

泡盛醸造における *Aspergillus luchuensis* 由来
フェノール酸脱炭酸酵素による 4-ビニルグアヤコール生産
(4-Vinylguaiacol production by *Aspergillus luchuensis*
phenolic acid decarboxylase in *awamori* brewing.)

眞榮田麻友美

2021

目次

第1章 緒言	1
第2章 リコンビナント AIPAD の酵素化学的諸性質	8
第1節 緒言	8
第2節 実験材料と方法	10
第1項 試薬および菌株	
第2項 菌株および培地	
第3項 <i>alpad</i> 遺伝子のクローニング	
第4項 リコンビナント AIPAD の発現および精製	
第5項 N 末端アミノ酸配列解析	
第6項 精製リコンビナント AIPAD の分子量測定	
第7項 PAD 活性の測定	
第3節 実験結果	15
第1項 <i>A. luchuensis</i> のフェノール酸脱炭酸酵素のクローニングおよびシーケンス解析	
第2項 AIPAD の異種発現と諸性質	
第3項 基質特異性およびカイネティックパラメーター	
第4項 活性に対する金属イオンおよび化学試薬の影響	
第4節 考察	28
第3章 黒麹菌における AIPAD の発現・機能解析および誘導物質の探索	31
第1節 緒言	31
第2節 実験方法	35
第1項 材料および試薬	
第2項 静止菌体反応	

第3項 米および米ぬか中のFAの定量

第4項 米粉およびグルコースのFAD活性への影響

第5項 麴の調製

第6項 麴中の菌体量の定量

第7項 ウェスタンブロッティング

第8項 米ぬか熱水抽出物で培養した菌体によるFAD活性測定

第9項 米ぬか熱水抽出物中のAIPAD誘導物質の精製

第10項 フェノール酸類の検出

第11項 HPAEC-PADを用いた単糖の分析

第12項 ESI-MS分析

第13項 TLCによる糖の検出

第14項 HPAEC-PADを用いたグルコース、フルクトースおよびスクロースの定量

第15項 フルクトースおよびスクロース培養菌体による静止菌体反応試験

第16項 転写誘導試験

第3節 実験結果..... 44

第1項 AIPADの誘導性試験

第2項 米ぬか中の誘導物質の探索および同定

第3項 *alpad*の転写誘導試験

第4項 製麴中のFAD活性およびAIPAD量の経時変化

第4節 考察..... 55

第4章 泡盛醸造における4-VG生成へのAIPADの寄与..... 58

第1節 緒言..... 58

第2節 実験方法..... 60

第 1 項	培地および鑄型の調製	
第 2 項	<i>alpad</i> 破壊株の構築	
第 3 項	野生株および $\Delta alpad$ 株の FA による生育への影響	
第 4 項	静止菌体反応における FAD 活性の測定	
第 5 項	米中の FA の定量	
第 6 項	製麴	
第 7 項	麴中の菌体量, FAD 活性および FA と 4-VG 量の測定	
第 8 項	モロミおよび蒸留液中の FA および 4-VG の定量	
第 9 項	蒸留時の熱による FA から 4-VG への変換	
第 10 項	モロミ中の麴の FAD 活性における経時変化の評価	
第 11 項	<i>A. kawachii</i> $\Delta AKAW08977$ 株の FAD 活性への影響	
第 3 節	結果	69
第 1 節	<i>alpad</i> 破壊株の構築	
第 2 節	$\Delta alpad$ 株の表現型と生育における FA の影響	
第 3 項	野生株および $\Delta alpad$ 株の静止菌体反応における FAD 活性の測定	
第 4 項	野生株および $\Delta alpad$ 株の麴中の FAD 活性の測定	
第 5 項	野生株および $\Delta alpad$ 株の醸造試験	
第 6 項	モロミ中の麴菌の FAD 活性の測定	
第 7 項	蒸留時の熱による FA から 4-VG への変換	
第 8 項	<i>A. kawachii</i> $\Delta AKAW08977$ 株を用いた FAD 活性への影響	
第 4 節	考察	85
第 5 章	総括	90
	参考文献	95

謝辭..... 103

Abbreviations

AkPAD : phenolic acid decarboxylase from *Aspergillus kawachii*

ALPAD : phenolic acid decarboxylase from *Aspergillus luchuensis*

AMT : Agrobacterium-mediated transformation

AnPAD : phenolic acid decarboxylase from *Aspergillus niger*

CA : caffeic acid

CCR : carbon catabolite repression

CD : Czapek-Dox

cDNA : complementary deoxyribonucleic acid

CFE : cell-free extract

CgPAD : phenolic acid decarboxylase from *Candida guilliermondii*

D : distillate

DAM : days after start of moromi fermentation

DEPC : diethyl pyrocarbonate

DO : dissolved oxygen

DR : distillation remnants (distillation remaining solution)

FA : ferulic acid

FAD : Ferulic Acid Decarboxylation

FAE : feruloyl esterase

FDC1 : ferulic acid decarboxylase

FMN : flavin mononucleotide

Glc : glucose

GlcNAc : *N*-acetylglucosamine

gpdA : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

hph : hygromycin B resistance gene

HPLC : high performance liquid chromatography

IM : Induction medium

LpPAD : phenolic acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*

MM : minimal

MES : 2-Morpholinoethanesulfonic acid

ORF : open reading frame

PAD : phenolic acid decarboxylase

PAD1 : phenylacrylic acid decarboxylase

PCA : *p*-coumaric acid

PCMB : 4-chloromercuribenzoate

PDA : potato dextrose with 1.5% agar

PDB : protein data bank

PMSF : phenylmethanesulfonyl fluoride

PVDF : polyvinylidene difluoride

qPCR : quantitative PCR

RB : rice bran

SD : standard deviation

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

U : unit

WR: white rice

xln : xylanases

4-VG : 4-vinylguaiacol

4-VP : 4-vinylphenol

$\Delta alpad$: *alpad*-disrupted

第1章 緒言

泡盛は沖縄の伝統的な蒸留酒であり、米を原料に黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* と酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて作られている。多くの酒造所では原料米はタイ米(長粒米)を用いている。泡盛は以下の工程で製造される(Fig. 1-1)。

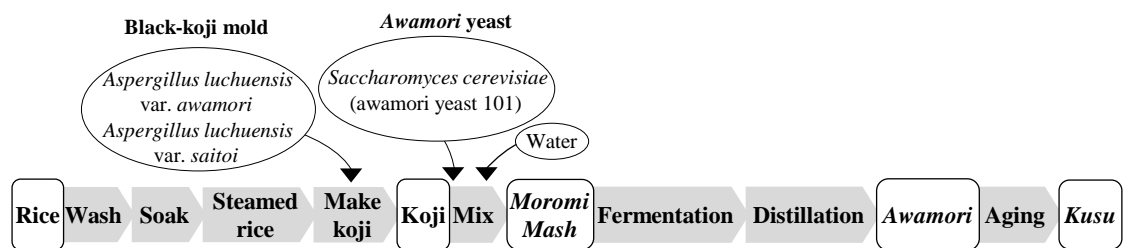


Fig. 1-1. Awamori-brewing process.

はじめに、蒸米に *A. luchuensis* を種付けし製麹を行う。多くの泡盛酒造所では、種麹は *A. luchuensis* var. *awamori* と *A. luchuensis* var. *saitoi* の2種の黒麹菌を混ぜた複菌麹を用いている。製麹は2日間(種付けから42時間程度)行うのが一般的だが、製品によっては3日間または4日間行う場合もあり、これを老麹(ひねこうじ)と呼ぶ。製麹工程においては、米に含まれるデンプンが *A. luchuensis* の分泌する α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼによって分解され、グルコースが生成されるとともに、クエン酸が生成される。*A. luchuensis* var. *awamori* は α -アミラーゼと香りの生成に、*A. luchuensis* var. *saitoi* はグルコアミラーゼとクエン酸生成に優れていることが報告されており(塚原正俊ら, 2011)、複菌麹にすることによってこれらがバランス良く生産・機能すると考えられている。次に、出来上がった麹に水と酵母を混合し、モロミを作る。多くの泡盛酒造所では、酵母は泡盛101号酵母を用いている。*A. luchuensis* の働きによって生成されたグルコースは酵母 *S. cerevisiae* によってエタノールに変換される。また、製麹中に

A. luchuensis によって生成されたクエン酸はモロミ中の pH を下げ、雑菌の汚染を抑制する働きを持つ。このモロミを 2~3 週間発酵させ、最後にモロミを単式蒸留によって蒸留し、得られた蒸留液をろ過、加水し調整したのが泡盛である。泡盛の最大の特徴は、他の本格焼酎が麴を主に酵素源として用い、そこに主原料である芋、麦、または米等を添加する 2 段仕込みなのに対し、泡盛は主原料である米すべてを麴として仕込む全麴仕込である。そして、もう 1 つの大きな特徴は 3 年以上熟成させると芳醇な香味を持った古酒(コース)になることである。

泡盛古酒の香味成分の中でも最も特徴的な香りの 1 つにバニリンがある。バニリンは米細胞壁に含まれるフェルラ酸(FA)に由来する。米細胞壁ヘミセルロース成分であるキシランは主にグルクロノアラビノキシランで、キシロースが β -1,4-結合した主鎖に対しキシロース残基の O-2 位にグルクロン酸残基が、O-3 位にアラビノース残基が結合し、このアラビノース残基の O-5 位に FA がエステル結合している (Fig. 1-2) (Shibuya et al., 1984 ; Oliveira et al., 2019)。

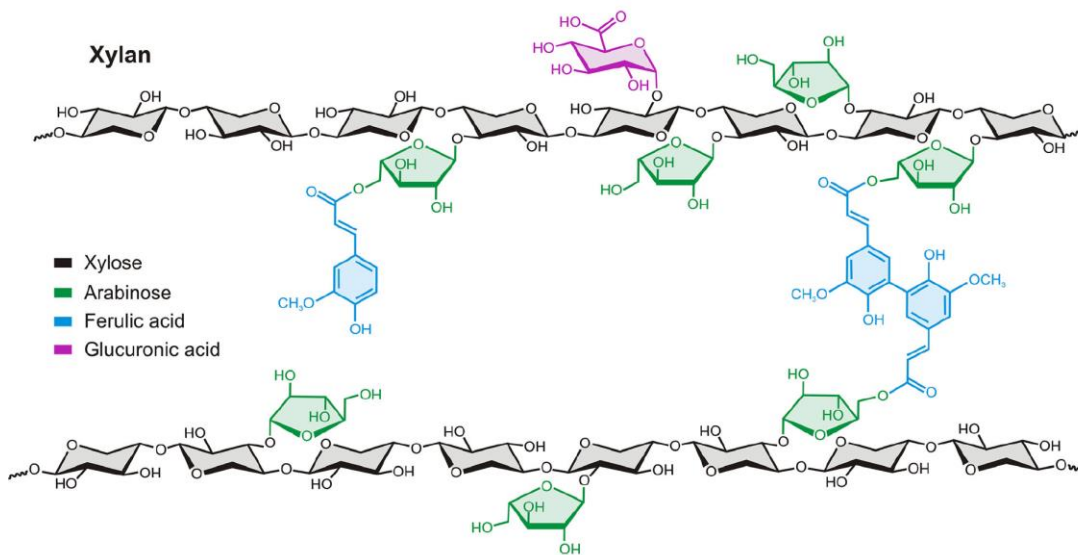


Fig. 1-2. Generalized structure of xylan branched with arabinose, ferulic acid and glucuronic acid.*

*Oliveira et al., Plant. Biotechnol. J., 17: 2225-2227 (2019).

A. luchuensis の分泌するフェルラ酸エステラーゼ (Fae) がこのエステル結合を切って、FA を遊離させることが報告されている (Koseki et al., 1998)。遊離した FA は脱炭酸され、4-ビニルグアヤコール(4-VG)に変換される。その 4-VG が蒸留液に移り、貯蔵中に酸化されてバニリンとなる。これまでに、泡盛醸造中の FA から 4-VG への変換は、蒸留時の熱 (Koseki et al., 1996) や、酵母および醸造中に混入している乳酸菌が持つフェノール酸脱炭酸酵素によるものだと考えられてきた (Fig. 1-3)。

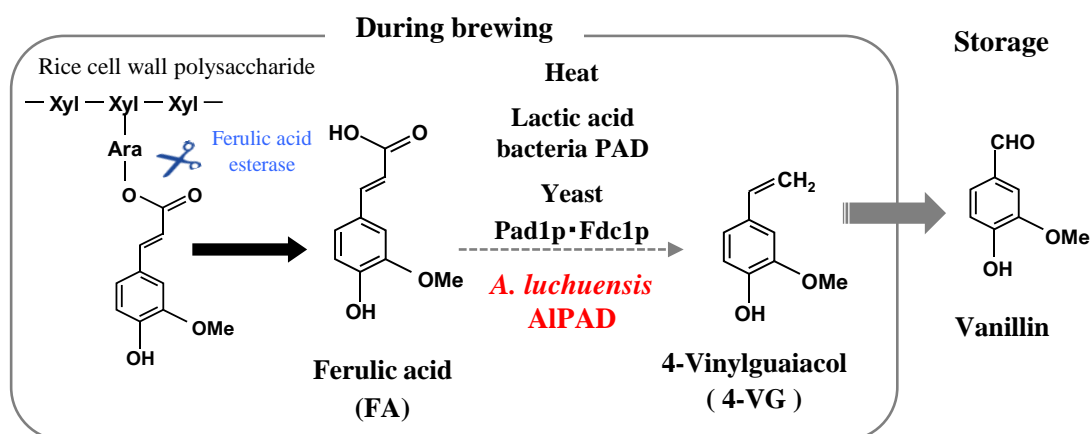


Fig. 1-3. Bioconversion of ferulic acid to 4-vinylguaiacol during *Awamori*-brewing process and vanillin generation during *Awamori*-aging

FA はフェノール酸 (phenol acid; phenolic acid) の 1 種である。フェノール酸は、広義にはフェノール環にカルボン酸またはアクリル酸がついた化合物の総称で、狭義にはフェノール環の 4 位にアクリル酸の付いた化合物 (hydroxycinnamic acid, ヒドロキシケイ皮酸類) の総称である (Fig. 1-4)。本論文では、特に断りの無い限り、フェノール酸を狭義の意味で用いる。フェノール酸類には FA 以外に *p*-クマル酸 (PCA), コーヒー酸 (CA) などがあり、これらの化合物は植物の細胞壁に含まれている。フェノール酸類が脱炭酸されると、対応したビニルフェノール類が生成される (Table 1-1)。酵母および細菌類の一部はフェノール酸脱炭酸酵素を生産するこ

とが報告されている (Mukai et al., 2010 ; Cavin et al., 1997)。



Hydroxybenzoic acids	R ₁	R ₂	Hydroxycinnamic acids	R ₁	R ₂
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	-H	-H	<i>p</i> -Coumaric acid	-H	-H
Gallic acid	-OH	-OH	Caffeic acid	-OH	-H
Vanillic acid	-OCH ₃	-H	Ferulic acid	-OCH ₃	-H
Syringic acid	-OCH ₃	-OCH ₃	Sinapic acid	-OCH ₃	-OCH ₃

Fig. 1-4. Benzoic and cinnamic acid structures.

Table 1-1. Phenolic acids and their decarboxylated products

	Substrates	Products
Phenolic acid		
Ferulic acid (FA)		 4-VG (4-Vinylguaiacol)
<i>p</i>-Coumaric acid (PCA)		 4-VP (4-Vinylphenol)
Caffeic acid (CA)		 4-VC (4-Vinylcatechol)

Mukaiら(2010)は、*S. cerevisiae*において、phenylacrylic acid decarboxylase (*PADI*)と ferulic acid decarboxylase (*FDCI*)の2つがFAの脱炭酸反応に必要なことを報告している。PADI

は近年 flavin prenyltransferase (EC 2.5.1.129)と新たに命名された。この酵素は FDC1 (EC 4.1.1.102)に必要な修飾フラビン補因子プレニル化 FMNH₂ を生成する(White et al., 2015 ; Payne et al., 2015)。言い換えると FDC1 は脱炭酸反応を行う酵素で、PAD1 は FDC1 の補酵素を生産する酵素である。一方、*Bacillus* 属(Zago et al., 1995 ; Cavin et al., 1998 ; Prim et al., 2003)や *Lactobacillus* 属(Cavin et al., 1997 ; Rodríguez et al., 2008 ; Landete et al., 2010), などの細菌類や酵母である *Candida guilliermondii* (Huang et al., 2012a)は、フェノール酸脱炭酸酵素(phenolic acid decarboxylase, PAD)を持ち、FA から 4-VG への変換を触媒することが報告されている。*S. cerevisiae* の Fdc1p(cl00311: UbiD superfamily)と細菌類の PAD(cl01382: PAD superfamily)は、互いに無関係なファミリーである。また、*S. cerevisiae* の Pad1p(cl19190: flavoprotein superfamily)と細菌の PAD は同様の略語にもかかわらず、全く無関係な酵素である(Table 1-2, Fig. 1-5)。

Table 1-2. Comparison between PAD and PAD1-FDC1.

Name	Full name	Superfamily	EC Number	Other Name
PAD	phenolic acid decarboxylase	PAD superfamily (cl01382)	4.1.1.102	phenol acid decarboxylase
PAD1	phenylacrylic acid decarboxylase	flavoprotein superfamily (cl19190)	2.5.1.129	flavin prenyltransferase; UbiX
FDC1	ferulic acid decarboxylase	UbiD superfamily (cl00311)	4.1.1.102	phenacrylate decarboxylase

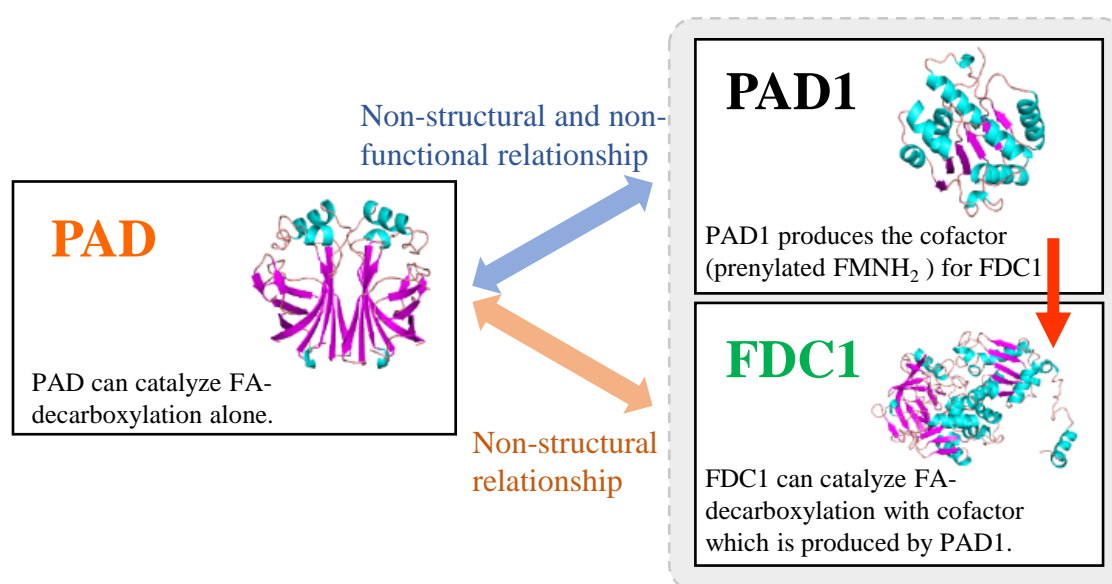


Fig. 1-5. Comparison between PAD and PAD1-FDC1.

これらの知見から、泡盛醸造におけるFAから4-VGへの変換の一部は、酵母の持つPad1p-Fdc1pや混入する細菌類の持つPADによる可能性が議論されていた (Fig. 1-3)。しかし、泡盛101号酵母のFDC1にはナンセンス変異が含まれているためFAを4-VGに変換できないことがわかった (Mukai et al., 1998 ; Mukai et al., 2014)。一方、PADを有する*Lactobacillus*属が泡盛のモロミから分離されている (Watanabe et al., 2009)。しかしながら、モロミから単離されるPADを有する乳酸菌は、泡盛モロミの低pH環境下では増殖が困難であり、菌密度としても極

めて小さく、モロミ中での 4-VG 生産への寄与については疑問が持たれた。

A. luchuensis のゲノム解析 (Futagami et al., 2011; Yamada et al., 2016) により, *S. cerevisiae* の *PADI* および *FDCI* と相同性を有する配列, そして細菌および *C. guilliermondii* の *PAD* と相同性を有する配列がそれぞれ存在することが明らかとなった。*Aspergillus niger* では, *S. cerevisiae* の *PADI* と *FDCI* のホモログが機能して, 桂皮酸を脱炭酸する活性が報告されている (Payne et al., 2015)。一方で, 真菌類における *PAD* superfamily に属する *PAD* の機能解析に関する報告は, 酵母である *C. guilliermondii* (Huang et al., 2012a) と糸状性真菌である *Isaria farinosa* (Linke et al., 2017) の 2 例が報告されている。我々は *A. luchuensis* においても本ファミリーに属する *PAD* が機能する可能性が充分にあると考えた。

本研究では, *PAD* superfamily に属する *A. luchuensis* 由来フェノール酸脱炭酸酵素候補遺伝子 (*alpad*) が, 泡盛醸造における 4-VG 生成の主要因であるという仮説を立て, *alpad* 候補遺伝子が実際に酵素 (AIPAD) として発現し, 泡盛醸造中に FA を 4-VG に変換する活性 (FAD 活性) に寄与しているのかを明らかにすることを目的として行った。

第 2 章では *A. luchuensis* から *pad* 遺伝子をクローニングし, *Escherichia coli* を用いてリコンビナント AIPAD を作成し, FAD 活性の有無とその諸性質を調べることで, 醸造条件下で機能可能かどうか検証した。第 3 章では *A. luchuensis* の菌体で AIPAD が発現・機能しているかを確かめるために, AIPAD の米ぬかによる誘導性および AIPAD が製麴中に発現して FAD 活性に寄与しているのか確認した。同時に米ぬか中の AIPAD 誘導物質の探索を行った。第 4 章では *alpad* 破壊株を用いて泡盛醸造中の 4-VG 生成における AIPAD の寄与率と泡盛醸造中のどのタイミングで 4-VG が生成されているのかについて調べた。これらの結果の総括を第 5 章に記した。本研究により, *A. luchuensis* において AIPAD が発現・機能しており, 泡盛醸造における 4-VG 生産の主要因が本酵素であることを明らかにした。

第2章 リコンビナント AIPAD の酵素化学的諸性質

第1節 緒言

フェルラ酸(FA)や *p*-クマル酸(PCA), コーヒー酸(CA)などのフェノール酸類は植物のリグニンやヘミセルロースなどの細胞壁を構成する化合物の一つである。フェノール酸類は細菌や真菌において抗菌作用があることが知られている(Zaldivar et al., 1999 ; Baranowski et al. 1980)。自然界に存在する一部の酵母や乳酸菌などの微生物はフェノール酸類を脱炭酸する酵素によって FA を無毒化していると考えられている。これまでに, 真菌においては, 一部の *Saccharomyces cerevisiae*(Clausen et al., 1994 ; Mukai et al., 2010)や *Candida guilliermondii* (Huang et al., 2012a)において FA 脱炭酸活性(FAD 活性)を示すことが報告されている。細菌類においては, *Bacillus* 属(Zago et al., 1995 ; Cavin et al., 1998 ; Prim et al., 2003)および *Lactobacillus* 属(Cavin et al., 1997; Rodríguez et al., 2008; Landete et al., 2010)などが FA から 4-ビニルグアヤコール(4-VG)への変換を触媒することができるフェノール酸脱炭酸酵素(phenolic acid decarboxylase: PAD)を有することが報告されている。

フェノール類が脱炭酸された 4-ビニルフェノール類はワインやビール, 清酒や焼酎においてオフ・フレーバーとして知られている。一方, FA が脱炭酸された 4-VG はバニリンの前駆体として知られており, そのバニリンは食品や飲料, 医薬品などの香料として産業的に利用されている。泡盛においても, 原料米細胞壁に由来する FA が脱炭酸され, 得られた 4-VG が貯蔵中に非酵素的酸化によりバニリンに変わり, 泡盛古酒の特徴香となっている。しかしながら, この FA の脱炭酸反応がどのように行われているかは未解明であった。上記の *S. cerevisiae* である泡盛酵母の酵素やモロミに混入した乳酸菌類の生産する PAD によるもの等様々な説がある。

Aspergillus luchuensis mut. *kawachii* のゲノム解析(Futagami et al., 2011)により, 細菌類およ

び *C. guilliermondii* (Huang et al., 2012b) の PAD の配列と相同性を有する配列が存在することが明らかとなった。我々は, *A. luchuensis* が持つ PAD 候補遺伝子が, FA の脱炭酸反応に関わっているという仮説を立てた。まずは, 本候補遺伝子の翻訳産物が FA を脱炭酸し 4-VG に変換できる活性があるかを確かめるために, リコンビナント酵素の調製を試みた。本章では, *A. luchuensis* var. *awamori* ISH1 由来 PAD 遺伝子 (*alpad*) をクローニングし, *Escherichia coli* での発現系を構築し, リコンビナント酵素 (AIPAD) を精製し, その特性を明らかにした。

第 2 節 実験材料と方法

第 1 項 試薬および菌株

FA, CA および 4-VG は和光純薬工業株式会社から購入した。PCA は MP Biomedicals, 4-ビニルフェノール(4-VP)は Sigma-Aldrich から購入した。その他試薬は一般に販売されている特級またはそれに準ずるものを使用した。

第 2 項 菌株および培地

泡盛醸造で主に使われている *A. luchuensis* var. *awamori* ISH1 株 (*A. luchuensis* ISH1) は、有限会社石川種麴店より提供いただいた。1.5% アガロースを含むポテトデキストロース (Becton Dickinson and Company 社製) 培地 (PDA) は *A. luchuensis* ISH1 の分生子を調製するための培地として使用した。Oshoma ら (2005) の米ぬか培地 [0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ および 0.1% Tween 80] を 2 M H_2SO_4 で pH 4.0 に調製した培地は, *alpad* のクローニングに使用する菌体を培養するための培地として使用した。

第 3 項 *alpad* 遺伝子のクローニング

使用したプライマーを Table 2-1 に示す。total RNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen 社製) を用いて, Oshoma ら (2005) の米ぬか培地で 5 日間培養した *A. luchuensis* ISH1 から抽出した。一本鎖の相補的 DNA (cDNA) 合成は, 5 μg のトータル RNA を鋳型にオリゴ (dT) アダプタープライマーおよび SuperScript III One-Step RT-PCR System (Invitrogen 社製) を用いて行った。合成した cDNA は, PCR 増幅のための鋳型として用いた。プライマーは, 北原ら (1974) によって *A. luchuensis* mut. *kawachii* と改に名付けられ, 近年その使用が提案された (Hong et al., 2014),

Aspergillus kawachii IFO 4308 (Futagami et al., 2011) の PAD 候補遺伝子 (AKAW_09369) の配列を基に作成した。PCR は候補遺伝子のオープンリーディングフレーム (ORF) の 5' および 3' 末端に特異的なプライマー P1 および P2 を用いて行った。PCR 産物は pGEM-T vector (Promega 社製) にクローニングし, ABI Prism 3100 Genetic Analysis system (Applied Biosystems 社製) を用いてシーケンスを行った。形質転換により独立に得られた 3 つのコロニーのプラスミドに由来するインサートの塩基配列は同一であった。

Table 2-1. Primers for cDNA cloning.

Primer no. (5' → 3')	
P1	ATGCCAGTCGTTCCCTTCGC
P2	CTATAATGTCGGCCATTCCATG
P3	<u>CATATGCCAGTCGTTCCCTTCGC</u>
P4	<u>GGATCCTATAATGTCGGCCATTCC</u>

*Single underlines and double underlines indicate NdeI and BamHI recognition sites, respectively.

