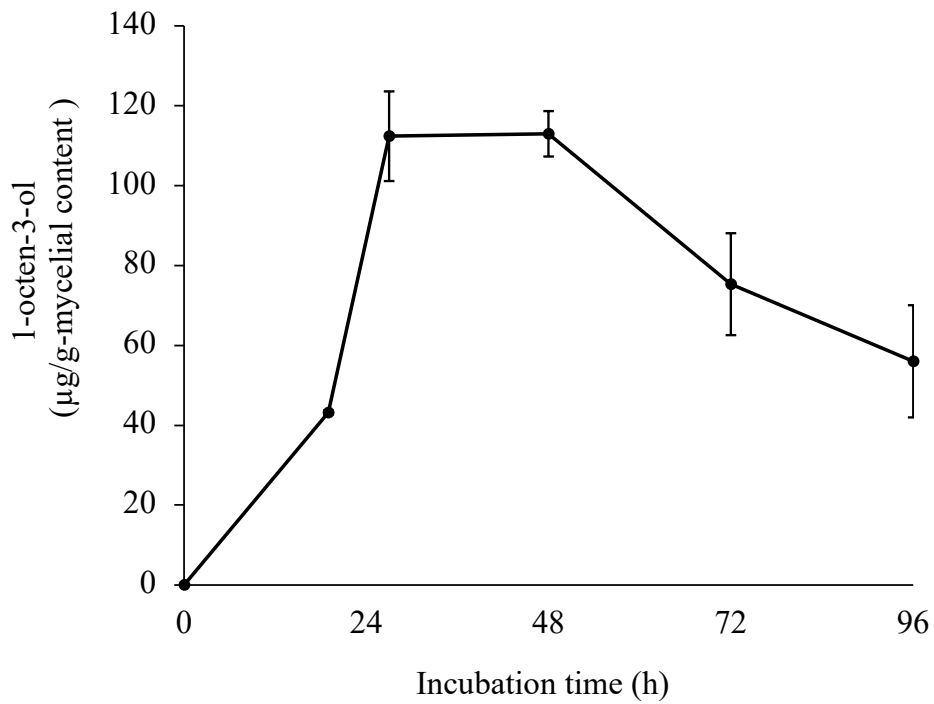


Fig. 1-9 *A. luchuensis* NBRC 4314株を用いて調製した麴における1-octen-3-ol生産量の経時変化

実験室株である*A. luchuensis* NBRC 4314株を用いて麴を調製した。培養19、27、48、72、96時間の麴を調製し、各麴に含まれる1-octen-3-ol量をGCMS分析により測定した。それぞれ3連ずつ調べ、麴に含まれる菌体量あたりで評価した。

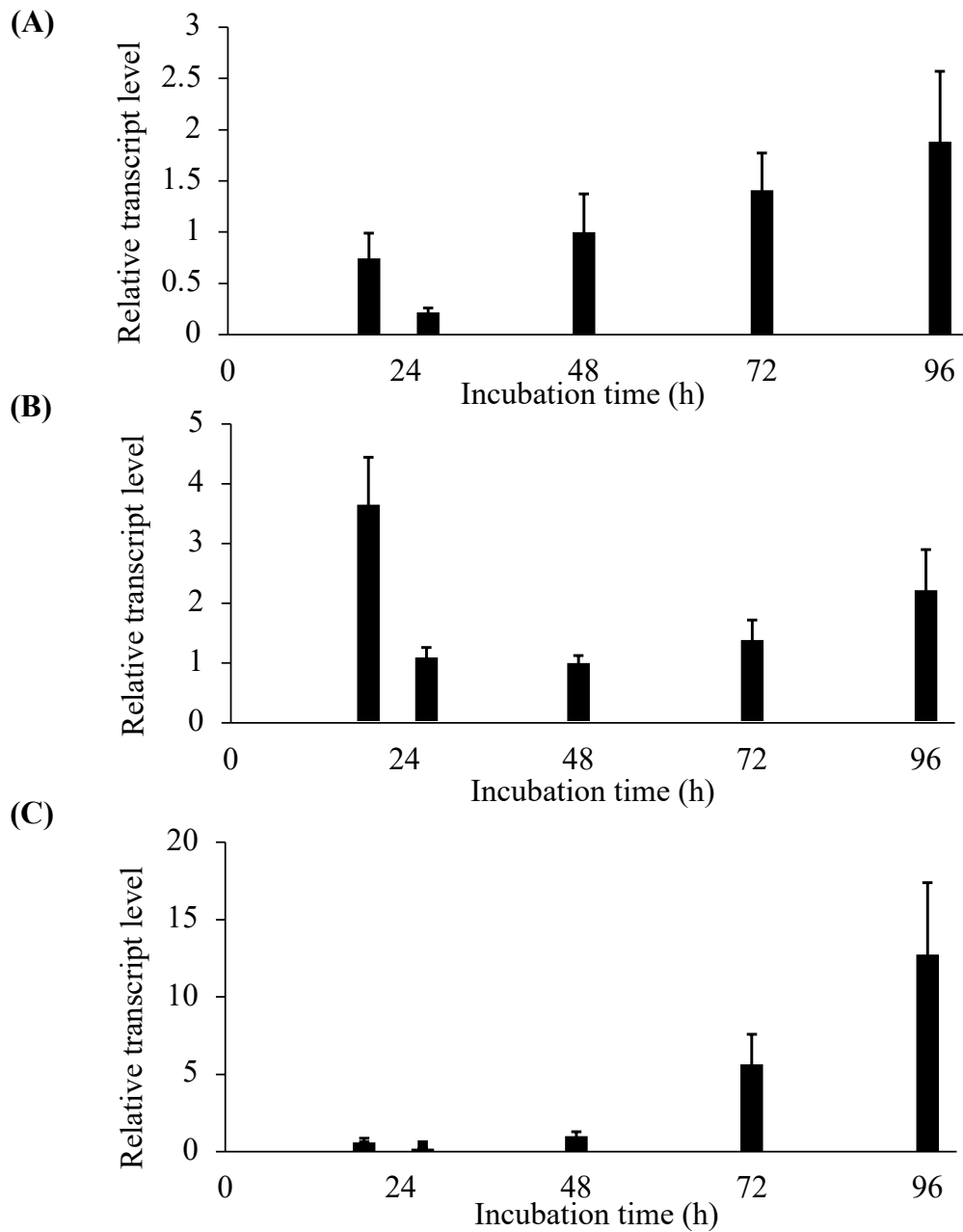


Fig. 1-10 *A. luchuensis* NBRC 4314株を用いて調製した麴における *Alppo*遺伝子の発現動態

(A) *A. luchuensis* NBRC 4314株を用いて調製した麴における *AlppoA* の発現動態  
 (B) *A. luchuensis* NBRC 4314株を用いて調製した麴における *AlppoC* の発現動態  
 (C) *A. luchuensis* NBRC 4314株を用いて調製した麴における *AlppoD* の発現動態  
 各遺伝子の発現動態は、それぞれ培養48時間における発現量を1として $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法を用いて比較定量した。エラーバーは、3連のデータにおける標準偏差を示す。

#### 4. ヒドロペルオキシドリアーゼ *Alhpl* 遺伝子破壊による 1-octen-3-ol 生合成への影響の解析

黒麹菌で見出された 2 種類の *Alhpl* (*Alhpl1*、*Alhpl2*) 遺伝子破壊株 ( $\Delta Alhpl$  株) を構築し、1-octen-3-ol 生産性への関与を検討した。各 *Alhpl* 破壊株は、親株を *A. luchuensis*  $\Delta ligD$  株として、アグロバクテリウム法による形質転換によって構築した (Fig. 1-11A、B)。破壊の確認はコロニーダイレクト PCR により行ったが、増幅鎖長が親株と形質転換体間で差がなかったため、制限酵素を用いて、その切断バンドパターンにより破壊の確認を行った。 $\Delta Alhpl1$  株においては制限酵素 *SmaI* を用いて消化することにより、親株では未切断であるのに対して、*Alhpl1* 破壊株では 3217 bp と 1316 bp に切断される。これにより  $\Delta Alhpl1$  の取得の確認を行った (Fig. 1-11C)。同様に、 $\Delta Alhpl2$  株の取得の確認においても、制限酵素 *XhoI* を用いた。親株では未切断であるのに対し、*Alhpl2* 破壊株では 3126 bp と 1392 bp に切断される。これにより  $\Delta Alhpl2$  の取得の確認を行った (Fig. 1-11D)。両遺伝子破壊株ともに複数株の遺伝子破壊株も取得が確認できた。

親株である  $\Delta ligD$  株における 1-octen-3-ol 生産量が 46.7 ng/mg -mycelial content であったのに対して、 $\Delta Alhpl1$  株では 44.0 ng/mg -mycelial content、 $\Delta Alhpl2$  株では 47.7 ng/mg -mycelial content の生産量を示した (Fig. 1-12)。したがって、 $\Delta hpl$  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。



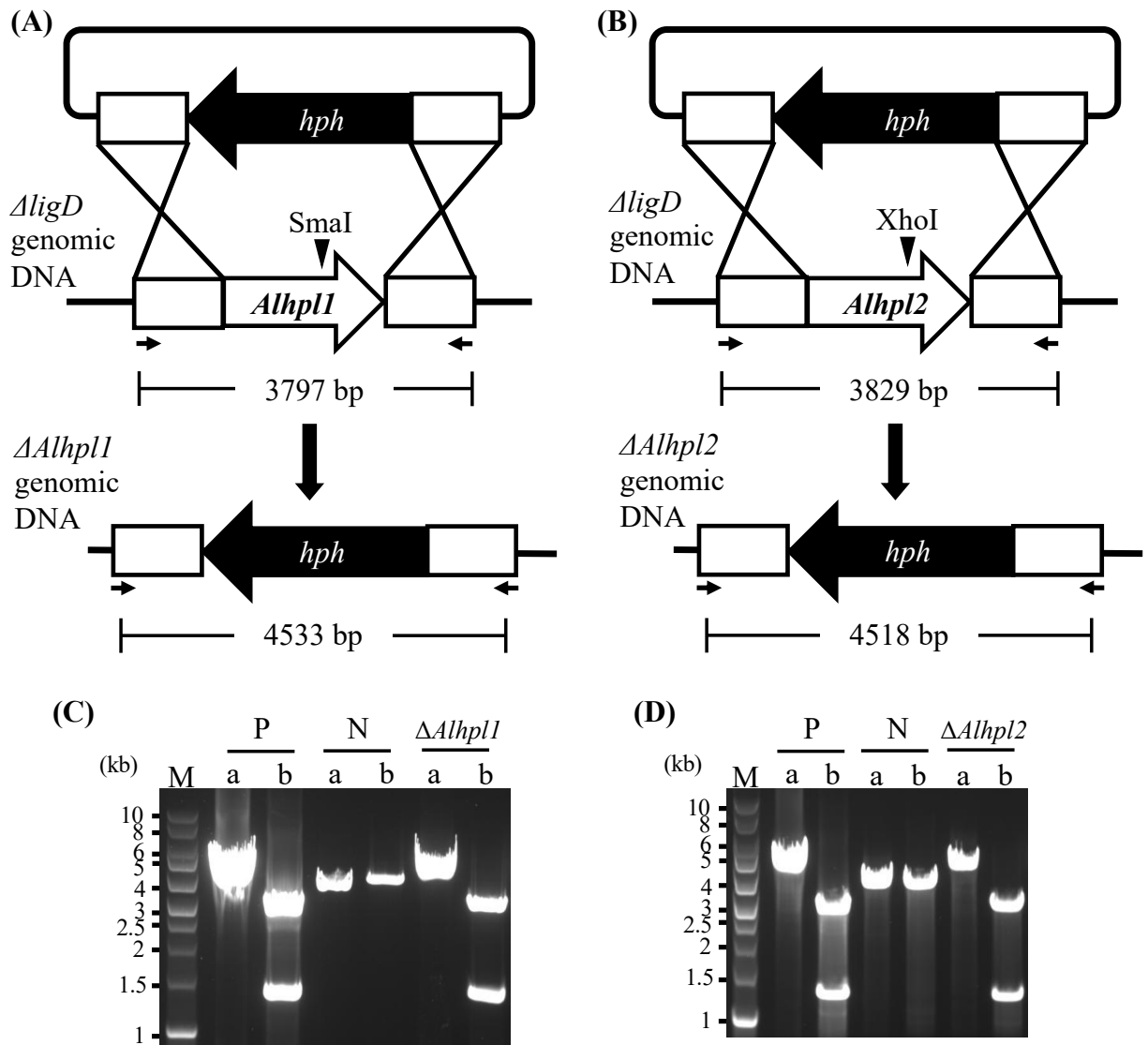


Fig. 1-11  $\Delta Alhpl1$ 株および $\Delta Alhpl2$ 株の構築と遺伝子破壊の確認

(A) *Alhpl1*および(B) *Alhpl2*破壊のためのストラテジー。黒矢印は、コロニーダイレクトPCRで遺伝子破壊を確認するために使用したプライマーの位置を示している。各図内の制限酵素は遺伝子破壊の確認に用いた。

(C) *Alhpl1*および*Alhpl2*の破壊を確認するためのコロニーダイレクトPCRで増幅されたDNA断片のアガロースゲル電気泳動。PCR産物はそれぞれSmaIおよびXhoIで消化したものも用いている。

レーンM; 1 kb ラダー DNA マーカー、レーン P; 破壊用カセットを含むプラスミド (pRIE- $\Delta Alhpl1$ およびpRIE- $\Delta Alhpl2$ )、レーンN; 親株 ( $\Delta ligD$ )、

