

麴菌由来の麦味噌特徴香の解析ならびに
麴菌の育種に関する研究

小 城 章 裕

2019

目次

第1章 麦味噌の発酵における熟成期間が揮発性化合物に及ぼす影響

第1節 緒論.....	3
第2節 実験方法.....	5
1-2-1 材料.....	5
1-2-2 味噌サンプルの官能評価.....	7
1-2-3 GC-MS 分析.....	7
1-2-4 統計分析.....	8
第3節 結果と考察.....	9
1-3-1 熟成期間の異なる麦味噌の官能評価.....	9
1-3-2 熟成期間の異なる麦味噌の揮発性化合物の比較.....	11
1-3-3 市販の淡色麦味噌と赤色麦味噌の揮発性化合物の比較.....	13
参考文献.....	17
第2章 イオンビームを用いた突然変異誘発による麹菌の育種.....	20
第1節 緒論.....	20
第2節 実験方法.....	21

2-2-1	菌株および培養条件.....	21
2-2-2	イオンビーム照射の条件.....	22
2-2-3	イオンビームが突然変異の頻度に及ぼす影響の評価.....	22
2-2-4	高デンプン分解活性を有する突然変異株のスクリーニング.....	23
2-2-5	寒天培地におけるデンプン分解活性の評価.....	23
2-2-6	デンプン分解活性およびタンパク質同定のための Natvie-PAGE....	24
2-2-7	米麴のデンプン活性.....	25
2-2-8	GlcNAc 測定による米麴における生育の評価.....	25
2-2-9	RNA の抽出.....	25
2-2-10	RNA-seq 解析.....	26
2-2-11	リアルタイム RT-PCR 解析.....	26
第 3 節	結果と考察.....	29
2-3-1	イオンビームによる突然変異誘発の評価.....	29
2-3-2	寒天培地におけるデンプン分解酵素活性の比較.....	30
2-3-3	黒麴菌 RIB2601 株および U1 株の GlcNAc 含量および生育評価....	34
2-3-4	米麴におけるデンプン分解活性.....	34
2-3-5	温度および細胞壁阻害剤が U1 株の増殖に及ぼす影響.....	37
2-3-6	分泌タンパク質をコードする遺伝子の転写解析.....	39
2-3-7	RNA-seq によるトランスクリプトームデータの解釈.....	41
	参考文献.....	44
	謝辞.....	47

第1章 麦味噌の発酵における熟成期間が揮発性化合物に及ぼす影響

第1節 緒論

味噌は、大豆を発酵させた日本の伝統的な調味料であり、麴の原料に基づいて米味噌、麦味噌、豆味噌、調合味噌の4種類に分けられる。味噌の麴造りには、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* が使用され、味噌中の多糖類や蛋白質の分解に重要な役割を担っている (Machida et al. 2008)。全国味噌工業協同組合連合会の2017年の調査によると、各種の味噌の市場シェアは、米味噌 (81.2%)、麦味噌 (4.3%)、豆味噌 (4.8%)、調合味噌 (9.7%) となっている (<http://zenmi.jp/>, July 25, 2018)。

味噌の種類は4種類に大別されるが、麴 (米・麦) と大豆の配合比や熟成期間の違いで多様な風味の味噌が各地で生産されている。北の地域は比較的に塩分濃度が高く麴歩合は低い傾向にあり、一方、南の地域は塩分濃度が低く、麴歩合が高い傾向にある。もっとも多く生産される米味噌は、一般的に麴歩合 (麴原料の重量/大豆重量 × 10) が10であり、熟成期間は淡色米味噌で3~4ヶ月、赤色米味噌で約1年である。豆味噌は中部地方で生産され、熟成は1年~3年以上である。麦味噌は主に九州地方で生産され、麴歩合は20~30と高く熟成期間は1~2ヶ月と短い傾向にある。特に鹿児島県の味噌は麴歩合が30以上と高く、熟成期間はもっとも早く2週間ほどで出荷するものまである。これは鹿児島県の消費者が熟成の短い甘い味噌を好む傾向があるためであり、香りについても麴臭を好む傾向が知られている。本研究では、このような鹿児島県の麦味噌の熟成期間が香りにどのように寄与するのかについて明らかにすることを目的とした。

先行研究において、米味噌の成分は、Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) により分析され、200種類以上が同定されている (Honma 1987)。また、味噌の香りに関与する成分としてアルキルピラジン類が (Mori et al. 1983)、さらに、米味噌と麦味噌において 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone

(HEMF) が重要な香気成分として同定された (Sugawara 1991; Hayashida et al. 1998)。HEMF は、耐塩性酵母である *Zygosaccharomyces rouxii* により生産され、カラメル様、ショートケーキ様と表現される甘い香りを有している化合物であり (Kobayashi and Sugawara 1999)、もともとは醤油の重要香気成分として同定された (Nunomura et al. 1976)。その他に醤油の独特の香りとして、methionol と 4-ethylguaiacol も知られており、これらの 3 成分に着目して、異なるタイプの味噌 (米味噌 [赤色系・辛味噌、淡色系・辛甘味噌]、豆味噌、麦味噌) の香気成分の違いが GC-MS により比較されている (Sasaki and Mori 1991; Sugawara and Yonekura 1998)。その結果、HEMF と methionol は、米味噌、豆味噌、麦味噌において検出されたが 4-ethylguaiacol は麦味噌と豆味噌にのみ検出された。これらの成分の組み合わせと濃度によって、異なるタイプの味噌の香りが形成されていると考えられた。なお、methionol は、HEMF と同様に *Z. rouxii* により生産される他、加温によって促進されるメチオニンのアミノカルボニル反応によっても生産される (Sasaki and Mori 1991; Aoki and Uchida 1991; Sugawara and Hosaka, 2009)。また、4-ethylguaiacol は、*Candida* spp. により生産されると考えられている (Suezawa and Suzuki 2007; Sasaki and Mori 1991)。

麦味噌には、米味噌と同様に、熟成期間の短い淡色系と、熟成期間の長い赤色系の 2 タイプが存在する (Domoto, 1982)。本研究では、赤色系の麦味噌と比較して、淡色系の麦味噌の特徴である麴様の香りに焦点を当てた。麴の香りに関する先行研究では、*A. oryzae* が生産する 1-octen-3-ol が知られている (Kamiński et al., 1972; Ito et al., 1990)。1-octen-3-ol は、きのこ様の香りで表現される香気化合物である。次に、米麴の香りに寄与する香気化合物が解析され、2-methyl-2-hepten-6-one、methional、1-octen-3-one、1-octen-3-ol、phenylacetaldehyde の 5 種類の化合物が同定されている (Takahashi et al., 2006)。これらのうち、methional、1-octen-3-one、phenylacetaldehyde の 3 つが特に麦味噌に寄与している化合物とされた。なお、methional はバラ様の香りで表現される香気化合物である。

第2節 実験方法

1-2-1 材料

本研究で用いた味噌の試料を Table 1-1 に示した。味噌工場（ほたる醸造、鹿児島市川田町）で熟成時間の異なる5種類の麦味噌を製造した。約240 kgの蒸した麦に黄麹菌 *Aspergillus oryzae*（河内源一郎商店、鹿児島市清水町）の種麹240 gを植え付け、40時間かけて製麹を行った。種混ぜ終了温度を32℃にし、約10時間かけて38℃まで徐々に上昇させた。36～38℃で18時間保持した後、33～35℃に温度を落とし12時間保持した。出来上がった麦麹に約72 kgの蒸し大豆と50 kgの塩化ナトリウムを混合し、28℃で熟成させた。熟成期間は、20、30、60、90、365日間として麦味噌を調製し、それぞれH20、H30、H60、H90、およびH365とした。H20、H30、H60は淡色系の麦味噌、H90、H365は赤色系の麦味噌とした。H20とH365は実際に市販されている味噌として、市販品の味噌の解析としても使用した。

市販の淡色系麦味噌サンプル4種（A、B、C、D）と市販の赤色系の麦味噌サンプル4種（E、F、G、I）を無作為に選んだ。乳酸菌と酵母の添加の有無について各製造業者への聞き取り調査を行い、いずれの商品においても乳酸菌と酵母が無添加であることを確認した。すべての淡色系麦味噌は、鹿児島県の異なる工場生産されたものである。味噌サンプルは、分析に使用するまで-20℃で保存した。

Table 1-1. Barley miso samples used in this study.

Sample name ^a	Maturation time	Category ^b	Addition of lactic acid bacteria	Addition of yeast
A	2 months ^c	G	no ^c	no ^c
B	2 months ^c	G	no ^c	no ^c
C	1 to 2 months ^c	G	no ^c	no ^c
D	1 to 2 months ^c	G	no ^c	no ^c
E	more than 1 year ^c	H	no ^c	no ^c
F	3 to 5 months ^c	H	no ^c	no ^c
G	more than 3 years ^c	H	no ^c	no ^c
I	1 year ^c	H	no ^c	no ^c
H20	20 days	G	no	no
H30	30 days	G	no	no
H60	60 days	G	no	no
H90	90 days	H	no	no
H365	365 days	H	no	no

^a An alphabet denotes miso of different companies.

^b Category as defined by the Central Miso Research Institute (G, light-colored barley miso; H, red barley miso).

^c Information was obtained by interviews with manufacturer.

1-2-2 味噌サンプルの官能評価

味噌サンプルの官能評価は、味噌汁を飲用する状態に近い温度を再現するために 100 mL 容三角フラスコに味噌 10 g と沸騰したお湯を 20 mL 入れて懸濁したものをを用いて行った。なお、三角フラスコはアルミ箔で覆ったものを使用し、ブラインドテストにて行った。評価は 0、1、2、3、4、5 点の尺度で行い、5 点を最も麴の香りが強い点数とし、香りがしないものを 0 とした。評価員は、鹿児島大学に所属する 13 名（男性 6 名、女性 7 名）によった。

1-2-3 GC-MS 分析

味噌サンプルの揮発性化合物の分析をヘッドスペース GC-MS により、先に記載された手法 (Shiraishi et al. 2016; Rahayu et al. 2017) を改変して行った。まず、10 g の味噌と 10 mL の水を 500 mL 容の専用ガラス容器に入れ懸濁し、内部標準物質として 10 mL/L の 1-ペンタノールを 1 mL 加えて密閉した。味噌汁中の香りを比較するために、サンプルを入れた容器を 70°C の水浴中で 30 分間保温し、生じたヘッドスペースガス 200 mL を吸引し、自動濃縮装置 (ENTECH 7100A; Entech Instruments Inc., CA, USA) により濃縮した。揮発性成分の分離および同定は、DB-WAX カラム (60 m × 0.25 mm, i.e., 0.25- μ m film; Agilent Technologies, CA, USA) を備えた GC-MS (GC, Agilent 6890; MS, Agilent 5979B; Agilent Technologies, CA, USA) により行った。同操作を 3 回繰り返す、得られたデータより平均値を算出した。揮発性成分は、NIST 05a マススペクトルライブラリを備えた Agilent ChemStation ソフトウェア、および Aroma Offices ソフトウェア (Nishikawa Meter Co. Ltd., Tokyo, Japan) のデータベースから検索された Retention Index により同定した。Retention Index の算出には、*n*-パラフィン混合物 C₅, C₆, C₇, C₈ (Supelco, PA, USA) および *n*-パラフィン混合物 C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆ (Supelco) を含む標準溶液