第 4 項 リコンビナント AIPAD の発現および精製

AIPAD cDNA を鋳型として, Table 2-1 に示している *NdeI* 制限酵素部位を含む P3 プライマーおよび *BamHI* 制限酵素部位を含む P4 プライマーを用いて PCR を行った。増幅させた DNA 断片は, *NdeI* および *BamHI* で制限酵素処理を行い, 同酵素で制限酵素処理を行った pET22b 発現用ベクター (メルク社製) にライゲーションした。得られた組み換えプラスミド (pET-AIPAD) を *E. coli* BL21 (DE3) に導入した。形質転換した *E. coli* を 500 mL 容坂口フラスコにアンピシリン (100 μg/mL) 含有ルリア-ベルターニ (LB) 培地 (tryptone, 10g/L; yeast extract, 5g/L; NaCl, 10g/L) 100 mL, 37°C で培養し, 600 nm における吸光値 (A_{600}) が 0.5 になるまで振とう培養を行った。本培養液にイソプロピル β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を終濃度 1

mM になるように添加した後、18°C で 24 時間振とう培養を行った。得られた培養液を 4°C で遠心分離(6,000×g, 15 分)し、菌体を回収した。

AIPAD の精製は、4°C を超えないように行った。菌体は生理食塩水で 2 回洗浄し、菌体湿重量の 7 倍量の 20 mM 2-Morpholinoethanesulfonic acid (MES) 緩衝液(pH 6.0) に懸濁した。菌体を超音波破砕機(VP-15S 型;タイテック社製)を用いて power level 5, 50%duty で 30 秒間破砕, 30 秒間冷却の 10 サイクルで破砕した後、遠心分離(12,000×g, 20 分)により上清を回収した。上清は 20 mM MES 緩衝液(pH 6.0)で平衡化した CM Toyopearl 650 M カラム(3.0 cm × 20.0 cm, 東ソー社製)に直接アプライした。流速は 50 mL/h で行った。得られた非吸着画分を、20 mM MES 緩衝液(pH 6.0)で平衡化した DEAE Sepharose FF カラム(3.0 cm × 20.0 cm, GE Healthcare & Bio Sciences 社製)にアプライした。流速は 50 mL/h で行った。50 mM NaCl を含む MES 緩衝液(pH 6.0) 100 mL で洗浄した後、50 mM から 0.4 M までの直線的塩濃度勾配によりタンパク質を溶出した。活性が確認された画分を回収し、Amicon Ultra-15 遠心フィルターユニット(Millipore 社製)で濃縮するとともに 10 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)で置換し、精製酵素溶液とした。酵素溶液は使用するまで-20°C で保存した。精製リコンビナント酵素は 100 mL 培養液から 10.2 mg 得られた。

第 5 項 N 末端アミノ酸配列解析

N 末端アミノ酸配列は、プロテインシーケンサー(PPSQ-23A 型;島津製作所社製)を用いたエドマン分解法により決定した。

第 6 項 精製リコンビナント AIPAD の分子量測定

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE) は、15% (w/v) のアクリルアミドゲルを用いた Laemmli 法(1970)に従って行った。サンプルはサンプルバッファー

(終濃度 0.1% SDS 含有)および β -メルカプトエタノール(終濃度 5%)と混合した後、3 分間煮沸処理を行い、アプライした。ゲル中のタンパク質の染色にはクマシーブリリアントブルーR250 を用いて行った。サイズマーカーとして PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific 社製)を用いた。

リコンビナント AIPAD の分子量は、Superdex 75 10/300 GL カラム(10×300 mm, GE Healthcare 社製)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって測定した。AKTA prime plus (GE Healthcare 社製)を用いて、0.15 M NaCl を含む 50 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)で平衡化した本カラムにサンプルをアプライすることによってクロマトグラフィーを行った(流速 0.3 mL/min)。サイズマーカーとして bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (44 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa) および cytochrome c (12.4 kDa)を用いた。

第 7 項 PAD 活性の測定

フェノール酸脱炭酸活性(PAD 活性)は、次のように測定した。基質(20 mM)は蒸留水に懸濁し、1 M NaOH で pH 8.0 に調製し、溶解させた水溶液を用いた。0.1 M MES 緩衝液(pH 5.5)を含む 5 mM の基質溶液に、酵素溶液を添加した反応溶液 1 mL を 40°C で保持した。反応溶液に、5 M NaOH を 100 μ L 添加することによって酵素反応を停止させた。反応による生成物の定量は、COSMOSIL 5C₁₈-AR300 (ナカライテスク社製, 0.46 mm × 150 mm)を用いた逆相-高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) により行った。移動相はアセトニトリル/0.05%リン酸 (7:3, v/v), カラム温度は 40°C で。流速は 0.6 mL/min で行った。酵素反応溶液 10 μ L はオートサンプラーによって、上記カラムを装着した Prominence HPLC system (島津製作所社製)にインジェクトされ、カラムクロマトグラフィーによって分離された生成物は SPD-M20A フォトダイオードによって検出された(検出・定量波長は 260 nm)。酵素活性の 1 ユニット(U)は、反応 1 分間当たり 1 μ mol の 4-VG または 4-VP を遊離させる酵素量として定義した。CA の脱炭酸反

応により生成される4-ビニルカテコールは市販されていないため、CAを基質として使用した場合の酵素活性はCAの分解速度として示した。タンパク質濃度はBCAタンパク質アッセイキット(Thermo Fisher Scientific社製)を用いて測定し、bovine serum albuminで作成した検量線に基づき定量した。

第3節 実験結果

第1項 *A. luchuensis* のフェノール酸脱炭酸酵素のクローニングおよびシーケンス解析

米ぬか培地で誘導を行った *A. luchuensis* ISH1 の PAD 候補遺伝子のクローニングは, total RNA から逆転写反応により合成した cDNA を鋳型に, *A. luchuensis* mut. *kawachii* IFO 4308 の PAD 候補遺伝子の配列を基に作製したプライマーを用いた PCR によって行った。得られた cDNA は 516 塩基からなり, 172 アミノ酸残基をコードしていた (Fig. 2-1)。得られた推定アミノ酸配列は, *A. kawachii* IFO 4308 (accession no. GAA91255, AkPAD) および *A. niger* CBS 513.88 (XP_001390366, AnPAD) の推定 PAD と 99% の identity を示した。得られた *A. luchuensis* ISH1 由来 PAD 候補遺伝子を AIPAD (LC369499) とした。各種 PAD とのマルチプルアライメントを Fig. 2-2 に示す。AIPAD と *C. guilliermondii* 由来 PAD (CgPAD, BAL04260) (Huang et al., 2012b) とは 55% の相同性を示し, *Lactobacillus plantarum* 由来 PAD (LpPAD, PDB ID: 2W2A) (Rodríguez et al., 2010) とは 21% と低い相同性を示した (Fig. 2-2)。LpPAD (Rodríguez et al., 2010) の触媒作用に関与する 4 つの残基 (Tyr18, Tyr20, Arg48 および Glu71) は, AIPAD の Tyr23, Tyr25, Arg61 および Glu84 に対応する位置で保存されていた (Fig. 2-2, ○印)。AIPAD の N 末端領域は CgPAD より短く, LpPAD より長かった。C 末端領域は LpPAD より短かった。AIPAD における Asp29 から Lys36 の挿入部分は LpPAD (PDB ID: 2W2A) の 1 番目と 2 番目の β -ストランド間のループ領域と一致している (Fig. 2-3)。さらに, LpPAD における 4 番目の α -ヘリックスと 9 番目の β -ストランド間のループに位置する Tyr123 から Lys128 に対応する領域は, AIPAD において欠失していた。PAD の系統解析の結果, PAD は真菌類において広く存在していることがわかったが, 性質について調べられているのは *Cordyceps farinosa* (*Isaria farinosa*) および *C. guilliermondii* のみであった (Fig. 2-4)。

	10	20	30	40	50	60	
1	ATGCCAGTCGTTCCCTTCGCTGAAAGACACCCCGTTTCGACACCGACATTCGCGACCGTCAT						
1	M P V V P S L K D T P F D T D I R D R H						20
	70	80	90	100	110	120	
	TTGATATACGATTACGCCGCGCAGGACGCGCAAGGCAACCCCGAGAAATGGCGCTATGAA						
21	L I Y D Y A A Q D A Q G N P E K W R Y E						40
	130	140	150	160	170	180	
	ATGTGGTTCTATAACGAGGACCGCATCGTCTATGCCATCCATGGCGGTCCCATGGCCGGC						
41	M W F Y N E D R I V Y A I H G G P M A G						60
	190	200	210	220	230	240	
	CGCAAGAACTTTCAAACGGCCACGTACCAAGTGCATTTCGACCGGGCGAGCTCTGGCAGTGC						
61	R K N F Q T A T Y Q C I R P G E L W Q C						80
	250	260	270	280	290	300	
	AATTGGCTTGAGGAGACCGGTACCATCTGTTTCGCTGGTGTACGACATTCGGCGGAAGCGC						
81	N W L E E T G T I C S L V Y D I P R K R						100
	310	320	330	340	350	360	
	ATCACCACGTTGCTGGGCTTCTCCAAGGGACATTGGGAGGAAGCGGAGGGCGGCTCACGGC						
101	I T T L L G F S K G H W E E A E A A H G						120
	370	380	390	400	410	420	
	GACAAGCGGAATGCGAAGGATCTGGAAGATGGAGGGGTTGGCCGCGATTGGCAAGCAA						
121	D K R N A K D L E R W R G L A A I G K Q						140
	430	440	450	460	470	480	
	ACGGATCGGAAGCTCCTGAGCGAACAAGCAGACATCCTCGAGGATTTCCGAGGCCCTGGT						
141	T D R K L L S E Q A D I L E D F R G P G						160
	490	500	510				
	GATTTGGAGCCGATTGACATGGAATGGCCGACATTA			516			
161	D L E P I D M E W P T L			172			

Fig. 2-1. Nucleotide sequence and the predicted amino acid sequence of *alpad* gene.



Fig. 2-2. Multiple sequence alignment of PADs.

Sequence comparison of *A. kawachii* IFO 4308 (AkPAD; GAA91255), *A. niger* CBS513.88 (AnPAD; XP_001390366), *C. guilliermondii* (CgPAD; BAL04260), and *L. plantarum* CECT 748 (LpPAD; PDB code 2W2A). Identical residues are shown in white with a black background. Similar residues are shown in white with a gray background. Dashes indicate gaps. Possible catalytic residues in the PAD enzyme from *L. plantarum* CECT 748 are indicated as open circles above the AIPAD sequence.

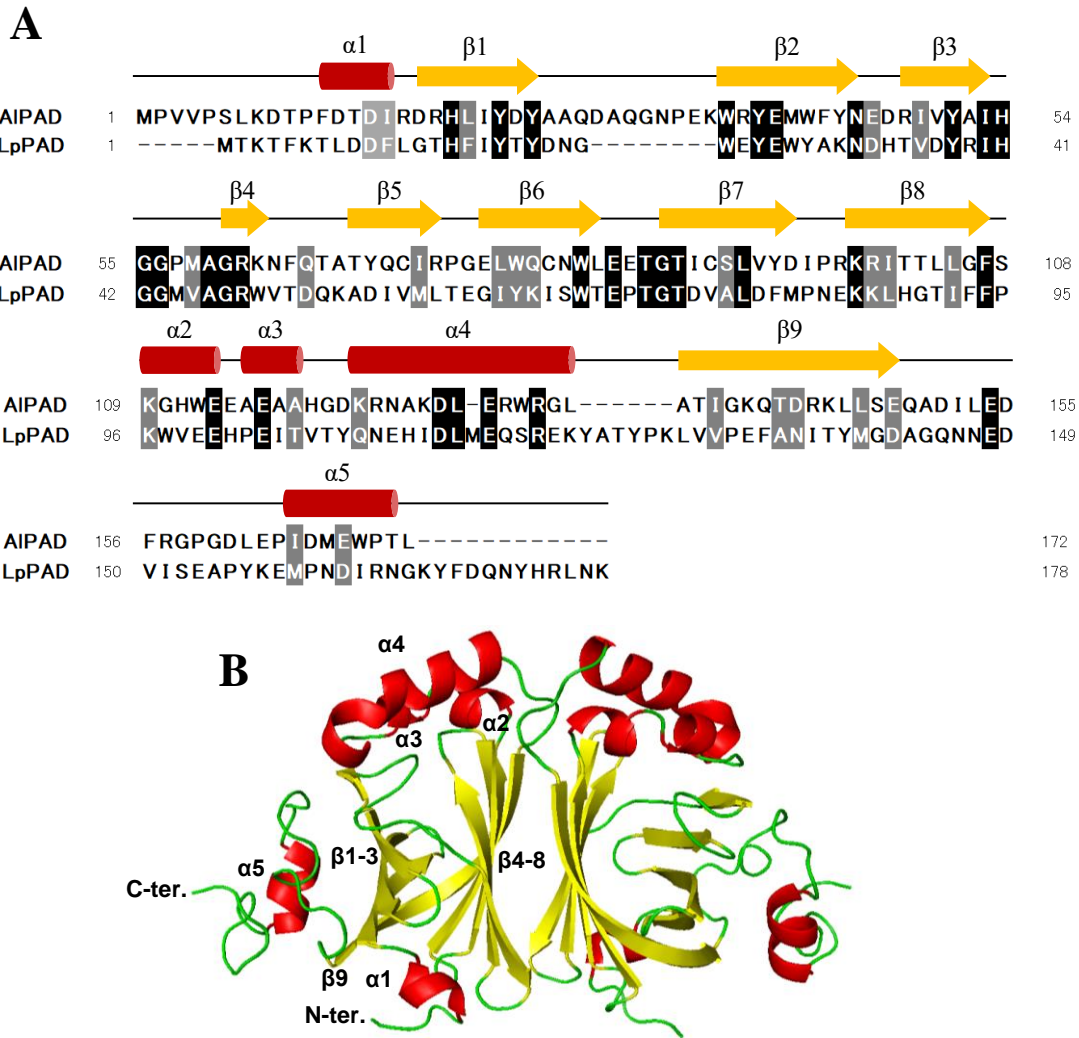


Fig. 2-3. Amino acid sequence alignments of AIPAD and LpPAD, and secondary and tertiary structure of LpPAD.

A. Amino acid sequence alignments of AIPAD and LpPAD. Red boxes and yellow arrows indicate α -helices and β -strands, respectively, in LpPAD. B. Ribbon diagram of dimeric of LpPAD (PDB ID: 2W2A).

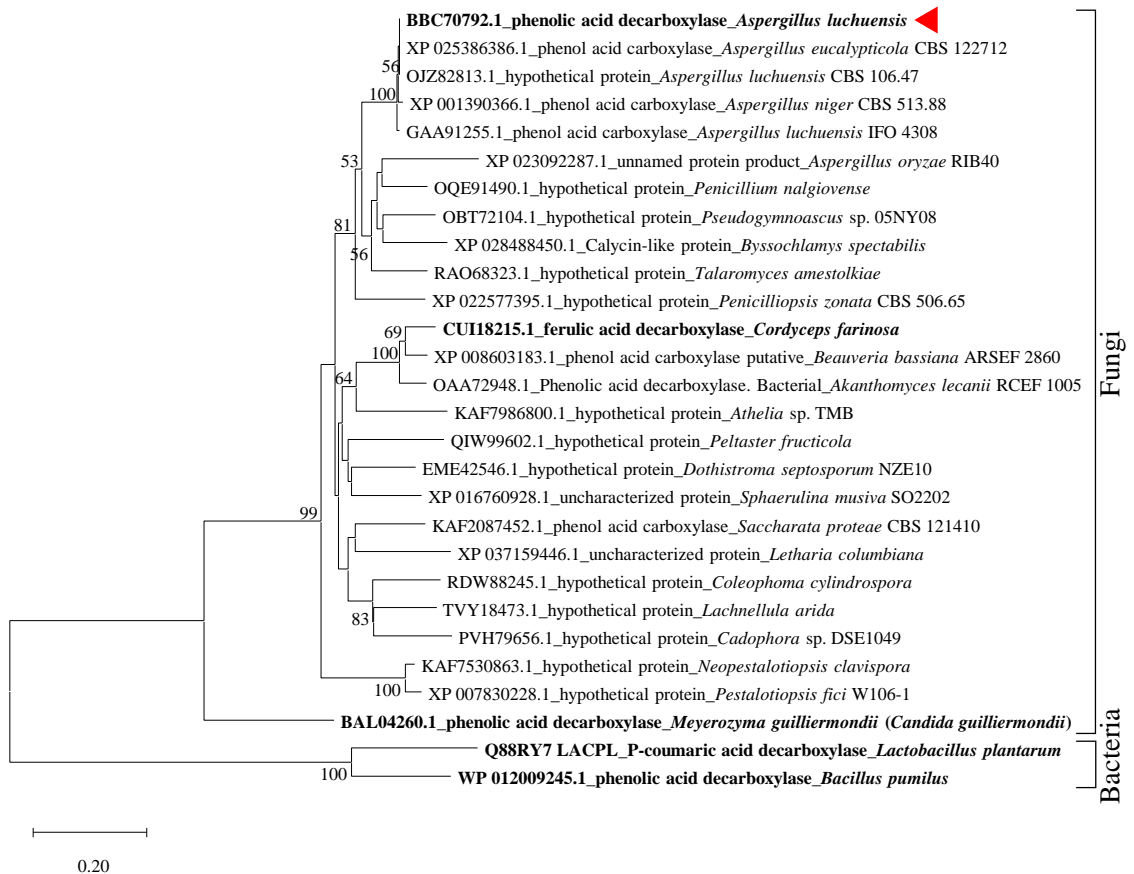


Fig. 2-4. Phylogenetic analysis of PAD.

Bold fonts indicate enzymes that have been characterized. Red arrow indicates AIPAD. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou & Nei, 1987). The optimal tree with the sum of branch length = 4.44 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein, 1985). The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method (Zuckerkanndl & Pauling, 1965) and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. This analysis involved 28 amino acid sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 203 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X [Kumar et al., 2018.]

第2項 AIPADの異種発現と諸性質

AIPADの酵素化学的諸性質を調べるために、AIPADの大腸菌による発現を試みた。リコンビナントAIPADは、陽イオンおよび陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによって均一に精製された(Fig. 2-5 および Table 2-2)。100 mLの培養液から10.2 mgのリコンビナント体が得られ

た。リコンビナントタンパク質の N 末端配列 5 残基はプロテインシーケンサーによって PVVPS であると決定されたことから、リコンビナント AIPAD の N 末端のメチオニン残基は翻訳後に取り除かれていることがわかった。次に、SDS-PAGE を用いて AIPAD の分子サイズを測定したところ、約 19.4 kDa と算出され (Fig. 2-6A)、理論値 (Pro2-Leu172: 19,888 Da) とほぼ一致していることがわかった。精製酵素をゲルカラムクロマトグラフィーに供した結果、約 35.6 kDa と算出されたことから、AIPAD はホモダイマーであることが示唆された (Fig. 2-6B)。FA を基質として用いた場合、AIPAD の最適 pH および最適温度は、約 pH 5.7 および 40°C だった (Fig. 2-7A, C)。AIPAD は pH 4.5 から 9.5 (25°C, 18 時間処理) まで、50°C (pH 6, 1 時間処理) まで安定であった (Fig. 2-7B, D)。

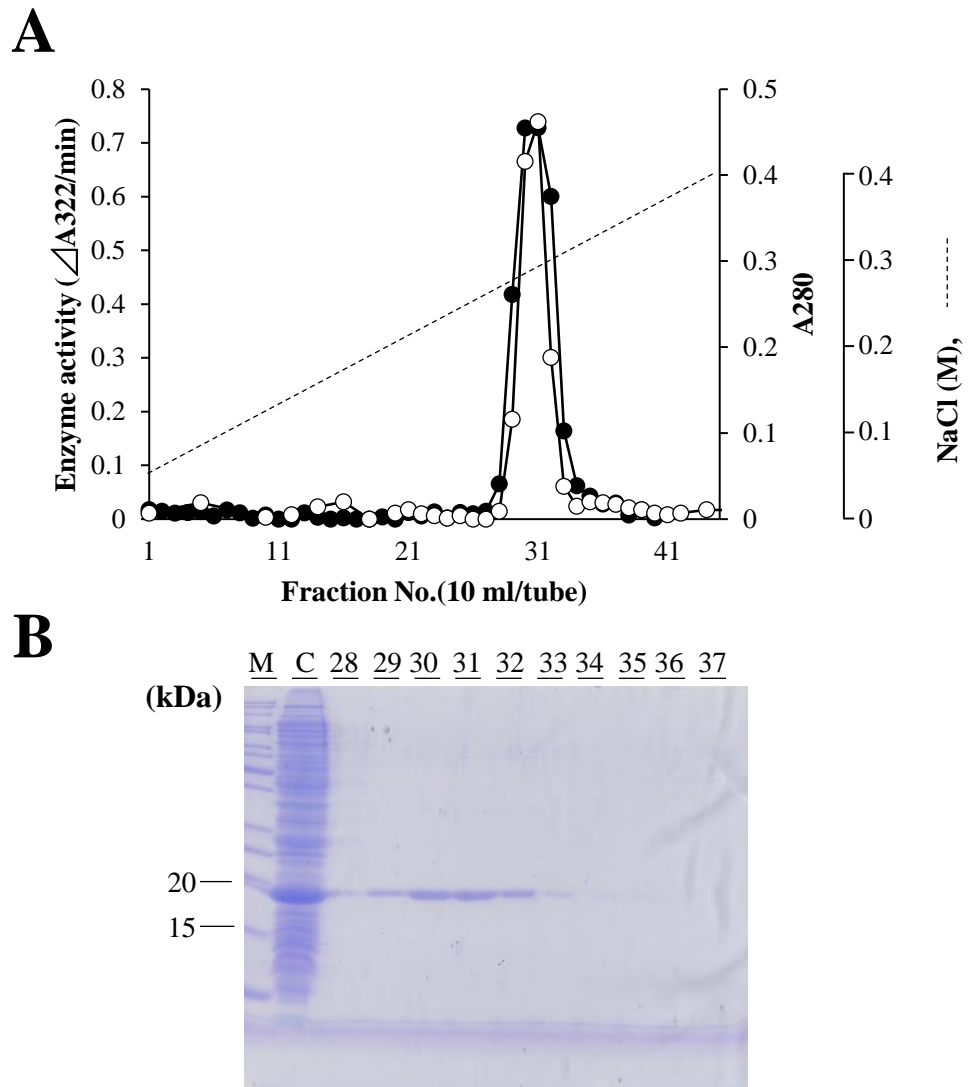


Fig. 2-5. DEAE Sepharose FF column chromatogram (A) and SDS-PAGE (B) of fractions obtained by the chromatography.

(A) Open circles indicate FA decarboxylase activity as decreasing rate at A322 per min, corresponding to convert FA to 4-VG. Closed circles indicate protein concentration as A280. Adsorbed proteins were eluted with a linear gradient of 0.05-0.4 M NaCl (dotted line) in 20 mM MES buffer (pH6.0). (B) Lane M, PageRuler Unstained Protein Ladder; lane C, cell free extract of *E. coli* having expressed recombinant AIPAD; lane 28 to 37 were fraction No. in the chromatography.

Table 2-2. A summary of typical purification of recombinant AIPAD.

Procedure	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Fold
Cell free extract	5.8	80.8	51,297	635	100.0	1.00
CM Toyopearl 650M	38.0	67.3	33,056	491	64.4	0.77
DEAE Sepharose FF	40.0	15.5	30,657	1,974	59.8	3.11
Amicon Ultra-15	4.0	10.2	24,376	2,389	47.5	3.76

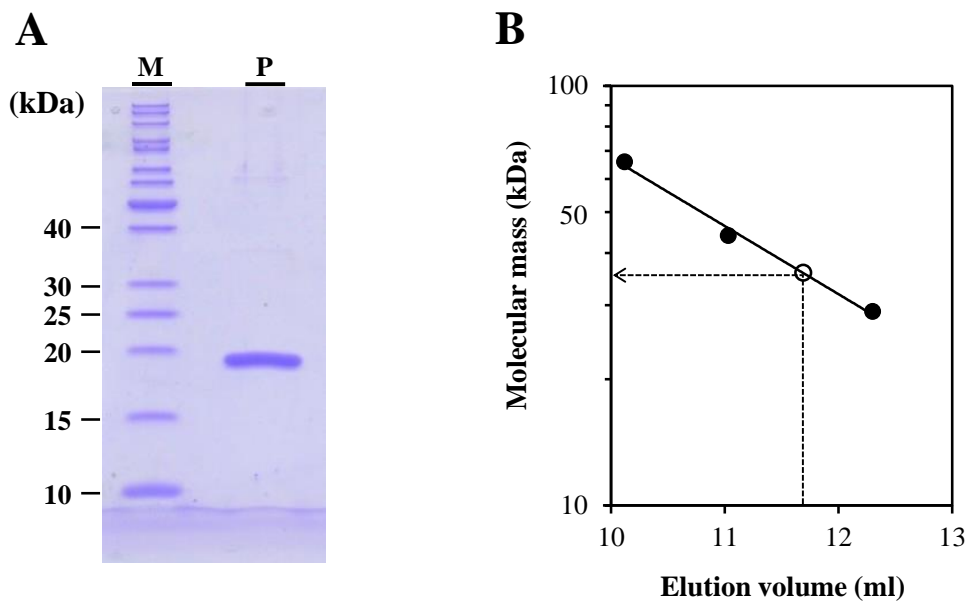


Fig. 2-6. Estimation of the molecular mass of the purified recombinant AIPAD protein.

(A) SDS-PAGE analysis. M and P indicate the size marker standard and the purified recombinant AIPAD gel lanes, respectively. (B) Gel-filtration column chromatography analysis. Size marker proteins (closed circles) and the purified recombinant AIPAD protein (open circle).

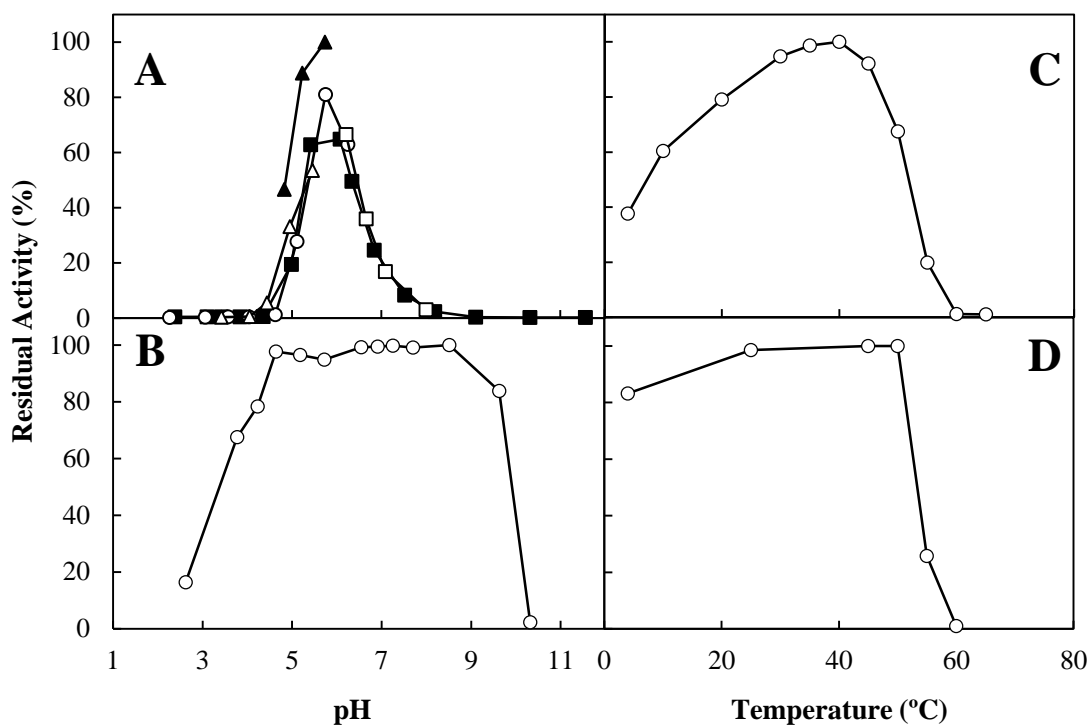


Fig. 2-7. Effect of pH and temperature on the FA decarboxylase activity and stability of AIPAD.

(A) The pH-activity was measured at 40°C using FA as a substrate in various 50 mM buffers including sodium citrate (open circles), sodium acetate (open triangles), MES (filled triangles), sodium phosphate (open squares), and Britton–Robinson universal buffer (filled squares) under different pH conditions. The pH in each reaction mixture was measured at 40°C at the start of the experiments. The average values are expressed as percentages, setting the maximum activity as 100%. (B) The effect of pH on enzyme stability was examined by measuring the residual activity following incubation at 25°C for 18 h under various pH conditions. (C) The effect of temperature on enzyme activity was examined following incubation at various temperatures for 10 min. (D) The effect of temperature on enzyme stability was examined by measuring residual activity in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0, for 1 h following incubation at various temperatures.