レーン 1-3; 形質転換体

レーンa; 制限酵素未消化、レーンb; 制限酵素消化

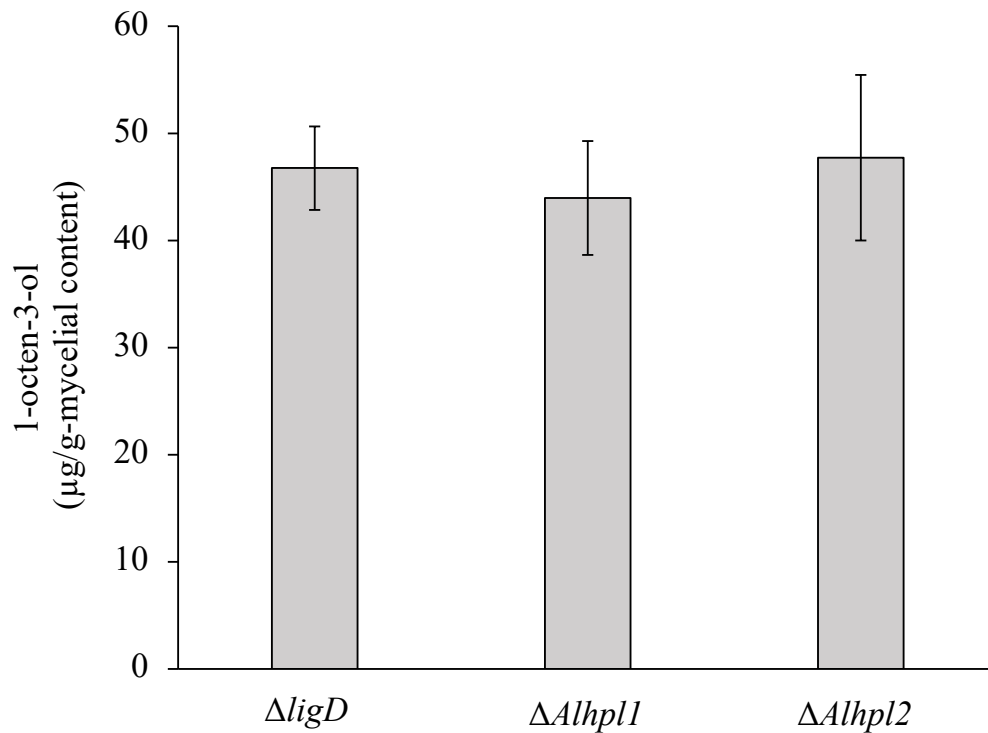


Fig. 1-12 黒麹菌 $\Delta Alhpl$ 株を用いて調製した麹における1-octen-3-ol生産量

$\Delta ligD$ 株、 $\Delta Alhpl1$ 株、 $\Delta Alhpl2$ 株を用いて調製した麹から、ジクロロメタンで抽出した1-octen-3-ol生産量をGCMSを用いて定量した。1-octen-3-ol生産量は、乾燥菌体重量に対して均一化した。エラーバーは、3連のデータにおける標準偏差を示す。 $\Delta ligD$ 株とその他の菌株の麹間に有意な差は見られなかった。

## 5. オレイン酸デサチュラーゼ *AlodeA* 遺伝子破壊による 1-octen-3-ol 生合成への影響の解析

PpoC はリノール酸を基質として 1-octen-3-ol 生合成に関与していると考えられるが、泡盛醸造の製麹において、黒麹菌の PpoC が原料米に含まれるリノール酸を利用しているのか、細胞内で生合成したリノール酸を利用しているのか、明らかではない。そこで、黒麹菌による 1-octen-3-ol 生産に対するリノール酸生合成遺伝子、オレイン酸デサチュラーゼをコードする *odeA* 破壊の影響について検討を行った。

*AlodeA* 破壊株は、親株を *A. luchuensis*  $\Delta ligD$  株とする *A. tumefaciens* を用いたアグロバクテリウム法による形質転換によって構築した (Fig. 1-13)。

*AlodeA* 遺伝子破壊株 ( $\Delta AlodeA$  株) における 1-octen-3-ol 生産量を検討した結果、親株である  $\Delta ligD$  株では 73.5 ng/mg -mycelial content であったのに対して、 $\Delta AlodeA$  株では 22.0 ng/mg -mycelial content の生産量を示した (Fig. 1-14)。 $\Delta AlodeA$  破壊株の 1-octen-3-ol 生産量は親株の 3 分の 1 以下まで低下したことから、黒麹菌は細胞内で生合成したリノール酸から 1-octen-3-ol を生合成していると推定された。

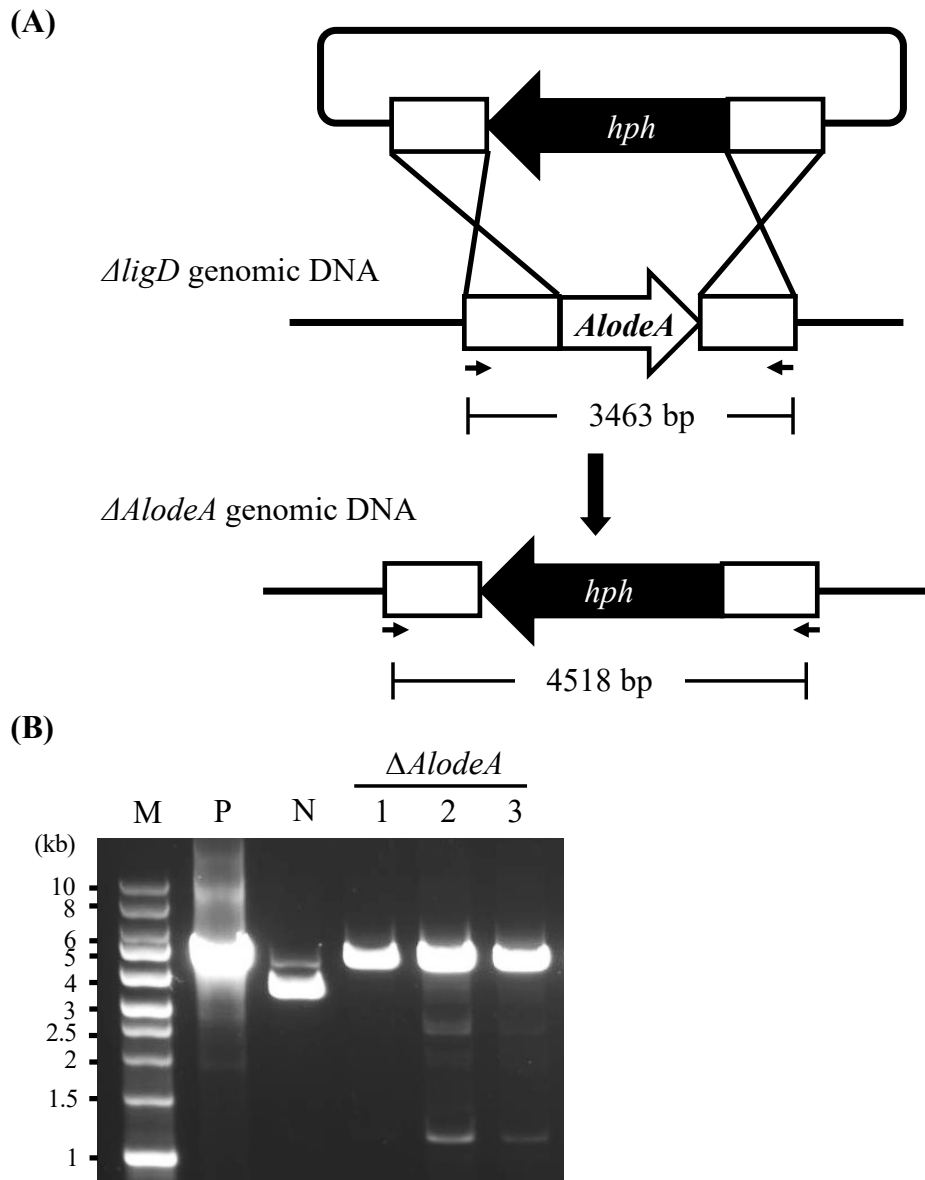


Fig. 1-13 *ΔAlodeA*株の構築と遺伝子破壊の確認

(A) *AlodeA*破壊のためのストラテジー。黒矢印は、コロニーダイレクトPCRで遺伝子破壊を確認するために使用したプライマーの位置を示している。

(B) *AlodeA*の破壊を確認するためのコロニーダイレクトPCRで増幅されたDNA断片のアガロースゲル電気泳動。

レーンM; 1 kb ラダー DNA マーカー、レーン P; 破壊用カセットを含むプラスミド (pRIE-*ΔAlodeA*)、レーンN; 親株 (*ΔligD*)、レーン 1-3; 形質転換体

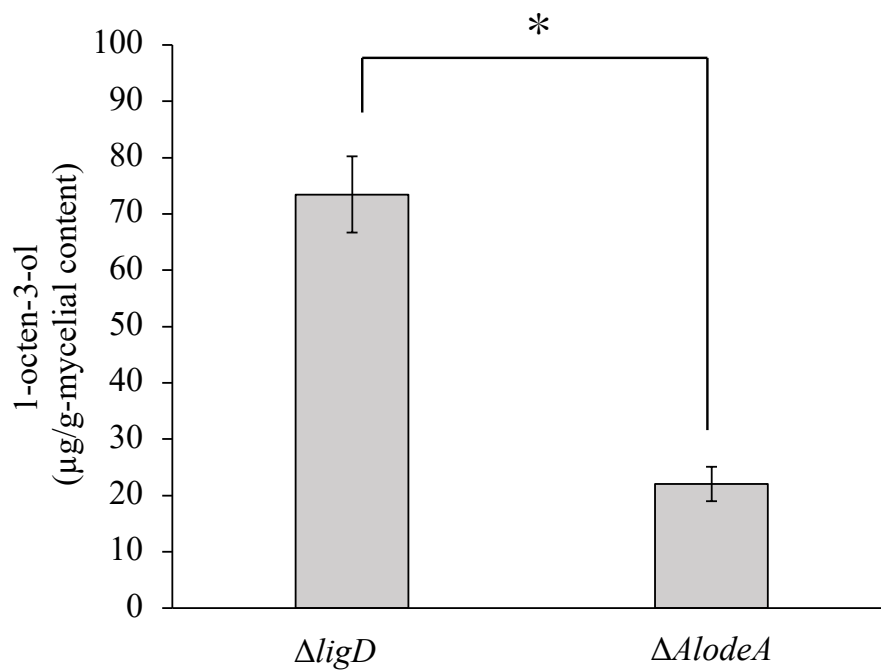


Fig. 1-14 黒麹菌*ΔAlodeA*株を用いて調製した麹における1-octen-3-ol生産量

*ΔligD*株、*ΔAlodeA*株を用いて調製した麹から、ジクロロメタンで抽出した1-octen-3-ol生産量をGCMSを用いて定量した。1-octen-3-ol生産量は、乾燥菌体重量に対して均一化した。エラーバーは、3連のデータにおける標準偏差を示す。Student's t-testにより有意差を\*で示した (\* $p < 0.05$ )。

#### 第4節 考察

本章ではまず、黒麹菌を用いて調製した麴における 1-octen-3-ol 生産性を確認した。比較対象として、1-octen-3-ol の標品及びタイ米の蒸米を用いた。Fig. 1-1 に示したように、黒麹菌を用いて調製した麴のクロマトグラムでは 1-octen-3-ol の標品と同様に、1-octen-3-ol を示すピーク (RT = 05:18) が検出された。一方で、黒麹菌を植菌していない蒸米のクロマトグラムでは、1-octen-3-ol を示すピークは検出されなかったことから、蒸米には 1-octen-3-ol が含まれていないことが示された。したがって、麴に含まれる 1-octen-3-ol は、黒麹菌によって生合成されていることが明らかになった。

黒麹菌を用いて調製した麴では 1-octen-3-ol の他にも蒸米には見られなかったピークが複数存在した。特に 1-octen-3-ol 以外でピークが大きかった化合物として 2-carboxymethyl-3-hexylmaleic acid anhydride (RT = 12:47) が検出された。本化合物は、古くから *A. niger* による生成が確認されており (40、41)、近年では *A. tubingensis* においても報告がある (42)。生理機能として、グラム陽性菌に対する微弱な抗菌作用、植物種子の発芽促進剤、芽・根の成長促進剤として報告されている (40、41)。しかし、*Aspergillus* 属糸状菌における作用や生合成機構については不明である。

ヘムペルオキシダーゼドメインはジオキシゲナーゼ反応に関与しており、その活性部位が基質特異性に関与している (43)。黒麹菌の Ppo のヘムペルオキシダーゼドメインにおける活性部位のアミノ酸残基について、他の典型的なヘムペルオキシダーゼと比較すると、AlPpoA の活性部位は GgLDS、ヒツジ PGHS1、およびヒツジ PGHS2 と同様に、Leu 残基を含むが、AlPpoC および AlPpoD では Val であった (Fig. 1-2)。即ち、オキシゲナーゼ反応に対する基質特異性に関連すると考えられているヘムペルオキシダーゼドメインの活性部位のアミノ酸残基は、AlPpoD と AlPpoC は類似していた (Fig. 1-2)。し

かしながら、遺伝子破壊の実験結果は、AlPpoC は 1-octen-3-ol 生合成に直接的に関与しているのに対して、AlPpoD の関与は小さいことを示唆する結果であった。この結果は、黒麹菌での 1-octen-3-ol の生合成が、ヘムペルオキシダーゼドメインを介したオキシゲナーゼ反応を伴わないことを示唆している。AlPpoD のヘムペルオキシダーゼ反応の基質と生成物は AlPpoC とは異なる可能性がある。各 Ppo 遺伝子の C 末端側にあるシトクロム P450 ドメインの活性部位のヘムシグネチャーモチーフに保存されているアミノ酸配列を比較した結果、ほとんどの脂肪酸オキシゲナーゼにおいて Cys 残基として保存されている箇所が AlPpoC のみ Gly 残基に置換されていた (Fig. 1-2)。A. nidulans PpoC でも同様に Gly 残基に置換されていたことから、PpoC はシトクロム P450 活性を失っている可能性がある。一方、AlPpoA および AlPpoD ではシトクロム P450 ドメインの活性部位におけるアミノ酸残基は共通していた (Fig. 1-2)。ΔAlppoA 株と ΔalppoD 株の両方が親株よりも高い 1-octen-3-ol 生産性を示したことを考慮すると (Fig. 1-7)、シトクロム P450 ドメインは 1-octen-3-ol 生合成を負に調節する機能を果たしている可能性がある。

