

博士論文

微生物機能を活用した新たな風味を有する 泡盛醸造技術の開発

塚原 正俊

奈良先端科学技術大学院大学
先端科学技術研究科
バイオサイエンスプログラム

主指導教員: 高木 博史 教授
ストレス微生物科学研究室 (バイオサイエンス領域)

令和 5 年 1 月 16 日提出

目次

緒言	7
1 泡盛とは	7
2 泡盛醸造の概要	8
3 泡盛醸造微生物の歴史的背景	8
4 泡盛で注目される香味成分	9
第 1 章 従来 of 泡盛酵母を親株とした新たな酵母の育種	12
1-1 泡盛酵母 101 株の全ゲノム解析	12
1-1-1 背景	12
1-1-2 材料と方法	12
1) 試料	12
2) 全ゲノムデータの取得	12
3) ドラフトゲノム配列の構築	12
4) 単塩基変異を用いた系統解析	13
1-1-3 結果と考察	14
1) 泡盛酵母 101 株のドラフトゲノムの作製と解析	14
2) 泡盛酵母 101 株の詳細な系統解析	14
1-2 泡盛酵母 101 株を親株とした育種	19
1-2-1 背景	19
1-2-2 材料と方法	20
1) 酵母株とプラスミド	20
2) 培地	21
3) L-ロイシンアナログ耐性変異株の分離	21
4) 細胞内アミノ酸含有量の測定	21
5) 泡盛の発酵試験と蒸留	21
6) 遺伝子クローニングと塩基配列解析	22
7) <i>LEU4</i> 遺伝子の発現プラスミドの構築	22
8) 形質転換体の増殖能の評価	24

9) Leu4 活性の評価	24
10) Leu4 の立体構造予測	24
11) 変異型 <i>LEU4</i> を発現する組換え株の香気成分含有量の測定	25
1-2-3 結果と考察	25
1) 泡盛酵母の TFL 耐性株からの L-ロイシン高生産変異株の分離 ...	25
2) L-ロイシン蓄積泡盛酵母変異株の泡盛発酵試験	26
3) 18-T55 株の Leu4 活性と <i>LEU4</i> 遺伝子の配列	27
4) L-ロイシン生合成および Leu4 活性に対する <i>LEU4</i> 変異の影響	28
5) Leu4 における L-ロイシン結合部位の構造予測	30
6) 変異型 <i>LEU4</i> を発現する泡盛酵母でのイソアミルアルコール生産性	32
7) 実機モデル小仕込み試験での酢酸イソアミルの濃度	34
第 2 章 ハイビスカス酵母の取得および新たな酵母の育種	36
2-1 沖縄の自然界からのハイビスカス酵母の取得と解析	36
2-1-1 背景	36
2-1-2 材料と方法	36
1) 培地	36
2) ハイビスカスの花からの泡盛酵母の分離	36
3) 採取株の種の判別	37
4) 泡盛の発酵試験と蒸留	37
5) 高速液体クロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー分析	37
6) ゲノム配列データの取得と系統解析	37
2-1-3 結果と考察	38
1) 沖縄の自然界からのハイビスカス酵母の取得	38
2) ハイビスカス酵母 HC02-5-2 株の詳細な系統解析	39
3) ハイビスカス酵母 HC02-5-2 株の泡盛醸造特性	42
2-2 ハイビスカス酵母 HC02-5-2 株を親株とした新たな酵母の育種	44
2-2-1 背景	44
2-2-2 材料と方法	44