第3項 基質特異性およびカイネティックパラメーター

PCA, FA および CA に対するリコンビナント AIPAD のカイネティックパラメーターは、Lineweaver–Burk plot を用いて算出した (Fig. 2-8)。 K_m , k_{cat} および触媒効率 (k_{cat}/K_m) の値から判断すると、今回使用した基質の中では、AIPAD は FA と PCA に対する触媒効率が高く、CA に対しては、これらよりも明らかに低いことが分かった。FA と PCA を比較すると、PCA に対する触媒効率がやや高かった (Table 2-3)。

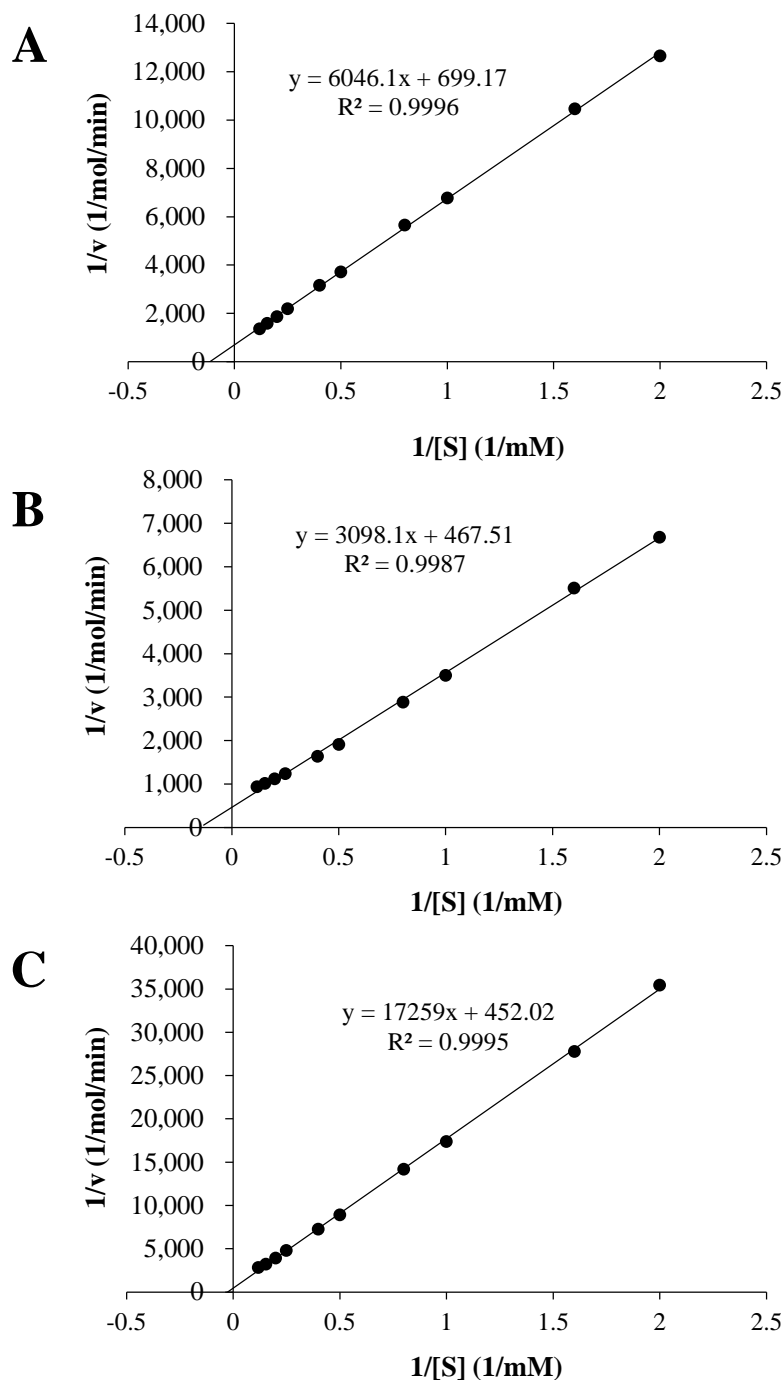


Fig. 2-8. Lineweaver-Burk plot against FA (A), PCA (B), and CA (C) .

(A) Reaction mixtures, contained various concentrations of ferulic acid, 0.1 M MES buffer (pH 5.5) and 31.8 nmol of enzyme protein in a total volume of 1.0 ml, were reacted at 40°C for 10 min. (B) Reaction mixtures, contained various concentrations of *p*-coumaric acid, 0.1 M MES buffer (pH 5.5) and 31.8 nmol of enzyme protein in a total volume of 1.0 ml, were reacted at 40°C for 10 min. (C) Reaction mixtures, contained various concentrations of caffeic acid, 0.1 M MES buffer (pH 5.5) and 254.2 nmol of enzyme protein in a total volume of 1.0 ml, were reacted at 40°C for 10 min.

Table 2-3. Kinetic parameters of AIPAD

Substrates	Kinetic parameter		
	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹) ^a	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
FA	8.65	750	86.8
PCA	6.63	1122	169.3
CA	36.92	140	3.80

^a The values were calculated assuming the theoretical molecular weight as 39,776 (homo dimer)

第4項 活性に対する金属イオンおよび化学試薬の影響

酵素反応はFAを基質として、様々な陽イオン(各1 mM)の存在下で40°C, 10分間反応させた(Table 2-4)。Cu²⁺, Hg²⁺, Fe²⁺およびFe³⁺イオンは完全にまたはほぼ完全に反応を阻害した。Zn²⁺およびAl³⁺イオンはコントロールの反応と比較して、それぞれ約68%および63%酵素活性を阻害した。Na⁺, K⁺, Li⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Co²⁺およびNi²⁺は影響しないまたはわずかな阻害効果しか示さないことがわかった。

化学試薬のAIPADの酵素活性に与える影響はIgarashiら(1998)の方法で調べた。Table 2-5に示すように、酵素活性はジエチルピロカーボネイト(DEPC, 1 mM)および4-クロロ水銀安息香酸(PCMB, 0.5 mM)によって完全に阻害されたが、N-エチルマレイミド(1 mM), ヨード酢酸(0.5 mM), EDTA(1 mM)およびPMSF(1 mM)は、ほぼ影響を与えないことがわかった。N-ブロモスクシイミド(0.1 mM)は39%の阻害を引き起こすことがわかった。

Table 2-4. Effect of metal ion on the enzyme activity.

Irons (1 mM)	Relative activity (%) ^a	
Control	100.0	± 1.08
NaCl	101.0	± 0.11
KCl	100.0	± 0.36
LiCl	99.4	± 0.36
MgSO ₄	97.8	± 1.43
CaCl ₂	97.5	± 1.12
MnCl ₂	96.4	± 1.02
CoCl ₂	96.7	± 0.86
ZnSO ₄	31.9	± 0.79
NiSO ₄	89.7	± 0.88
CuCl ₂	0.0	± 0.00
HgCl ₂	1.3	± 0.01
AlCl ₃	36.7	± 0.45
FeCl ₂	6.5	± 0.28
FeCl ₃	4.0	± 0.02

^a The values are the means of three experiments with SD and shown as the percentages of the activity without additives, which is taken as 100%

Table 2-5. Effects of chemical reagents on the enzyme activity.

Chemical reagents	Concentration (mM)	Relative activity ^a (%)
No addition		100.0 ± 3.08
EDTA	1.0	99.3 ± 2.65
PMSF	1.0	97.6 ± 3.16
DEPC	1.0	89.4 ± 2.19
Iodoacetate	0.5	96.6 ± 5.91
PCMB ^b	0.5	2.4 ± 2.45
<i>N</i> -Ethylmaleimide	1.0	99.7 ± 4.82
<i>N</i> -Bromosuccinimide ^c	0.1	60.7 ± 3.59

^aThe activity was measured after the enzyme had been treated with each chemical reagent for 20 min at the indicated pH and temperature in the suitable buffer. The treatment conditions were 25°C and at pH 6.0 in 10 mM phosphate buffer, and a 0.1 ml aliquot was used for the determination of the residual activity under the standard assay conditions. The values are the means of three experiments with standard deviation (SD) and shown as the percentages of the activity without additives, which is taken as 100%

^bTreated for 20 min at 25°C and at pH 5.0 in 10 mM acetate buffer

^cTreated for 20 min at 4°C and at pH 5.0 in 10 mM acetate buffer

第4節 考察

AIPAD は、酵母である *C. guilliermondii* の PAD と 55%ほどの配列類似性を示した (Fig. 2-2)。AIPAD の配列は、相同性はあまり高くはないが細菌類の PAD の配列と類似していた。Mukaiら(2010)は、フェニルアクリル酸脱炭酸酵素遺伝子 (*PADI*, YDR538W) およびフェルラ酸脱炭酸酵素遺伝子 (*FDCI*, YDR359W) の両方が *S. cerevisiae* においてフェニルアクリル酸 (フェノール酸と同義) の脱炭酸に必須であることを報告している。AIPAD は、*S. cerevisiae* の Pad1p または Fdc1p と相同性を示さない。*A. luchuensis* のゲノムには、*S. cerevisiae* の *PADI* と 62%の相同性を有する推定フェニルアクリル酸脱炭酸酵素 (GAA90863) および *S. cerevisiae* の *FDCI* と 49%の相同性を有する推定 3-オクタプレニル-4-ヒドロキシ安息香酸カルボキシリアーゼ (GAA90861) をコードする遺伝子が存在する。今後、これらの遺伝子が *A. luchuensis* で発現し、FA から 4-VG を生産する機能をもつのかどうか調べる必要がある。

DEPC および *N*-ブロモスクシイミドは、それぞれ強いまたは中程度の阻害を引き起こした。マルチプルアライメントは、いくつかの保存されたヒスチジンおよびトリプトファン残基を持つことがわかった。これらの結果は、ヒスチジンおよびトリプトファン残基が酵素の触媒または安定性に寄与している可能性があることが示唆された。 Cu^{2+} および Hg^{2+} などの重金属イオンや PCMB が AIPAD の活性を完全に阻害したことから、システイン残基の活性への関与が示唆された。一方で、ヨード酢酸および *N*-エチルマレイミドは有意な阻害効果を示さなかったため、システイン残基の触媒作用への寄与は明らかにできなかった。酵母の CgPAD でも同様の結果が得られている (Huang., 2012a)。

末端の長さおよび内部配列に関して PAD 間にいくつかの違いがあるが、内部の挿入領域および欠損領域は LpPAD においてループ領域に位置している。従って、AIPAD, CgPAD および細菌の PAD はコア構造が類似している可能性があることがわかった。リコンビナント

AIPAD はホモダイマーであり, *Brettanomyces anomalus* (Edlin et al., 1998) および *C. guilliermondii* (Huang et al., 2012b) などの酵母や, *Bacillus subtilis* (Cavin et al., 1998), *Bacillus pumilus* (Zago et al., 1998) および *L. plantarum* (Rodríguez et al., 2010) などの細菌の PAD と類似している。系統解析の結果, PAD は真菌類に広く分布していることから, 何かしらの生理的な役割があるのではないかと考えられた。AIPAD は FA, PCA および CA の脱炭酸をそれぞれ 100:150:19 の相対比で触媒していた。*C. guilliermondii*, *B. anomalus*, *B. pumilus* および *L. plantarum* の PAD では, それぞれ FA:PCA:CA=100:95:64, 100:38:32, 100:95:64 および 100:1316:1374 であった (Huang., 2012a; Edlin et al., ; Cavin et al., 1998; Rodríguez et al., 2008)。これらの知見から, AIPAD は CgPAD および細菌類 PAD と同様の触媒機構および類似した三次元構造を有するが, 詳細な基質認識が異なることがわかった。

AIPAD は 4°C のとき, 最適温度 40°C で検出された活性の約 40%の活性を示した。低温環境下でも十分な活性を持つ特徴は, *C. guilliermondii* (Huang et al., 2012a) や *B. pumilus* (Zago et al., 1995) などの他の微生物に由来する PAD にも見られた。また, AIPAD は 50°C で 60 分間加熱後, 100%の活性を保持していた。CgPAD は 50°C で 20 分間インキュベート後の残存活性は 10%未満 (Huang et al., 2012a), *B. pumilus* 由来 PAD は 42°C で 30 分間インキュベートすることによって完全に失活 (Zago et al., 1995), *Bacillus* sp. BP-7 由来 PAD は 50°C で 40 分間インキュベート後の残存活性は 47%であった (Prim et al. 2003)。その他のほとんどの細菌の PAD の熱安定性はさらに低かった。従って, AIPAD 酵素は真菌および細菌の PAD の中で比較的熱安定性があることがわかった。泡盛醸造において製麴中の温度は 35-40°C に保たれている。従って, AIPAD の熱安定性は醸造工程において FA の脱炭酸活性を維持することができることがわかった。

AIPAD は pH 4.0 以下, pH 8.0 以上では FAD 活性を示さなかった。泡盛醸造における麴およびモロミは, *A. luchuensis* が生成するクエン酸によって通常 pH 3.5 程度になっている。従っ

て、AIPAD は泡盛醸造中、細胞外では FAD 活性を触媒することができないことがわかった。AIPAD はシグナル配列が無いことから、細胞質に存在すると考えられる。Hesse ら(2002)は、クエン酸存在下で細胞外 pH を 1.5 から 7.0 の間で変化させたときの *A. niger* の細胞質内が常に pH 7.6 を維持することを報告している。このことから、AIPAD は *A. luchuensis* の細胞質において FAD 活性を発揮することが示唆された。

酵素反応による生成物である 4-VG は、食品、飲料、医薬品および香水に使用されている最も重要な芳香族のフレーバー化合物の一つであるバニリンの前駆体である。従って、AIPAD のような中温性酵素は、広い pH および温度範囲で活性が安定しており、産業利用に有益である可能性があると考えられた。

第3章 黒麹菌における AIPAD の発現・機能解析および誘導物質の探索

第1節 緒言

第2章で示した通り、大腸菌で生産されたリコンビナント AIPAD は、FA を脱炭酸して 4-VG に変換する触媒活性を有していた。しかしながら、本酵素遺伝子が *Aspergillus luchuensis* の菌体やそれを生やした麴で発現・機能しているかは明らかでなかった。

麴の原料である米は主に胚乳、胚芽およびぬかの 3 つの構造から成り立っている。胚乳とぬかに含まれている炭水化物は、それぞれ約 70%および 50%含まれている (Fig. 3-1A, B)。胚乳の炭水化物はほぼデンプンで構成されており、それに対してぬかは細胞壁成分が多く含むことが知られている (Fig. 3-1C, D)。精米歩合が小さくなるほど、タンパク質や脂質、細胞壁成分の含有量が減少していく。

製麴中の *A. luchuensis* は、栄養源を求めて米の表面から中心に向かって菌糸先端から様々な分解酵素を分泌しながら菌糸を伸ばしていく。米中のタンパク質を資化するために種々のプロテアーゼを生産し、デンプンを資化するために大量の α -アミラーゼやグルコアミラーゼを分泌する。その他にも米細胞壁の主成分であるセルロースやキシランを分解するために、セルラーゼやキシラナーゼを分泌する。イネ目の主要なキシランはグルクロノアラビノキシランで構成されており (Fig. 1-2)、このアラビノース残基の O-5 位に FA がエステル結合しており (Shibuya et al., 1984)、*A. luchuensis* の分泌するフェルラ酸エステラーゼ (Fae) がこのエステル結合を切って、FA を遊離させることが知られている (Koseki, et al., 1998)。AIPAD 遺伝子の発現は基質である遊離 FA によって誘導されることが予測された。一方、*Aspergillus nidulans* のエンドキシラナーゼをコードする遺伝子 (*xlnA*) の発現がキシロースによって誘導されること (Orejas et al., 1999)、*Aspergillus niger* のフェルロイルエステラーゼをコードする遺伝子 (*faeA*)

の発現がキシロースと FA によって誘導されることが報告されている (de Vries et al., 1994)。これらのことから, AIPAD 遺伝子の発現は FA だけで無く, 他の米細胞壁成分によっても誘導される可能性がある (Fig. 3-2)。

本章では, AIPAD が *A. luchuensis* の菌体で発現・機能しているかを確かめるために, AIPAD の FA および細胞壁成分を多く含む米ぬかによる誘導性を, 静止菌体反応によって調べた。次に, 米ぬかに含まれる誘導物質の探索を行った。また, 実際に AIPAD が製麴中に発現して FAD 活性に寄与しているのかを調べるために, 細胞壁成分を多く含む二分搗き玄米を用いて製麴を行い, 製麴時間毎に FAD 活性および AIPAD 量の定量を行った。

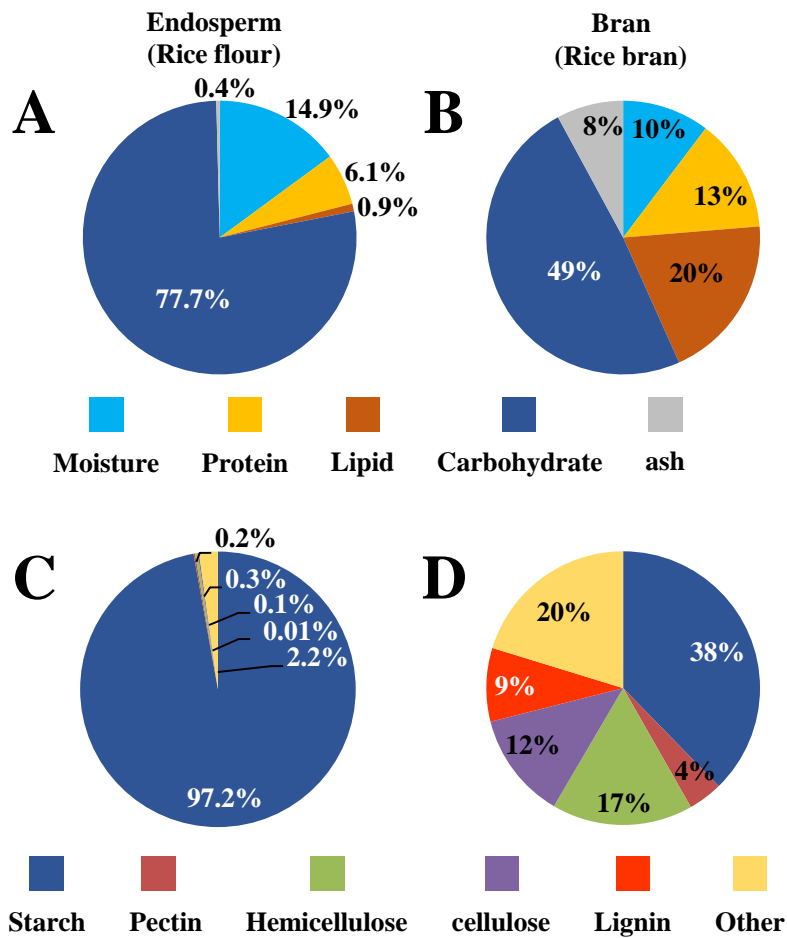


Fig. 3-1. General ingredients of bran and endosperm, and component ratio of starch and cell wall components in the carbohydrates.

A and B were created according to Food Composition Database (<https://foodb.mext.go.jp>). C and D were created according to the data described in “Comparative studies on cell wall preparations from rice bran, germ, and endosperm” (Shibuya et al. 1985).

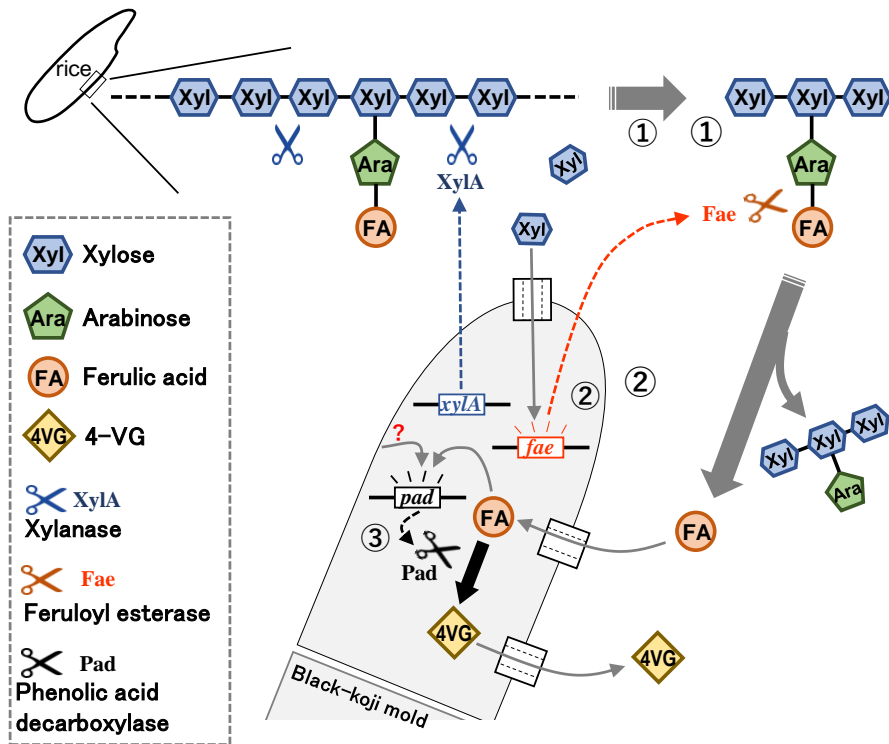


Fig. 3-2. Estimated pathway for 4-VG production from rice cell wall.

第2節 実験方法

第1項 材料および試薬

ジャポニカ米(精白米)とその米ぬかは, RICE SHOP 舞姫で購入した鹿児島県産ヒノヒカリを使用した。米ぬかは篩(IIDASEISAKUSHO 社製)を用いて 149 μm 以下の粒子径のものを用いた。ジャポニカ米の精白米はクダッカー(SCM-50 型, SIBATA 社製)を用いて粉碎し, 米ぬかと同様に 149 μm 以下の粒子径のものを米粉として用いた。

FA 脱炭酸活性(FAD 活性)の誘導試験には, Oshoma ら(2005)の米ぬか培地を参考に, 2 M H_2SO_4 で pH 4.0 に調製した基礎培地[0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% KH_2PO_4 , 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ および 0.001% Tween 80]を用いた。転写誘導試験には, 最少(MM)培地(0.6% NaNO_3 , 0.15% KH_2PO_4 , 0.05% KCl , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1% グルコースおよび 0.2% Hutner's trace elements)を 5 M KOH で pH 5.5 に調製した培地を用いた。

抗 AIPAD ウサギ抗体は(株)医学生物研究所に作成を委託した。2 次抗体は Jackson Immuno Reseach 社製のペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体を用いた。その他試薬は一般に販売されている特級またはそれに準ずる試薬を使用した。

第2項 静止菌体反応

FA (1 mM), 米ぬか(1%)および米粉(1%)は誘導物質候補として用いた。グルコース(2%)はコントロールとして用いた。菌体は 1 L 容三角フラスコに 100 mL の基礎培地を用いて 30°C, 5 日間, 振とう培養した。培養菌体はブフナーろ過器を用いてろ紙で菌体を回収し, 生理食塩水を用いて洗浄した。洗浄後, 水分を取り除くためにろ紙を用いて回収し, FAD 活性を検出するための静止菌体反応に用いた。4 mM FA を含む生理食塩水を菌体湿重量に対し 10 倍量(v/w)添加し, その混合液を静置, 30°C で保温した。上清を 0, 3, 12, 24 および 36 時間後に

回収し、第2章 第2節 第7項と同様の方法で4-VGを定量した。

第3項 米および米ぬか中のFAの定量

フェルラ酸の定量は Shibuya (1984) の方法に従って行った。白米または米ぬか(それぞれ 0.5 g)はマルチビーズショッカー(安井機器社製)を用いて 3,000 rpm, 30 秒間メタルコーンを用いて数回破碎した。破碎により得られた粉末 0.1 g に対し 5 mL の 0.5 M NaOH を加えて、60°C, 90 分間温置した。次に、1.5 mL の 6 M HCl を混合液に添加し、攪拌した後 0.8 mL の 1-ブタノールを添加した。混合液を激しくボルテックスした後、混合液を遠心分離(3,000×g, 10 分, 25°C)した。有機相を回収し、他のチューブに移した。残った水相に、1-ブタノール(0.3 mL)を添加し、その混合液を上記と同様の条件でボルテックスおよび遠心分離を行い、有機相を回収した。得られた有機相は先に回収していた有機相と混合し、FA 抽出サンプルとした。

サンプル溶液中のFA量は、第2章 第2節 第7項と同じカラムとHPLC機器を用いて、次に示す条件で定量した。溶出は溶液 A(50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液, pH4.0)および溶液 B(50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液, pH 4.0/メタノール, 1:9, v/v)のグラジエントで、流速は 0.6 mL/min, カラム温度は 40°Cで行った。B 溶液 15%で 20 分間平衡化を行ったカラムに対し、サンプル溶液 10 μL をオートサンプラーによってインジェクトした後、B 溶液 35 分間で 15 から 100%のリニアグラジエントで分離を行った。FA の検出は 322 nm で行った。

第4項 米粉およびグルコースのFAD活性への影響

上記第1項に示す基礎培地に終濃度 0.5 mM FA と 1 または 0.1%の米粉またはグルコースをそれぞれ添加した培地で培養した菌体を用いて、上記第2項と同様の方法で静止菌体反応を行った。

第5項 麴の調製

二分搗き玄米(ジャポニカ)1 kg を水に6時間浸漬した。次に水切りを行い、30分間蒸煮した。40°Cまで冷却した後、*A. luchuensis* ISH1の種麴を混合した。製麴中の温度は、0~24時間は38°C、24~30時間は36°C、30~68時間は34°Cで行った。製麴開始から30、35、43、46、56および68時間後に麴の一部を回収した。麴を液体窒素で冷凍した後、マルチビーズショッカー(安井機器)を用いて、2,000 rpm、30秒間、メタルコーンを用いて数回破碎した。破碎する度に、液体窒素で麴とメタルコーンを含むチューブ全体を冷却し、凍結状態を維持した。破碎により得られた麴の粉末を2倍量(液量/麴の粉末の重量)の抽出緩衝液(0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF)と混合し、4°Cで1時間抽出を行った。次に、混合液を遠心分離(12,000×g, 10分, 4°C)し、その上清を無細胞抽出液(CFE)として用いた。CFEはFAD活性試験およびウエスタンブロッティングを用いたAIPADの定量に使用した。

第6項 麴中の菌体量の定量

1) 米麴中の菌糸体は、藤井らの方法(1992)を用いて、菌糸体の細胞壁のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)の量として定量した。約5gの米麴を100°Cのオーブンで1時間乾燥させ、メタルコーンとマルチビーズショッカーを用いて粉碎した。粉碎した麴(0.1 g)を50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0) 1 mLで3回洗浄し、懸濁液を10,000×g、10分間遠心分離した。ペレットを1 mg/mLのYatalase(Takara Bio社製)を含む1 mLの50 mM リン酸ナトリウム緩衝液に再懸濁し、37°Cで1時間インキュベートした。次に10,000×g、10分間遠心分離を行い、上清に含まれるGlcNAcの量を次に示すReissigら(1955)の方法によって測定した。

2) Reissig法によるGlcNAcの定量

遊離したGlcNAcをReissig法で測定した。上記第6項で調整した上清200 μLに0.8 M 四

ホウ酸カリウム水溶液を 40 μ L 混合し、3 分間煮沸後、常温まで冷却した。次に *p*DMAB 試薬 1.2 mL を混合し、37°C で 20 分間保温し発色させた。その後、常温まで冷却し 585 nm の吸光度測定し、GlcNAc の量を定量した。*p*DMAB 試薬は *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド (*p*DMAB) 10 g を 10 N HCl : 氷酢酸 = 12.5 : 87.5 (v/v) の溶液 100 mL に溶解して冷蔵保存したものを、使用直前に氷酢酸で 10 倍希釈したものを用いた。検量線は、0.039-125 μ g/mL の濃度の GlcNAc を用いて作成した。サンプルは検量線内に収まるように適宜希釈した。

第 7 項 ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは以下の手順で行った。タンパク質サンプルを SDS-PAGE によって分離した後、Kyhse-Andersen らのバッファーシステム(1984)を用いてポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレンにエレクトロブロッティングした。ブロッティングは EzFastBlot を用いて添付のプロトコールに従って行った。電流は 6 mA/cm²、通電時間は 7 分で行った。ブロッティング後、PBS で軽くすすぎを行い、5%スキムミルク(PBS 溶液)を用いて室温で 1 時間ブロッッキングを行った。次に、T-PBS(0.05 % Tween20 含有 PBS)で洗浄後、1 次抗体(ポリクローナル抗 AIPAD 抗体)を Can Get Signal(TOYOBO 社製)の Solution 1 で 2,000 倍希釈し、1 時間室温で反応させた。次に T-PBS で洗浄後、二次抗体(ポリクローナル抗 AIPAD 抗体)を Can Get Signal(TOYOBO 社製)の Solution 2 で 5,000 倍希釈し、1 時間室温で反応させた。バンドは Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratorie 社製)を化学発光試薬として使用し、ImageQuant LAS 4000 mini-luminescence image analyzer (GE Helthcare 社製)を用いて可視化した。ウェスタンブロッティングによるタンパク質のバンドの化学発光強度は AlphaView Software (ProteinSimple 社製)を用いて定量した。

第 8 項 米ぬか熱水抽出物で培養した菌体による FAD 活性測定

蒸留水、2 M H₂SO₄ で pH 4 に調製した蒸留水、および基礎培地(第 1 項参照)にそれぞれ 1%米ぬかを添加し、オートクレーブにて 121°C、15 分で熱水抽出したものを、それぞれ水抽出物、pH 4 抽出物および基礎培地抽出物とした。各抽出物は 12,000×g、5 分、25°C で遠心分離を行い、得られた上清をろ紙(No. 2, ADVANTEC 社製)を用いてブフナーろ過器により吸引・ろ過した。ろ液を 12,000×g、5 分、25°C で遠心分離を行い得られた上清を 0.45 μm フィルター(セルロース混合エステル)で吸引ろ過した。そのろ液をクリーンベンチ内で 0.22 μm フィルター(ポリエーテルスルホン)でろ過滅菌し、乾熱滅菌した 1 L 容三角フラスコに 100 mL 入れた。また、比較として基礎培地に 1%米ぬかを添加し、オートクレーブ(121°C、15 分)した 1%米ぬか含有基礎培地を作成した。各抽出液を培地として使用し、上記第 2 項と同様の方法で培養および静止菌体反応を行った。