3 種類の Alppo 遺伝子破壊株 (Δalppo 株) および過剰発現株 (OEAlppo 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、ΔalppoA 株は親株の 1.22 倍、ΔalppoD 株は親株の 1.40 倍の生産性を示したが、ΔalppoC 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、ppo 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、OEAlppoC 株で最も高く、OEAlppoA 株、OEAlppoD 株では、親株をわずかに下回ることが示された (Fig. 1-8)。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。*A. nidulans* では *ppoA* の過剰発現が *ppoC* の発現を阻害することから、*ppoC* の発現は *ppoA* によるフィードバック制御を受けることが指摘されている (34)。また、*A. nidulans* における知見から予測される 1-octen-3-ol 生合成経路を考慮すると (Fig. 0)、AlPpoA と AlPpoC は、基質であるリノール酸をめぐる競合関係にあると考えられる。したがって、この競合が起こらない *AlppoA* 破壊株では AlPpoC の反応生成物の生成が亢進し、その結果として 1-octen-3-ol 生合成が亢進された可能性があると考えている。*AlppoA* 破壊株では *AlppoC* の発現が上昇していることも考えられるため、遺伝子発現解析によってこれを明らかにすることができると考えている。一方、PpoD の基質と生成物は特徴付けられておらず、PpoC の発現調節への関与は分からない。ただし、シトクロム P450 ドメインの活性部位のアミノ酸配列における AlPpoD と AlPpoA の類似性を踏まえると、AlPpoD も AlPpoC の発現制御を行う可能性があると考えられる。

近年、マツタケ *T. matsutake* において報告された Hpl の配列情報を元に黒麹菌ゲノムデータベースより 2 つの *Alhpl* 遺伝子を見出した。遺伝子破壊による 1-octen-3-ol 生合成への関与について検討した結果、それぞれの単独破壊株で調製した麹における 1-octen-3-ol 生産性は変わらなかった (Fig. 1-12)。二つの配列はそれぞれが同程度の相同性を示していたことから、互いにその機能を補い合っている可能性が考えられた。二つの *Alhpl* 遺伝子について二重破壊株の取得を行い、1-octen-3-ol 生合成への関与を再度検討する必要がある。また、Hpl はシトクロム P450 ドメインを有するが、シトクロム P450 は生物において普遍的に保存されている酸化還元酵素であり、またその種類も非常に多い。Ppo にも当ドメインが保存されていることや、他にも黒麹菌ゲノムデータベース内にシトクロム P450 ドメインを示す配列が存在すると考



えられる為、今回見出した二つの *Alhpl* 以外の関与についても検討する必要があると考えた。

$\Delta AlodeA$  株における 1-octen-3-ol 生産量を検討した結果、 $\Delta AlodeA$  株の生産量は親株の 3 分の 1 以下まで低下した (Fig. 1-14)。この結果は、黒麹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、黒麹菌を用いて製麹した米麹に含まれる 1-octen-3-ol の大部分は、黒麹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。しかし、今回の検討では  $\Delta AlodeA$  株を用いて調製した麹において 1-octen-3-ol の生産量は 0 にはならなかった。 $\Delta AlppoC$  株を用いて調製した麹における生産量が検出限界以下であったことを踏まえると、リノール酸が *AlodeA* を介さずに供給される経路の存在、もしくは *AlppoC* の基質特異性が低く、リノール酸以外の脂肪酸からも 1-octen-3-ol 生合成が行われる可能性が考えられる。特に、前者の *AlodeA* を介さない場合のリノール酸供給源として、米由来の脂肪酸が考えられる。リノール酸はインディカ種の米の可食部 100 g 中に約 250 mg 含まれており、米はリノール酸の供給源に成り得ると考えられる。麹は米に麹菌を生育させているため、黒麹菌は米に含まれる脂肪酸を一部取り込み、1-octen-3-ol 生合成に用いている可能性がある。

## 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

## 第1節 緒言

第1章において、製麴過程において 1-octen-3-ol が黒麹菌によって生産されること、脂肪酸オキシゲナーゼ *AlppoC* がその生合成に大きく関与することを明らかにした。しかしながら、最終産物である泡盛に含まれる 1-octen-3-ol の由来については依然として不明である。

黒麹菌は、糖化酵素やクエン酸などの泡盛製造に重要な因子を数多く生産しているが、泡盛の品質に影響を与える香気成分の生産にも関与している。泡盛古酒における特徴香の原因物質として知られるバニリンの合成は、米の細胞壁に結合しているフェルラ酸を出発物質としている。これまでの研究では、黒麹菌が生産するフェルラ酸エステラーゼによって、米の細胞壁からフェルラ酸が放出されることが報告されていた (2)。さらに最近の研究では、黒麹菌が生産するフェノール酸デカルボキシラーゼがフェルラ酸から 4-ビニルグアイアコールへの変換に関与していることが明らかになり (6, 44)、熟成中にバニリンに化学変換されると考えられている。

このように、黒麹菌が生産する香気物質が泡盛の品質に影響を与えることがわかっているが、その影響については十分に検討されていない。泡盛実醸造の観点から、最終産物に含まれる香気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。

本章では、第1章において構築した  $\Delta Alppo$  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、即ち泡盛中の香気成分 1-octen-3-ol の含有量に対する各 *Alppo* 破壊の影響を調べた。

## 第 2 節 実験方法

### 1. 供試菌株及び培養・製麴

*A. luchuensis*  $\Delta$ ligD 株および第 1 章にて構築した *A. luchuensis*  $\Delta$ AlppoA 株、 $\Delta$ AlppoC 株および  $\Delta$ AlppoD 株を小仕込み試験に用いた。

これらの菌株はポテトデキストロース (PD) 寒天培地 (Becton, Dickinson and Company) で培養した。

泡盛小仕込み試験では、供試菌株として泡盛酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Aw101 株を使用した。5 mL YPD 培地 (1% Yeast Extract, 2% Peptone, 2% Dextrose) を調製し、L 字試験管を用いて 30°C、24 時間、振盪培養し前培養とした。この培養液 5 mL を 100 mL 容三角フラスコ中の 50 mL YPD 培地に加え、本培養とした。本培養は 30°C、96 時間、静置培養し、これを泡盛小仕込み試験に用いた。

## 2. 泡盛小仕込み試験

泡盛小仕込み試験に用いた麴は第1章第2節1-3に示した方法で調製した。麴は $\alpha$ 化米60gを用いたスケールで調製した。調製した麴全量、酵母の培養液670 $\mu$ L、水道水116.25 mLを混合して200 mL容マヨネーズ瓶を用いてもろみを調製した。このもろみを、温度制御されたウォーターバスを用いて14日間発酵させた。水温は、0~72時間は30 $^{\circ}$ C、72~96時間は28 $^{\circ}$ C、96~144時間は27 $^{\circ}$ C、144~216時間は26 $^{\circ}$ C、216~336時間は24 $^{\circ}$ Cに維持した。発酵24時間ごとにもろみの攪拌および重量を測定した。発酵後、約180gのもろみ全量を常圧蒸留装置（宮本理研工業株式会社、日本、大阪）により常圧蒸留して90 mLの泡盛（蒸留液）を得た。蒸留液はネジ蓋付ガラス瓶に入れて4 $^{\circ}$ Cで保管した。

もろみ発酵終了および蒸留後の留液におけるアルコール濃度はアルコメイトAL-3（理研計器（株））を用いて簡易測定した。

### 3. SPME-GCMS 法を用いた揮発性物質の分析

揮発性物質の抽出に適した固相マイクロ抽出 (SPME) 法を用いて、泡盛中の香気成分を抽出した (18)。SPME ファイバー (SUPELCO 社、57326-U 65  $\mu\text{m}$  PDMS/DVB (Stable flex/SS)) を用いた。60°C で 30 分間 20 mL 容ガラスバイアルに入れた 10 mL の試料をプレインキュベートした後、ファイバーをヘッドスペースに挿入し、60°C で 30 分間インキュベートして抽出した。試料は、エタノール濃度が 20% となるように濃度を調整して分析した。抽出された香気成分は、Agilent 7890B ガスクロマトグラフと Agilent 5975C 質量分析計 (Agilent Technologies) を用いて定量分析した。マススペクトルは EI 法により得られた。DB-5ms Ultra Inert カラム (30 m 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 mm) (Agilent Technologies) を用いて香気成分を分離した。ファイバーは 250°C で 2 分間、スプリットレスモードで脱着した。キャリアガスにはヘリウムを使用し、流量はヘリウムを 1.5 mL/min で使用し、オープン温度は 50°C で 2 分間保持した後、10°C/min の速度で 200°C まで上昇させた。250°C まで 3°C /min で昇温し、250°C で 2 分間保持した後、10°C/min の速度で 320°C まで上昇させた。MS 分析はスキャンモードで行い、分析範囲は  $m/z$ ; 35-200 であった。GC のクロマトグラムで検出された化合物は、その保持時間を標準物質の化合物の保持時間と比較して同定した。さらに、標準物質が手に入らなかった化合物の同定は、NIST 98 Mass Spectral Library ライブラリー (National Institute of Standards and Technology) に登録されている化合物の保持時間と比較して、同定した。1-octen-3-ol は標準物質をもとに作成した検量線を用いて定量した。その他の香気成分は NIST ライブラリーの情報を元に同定し、 $m/z$  top peak のエリア値に基づいて比較した。

### 第3節 実験結果

#### 1. 黒麹菌の脂肪酸オキシゲナーゼ破壊株を用いた泡盛小仕込み試験

*AlppoA*、*AlppoC*、*AlppoD* の破壊が、泡盛の香気成分、特に 1-octen-3-ol 含有量に及ぼす影響を調べるため、各  $\Delta Alppo$  株を用いて調製した麹を用いて泡盛小仕込み試験を行った。

調製した各もろみに対して、24 時間ごとにもろみ重量を測定し、その経時変化を調べた結果、アルコール発酵時の二酸化炭素発生によるもろみ重量の経時的な減少が見られた (Fig. 2-1)。各菌株間のもろみにおける日毎 CO<sub>2</sub> 減少量には有意な差はなく、どの菌株を用いて調製したもろみにおいても同様にアルコール発酵が進行した。発酵終了時のもろみのアルコール濃度は平均 16.0%であった。常圧単式蒸留により得た蒸留液のアルコール濃度は平均 28.4%であり、*Alppo* の破壊はアルコール発酵の進行に有意な影響を与えなかった (Table 2)。

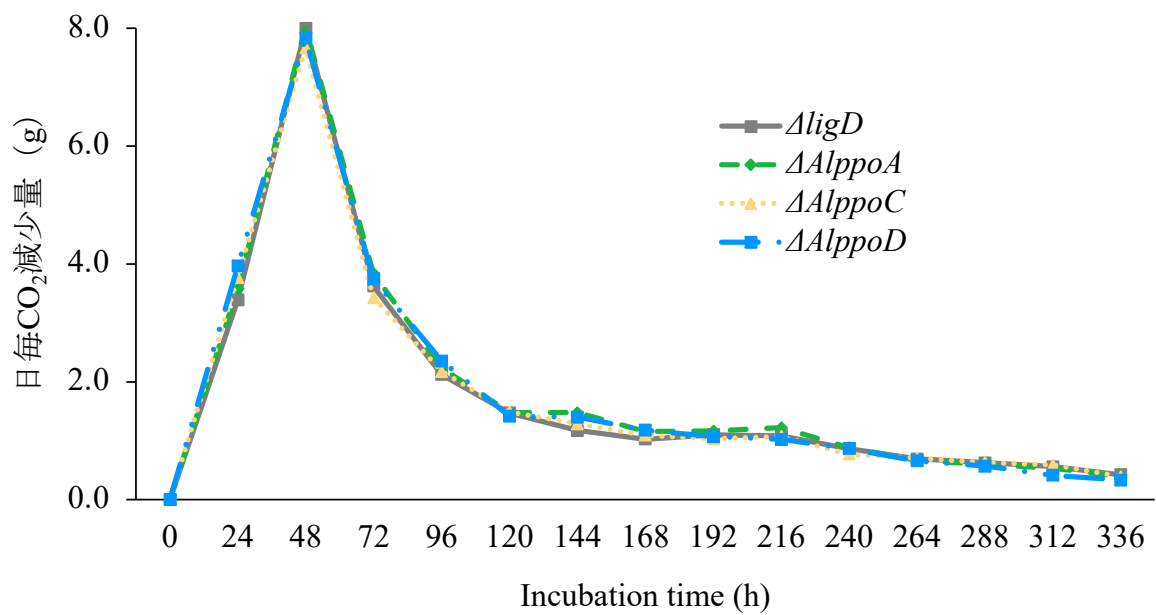


Fig. 2-1 泡盛小仕込み試験におけるもろみ発酵中のもろみ重量の推移

もろみ発酵開始から24時間ごとにもろみ重量を測定し、その重量の差から日毎のCO<sub>2</sub>減少量を算出した。各菌株間での差はなく、どの菌株を用いたもろみにおいても同様にアルコール発酵が進行した。



Table 2 泡盛小仕込み試験におけるもろみ発酵前後のもろみ重量  
およびアルコール濃度

	もろみ重量 発酵開始 (g)	もろみ重量 発酵終了 (g)	総CO <sub>2</sub> 減少量 (g)	発酵終了時 もろみアルコール 濃度 (%)	蒸留液 アルコール濃度 (%)
<i>ΔligD</i>	203.12	176.98	26.14	15.98	28.68
<i>ΔAlppoA</i>	203.11	175.90	27.21	15.87	27.75
<i>ΔAlppoC</i>	203.43	177.34	26.09	16.10	28.67
<i>ΔAlppoD</i>	203.15	176.34	26.81	15.85	28.35

