

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14700

研究課題名(和文) 黒麹菌フェノール酸脱炭酸酵素(PAD)の特性解析と古酒熟成を目指した育種研究

研究課題名(英文) Characterization of phenolic acid decarboxylase (PAD) in black fungi and breeding in terms of awamori aging

研究代表者

仲宗根 薫 (Nakasone, Kaoru)

近畿大学・工学部・教授

研究者番号：80340834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：泡盛の香味成分であるバニリンは、原料米のフェルラ酸がフェノール酸脱炭酸酵素により4-ビニルグアヤコール(4-VG)へ変換された後、バニリンへ変化する。熟成3年後の泡盛古酒は、このバニリン濃度の高さを特徴とする。本研究では、香り高い(バニリン香)泡盛の製造法を提案した。泡盛は黒麹菌及び泡盛酵母の協働により発酵が進行する。本研究では、この芳香に関与する酵素(padC)を黒麹菌に見出し、その機能を評価し、本酵素の潜在性を引き出すことで、バニリン香が強化された泡盛の製造が実現可能な研究を行い、通常よりも短期間に古酒の特性の付加を可能にし、熟成の効率化を導く提案を行った。

研究成果の概要(英文)：Awamori is distilled liquor made from Indica-rice in Okinawa, and *Aspergillus luchuensis* and *Saccharomyces cerevisiae* are involved. Awamori flavors is characterized by vanillin generated from 4-vinylguaiacol (4-VG). In the fermentation, the microbial phenolic acid decarboxylase decarboxylates ferulic acid with production of 4-VG. Thus, the enzyme are important for the awamori flavors and the sources of the enzyme were unclear. In this study, the gene was detected on the genome of *A. luchuensis*. Besides two microbes, importance of other microbes such as lactic acid bacteria as a contaminant in the moromi are suggested, because the awamori brewery is an open system from outside. A lactic acid bacterium was isolated from the moromi, and the padC gene was also detected, suggesting both *A. luchuensis* and the bacterium may contribute the production of the flavor of 4-VG and vanillin. Biochemical characterization of these enzymes are carried out for future application of the flavor.

研究分野：応用微生物学

キーワード：泡盛 黒麹菌 フェノール酸脱炭酸酵素 古酒 乳酸菌

1. 研究開始当初の背景

泡盛は、インディカ米を原料とし黒麹菌と泡盛酵母により発酵、その後の蒸留を経て製造され、熟成(古酒化)させればさせるほど芳醇でまろやかな味わいになる。古酒の価値は高く、価格は熟成の年月に大きく比例する。従って短期間の古酒熟成技術(古酒熟成への効率化)はその利益に反映されることから、泡盛の古酒化技術はニーズとして大きく、このような技術はまだ確立されていなかった。

泡盛の芳香を特徴付ける成分として甘い香りのするバニリンがあり、蒸留されたばかりの新酒のバニリン濃度は低く、その後古酒へと熟成させることでバニリン濃度は高まっていく。古酒の芳醇でまろやかな味わい深さは、バニリン濃度の高さに起因し、このバニリンは、原料米中のフェルラ酸(FA)が4-ビニルグアヤコール(4-VG)へ変換、次にその酸化により生成される。従って、泡盛もろみ中で4-VGやバニリン濃度を高める発酵技術が開発されれば、新酒の段階で既に古酒レベルの品質をもつ泡盛製造と従来よりも短期間での古酒化も可能になる。

2. 研究の目的

上記のニーズと背景に基づき、本研究では、この芳香に関与する酵素(*padC*)を黒麹菌に見だし、その機能を評価し、本酵素の潜在性を引き出すことで、バニリン香が強化された泡盛の製造が実現可能な研究を行い、通常よりも短期間に古酒の特性の付加を可能にし、熟成の効率化を導く提案を行った。

3. 研究の方法

(1) 黒麹菌における *padC* 遺伝子の構造解析と機能解析

共同研究先の泡盛酒造所で使用されている実用株、*A. luchuensis* KBN2012 株、*A. saitoi* KBN2024 株の NGS によるドラフトゲノムを行い、黒麹菌 *A. luchuensis* NBRC4314 株(実験室・モデル株)と比較し、*padC* 遺伝子構造の解析を行った。また本遺伝子の発現誘導解析も行った。