を使用した。

1-2-4 統計分析

GC-MS によって検出された揮発性化合物の解析は、R バージョン 3.4.1 と FactoMineR パッケージ (Lê et al. 2008) を用いたウィルコクソンの順位和検定、および主成分分析により行った。

第3節 結果と考察

1-3-1 熟成期間の異なる麦味噌の官能評価

熟成期間の短い淡色系の麦味噌は、熟成期間の長い赤色系の麦味噌と比較して、麴様の香りが強いと言われている。そこで、熟成期間が及ぼす麴様の香りの強さへの影響を確認するために、麦味噌サンプル（H20、H30、H60、H90 および H365）の官能評価を行った（Fig 1-1）。味噌の熟成期間と色調に基づいて、H20、H30、H60 は淡色系の麦味噌、H90、H365 は赤色系の麦味噌に分類した。

H20 と比較して H30 では麴様の香りがわずかに上昇した。しかし、H20、H30 および H60 では麴様の香りの強さはほぼ同程度であった。麴様の香りの強さは H90 で有意に減少し、H365 でさらに減少した。この結果から、熟成期間 60 日までは若い味噌の麴の香気が維持されていることが示唆された。また、この結果は、麴様の香りが好まれる鹿児島県において、淡色系の麦味噌が一般的に 2 ヶ月未満の熟成時間で出荷されることと一致していた。

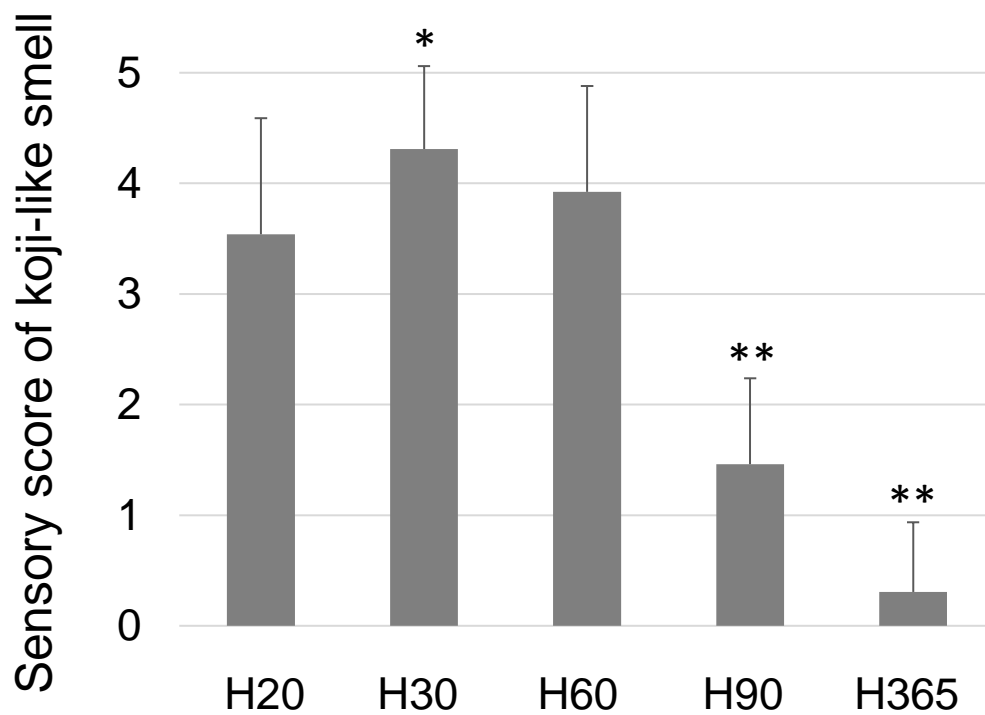


Figure 1-1. Effect of maturation time of barley miso on the koji-like smell. Sensory evaluation of barley miso with different maturation periods (20, 30, 60, 90, and 365 days) was scored on a scale of 0–5 points, where 5 was the score given to a strong koji-like smell. The analysis was performed to the shortest time-matured miso at 20 days (n = 13; **p*-value < 0.05 vs H20; ** *p*-value < 0.01 vs H20; *t*-test).

1-3-2 熟成期間の異なる麦味噌の揮発性化合物の比較

麦味噌の揮発性成分に及ぼす熟成期間の影響を麴の香りに着目して解析するために、ヘッドスペース GC-MS 分析を行った。試料として、官能評価により麴の香りの強さを評価した熟成期間の異なる麦味噌試料 H20、H30、H60、H90、H365 を使用した (Fig 1-1)。

GC-MS 分析によりすべての味噌に共通する成分として、計 24 種の化合物を同定した (Table 1-2)。まず、1-propanol および 1-butanol を除くほとんどの化合物が成熟期間中に増加する傾向を示した。次に、先行研究において麴の香りの構成成分として同定されていた 1-octen-3-ol と phenylacetaldehyde (Ito *et al.*, 1990; Shiraishi *et al.* 2016; Takahashi *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2007) が含まれており、これらの 2 成分に着目した。1-octen-3-ol の濃度は、20 日 (H20) から 90 日 (H90) にかけて変化せず、90 日 (H90) から 365 日 (H365) にかけて増加した。一方、phenylacetaldehyde の濃度は 20 日 (H20) から 365 日 (H365) に徐々に増加した (Table 1-2)。官能評価試験においては、麴様の香りの強さは 60 日 (H60) から 90 日 (H90) にかけて大きく減少したことが示唆された (Fig. 1-1)。したがって、この麴様の香りの減少は、1-octen-3-ol の減少が原因ではない可能性が示唆された。

Table 1-2. Volatile compounds detected by GC-MS analysis in barley miso samples.

Compounds	Retention index ^a	Peak area of analyte / Peak area of internal standard												
		Test products					Commercial samples (light-colored barley miso)					Commercial samples (red barley miso)		
		H20 (20 days)	30 days (30 days)	H60 (60 days)	H90 (90 days)	H365 (365 days)	A (2 months)	B (2 months)	C (1 to 2 months)	D (1 to 2 months)	E (more than 1 year)	F (3 to 5 months)	G (more than 3 years)	I (1 year)
acetaldehyde	739	0.04490	0.02723	0.03919	0.04305	0.33322	0.08971	0.12821	0.29175	0.39436	0.30232	0.33614	0.19648	0.35574
isobutyraldehyde	795	0.01883	0.02160	0.08233	0.20125	0.23095	0.02779	0.02344	0.00539	0.10312	0.07465	0.06399	0.43388	0.29505
ethyl acetate	872	1.62954	1.40704	1.61404	1.63528	8.33188	9.02154	2.81788	21.38140	19.80140	8.67186	9.54263	19.74710	18.20800
2-methylbutyraldehyde	900	0.13628	0.16971	0.74915	1.59792	1.57822	0.15361	0.11202	0.04103	0.65435	0.59149	0.60693	4.89599	3.63947
isovaleraldehyde	904	0.39838	0.29517	0.61579	0.85532	4.81779	0.24239	0.21755	0.07489	0.74137	1.82107	1.64696	5.36092	4.03689
ethyl propionate	944	0.02332	0.01829	0.02141	0.02087	0.51729	0.42621	0.08367	1.92014	0.93435	0.24476	1.14953	2.17117	1.36527
ethyl isobutyrate	952	0.06212	0.05772	0.08341	0.08093	1.61981	0.19092	0.60833	0.52769	3.58015	0.36970	3.52566	4.16055	3.39022
1-propanol	1031	0.09393	0.06228	0.00765	0.05603	0.10812	0.32022	0.14196	0.66933	0.35774	0.04320	0.27259	0.11992	0.17629
ethyl 2-methylbutyrate	1043	0.03171	0.03014	0.05238	0.05124	0.90106	0.28961	0.20944	0.14985	1.03385	0.13480	1.35149	1.91673	1.13306
hexanal	1071	0.03424	0.02589	0.04739	0.04135	0.14945	0.00462	0.04983	0.05026	0.06015	0.09539	0.07717	0.10357	0.12881
2-methyl-1-propanol	1091	0.00200	0.20855	0.17885	0.20684	2.19546	4.80718	1.63794	6.33698	3.72374	1.07925	6.53551	1.78327	3.98765
isoamyl acetate	1116	0.02183	0.00838	0.01100	0.00998	1.35562	0.33031	0.06195	1.35652	1.84207	0.77550	1.26429	1.15901	2.03610
1-butanol	1139	0.40480	0.00852	0.00857	0.00901	0.10289	1.35896	0.42531	1.37297	1.78944	0.17501	3.96440	0.62421	2.50374
isoamyl alcohol	1207	0.00052	0.58943	0.52593	0.50137	12.01510	0.00169	3.21534	31.45190	0.01632	9.05055	16.62072	7.54624	16.91227
ethyl hexanoate	1225	0.01199	0.00884	0.01566	0.01283	0.16877	0.23228	0.12200	0.38972	0.65542	0.16138	0.18267	0.21717	0.33404
ethyl <i>n</i> -octanoate	1424	0.01817	0.00680	0.00811	0.00636	0.06008	0.03438	0.05628	0.21317	0.19645	0.05529	0.12107	0.09880	0.33515
1-octen-3-ol	1442	0.19243	0.14992	0.21646	0.19045	0.48590	0.42464	1.20333	0.17996	0.70442	0.20288	0.22906	0.21262	0.34313
furfural	1451	0.03121	0.03327	0.07802	0.10129	0.19011	0.04221	0.05564	0.06184	0.06487	0.19983	0.36455	0.12963	0.14741
2-ethyl-1-hexanol	1481	0.01621	0.01695	0.01881	0.02003	0.03359	0.02896	0.01312	0.01939	0.01989	0.02429	0.02671	0.03262	0.03822
benzaldehyde	1513	0.21680	0.18705	0.41226	0.39901	0.26248	0.19395	0.11313	0.06692	0.10323	0.39907	0.20789	0.27629	0.22969
ethyl decanoate	1631	0.00822	0.00508	0.00458	0.00414	0.01286	0.00643	0.04696	0.04162	0.02889	0.00716	0.01435	0.01149	0.03618
phenylacetaldehyde	1634	0.11235	0.10779	0.17889	0.19591	0.61896	0.08088	0.16368	0.18918	0.20683	0.77720	0.45836	0.50286	0.33274
ethyl benzoate	1662	0.03719	0.03465	0.04941	0.04222	0.31739	0.07685	0.21977	0.33155	0.13793	0.10698	0.72735	1.28703	0.80949
ethyl phenylacetate	1779	0.03446	0.03761	0.05079	0.04519	0.17061	0.00006	0.09412	0.10778	0.18226	0.09923	0.54994	0.59364	0.19013

^aRetention index was analyzed by comparison with the retention indexes in the AromaOffice database (Nishikawa Meter Co., Ltd., Tokyo, Japan).