## 2. 蒸留液に含まれる揮発性物質の分析

蒸留液のアルコール濃度が 20%になるように、各蒸留液に加水した後、SPME-GCMS 分析で 1-octen-3-ol を含む香気成分を分析した。各蒸留液に含まれる 1-octen-3-ol の量は、得られた GCMS のピーク面積から求め、アルコール濃度 25%相当に換算し含有量を評価した (Fig. 2-2)。親株である  $\Delta ligD$  株を用いて調製した蒸留液における 1-octen-3-ol 含有量は 2.0 mg/L であった。 $\Delta AlppoA$  株で調製した蒸留液中の 1-octen-3-ol 含有量は 2.4 mg/L であり、親株の 1.2 倍の値を示した。 $\Delta AlppoC$  株で調製した蒸留液からは、1-octen-3-ol が検出されなかった (1-octen-3-ol の検出限界は 8 mg/L 以下であった。)。したがって、 $\Delta AlppoC$  は泡盛蒸留液中の 1-octen-3-ol 生成にとって必須であることが示された。 $\Delta AlppoD$  株で調製した蒸留液中の 1-octen-3-ol 含有量は 2.5 mg/L であり、これは親株の 1.2 倍の値を示した。

次に、1-octen-3-ol 以外の香気成分に関する分析と評価を行った。今回の分析では中高沸点の化合物を検出しやすい抽出・分析条件を採用した (45)。1-octen-3-ol の他に、泡盛の主要な香気成分として知られるカプロン酸エチル、カプリル酸エチル、 $\beta$ -フェネチルアルコールが今回の分析で検出された。各化合物について NIST のライブラリー情報を元に Top peak を示すフラグメントイオンの m/z のエリア値を算出した。親株である  $\Delta ligD$  株を用いて調製した蒸留液の値を 100%として、これら化合物の含有量を比較した (Fig. 2-3)。その結果、 $\beta$ -フェネチルアルコールにおいて親株である  $\Delta ligD$  株と  $\Delta AlppoD$  株間に有意な差が確認された。一方で、カプロン酸エチルおよびカプリル酸エチルにおいてはサンプル間でのばらつきが大きかったこともあり、どのサンプル間においても有意な差は見られなかった。

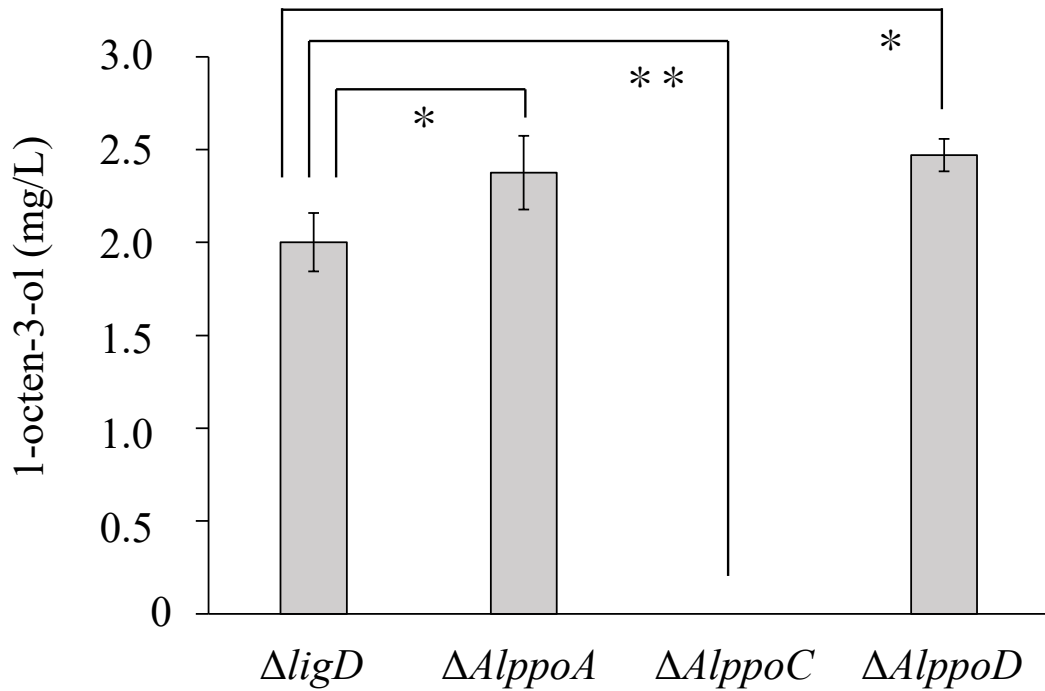


Fig. 2-2 黒麹菌 $\Delta Alppo$ 株を用いて調製した蒸留液における1-octen-3-ol含有量

$\Delta ligD$ 、 $\Delta AlppoA$ 、 $\Delta AlppoC$ 、および $\Delta AlppoD$ 株で調製した米麹を用いて、各蒸留液を調製した。各蒸留液は、分析前にアルコール濃度を20%に調整した。SPMEで抽出した1-octen-3-olは、GCMSを用いて定量した。得られた値をアルコール濃度25%に換算した。エラーバーは、3連のデータにおける標準偏差を示す。Student's t-testにより有意差を\*で示した (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )。

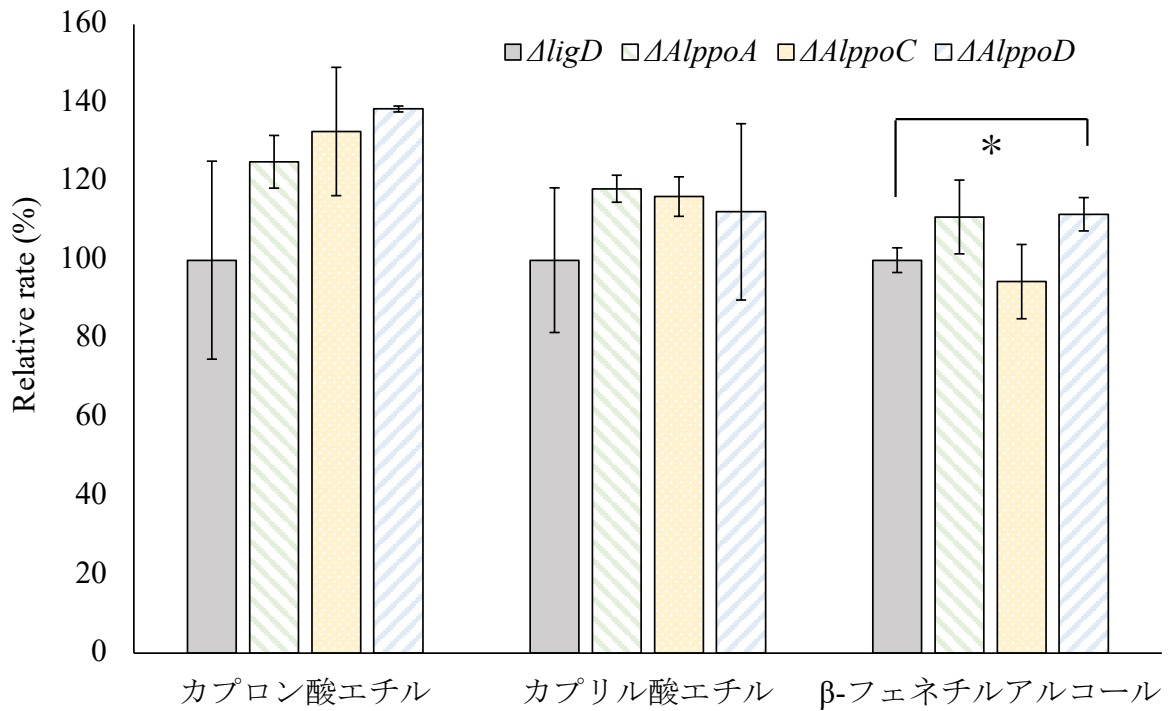


Fig. 2-3 黒麹菌 $\Delta Alppo$ 株を用いて調製した蒸留液の主要香気成分分析

各物質における値は $\Delta ligD$ 株を用いて調製した蒸留液における値を100%とした割合で示している。それぞれ3連のデータを用いて作製した。エラーバーはそれぞれの標準偏差を示し、Student's t-testにより有意差を\*で示した (\* $p < 0.05$ )。

#### 第4節 考察

1-octen-3-ol は、アルコール飲料を含む多くの食品や飲料に含まれる香気成分である (1、8-16、18)。1-octen-3-ol は、日本酒の味に寄与していると報告されている (16)。泡盛中の 1-octen-3-ol の濃度 (平均 231  $\mu\text{g/L}$ ) は官能閾値 (12  $\mu\text{g/L}$ ) を超えており、官能特性に影響を与えていると考えられる (3、18)。しかし、その生合成メカニズムの詳細は明らかにされていなかった。*Aspergillus* 属が 1-octen-3-ol を生産することはいくつかの研究で報告されている (19-24)。我々は、*A. luchuensis* が米麴中で 1-octen-3-ol を生産し、*AlppoC* がその生産を媒介することを第1章で明らかにした。しかし、泡盛の 1-octen-3-ol 生産に対して、製麴後のプロセスがどのように影響するかは不明であった。本章における、泡盛小仕込み試験において  $\Delta$ *AlppoC* 株を用いて製造した泡盛でのみ、1-octen-3-ol が検出されなかったことから (Fig. 2-2)、製麴後の工程には 1-octen-3-ol の生成に関わる要因がないことが強く示唆された。このように、*A. luchuensis* の *AlppoC* が最終産物である泡盛の 1-octen-3-ol 生産に必須の役割を果たしていることを明らかにしたのは、今回の報告が初めてである。

白麴菌 *A. luchuensis* mut. *kawachii* (*A. kawachii*) を用いて調製した蒸留酒では、1-octen-3-ol の含有量が著しく低いことが以前に報告されている (3)。白麴菌では *ppoC* が保存されていないことから (Table 1-5)、白麴菌で調製した蒸留酒において 1-octen-3-ol 含有量が低かったのは、白麴菌が *ppoC* を持たないことが原因であると考えられた。また、泡盛に限らず、麴菌を用いて発酵させた他のアルコール飲料においても、*ppoC* が 1-octen-3-ol 生成の原因遺伝子であることが示唆された。本章における泡盛小仕込み試験と同様の条件により白麴菌および泡盛実醸造に広く使用される菌株である ISH1 株および ISH2 株を用いて小仕込み試験を行い、1-octen-3-ol 含有量を測定した (Fig. 2-

4)。 *ppoC* を保有せず、麴においても 1-octen-3-ol 非生産性を示した白麴菌および ISH2 株を用いて調製した蒸留液では  $\Delta AlppoC$  株を用いて調製した蒸留液と同様に 1-octen-3-ol は検出されなかった。

また、本検討では 1-octen-3-ol の他に、主要な香気成分としてカプロン酸エチル、カプリル酸エチル、 $\beta$ -フェネチルアルコールが検出された。これらの化合物はいずれも酵母によって生合成されと考えられており、カプロン酸エチルおよびカプリル酸エチルは脂肪酸合成経路を介して生合成されると報告されている (46、47)。 $\beta$ -フェネチルアルコールにおいてはアミノ酸代謝、即ちエールリッヒ経路との関連が強いと報告されている (48)。有意差は見られなかったが *Alppo* 破壊株で増加傾向を示したカプロン酸エチルは、酵母において中鎖脂肪酸から長鎖脂肪酸への伸長に関わる脂肪酸合成酵素の活性を阻害することで高生産化されることが報告されている (47)。*ppo* の基質はリノール酸などの長鎖不飽和脂肪酸であるため、*ppo* 破壊によって麴菌の脂肪酸合成経路が影響を受けた結果、酵母の代謝産物生成に影響が出る可能性がある。麴菌内の脂肪酸合成経路関連物質が酵母の代謝産物にどう影響するかは不明であるが、もろみ発酵中に麴菌は死滅・溶解し、様々な麴菌代謝産物が酵母の生育・代謝に影響を与えていると考えられる。一方、酵母における  $\beta$ -フェネチルアルコールの生合成は米や麴由来のアミノ酸によって影響を受けることが報告されている (48)。近年、黒麴菌において高プロテアーゼ活性を指標に選抜した菌株における 1-octen-3-ol 生産量が顕著に増加するという報告があった (49)。このことより黒麴菌においてプロテアーゼ産生と 1-octen-3-ol 産生には関連がある可能性があると言われている。したがって、*ppo* 破壊の影響が黒麴菌プロテアーゼ活性に影響を及ぼし、結果として麴から供給されるアミノ酸組成および含量に影響を及ぼす可能性があると考えている。

本研究では、 $\Delta AlppoC$  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。この結果より、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。