第 9 項 米ぬか熱水抽出物中の AIPAD 誘導物質の精製

2 M H₂SO₄ で pH 4 に調製した蒸留水 1 L に米ぬか 1%を添加し、オートクレーブにて 121°C、15 分で熱水抽出した。得られた熱水抽出物を透析チューブ(14,000 カット)に入れ、2 L の蒸留水で透析を一昼夜行い、透析外液を回収した。透析内液は透析チューブごと、もう一度 2 L の蒸留水で透析を一昼夜行い、透析外液を回収し、上記の透析外液と混合した。得られた透析外液 4 L をエバポレーターにて 660 mL まで濃縮したものを低分子画分とした。次に、蒸留水で平衡化した DIAION HP20(3×20 cm, Supelco 社製)に低分子画分 500 mL を流速 23 mL/min で流した。低分子画分を DIAION HP20 に添加後、蒸留水を 500 mL 添加した。始めの 50 mL を除く 1 L の DIAION 非吸着画分を得た。次に、蒸留水で平衡化した Hi-Flash column ODS-L(26×100 mm, 山善社製)に流速 5 mL/min で DIAION 非吸着画分 800 mL を添加し、その後、蒸留水 800 mL を添加した。始めの 15 mL を除く ODS 非吸着画分 1.6 L を

得た。次に、得られた ODS 非吸着画分 1.6 L をエバポレーターを用いて 50 mL まで濃縮した。次に、70%アセトニトリルで平衡化した TSKgel Amide-80 (21.5×300 mm, 東ソー社製) に流速 5 mL/min で濃縮した ODS 非吸着画分を 2.4 mL アプライし、フラクションコレクターを用いて 25 mL ずつ分画し、始めの 25 mL のフラクションを除く 11 本を採取した。これを繰り返し、各フラクションをエバポレーターを用いて乾固し、50 mL の蒸留水に溶かし、2 M H₂SO₄ で pH 4 に調製した後、121°C、15 分間オートクレーブしたものを培地として用いた。各フラクションの FA の脱炭酸反応の誘導活性 (FAD 誘導活性) の測定は、上記の第 2 項と同様の方法で静止菌体反応により行った。

第 10 項 フェノール酸類の検出

上記の第 9 項の TSKgel Amide-80 カラムから得られた各フラクション 100 μL に対し 5 mL の 0.5 M NaOH を加え、上記第 3 項と同様の方法で、各フラクションに含まれるフェノール酸類 (PCA および FA) の検出を行った。

第 11 項 HPAEC-PAD を用いた単糖の分析

カラムは CarboPac PA1 (4×250 mm, サーモフィッシャー社製)、ガードカラムは CarboPac PA1 (4×50 mm, サーモフィッシャー社製) を用いた。溶離液 A は超純水、溶離液 B は 0.4 M NaOH 溶液、溶離液 C には 0.5 M 酢酸ナトリウム溶液を用いた。溶離液 A に対して 3.5% の溶離液 B で平衡化したカラムに対し、サンプルを 25 μL をアプライした。グラジエントプログラムは次のように設定した。0-12.5 分は溶離液 B 3.5% でアイソクラティック、12.5-13.2 分は溶離液 B 3.5-6% でリニアグラジエント、13.2-25 分は溶離液 B 6-25%、溶離液 C 0-50% でリニアグラジエント、25-31.25 分は溶離液 B 5%、溶離液 C 50% でアイソクラティックとした。流速は 1 mL/min、カラム温度は 30°C で行った。スタンダードとして、各単糖 0.1 mM 溶液を用いた。

第 12 項 ESI-MS 分析

ESI-MS 分析は、ACQUITY UPLC H-Class システム(ウォーターズ社製)を用いて、インフュージョンで行った。溶媒は 2-プロパノールに 0.2 μm PTFE フィルター済みの酢酸アンモニウム溶液を終濃度 50 mM, 氷酢酸を 0.05%になるように添加した。スタンダードとしてグルコースとイソマルトースをそれぞれ終濃度 0.1 mM になるように溶媒に添加したものをを用いた。サンプルは溶媒 990 μL に 10 μL 添加して分析を行った。分析条件は ESI ポジティブモードでイオン化した。

第 13 項 TLC による糖の検出

TLC はメルク社製の TLC アルミニウムシート(シリカゲル 60)を用いた。TLC の下から 1 cm のところに 5 mm 間隔で各種標準試薬を最終的に約 10 ng になるように 1 μL ずつスポットした。サンプルは 10 μL を 1 μL ずつスポットした。1 μL スポットするごとにドライヤーを用いて乾かした。その後、展開溶媒[1-ブタノール:2-プロパノール:蒸留水=10:5:4(v/v/v)]を充滿させた容器に TLC シートを入れ、約 90 分間展開させた。展開後、ドライヤーを用いて乾かした。この操作を 3 回繰り返した。次に、TLC を乾かしてからジフェニルアミン-アニリン溶液(ジフェニルアミン 0.2 g, アニリン 200 μL , アセトン 10 mL, リン酸 1 mL)を噴霧し、ドライヤーを用いて乾かし、その後ホットプレート上で 180°C で発色するまで加熱した。続いて、非還元糖を検出するために、発色試薬(メタノール:硫酸=50:1)を表の面に噴霧し、上記と同様に発色させた

第 14 項 HPAEC-PAD を用いたグルコース、フルクトースおよびスクロースの定量

カラムは上記第 11 項と同様のカラムを用いた。溶離液 A は超純水、溶離液 B は 0.4 M NaOH 溶液を用いた。分離は溶離液 A に対して 37.5%の溶離液 B を用いたアイソクラティックモード、流速 1 mL/min, カラム温度 30°C で行い、サンプルは 25 μ L 注入した。

第 15 項 フルクトースおよびスクロース培養菌体による静止菌体反応試験

上記第 1 項に示す基礎培地に終濃度 0.5 mM のフルクトースおよびスクロースを添加した基礎培地で培養した菌体を用いて、上記第 2 項と同様の方法で静止菌体反応を行った。

第 16 項 転写誘導試験

菌体は、 1×10^6 個の分生子を 1 L 容三角フラスコに 100 mL の MM 培地に添加し、30°C, 16 時間、振とう(100 rpm)により培養した菌体を転写誘導試験に用いた。培養菌体はブフナーろ過器を用いてミラクロス(ポアサイズ 22-25 μ m)で菌体を回収し、グルコースが入っていない MM 培地を用いて洗浄した。洗浄後、1.5 mM FA 含有 MM 培地(Glc 抜き) 100 mL に菌体を添加し、30°C で 1, 3, 4 および 6 時間振とう(100 rpm)した。菌体を上記と同様の方法で回収し、液体窒素で冷凍後、-70°C で保存した。冷凍した菌体は乳鉢と乳棒を用いて液体窒素存在下ですり潰した。粉末にした菌体から SV Total RNA Isolation System (Promega 社製)のキットを用い、キットのプロトコールに従い、RNA を抽出した。cDNA の合成は、100 ng の total RNA を鋳型に SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Fisher 社)を用いて行った。合成した cDNA を鋳型に定量 PCR (qPCR)を行った。qPCR は Bright Green 2 \times qPCR ROE (Applied Biological Materials 社製)を用いてリアルタイム PCR システム (Step One Plus 型, Applied Biosystem 社製)にて定量した。qPCR に使用したプライマーを Table 3-1 に示す。検量線に用いた鋳型 (*actin* および *alpad*) は $10^2 \sim 10^8$ コピー/ μ L になるように調製し、cDNA は $10^1 \sim 10^4$ 倍

希釈したものを用いて、絶対定量法により転写量を測定した。転写量の補正はアクチンを用いて行った。

Table 3-1. Sequence of primer

Primer	Sequence(5' to 3')
actin_F	GGTATGGGTCAGAAGGACTC
actin_R	CTCCATGTCATCCCAGTTCG
AIPAD_F	ATCCGTTTGCTTGCCAATCG
AIPAD_R	AAGGGACATTGGGAGGAAGC

第3節 実験結果

第1項 AIPAD の誘導性試験

AIPAD の誘導性を調べるために、最初に YPD や Czapek-Dox broth などのいくつかの複合培地に 1 mM FA を添加し、得られた培養菌体で FAD 活性を測定したところ、ほとんど検出されなかった。次に、硫酸アンモニウムなどの栄養素と少量のミネラルに米ぬかを添加した米ぬか基礎培地を使用した(Oshoma et al., 2005)。米ぬかには FA を含むヘミセルロースおよびリグニン化合物が豊富に含まれており、これらは PAD の基質前駆体および基質であるため、AIPAD の誘導物質となることが期待された。予備実験では、Oshoma らの米ぬか培地で培養した菌体は強い FAD 活性を示した。よって、この培地を参考に調製した基礎培地に 1%米ぬか、1%米粉、1 mM FA または 2%グルコースを含む培地を調製し、誘導実験を行った(Fig. 3-3)。その結果、1%米ぬかで培養した菌体の FAD 活性は最も高かった。1 mMFA においては FAD 活性を誘導したが、1%米ぬかよりも低かった。対照的に、1%米粉と 2%グルコースでは、ほとんど FAD 活性が検出されなかった。また、FAD 活性(4-VG 生産量)とウエスタンブロッティングで測定した AIPAD の量に相関があった(Fig. 3-3B)。従って、*A. luchuensis* ISH1 の誘導された FAD 活性は AIPAD の発現によるものであることが示唆された。次に、米ぬかによる AIPAD の誘導性が、米ぬかに含まれる FA 含有量に依存していると考えられたため、米ぬかと米粉の FA 量を定量した。この実験で使用した米ぬかおよび米粉 100 g あたりに含まれる FA 量は、それぞれ 840 mg および 25 mg であった。よって、米ぬかおよび米粉含有基礎培地中に含まれる FA 濃度が、それぞれ 0.43 mM および 0.01 mM 相当であることがわかった。これらの結果は、FA が AIPAD の誘導因子の 1 つであることを示唆した。同時に、1 mM FA よりも 0.43 mM FA を含む 1%米ぬかの方が誘導性が高いことが分かり、米ぬか中には FA 以外に AIPAD を誘導する物質が含まれていることが示唆された。

次に、FA 含有基礎培地にグルコースまたは米粉を添加し、FAD 活性を測定した (Fig. 3-4)。その結果、FAD 活性はグルコースおよび米粉により抑制された。また、グルコースよりも米粉の方が抑制が強いことが確認された。

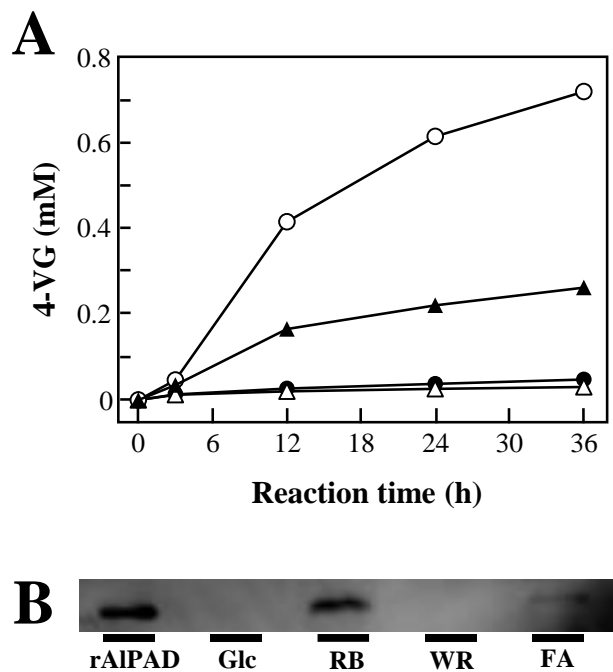


Fig. 3-3. Bioconversion of FA to 4-VG in resting cells of *A. luchuensis* ISH1 grown in basal medium with FA, rice bran, white rice, or glucose.

Each culture was grown with shaking in defined basal medium plus 1% rice bran powder (open circles), 2% glucose (filled circles), 1% white rice powder (open triangles), or 1 mM FA (filled triangles). The mycelia from each culture group were used in the bioconversion assays (A), or cell-free extracts were prepared and analyzed by western-blotting for the detection of AIPAD protein (B). rAIPAD, purified recombinant AIPAD; Glc, glucose; RB, rice bran; WR, white rice (endosperm of rice); FA, ferulic acid.

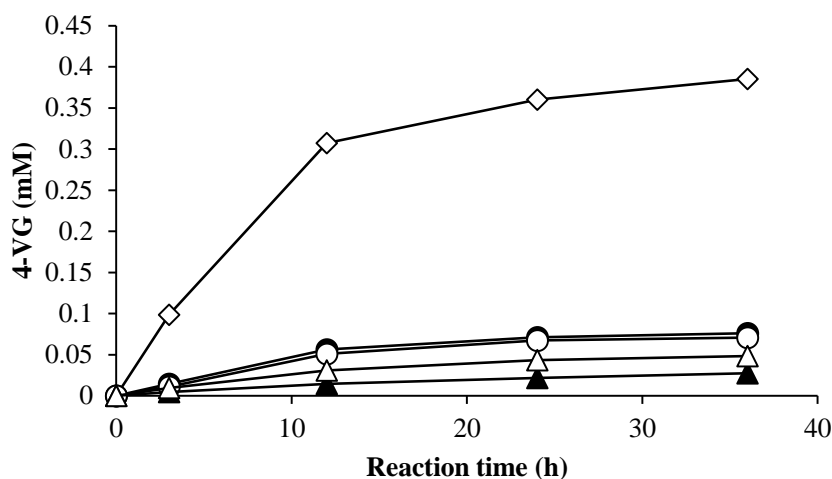


Fig. 3-4. Biological conversion of FA to 4-VG in resting cells of *A. luchuensis* ISH1 grown in basal medium with rice flour or glucose to FA.

Each culture was grown with shaking in defined basal medium plus 1% glucose (open circles), 0.1 % glucose (filled circles), 1% white rice powder (open triangles), 0.1 white rice powder (filled triangles), or 0.5 mM FA (open rhombus). A final concentration of 0.5 mM FA is added to all the medium. The mycelia from each culture group were used in the bioconversion assays.

第 2 項 米ぬか中の誘導物質の探索および同定

上記の第 1 項の結果から、米ぬか中に含まれる FA 以外の誘導物質の存在が示唆されたことから、米ぬか中の誘導物質の探索を行った。予備的な試験により、米ぬか熱水抽出物で AIPAD の誘導性が確認されたため、始めに、米ぬか熱水抽出の条件検討を行った。pH 4 で行った熱水抽出物を用いて培養した菌体において、1%米ぬか含有基礎培地と同定度の FAD 活性を示すことがわかった (Fig. 3-5)。次に、抽出条件が異なる熱水抽出物に含まれる遊離 FA を定量した。その結果、1%米ぬか含有基礎培地の総 FA 濃度は約 0.43 mM であるのに対して、どの抽出条件でもそれぞれの熱水抽出物に含まれている遊離 FA は約 0.01 mM しか含まれないことがわかった (Table 3-2)。次に、米ぬか熱水抽出物に含まれる AIPAD 誘導物質の分離を試みた。米ぬか熱水抽出物の透析 (14,000 カット) 外液に FAD 誘導活性が検出された。本透析外液を高分子および非極性物質を吸着する DIAION HP20 に供与した結果、非吸着

画分に FAD 誘導活性が検出された。さらに本画分を水で平衡化した ODS カラムに供与した結果、非吸着画分で FAD 誘導活性が検出された。本画分を TSKgel Amide-80 カラムに供与した結果、得られた複数のフラクションに FAD 誘導活性が検出された (Fig. 3-6A)。活性が検出されたフラクションに含まれているフェノール酸および糖分析を行った結果、フェノール酸はフラクション 2 にのみ検出された (Fig. 3-6B)。しかし、濃度は低く、定量限界以下であった。糖分析においては、FAD 誘導活性がみられた後半のフラクション (6-10) には糖が多く含まれていることがわかった (Fig. 3-6C)。前半のフラクション (2-5) には糖が検出されず、アミノ酸が検出された (data not shown)。糖が検出された後半の加水分解サンプルにおいてグルコースが多く検出されたことから、FAD 誘導活性物質がグルコースで構成されたオリゴ糖であることが示唆された。次に、糖が検出された後半のフラクション (7-9) の質量分析を行った結果、イソマルトースの 360.39 m/z と ほぼ同じ値を示したことから、後半のフラクション (7-9) に共通に含まれている糖はグルコースから成る 2 糖であることが示唆された (Fig. 3-7)。次に、TLC を用いて 2 糖の分析を行った。その結果、後半のフラクション (7-10) に含まれている 2 糖はスクロースであることが示唆された (Fig. 3-8)。6 炭糖であるグルコースとフルクトースからなる 2 糖であるスクロースを酸加水分解すると、グルコースは残るがフルクトースはほとんど分解される。よって、酸加水分解による構成糖分析ではグルコースしか検出されなかったことが示唆された (Fig. 3-9, フラクション 8 および 9 参照)。各フラクションに含まれているスクロースおよびフルクトースを定量した結果、後半のフラクション 6 および 7 に 0.3~0.7 mM ほどのフルクトースが検出され、フラクション 7~10 のフラクションにスクロースが約 0.3~1.5 mM 検出された (Fig. 3-9)。次に、終濃度 0.5 mM のスクロースおよびフルクトースを含む基礎培地で培養した菌体を用いて静止菌体反応を行った。その結果、スクロースは 0.5 mM FA 培養菌体とほぼ同程度の FAD 活性を示した (Fig. 3-10)。フルクトースは FA 培養菌体よりも活性が高く、反応時間 3~12 時間目までは米ぬか培養菌体よりも FAD 活性が高かった。スクロースを培地調製のためにオートクレーブ

すると、グルコースとフルクトースに分解される。よって、スクロース添加基礎培地培養菌体による FAD 活性もフルクトースに由来することが示唆された。これらのことから、米ぬか熱水抽出物に含まれる AIPAD の誘導物質の 1 つはフルクトースであることが示唆された。フルクトースと FA の相乗効果を調べるために、終濃度 0.5 mM のフルクトースおよび 0.5 mM FA 含有基礎培地で培養した菌体の FAD 活性を調べた。その結果、フルクトースおよび FA 単体で培養したときの活性とほとんど差がみられなかった (data not shown)。このことから、フルクトースと FA の相乗効果はみられないことがわかった。

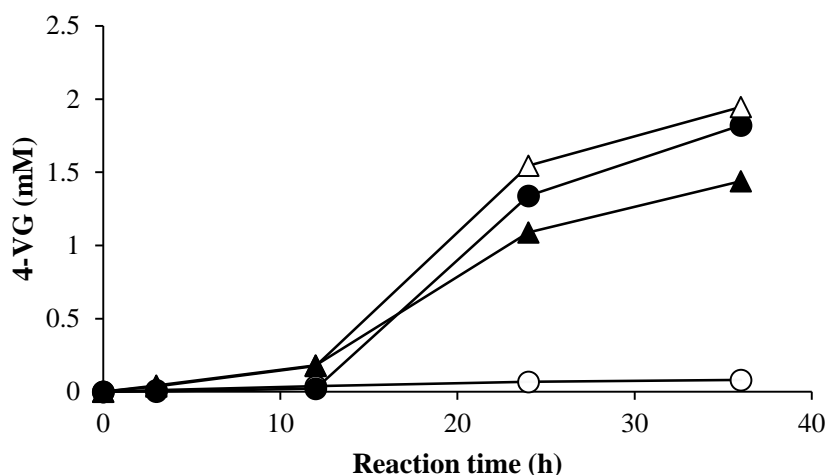


Fig. 3-5. FAD activity of resting cells of *A. luchuensis* cultured with rice bran extract using neutral water, acidic water or basal medium.

Each culture was grown with shaking in rice bran extract using neutral water (open circles), acidic water (filled circles), basal medium (open triangles). Basal medium plus 1% rice bran was used as the control (filled triangles). The mycelia from each culture group were used in the bioconversion.

Table 3-2. The concentration of total FA contained in basal medium with 1% rice bran and FA concentration of rice bran extract by various solution with various pH

Types of media	FA (mM)
Basal medium with 1%rice bran	0.4327
Rice bran + distilled water	0.0097
Rice bran + distilled water (pH 4.0)	0.0099
Rice bran + basal media (pH 4.0)	0.0107

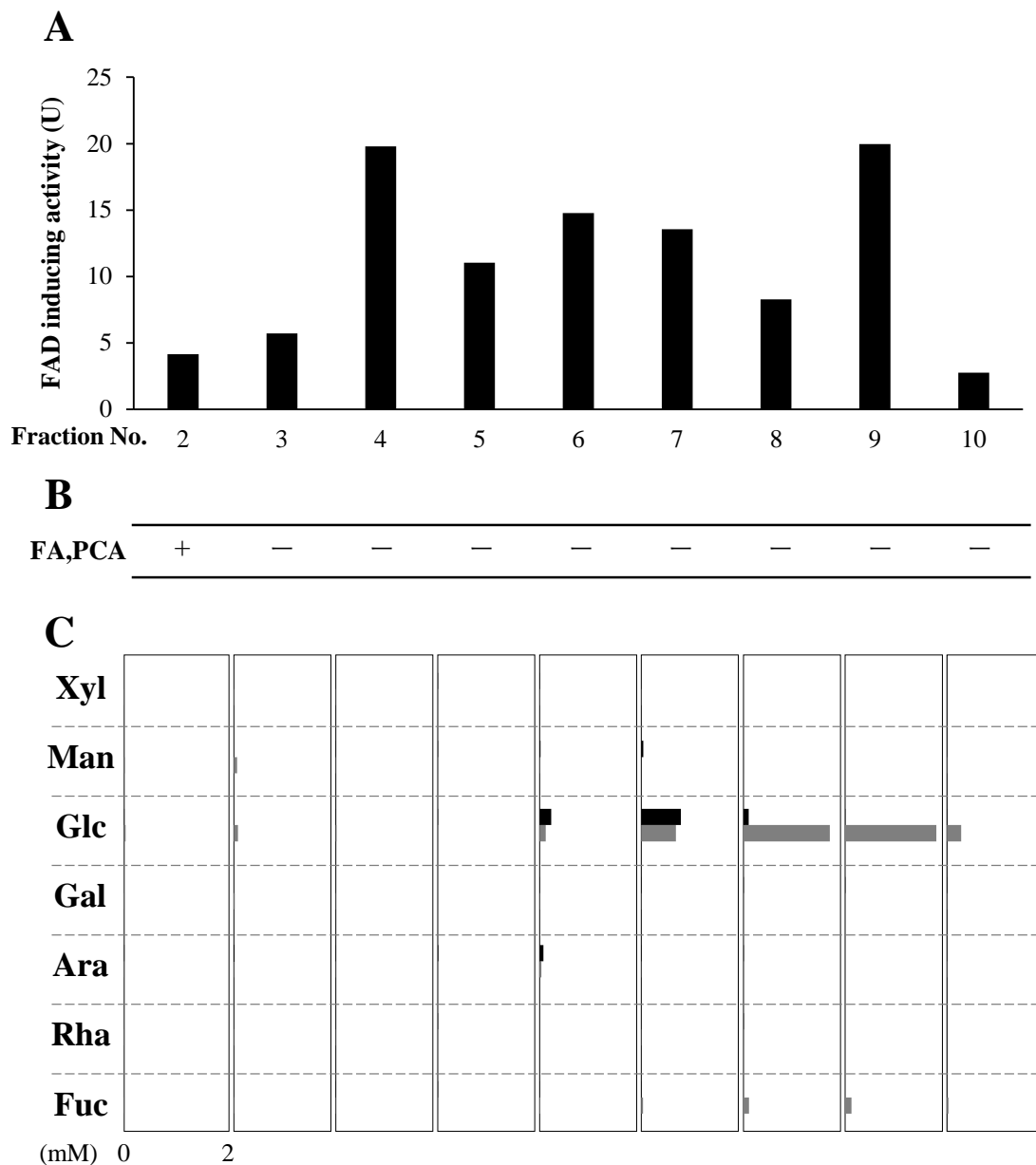


Fig. 3-6. FAD-inducing activity and phenolic acid and sugar composition of each fraction
 (A) FAD-inducing activity of each fraction purified on a TSKgel Amide-80 column. (B) Whether FA or PCA contained in the fraction is detected. +, detected ; -, not detected. (C) The analysis result of the monosaccharide in the fraction is shown. Black and gray bar graphs show untreated and hydrolyzed samples.

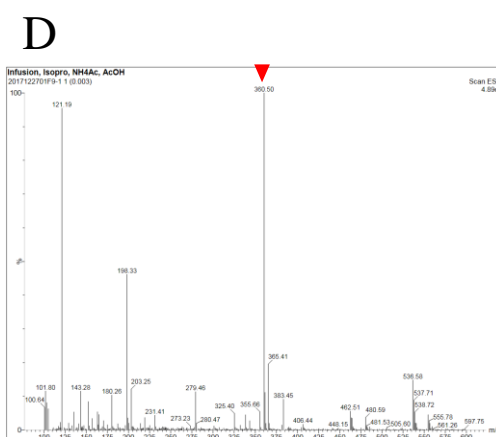
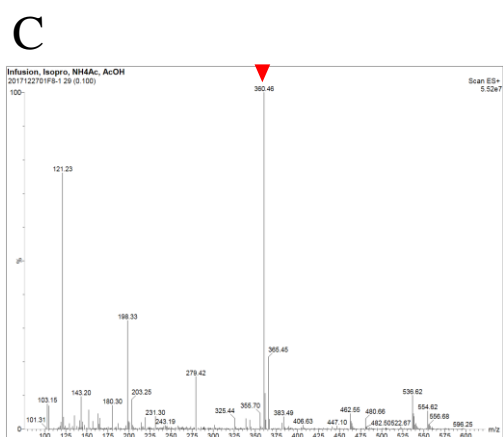
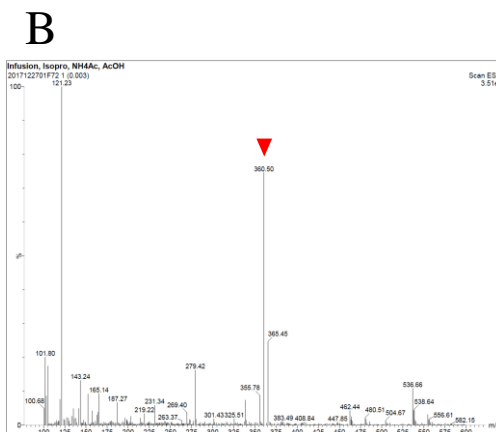
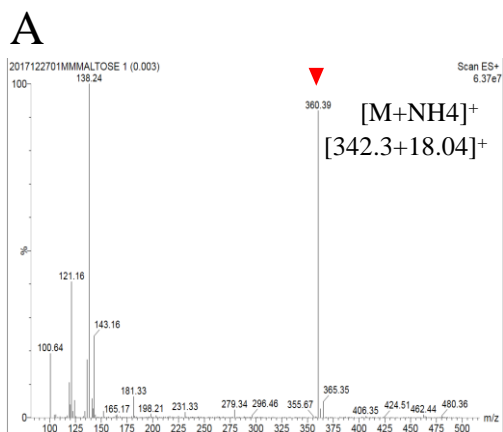


Fig. 3-7. MS analysis of fraction 7, 8 and 9
A, maltose ; B, fraction 7 ; C, fraction 8 ; D, fraction 9.