1-3-3 市販の淡色系麦味噌と赤色系麦味噌の揮発性化合物の比較

淡色系の麦味噌と赤色系の麦味噌の揮発性化合物の違いを明確にするために、市販されている淡色系麦味噌（A、B、C、D および H20）と赤色系麦味噌（E、F、G、I および H365）の揮発性成分を GC-MS により分析した結果、24 の共通する化合物が検出された（Table 1-2）。これらの成分を主成分分析およびウィルコクソンの順位和検定により解析した。

主成分負荷量のプロットの結果、第 1 主成分（Dim 1）と第 2 主成分（Dim 2）でデータセットの変動の 64.98% を占めており、多くの変数の情報がまとめられていることが示唆された（Fig. 1-3A, Table 1-3）。淡色系麦味噌（A、B、C、D および H20）および赤色系麦味噌（E、F、G、I および H365）はそれぞれのクラスターを形成した。特に、第 1 主成分（Dim 1）に従って、右側に 4 つの赤色系麦味噌（F、G、I および H365）が含まれ、左側に 4 つの淡色系麦味噌（A、B、C および H20）がプロットされた（Fig. 1-3A）。第 1 主成分（Dim 1）は、ethyl acetate、isovaleraldehyde、2-methylbutyraldehyde、ethyl isobutyrate、ethyl propionate、ethyl 2-methylbutyrate、ethyl benzoate、isoamyl acetate、ethyl phenylacetate、isobutyraldehyde、acetaldehyde、hexanal、ethyl *n*-octanoate および 2-ethyl-1-hexanol と正の相関関係を示した（Fig. 1-3B、Table 1-3）。この結果は、熟成期間中にこれらの揮発性化合物の濃度が増加したという結果と一致した（Table 1-2）。

次に、淡色系麦味噌（A、B、C、D および H20）と赤色系麦味噌（E、F、G、I および H365）のそれぞれの各揮発性成分について、ウィルコクソンの順位和検定による統計解析を行った（Table 1-3）。その結果、furfural、hexanal、isovaleraldehyde、phenylacetaldehyde、benzaldehyde、2-ethyl-1-hexanol、2-methylbutyraldehyde および isobutyraldehyde は、淡色系麦味噌よりも赤色系麦味噌において高濃度であることが示唆された（Table 1-3; p 値 < 0.05 ）。

麴香の構成成分として注目した phenylacetaldehyde（Takahashi et al. 2006）の濃

度は、赤色麦味噌において淡色麦味噌よりも 0.28 倍低い濃度であった (Table 1-3; p 値 < 0.05)。また、1-octen-3-ol の濃度は、赤色麦味噌よりも淡色麦味噌で 1.84 倍高かったが、統計解析により有意差は支持されなかった (Table 1-3)。

以上の結果をまとめると、まず、熟成期間が麦味噌の麴香の減少に重要な役割を果たしていることが示された。しかし、麴香の構成成分として知られている 1-octen-3-ol と phenylacetaldehyde の濃度は、赤色系麦味噌と比較して、淡色系麦味噌に高濃度で含まれているわけではないことが示唆された。本結果の要因として、まず、淡色麦味噌の麴様の香りに寄与する他の化合物があった可能性が挙げられる。例えば、ヘッドスペース GC-MS 分析により 1-octen-3-ol と phenylacetaldehyde を検出したが、その他の麴香の構成成分として報告されている 2-methyl-2-hepten-6-one、methional、および 1-octen-3-one (Takahashi et al. 2006) は未検出であった。したがって、本研究は、淡色系麦味噌に特徴的な麴様の香りについての知見を提供したが、麴香の同定はできなかった。比較した共通の 24 種類の揮発性化合物とそれ以外の揮発性化合物も含め、包括的な分析が必要であると考えられる。

次に、淡色系麦味噌において麴様の香りが強く感じられる要因として、1-octen-3-ol と phenylacetaldehyde は赤色系麦味噌と同等のレベルで存在するが、赤色系麦味噌ではアルデヒド類、エステル類の揮発性成分の濃度が高いために、麴様の香りがマスクされている可能性が挙げられる。例えば、ワインが酸素にさらされた場合、furfural と hexanal の増加によりワインの香りがマスクされ、それぞれ調理された野菜と辛味の香味の出現と相関することが知られている (Jackson, 2011)。また、benzaldehyde は、トリメチルアミン (魚臭) の臭気のマスキング効果があることが報告されている (Shiraishi et al. 1982)。これら furfural、hexanal、benzaldehyde は淡色系麦味噌よりも赤色系麦味噌において高濃度で存在することが示唆された。このようなその他の揮発性成分による麴様の香りのマスク効果について検証することが今後の課題として考えられる。

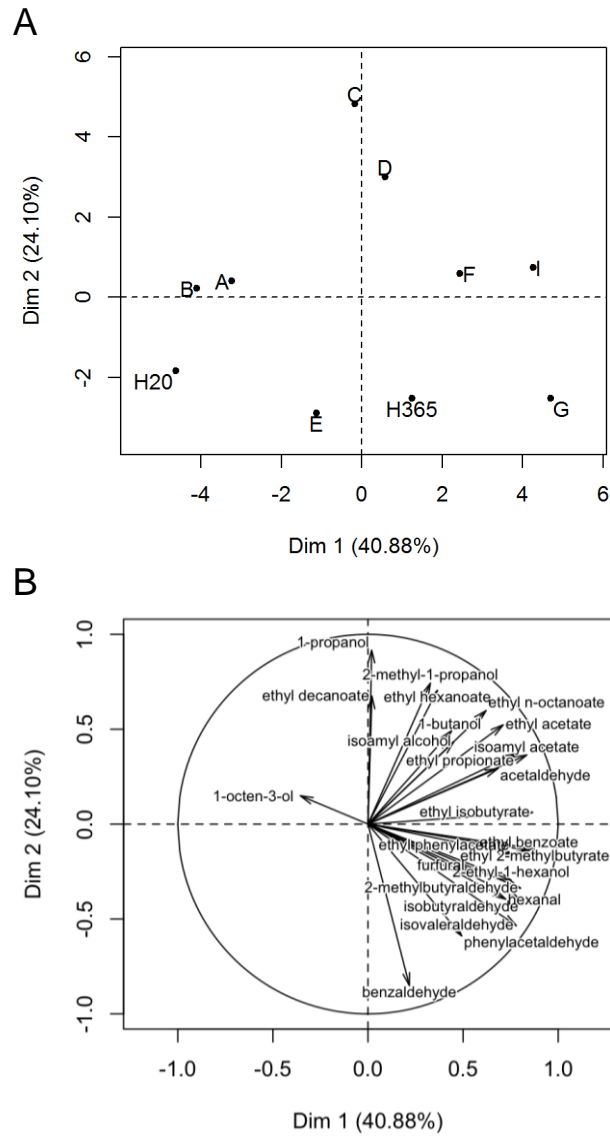


Figure 1-2. PCA plot based on volatile compounds of commercial light-colored barley miso (A, B, C, D, and H20) and red barley miso (E, F, G, I, and H365). The analysis was performed on the dataset in Table 1. The individuals factor map (A) and variables factor map (B) for the two first principal components.

Table 1-3. Evaluation of volatile compounds between light-colored barley miso and red barley miso by Wilcox rank sum test.

No.	Compounds	Ratio of average (light/red)	<i>p</i> -value
1	Furfural	0.25	0.008
2	Hexanal	0.36	0.008
3	Isovaleraldehyde	0.09	0.008
4	Phenylacetaldehyde	0.28	0.008
5	Benzaldehyde	0.50	0.016
6	2-Ethyl-1-hexanol	0.63	0.032
7	2-Methylbutyraldehyde	0.10	0.032
8	Isobutyraldehyde	0.16	0.032
9	Ethyl phenylacetate	0.26	0.056
10	Ethyl benzoate	0.25	0.095
11	Ethyl 2-methylbutyrate	0.32	0.151
12	Isoamyl alcohol	0.56	0.151
13	1-Propanol	2.20	0.222
14	Acetaldehyde	0.62	0.222
15	Ethyl isobutyrate	0.38	0.222
16	Ethyl propionate	0.62	0.310
17	Isoamyl acetate	0.55	0.421
18	Ethyl <i>n</i> -octanoate	0.77	0.548
19	Ethyl decanoate	1.61	0.690
20	1-Octen-3-ol	1.84	0.841
21	Ethyl hexanoate	1.33	0.841
22	1-Butanol	0.73	1.000
23	2-Methyl-1-propanol	1.06	1.000
24	Ethyl acetate	0.85	1.000

参考文献

- Japan Federation of Miso Manufacturers Cooperatives (<http://zenmi.jp/>, July25,2018)
- Aoki, T., Uchida, K. (1991). Enhanced formation of 3-(methylthio)-1-propanol in a salt-tolerant yeast, *Zygosaccharomyces rouxii*, due to deficiency of *S*-adenosylmethionine synthase. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2113–2116.
- Domoto, Y. (1982). Regional characteristics of barley miso. *Nippon Jyozokyoikai shi*, 77, 432–438 (in Japanese).
- Hayashida, Y., Nishimura, K., Slaughter, J. C. (1998). The importance of the furanones HDMF and HEMF in the flavour profile of Japanese barley miso and their production during fermentation. *J. Sci. Food Agric.*, 78, 88–94.
- Honma, N. (1987). Aroma and Aroma components of miso (2). *Nippon Jyozokyoikai shi*, 82, 548–553 (in Japanese).
- Ito, K., Yoshida, K., Ishikawa, T., Kobayashi, S. (1990). Volatile compounds produced by the fungus *Aspergillus oryzae* in rice *Koji* and their changes during cultivation. *J. Ferment. Bioeng.*, 70, 169–172.
- Jackson, R. S. (2011) Shelf life of wine. In “Food and beverage stability and shelf life.” Ed. By D. Kilcast, P. Subramaniam. Woodhead Publishing, pp. 540–570.
- Kamiński, E., Libbey, L. M., Stawicki, S., Wasowicz, E. (1972). Identification of the predominant volatile compounds produced by *Aspergillus flavus*. *Appl. Microbiol.*, 24, 721–726.
- Kobayashi, A., Sugawara, E. (1999). Flavor components of shoyu and miso Japanese fermented soybean seasonings. In “Flavor chemistry of ethnic foods.” Ed. By F. Shahidi, C. T. Ho. Springer US, pp. 5–14.
- Lê, S., Josse, J., Husson, F. (2008). FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *J. Stat. Softw.*, 25, 1–18.