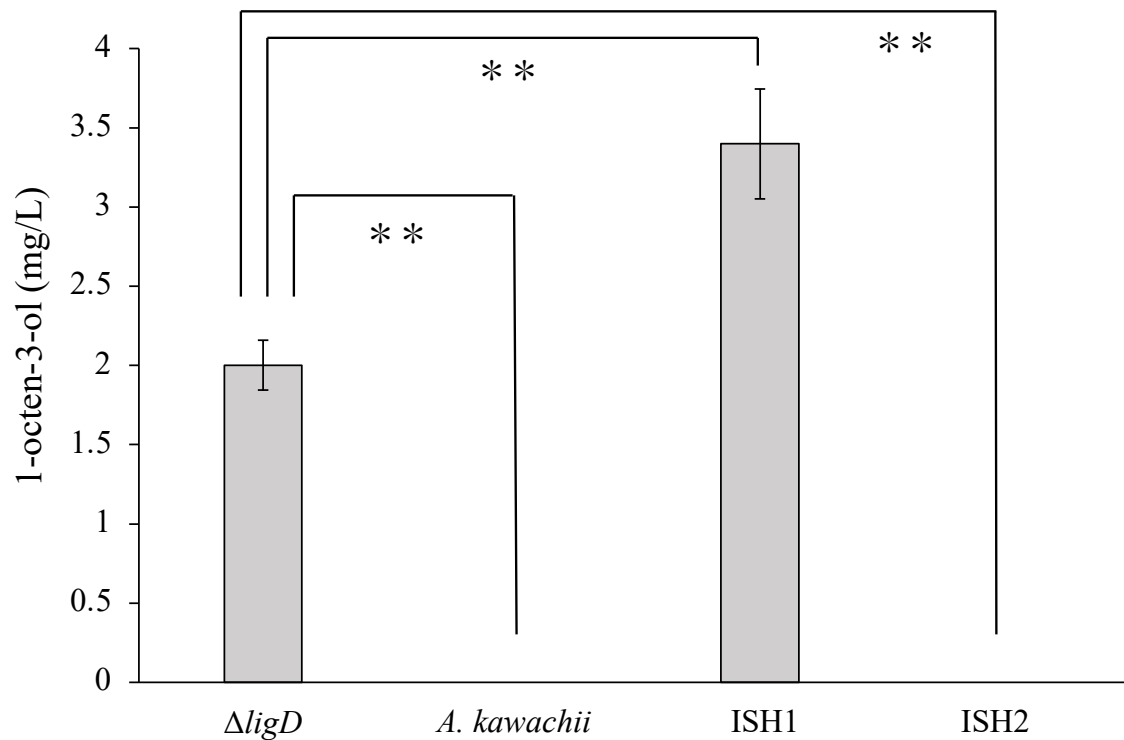


Fig. 2-4 白麹菌および黒麹菌実醸造菌株を用いて調製した蒸留液における1-octen-3-ol含有量

*A. luchuensis* NBRC 4314株を親株とする $\Delta ligD$ 株、白麹菌 (*A. kawachii* NBRC 4308株)、泡盛実醸造に用いられる菌株である*A. luchuensis* ISH1および*A. luchuensis* ISH2株を用いて蒸留液を調製した。各蒸留液は、分析前にアルコール濃度を20%に調整した。SPMEで抽出した1-octen-3-olは、GCMSを用いて定量した。得られた値をアルコール濃度25%に換算した。エラーバーは、3連のデータにおける標準偏差を示す。Student's t-testにより有意差を\*で示した (\*\* $p < 0.01$ )。



## 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

## 第1節 緒言

第1章、第2章の検討により、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。このことから *AlppoC* の発現制御は 1-octen-3-ol 生産制御機構を理解する上で重要であると考えられた。

近年、独立行政法人 酒類総合研究所において、黒麹菌の主要転写因子破壊株ライブラリーが構築された (50)。この転写因子破壊株ライブラリーには各転写因子に関わる遺伝子破壊株 115 株が含まれている。本章では転写因子破壊株の 1-octen-3-ol 生産性を比較することによって、1-octen-3-ol 生合成の制御因子を探索することを目的とした。特に、1-octen-3-ol 生産性を上昇させた転写因子破壊株について、1-octen-3-ol 生合成の必須因子である *AlppoC* の発現への影響を詳細に調べた。また、各転写因子の機能に関する知見より、黒麹菌における 1-octen-3-ol 生産の生理学的意義について考察した。

## 第 2 節 実験方法

### 1. 供試菌株及び培養・製麴

黒麴菌転写因子破壊株は、独立行政法人 酒類総合研究所にて構築された黒麴菌転写因子破壊株ライブラリーを用いた (50)。*A. luchuensis*  $\Delta ligD$  株を親株とする転写因子に関わる遺伝子破壊株合計 115 株を実験に用いた (Table 3)。*A. luchuensis* NBRC 4314 株および *A. luchuensis*  $\Delta ligD$  株を含む全ての黒麴菌はポテトデキストロース (PD) 寒天培地 (Becton, Dickinson and Company) で培養した。

黒麴菌を用いた麴の調製は、第 1 章第 2 節 1 に示した製麴方法と同様に実施した。なお 48 時間以降の培養については 34°C を維持したまま、24 時間ごとに麴を攪拌した。湿度について、27 時間以降は制御を行わなかった。

Table 3 転写因子破壊株リストとその菌株を用いて調製した麴に含まれる1-octen-3-ol含有量

遺伝子名	1-octen-3-ol ( $\mu\text{g/g-koji}$ )	遺伝子名	1-octen-3-ol ( $\mu\text{g/g-koji}$ )	遺伝子名	1-octen-3-ol ( $\mu\text{g/g-koji}$ )
<i>ligD</i>	6.47	<i>hsf1</i>	6.75	<i>sonC</i>	6.86
<i>acdX</i>	3.06	<i>htfA</i>	8.33	<i>srbA</i>	5.45
<i>ace2</i>	3.65	<i>inuR</i>	8.27	<i>sreA</i>	4.32
<i>acuK</i>	5.49	<i>kojR</i>	7.17	<i>srrA</i>	1.01
<i>acuM</i>	4.83	<i>leuB</i>	5.77	<i>steA</i>	5.81
<i>adaB</i>	5.61	<i>lreA</i>	4.70	<i>stuA</i>	4.07
<i>amdA</i>	5.16	<i>lreB</i>	4.54	<i>tamA</i>	7.89
<i>amdR</i>	5.47	<i>mbf1</i>	6.55	<i>uaY</i>	6.28
<i>amdX</i>	5.62	<i>mcnB</i>	6.04	<i>xlnR</i>	5.84
<i>amyR</i>	4.76	<i>meaB</i>	3.71	<i>xprG</i>	4.69
<i>anbH1</i>	6.62	<i>metR</i>	4.73	<i>zapA</i>	5.86
<i>araR</i>	6.92	<i>metZ</i>	5.84	<i>zfpA</i>	5.40
<i>arcA</i>	6.45	<i>mpt</i>	5.90	<i>zfpB</i>	7.88
<i>areA</i>	0.00	<i>msnA</i>	2.68	<i>zipA</i>	4.95
<i>areB</i>	5.35	<i>mtfA</i>	4.98	<i>zipC</i>	0.00
<i>atfA</i>	6.16	<i>napA</i>	6.48	<i>agsE</i>	6.52
<i>atfB</i>	6.12	<i>nirA</i>	5.82	<i>100660</i>	5.89
<i>azf1</i>	7.53	<i>nosA</i>	6.37	<i>hbx1</i>	5.14
<i>clbR</i>	6.88	<i>nsdD</i>	24.07	<i>hbx3</i>	5.25
<i>clrA</i>	6.41	<i>oafA</i>	5.34	<i>hbx4</i>	5.26
<i>clrB</i>	6.05	<i>oefC</i>	5.65	<i>hbx5</i>	5.45
<i>cpcA</i>	6.50	<i>pacC</i>	8.10	<i>hbx6</i>	5.24
<i>creA</i>	0.32	<i>palcA</i>	2.50	<i>hbx7</i>	4.39
<i>crzA</i>	2.05	<i>prnA</i>	6.19	<i>hbx8</i>	4.68
<i>dopA</i>	4.98	<i>priT</i>	1.14	<i>hbx9</i>	5.24
<i>ecdR</i>	6.13	<i>qutA</i>	5.77	<i>030093</i>	2.15
<i>facB</i>	6.33	<i>rfeD</i>	5.68	<i>060250</i>	0.28
<i>farA</i>	7.28	<i>rfeF</i>	5.05	<i>100495</i>	5.67
<i>farB</i>	6.50	<i>rfeG</i>	4.64	<i>170664</i>	3.52
<i>fhpA</i>	6.84	<i>rgdA</i>	2.60	<i>171256</i>	4.54
<i>flbB</i>	3.48	<i>rhaR</i>	5.53	<i>200766</i>	6.23
<i>flbC</i>	1.54	<i>rlmA</i>	3.60	<i>200777</i>	5.71
<i>flbD</i>	2.30	<i>rosA</i>	5.57	<i>210520</i>	7.02
<i>galX</i>	6.83	<i>rsmA</i>	5.95	<i>210742</i>	5.73
<i>hacA</i>	7.63	<i>sclR</i>	9.29	<i>211035</i>	2.75
<i>hapB</i>	5.33	<i>sdrA</i>	5.41	<i>rum1</i>	0.46
<i>hapC</i>	0.25	<i>sfgA</i>	6.15	<i>250030</i>	14.12
<i>hapE</i>	0.21	<i>silA</i>	5.92	<i>260101</i>	4.89
<i>hapX</i>	6.14	<i>sltA</i>	4.28		

## 2. 香気物質の抽出および GCMS を用いた分析

麴からの香気物質の抽出および GCMS を用いた分析は、第 1 章第 2 節 6、7 に示した方法と同様に行った。黒麴菌転写因子破壊株については、香気物質の抽出および分析は 1 連でのみ行っており、その他の検討は 3 連で実施した。

### 3. 麴からの RNA 抽出および RT-qPCR 法による遺伝子発現解析

麴からの RNA 抽出および RT-qPCR 法による遺伝子発現解析は、第 1 章第 2 節 8、9 に示した方法と同様に行った。RT-qPCR に用いたプライマーは、Table 1-4 に示した。

### 第3節 実験結果

#### 1. 黒麹菌転写因子破壊株ライブラリーを用いて作製した麹における香気物質の分析

転写因子破壊株の親株である *A. luchuensis*  $\Delta ligD$  株および転写因子破壊株 115 株で調製した各麹における 1-octen-3-ol の含有量を調べた。なお、転写因子破壊株ライブラリーに含まれる菌株の一つである *brlA* 破壊株は、生育が著しく悪く、分生子が着生されない菌株であり、製麹操作において他の菌株と同様の操作を行うことができないため検討対象外とした。なお、*brlA* は無性生殖調節因子として知られており、この遺伝子破壊株において分生子形成が不十分であったのは *brlA* の表現型が示されたものと考えられた。

親株を含めた 116 株における麹に含まれる 1-octen-3-ol 含有量を Table 3 および Fig. 3-1 に示した。親株である *A. luchuensis*  $\Delta ligD$  株を用いて調製した麹における 1-octen-3-ol 含有量と比較して、2 倍以上の含有量を示した転写因子破壊株は  $\Delta nsdD$  株および  $\Delta 250030$  株の 2 株であり、最大の含有量を示したのは  $\Delta nsdD$  株であった。なお、*nsdD* は有性生殖に関わる因子として知られており、分生子形成については目視において、親株と比較して増加する傾向が見られた。

一方、親株における 1-octen-3-ol 含有量と比較して 2 分の 1 以下を示した転写因子破壊株は 16 株あった。また、転写因子破壊株ライブラリーに含まれる菌株の中には米への生育が悪く、1-octen-3-ol が検出されない株が 2 株あった ( $\Delta areA$  および  $\Delta zipC$ )。これらの結果より、黒麹菌における 1-octen-3-ol 合成に関わる可能性がある転写因子を選抜することが出来た。

次に、最大の 1-octen-3-ol 含有量を示した  $\Delta nsdD$  株で製麹した麹における 1-octen-3-ol 含有量の経時変化（培養 0 時間から 96 時間）を検討した。 $\Delta nsdD$

株を用いて製麹した麹における 1-octen-3-ol 生産量は、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 時間における製麹過程のどの時間においても実験室株である *A. luchuensis* 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 (Fig. 3-2)。



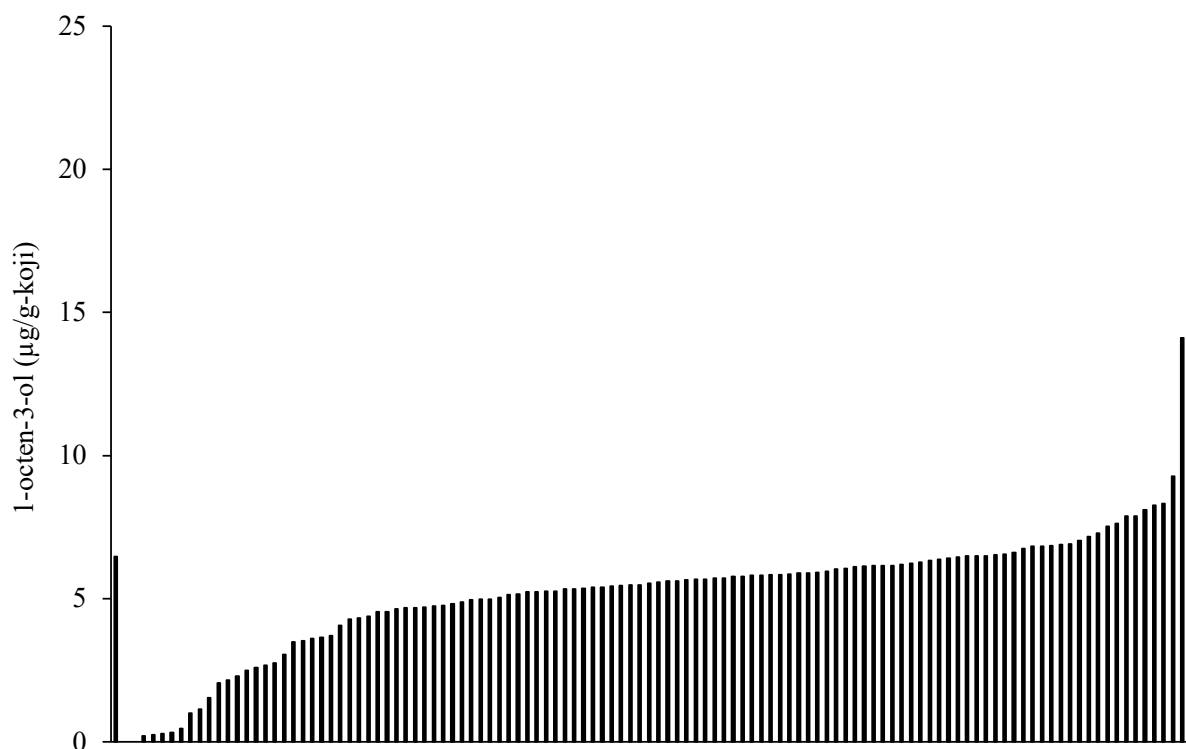


Fig. 3-1 黒麹菌 $\Delta ligD$ 株および転写因子破壊株を用いて調製した麴に含まれる1-octen-3-ol含有量

*A. luchuensis* NBRC 4314株を親株とする $\Delta ligD$ 株、黒麹菌転写因子破壊株ライブラリーに含まれる転写因子破壊株114菌株をそれぞれ用いて麴を調製した。各麴に含まれる1-octen-3-ol量をGCMS分析により測定した。それぞれ1連ずつ調べ、その含有量ごとに並べた。