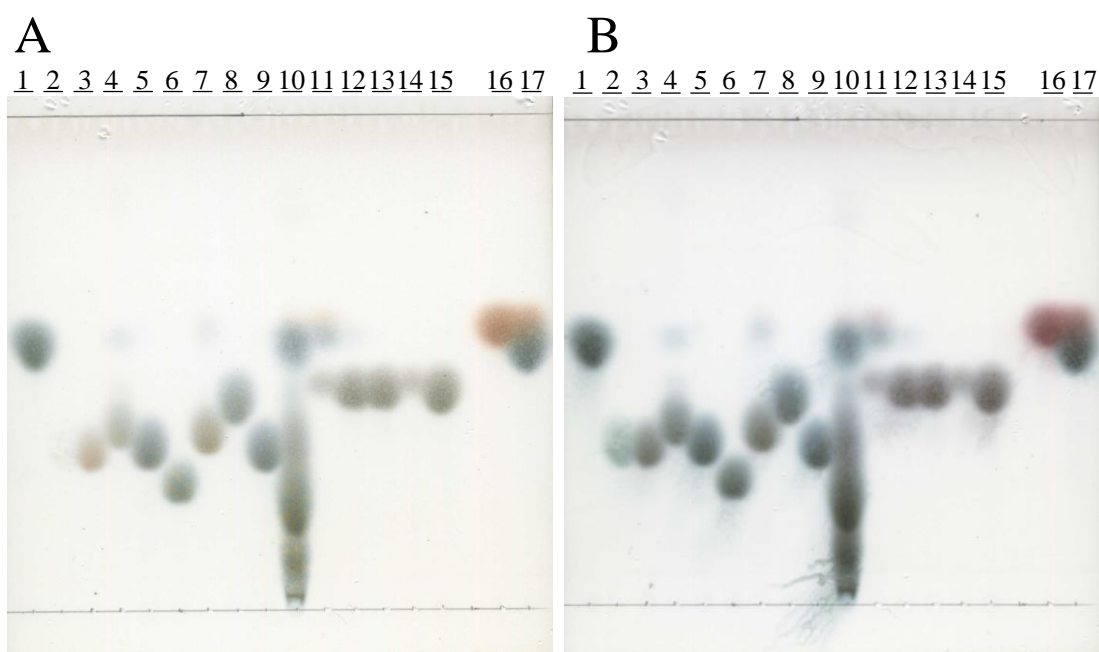


Fig. 3-8. TLC of various sugars and fraction 7, 8, 9,10

TLC plates were developed by diphenylamine-aniline reagent (A) and phenol-sulfuric acid reagent (B), respectively. Lane 1, glucose ; lane 2, trehalose ; lane 3, kojibiose ; lane 4, nigerose ; lane 5, maltose ; lane 6, isomaltose ; lane 7, sophorose ; lane 8, laminaribiose ; lane 9, cellobiose ; lane 10, gentiobiose ; lane 11, fraction 7 ; lane 12, fraction 8 ; lane 13, fraction 9 ; lane 14, fraction 10 ; lane 15, sucrose ; lane 16, fructose ; lane 17, glucose and fructose.

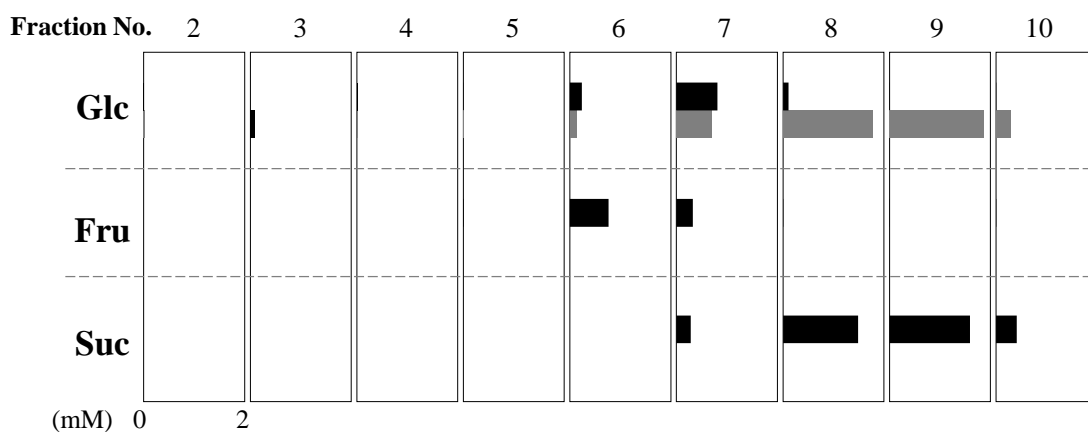


Fig. 3-9. FAD-inducing activity and glucose, fructose and sucrose composition of each fraction

The amount of glucose, fructose and sucrose contained in each fraction. Black and gray bar graphs show untreated and hydrolyzed samples.

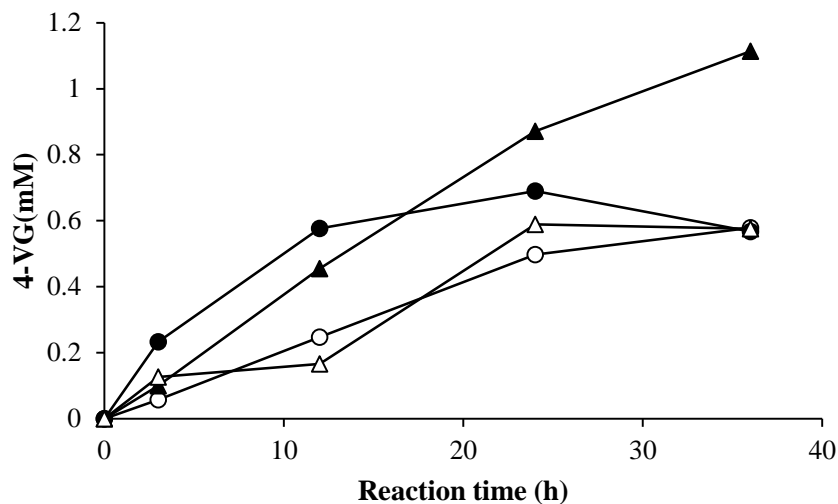


Fig. 3-10. Bioconversion of FA to 4-VG in resting cells of *A. luchuensis* ISH1 grown in basal medium with sucrose, fructose, FA, or rice bran.

Each culture was grown with shaking in defined basal medium plus 0.5 mM sucrose (open circles), 0.5 mM fructose (filled circles), 0.5 mM FA (open triangles), or 1% rice bran (filled triangles). The mycelia from each culture group were used in the bioconversion assays.

第3項 *alpad* の転写誘導試験

上記の第1および2項の結果から、FAおよびフルクトースがAIPAD誘導物質の候補であることが示唆された。次に、これらの物質を使って*alpad*の転写誘導試験を行った。その結果、FA添加区において誘導開始1時間目に最も転写量が多く、その後減少した(Fig. 3-11A)。それに対して、フルクトース添加区においては、誘導開始1時間目にわずかに増加したが、誘導1時間目から6時間目にかけて転写量はほとんど変動しなかった(Fig. 3-11B)。

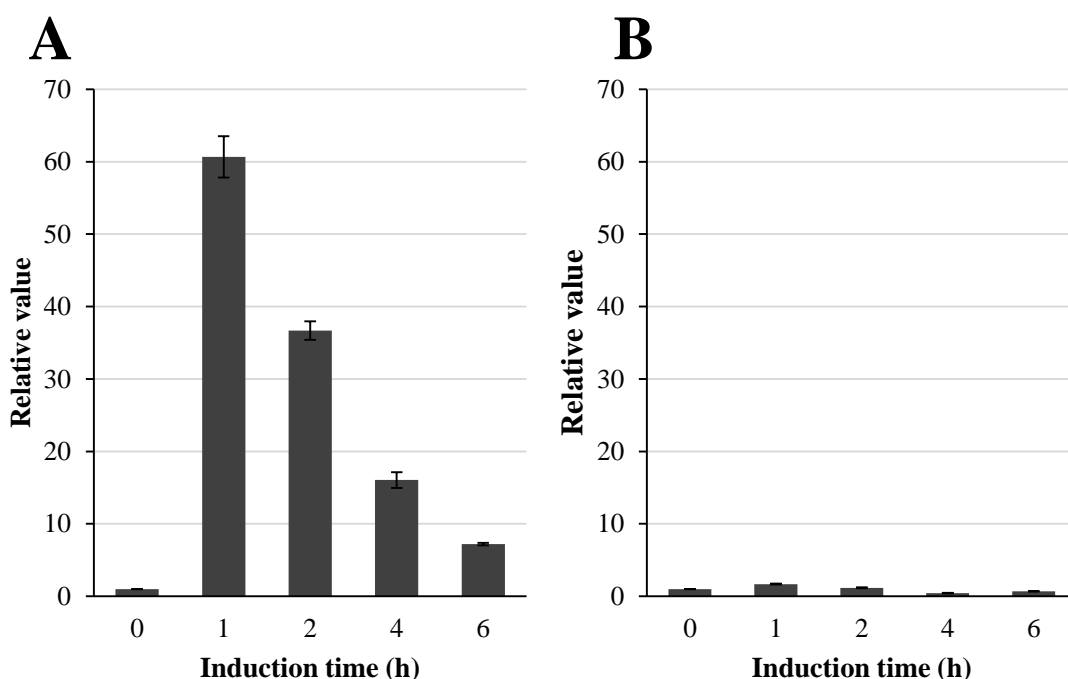


Fig. 3-11. Changes in transcripts of *alpD* in cultured cells induced by FA or fructose
A. luchuensis ISH1 mycelium was incubate for each hour in MM medium containing 1.5 mM FA (A) or 0.5 mM fructose (B). The amount of each transcription was normalized using *actin*.

第4項 製麴中の FAD 活性および AIPAD 量の経時変化

静止菌体反応試験において、FA および米ぬかにより *A. luchuensis* ISH1 菌体内で AIPAD が発現・誘導され、機能していることが分かった。次に麴中で AIPAD が発現・機能しているかを調べるために、米ぬかを多く含む二分搗き玄米を用いて製麴した麴の無細胞抽出液 (CFE) の FAD 活性を測定した。麴は *A. luchuensis* ISH1 の種麴を添加してから 30, 35, 43, 46, 56 および 68 時間後にサンプリングした (Fig. 3-12A)。Fig. 3-12B に麴中の菌糸体の量と相関する GlcNAc 量を示した (Fujii et al., 1992)。等量の GlcNAc を含む麴の CFE を調製し、FAD 活性を測定するとともに、ウエスタンブロッティングにより AIPAD 量を定量した (Fig. 3-12C, D)。FAD 活性は始めに 43 時間から検出され、それ以降は製麴時間と共に FAD 活性が増加した。この結果は麴の CFE 中の AIPAD 量と強い正の相関があることがわかった。

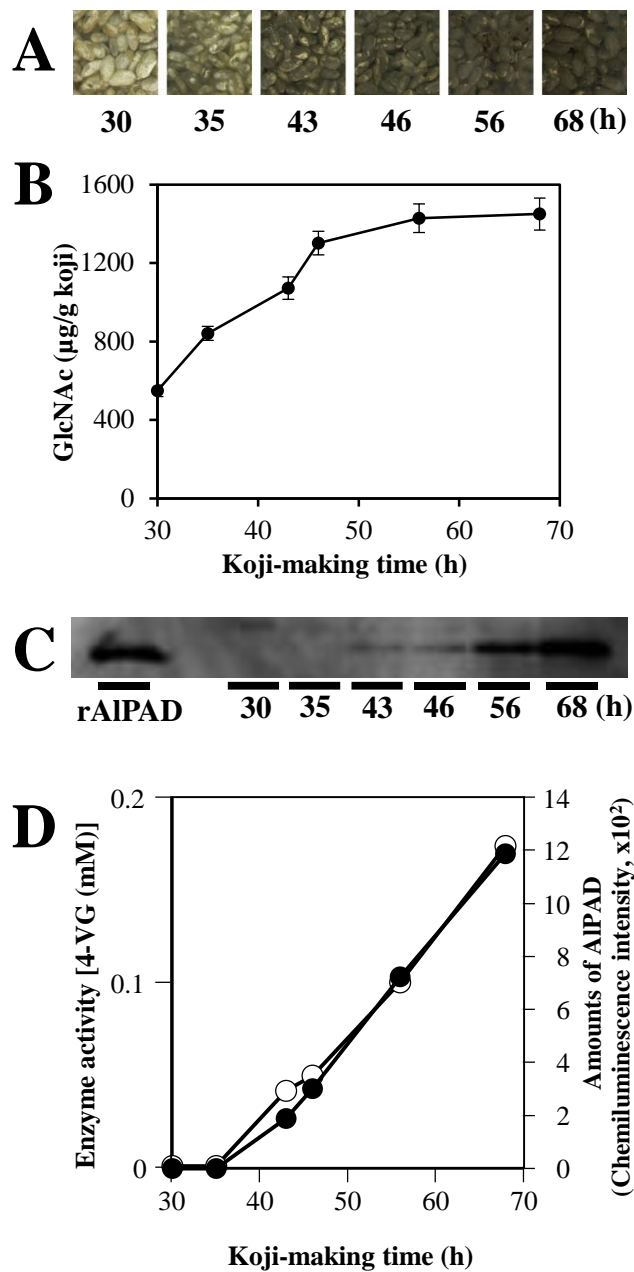


Fig. 3-12. Time course analyses of ferulic acid decarboxylase activity and AIPAD quantitation during koji-making.

(A) Koji was harvested 30, 35, 43, 46, 56, and 68 h post inoculation with *A. luchuensis* ISH1. (B) Amounts of GlcNAc during koji-making. Generally, the amount of GlcNAc correlates with the amount of mycelia in koji. (C) Detection of AIPAD by western blotting. (D) Cell-free extracts, were prepared from the koji containing equal amounts of GlcNAc, were analyzed for ferulic acid decarboxylase activity (open circles) and AIPAD amounts (closed circles). Amounts of AIPAD were shown as chemiluminescence intensities of protein bands detected by western blotting in C.

第4節 考察

「AIPAD の誘導性と米ぬか中の誘導物質の探索」

A. luchuensis ISH1 の FAD 活性および AIPAD の発現は, FA および米ぬかの両方で誘導された。0.43 mM FA を含む米ぬかによる AIPAD の誘導性は, 1 mM FA によって誘導される誘導性よりも明らかに高かった。このことから, 米ぬか中には FA に加えて他の誘導物質の存在が示唆された。De Vries と Visser(1994)は, *A. niger* のフェルロイルエステラーゼをコードする遺伝子 (*faeA*) がキシロースとフェルラ酸によって誘導されることを報告している。AIPAD は米ぬか中の細胞壁成分によっても誘導されることが期待された。

米ぬか中の AIPAD 誘導物質の探索を, 静止菌体反応における FAD 活性を指標にして行ったところ, AIPAD の誘導物質の 1 つはフルクトースであることが示唆された。しかし, *alpad* の転写誘導試験においては, フルクトース添加区の *alpad* の転写量は FA 添加区と比較すると著しく低いことがわかった。微生物に広く存在する代謝制御システムとしてカーボンカタボライトリプレッション (CCR) が知られており, 多くの微生物では, グルコースが多く存在する培地で培養を行うと, その他の糖の資化に関わる遺伝子発現が抑制される。*Aspergillus* 属菌においては, 糖質加水分解酵素であるキシラナーゼ (*xlnA*) のみならず, *faeA* もグルコースによる CCR によって発現が抑制されることが報告されている (de Vries et al., 1999 ; Orejas et al., 1999)。

AIPAD も FA 含有基礎培地にグルコースや米粉を添加すると FAD 活性が抑制されることが確認された (Fig. 3-4)。一方, *xlnA* および *faeA* の発現制御においてフルクトース培養菌体では CCR が起こらない (de Vries et al., 1999 ; Orejas et al., 1999)。これら知見とフルクトースが *alpad* の転写をほとんど誘導できないという結果から, 次のような可能性が考えられた。CCR のかからないフルクトースで培養した菌体を, 静止菌体反応液中に移すと, そこに含まれる高濃度の FA によって AIPAD の発現が容易に誘導され, FAD 活性が上昇した可能性がある。しかしな

がら、FA による転写誘導試験は、1%グルコースを含む MM 培地で培養した菌体をグルコース無しの培地に移して行われており、工程としては静止菌体反応と良く似ているが、この場合は *alpad* は FA により速やかに転写誘導されており、CCR は起こっていないようである。2%グルコース含有基礎培地で培養した菌体を洗浄して、FA 含有静止菌体反応に用いると、FAD 活性はほとんど検出されず (Fig. 3-3)、転写誘導試験の結果と矛盾する。静止菌体反応と転写誘導試験の大きな違いは、静止菌体反応ではそれぞれの化合物を含む基礎培地で 5 日間培養した菌体を用いるのに対し、転写誘導試験では培養 16 時間目の対数増殖期の菌体を用いるところである。FA による転写誘導試験において、培養時間(生育ステージ)の異なる菌体では、*alpad* の誘導性が大きく異なるという結果を得ている (data not shown)。よって、今後は用いる培養菌体の培養時間や培養条件等を変えて FA やフルクトースによる AIPAD の誘導性を詳細に調べる必要がある。また、フルクトースによる静止菌体反応における FAD 活性の増大は、FA 脱炭酸活性を有する他の酵素や、FA の取り込み、4-VG の排出等に影響を与えている可能性も視野に入れて検討していく必要がある。

細菌類においては、*Bacillus subtilis* や *Pediococcus pentosaceus* のフェノール酸脱炭酸酵素 (PAD) が FA によって誘導されることが報告されている (Cavin et al., 1998; Barthelmebs et al., 2000a)。また、一部の細菌では、PAD の発現誘導が PadR (*pad* transcriptional regulator) によって制御されることが報告されている (Gury et al., 2004)。真菌類における PAD の誘導メカニズムは解明されていない。*C. guilliermondii* 由来 PAD (CgPAD) は FA および PCA によって誘導されるが、CgPAD で分解できない 6-hydroxy-2-naphthoic acid (6H2N) によって FA の 20 倍、PCA の 6 倍誘導される (Huang et al., 2012a)。AIPAD は 6H2N では誘導されなかった (data not shown)。従って、AIPAD の誘導メカニズムは CgPAD の誘導メカニズムとは異なる可能性がある。今回の静止菌体反応および転写誘導試験から、少なくとも FA によって AIPAD が誘導されることは明らかとなったが、その誘導メカニズムは全く分かっていない。今後、FA の添加

の有無による RNA-seq 解析を行い, FA 添加で増減する遺伝子を解析し, AIPAD の発現制御メカニズムを調べて行く予定である。

「AIPAD の麴中における発現と製麴時間に伴う増大」

二分搗き玄米を原料とした麴の CFE の FAD 活性と AIPAD の量は, 製麴 43 時間から検出され, その後少なくとも 66 時間までは製麴時間にもない増大することが分かった。同時にその FAD 活性と AIPAD 量に強い正の相関が認められたことから, 麴中で AIPAD が発現し機能していることが示唆された。一方, 麴の製麴時間に伴い AIPAD の量が増加する理由についてはわかっていない。製麴中の *A. luchuensis* はアミラーゼおよびグルコアミラーゼを分泌してデンプンをグルコースに変換する。デンプンの量は製麴時間の経過に伴い徐々に減少し, 製麴後期には相対的に細胞壁物質の比率が高まり, その結果, 細胞壁の分解に関与する酵素の発現が誘導されると推測される。AIPAD の発現は, これらの酵素と関連して誘導された可能性がある。現在, 製麴時間の異なる麴の RNA-seq 解析を行っており, 製麴時間にもない転写量が増減する細胞壁分解に関与する酵素遺伝子やその他 AIPAD に関連する遺伝子の探索を行っている。これらの解析を通じて, AIPAD が製麴時間に伴い増大するメカニズムを明らかにしたい。

以上の結果から, *A. luchuensis* 菌体およびそれを生やした麴中で, AIPAD が発現・機能していることが明らかとなった。泡盛醸造中の FA から 4-VG への変換の少なくとも一部は *A. luchuensis* の PAD によって触媒されることが示唆された。

第4章 泡盛醸造における4-VG生成へのAIPADの寄与

第1節 緒言

第2章では、大腸菌で発現させたリコンビナント AIPAD が、FA を 4-VG に変換する活性 (FAD 活性) を十分に有していることを示した。また、シグナル配列の欠如、AIPAD の pH プロファイル、静止菌体反応の結果から、*Aspergillus luchuensis* は FA を菌体外から取り込み、菌体内で発現している AIPAD によって 4-VG に変換し、菌体外に放出していることが示唆された。第3章では、AIPAD が基質である FA や米ぬか成分によって誘導されること、AIPAD が製麴中に発現し、FAD 活性を発揮することを示した。これらのことから、泡盛醸造中の FA から 4-VG へ変換の少なくとも一部は AIPAD によって行われていることが示唆された。しかしながら、泡盛醸造中の FA から 4-VG への変換については、これまでに様々な提案がなされており、4-VG 生産に AIPAD がどの程度寄与しているのかは分からなかった。

Koseki ら(1996)は、モデル焼酎モロミを用いた試験により、モロミ中の FA が蒸留時の熱によって 4-VG に変換されることを示している。また、*Saccharomyces cerevisiae* の一部の菌株 (Mukai et al., 2010 ; Clausen et al., 1994) では、フェニルアクリル酸脱炭酸酵素 (PAD1) およびフェルラ酸脱炭酸酵素 (FDC1) によって FAD 活性を示すことが報告されている。また、泡盛のモロミから分離された *Lactobacillus* 属 (Watanabe et al., 2009) が FAD 活性を示すことが報告されている。これらの知見から、泡盛醸造における FA から 4-VG への変換は、蒸留時の熱または酵母や混入する乳酸菌の持つ FAD 活性によるものだと考えられてきた。しかし、泡盛 101 号酵母の *FDC1* にはナンセンス変異が含まれているため FAD 活性が無いことがわかっている (Mukai et al., 1998 ; Mukai et al., 2014)。また、モロミから単離される FAD 活性を有する乳酸菌は、泡盛モロミの低 pH 環境下では増殖が困難であり、菌密度としても極めて小さく、モロミ

中での 4-VG 生産への寄与については疑問が持たれた。

そこで、我々は *A. luchuensis* が有する *Candida guilliermondii* および細菌類由来の PAD ファミリーに属する PAD, すなわち AIPAD が泡盛醸造における 4-VG 生産の主要因であると仮説を立てた。一方、*A. luchuensis* のゲノム中には、*S. cerevisiae* の *PADI* および *FDCI* (Mukai et al., 2010) の酵素をコードする遺伝子と類似した配列も存在する。*S. cerevisiae* の *Fdc1p* (UbiD ファミリーデカルボキシラーゼ, TIGR00148) と細菌類の PAD (PAD スーパーファミリー, c101382) は、互いに無関係なファミリーである。また、*S. cerevisiae* の *Pad1p* (フラビンプレニルトランスフェラーゼ) と細菌の PAD は同様の略語にもかかわらず、無関係な酵素である。*Aspergillus niger* では、*S. cerevisiae* の *FDCI* と *PADI* のホモログが機能して、桂皮酸を脱炭酸する活性が示されている (Payne et al., 2015)。泡盛醸造中の FA から 4-VG への変換に *A. luchuensis* のこれらのホモログが関与している可能性もある。

本章では、泡盛醸造中の 4-VG 生産における AIPAD の寄与を明確にするために、*alpad* 破壊株 ($\Delta alpad$ 株) を作製し、小仕込み試験を行い、野生株との比較を行った。また、蒸留時の熱による 4-VG 生成への寄与率も調べた。これらの結果を合わせて、泡盛醸造中の 4-VG 生産における AIPAD の寄与率を明らかにした。さらに、泡盛醸造中のどのタイミングで 4-VG が生成されているのかについても調べた。また、*S. cerevisiae* の *PADI* と相同性のある遺伝子を破壊した株 (*A. luchuensis* mut. *kawachii*) を用いて静止菌体反応試験を行い、FAD 活性に関与しているのか調べた。

第2節 実験方法

第1項 培地および鋳型の調製

Czapek-Dox (CD) 培地 (2% グルコース, 0.3% NaNO₃, 0.2% KCl, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O および 0.002% FeSO₄·7H₂O) を 1 M NaOH で pH 5.5 に調製し, $\Delta alpad$ 株のスクリーニングおよび FA による生育への影響を調べるために用いた。最少 (MM) 培地 (0.6% NaNO₃, 0.15% KH₂PO₄, 0.05% KCl, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 1% グルコースおよび 0.2% Hutner's trace elements) は 5 M KOH で pH 5.5 に調製し, 野生株および $\Delta alpad$ 株の FA による生育への影響を調べるために使用した。*A. luchuensis* ISH1 のゲノム DNA は PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて調製した。*A. kawachii* のコントロール株 (*ligD*⁻, *argB*⁺, *sC*⁻) (以下, *A. kawachii*_cntl 株) および PAD1 候補遺伝子欠損株 (*ligD*⁻, AKAW08977::*argB*, *sC*⁻) (以下, *A. kawachii*_ Δ AKAW08977 株) は佐賀大学の後藤正利先生よりご提供いただいた。

第2項 *alpad* 破壊株の構築

PCR に用いた各種プライマー配列は Table 4-1 に示す。*A. luchuensis* ISH1 のゲノム DNA を鋳型として, プライマー F1 と R1 および F2 と R2 を用いた PCR により, *alpad* のそれぞれ 5'側および 3'側の約 1 kb の長さのフラグメントを増幅させた (Fig. 4-1A)。ハイグロマイシン B 耐性遺伝子 (*hph*) カセットはプラスミド pBA1-*hph* (山田ら, 未発表) を *KpnI* で消化することで得られた。このプラスミドは, ハイグロマイシン耐性遺伝子が *A. luchuensis* のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (*gpdA*) プロモーターおよびターミネーターの間に挿入されている。次に, バイナリーベクター pRIE (Takahashi et al. 2011) を *EcoRI* で消化した。これら 4 つの DNA 断片を In-Fusion HD クローニングキット (Takara Bio 社製) を使用して連結し, pRIE- $\Delta alpad$ を構築

した (Fig. 4-1B & C)。pRIE- $\Delta alpad$ とアグロバクテリウム法 (AMT 法) (Michielse et al., 2008) を用いて *A. luchuensis* ISH1 を形質転換した手順を以下に示す。10%グリセロール 40 μL に pRIE- $\Delta alpad$ プラスミド (397.4 ng/ μL) 1 μL およびアグロバクテリウムコンピテントセル 5 μL を混合し、エレクトロポレーター (ELEPO21, ネッパジーン社製) を用いて Table 4-2 の条件でエレクトロポレーションを行い、SOC 培地 (tryptone, 20 g/L; yeast extract, 5 g/L; 5 M NaCl, 2 mL/L; 2 M KCl, 1.25 mL/L; 2 M MgCl₂, 10 mL/L, 1 M glucose, 20 mL/L) 900 μL と混合し、28°C, 1000 rpm, 2 時間振とう培養を行った。LB 寒天培地 (終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシン, 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ リファンピシリン) にスプレットし、28°C, 3 日間, 遮光で培養した。次に、アグロバクテリウムの形質転換体を LB 液体培地 (終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシン, 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ リファンピシリン) 10 mL に植菌し、28°C, 200 rpm, 24 時間培養した。培養後、培養液 300 μL と等量の滅菌水を混合し、OD₆₀₀ を測定した。測定後、5 mL の誘導培地 (IM) 液体培地 (Table 4-3) にアグロバクテリウムを添加した時の OD₆₀₀ が 0.3 相当の培養液を回収し、4,000 rpm, 5 分, 25°C で遠心分離を行った。遠心後、上清を捨て、得られたペレットに IM 液体培地 300 μL を添加し、優しくピッパッティングし洗浄した。洗浄後、上記と同様の条件で遠心分離を行った。遠心後、上清を捨て、得られたペレットを 5 mL の IM 液体培地が入った 100 mL 容三角フラスコに添加した。IM 液体培地に 0.2 M アセトシリンゴンを 5 μL 添加し、28°C, 100 rpm, 遮光で 5 時間培養を行った。培養後、OD₆₀₀ を測定し、濃縮後の培養液が 100 μL あたり OD₆₀₀=0.8 になるように培養液を回収し、4,000 rpm, 5 分, 25°C で遠心分離を行った。適当量の上清を捨て、アグロバクテリウムと 10⁷ 個/mL の *A. luchuensis* ISH1 の分生子懸濁液を等量ずつ混合した。次に、IM 個体培地 (Table 4-4) に滅菌した Hybond N⁺ を空気が入らないように密着させ、その上に混合液を 100 μL ずつスプレットし、22°C, 遮光で 3 日間培養した。次に、菌糸が生えたフィルターをはがし、そのフィルターを終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のハイグロマイシンと 0.2 mM セフォタキシムを含む CD 培地で形質転換体を選択するとともにアグロバクテリウムを死滅させた。 $\Delta alpad$ 候

補株は、ハイグロマイシンを含む CD 寒天培地で 2 回継代培養することで純化した。 $\Delta alpad$ 株はプライマー F1 と R3, F3 と R3 および F4 と R3 を使用したコロニー PCR によって目的の位置で相同組み換えが行われたのかを確認した。(Fig. 4-3A)

Table 4-1. Sequences of primers

Primer name (5' → 3')	
F1	<u>CGTTTTTAATGAATTCTTAGGAAACGACCAATCCTCAC</u> TTGAG
R1	<u>GAGCTCAATGGCCCGCTGTGAATGAGACAATCACCGT</u> GATATG
F2	<u>TGGACCCCGAAGGCGGCTTAGTTCGCAAATATCTGGT</u> ATACCC
R2	<u>AGTTTAAACTGAATTGGACTCACCACCAGTGGAAGTT</u> ACTAC
R3	TGTTATCAACTCCAACCGCACCTCCG
F3	GACATTCCACGAAAGCGCATCACCAC
F4	GCAGTTCGGTTTCAGGCAGGTCTTGCAAC

Underlined, double line, and dotted line indicate sequences from pRIE plasmid, *gpdA* terminator, and *gpdA* promoter, respectively.