- Machida, M., Yamada, O., Gomi, K. (2008). Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. *DNA Res.*, 15, 173–183.
- Mori, Y., Kiuchi, K., Tabei, H. (1983). Flavor components of miso: basic fraction. *Agric. Biol. Chem.*, 47, 1487–1492.
- Nunomura, N., Sasaki, M., Asao, Y., Yokotsuka, T. (1976). Isolation and identification of 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone, as a flavor component in shoyu (soy sauce). *Agric. Biol. Chem.*, 40, 491–495.
- Rahayu, Y. Y., Yoshizaki, Y., Yamaguchi, K., Okutsu, K., Futagami, T., Tamaki, H., Sameshima, Y., Takamine, K. (2017). Key volatile compounds in red koji-shochu, a *Monascus*-fermented product, and their formation steps during fermentation. *Food Chem.*, 224, 398–406.
- Sasaki, M., Mori, S. (1991). The flavor of shoyu. *Nippon Jyozokyo kai shi*, 86, 913–922 (in Japanese).
- Shiraishi, K., Imada, K., Sugisawa, H. (1982) The masking effect of phenolic compounds on trimethylamine odor (The masking effect of fermented seasonings on off-odor in foods part II). *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 29, 426–427 (in Japanese).
- Shiraishi, Y., Yoshizaki, Y., Ono, T., Yamato, H., Okutsu, K., Tamaki, H., Futagami, T., Sameshima, Y., Takamine, K. (2016). Characteristic odour compounds in shochu derived from rice koji. *J. Inst. Brew.*, 122, 381–387.
- Suezawa, Y., Kimura, I., Inoue, M., Gohda, N., Suzuki, M. (2006). Identification and typing of miso and soy sauce fermentation yeasts, *Candida etchellsii* and *C. versatilis*, based on sequence analyses of the D1D2 domain of the 26S ribosomal RNA gene, and the region of internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 348–354.
- Suezawa, Y., Suzuki, M. (2007). Bioconversion of ferulic acid to 4-vinylguaiacol and 4-ethylguaiacol and of 4-vinylguaiacol to 4-ethylguaiacol by halotolerant yeasts

- belonging to the genus *Candida*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 1058–1062.
- Sugawara, E. (1991). Identification of 4-hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2 H)-furanone as a flavor component in miso. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 38, 491–493 (in Japanese).
- Sugawara, E., Hosaka, Y. (2009). Solid-phase microextraction analysis of the headspace volatiles from heated miso soup. *Nihon Kasei Gakkaishi*, 60, 545–552 (in Japanese).
- Sugawara, E., Yonekura, Y. (1998). Comparison of aroma components in five types of miso. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 45, 323–329 (in Japanese).
- Takahashi, M., Isogai, A., Utsunomiya, H., Nakano, S., Koizumi, T., Totsuka, A. (2006). GC- Olfactometry analysis of the aroma components in sake koji. *Nippon Jyozokiyokai shi*, 101, 957–963 (in Japanese).
- Takahashi, M., Isogai, A., Utsunomiya, H., Nakano, S., Koizumi, T., Totsuka, A. (2007). Change in the aroma of sake koji during koji-making. *Nippon Jyozokiyokai shi*, 102, 403–211 (in Japanese).

第2章 イオンビームを用いた突然変異誘発による麹菌の育種

第1節 緒論

麹菌は、日本の伝統的な発酵食品の製造に使用される重要な微生物である。その中でも黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* は、泡盛と焼酎の製造に使用されている (Yamada et al. 2011; Hong et al. 2014)。麹菌の主な役割は、発酵食品の原料に含まれるデンプンを単糖レベルに加水分解 (糖化) する糖質加水分解酵素を供給することである。また味噌に関しては、糖質加水分解酵素に加えて主原料である大豆におおく含まれるタンパク質を分解する酵素を供給することである。鹿児島県の味噌は第1章で述べたように熟成期間の短い甘口の味噌であり、糖質加水分解酵素による酵素分解型の味噌であることから、糖化酵素の強い麹菌の育種に注目した。しかし、先行研究において黄麹菌については詳細な検討がなされている。そこで、本研究では、イオンビームを変異源として黒麹菌の糖化酵素の生産性を高めることを検討した。

先行研究においては、清酒、味噌、醤油の製造に用いられる黄麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 に対するイオンビームの変異誘発効果が、 γ 線と比較して詳細に調べられた (Toyoshima et al. 2012)。ATP スルフリラーゼをコードする *sC* 遺伝子の変異体はセレン酸耐性株として選択することができることから (Arst 1968; Buxton et al. 1989)、イオンビームあるいは γ 線による突然変異の誘発後に RIB40 株の *sC* 変異株をスクリーニングし、その効果が比較されている (Toyoshima et al. 2012)。その結果、イオンビームが塩基置換、転移、染色体再編成、大規模欠失などの様々な突然変異を引き起こすことができる利点があることが示唆された。また、イオンビームによる突然変異誘発は、 γ 線突然変異誘発よりも *A. luchuensis* IFO 4033 (RIB2601) からの高デンプン分解活性を有する突然変異株を得るのに有効であることが報告されている (Amsal et al. 1999)。この突然変異体

株は、親株よりもキャッサバ、サゴおよびスクンのデンプンの分解活性の増加を示した。

本研究では、黒麹菌の育種へのイオンビーム適用研究の過程で、高デンプン分解活性を有する *A. luchuensis* RIB2601 の突然変異株を取得し、イオンビームがその菌株にどのように影響を与えたかを遺伝子レベルで調べた。

第2節 実験方法

2-2-1 菌株および培養条件

A. luchuensis RIB2601 株 (RIB2601) およびそれを親株として取得した U1 変異株を用いた。イオンビーム照射のために、RIB2601 株を TYMG 寒天培地 (トリプトン 1 g, 酵母エキス 5 g, 麦芽エキス 10 g, NaNO₃ 1 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ 0.5 g, グルコース 10 g, 寒天 15 g, all per 1 L, pH 7.0) において培養した。イオンビーム照射の効果を調べるために、M 培地 (NaNO₃ 6 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.52 g, KH₂PO₄ 1.52 g, KCl 1.52 g, グルコース 10 g, Hutner's trace element solution 2.0 mL, 寒天 15 g, all per L, pH 5.5)、M +セレン酸培地 (18.9 mg/L Na₂SeO₄, 30 mg/L D-メチオニン) および M +クロム酸培地 (37.3 mg/L Na₂CrO₄, 1.5 g/L L-メチオニン) を使用した。

高デンプン分解活性を有する菌株のスクリーニングと取得した株の解析のために TYS 寒天培地 (トリプトン 1 g, 酵母エキス 5 g, NaNO₃ 1 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ 0.5 g, MgSO₄ 0.5 g, 小麦デンプン 20 g, 寒天 20g, Triton X-100 1 ml, all per L, pH 7.0)、または TYSS 寒天培地 (小麦デンプンの代わりに可溶性デンプン 20 g/L を含む TYS 寒天培地) を用いた。ストレス感受性試験のために、コンゴレッド (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) または fluorescent brightener 28 (calcofluor white, CFW; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を用いた。

RIB2601 の野生株および U1 株を用いて、米麴を製造した (Shiraishi et al. 2016)。まず、精米した米を蒸した後、米 100 g (蒸す前の重量) 当たり 10^8 の分生子を接種した。その後、30 時間かけて 35°C から 40°C へと温度を上昇させ、次いで 35°C に温度を下げた。仕舞仕事 (30 時間) と出麴 (40 時間) においてサンプリングを行った。

2-2-2 イオンビーム照射の条件

RIB2601 を TYMG 寒天培地に接種して 30°C で 7 日間培養した後、シャーレの蓋をはずして Kapton 膜 (Du Pont-Toray, Tokyo, Japan) でカバーした。イオン加速器 (TIARA, Takasaki, Gunma, Japan) において、220 MeV の炭素イオンビーム (ビーム電流, 1~2nA) を照射した。照射した後、分生子を滅菌水に懸濁し、その濃度を CDA-1000 粒子計測器 (Sysmex, Kobe, Japan) により測定した。

2-2-3 イオンビームが突然変異の頻度に及ぼす影響の評価

イオンビーム照射後の *A. luchuensis* の分生子の生存率を調べるために、分生子の発芽率を測定した。イオンビームを非照射、あるいは照射した分生子を M 培地に塗布し、30°C で 2 日間培養し、出現したコロニーの数を数えた。

次に、ATP sulfurylase をコードする *sC* 遺伝子の突然変異体の出現頻度を測定した。分生子 (10^6) を M + セレン酸培地に播種し、30°C で 4 日間培養した。sulfate permease をコードする *sB* 遺伝子の機能を失った突然変異体もセレン酸の存在下で選択されるが、*sB* 突然変異体はセレン酸だけでなくクロム酸耐性も獲得することが知られている (Arst 1968; Buxton et al. 1989)。したがって、M + セレン酸培地で形成されたコロニーを M+ クロム酸培地に継代し、30°C で 4~7 日

間培養し、セレン酸耐性を有するがクロム酸耐性を有さなかった突然変異体を sC 突然変異株とみなし、その出現率を計算した。

2-2-4 高デンプン分解活性を有する突然変異株のスクリーニング

高デンプン分解活性を示す突然変異株をスクリーニングするために、200 Gy の線量でイオンビーム処理した分生子を TYS 寒天培地に塗布し、30°C で 2 日間培養した。TYS 寒天培地は 2% [wt/vol] の不溶性デンプンを含有しており、デンプン分解により形成されるハローのサイズを目視することができる。ハローおよびコロニーの大きさの両方を測定し、コロニーサイズ (コロニー直径) に対するハローサイズの比を計算し、デンプン分解活性を評価した。コントロール株よりも高デンプン分解活性を示したコロニーを 4 回継代して、安定性を確認した。

2-2-5 寒天培地におけるデンプン分解活性の評価

RIB2691 野生株、および U1 株の分生子 (10^5) を TYSS 寒天培地上に塗布し、30°C で 2 日間培養した。寒天培地上にタンパク質抽出用の緩衝液 (10 mM 酢酸ナトリウム, 0.5% [wt/vol] NaCl, pH5.5) を 7 ml 注ぎ、4°C で 16 時間保持し、タンパク質抽出液として使用した。寒天培地における生育を評価するために、菌体重量を測定した。寒天を加熱により融解し、菌体をガーゼにより回収した。約 60°C の温水で菌糸体を洗浄して寒天を取り除いた後、菌体を凍結乾燥した。菌体の凍結乾燥重量を測定し、菌体重量当たりの各デンプン分解酵素の活性を算出した。

α -アミラーゼ、 α -グルコシダーゼおよびグルコアミラーゼ活性は、 α -アミラーゼアッセイキット (Kikkoman Biochemifa, Tokyo, Japan) および糖化力分画定量キ

ット (Kikkoman Biochemifa) を用いて、プロトコールに従って測定した。本アッセイキットでは、1 U の α -アミラーゼ活性は、2-クロロ-4-ニトロフェニル 6⁵-アジド-6⁵ デオキシ- β -マルトペンタオシドから 1 μ mol の 2-クロロ-4-ニトロフェノールを 37°C、1 分間で生成する力価として定義される。また、1 U のグルコアミラーゼ活性と 1 U の α -グルコシダーゼ活性は、 β -グルコシダーゼの存在下において、4-ニトロフェニル β -マルトシドおよび 1 μ mol の 4-ニトロフェニル α -グルコシドから 1 μ mol の 4-ニトロフェノールを 37°C、1 分間で遊離させる力価として定義される。