(2) 泡盛もろみ中に見いだされる微生物相の解析

共同研究先の泡盛酒造所より泡盛もろみをサンプリングし、泡盛製造に用いられている黒麹菌の分離を試みた。実際の分離では黒麹菌以外に、泡盛酵母、その他の微生物(乳酸菌)の分離も同時に試み、目的微生物の分離が終了した。その後、もろみ DNA 精製、NGS による群集解析を行った。

(3) 泡盛もろみ中から分離された新規植物性乳酸菌の系統及び生理学的解析

新規に分離された乳酸菌は、16SrDNA 解析による系統解析、及び糖資化性、クエン酸存在下における増殖特性と脂肪酸組成変化、電顕による観察を行い、標準株との比較を行った。

(4) 泡盛酵母のゲノム育種

NGS による泡盛酵母ドラフトゲノム解析

を行い、栄養要求性株、カプロン酸エチル高生産株を構築した。

(5) 黒麹菌、泡盛酵母、乳酸菌を組み合わせた泡盛の芳香の改善

黒麹菌 *PadC* の潜在性を引き出し、バニリン香が強化された泡盛製造を検討するため、各々のもろみの 4-VG 定量を行うことで評価した。また乳酸菌や泡盛酵母も組み合わせ、同様な評価を行った。

4. 研究成果

(1) 黒麹菌における *padC* 遺伝子の構造解析・機能解析

2 種の実用黒麹菌は各々異なる種であり、ひとつは *A. luchuensis* (KBN2012 株)、もうひとつは *A. saitoi* (KBN2024 株)である。これら黒麹菌のドラフトゲノムについて NGS を用い、数億個の塩基配列断片を得た後アセンブルを行い、数百個のコンティグ配列を得た。実験室黒麹菌 *A. luchuensis* NBRC4314 株と KBN2012 とのゲノム配列の比較では塩基配列の相違はほとんど見いだされず、KBN2024 との比較では数%程度の違いが見いだされた。

黒麹菌 NBRC4314 株ゲノム情報より、*padC* 遺伝子を見だしコード領域の解析を行った。本酵素遺伝子は 519bp、172 アミノ酸、分子量 19989.17、等電点(pI)5.01 の特徴を有し、イントロンを含まないことが明らかとなった。KBN2012 及び KBN2024 株の NGS ドラフトゲノム情報からもアノテーションを行い、また白麹菌、*Aspergillus niger* と本酵素のアミノ酸配列の BLAST 解析を行ったところ、完全に一致する結果を示した。別の実用株 ISH1 株(LC369499)では、塩基配列が数塩基異なり、また 1 アミノ酸の違いが見いだされた。さらに同酵素遺伝子の生化学的解析研究が報告されている *Candida guilliermondii*, *Lactobacillus plantarum* と比較し、酵素活性に重要なアミノ酸残基も明らかにした(図 1)。

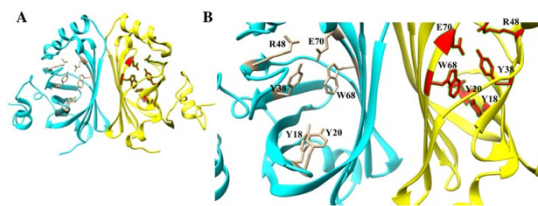


図1 *PadC*アミノ酸残基保存領域と予想される活性部位 A; 二量体*PadC*, B; *PadC*中の予想される活性部位のアミノ酸残基

さらにプロモーター(上流域)部分には基本転写因子結合部位が見いだされた。黒麹菌において *PAD* 遺伝子は「構成的に(常に)」発現しているのか?また誘導されているのか?を明らかにするため、様々な組成の液体培地による黒麹菌の培養を試み、この疑問点を解決する誘導実験を行った結果、米ぬか等の成分が本遺伝子の誘導に関与していることを明らかにした。上記、2 種の実用黒麹菌 *padC* 遺伝子発現に関与する転写因子群の探索を行った。上記誘導物質を用いた、2 種の黒麹菌における *padC* 遺伝子発現(RT-PCR 等)結果に基