1) 培地	44
2) HC02-5-2 株を親株とした TFL 耐性変異株の分離	44
3) 遺伝子クローニングとプラスミド構築	45
4) Leu4 活性の評価	46
5) 細胞内アミノ酸含量の定量	46
6) Leu4 の立体構造予測	46
2-2-3 結果と考察	47
1) L-ロイシンを蓄積するハイビスカス酵母変異株の分離	47
2) T25 株の Leu4 活性と <i>LEU4</i> 遺伝子配列	48
3) <i>LEU4</i> 変異が Leu4 活性と L-ロイシン生合成におよぼす影響	49
4) 変異型 Leu4 における L-ロイシン結合部位の構造予測	49
5) T25 株の泡盛発酵試験とエタノールおよび香気成分の分析	51
6) T25 株のパイロットスケール醸造での香気成分の分析	52
7) T25 株の泡盛酵母としての有用性	53
第 3 章 島バナナ酵母の取得および新たな酵母の育種	55
3-1 沖縄の自然界からの島バナナ酵母の取得と解析背景	55
3-1-1 背景	55
3-1-2 材料と方法	55
1) 培地	55
2) 島バナナからの泡盛酵母の分離	55
3) 採取株の種の判別	56
4) 泡盛の発酵試験と蒸留	56
5) 高速液体クロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー分析	56
6) 全ゲノム情報の取得と系統解析	56
3-1-3 結果と考察	57
1) 沖縄の自然界からの島バナナ酵母の取得	57
2) 島バナナ酵母 35a14 株の詳細な系統解析	57
3) 島バナナ酵母 35a14 株の泡盛醸造特性	61

3-2 島バナナ酵母 35A14 株を親株とした新たな酵母の育種	63
3-2-1 背景	63
3-2-2 材料と方法	63
1) 培地	63
2) 島バナナ酵母 35a14 株を親株とした TFL 耐性酵母変異株の分離	63
3) 遺伝子クローニングとプラスミド構築	63
4) 細胞内アミノ酸含量の定量	64
5) Leu4 の立体構造予測	65
3-2-3 結果と考察	65
1) L-ロイシン蓄積を伴う島バナナ酵母変異株の分離	65
2) BNNL80 株の <i>LEU4</i> 遺伝子配列の解析	65
3) <i>LEU4</i> 変異が L-ロイシン生合成におよぼす影響	66
4) <i>LEU4</i> 変異体における L-ロイシン結合部位の構造予測	67
5) BNNL80 株の泡盛酵母としての有用性	69
第 4 章 泡盛醸造に関与する微生物の機能解析と泡盛醸造への応用	71
4-1 黒麹菌の系統解析と泡盛醸造への応用	71
4-1-1 背景	71
4-1-2 材料と方法	72
1) 試料	72
2) 全ゲノムデータの取得	72
3) 単塩基変異を用いた系統解析	72
4-2-3 結果と考察	73
1) 全ゲノム情報を用いた変異解析	73
2) 黒アスペルギルス類における <i>A. luchuensis</i> の系統的位	76
3) <i>A. luchuensis</i> の種内系統解析	77
4) <i>A. luchuensis</i> 内の分岐年代の推定	78
4-2 泡盛もろみ乳酸菌が泡盛風味成分に及ぼす影響	81
4-2-1 背景	81

4-2-2 材料と方法	81
1) 泡盛酒造所のもろみおよび蒸留液の試料	81
2) もろみ生酸菌の分離及び数の測定	81
3) フェルラ酸及び 4-VG、バニリンの定量	81
4) 生酸菌によるフェルラ酸から 4-VG への変換試験	82
5) 生酸菌のゲノム DNA 抽出及び 16S rDNA 部分配列の解析	82
6) 製麴、小仕込み試験	82
4-2-3 結果と考察	83
1) 泡盛もろみに含まれる生酸菌数、およびフェルラ酸、4-VG 濃度	83
2) 泡盛もろみに含まれる生酸菌の同定	85
3) 泡盛もろみに含まれる生酸菌のフェルラ酸変換活性の評価	85
4) 小仕込み試験による乳酸菌の影響の解析	87
総括	90
謝辞	92
参考文献	93

緒言

1 泡盛とは

泡盛は、清酒、本格焼酎とともに日本の國酒の1つで¹⁾、約600年の歴史を有する日本最古の蒸留酒である。沖縄県では、古来より現在まで日常的な晩酌から大小の宴会、冠婚葬祭など様々な場面で広く愛飲され、地元酒として親しまれている。特に、華やかでフルーティーな香りとともに、年単位の貯蔵により熟成し芳香や甘みが増強される特徴は、他の酒類にはない重要な付加価値である(図1)。