2-2-6 デンプン分解活性評価およびタンパク質同定のための Native-PAGE

TYSS 寒天培地からのタンパク質抽出液 0.5 ml を、Vivacon 500 限外濾過ユニット (>50kDa, Sartorius, Goettingen, Germany) で 10 倍濃縮し、Native-PAGE 用の緩衝液 (0.05% [wt/vol] BPB, 70% [vol/vol] グリセロール、62.5mM Tris-HCl、pH 6.8) と混合した。サンプルを 10% アクリルアミドゲルを用いた Native PAGE により分析した。電気泳動の後、ゲルを 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) に溶解した 3% 可溶性デンプン溶液に浸して、30°C で 1 時間反応させた。次に、ゲルを脱イオン水で洗浄し、10 倍希釈のヨードチンキ (大成薬品工業株式会社) で染色した。染色結果を観察した後、ゲルを脱イオン水で洗浄し、CBB Stain One (Nacalai Tesque) により再び染色した。検出されたタンパク質のバンドを同定するために、MALDI-TOF MS 分析を Ultraflex (Bruker Daltonics) により行った (Oda et al. 2006)。

2-2-7 米麴のデンプン分解活性

麴における U1 株の表現型を評価するために、2-2-1 に記述した手法により RIB2601 株と U1 株を用いて米麴を作り、デンプン分解活性を比較した。仕舞仕事および出麴の段階で米麴のサンプリングを行った。酵素を抽出するために、10 g の米麴を 50 ml のタンパク質抽出緩衝液（10 mM 酢酸ナトリウム、0.5% [wt/vol] NaCl、pH5.5）と混合し、25°C で 3 時間静置した。この溶液をろ紙（No. 5、Advantec、Tokyo、Japan）を用いてろ過した。 α -グルコシダーゼ、グルコアミラーゼおよび α -アミラーゼの酵素活性は、糖化力分画定量キット（Kikkoman Biochemifa）および α -アミラーゼアッセイキット（Kikkoman Biochemifa）を用いてプロトコールに従って測定した。

2-2-8 GlcNAc 測定による米麴における生育の評価

麴における麴菌の増殖を評価するために GlcNAc 含量を使用することができると（Fujii et al. 1992）。麴中の菌体重量を推定するために、凍結乾燥菌した菌体および麴における GlcNAc レベルを、先に報告された手法（Reissig et al. 1955; Fujii et al. 1992）に従って測定した。2-2-5 で記述した方法により TYSS 寒天培地から回収した菌体を凍結乾燥し、GlcNAc の測定に用いた。

2-2-9 RNA の抽出

米麴の仕舞仕事（30 時間）の試料から RNA を抽出した（Futagami et al. 2015）。サンプリングした試料を直ちに液体窒素で凍結し、液体窒素の存在下においてハンマーを用いて破壊し、RNAiso（Takara Bio, Shiga, Japan）を用いて RNA を

抽出した。RNA の精製のために、SV total RNA isolation system (Promega, Madison, WI) をプロトコールに従って使用した。

2-2-10 RNA-seq 解析

RNA-seq によるトランスクリプトーム解析は、HiSeq 2000 システム (Illumina) により行った。三連で独立して調製した米麴 (仕舞仕事) から抽出した RNA を用いた。ライブラリーの調製および配列決定は、Eurofins Genomics K.K. (Tokyo, Japan) において行われた。シーケンスリードは、Illumina Chastity filter でフィルタリングした。RIB2601 のゲノム情報は未公開であったため、白麴菌 *A. luchuensis* mut. *kawachii* IFO (NBRC) 4308 のゲノム (Futagami et al. 2015) にシーケンスリードをマッピングした。RIB2601 株と U1 株における各遺伝子の発現量の比を \log_2 ratio として計算した。 q 値は、R パッケージ TCC (Sun et al. 2013) の iDEGES / edgeR-edgeR のパイプラインを使用して計算した。 q 値が 0.05 未満、かつ \log_2 fold change が -1 未満または 1 より大きい場合に有意な発現変動と見なした。次に、遺伝子オントロジー (GO) 解析を行った。GO エンリッチメント解析は、先に報告された手法 (Ashburner et al. 2000; Harris et al. 2004; Futagami et al. 2015)、および PERL スクリプトを用いて行った。RNA-seq データはアクセッション番号 GSE92237 として Gene Expression Omnibus (GEO) に登録した。

2-2-11 リアルタイム RT-PCR 解析

PrimeScript RT reagent kit (perfect realtime) (Takara Bio) を用いて、500 ng の total RNA を鋳型としてプロトコールに従って cDNA を合成した。SYBR premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) (Takara Bio) を用いて Dice real-time system MRQ thermal

cycler (Takara Bio) を用いて、リアルタイム RT-PCR 解析を行った。リアルタイム RT-PCR 用のプライマーは、*A. luchuensis* mut. *kawachii* IFO 4308 株の遺伝子情報を用いて、AL (acid labile) *amyA*、AS (acid stable) *amyA*、*glaA*、*AKAW_10307*、*AKAW_00660*、および *actA* に対して設計した (Table 2-1)。IFO 4308 株のゲノム DNA (4.5×10^4 , 9×10^4 , 1.8×10^5 , および 4.5×10^5 コピー) を standard DNA として用いた。アクチンをコードする *actA* 遺伝子を用いて、標的遺伝子の mRNA レベルを標準化した。

Table 2-1. Primers used in this study.

Name	Sequences (5'-3')	References
actin-RT-F	GGTATGGGTCAGAAGGACTC	Futagami et al. 2015
actin-RT-R	CTCCATGTCATCCCAGTTCG	Futagami et al. 2015
ALamyA-RT-F	GTGGTGGTCTCTATTTCTGTACGG	This study
ALamyA-RT-R	CGACCCATCCGTCCTTGCAAAT	This study
ASamyA-RT-F	CAAGTATTGCCCTTGCTGTGTCC	This study
ASamyA-RT-R	GTCGAATTGTCGTCCTACCGAA	This study
glaA-RT-F	GCGCGACCTTGGATTCGTGG	This study
glaA-RT-R	ACTGGCAACGACAATGCCAGAG	This study
AK10307-RT-F	GGTCAAAGAGAGTTTGCCCTTCG	This study
AK10307-RT-R	GAAGTCGTAGGCATCGTTGTTCC	This study
AK660-RT-F	GCTGCCTTTGAGGGAACCCG	This study
AK660-RT-R	CTTCTGAGCGAGCTCGGACC	This study

第3節 結果と考察

2-3-1 イオンビームによる突然変異誘発の評価

イオンビーム突然変異誘発の条件を評価するために、*A. luchuensis* RIB2601株の生存率および*sC*突然変異株の出現頻度に及ぼすイオンビームの影響を調べた (Table 2-2)。その結果、イオンビームが線量依存的に分生子の発芽率を低下させることが確認された。また、*sC*突然変異株の出現頻度を、セレン酸耐性およびクロム酸感受性の表現型に基づいてスクリーニングして評価したところ、*sC*突然変異株の頻度もイオンビームの線量依存的に増加した。この結果から、イオンビームが*sC*遺伝子の突然変異を引き起こしたことが示唆された。

Table 2-2. Effect of an ion beam on germination rate and frequency of the emergence of *sC* mutants

Dose of ion beam (Gy)	0	50	100	200	300
Germination rate (%)	100	67.8±15.7	50.6±11.1	7.25±1.07	2.17±0.05
Frequencies	1.8×10^{-5}	9.6×10^{-5}	8.9×10^{-5}	3.8×10^{-4}	7.5×10^{-4}
(No. of <i>sC</i> mutant/ No. of conida)	(23/ 1,255,000)	(269/ 2,796,483)	(273/ 3,083,248)	(127/ 331,189)	(16/ 21,464)

2-3-2 寒天培地におけるデンプン分解酵素活性の比較

デンプン含有寒天培地におけるデンプン分解によるハロー形成に基づいて約 10,000 個のコロニーをスクリーニングし、高デンプン分解活性変異株の候補株を 4 株取得した。しかし、これらの株のうち 3 株は 4 回の継代培養の間に高デンプン分解活性を失い、最終的に U1 株のみが安定な高デンプン分解活性を示した (Fig. 2-1A)。U1 株のデンプン分解活性を評価するために、デンプンを炭素源として含む寒天培地上で生育させた RIB2601 株および U1 株の α -アミラーゼ、グルコアミラーゼおよび α -グルコシダーゼ活性を測定した。U1 株のこれらの酵素活性は、親株である RIB2601 株よりも有意に高かった (Fig. 2-1B)。

U1 株の高デンプン分解活性の原因を調べるために、寒天培地に分泌されたタンパク質を抽出し、native PAGE により分析した。ゲルをデンプン分解活性を指標とした活性染色で染色した結果、2 つのバンド (Fig. 2-2A の I および II) が検出された。U1 株のバンドの染色は、U1 株が高デンプン分解活性を示す結果と一致して、RIB2601 株のバンドよりも濃く染色された。その後、CBB 染色を行い MALDI-TOF MS 解析により各バンドのタンパク質を同定した。これらのバンドがグルコアミラーゼ (GlaA) および α -アミラーゼ (AmyA) 由来であることを確認した (GlaA についてはバンド 4 および 5、AmyA について 6 および 7)。黒麹菌には、非耐酸性タイプと耐酸性タイプの 2 種類の α -アミラーゼがあり (Suganuma et al. 2007)、検出された AmyA は非耐酸性タイプであった。CBB 染色においても、これらのバンドは、U1 株において RIB2601 株よりも濃く染色された。この結果から、U1 株の高デンプン分解活性は、GlaA および AmyA のより高いレベルの分泌生産に起因することが考えられた。

CBB 染色および MALDI-TOF MS 解析では、U1 株においてより高いレベルで β -ラクタマーゼドメイン含有タンパク質 (AKAW_10307) (Fig. 2-2B のバンド 1)

が分泌される一方、ジペプチジルペプチダーゼ (AKAW_00660) (Fig 2-2B と Table 2-3 の 2 および 3) は、U1 株においてより低いレベルで分泌された。

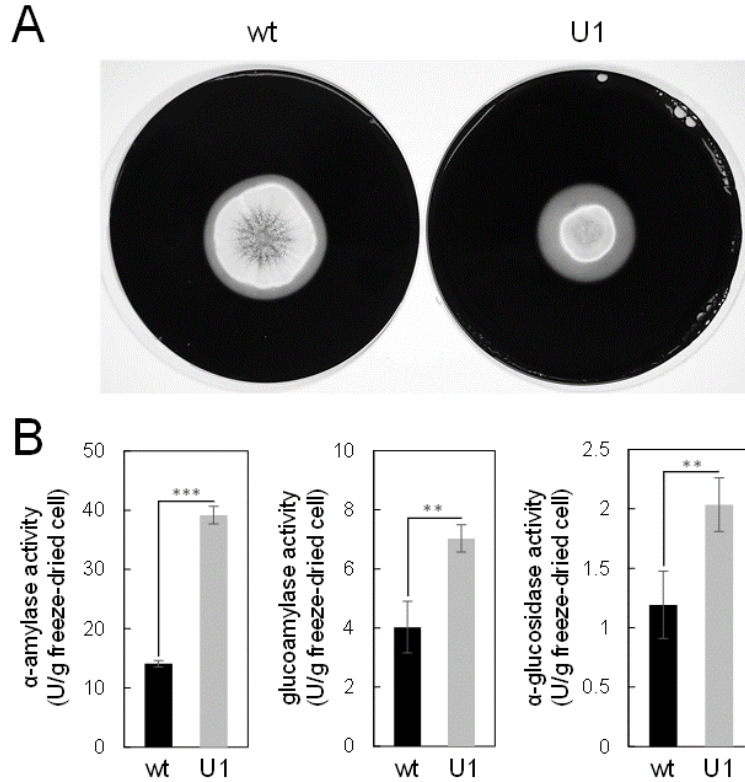


Fig. 2-1 Comparison of *A. luchuensis* RIB2601 wt and strain U1 grown on agar medium. Colony formation and starch degradation test of *A. luchuensis* RIB2601 wt strain and strain U1 (A). Conidia (2×10^4) were inoculated on TYSS medium containing starch and incubated at 30°C for 3 days. The degradation of starch was evaluated by halo formation. The grey region surrounding the colony indicates the halo visualized by starch iodine reaction. Amylolytic enzyme activities of wt strain and strain U1 grown on agar medium (B). Conidia (1×10^5) were inoculated on an agar plate containing 25 ml TYSS medium and incubated at 30°C for 2 days. The cultivation was performed on 4 agar plates for each strain. The activities of amylolytic enzymes and cell yields were measured for each agar plate. The mean values and the standard deviations were determined from the results on four plates. Asterisks indicate statistical significance: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Welch's t-test).