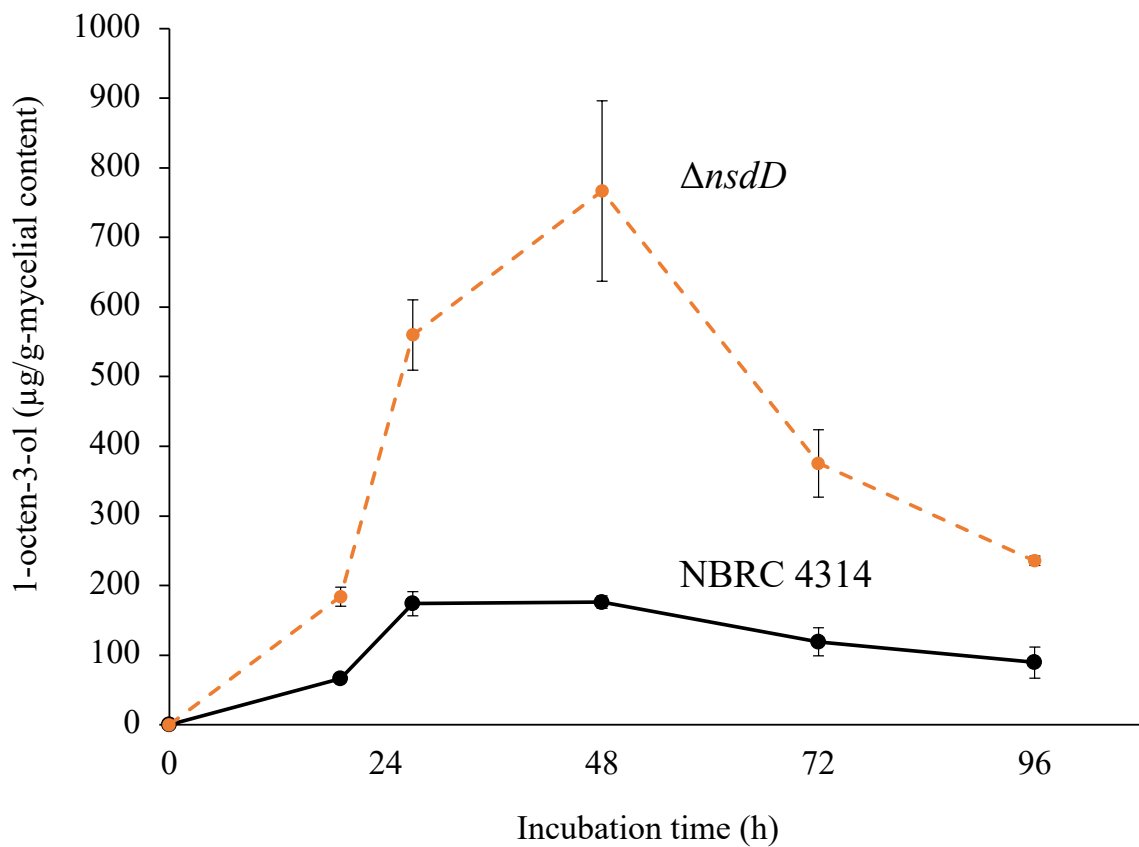


Fig. 3-2 黒麹菌NBRC 4314株および $\Delta nsdD$ 株を用いて調製した麴における1-octen-3-ol生産量

実験室株である*A. luchuensis* NBRC 4314株と1-octen-3-ol高含有を示した $\Delta nsdD$ 株をそれぞれ用いて麴を調製した。各麴に含まれる1-octen-3-ol量をGCMS分析により測定した。それぞれ3連ずつ調べ、麴に含まれる菌体量あたりで評価した。

## 2. 1-octen-3-ol 生産に関与する転写因子破壊株における生合成関連遺伝子の発現解析

$\Delta nsdD$  株は転写因子破壊株を含む全ての株の中で最大の 1-octen-3-ol 生産量を示した。このことから、 $\Delta nsdD$  株は 1-octen-3-ol 生合成の必須因子である *AlppoC* の発現が上昇している可能性があると考えた。そこで、 $\Delta nsdD$  株で製麴した麴における *AlppoC* の発現動態を検討した。

*A. luchuensis* NBRC 4314 株および  $\Delta nsdD$  株の *AlppoC* 発現動態をそれぞれ確認した。各菌株における培養 48 時間目の *AlppoC* の発現量を 1 として比較定量を行った。 $\Delta nsdD$  株における *AlppoC* の発現動態は、*A. luchuensis* NBRC 4314 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量が高いことが明らかとなった (Fig. 3-3A)。また、培養 48 時間以降の培養後期において、両株とも *AlppoC* の発現量が緩やかに上昇することが分かった。

次に、Fig. 3-3A で得られた遺伝子発現解析結果に基づいて、*AlppoC* の発現に対する *nsdD* 破壊の影響を評価した。各培養時間において、*A. luchuensis* NBRC 4314 株および  $\Delta nsdD$  株の *AlppoC* 発現量を比較した。各培養時間の *A. luchuensis* NBRC 4314 株における発現量を 1 として比較定量を行った。各培養時間における *AlppoC* 発現量を比較すると、 $\Delta nsdD$  株における *AlppoC* の発現量は、製麴過程全体にわたって *A. luchuensis* NBRC 4314 株における *AlppoC* の発現量を大きく上回っていた (Fig. 3-3B)。したがって、 $\Delta nsdD$  株では 1-octen-3-ol 生合成の必須因子である *AlppoC* の発現が亢進されていることが明らかになった。即ち、*NsdD* は *AlppoC* の発現を負に制御する機能をもつ転写因子であることが強く示唆された。

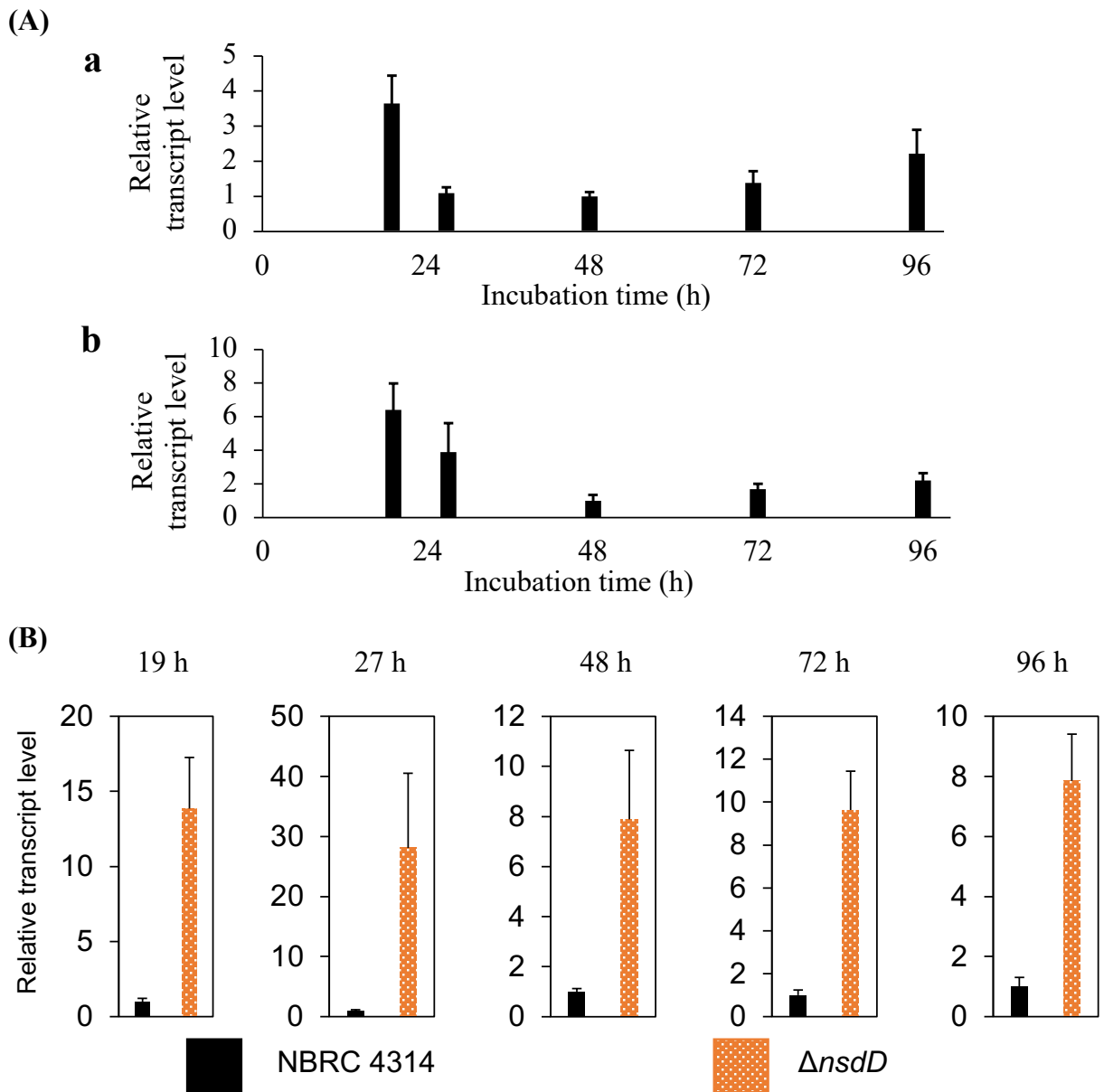


Fig. 3-3 黒麹菌NBRC 4314株および $\Delta nsdD$ 株を用いて調製した麴における $AlppoC$ 遺伝子の発現動態

(A) a; *A. luchuensis* NBRC 4314株を用いて調製した麴における $AlppoC$ の発現動態 b; *A. luchuensis*  $\Delta nsdD$ 株を用いて調製した麴における $AlppoC$ の発現動態

$AlppoC$ の発現動態は、それぞれ培養48時間における $AlppoC$ の発現量を1として $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて比較定量した。

(B) 黒麹菌NBRC 4314株および $\Delta nsdD$ 株を用いて調製した麴における各培養時間ごとの $AlppoC$ 遺伝子発現の比較

$AlppoC$ の発現動態は、各培養時間における*A. luchuensis* NBRC 4314株を用いて調製した麴での $AlppoC$ の発現量を1として $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて比較定量した。

エラーバーは、3連のデータにおける標準偏差を示す。

### 3. 製麴過程における生活環の制御に関わる転写因子 *brlA* の発現動態の解析

本章第3節1および2において生活環、特に有性生殖の調節に関わる転写因子として報告のある *nsdD* が 1-octen-3-ol 生合成および *AlppoC* 発現の制御に関与することが示唆された。そのため、*AlppoC* 発現の制御に生活環の調節因子が関与していると推測し、無性生殖調節因子の一つである *brlA* の関与について検討した。

先に示した通り、*brlA* 破壊株は転写因子破壊株ライブラリーに含まれているものの、分生子形成能が著しく低下しており、生育が非常に不安定であった。したがって、*brlA* 破壊株を用いた麴の調製が困難であり、1-octen-3-ol 生産性を評価することが出来なかった。そこで、実験室株である *A. luchuensis* NBRC4314 株で製麴を行い、その製麴過程における *brlA* の発現動態を調べた。*AlppoC* の発現動態と合わせて Fig. 3-4 に示した。

*brlA* の発現動態は培養 19 時間で最大を示し、一度低下した後に培養 48 時間以降に再び増加した。この発現動態は *AlppoC* の発現動態と同様の傾向を示していた。したがって、*brlA* は *AlppoC* の発現を制御する転写因子、あるいは *AlppoC* が *brlA* の発現に関与している可能性があると考えられた。