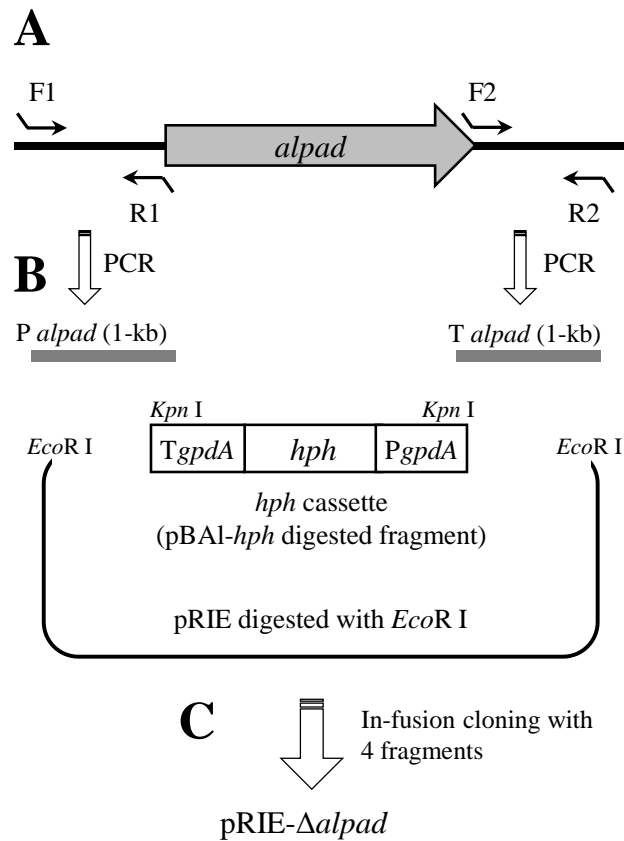


Fig. 4-1. Construction of plasmid for *alpad* disruption.

(A) Primer positions on the genome. (B) About 1 kb of fragments of upstream and downstream of *alpad* were amplified by PCR the with primer pairs F1/R1 and F2/R2, respectively. (C) These four DNA fragments were ligated using an In-Fusion to construct pRIE-Δ*alpad*.

Table 4-2. Electroporation condition

	Voltage	Length	Interval	Number of pulses	polarity
Poring Pulse	2,000 V	2.5 msec	50 ms	1	+
Transfer Pluse	150 V	50 msec	50 ms	5	+/-

Table 4-3. IM liquid medium

Compounds	Amount
K-buffer	16 μ l
MN buffer	400 μ l
1% CaCl ₂ (wt/vol)	20 μ l
0.01% FeSO ₄ (wt/vol)	200 μ l
Trace elements for IM medium	100 μ l
20% NH ₄ NO ₃ (wt/vol)	50 μ l
50% glycerol	200 μ l
1 M MES	800 μ l
20% glucose (wt/vol)	200 μ l
Distilled water	18.014 mL
Total	20 ml

FeSO₄ and MES were filter sterilized. The others were sterilized by autoclave.

Table 4-4. IM solid medium (50 ml)

Compounds	Amount
K-buffer	40 μ l
MN buffer	1 mL
1% CaCl ₂ (wt/vol)	50 μ l
0.01% FeSO ₄ (wt/vol)	500 μ l
Trace elements for IM medium	250 μ l
20% NH ₄ NO ₃ (wt/vol)	125 μ l
50% glycerol	500 μ l
1 M MES	2 mL
20% glucose (wt/vol)	250 μ l
0.2 M acetosyringone	50 μ l

Dissolve 0.75 g of agar in water to fill up a total volume 45.285 ml and sterilized by autoclave.

Table 4-5. Trace elements for IM medium

Compounds	Amount
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	10 mg
H ₃ BO ₃	10 mg
MnSO ₄ · H ₂ O	10 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	10 mg

It was filled up to 100 ml with distilled water and sterilized by autoclave.

第3項 野生株および $\Delta alpad$ 株の FA による生育への影響

それぞれの株を PDA 培地で 30°C で 4 日間培養し、分生子を滅菌水を用いて回収した。それぞれの株の生育に対する FA の影響を調べるために、グルコースを含むまたは含まない 1.5%寒天含有 MM 培地および 1.5%寒天含有 CD 培地に 1 または 5 mM FA を添加した培地と PDA 培地を使用した。それぞれの培地に 10³ 個/3 μ L の分生子懸濁液をスポットし、30°C で 1 週間培養し、 $\Delta alpad$ 株のコロニーサイズと形状を野生株と比較した。

第4項 静止菌体反応における FAD 活性の測定

培地は終濃度 0.5 mM FA 含有基礎培地を用いて培養を行い、第3章 第2節 第2項と同様の方法で FAD 活性測定を行い、上清中の FA および 4-VG の定量は第3章 第2節 第3項の HPLC と同様の方法で測定した。

第5項 米中の FA の定量

インディカ米中の FA の定量は第3章 第2節 第3項と同様の方法で定量した。

第6項 製麴

製麴は自動発酵機ミニ 15 型 D (ヤエガキフード&システム社製)を用いて行った。10 kg のインディカ米を 1 時間 40 分浸漬した。次に、水切り(余分な水分を取り除く)を 30 分間行った後、20 分間コシキ型蒸米機で蒸煮した。40°C まで冷却した後、米に *A. luchuensis* ISH1 の 6×10^9 個/50 mL の分生子懸濁液を添加した。製麴中の温度は、0~24 時間は 38°C、24~30 時間は 36°C、30~66 時間は 34°C で行った。麴のサンプリングは製麴時間 30, 42, 54 および 66 時間目に行った (Fig. 4-2)。サンプリングした麴はモロミ発酵に使用し、一部は液体窒素で凍結し-70°Cで保存した。

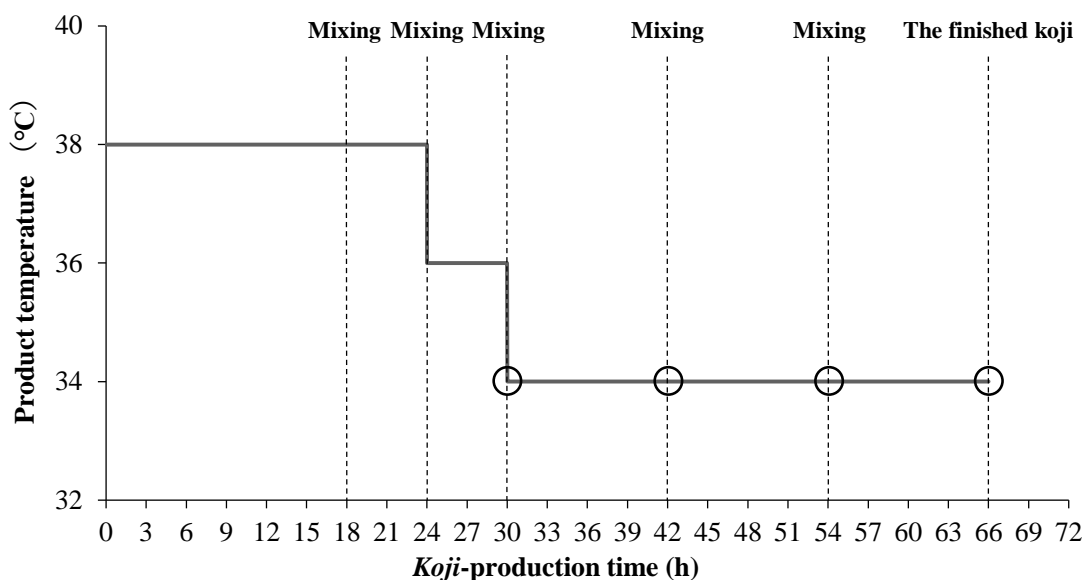


Fig. 4-2. Temperature condition and sampling schedule in koji production.

A gray polygonal line, dot lines, and open circles indicate product temperature of koji, mixing time, and sampling points, respectively.

第7項 麴中の菌体量, FAD 活性および FA と 4-VG 量の測定

凍結した麴は粉碎して、麴中の菌体量測定、麴無細胞抽出液の FAD 活性測定、麴中の FA および 4-VG 量の測定に使用した。麴の粉碎は以下のように行った。22 mL 容破碎容器に凍結した約 0.5 g の麴とメタルコーンを入れ、マルチビーズショッカー (安井機器) を用いて 2,000 rpm, 20 秒間の破碎を数回繰り返した。麴とメタルコーンが入った破碎容器は、破碎前後に液体窒素に浸け、麴の凍結状態を維持した。麴中の菌体量の定量は第3章 第2節 第6項と同様の方法で定量した。麴無細胞抽出液の FAD 活性測定は第3章 第2節 第5項と同様の方法で行った。

麴中の FA および 4-VG の定量は以下のように行った。上記と同様の方法で破碎した麴を2倍量 (液量/麴の粉末の重量) の抽出緩衝液 (0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7 ; 1 mM EDTA ; 1 mM PMSF ; 0.5 mM PCMB) と混合し、4°C で1時間抽出を行った。次に、混合液を遠心分離 (12,000×g, 10 分, 4°C) し、その上清を麴抽出液として用いた。麴の抽出液中の 4-

VG 量は ACQUITY UPLC H-Class システム(ウォーターズ社製)を用いて分析した。分析条件は、イオン化方式を ESI ポジティブモード、測定モードを MRM、キャピラリー電圧を 2.0 kV、コーン電圧を 30 V、デソルベーション温度を 350°C、デソルベーションガス流量を 800 L/hr、コーンガス流量を 50 L/hr、コリジョンエネルギーを 18 V、親イオンを 151、プロダクトイオン 91 で分析を行った。カラムは ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1×50 mm, Waters 社製)を用いて、カラム温度は 40°C で行った。溶出は溶液 A (1%ギ酸水溶液) および溶液 B (アセトニトリル) 用いて、流速は 0.15 mL/min で行った。グラジエントは、B 溶液を 10 分間、10 から 100% のリニアグラジエントで行い、その後 B 溶液を 100% で 4 分間洗浄し、10% の溶液 B で 6 分間、平衡化した。サンプルは 2 μL を注入した。

第 8 項 モロミおよび蒸留液中の FA および 4-VG の定量

モロミは、米麴 100 g に蒸留水 170 mL および 0.1 mL の酵母懸濁液(蒸留水に 10% の泡盛 101 号酵母の乾燥酵母を懸濁)を添加し混合し調製した。モロミを 28°C で 2 週間保温し、1 日 1 回薬さじで攪拌した。0, 1, 2, 3, 7 および 14 日目にサンプリングを行った。最後にモロミを分析用蒸留器(塚本鑛吉商店社製)を使用して蒸留した。蒸留液のアルコール濃度は、デジタルエチルアルコール濃度計 PET-109 (アタゴ社製)を用いて測定し、エタノール濃度が 10% (w/w) に達するまで蒸留液を回収した。モロミおよび蒸留液中の FA および 4-VG の定量は第 3 章 第 2 節 第 3 項の HPLC と同様の条件で測定した。

第 9 項 蒸留時の熱による FA から 4-VG への変換

モロミは、*Δalpad* 株を用い、上記第 6 項の条件で作成した製麴 42 時間の麴を用いて仕込み、2 週間発酵させたものを用いた。蒸留前にモロミに終濃度 0.1, 0.5 および 1 mM になるように FA を添加した。モロミは上記第 8 項と同様の方法で蒸留した。モロミ、蒸留液および蒸留粕

中の FA および 4-VG の定量を第 3 章 第 2 節 第 3 項の HPLC と同様の条件で測定した。

第 10 項 モロミ中の麴の FAD 活性における経時変化の評価

上記の第 6 項と同じ条件で作成した製麴 42 時間の麴を用いて、上記第 8 項と同じ条件でモロミを 5 セット仕込んだ。モロミ発酵開始後 0, 1, 2, 3 および 4 日目に各モロミに FA (1 mM) を添加し、添加後から 24 時間ごとに 3 日間 FA および 4-VG の濃度を測定した (Fig. 4-12A)。モロミ中の FA および 4-VG の定量は第 3 章 第 2 節 第 3 項と同様の条件で測定した。

第 11 項 *A. kawachii* ΔAKAW08977 株の FAD 活性への影響

培地は終濃度 1 mM メチオニンおよび 0.5 mM FA 含有基礎培地を用いて培養を行い、第 3 章 第 2 節 第 2 項と同様の方法で FAD 活性測定を行い、上清中の FA および 4-VG の定量は第 3 章 第 2 節 第 3 項の HPLC と同様の方法で測定した。

第3節 結果

第1節 *alpad* 破壊株の構築

FA から 4-VG への変換における AIPAD の寄与を調べるために、沖縄の泡盛酒造所で利用されている *A. luchuensis* ISH1 株の *alpad* 破壊株の構築を試みた。AMT 法 (Michielse et al., 2008) を用いて野生型 *A. luchuensis* ISH1 株の形質転換を行った。ハイグロマイシン耐性株の 6 株中から、プライマー F1 および R3 を用いたコロニー PCR によって 3 つの候補株が得られた。候補株において、*alpad* が相同組換によって *hph* カセットに置換されたかどうかをコロニー PCR によって確認した (Fig. 4-3)。プライマー F1 および R3 は、それぞれ *alpad* をコードする領域の 5'末端から 1 kb 上流の配列および *alpad* をコードする領域の 3'末端から 1 kb 下流の外部配列に設計した (Fig. 4-3A)。プライマー F3 および F4 は、それぞれ *alpad* および *hph* をコードする領域の内部配列に設計した。F1 および R3 プライマーを使用した場合、野生株では 2.9 kb の PCR 産物が増幅され、ハイグロマイシン耐性株では 4.7 kb の PCR 産物が検出された (Fig. 4-3B)。F3 および R3 プライマーを使用した場合、野生株では 1.5 kb の PCR 産物が検出され、ハイグロマイシン耐性株では PCR 産物は検出されなかった (Fig. 4-3C)。F4 および F3 プライマーを使用した場合、野生株では PCR 産物は検出されなかったが、ハイグロマイシン耐性株では 2.4 kb の PCR 産物が検出された (Fig. 4-3D)。これらの結果から、候補株において *alpad* をコードする領域が *hph* カセットによって置換されたことを示した。得られた形質転換体を $\Delta alpad$ 株とし、その後の実験に使用した。

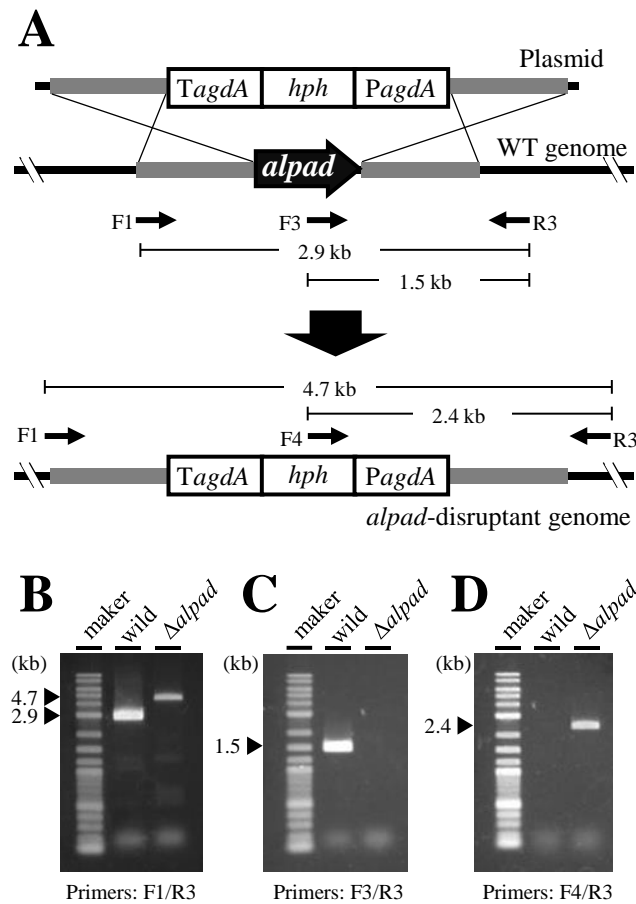


Fig. 4-3. Confirmation of site-specific homologous recombination on $\Delta alpad$ mutant by PCR.

A, the outline of *alpad* gene disruption by homologous recombination and primer positions on the genome. Confirmation of *alpad* disruptant was performed by PCR with primer sets F1/ R3 (B) , F3/R3 (C), and F4 /R3 (D).

第2節 $\Delta alpad$ 株の表現型と生育におけるFAの影響

$\Delta alpad$ 株の表現型と生育におけるFAの影響を調べるために、野生株および $\Delta alpad$ 株のFA含有または非含有各種寒天培地上での表現型の比較を行った。野生株および $\Delta alpad$ 株は、FAの存在下および非存在下での培養において同様の表現型を示した(Fig. 4-4)。これらの結果から、*alpad* 遺伝子が *A. luchuensis* の生育とFA資化に必須ではないことが示唆された。また、*A. luchuensis* の野生株および $\Delta alpad$ 株はFAを唯一の炭素源とした培地でも生育

したことから、FA を資化していることが分かった。

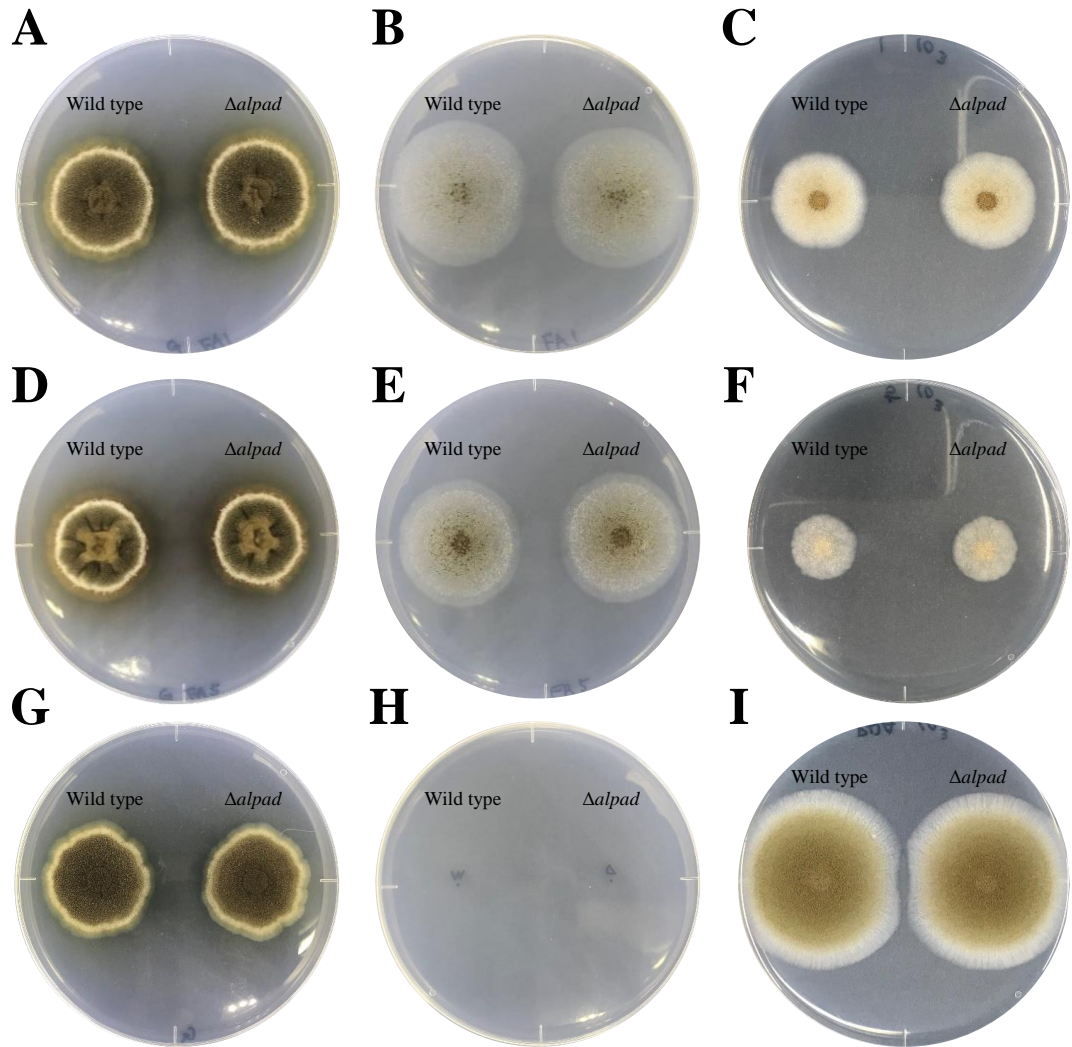


Fig. 4-4. Effect FA on growth of wild-type and $\Delta alpad$ strains.

A, B, D, E, G and H are MM medium. C and F are CD medium. I is PDA medium. A-C and D-F contain 1 and 5 mM FA, respectively. A, C, D, F, G, and I contain 1% glucose. B, E, and H do not contain glucose. Left ; Wild type, Right ; $\Delta alpad$.

第3節 野生株および $\Delta alpad$ 株の静止菌体反応における FAD 活性の測定

A. luchuensis ISH1 の 4-VG 生産における AIPAD の寄与を明らかにするために、 $\Delta alpad$ 株を用いた静止菌体反応による FAD 活性を野生株と比較した (Fig. 4-5)。野生株では、反応時

間に伴い FA が著しく減少し、4-VG 濃度が著しく増加した。 $\Delta alpad$ 株では、FA 濃度は反応時間に伴い減少したが、4-VG は反応中ほとんど検出されなかった。反応中 $\Delta alpad$ 株の FA 濃度は、野生株よりも常に高かった。これらの結果から、AIPAD が *A. luchuensis* ISH1 の FA から 4-VG への変換に関与していることが示唆された。

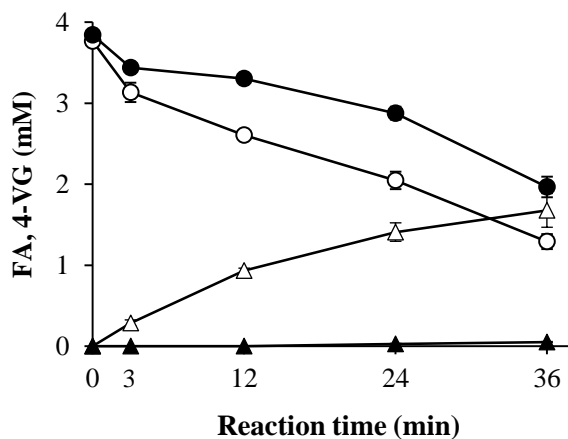


Fig. 4-5. Bioconversion of FA to 4-VG in resting cell of wild and $\Delta alpad$ strains.

The fungal cells for resting cells reaction were prepared as described in the Materials & Methods section. The cells with 4 mM FA solution were incubated at 30°C for certain time, and the concentrations of FA and 4-VG in the supernatant were measured. Circles and triangles indicate FA and 4-VG, respectively. Open and filled symbols indicate wild-type and $\Delta alpad$ strains, respectively. Error bars indicate the standard deviation of three replicates.

第4項 野生株および $\Delta alpad$ 株の麴中の FAD 活性の測定

泡盛醸造における FA から 4-VG への変換を触媒する AIPAD の寄与を明らかにするために、野生株と $\Delta alpad$ 株の麴を作製した。麴は製麴してから 30, 42, 54 および 66 時間目にサンプルリングした。製麴中の麴菌の菌体量と相関する GlcNAc 量は野生株および $\Delta alpad$ 株どちらも同程度であった (Fig. 4-6A)。野生株および $\Delta alpad$ 株のどちらにおいても GlcNAc 量は、製麴してから 30 から 42 時間にかけて増加し、その後 66 時間まで一定であった。次に、GlcNAc 量を揃えて麴の無細胞抽出液 (CFE) の FAD 活性を測定した (Fig. 4-6B)。野生株においては、

麴の製麴時間に比例して CFE の FAD 活性は増加していた。対照的に、 $\Delta alpad$ 株ほどの製麴時間においても FAD 活性は著しく低かった。これらの結果から、麴中の FAD 活性は AIPAD に依存しており、AIPAD の発現量が製麴時間に比例して増加していることを示唆している。

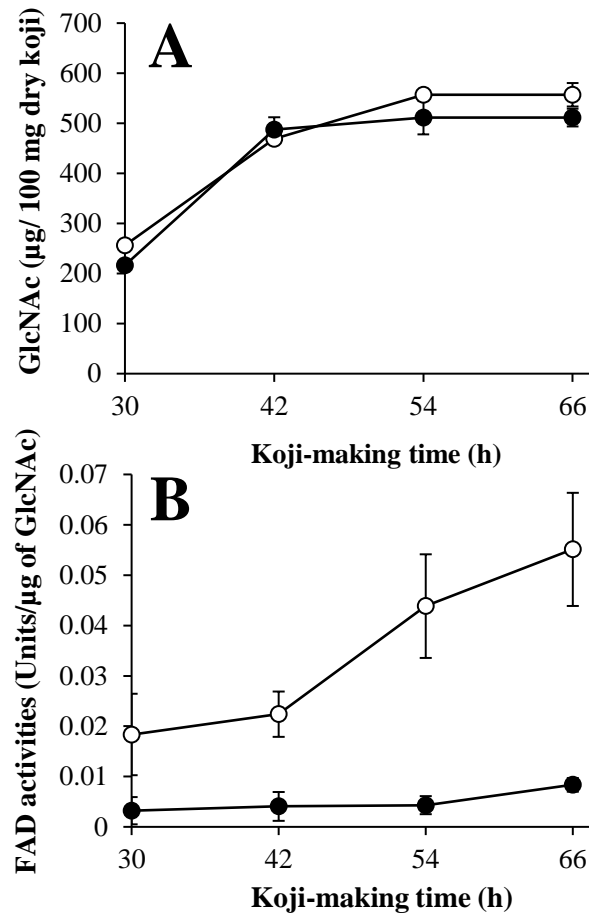


Fig. 4-6. The amount of GlcNAc in koji and FAD activity using CFE of koji.

(A) Amounts of GlcNAc, correlating with amounts of mycelia, in koji during koji making. (B) FAD activity using CFE which were prepared from the koji containing equal amounts of GlcNAc each other. One unit of enzyme activity defined as the amount of enzyme that released 1 μmol of 4-VG per min at 40°C. Open circle and filled circle indicate wild type and $\Delta alpad$ strains, respectively. Error bars indicate the standard deviation of three replicates.

第5項 野生株および $\Delta alpad$ 株の醸造試験

野生株と $\Delta alpad$ 株の製麴時間の異なる麴を用いて仕込んだモロミ中の FA および 4-VG の量を比較した。Fig. 4-7 にモロミ中の FA および 4-VG の濃度の製麴時間 (30, 42, 54 および 66 時間) およびモロミ発酵時間 (0, 1, 2, 3, 7, および 14 日) における経時変化を示した。野生株において、FA 量はモロミ発酵時間とともに増加したが、モロミ発酵後半は製麴時間にとまないう減少した (Fig. 4-7A)。一方で、 $\Delta alpad$ 株において、FA 量はモロミ発酵時間とともに増加したが、製麴時間にとまないう変化はほとんど無かった (Fig. 4-7B)。野生株において、4-VG 量はモロミ発酵時間および製麴時間とともに増加した (Fig. 4-7C)。 $\Delta alpad$ 株において、4-VG 量は野生株と比較して著しく低く、モロミ発酵時間および製麴時間に対して変化が見られなかった (Fig. 4-7D)。

Fig. 4-8A に、モロミ発酵 14 日目の FA および 4-VG 量の製麴時間に対する変化を示した。野生株において、製麴時間に伴い著しく FA 量が減少し、4-VG 量は著しく増加しており、FA 量と 4-VG 量の変化には負の相関がみられた。 $\Delta alpad$ 株においては、どの製麴時間においても FA および 4-VG 量は一定で、野生株と比較して FA 量は多く、4-VG 量は著しく低かった。野生株で仕込んだモロミを蒸留した蒸留液中の 4-VG 量は製麴時間に伴い著しく増加した (Fig. 4-8B)。野生株 66 時間製麴区のモロミ中の 4-VG の蒸留液への移行率は約 60% 程度であった。一方、 $\Delta alpad$ 株では、どの製麴時間においても 4-VG 量は著しく低かった。この結果を基に、泡盛醸造中の 4-VG 生産における AIPAD の寄与率*を算出すると、製麴時間 42-66 時間の麴を用いた泡盛醸造の 4-VG 生産における AIPAD の寄与率は約 88-94% であることが分かった。

*AIPAD の寄与率 (%) = [(野生株の蒸留液中の 4-VG 量 - $\Delta alpad$ 株の蒸留液中の 4-VG 量) / 野生株の蒸留液中の 4-VG 量] × 100

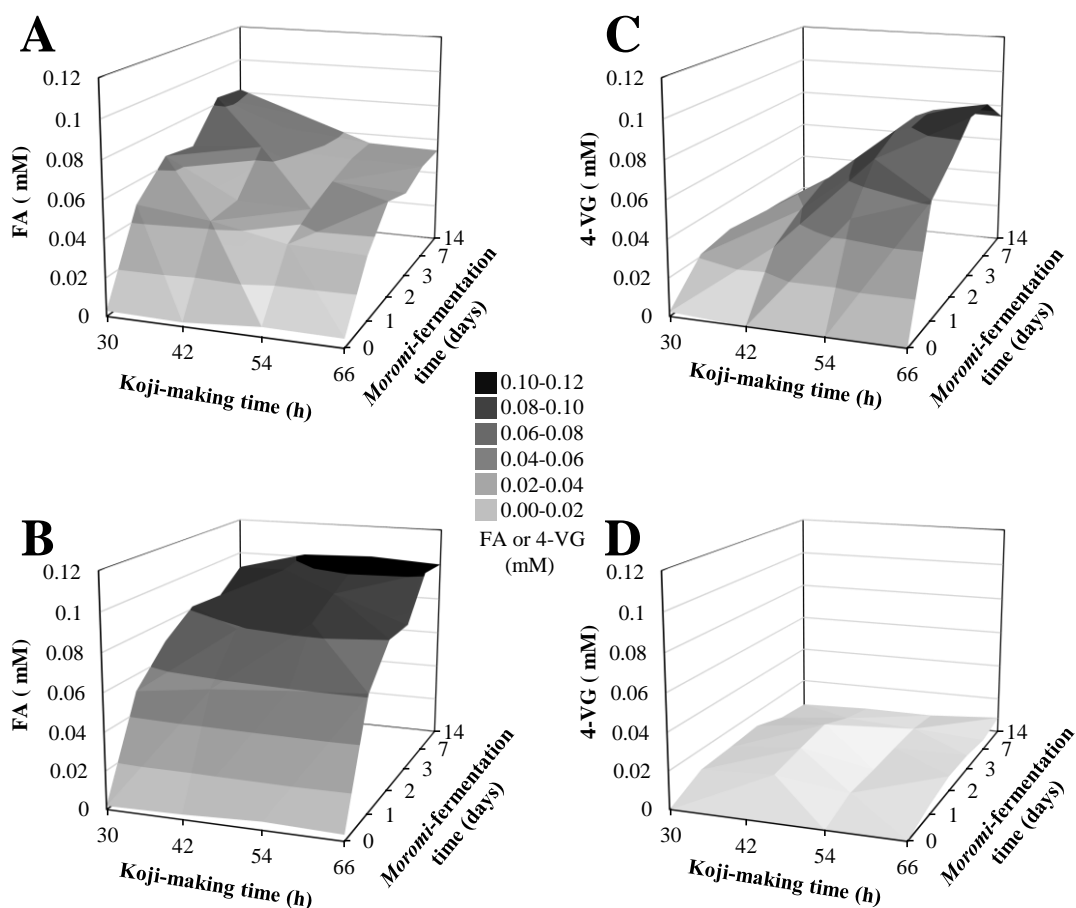


Fig. 4-7. Concentration of FA and 4-VG in moromi.