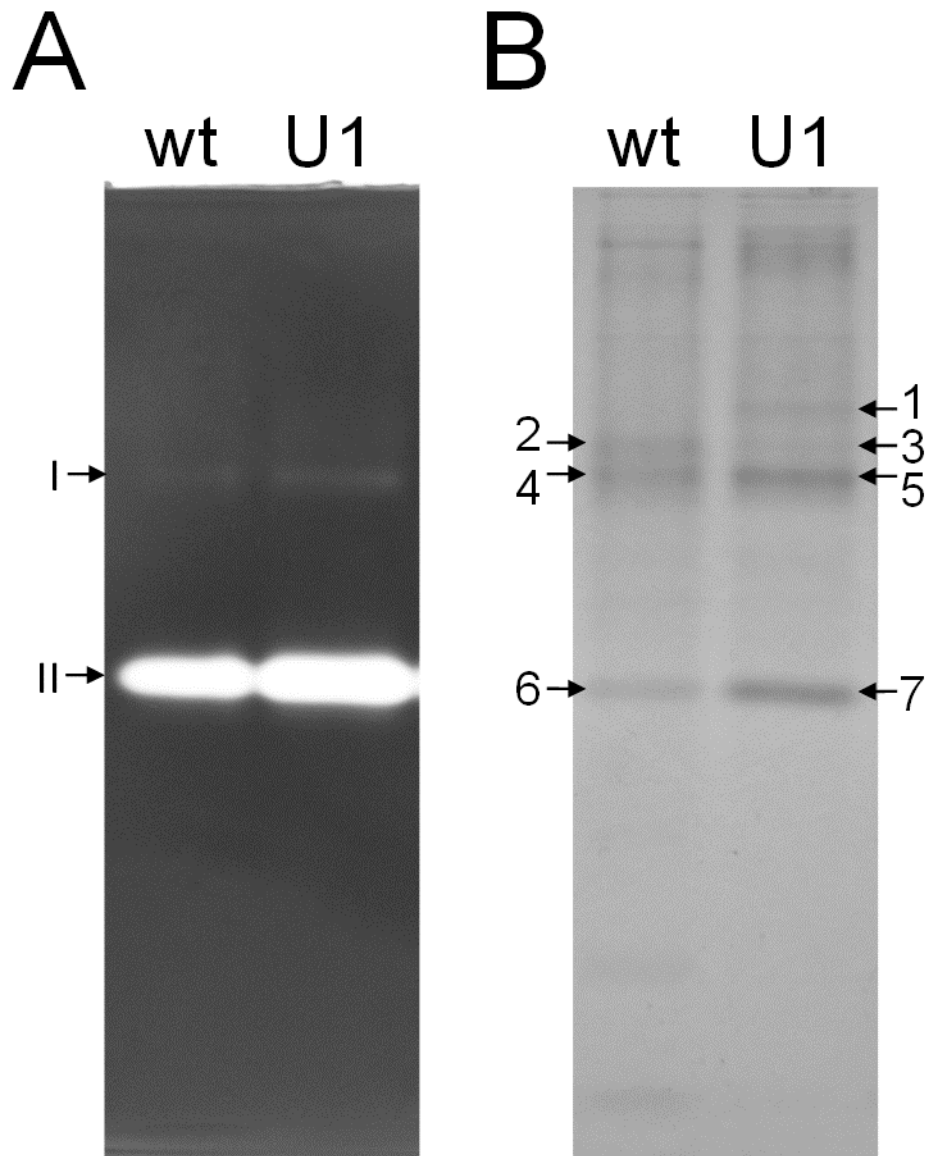


Fig. 2-2 Secreted proteins of *A. luchuensis* *wt* and strain *U1*. Amylolytic activity staining was performed after native PAGE of secreted enzymes (A). CBB staining was performed after destaining of the starch iodine reaction (B). Band I (in A) corresponds to bands 4 and 5 (in B) and Band II corresponds to 6 and 7. A representative result is shown from experiments performed three times using independently prepared samples. The bands in B were isolated and identified by MALDI-TOF MS (see Table 2-3).

Table 2-3. Proteins identified by MALDI-TOF MS analysis

Bands	NCBI number	GI Descriptions	Species	Score	Coverage (%)
1	gi 358375613	β -Lactamase domain protein	<i>A. kawachii</i> IFO 4308	114	22
2	gi 145256471	Dipeptidyl peptidase III	<i>A. niger</i> CBS 513.88	121	27
3	gi 145256471	Dipeptidyl peptidase III	<i>A. niger</i> CBS 513.88	176	31
4	gi 157829865	Glucoamylase	<i>A. awamori</i> var. X100	121	17
5	gi 358374272	Glucoamylase	<i>A. kawachii</i> IFO 4308	179	15
6	gi 114794116	α -Amylase	<i>A. niger</i>	96	11
7	gi 114794116	α -Amylase	<i>A. niger</i>	235	20

2-3-3 黒麹菌 RIB2601 株および U1 株の GlcNAc 含量および生育評価

米麴における *A. luchuensis* の生育を評価するために、凍結乾燥した菌体および米麴中の GlcNAc 含量を測定した。凍結乾燥した菌体は、寒天培地で培養した菌体から調製した。まず、凍結乾燥菌体あたりの GlcNAc 含量は、U1 株では野生株より約 1.3 倍高かった (Fig. 2-3A)。この結果から、イオンビーム照射が U1 株の GlcNAc 含量に影響を与えたことが示唆された。

次に、GlcNAc 含量に基づいて米麴の菌糸体量を予測した (Fig. 2-3B)。U1 株を用いて培養した米麴の GlcNAc 含量は、RIB2601 株を用いて培養した米麴の約 0.1 倍であった。この結果から、U1 株の米麴における生育は、親株である RIB2601 野生株よりも有意に遅延したことが示唆された。

2-3-4 米麴におけるデンプン分解活性

米麴における *A. luchuensis* RIB2601 株および U1 株のデンプン分解活性を比較して、U1 株の麴製造への適用性を評価した。米麴の重量あたりの α -アミラーゼ、グルコアミラーゼおよび α -グルコシダーゼ活性は、ほとんど差は見られなかった (Fig. 2-4A)。出麴における α -アミラーゼ活性と仕舞仕事におけるグルコアミラーゼ活性が U1 株においてわずかに増加したことに有意差が見られた。一方、GlcNAc 含量から推定された菌体重量当たりの酵素活性は、すべてにおいて U1 株により製造した米麴は RIB2601 株により製造した麴よりも有意に高い活性を示した (Fig. 2-4B)。この結果は、麴において U1 株が親株である RIB2601 株よりも著しく生育遅延するが、それを補うデンプン分解活性を供給することが示唆された。

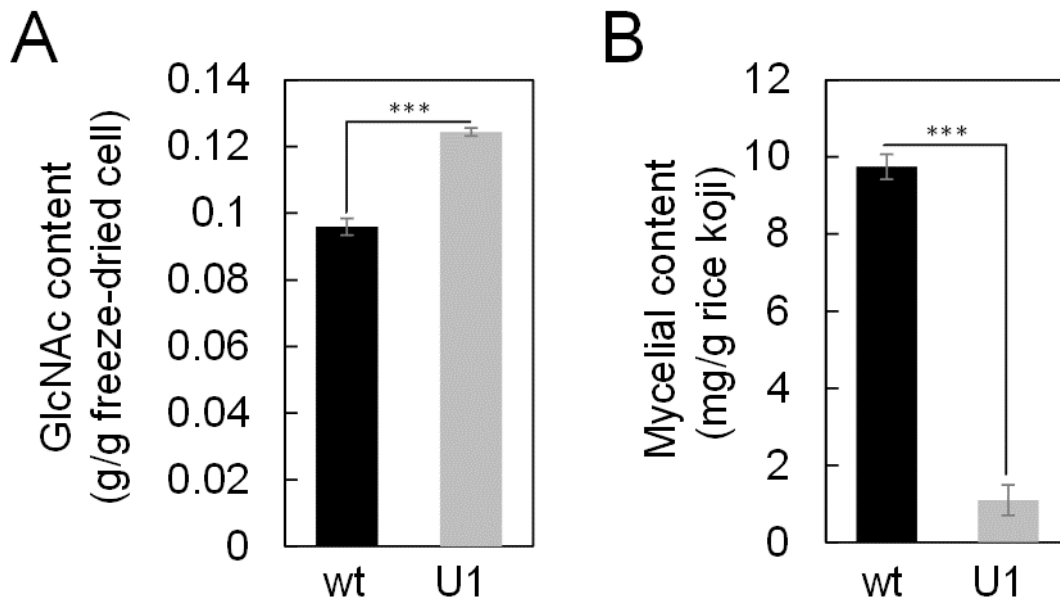


Fig. 2-3 Comparison of growth of *A. luchuensis* wt and strain U1 in rice koji based on the GlcNAc content. The GlcNAc content of the cell wall fraction from wt and strain U1 (A). The putative mycelial content of wt and strain U1 in the *dekoji* of rice koji (B). The putative mycelial content was estimated by the GlcNAc contents of cell wall and rice koji. Asterisks indicate statistical significance: *** $p < 0.001$ (Welch's t-test).