づき、NGS による RNseq 解析を行ったところ、数十種類以上の DNA 結合性タンパク質の変動が観察され、*padC* 遺伝子発現に関与する転写因子候補群のリストアップを行った。次にこれら因子候補群の遺伝子破壊を最終目的として、相同組み換え・CRISPR により、種々の栄養要求性株(*pyrG*, *niaD*, *sC* 等)を構築した。これら栄養要求性株の構築によって、上記転写因子遺伝子群を候補とした遺伝子破壊が可能となる基盤が構築された。現在、これらの株を宿主として、遺伝子破壊株の構築と *cis* エレメント上流域の解析も同時に行い、ゲルシフト・フットプリント等の解析を行っている。

(2) 泡盛もろみ中に見いだされる微生物相の解析

黒麹菌はクエン酸を生産しもろみ中の雑菌の増殖を抑えるが、乳酸菌はクエン酸存在下でも生き延びる可能性がある。これは泡盛の発酵系は黒麹菌と酵母のみではなく、第3の微生物が関与する複合的な発酵システムと捉え、泡盛もろみを複合微生物生態系として、乳酸菌の役割を評価し、PAD がどの微生物由来か? を明らかにし、泡盛芳香改良のヒントを得ることも付加的な目的とした。

その結果、多様な属の微生物群が見いだされた。これら微生物が、泡盛酒造所に共通なものなのか? 本酒造所独自のものなのか? は、今後、別の酒造所の調査により明らかにしていく。

(3) 泡盛もろみ中から分離された新規植物性乳酸菌の系統及び生理学的解析

泡盛発酵もろみから分離された第3の微生物-乳酸菌 (N4 株) -は、16SrDNA の解析の結果、*Lactobacillus plantarum* であることが明らかとなった。これは典型的な植物乳酸菌であり、泡盛もろみの原材料が米であることから当然の結果であると判断される。クエン酸存在下での増殖特性を標準株と比較し 3%でも増殖することを見いだした。また脂肪酸組成の変動も観察され、標準株では観察されなかった。本菌株は乳糖を利用しないなど、糖資化性能も異なり泡盛もろみに適応した乳酸菌であることが示唆された。

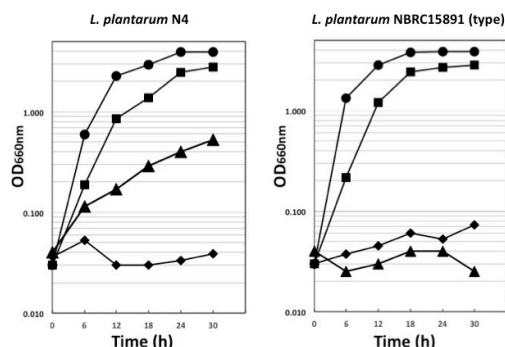


図2 クエン酸存在下における乳酸菌の増殖特性
クエン酸濃度 ●;0%、■;1%、▲;3%、◆;5%

(4) 泡盛酵母のゲノム育種

本研究では、泡盛関連微生物のゲノム育種を前提としており、従って泡盛酵母においても NGS によってドラフトゲノムを得た。多

くの育種株を得、それらを組み合わせることで、本研究目的の古酒の効率化のみならず、芳香の多様化へも泡盛研究を展開でき、製品の高価値化を目指すことが可能になる。

ここでは、吟醸香に着目し、FAS の α サブユニットである FAS2 遺伝子へ点突然変異を導入することでカプロン酸エチルを高生産する泡盛酵母の育種を行った。その結果、泡盛酵母においても、日本酒用酵母と同様、カプロン酸エチルの生産が観察された。

(5) 黒麹菌、泡盛酵母、乳酸菌を組み合わせた泡盛の芳香の改善

黒麹菌、泡盛酵母、乳酸菌を組み合わせ、各々のもろみにおける芳香改善を検討した。新たに分離した植物性乳酸菌 *L. plantarum* N4 株の有効活用も視野に入れ、本菌株の *padC* 遺伝子発現機構の解析を目的とし、*padC* (Pad 酵素) 及び *padR* (PadC 転写抑制因子) 両遺伝子破壊株を構築した。黒麹菌と乳酸菌野生株、黒麹菌と乳酸菌遺伝子破壊株との混合培養 (= 発酵) における 4-VG (バニリン前駆体) の変動を観察したところ、野生株との混合培養でのみ 4-VG 濃度の増加が観察され、発酵過程における 4-VG 増加の寄与を証明した。