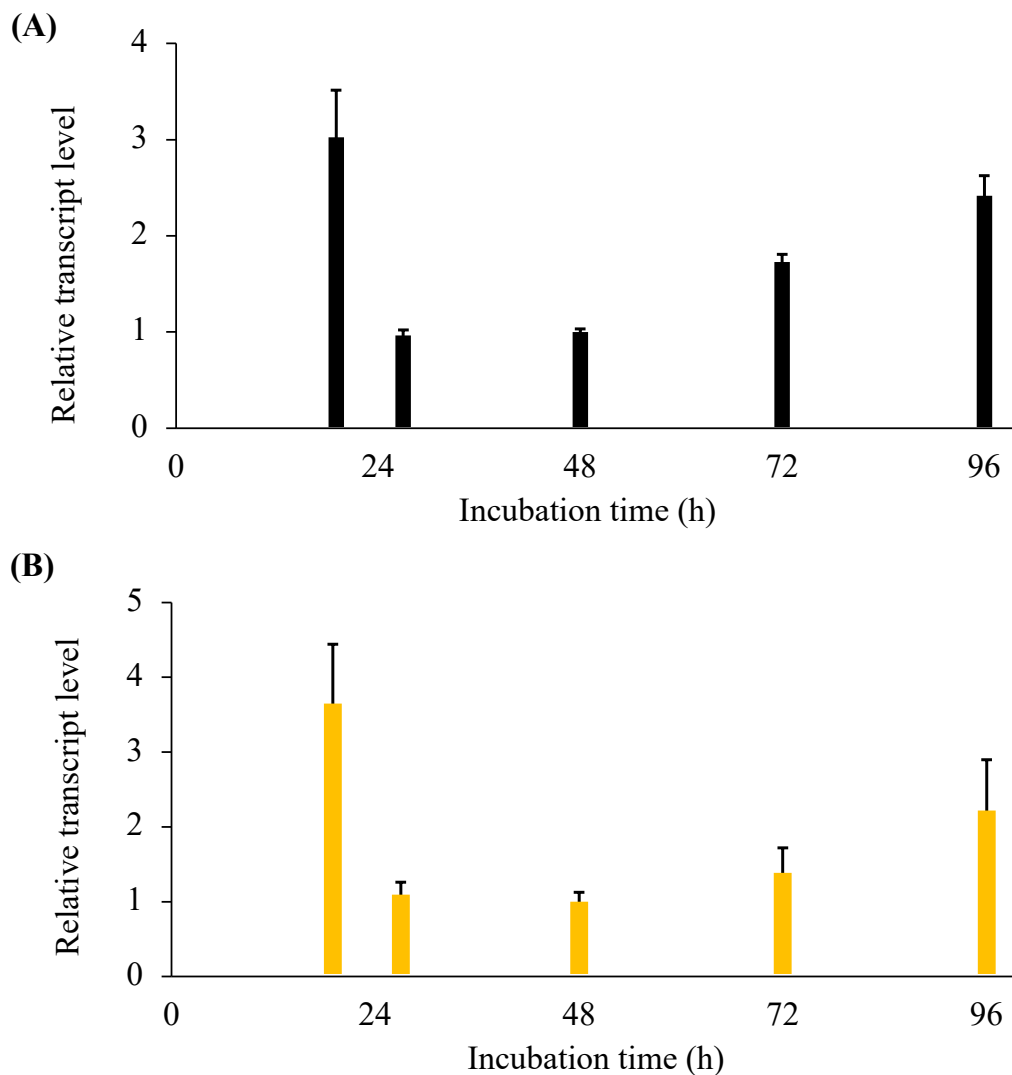


Fig. 3-4 黒麹菌NBRC 4314株における転写因子*brlA*と*AlppoC*の発現動態

(A) *A. luchuensis* NBRC 4314株を用いて調製した麴における*brlA*の発現動態  
 (B) *A. luchuensis* NBRC 4314株を用いて調製した麴における*AlppoC*の発現動態  
 各遺伝子の発現動態は、それぞれ培養48時間における発現量を1として $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて比較定量した。エラーバーは、3連のデータにおける標準偏差を示す。

#### 第4節 考察

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115株を用いて製麹した各麹における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生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*A. luchuensis*  $\Delta nsdD$ 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(51)。 $\Delta nsdD$ 株の1-octen-3-ol含有量は、全96時間の製麹過程におけるどの時間においても実験室株*A. luchuensis* NBRC 4314株の含有量を上回っていた。また、 $\Delta nsdD$ 株における*AlppoC*の発現量は、製麹過程全体にわたって実験室株の*AlppoC*発現量を上回っていた。この結果は、*nsdD*は製麹過程において*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。

本検討により*nsdD*が1-octen-3-ol生合成および*AlppoC*発現の制御に関与することが示唆された。*Aspergillus*属は不完全菌類であり、本研究に用いている黒麹菌*A. luchuensis*においても有性世代は見つかっていない。本菌は無性生殖、即ち分生子形成により無性的に増殖するが、無性生殖の調節因子の一つとして*brlA*が知られている(52)。本章の検討により、*brlA*と*AlppoC*の発現動態が類似していることが明らかになった。*brlA*の発現は*nsdD*によって負の制御を受けていることが報告されていることから(51)、*brlA*と*AlppoC*の発現が相関していることと*nsdD*によって*AlppoC*発現を負に制御すること

に矛盾はない。しかし、*brlA*、*AlppoC* および 1-octen-3-ol の相互関係については依然として不明である。

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 (34)。オキシリピンは前述したように脂肪酸酸化物の総称であり、1-octen-3-ol 生合成の中間体から生合成される。本章において、黒麹菌における有性生殖への関与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。したがって、本菌における 1-octen-3-ol 生合成と生活環の制御には密接な関連性があると考えられる。本章で得られた結果は、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。



## 総合考察

本研究は、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 1-octen-3-ol を研究対象とした。醸造学および分子生物学的手法を駆使することにより、黒麹菌における 1-octen-3-ol 生合成機構の解析を通じて、黒麹菌が本化合物を生産する生理学的意義を考察した。

第 1 章では *A. luchunesis* による 1-octen-3-ol 生産を確認した。黒麹菌による 1-octen-3-ol 生産は、コーヒー豆に生育した *A. luchuensis* における報告があるが (12)、蒸米における黒麹菌による 1-octen-3-ol の生産については、本研究が初めての報告である。1-octen-3-ol 生合成に関わると考えられた脂肪酸オキシゲナーゼをコードする *AlppoA*、*C*、*D* 遺伝子を黒麹菌ゲノムデータベースより見出し、各遺伝子破壊株および過剰発現株を構築した (Fig. 2-4、2-5、2-6)。得られた各遺伝子破壊株および過剰発現株を用いて調製した麹における 1-octen-3-ol 生産性の比較解析から、*AlppoC* が 1-octen-3-ol 生合成の必須因子であることを明らかにした (Fig. 1-7、1-8)。

また、1-octen-3-ol 生合成の中間体と予想されるヒドロペルオキシドから 1-octen-3-ol 生成への関与が予想された *Alhpl* 遺伝子を 2 つ見出し、破壊株を構築した (Fig. 1-11)。本検討では、*hpl* と相同性の高い配列をそれぞれ単独破壊し、1-octen-3-ol 生産への影響を評価したが、*Alhpl* の破壊による 1-octen-3-ol 生合成への影響は確認されなかった (Fig. 1-12)。両遺伝子がヒドロペルオキシドの機能を補完し合っている可能性を考慮し、両遺伝子の二重破壊による 1-octen-3-ol 生産への影響について検討が必要であると考えている。

加えて、*ppo* の反応基質と想定されるリノール酸の由来について検討を行った。黒麹菌細胞内でのリノール酸生合成への関与が考えられるオレイン酸デサチュラーゼ *AlodeA* を見出し、破壊株を構築した (Fig. 1-13)。麹を用いた検討の結果、*AlodeA* 破壊による 1-octen-3-ol 生産性の低下が確認された。したがって、*ppoC* の反応基質として想定されるリノール酸の多くは、米に含まれるリノール酸を利用するのではなく、黒麹菌細胞内の脂肪酸生合成経路

により供給されていることが示唆された (Fig. 1-14)。これまでに、Takahashi らによって、黄麹菌を用いて調製された麴について製麴過程における麴中のリノール酸と 1-octen-3-ol 量の経時変化が報告されている (20)。この Takahashi らの黄麹菌における報告と本研究における 1-octen-3-ol 生産性を比較すると、黄麹菌での 1-octen-3-ol 量は著しく低く、その代わりに 1-octen-3-one が高く検出されていた。また、Takahashi らによれば、黄麹菌で調製した麴に含まれるリノール酸は製麴中において増加傾向が確認されたことから、麴中の黄麹菌がリノール酸を生産することが指摘されている。以上のことから、黒麹菌菌体内におけるリノール酸の生合成と 1-octen-3-ol の生合成は連動している可能性が高いと考えられた。

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 (Fig. 1-9)。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 産生に対する *AlppoC* の発現の関与が改めて確認された (Fig. 1-10)。*AlppoA*、*AlppoD* 破壊や過剰発現により 1-octen-3-ol 生産性に影響が出たがその原因は未だ不明である。*AlppoC* の反応基質であるリノール酸の取り合いや *Alppo* 同士の発現への相互作用についての検討は今後の課題である。

第 2 章では、第 1 章で構築した *Alppo* 破壊株を用いて泡盛小仕込み試験を行うことにより、泡盛に含まれる 1-octen-3-ol の由来について検討した。黒麹菌を用いて製麴した麴において黒麹菌が *AlppoC* を介して 1-octen-3-ol を生産することに加えて、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 (Fig. 2-4)。これまで醸造分野では、出芽酵母に関して、醸造飲食品に含まれる香気物質生産を品質指標とする菌株の育種がな

されてきたが、麴菌での実施例はほとんどない。また、麴菌の香りは、醸造現場において製麴の進行状況を判断する目安として用いられる重要な要素である。清酒醸造の現場では、オハグロ臭や栗香、キノコ臭といった麴の香りを表現する用語があり、この中で 1-octen-3-ol はキノコ臭に関わると考えられている。しかしながら、これらの用語は基本的には複数の化合物に由来する香りを合計した官能表現であり、1-octen-3-ol はオハグロ臭や栗香と呼ばれる香りを構成する 1 成分として関与している可能性もある。麴菌由来香氣成分が最終産物の香氣生成に大きく関わるという本研究から得られた知見は、醸造における麴菌の役割としてよく知られる原料の糖化やクエン酸産生に加えて、麴菌が重要な役割をもつことを示している。

第 3 章では、1-octen-3-ol 生合成およびその中核を担う *AlppoC* 遺伝子の発現制御機構を解明するために、黒麴菌転写因子破壊株ライブラリーを用いて 1-octen-3-ol 生産性を制御する転写因子の選抜を行った。その結果、黒麴菌の有性生活環の制御への関与が予想される転写因子 *nsdD* が関与していることが示唆された (Fig. 3-1、3-2)。1-octen-3-ol 生合成経路の中間体から生合成されるオキシリピンは、*Aspergillus* 属糸状菌の生育・生殖分化に関連し、特にマイコトキシンを含む二次代謝産物のシグナル伝達物質として、海外での注目度は高い。今回、*Alppo* の制御因子として生活環に関わる転写因子が選抜されたことは、*Aspergillus* 属糸状菌における生殖分化における基礎的知見として意義深いものであると考える。また、*nsdD* の発現制御は 1-octen-3-ol 生産性と密接に関係していることから、*nsdD* をターゲットとした麴菌の育種を行うことにより、発酵飲食品の香氣改良等にも貢献できると考えられる。

泡盛において 1-octen-3-ol は特徴香の 1 つであり、その含有量の多さから官能特性に影響をもつ成分として考えられている。また、近年黒麴菌においてプロテアーゼ活性と 1-octen-3-ol 生産性の関連が報告されている (49)。麴菌のタンパク質分解活性は、酵母由来の香氣物質産生に大きな影響を与える

ことが指摘されていることから、醸造分野において 1-octen-3-ol 生合成機構を明らかにする当研究を実施する意義は大きいと考えられる。また、本研究から得られた知見は、香気物質を品質指標として醸造用麹菌を選抜・育種する手法の確立に寄与する。本研究により 1-octen-3-ol 生合成機構の一端を解明することが出来たが、依然として生合成経路およびその制御機構において不明な点が多い (Fig. 4)。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。製麹工程では一般に、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。

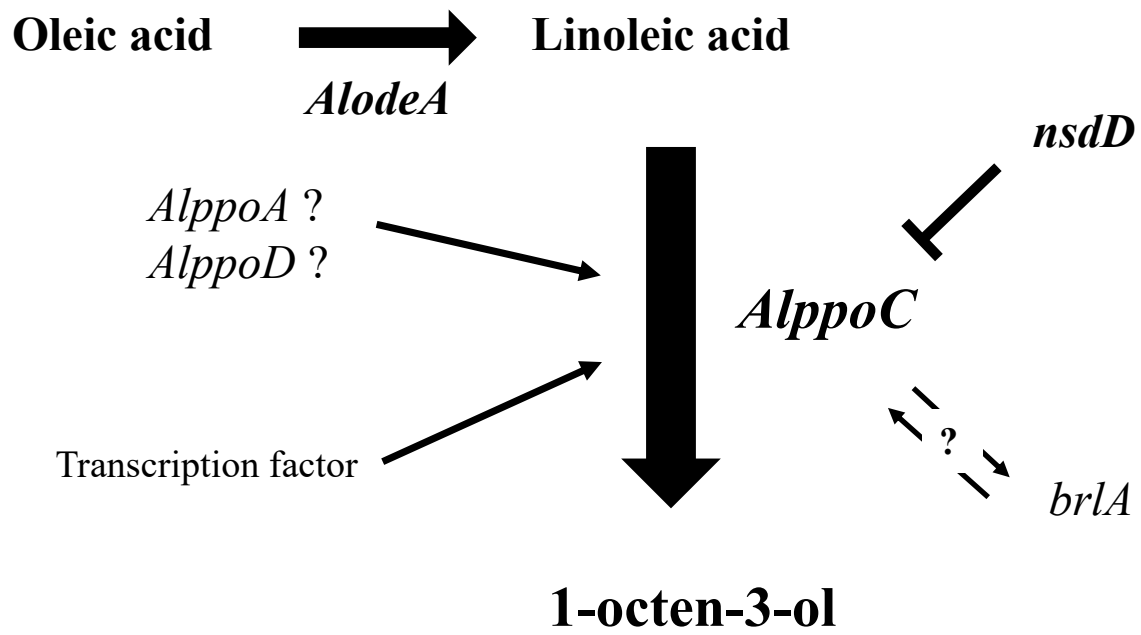


Fig. 4 本研究において明らかになった黒麹菌における1-octen-3-ol 生合成経路とその制御の概略

## 引用文献

1. Fukuda, H., Han, J., Mizutani, O., Kanai, M., and Yamada, O.: Characteristics of the volatile composition and simplified discrimination of sweet potato shochu and its application, *J. Brew. Soc. Japan*, 111, 545-555 (2016)
2. Koseki, T. and Iwano, K.: A mechanism for the formation and meaning of vanillin in awamori, *J. Brew. Soc. Japan.*, 93, 510-517 (1998)
3. Fukuda, H. and Han, J.: The origin and distillation behavior of 1-octen-3-ol in Awamori, *J. Brew. Soc. Japan*, 111, 750-757 (2016)
4. Yamada O, Takara R, Hamada R, Hayashi R, Tsukahara M, Mikami S: Molecular biological researches of Kuro-Koji molds, their classification and safety, *J. Biosci. Bioeng*, 112, 3, 233-237 (2011)
5. Sugama, S., Nishiya, T., Ohaba, T., Kawauchi, K., Teruya, H., Hara, S., and Murakami, H.: Awamori kouji ni kansuru chousa, kurokoujikin no bunpu to sono seishitsu, *J. Brew. Soc. Japan*, 70, 595-598 (1975)
6. Maeda, M., Tokashiki, M., Tokashiki, M., Uechi, K., Ito, S., and Taira, T.: Characterization and induction of phenolic acid decarboxylase from *Aspergillus luchuensis*, *J. Biosci. Bioeng.*, 126, 162-168 (2018)