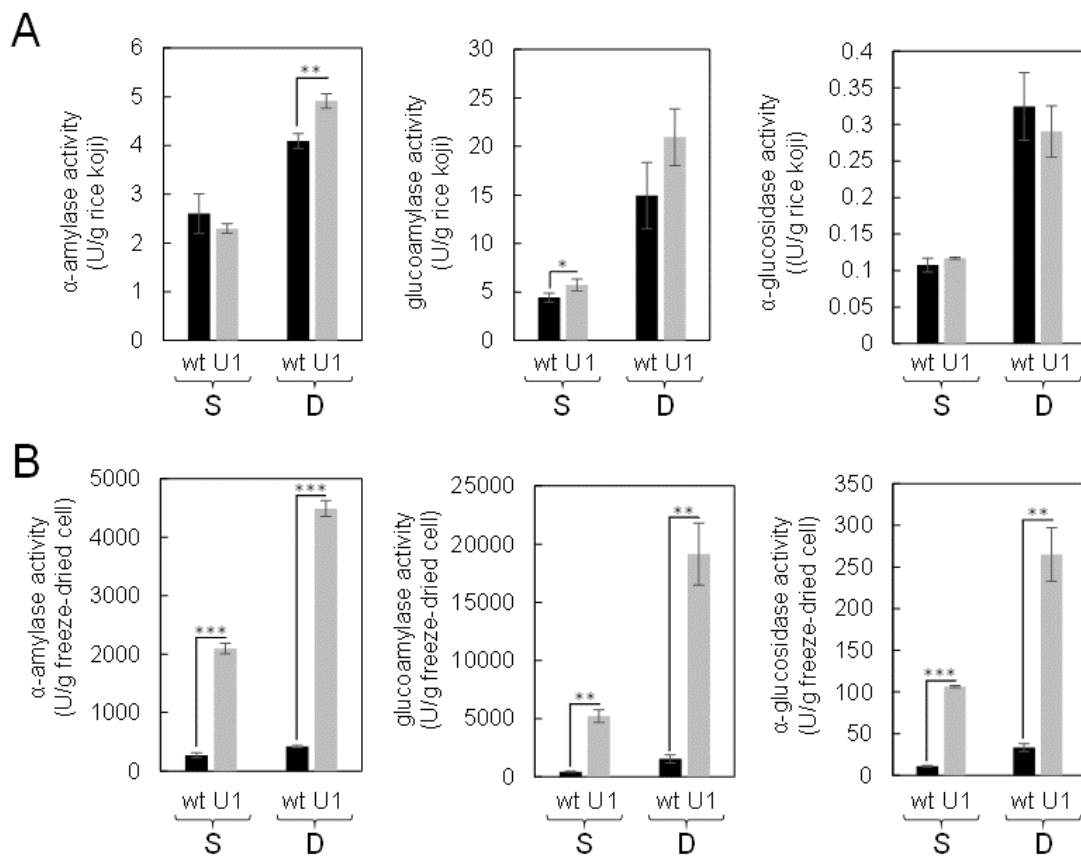


Fig.2-4 The activity of amylolytic enzymes of *A. luchuensis* wt and strain U1 in rice koji. The enzymatic activity on the basis of koji weight (A) and mycelial weight (B). Rice koji was prepared in triplicate and the amylolytic enzyme activities were measured in triplicate using independently prepared samples. The mean values and the standard deviations were determined. Abbreviations: S, *shimaishigoto*; D, *dekoji*. Asterisks indicate statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Welch's t-test).

2-3-5 温度および細胞壁阻害剤が U1 の増殖に及ぼす影響

U1 株の表現型の特徴を明らかにするために、まず培養温度の影響を調べた (Fig. 2-5)。各菌株を麴の製造過程の温度帯である 30°C~42°C で生育させた。U1 株のコロニー形成は、高温 (42°C) で強く阻害された。また、U1 株は、RIB2601 株よりも 1.3 倍高い GlcNAc 含量を示したことから (Fig. 2-3)、U1 株は GlcNAc などの細胞壁合成・維持機構に異常があることが示唆された。そこで、コンゴレッドや CFW のような細胞壁合成阻害剤がコロニー形成に影響を与えるかどうかを調べた。コンゴレッドおよび CFW は、それぞれグルカンおよびキチンに結合することによって細胞壁合成を阻害することが知られている (Ram and Klis 2006)。コンゴレッドは RIB2601 株と U1 株の増殖を同程度に阻害したが、U1 株のコロニー形成は、RIB2601 株と比較して、100 µg/ml の CFW によって顕著に阻害された。これらの結果は、U1 株は、高温に対する耐性およびキチン合成に異常が引き起こされていることが示唆された。

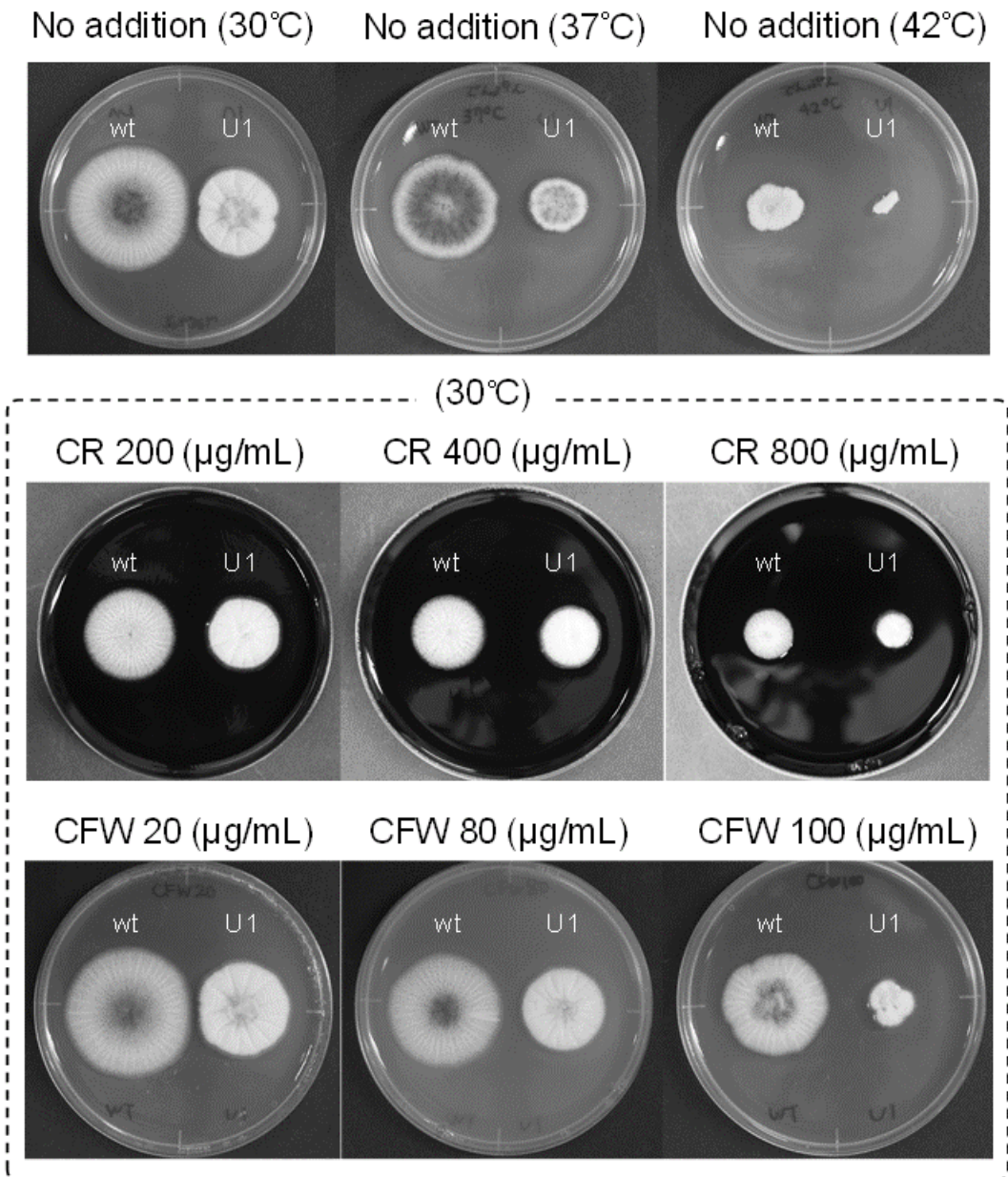


Fig. 2-5 Effect of temperature and inhibitors of cell wall biogenesis on the growth of *A. luchuensis* wt and strain U1. The colony formation of wt and strain U1 was compared on TYSS. Abbreviations: CR, Congo red; CFW, calcofluor white.

2-3-6 分泌タンパク質をコードする遺伝子の転写解析

イオンビーム照射が U1 株の遺伝子発現に与える影響について調べるために、RIB2601 株と U1 株との間の比較 RNA-seq 解析を行った。その結果、604 の遺伝子発現変動を同定した。これらの 604 遺伝子のうち、281 遺伝子が U1 株において発現上昇、323 遺伝子が発現減少した。興味深いことに、*amyA* や *glaA* のようなデンプン分解酵素をコードする遺伝子は含まれておらず、この結果は、タンパク質分泌のレベルと一致しなかった (Fig. 2-2B)。リアルタイム RT-PCR によっても、非耐酸性 α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼをコードする *amyA* および *glaA* の転写レベルが、RIB2601 株および U1 株間で有意差がないことを確認した (Fig. 2-6)。さらに、U1 株における耐酸性 α -アミラーゼをコードする *aamA* 遺伝子の転写レベルは、RIB2601 株よりも低いことが示唆された。

次に、Native-PAGE 解析 (Fig. 2-2B) により RIB2601 株と U1 株とで発現がタンパク質レベルで異なることが示唆された β -ラクタマーゼドメイン含有タンパク質 (AKAW_10307) およびジペプチジルペプチダーゼ (AKAW_00660) の遺伝子発現を調べた。しかしながら、RNA-seq またはリアルタイム RT-PCR によって、これら 2 つの遺伝子の有意な転写変化はみられなかった。したがって、異なるタンパク質発現レベルは、転写よりもむしろタンパク質翻訳、タンパク質輸送およびタンパク質分解のような転写後プロセスに起因する可能性が示唆された。

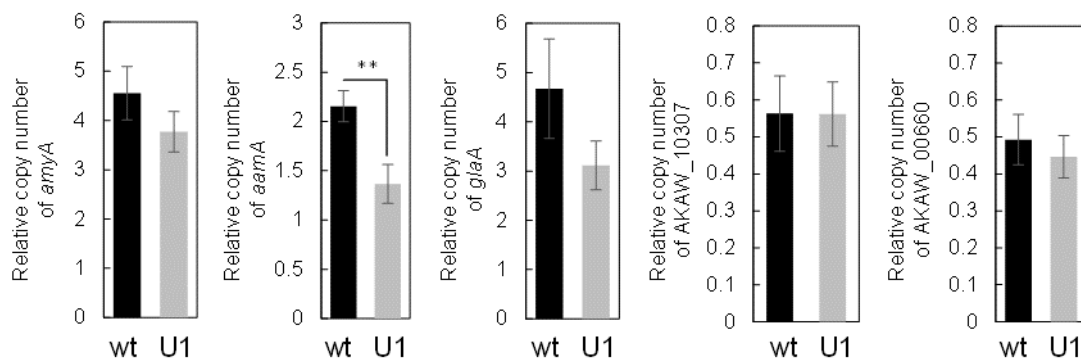


Fig. 2-6 Transcription of genes of *A. luchuensis* wt and strain U1 in rice koji. Real-time RT-PCR was performed for the genes encoding proteins identified in the secreted protein fractions (see Fig. 2). The copy numbers were normalized to the actin gene and the data are presented as relative numbers. Asterisks indicate statistical significance: ** $p < 0.01$ (Welch's t-test).