A and C show the results using wild strain. B and D show the results using $\Delta alpad$ strain. A and B indicate concentration of FA. C and D indicate concentration of 4-VG. The gray scales show concentrations of FA or 4-VG according to symbols with numbers at the center of this figure.

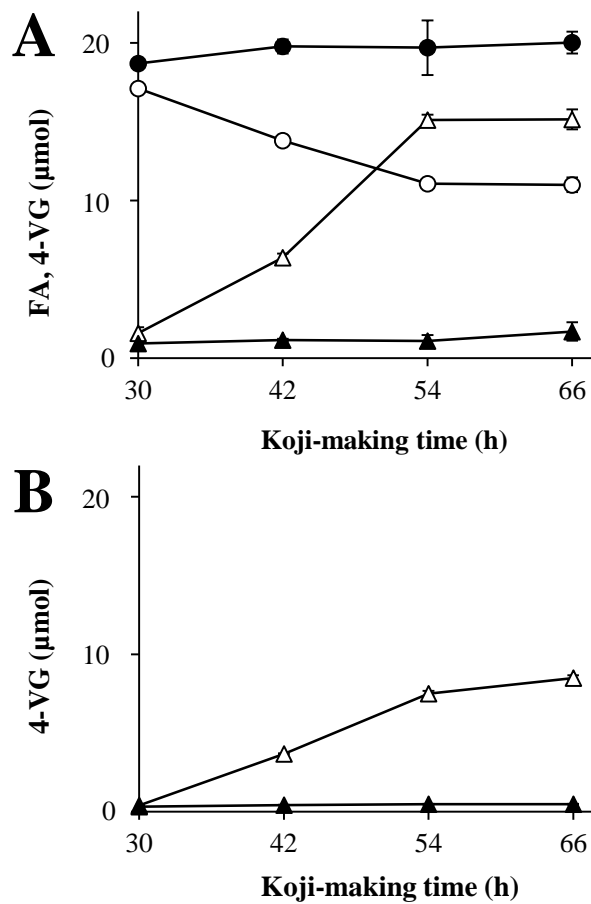


Fig. 4-8. The koji-making time dependent change of FA and 4-VG amounts in *moromi* and distillate.

Moromi was used at 14 days after start of *moromi*-fermentation. A and B indicate amounts of FA and 4-VG in *moromi* and its distillate, respectively. Open and closed symbols indicate wild-type and $\Delta alpad$ strains, respectively. Circle and triangle indicate FA and 4-VG, respectively. Error bars indicate the standard deviation of three replicates.

第6項 モロミ中の麴菌のFAD活性の測定

野生株を用いて作製した麴のFAD活性は、麴の製麴時間に伴い増加していた。麴の重量あたりのFAD活性は、モロミ中の4-VG濃度の増加と正の相関が見られた(Fig. 4-9)。本結果から、泡盛醸造中の4-VGの生成において次の2つの可能性が考えられた。1つは、製麴中に増大したFAD活性によって、製麴中に4-VGが生成され、それがモロミ発酵中に麴からモロミ中に徐々に溶出される可能性。もう1つは、製麴中に増大したFAD活性によって、モロミ

発酵中に 4-VG が生成される可能性である。そこで、モロミで検出された 4-VG が製麴中とモロミ発酵中のどちらで生成されているのかを検証した。野生株で作製した製麴時間 66 時間目の麴 100 g あたりに含まれる 4-VG の量は 0.1 μmol 未満であった (Fig. 4-10)。同じ麴 100 g で仕込んだモロミのモロミ発酵 1, 2 および 3 日目の 4-VG 量は、それぞれ 12.4, 14.7 および 17.6 μmol であった (Fig. 4-11B-D)。モロミで検出された 4-VG 量は麴中の 4-VG 量より 2 桁多かったことから、モロミで検出された 4-VG のほとんどがモロミ発酵中に生成されていることがわかった。モロミ発酵 3 日後の 4-VG 量は 7 日目まで変化せず、その後 14 日目までにわずかに減少していた (Fig. 4-11D-F)。これらの結果から、麴中の *A. luchuensis* 菌体がモロミ発酵初期に FA を 4-VG に変換していることが示唆された。

次に、モロミ中の麴菌が FA を 4-VG に変換する能力があるかどうか？それが仕込後何日目まで発揮できるのかを検証した。野生株により 42 時間製麴した麴で仕込んだモロミを用いた。モロミ発酵 0, 1, 2, 3 および 4 日目のそれぞれのモロミに 1 mM FA を添加し、FA および 4-VG の濃度を 24 時間ごとに 3 日間測定した (Fig. 4-12A) (図中の "DAM" は days after start of *moromi fermentation* の略で、モロミ発酵開始からの日にち)。モロミ発酵時間にかかわらず、添加した FA は 24 時間後にはある一定量減少し、減少量はモロミ発酵 0 から 1 日目で最も大きく、次に 1 から 2 日目、2 から 3 日目以降の減少量はほぼ一定であった (Fig. 4-12B)。モロミ発酵 0 日目に FA を添加すると、その 24 時間後に 4-VG が増加し、同様にしてモロミ発酵 2 日目までに FA を添加すると、その 24 時間後に 4-VG が増加することが分かった (Fig. 4-12C)。また、通常のもろミと FA を添加したモロミにおいて、1 日あたりに生成される 4-VG の量はモロミ発酵 1 日目で最も多く、その後 3 日目にかけて減少し、その後はほとんど生成されないことがわかった (Fig. 4-13A および B)。これらの結果から、モロミ中の麴菌がモロミ発酵開始後 2 日以内は、FA を 4-VG に変換することができることが分かった。

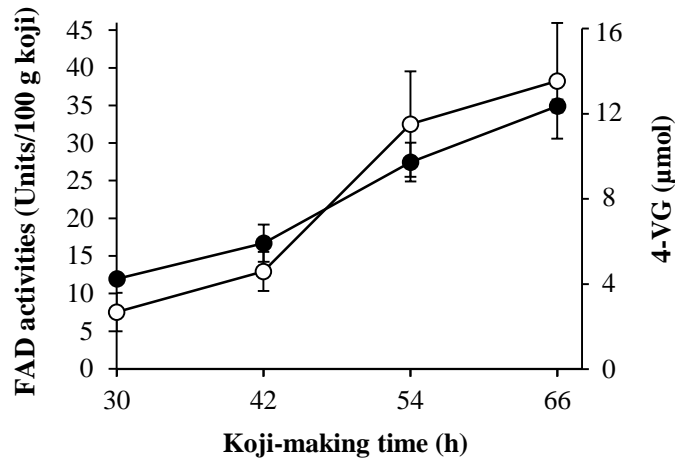


Fig. 4-9. Correlation between FAD activity per 100 g of koji and 4-VG amounts in *moromi* at 1 day after start of *moromi*-fermentation.

The FAD activity per 100 g of koji was calculated from the results shown in Fig. 4-6A and 4-6B. The data of 4-VG amounts in *moromi* is the same as Fig. 4-11B. Open circle and filled circle indicate FAD activity in koji and 4-VG amount in *moromi*. Error bars indicate the standard deviation of three replicates.

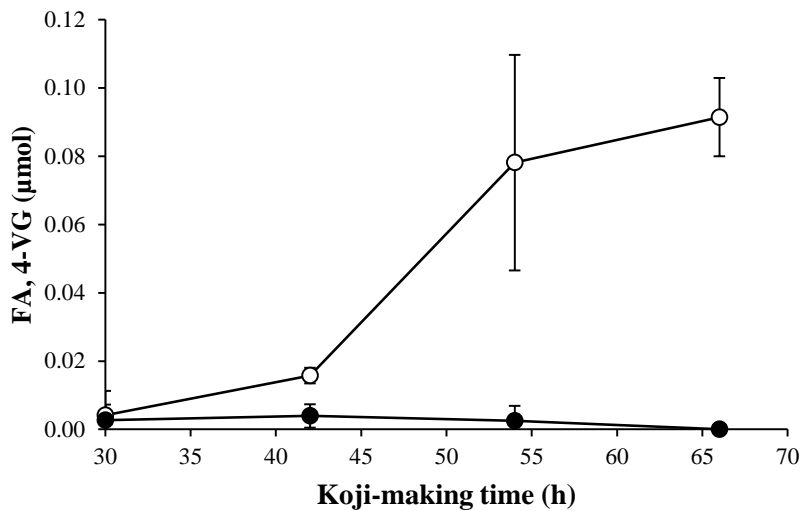


Fig. 4-10. Amount of 4-VG contained in 100g of koji

The amount of 4-VG contained in 100g of koji quantified using LC/MS/MS. Open circle and filled circle indicate wild type and $\Delta alpad$ strains, respectively. Error bars indicate the standard deviation of three replicates.

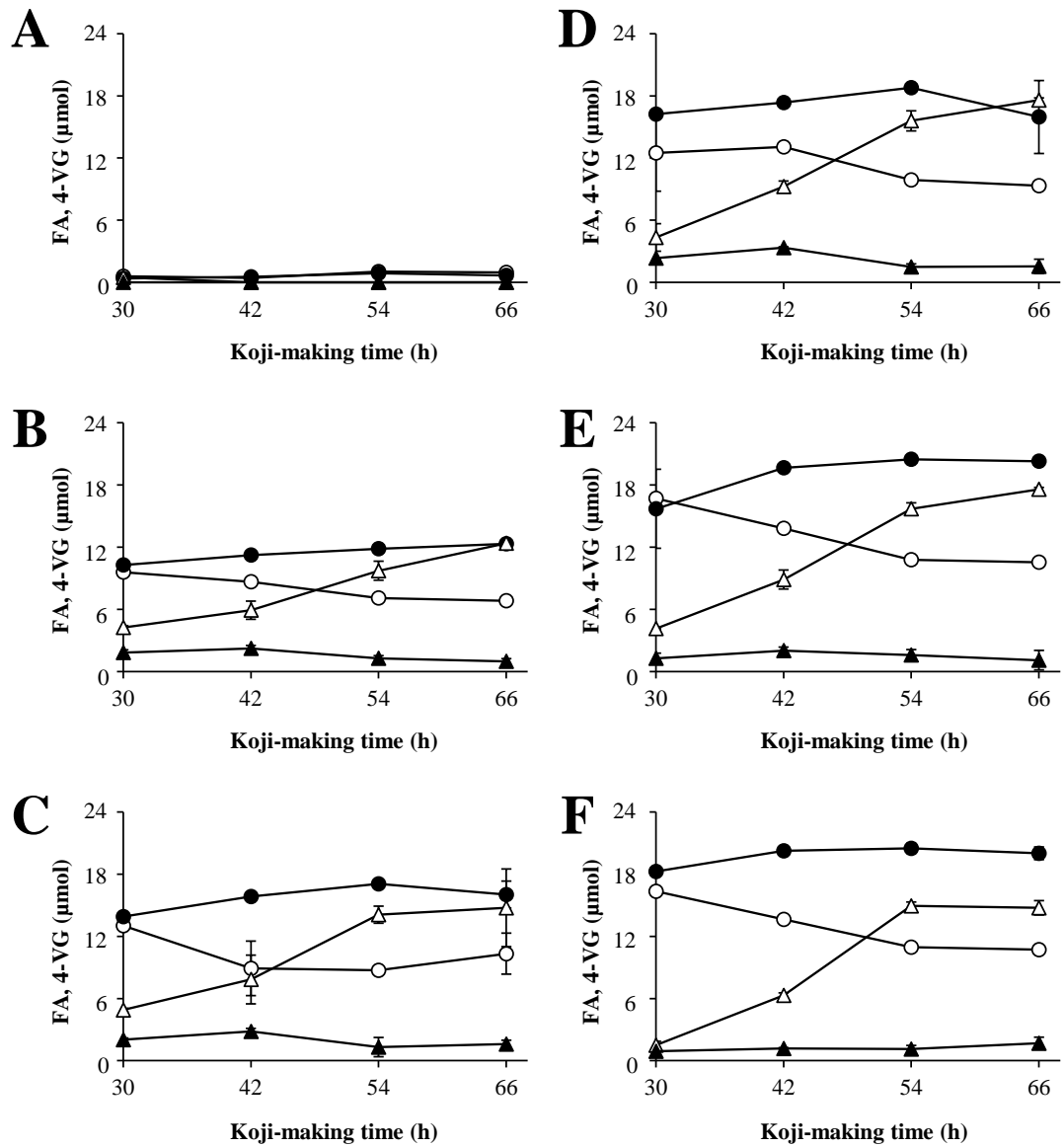


Fig. 4-11. Change of the amounts of FA and 4-VG in *moromi* depending on the koji-making time.

A, B, C, D, E, and F indicate *moromi* at 0, 1, 2, 3, 7, and 14 days after start of *moromi*-fermentation. Open and closed symbols indicate wild-type and $\Delta alpad$ strains, respectively. Circles and triangles indicate FA and 4-VG, respectively. Error bars indicate the standard deviation of three replicates.

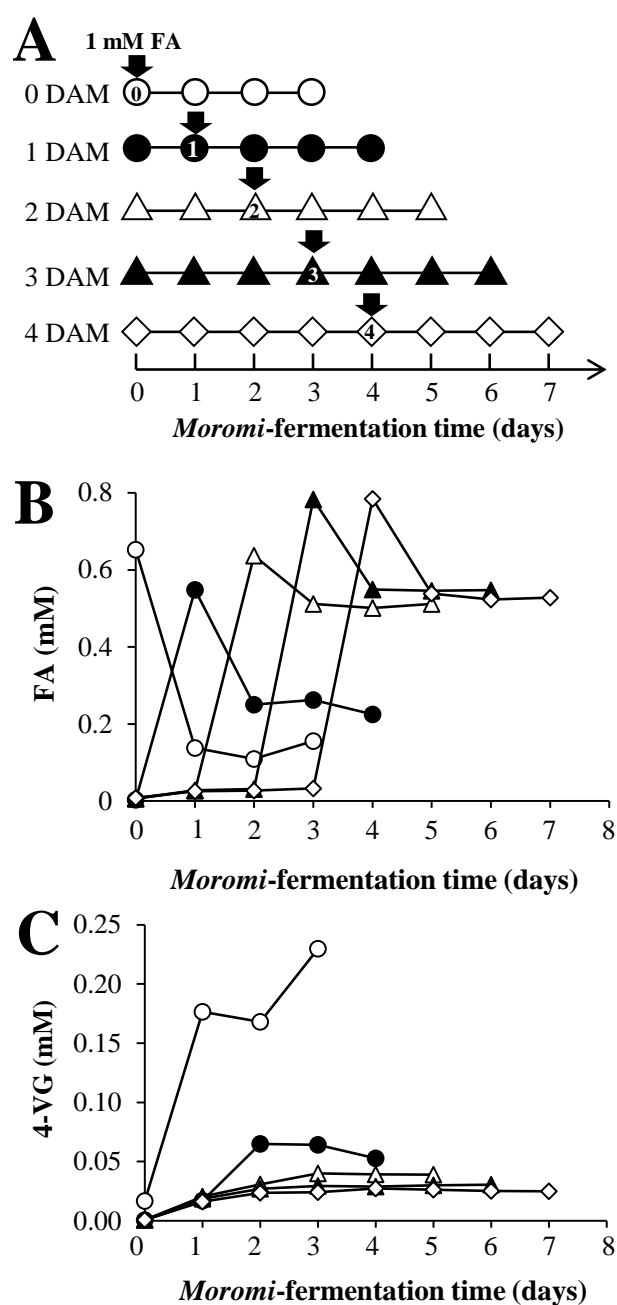


Fig. 4-12. The *moromi*-fermentation time dependent change of FAD activities of koji in *moromi*.

Moromi was prepared by koji at 42 h after the beginning of koji making using wild-type strain as described in the Materials & Methods section. (A) 1 mM FA was added to the each *moromi* at 0, 1, 2, 3, and 4 days after start of *moromi* fermentation (DAM), and the concentrations of FA (B) and 4-VG (C) were measured every 24 hours until 3 days after the addition of FA. The bold arrow indicates the day on which the FA was added. Open circle, closed circle, open triangle, closed triangle, and diamond indicate 0, 1, 2, 3, and 4 days after start of *moromi* fermentation, respectively.

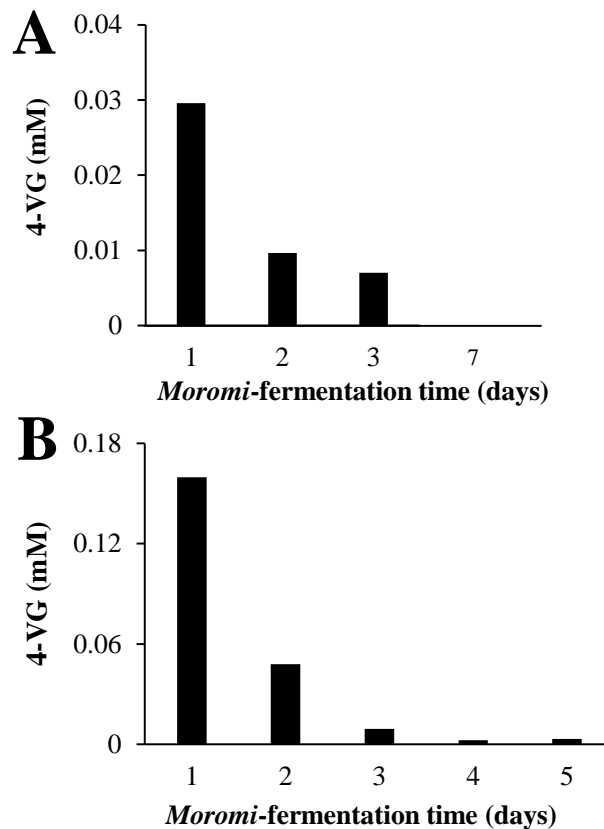


Fig. 4-13. Comparison of increased amounts of 4-VG for one day between normal *moromi* and FA-added *moromi*.

The increased amount of 4-VG for one day was obtained by subtracting the amount of the previous day from the amount of the day. A and B indicate normal *moromi* and FA-added *moromi*, respectively. The calculated values in A and B were obtained from Fig. 4-7C and Fig. 4-12C, respectively.

第7項 蒸留時の熱によるFAから4-VGへの変換

Koseki ら(1996)は、モデル焼酎モロミを用いて、FA が蒸留時に熱によって4-VGに変換されることを報告している。本研究では、 $\Delta alpad$ 株の麴で仕込んだモロミの蒸留液中の4-VG濃度が著しく低く、定量限界値以下であった(Fig. 4-8B)ため、蒸留液時の熱によるFAから4-VGへの変換率を算出することができなかった。変換率を算出するために、一定量のFAを添加したモロミを用いた蒸留試験を行った。モロミには0.1, 0.5または1 mMのFAを添加した。AIPADの影響を除くために $\Delta alpad$ 株を用い、製麴時間66時間の麴で仕込んだモロミ発酵

14 日目のモロミを蒸留試験に使用した。また、蒸留液はエタノール濃度 10% (w/w) まで回収した。その結果、FA 濃度に関係なく FA から 4-VG への変換率は一定で、蒸留粕および蒸留液に、それぞれモロミ中の FA の 1/10 および 1/50 に相当する 4-VG が検出された (Fig. 4-14A および B)。言い換えると、モロミ中の FA の 12% が蒸留時の熱によって 4-VG に変換され、その 6 分の 1 (モロミ中の FA を 100% とすると 2%) が蒸留液に移行することがわかった (Fig. 4-14C)。この移行率から、蒸留液時の熱による 4-VG への寄与を算出した。15.1 mmol の 4-VG および 11 mmol の FA を含むモロミ (野生株の製麹時間 66 時間の麹を用いて仕込んだモロミ発酵 14 日目のモロミ) から、8.5 μmol の 4-VG が蒸留液中に検出されている (Fig. 4-8)。上記の移行率であれば、モロミ中の 11 μmol の FA から蒸留により蒸留液中に 0.22 μmol の 4-VG を得ることができる。この結果から、泡盛醸造における 4-VG 生成の蒸留時の熱による寄与率は約 2.6% ($0.22 \mu\text{mol}/8.5 \mu\text{mol}$) と算出された。これらの結果から、蒸留時の熱による 4-VG 生成への寄与は、泡盛醸造における AIPAD の寄与よりもはるかに低いことがわかった。

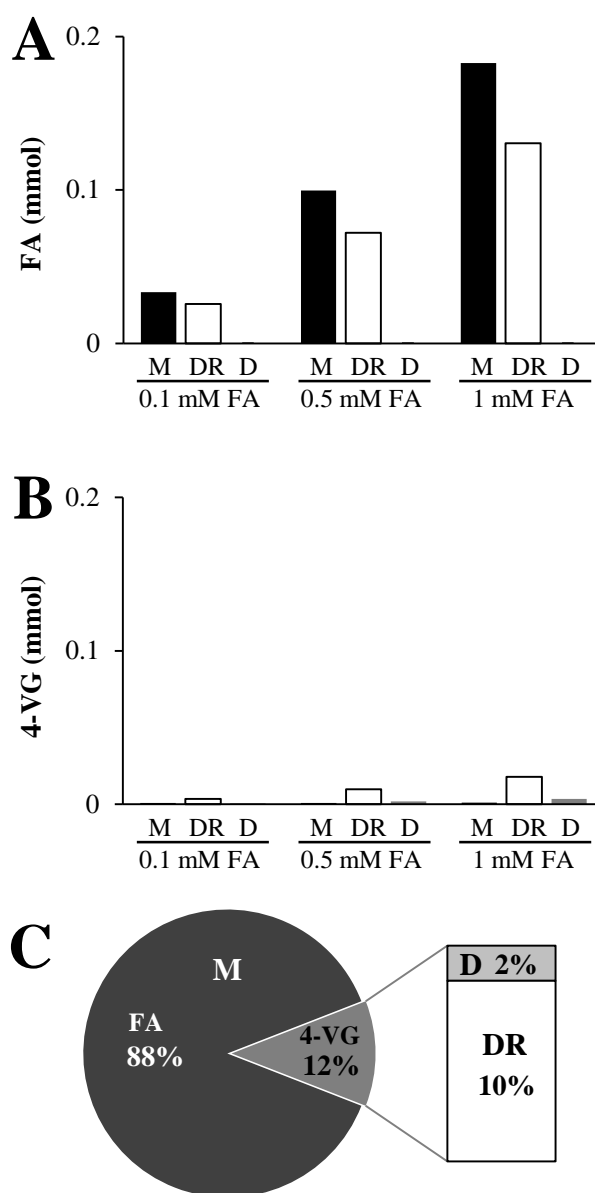


Fig. 4-14. Effect of heat during distillation using FA added *moromi* on conversion of FA to 4-VG.

A and B indicate amounts of FA and 4-VG, respectively. C indicate conversion rate of FA to 4-VG. M, *moromi*; DR, distillation remnants (distillation remaining solution); D, distillate.

第 8 項 *A. kawachii* Δ AKAW08977 株を用いた FAD 活性への影響

A. luchuensis の 4-VG 生産に PAD1 (AKAW08977) が関与しているのかを明らかにするために、 Δ *A. kawachii* Δ AKAW08977 株を用いた静止菌体反応による FAD 活性をコントロール株と比較した (Fig. 4-15)。静止菌体反応の結果、*A. kawachii*_cntl 株と *A. kawachii* Δ AKAW08977 は、反応時間に伴い 4-VG 濃度が著しく増加し、その増加量はほぼ同程度であった。これらの結果から、PAD1 は *A. luchuensis* の FA から 4-VG への変換に関与していないことが示唆された。

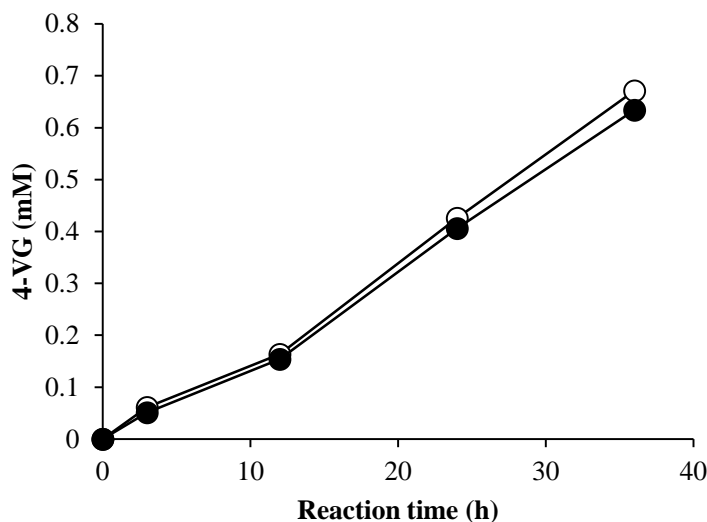


Fig. 4-15. Bioconversion of FA to 4-VG in resting cell of *A. kawachii* Δ AKAW08977 strain.

The fungal cells for resting cells reaction were prepared as described in the Materials & Methods section. The cells with 4 mM FA solution were incubated at 30°C for certain time, and the concentrations of 4-VG in the supernatant were measured. Open and filled circles indicate *A. kawachii*_cntl and *A. kawachii* Δ AKAW08977 strains, respectively.