3 年間の研究成果によって「古酒熟成」を目標とする醸造技術の基盤が得られ、今後の展開として、共同研究先の酒造所等と協力しながら、新しい泡盛の試作を行い製品化に向けた研究にシフトする予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① O. Yamada, M. Machida, A. Hosoyama, M. Goto, T. Takahashi, T. Futagami, Y. Yamagata, M. Takeuchi, T. Kobayashi, H. Koike, K. Abe, K. Asai, M. Arita, N. Fujita, K. Fukuda, K. Higa, H. Horikawa, T. Ishikawa, K. Jinno, Y. Kato, K. Kirimura, O. Mizutani, K. Nakasone, M. Sano, Y. Shiraishi, M. Tsukahara, K. Gomi, Genome sequence of *Aspergillus luchuensis* NBRC 4314, DNA Res. 23(6), 507–515 (2016) (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

① 佐伯隆登、仲宗根薫、カプロン酸エチルを高生産する泡盛酵母の取得、日本農芸化学会 2018 年度大会 (愛知県名古屋市)、2018

② 佐伯隆登、仲宗根薫、カプロン酸エチルを高生産する泡盛酵母の育種の試み、第 3 回 デザイン生命工学研究会 (沖縄県今帰仁村)、2018

③ 仲宗根薫、泡盛酵母の育種、第 12 回長野ミーティング：生物資源の有効利用を目指して (長野県白馬村)、2018

④ 大花健人、兼崎友、和久豊、吉川博文、仲宗根薫、黒麹菌由来フェノール酸脱炭酸酵素遺伝子の機能解析、2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (兵庫県神戸市)、2017

⑤ 佐伯隆登、仲宗根薫、泡盛酵母の芳香生成及び栄養要求性関連遺伝子群の構造解析、2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (兵庫県神戸市)、2017

⑥ Kaoru Nakasone, Characterization of phenolic

acid decarboxylase (PadC) from lactic acid bacteria isolated from fermenting mash (moromi) of awamori, Okinawan traditional distilled liquor, 15th Asian Conference on Transcription 2017 (ACT-XV 2017) (Penang, Malaysia), 2017

⑦仲宗根薫、上原誠、泡盛もろみより新たに分離された乳酸菌フェノール脱炭酸酵素遺伝子の機能解析、日本農芸化学会 2017 年度大会（京都府京都市）、2017

⑧仲宗根薫、上原誠、泡盛もろみより新たに分離された乳酸菌フェノール脱炭酸酵素遺伝子の機能解析、第 11 回長野ミーティング：生物資源の有効利用を目指して（長野県白馬村）、2017

⑨仲宗根薫、上原誠、泡盛もろみより新たに分離された乳酸菌フェノール脱炭酸酵素遺伝子の解析、第 53 回好塩微生物研究会（兵庫県神戸市）、2016

⑩上原誠、仲宗根薫、泡盛もろみより分離された乳酸菌フェノール脱炭酸酵素遺伝子の誘導とその発現、第 39 回日本分子生物学会年会（神奈川県横浜市）、2016

⑪上原誠、仲宗根薫、泡盛もろみより分離された乳酸菌の諸性質と泡盛製造への応用、生物資源ゲノム解析拠点シンポジウム・研究発表会（東京都世田谷区）、2016

⑫Kaoru Nakasone, Characterization of phenolic acid decarboxylase (PadC) from lactic acid bacteria isolated from fermenting mash (moromi) of awamori, Okinawan traditional distilled beverage, asm microbe 2016 (Boston, USA), 2016

⑬仲宗根薫、琉球泡盛のお話、第 10 回長野ミーティング：生物資源の有効利用を目指して（長野県白馬村）、2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲宗根 薫 (NAKASONE, Kaoru)
近畿大学・工学部・教授
研究者番号：80340834

(2) 研究分担者

なし