2-3-7 RNA-seqによるトランスクリプトームデータの解釈

イオンビームが U1 株の表現型にどのように影響するかを捉えるために、発現変動した 604 遺伝子について GO エンリッチメント解析を行った。その結果、biological process に関連する 8 つの GO term が同定した (Fig. 2-7)。重複する遺伝子を含む GO term を除くと、oxidation-reduction process (GO : 0055114)、transport process (GO : 0006810)、および glucosamine-containing compound metabolic process (GO : 1901071) が残った。oxidation-reduction process (GO : 0055114) には酸化還元代謝系の遺伝子が含まれ、transport process (GO : 0006810) にはオキシドレダクターゼや MFS (Major Facilitator Super) ファミリー輸送体、アミノ酸輸送体などの様々な輸送タンパク質が含まれていた。これらの中に、U1 株の特性に関連する因子は同定できなかった。一方、glucosamine-containing compound metabolic process (GO : 1901071) には、U1 株の細胞壁において GlcNAc 含有量が増加したこと (Fig. 2-3A) に関与する可能性のある GlcNAc の合成および分解に関与する遺伝子が含まれていた。その中で、U1 株において発現上昇したものには、推定糖質加水分解酵素ファミリー18のキチナーゼ (AKAW_02399)、N-アセチルグルコサミン-6-リン酸デアセチラーゼ (AKAW_07501)、グルコサミン-6-リン酸イソメラーゼ (AKAW_07504)、およびキチン結合活性ドメインを有する推定遺伝子 (AKAW_10297) が含まれた。一方、U1 株において発現低下したものの中には、クラス V キチナーゼ (AKAW_02055) が含まれた。細胞壁組成の変化は、デンプン分解活性に影響を及ぼした可能性がある。*A. luchuensis* mut. *kawachii* において α -アミラーゼは細胞壁画分にも検出された (Nagamine et al. 2003)。また、*A. oryzae* において α -アミラーゼは細胞壁のキチンに吸着することが報告されており、培養上清への分泌に影響すると考えられた (Sato et al. 2011)。さらに、*Aspergillus niger* において GFP 融合グルコアミラーゼは、糸先端部および部分的に菌糸体細胞壁に局在した (Gordon et al. 2000a, 2000b)。U1 株は、*amyA* や *glaA*

などのデンプン分解酵素に関与する遺伝子の発現レベルは変化しないにも関わらずこれらのデンプン分解酵素の分泌生産レベルが上昇したことが示唆された (Fig. 2-2B, Fig. 2-6)。デンプン分解酵素遺伝子の転写因子である可能性がある *amyR* 遺伝子 (AKAW_09854) と *fluG* 遺伝子 (AKAW_05082) が発現変動していないことも RNA-seq 解析により確認された。*A. niger* において AmyR は *aamA* (酸安定性 α -アミラーゼ)、*glaA* (グルコアミラーゼ)、および *agdA* (α -グルコシダーゼ) などの糖質加水分解酵素をコードする遺伝子の転写を調節することが報告されている (Yuan et al. 2008)。また、*A. niger* において FluG がグルコアミラーゼの発現に関与すること報告されている (Wang et al. 2014)。

本研究では、イオンビームによる麹菌の育種事例のひとつとして、高アミロース分解活性を有する *A. luchuensis* RIB2601 の変異株を育種できることを実証した。しかし、その原因変異までは特定できていないため、今後、RIB2601 株と U1 株の比較ゲノム解析により原因変異を同定することが期待される。

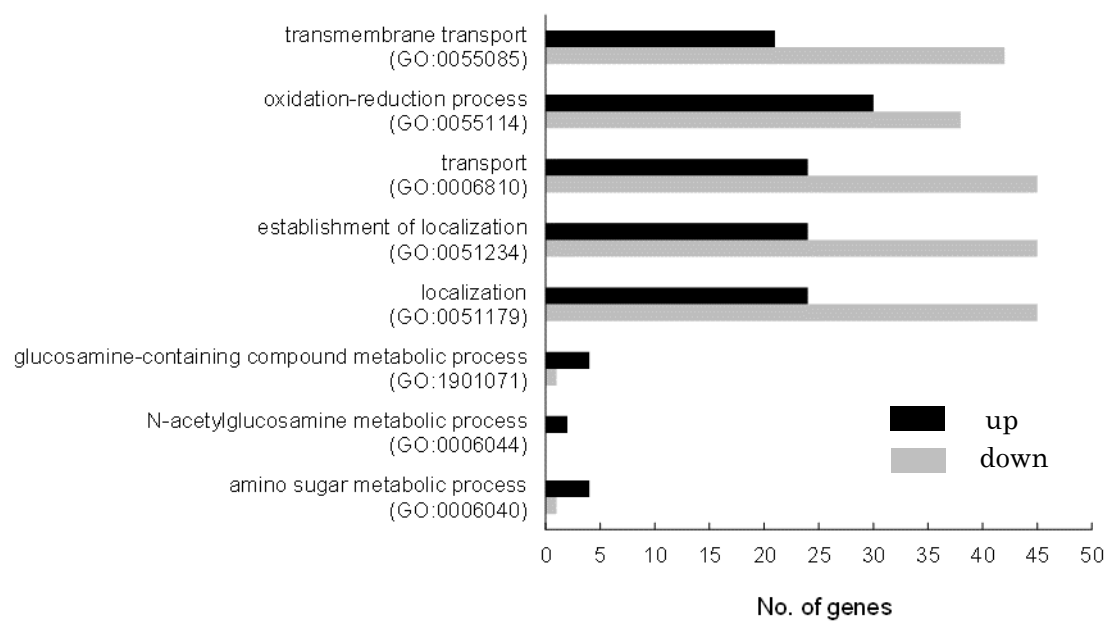


Fig. 2-7 Biological process GO terms. The GO terms were identified by GO enrichment analysis of genes showing significant changes in gene expression in strain U1. A set of 604 differentially expressed genes in rice koji was used for the analysis. The GO terms are shown in order of *p*-value (from lowest to highest; all *p*-values are <0.01).

参考文献

- Amsal, A., Takigami, M., and Ito, H. (1999) Increased digestibility of raw starches by mutant strains of *Aspergillus awamori*. *Food. Sci. Technol. Res.*, 5, 153–155.
- Arst, H. N. J. (1968) Genetical analysis of the first step of sulphate metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 219, 268–270.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H. et al. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.*, 25, 25–29.
- Buxton, F. P., Cwynne, D. I., and Davies, R. W. (1989) Cloning of a new bidirectionally selectable marker for *Aspergillus* strains, *Gene*, 84, 329–334.
- Fujii, F., Ozeki, K., Kanda, A., Hamachi, Y., Nunokawa, Y. (1992) A simple method for the determination of grown mycelial content in rice-koji using commercial cell wall lytic enzyme, yatalase. *J. Brew. Soc. Jpn.* 87, 757–759.
- Futagami, T., Mori, K., Wada, S., Ida, H., Kajiwara, Y. et al. (2015) Transcriptomic analysis of temperature responses of *Aspergillus kawachii* during barley koji production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, 1353-1363.
- Harris, M. A., Clark, J., Ireland, A., Lomax, J., Ashburner, M. et al. (2004) The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res.*, 32, 258D–D261.
- Gordon, C. L., Archer, D. B., Jeenes, D. J., Doonan, J. H., Wells, B. et al. (2000a) A glucoamylase::GFP gene fusion to study protein secretion by individual hyphae of *Aspergillus niger*. *J. Microbiol. Methods*, 42, 39–48.
- Gordon, C. L., Khalaj, V., Ram, A. F. J., Archer, D. B., Brookman, J. L. et al. (2000b) Glucoamylase::green fluorescent protein fusions to monitor protein secretion in *Aspergillus niger*. *Microbiology*, 146, 415–426.
- Hong, S. B., Yamada, O., and Samson, R. A. (2014) Taxonomic re-evaluation of black

- koji molds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 555–561.
- MacKenzie, D. A., Jeenes, D. J., Gou, X., and Archer, D. B. (2000) Molecular basis of glucoamylase overproduction by a mutagenised industrial strain of *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 193–200.
- Nagamine, K., Murashima, K., Kato, T., Shimoi, H., and Ito, K. (2003) Mode of alpha-amylase production by the shochu koji mold *Aspergillus kawachii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 2194–2202.
- Oda, K., Kakizono, D., Yamada, O., Iefuji, H., Akita, O. et al. (2006) Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 3448–3457.
- Ram, A. F., and Klis, F. M. (2006) Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nat. Protoc.*, 1, 2253–2256.
- Reissig, J. L., Storminger, J. L., Leloir, L. F. (1955) A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.* 217, 959–966.
- Sato, H., Toyoshima, Y., Shintani, T., and Gomi, K. (2011) Identification of potential cell wall component that allows Taka-amylase A adsorption in submerged cultures of *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 92, 961–969.
- Shiraishi, Y., Yoshizaki, Y., Ono, T., Yamato, H., Okutsu, K. et al. (2016) Characteristic odour compounds in shochu derived from rice koji. *J.Inst. Brew.*, 122, 381–387.
- Suganuma, T., Fujita, K., and Kitahara, K. (2007) Some distinguishable properties between acid-stable and neutral types of alpha-amylases from acid-producing koji. *J. Biosci. Bioeng.*, 104, 353–362.
- Sun, J., Nishiyama, T., Shimizu, K., and Kadota, K. (2013) TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinformatics*, 14, 219.

- Toyoshima, Y., Takahashi, A., Tanaka, H., Watanabe, J., Mogi, Y. et al. (2012) Lethal and mutagenic effects of ion beams and γ -rays in *Aspergillus oryzae*. *Mutat. Res.*, 740, 43–49.
- Wang, F., Krijgsheld, P., Hulsman, M., de Bekker, C., Müller, W. H. et al. (2015) FluG affects secretion in colonies of *Aspergillus niger*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 107, 225–240.
- Yamada, O., Takara, R., Hamada, R., Hayashi, R., Tsukahara, M. et al. (2011) Molecular biological researches of Kuro-Koji molds, their classification and safety. *J. Biosci. Bioeng.*, 112, 233–237.
- Yuan, X. L., van der Kaaij, R. M., van den Hondel, C. A., Punt, P. J., van der Maarel, M. J. et al. (2008) *Aspergillus niger* genome-wide analysis reveals a large number of novel alpha-glucan acting enzymes with unexpected expression profiles. *Mol. Genet. Genomics.*, 279, 545–561.

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました鹿児島大学農学部 教授 玉置尚徳博士に深甚なる謝意を表します。

本論文の審査委員であり、ご指導、ご鞭撻を賜りました鹿児島大学農学部 教授 高峯和則博士、琉球大学農学部 教授 外山博英博士、佐賀大学農学部 教授 後藤正利博士に深甚なる謝意を表します。

本研究を行うにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました鹿児島大学農学部 准教授 二神泰基博士、准教授 吉崎由美子博士、助教 奥津果優博士に深甚なる謝意を表します。

イオンビームの照射は、日本原子力研究開発機構（JAEA）施設共同利用のための大学間プログラムにより支援されました。関係者各位に御礼申し上げます。