第4節 考察

「泡盛醸造中の 4-VG 生産への AIPAD の寄与」

野生株において、蒸留液中の 4-VG 量は製麴時間に伴い増加し、モロミ中の 4-VG 量に比例することがわかった (Fig. 4-8)。一方で $\Delta alpad$ 株では、蒸留液中の 4-VG 量は著しく少なく、製麴時間による変化は見られなかった (Fig. 4-8B)。66 時間製麴した麴を用いた泡盛醸造における 4-VG 生成への AIPAD の寄与率は約 94%と算出されている。一方で、Kosekiら(1996)は実際のもろみの代わりに酢酸緩衝液およびエタノールを含む焼酎のモデル溶液を用いて、FA の一部は蒸留時の熱によって 4-VG に変換されることを示している。本研究では、一定量の FA を添加した実際のもろミを用いて、一般的に使用されている蒸留条件を用いて変換率を調べた。その結果、泡盛醸造における 4-VG 生成の蒸留時の熱による寄与率は約 2.6%であることがわかった。結論として、泡盛醸造において AIPAD が 4-VG 生成の主要因であることが明らかとなった。

「*A. luchuensis* の細胞はモロミ発酵初期は代謝可能な状態で維持されており、モロミ中で FA から 4-VG の変換を行っている」

野生株で製麴した麴の FAD 活性は、麴の製麴時間に伴い増加し、それはモロミ中の 4-VG 濃度の増加と相関していた (Fig. 4-9)。当初、我々は製麴中に発現された AIPAD の働きによって麴中の 4-VG が増え、それがモロミ中に溶出されると考えていた。しかしながら、麴に含まれる 4-VG の量は極めて少なく、モロミ発酵 1-3 日目の 4-VG 量は、その 100 倍以上検出された (Fig. 4-10 および 4-11B-D)。これらの結果から、製麴中に AIPAD は発現・蓄積されるが、FA を 4-VG に変換する反応はモロミ発酵工程中に行われていることが分かった。モロミ発酵時間に伴う 4-VG 生成の結果から、モロミで検出された 4-VG のほぼ全てがモロミ発酵の初期段

階で生成されたことが明らかになった (Fig. 4-11B-D)。第 2 章より *alpad* の ORF にはシグナル配列が無いいため、AIPAD は細胞質に局在すると考えられる。また、AIPAD は pH 4.0 以下では FAD 活性を示さないことがわかっている。麴とモロミは *A. luchuensis* が生産するクエン酸によって通常 pH 3.5 程度になっている。従って、AIPAD はモロミ中では細胞外で FA から 4-VG への変換を触媒することができないと考えられた。静止菌体反応においては、菌体は十分な量の生理食塩水で洗浄している。従って、細胞外酵素が FAD 活性に影響を与える可能性はないと考えられる。よって、*A. luchuensis* は細胞外から FA を取り込み、細胞質内で AIPAD により 4-VG に変換し、その 4-VG を菌体外に放出していると考えられた。このことから、モロミ発酵中に FA を 4-VG に変換するためには、麴中の *A. luchuensis* の細胞が代謝可能な状態でモロミ中で維持されていなければならないことを意味している。*A. luchuensis* は好気性微生物であることから、麴中の *A. luchuensis* 菌体は、モロミ中では生存出来ないと考えられている。一方で、菌体が死滅したとしても、酸耐性を有するアミラーゼやプロテアーゼなどの細胞外酵素がモロミで機能できる。本研究では、モロミ中の 4-VG 量はモロミ発酵開始から 3 日目まで増加し、その後は十分な量の FA が利用可能であるにもかかわらず増加しなかった (Fig. 4-7 および 4-11)。これらの結果は、いくらかの *A. luchuensis* の細胞がモロミ発酵 2 日目まで代謝可能な状態で維持されており、その後死滅状態であることを示唆している。泡盛モロミの CO₂ 生成を伴うアルコール発酵は、発酵開始後 2~3 日でピークに達する (Miyazato et al., 1972)。永井ら (1992) は、酒モロミ中の溶存酸素 (DO) の影響について次のように報告している。DO の濃度は、発酵初期は 2-4 ppm と高いが、その後の発酵は 0-5 ppb と低かった。これらの知見から、モロミ発酵初期は微好気性状態であると考えられる。静止菌体反応においても反応初期は微好気性条件下と思われる。野生株を用いた静止菌体反応試験において、反応開始後少なくとも 36 時間まで FA 量の減少および 4-VG 量の増加が観察されている。この結果も *A. luchuensis* の細胞が微好気性条件下で一定期間代謝可能な状態で維持できるという仮説を支持してい

る。

「モロミ中の *A. luchuensis* が生産するフェルラ酸エステラーゼによる米麴から FA の遊離」

AIPAD が米細胞壁に由来する FA を 4-VG に変換するためには、米細胞壁中にエステル結合している FA を遊離させなくてはならない。モロミ中の FA は、米の細胞壁から *A. luchuensis* が生産するフェルラ酸エステラーゼによって遊離されたものである (Koseki et al., 1998)。原料米に含まれる全 FA 量 (本研究で使用したインディカ米の細胞壁にエステル結合している FA) を測定した結果、麴 100 g あたりに FA が $22.0 \pm 1.73 \mu\text{mol}$ 含まれていることがわかった。 $\Delta alpad$ 株の製麴時間 66 時間の麴 100 g を用いて仕込んだモロミ発酵 14 日目のモロミ中の FA は $20 \mu\text{mol}$ であった (Fig. 4-8A)。従って、米の細胞壁にエステル結合した FA のほとんどすべてが、モロミ発酵中にフェルラ酸エステラーゼによって遊離されたと考えられた。 $\Delta alpad$ 株の麴を用いたモロミ中の FA 量は、モロミ発酵 7 日目まで増加し、その後 14 日目まで変化しなかった (Fig. 4-7B および 4-11E, F)。これらの結果から、*A. luchuensis* の細胞が死滅しているモロミ発酵 3 日目以降でも、フェルラ酸エステラーゼはモロミ中で活性が維持されており、その酵素がモロミ発酵 7 日目までは、米細胞壁多糖からほぼすべての FA を遊離することができることが示唆された (Fig. 4-11E)。泡盛モロミ発酵中に、FA がある一定濃度存在するにも関わらず、4-VG に変換されずに残ってしまうのは、菌体内でしか活性を發揮できない AIPAD がモロミ発酵 3 日目までしか機能出来ないことと、フェルラ酸エステラーゼがモロミ発酵 7 日目まで機能することによって、米細胞壁中の FA をモロミ中に供給し続けていることに起因していると考えられた。

「*alpad* 破壊株の表現型および AIPAD の生理学的な機能」

表現型に対する *alpad* 破壊の影響を調べるために、野生株および $\Delta alpad$ 株を FA 含有培

地で培養した。その結果、野生株および $\Delta alpad$ 株の表現型に違いはみられなかった (Fig. 4-4)。FA は *S.cerevisiae* の生育を強く阻害することが報告されている (Baranowski et al., 1980)。また、高フェノール酸濃度条件下では *Lactobacillus plantarum* の *pad* 遺伝子破壊株の生育を阻害することが報告されている (Barthelmebs et al., 2000b)。従って、PAD は微生物においてフェノール酸の解毒の役割を果たすと考えられている。しかし、 $\Delta alpad$ 株は FA 存在下で野生株と同様に生育した (Fig. 4-4A-F)。従って、AIPAD にはおそらく他の生理学的な役割があると考えられた。また、野生株と $\Delta alpad$ 株のどちらも FA を唯一の炭素源として含む培地で増殖した (Fig. 4-4B, E)。よって、*A. luchuensis* は FA を生育するための炭素源として利用できることがわかった。一部の細菌では、FA を生育のための唯一の炭素源として利用できることが報告されている (Segura et al., 1999 ; Overhage et al., 1999)。 $\Delta alpad$ 株を用いた静止菌体反応において、細胞外液中の FA 量は減少していたが、4-VG は生成されていなかった (Fig. 4-5)。これらの知見および結果から、*A. luchuensis* が細胞外から積極的に FA を取り込み、炭素源として FA を利用する可能性があることが示唆された。しかしながら、FA 含有培地での $\Delta alpad$ 株の生育は野生株と同様に生育し、野生株において結果的に生じる 4-VG はすぐに細胞外に放出されることから、AIPAD は炭素源としての FA の代謝に寄与していないと考えられた。今後、AIPAD の生理的意義の解明に興味を持たれる。

「PAD1 の FAD 活性への寄与」

S. cerevisiae の Pad1p と Fdc1p は 2 つの酵素が発現することで FAD 活性を発揮することが報告されている (Mukai et al., 2010)。*A. luchuensis* には *S. cerevisiae* の *PAD1* と *FDC1* の遺伝子と相同性を有する配列が存在する。*S. cerevisiae* の *PAD1* と相同性のある遺伝子 (AKAW08977) が破壊された *A. kawachii* Δ AKAW08977 株の FA 培養菌体を用いて静止菌体反応を行った。その結果、*A. kawachii* Δ AKAW08977 株は *A. kawachii* Δ cnt1 株と同程度の

活性を示した。このことから、PAD1 は FAD 活性に関与していないことが示唆された。*S. cerevisiae* において Pad1p は Fdc1p が脱炭酸するために必要な補因子を作る役割があることが知られている。実際に脱炭酸を行っているのは Fdc1p であるため、今後 *FDC1* と相同性のある遺伝子を破壊した株を用いて FAD 活性にどの程度関与しているのか調べる必要がある。

第5章 総括

「泡盛醸造中の 4-VG 生産における AIPAD の寄与」

泡盛古酒の特徴香であるバニリンは、原料米中の細胞壁にエステル結合している FA が、黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* がもつフェルラ酸エステラーゼによって遊離し、脱炭酸反応によって 4-VG に変換され、それが貯蔵中に非酵素的酸化によってバニリンに変わることが知られている。これまでに、醸造中の FA から 4-VG への変換は、蒸留時の熱、酵母や乳酸菌がもつフェノール酸脱炭酸酵素によるものだと考えられてきた。一方、*A. luchuensis* のゲノム中に *Saccharomyces cerevisiae* の *PADI* および *FDCI* と相同性のある遺伝子と細菌類の *PAD* と相同性のある遺伝子が存在するが、その機能解析は行われていなかった。このように、バニリン生成に重要な FA の脱炭酸反応による 4-VG への変換が化学反応もしくは、どの微生物由来の酵素によって行われているのか明らかではなかった。そこで私は、*A. luchuensis* が持つ細菌類と相同性のあるフェノール酸脱炭酸酵素候補遺伝子 (*alpad*) が、4-VG 生成の主要因であるという仮説を立てた。本論文では、*alpad* 候補遺伝子が実際に酵素 (AIPAD) として発現し、泡盛醸造中の FAD 活性に寄与しているのかを明らかにすることを目的として研究を行った。

はじめに、AIPAD が FA を脱炭酸することができるのかを調べるために、リコンビナント酵素を調製し、その諸性質を調べた。AIPAD の最適温度は 40°C で、50°C まで安定であった。泡盛醸造において製麹中の温度は 35-40°C、モロミ発酵中の温度は 30°C 付近に保たれており、温度に対する性質においては、AIPAD は醸造中に FA の脱炭酸活性を維持することができることがわかった。AIPAD の最適 pH は pH 5.5 付近で、pH 4 以下、pH 8 以上では触媒活性が無く、pH 4.5 から 9.5 の範囲で安定であった。泡盛醸造中の麹およびモロミは、*A. luchuensis* が生成するクエン酸によって通常 pH 3.5 程度になっている。このことから、AIPAD は細胞外では FAD 活性を触媒することができないことがわかった。AIPAD はシグナル配列が無いことか

ら、細胞質に局在すると予測された。*Aspergillus niger* の細胞質は細胞外の pH を 1.5 から 7.0 の間で変化させても細胞内の pH を pH 7.6 付近に維持することが報告されている (Hesse et al. 2002)。従って、AIPAD は醸造中、*A. luchuensis* の細胞質において FAD 活性を触媒することが示唆された。

次に、泡盛醸造中の 4-VG 生産における AIPAD の寄与を明らかにするために、*Δalpad* 株を用いて小仕込み試験を行い、野生株と 4-VG 生産量を比較した。野生株で仕込んだモロミの蒸留液中の 4-VG 量は、製麹 42 時間以降 66 時間まで著しく上昇したのに対し、*Δalpad* 株の 4-VG 量は著しく少なく、かつほとんど変化しなかった。得られた結果から、製麹時間 42～66 時間の麹を用いた泡盛醸造の 4-VG 生産における AIPAD の寄与率は約 88-94%であると算出された。一方で、FA の一部は蒸留時の熱によって 4-VG に変換されることが報告されている (Koseki et al., 1996)。本研究では、一定量の FA を添加したモロミを用いて、一般的に使用されている蒸留条件を用いて、熱による 4-VG 生成への寄与率を調べた。その結果、泡盛醸造における 4-VG 生成の蒸留時の熱による寄与率は約 2.6%であることがわかった。以上のことから、泡盛醸造中の 4-VG 生成の主要因は AIPAD であることが明らかとなった。

「泡盛醸造中における 4-VG 生産のタイミング」

製麹中の麹無細胞抽出液の FAD 活性とモロミ中の 4-VG 量には相関があったことから、麹中で発現した AIPAD によって、製麹中に 4-VG が生産され、それがモロミ中に溶出されていると考えた。しかしながら、実際に麹中の 4-VG 量を定量すると、その量は極めて少なく、モロミ中の 1/100 以下しか無かった。従って、4-VG のほとんどはモロミ発酵中に生産されることは明らかであった。一方で、好気性微生物である *A. luchuensis* は嫌気条件下であるモロミ中ではすぐに死滅するものと考えられていた。前述の通り、pH 4 以下で活性を持たない AIPAD は泡盛モロミの pH(3.5)において、細胞外では機能できない。従って、モロミ発酵中に FA を 4-VG に

変換するためには、*A. luchuensis* の細胞がモロミ中で代謝可能な状態で維持されていなければならない。それを検証するために、モロミに多量の FA を添加し、一定時間後に 4-VG が生成されるかどうかを調べた。その結果、モロミ発酵 2 日目までに FA を添加すると、FA 添加後 1 日目に 4-VG が著しく増加することがわかった。このことから、*A. luchuensis* の細胞が代謝可能な状態でモロミ発酵 2 日目まで維持されており、その後維持されなくなる(死滅した)ことが示唆された。AIPAD の基質である FA も、その多くはモロミ発酵中に米細胞壁から遊離されることも分かった。 $\Delta alpad$ 株を用いた試験により、FA はモロミ発酵 7 日目頃までその量が増えることが分かり、FA を米細胞壁から遊離させる Fae は菌体外酵素で、麹菌が死滅しても、モロミ中で活性を発揮できることが示唆された。モロミ発酵中に FA がある程度残存するのは、AIPAD が麹菌が生きていないと機能できないのに対し、Fae は麹菌とは独立しても機能でき、FA をしばらくの間供給できることに起因していると考えられた。一方、製麹中に AIPAD の発現量は増大しているが、モロミ中で更にその発現量が増大している可能性も排除できない。麹が水中に沈められ、水を吸う事によって、菌体外酵素である Xln や Fae はより効率良くヘミセルロース成分にアクセスでき、その結果 FA が遊離され、モロミ中の FA 濃度が高まる。その濃度が高まった FA によって AIPAD が更に誘導されることが予測される。今後、これらを明らかにするために、麹を浸漬して後に、Xln や Fae、そして AIPAD が誘導されているのかどうかを調べる必要がある。

「製麹時間に伴う AIPAD の増大」

本研究において、AIPAD は製麹時間に伴い発現量が増加することが分かった。製麹中の *A. luchuensis* は米中のデンプンをグルコースに変換する。そのデンプンの量は時間の経過と伴に減少して行き、相対的比率の増えた細胞壁物質に対し、その分解に関与する酵素の発現が誘導されると予測される。よって、製麹後期は、細胞壁の分解に関係するキシラナーゼやフ

エルラ酸エステラーゼなどのいくつかの酵素が発現し、機能していると考えられる。AIPAD の発現も、これらの酵素によって生産された物質によって誘導される可能性がある。実際に、細胞壁成分が豊富に含まれている米ぬかによって AIPAD が誘導される。米ぬかには基質である FA も含まれているが、米ぬかに含まれる FA よりも高い濃度の FA で誘導しても、米ぬかと比較して AIPAD の誘導性が低いことがわかった。このことから、米ぬかには FA に加えて他の誘導物質の存在が示唆された。

「本研究の応用と今後の展開」

本研究の結果から、泡盛醸造中の FA から 4-VG への変換の主要因は AIPAD であることが明らかとなった。そして、製麹時間が長い程、AIPAD の発現量、モロミ中の 4-VG 濃度および蒸留液中の 4-VG 濃度が高まることがわかった。このことから、老麴がバニリン香に富んだ古酒を作るのに適していることが示唆された。これらの結果は、泡盛酒造所の多くの杜氏が経験に基づき、古酒を作るために老麴を使用していることを科学的に明らかにした。しかし、製麹時間と共に AIPAD の発現が増加する理由についてはわかっていない。今後、トランスクリプトーム、プロテオームおよびメタボローム解析などのオミックス解析および転写調節に関わる遺伝子の解析等による AIPAD の発現誘導メカニズムの全貌の解明が期待される。また、今回の研究成果は、実用菌株である *A. luchuensis* var. *awamori* ISH1 株を用いたものとなっている。これまでに、ゲノムが読まれた *A. luchuensis* NBRC 4314 株でも研究を進めていたが、AIPAD 発現量および 4-VG 生産量は ISH1 株と比較すると極めて低いという結果が得られている。これらの結果は、菌株によって AIPAD の発現量とそれに伴う 4-VG 生成能が大きく異なることを示しており、より 4-VG 生産能の高い菌株を育種、分離する研究開発にも期待が持たれる。これら本研究で得られる成果は、バニリン香に富む付加価値の高い古酒の製造技術の確立に大きく貢献するものと確信する。清酒や焼酎などにおいては 4-VG はオフ・フレーバーとなるため、本研究の

成果は 4-VG を減らす技術開発への寄与も期待される。また、各種網羅的解析により、バニリンだけではなく、麹菌による他の香味成分を含む有用二次代謝産物の生成過程やメカニズムに関するデータが得られることから、本研究の成果は黒麹を用いる焼酎および泡盛の酒質制御および米麹や蒸留粕の機能性の向上に重要な知見を与えることが期待される。

「AIPAD の生理学的な機能」

本研究を通じて、泡盛醸造における 4-VG 生産に対して、AIPAD が決定的に重要であることが分かったが、自然界における AIPAD の役割は不明である。FA には微生物の生育を阻害する活性があり、PAD は微生物において FA の解毒の役割を果たすと考えられている。しかし、*Δalpad* 株は FA 存在下で野生株と同様に生育し、FA を唯一の炭素源として含む培地で野生株と同様に増殖した。PAD superfamily は細菌類で多く研究されて来たが、真菌類での研究例は本研究を含めて 3 例のみで、その生理的役割については全く分かっていない。一方、データベース上ではそのホモログが真菌類に広く存在している。今後、真菌類における PAD superfamily の生理的意義の解明に興味を持たれる。

参考文献

Baranowski, J. D., Davidson, P. M., Nagel, C. W., and Branen, A. L.: Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by naturally occurring hydroxycinnamates, *J. Food Sci.*, 45, 592-594 (1980).

Barthelmebs, L., Lecomte, B., Divies, C., and Cavin, J.-F.: Inducible metabolism of phenolic acids in *Pediococcus pentosaceus* is encoded by an autoregulated operon which involves a new class of negative transcriptional regulator, *J. Bacteriol.*, 182, 6724-6731 (2000a).

Barthelmebs, L., Divies, C., and Cavin, J. F.: Knockout of the *p*-coumarate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3368-3375 (2000b).

Cavin, J. and Barthelmebs, L.: Purification and characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 147, 291-295 (1997).

Cavin, J.-F., Dartois, V., and Diviès, C.: Gene cloning, transcriptional analysis, purification, and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus subtilis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1466-1471 (1998).

Clausen, M., Lamb, C. J., Megnet, R., and Doerner, P. W.: *PADI* encodes phenylacrylic acid decarboxylase which confers resistance to cinnamic acid in *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene*, 142, 107-112 (1994).

de Vries, R. P. and Visser, J.: Regulation of the feruloyl esterase (*faeA*) gene from *Aspergillus*

niger, Appl. Environ. Microbiol., 65, 5500-5503 (1999).

Edlin, D. A. N., Narbad, A., Gasson, M. J., Dickinson, J. R., and Lloyd, D.: Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*, Enzym. Microb. Technol., 22, 232-239 (1998).

Felsenstein, J.: Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap, Evolution., 39:783-791(1985).

Fujii, F., Ozeki, K., Kanda, A., Hamachi, M., and Nunokawa, Y.: A simple method for the determination of grown mycelial content in Rice-*koji* using commercial cell wall lytic enzyme, yatalase, J. Brew. Soc. Japan, 87, 757-759 (1992).

Futagami, T., Mori, K., Yamashita, A., Wada, S., Kajiwara, Y., Takashita, H., Omori, T., Takegawa, K., Tashiro, K., Kuhara, S., and Goto, M.: Genome announcement: genome sequence of the white koji mold *Aspergillus kawachii* IFO 4308, used for brewing the Japanese distilled spirit shochu, Eukaryot. Cell, 10, 1586-1587 (2011).

Gury, J., Barthelmebs, L., Tran, N. P., Diviès, C., and Cavin, J.-F.: Cloning, deletion, and characterization of PadR, the transcriptional repressor of the phenolic acid decarboxylase-encoding *padA* gene of *Lactobacillus plantarum*, Appl. Environ. Microbiol., 70, 2146-2153 (2004).

Hesse, S. J. A., Ruijter, G. J. G., Dijkema, C., and Visser, J.: Intracellular pH homeostasis in the filamentous fungus *Aspergillus niger*, Eur. J. Biochem., 269, 3485-3494 (2002).

Hong, S. B., Yamada, O., & Samson, R. A.: Taxonomic re-evaluation of black koji molds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(2), 555-561 (2014).

Huang, H. K., Tokashiki, M., Maeno, S., Onaga, S., Taira, T., and Ito, S.: Purification and properties of phenolic acid decarboxylase from *Candida guilliermondii*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 55-62 (2012a).

Huang, H. K., Chen, L. F., Tokashiki, M., Ozawa, T., Taira, T., and Ito, S.: An endogenous factor enhances ferulic acid decarboxylation catalyzed by phenolic acid decarboxylase from *Candida guilliermondii*, *AMB Express*, 2, 4 (2012b).

Igarashi, K., Hatada, Y., Hagihara, H., Saeki, K., Takaiwa, M., Uemura, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S., Kobayashi, T., and Ito, S.: Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3282-3289 (1998).

Koseki, T., Ito, Y., Furuse, S., Ito, K., and Iwano, K.: Conversion of ferulic acid into 4-vinylguaiacol, vanillin and vanillic acid in model solutions of *shochu*, *J. Ferment. Bioeng.*, 82, 46-50 (1996).

Koseki, T., Furuse, S., Iwano, K., and Matsuzawa, H.: Purification and characterization of a ferulylesterase from *Aspergillus awamori*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 2032-2034 (1998).

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K.: MEGA X: Molecular Evolutionary

Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 35:1547-1549 (2018).

Kyhse-Andersen, J.: Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 10, 203-209 (1984).

Landete, J. M., Rodríguez, H., Curiel, J. A., de las Rivas, B., Mancheño, J. M., and Muñoz, R.: Gene cloning, expression, and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Lactobacillus brevis* RM84, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 617-624 (2010).

Linke, D., Riemer, S. J., Schimanski, S., Nieter, A., Krings, U., & Berger, R. G.: Cold generation of smoke flavour by the first phenolic acid decarboxylase from a filamentous ascomycete—*Isaria farinosa*. *Fungal. Biol.*, 121(9), 763-774 (2017).

Michielse, C. B., Hooykaas, P. J., Van Den Hondel, C. A., and Ram, A. F.: *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*, *Nat. Protoc.*, 3, 1671 (2008).

Miyazato, K. and Osiro, K.: Studies on quantitative changes of composition in fermentation period of Awamori moromi, *Sci. Bull. Fac. Agric. Univ. Ryukyus*, 19, 291-297 (1972).

Mukai, N., Masaki, K., Fujii, T., Kawamukai, M., and Iefuji, H.: *PADI* and *FDCI* are essential for the decarboxylation of phenylacrylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biosci. Bioeng.*, 109, 564-569 (2010).

Mukai, N., Masaki, K., Fujii, T., and Iefuji, H.: Single nucleotide polymorphisms of *PADI* and *FDCI* show a positive relationship with ferulic acid decarboxylation ability among industrial yeasts used in alcoholic beverage production, *J. Biosci. Bioeng.*, 118, 50-55 (2014).

Mukai, N., Okada, A., Suzuki, A., and Takagashi, T.: Comparison of the brewing properties of beer yeasts and other yeasts used in alcohol beverage production, *J. Brew. Soc. Jpn.*, 93, 967-975 (1998)

Nagai, H., Kondo, K., Mishima, H., and Takemura, S.: Effects of dissolved oxygen on *sake* brewing, *J. Brew. Soc. Jpn.*, 70, 361-369 (1992).

Oliveira, D.M., Mota, T.R., Salatta, F.V., Marchiosi, R., Gomez, L.D., McQueen-Mason, S.J., Ferrarese-Filho, O. and dos Santos, W.D.: Designing xylan for improved sustainable biofuel production, *Plant. Biotechnol. J.*, 17: 2225-2227 (2019).

Orejas, M., MacCabe, A. P., Pérez González, J. A., Kumar, S., & Ramón, D.: Carbon catabolite repression of the *Aspergillus nidulans xlnA* gene. *Mol. Microbiol.*, 31(1), 177-184 (1999).

Oshoma, C. and Ikenebomeh, M.: Production of *Aspergillus niger* biomass from rice bran, *Pakistan J. Nutr.*, 4, 32-36 (2005).

Overhage, J., Priefert, H., and Steinbüchel, A.: Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in *Pseudomonas* sp. strain HR199, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4837-4847 (1999).

Payne, K. A., White, M. D., Fisher, K., Khara, B., Bailey, S. S., Parker, D., Rattray, N. J. W.,

Trivedi, D. K., Goodacre, R., Beveridge, R., Barran, P., Rigby, S. E., Scrutton, N. S., Hay, S., Leys, D.: New cofactor supports α , β -unsaturated acid decarboxylation via 1,3-dipolar cycloaddition, *Nature*, 522, 497-501 (2015).

Prim, N., Pastor, F. I. J., and Diaz, P.: Biochemical studies on cloned *Bacillus* sp. BP-7 phenolic acid decarboxylase PadA, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63, 51-56 (2003).

Reissig, J. L., Strominger, J. L., and Leloir, L. F.: A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetylamino sugars, *J. Biol. Chem.*, 217, 959-966 (1955).

Rodríguez, H., Angulo, I., de las Rivas, B., Campillo, N., Páez, J. A., Muñoz, R., and Mancheño, J. M.: *p*-Coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: structural insights into the active site and decarboxylation catalytic mechanism, *Proteins Struct. Funct. Bioinform.*, 78, 1662-1678 (2010).

Rodríguez, H., Landete, J. M., de las Rivas, B., and Muñoz, R.: Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748^T, *Food Chem.*, 107, 1393-1398 (2008).

Saitou, N., and Nei, M.: The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.*, 4:406-425n(1987).

Segura, A., Bünz, P. V., D'Argenio, D. A., and Ornston, L. N.: Genetic analysis of a chromosomal region containing *vanA* and *vanB*, genes required for conversion of either ferulate or vanillate to protocatechuate in *Acinetobacter*, *J. Bacteriol.*, 181, 3494-3504 (1999).

Shibuya, N.: Phenolic acids and their carbohydrate esters in rice endosperm cell walls, *Phytochemistry*, 23, 2233-2237 (1984).

Shibuya, N., Nakane, R., Yasui, A., Tanaka, N., Iwasaki, T.: Comparative Studies on Cell Wall Preparations from Rice Bran, Germ, and Endosperm, *Cereal. Chem.* 62(4): 252-258 (1985).

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).

Watanabe, S., Kanauchi, M., Takahashi, K., and Koizumi, T.: Purification and characteristics of feruloyl decarboxylase produced by lactic acid bacteria from *awamori* mash, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 67, 229-234 (2009).

White, M. D., Payne, K. A., Fisher, K., Marshall, S. A., Parker, D., Rattray, N. J. W., Trivedi, D. K., Goodacre, R., Rigby, S. E. J., Scrutton, N. S., Hay, S., and Leys, D.: UbiX is a flavin prenyltransferase required for bacterial ubiquinone biosynthesis, *Nature*, 522, 502-506 (2015).

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).

Zago, A., Degrassi, G., and Bruschi, C. V.: Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus pumilus* gene for ferulic acid decarboxylase, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 4484-4486 (1995).

Zaldivar, J., and Ingram, L. O.: Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnol. Bioeng.*, 66(4), 203-210 (1999).

Zuckerkindl, E., and Pauling, L.: Evolutionary divergence and convergence in proteins. Edited in *Evolving Genes and Proteins* by V. Bryson and H.J. Vogel. Academic Press, New York. pp. 97-166 (1965).

北原覚雄. 1974. アルコール工業におけるアミラーゼ, 日本のアルコールの歴史 : その事業と技術(協和醗酵工業, 東京), 244

塚原正俊, 鼠尾まい子.: 醸造生産に用いられている泡盛黒麹菌の比較ゲノム解析. *バイオサイエンスとインダストリー*. 77(4), 273-277(2012).

文部科学省. 食品成分データベース. 2017年3月10日. <https://foodb.mext.go.jp>, (参照 2018-1-13)

謝辞

本論文は筆者が鹿児島大学大学院連合農学研究科応用生命科学専攻博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。

研究の遂行にあたり、ご指導、ご教示を頂きました琉球大学農学部 平良東紀 教授、上地敬子 助教、外山博英 教授、水谷治 准教授、佐賀大学農学部 後藤正利 教授に深く感謝いたします。

ご審査くださいました鹿児島大学農学部 二神泰基 准教授に感謝いたします。

製麹にあたり、ご指導くださいました有限会社石川種麹店 渡嘉敷みどり 様、渡嘉敷正司 様、渡嘉敷 建孝 様に感謝いたします。

研究生活を支えていただいた琉球大学応用微生物学研究室の皆様感謝いたします。

博士課程の研究期間の資金援助を賜りました日本学術振興会に深甚なる謝意を表します。

最後に長い学生生活を支えていただいた家族に感謝いたします。