7. Combet, E., Henderson, J., Eastwood, D. C., and Burton, K. S.: Eight-carbon volatiles in mushrooms and fungi: properties, analysis, and biosynthesis, *Mycoscience*, 47, 317-326 (2006)
8. Yajima, I., Yanai, T., Nakamura, M., Sakakibara, H., and Hayashi, K.: Volatile flavor compounds of Matsutake-*Tricholoma matsutake* (ITO et IMAI) SING. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 373-377 (1981)
9. Chung, M. W. and Ziyang, W.: Volatile compounds in fresh and processed shiitake mushrooms (*Lentinus edodes* Sing.), *Food Sci. Res.*, 6, 166-170 (2000)
10. Morawicki, R. O. and Beelman, R. B.: Study of the biosynthesis of 1-octen-3-ol using a crude homogenate of *Agaricus bisporus* in a bioreactor, *J. Food Sci.*, 73, C135-C139 (2008)
11. Lu, H., Li, H., Lu, H., Li, X. L., and Zhou, A. G.: Chemical composition of lavender essential oil and its antioxidant activity and inhibition against rhinitis-related bacteria, *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4, 309e313 (2010)
12. Mielnik, M. B., Olsen, E., Vogt, G., Adeline, D., and Skrede, G.: Grape seed extract as antioxidant in cooked, cold stored Turkey meat, *LWT - Food Sci. Technol.*, 39, 191-198 (2006)
13. Hiratsuka, S., Aoshima, S., Koizumi, K., and Kato, N.: Changes of the volatile flavor compounds in dark muscle of skipjack tuna during storage, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 77, 1089-1094 (2011)



14. Díaz, P., Señoráns, F. J., Reglero, G., and Ibañez, E.: Truffle aroma analysis by headspace solid phase micro extraction, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6468-6472 (2002)
15. Jeleń, H. H., Obuchowska, M., Zawirska-Wojtasiak, R., and Wasowicz, E.: Headspace solid-phase microextraction use for the characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2360-2367 (2000)
16. Mimura, N., Isogai, A., Iwashita, K., Bamba, T., and Fukusaki, E.: Gas chromatography/mass spectrometry based component profiling and quality prediction for Japanese sake, *J. Biosci. Bioeng.*, 118, 406-414 (2014)
17. Hayase, F., Takahagi, Y., and Watanabe, H.: Analysis of cooked flavor and odorants contributing to the koku taste of seasoning soy sauce, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 60, 59-71 (2013)
18. Osafune, Y., Toshida, K., Han, J., Isogai, A., and Mukai, N.: Characterisation and threshold measurement of aroma compounds contributing to the quality of Honkaku shochu and Awamori, *J. Inst. Brew.*, 126, 131-135 (2020)
19. Kaminski, E., Stawicki, S., and Wasowicz, E.: Volatile flavor compounds by molds of *Aspergillus*, *Penicillium*, and Fungi imperfecti, *Appl. Microbiol.*, 27, 1001-1004 (1974)

20. Takahashi, M., Isogai, A., Utsunomiya, H., Nakano, S., Koizumi, T., and Totsuka, A.: GC-Olfactometry analysis of the aroma components in sake koji, *J. Brew. Soc. Japan*, 101, 957-963 (2006).
21. Herrero-Garcia, E., Garzia, A., Cordobes, S., Espeso, E. A., and Ugalde, U.: 8-Carbon oxylipins inhibit germination and growth, and stimulate aerial conidiation in *Aspergillus nidulans*, *Fungal Biol.*, 115, 393-400 (2011)
22. Heddergott, C., Calvo, A. M., and Latgé, J. P.: The volatome of *Aspergillus fumigatus*, *Eukaryot. Cell*, 13, 1014-1025 (2014)
23. Miyamoto, K., Murakami, T., Kakumyan, P., Keller, N. P., and Matsui, K.: Formation of 1-octen-3-ol from *Aspergillus flavus* conidia is accelerated after disruption of cells independently of Ppo oxygenases, and is not a main cause of inhibition of germination, *Peer J.*, 2, 395 (2014)
24. Günes, er, O. and Yüceer, Y. K.: Biosynthesis of eight-carbon volatiles from tomato and pepper pomaces by fungi: *Trichoderma atroviride* and *Aspergillus sojae*, *J. Biosci. Bioeng.*, 123, 451-459 (2017)
25. Iamanaka, B. T., Teixeira, A. A., Teixeira, A. R. R., Vicente, E., Frisvad, J. C., Taniwaki, M. H., and Bragagnolo, N.: Potential of volatile compounds produced by fungi to influence sensory quality of coffee beverage, *Food Res. Int.*, 64, 166-170 (2014)

26. Nemcovic, M., Jakubikova, L., Viden, I., and Farkas, V.: Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp. *FEMS Microbiol. Lett.*, 284, 231-236 (2008)
27. Chitarra, G. S., Abee, T., Rombouts, F. M., Posthumus, M. A., and Dijksterhuis, J.: Germination of *Penicillium paneumconidia* is regulated by 1-octen-3-ol, a volatile self-inhibitor, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 2823-2829 (2004)
28. Brodhun, F., Schneider, S., Gobel, C., Hornung, E., and Feussner, I.: PpoC from *Aspergillus nidulans* is a fusion protein with only one active haem, *Biochem. J.*, 425, 553-565 (2010)
29. Tsitsigiannis, D. I. and Keller, N. P.: Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals, *Trends Microbiol.*, 15, 109-118 (2007)
30. Tsitsigiannis, D. I., Kowieski, T. M., Zarnowski, R., and Keller, N. P.: Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in *Aspergillus nidulans*, *Microbiology*, 151, 1809-1821 (2005)
31. Lee, NY., Choi, DH., Kim, MG., Jeong, MJ., Kwon, HJ., Kim, DH., Kim, YG., Eric di Luccio., Arioka, M., Yoon, HJ. and Kim, JG.: Biosynthesis of (R)-(-)-1-octen-3-ol in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* with lipoxygenase-1 and hydroperoxide lyase genes from *Tricholoma matsutake.*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 296–305 (2020)

32. Joh, T., Kudo, T., Tasaki, Y., Fujii, N. and Hara, T.: Mushroom flavor and the enzymes involved in the biosynthesis., J. Japan Association on Odor Environment, 44, 315-322 (2013)
33. Noordermeer MA, Van Dijken AJ, Smeekens SC, Veldink GA, Vliegthart JF: Characterization of three cloned and expressed 13-hydroperoxide lyase isoenzymes from alfalfa with unusual N-terminal sequences and different enzyme kinetics, Eur. J. Biochem., 267, 9, 2473-2482 (2000)
34. Tsitsigiannis, D. I., Kowieski, T. M., Zarnowski, R., and Keller, N. P.: Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*, Eukaryot. Cell, 3, 1398-1411 (2004)
35. Yamada, O., Machida, M., Hosoyama, A., Goto, M., Takahashi, T., Futagami, T., Yamagata, Y., Takeuchi, M., Kobayashi, T., Koike, H., and other 17 authors: Genome sequence of *Aspergillus luchuensis* NBRC 4314, DNA Res., 23, 507-515 (2016)
36. Michielse, C. B., Hooykass, P. J., van den Hondel, C. A., and Ram, A. F.: *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*, Nat. Protoc., 3, 1671-1678 (2008)
37. Setoguchi, S., Mizutani, O., Yamada, O., Futagami, T., Iwai, K., Takase, Y., and Tamaki, H.: Effect of *pepA* deletion and overexpression in *Aspergillus luchuensis* on sweet potato shochu brewing, J. Biosci. Bioeng., 128, 456-462 (2019)

38. Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Domínguez, Y., and Scazzocchio, C.: Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi, *Fungal Genet. Biol.*, 41, 973-981 (2004)
39. Takahashi, T., Mizutani, O., Shiraishi, Y., and Yamada, O.: Development of an efficient gene-targeting system in *Aspergillus luchuensis* by deletion of the nonhomologous end joining system, *J. Biosci. Bioeng.*, 112, 529-534 (2011)
40. H. -L. Weidenmüller, F. Cavagna, H. -W. Fehlhaber, P. Präve: 2-Carboxymethyl-3-n-hexyl-maleic acid anhydride, a novel metabolite from an *Aspergillus*, *Tetrahedron Lett.*, 13, 33, 3519-3522 (1972)
41. Mondal G, Dureja P, Sen B: Fungal metabolites from *Aspergillus niger* AN27 related to plant growth promotion, *Indian J. Exp. Biol.*, 38, 1, 84-87 (2000)
42. Koch L, Lodin A, Herold I, Ilan M, Carmeli S, Yarden O: Sensitivity of *Neurospora crassa* to a marine-derived *Aspergillus tubingensis* anhydride exhibiting antifungal activity that is mediated by the MAS1 protein, *Mar. Drugs*, 12, 9, 4713-4731 (2014)
43. Brodhun, F. and Feussner, I.: Oxylipins in fungi, *FEBS J.*, 278, 1047e1063 (2011)

44. Maeda, M., Motosoko, M., Tokashiki, T., Tokashiki, J., Mizutani, O., Uechi, K., Goto, M., Taira, T.: Phenolic acid decarboxylase of *Aspergillus luchuensis* plays a crucial role in 4-vinylguaiacol production during awamori brewing, *J. Biosci. Bioeng.*, 130, 352-359 (2020)
45. Fukuda, H., Han, J. and Yamada, O.: Characteristics of the volatile composition of commercially available Awamori, *J. Brew. Soc. Japan.*, 111, 261–270 (2016)
46. Noba, S.: beer to hakkou no kagaku, *Chemistry and education*, 67, 584-587 (2019)
47. Tsutsumi, H.: Mechanism of aroma production in Japanese sake, *J. Japan Association on Odor Environment*, 46, 346-349 (2015)
48. Koganemaru, K., Sumi, T., Kanda, K., Kato, F., Tasiro, K. and Kuhara, S.:  $\beta$ -phenylethyl alcohol production by a mutant of sake yeast and its highly productive mechanism, *J. Brew. Soc. Japan*, 98, 3, 201-209 (2003)
49. Shiraishi, Y., Haraguchi, A., Murata, R., Hisashi, R., Okutsu, K., Yoshizaki, Y., Futagami, T., Tamaki, H., Wagu, Y. and Takamine, K.: Diversification of Honkaku-shochu using different *Aspergillus luchuensis*, *J. Brew. Soc. Japan*, 113, 12, 757-765 (2018)
50. Yamada, O., Nishibori, N., Hayashi, R., Arima, T. and Mizutani, O.: Construction of transcription factor gene deletion library of *Aspergillus luchuensis*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 67, 118-123 (2021)

51. Lee, MK., Kwon, NJ., Choi, JM., Lee, IS., Jung, S. and Yu, JH.: NsdD is a key repressor of asexual development in *Aspergillus nidulans*, *Genetics.*, 197, 159-173 (2014)
52. Chang, YC. and Timberlake, WE.: Identification of *Aspergillus brlA* response elements (BREs) by genetic selection in yeast, *Genetics.*, 133, 29-38 (1993)
53. Usami K.: Awamori sake jozo kenkyu houkokusyo, *Kogyo Kagaku Zasshi*, 4, 1437-1461 (1901)

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり終始多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました日本大学生物資源科学部 生命化学科 発酵化学研究室の荻原淳教授と渡邊泰祐准教授に深甚なる感謝の意を表します。学部4年生時から6年間、研究に対する考え方や知識についてのご指導のみならず、様々な実りある経験をさせて頂きました。

本学位論文の作成にあたり適切なお助言を頂き、学位審査に尽力下さいました日本大学生物資源科学部 食品生命科学科の長田和実教授と鈴木チセ教授に謹んで御礼申し上げます。

また、本研究の一部は独立行政法人 酒類総合研究所にて実施させていただきました。その際に御助言、御支援いただきました品質・評価研究部門の山田修部門長、醸造技術研究部門の磯谷敦子副部門長、醸造微生物研究部門の織田健主任研究員、金井宗良主任研究員、林梨咲様、柿菌ダララット様に深く感謝申し上げます。

黒麹菌の形質転換において、菌株やDNAカセットを御供与下さりました山田修部門長、琉球大学 農学部 亜熱帯生物資源科学科 水谷治准教授、細胞壁溶解酵素をご供与下さった山形大学大学院 理工学研究科 矢野成和准教授に対して感謝の意を表します。

日本大学で実施した香気成分の分析においては、日本大学生物資源科学部 生命化学科の細野崇准教授にご指導頂きました。厚く御礼申し上げます。

さらに、日々の研究生活において多くのご指導やお助言を頂きました新居鉄平氏、岩田悠志氏、小嶋涼氏を始めとする発酵化学研究室の皆様へ感謝申し上げます。

最後に、これまでの学生生活を全ての面で支えてくれた両親、家族に心から感謝致します。

片岡 涼輔