図1 沖縄での泡盛酒造所(左)、居酒屋(右)の甕熟成

泡盛は、酒税法上単式蒸留しょうちゅうに分類され「米こうじ(黒こうじ菌を用いたものに限る。)及び水を原料として発酵させたアルコール含有物を酒税法第三条第十号イに規定する単式蒸留機により蒸留したもの(水以外の物品を加えたものを除く。)」と規定されている²⁾。すなわち、泡盛とは①単式蒸留しょうちゅう、のうち、②黒麹菌のみの米麴を使用、③全麴仕込み、の条件を同時に満たす酒類である(図2)。泡盛醸造には黒麹菌、泡盛酵母、水のみを用いること、また、本格焼酎や清酒などのような段仕込みは行わず比較

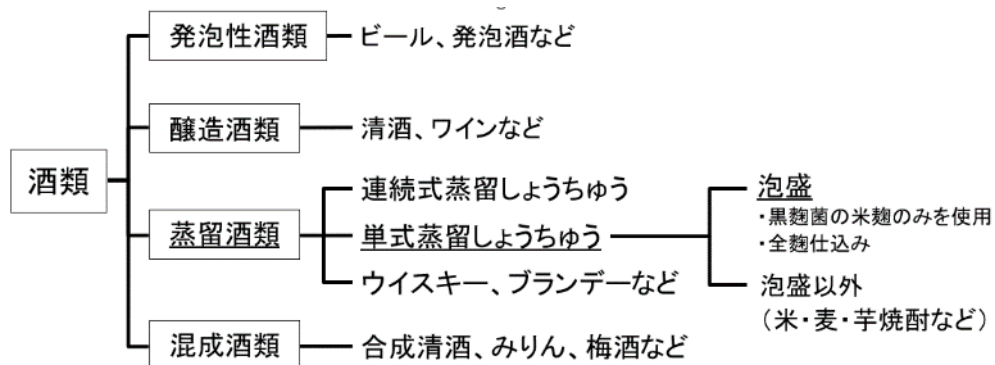


図2 泡盛の酒税法上の位置づけ **3)** を一部改変

的単純な製造工程であることなどから、泡盛はその醸造に用いられる「泡盛酵母」および「黒麹」の影響が極めて大きい蒸留酒である。

2 泡盛醸造の概要

泡盛は以下のような工程で醸造される（図 3）。原料は米のみ（ほとんどの泡盛はインディカ米）で、洗米、浸漬、蒸煮後、泡盛黒麹菌を種付けし、2-3日間製麹することで黒麹を得る。この黒麹と、泡盛酵母、水を混合したもろみを14-30日間発酵する。発酵後のもろみを単式蒸留器で蒸留することで泡盛が得られる。通常は、蒸留後数ヶ月保管し風味を安定させ、「一般酒」として製品化される。一方、蒸留後の泡盛はステンレスタンク、甕、樽などに貯蔵され、蒸留後3年以上保存したものが「古酒」として販売される。



図 3 泡盛の醸造工程

3 泡盛醸造微生物の歴史的背景

泡盛の醸造工程では、米を原料とし、黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) でデンプンを糖化、さらに酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) でアルコール発酵を行う⁴⁾。これらの黒麹菌、および酵母は、泡盛の酒質に大きな影響を与えている。

現在の泡盛醸造では培養した酵母種を用いることで安定した醸造が可能となっている。一方、以前の泡盛醸造では、前回醸造したもろみを酵母種として用いる「差しもと」と呼ばれる方法で酵母を主体とした微生物環境を維持してきた。従って、この時代のもろみには、多様な微生物が存在する菌叢であり酵母を含め様々な株が含まれていたと考えられる。また、差しもとによる醸造管理では、醸造環境ごとにそれぞれ異なる菌叢が維持されていたと考えられ、(積極的には意図していたわけではなかったと考えられるものの) 酒造所あるいは地域ごとに特有なもろみ菌叢あるいは酵母株が存在し、泡盛風味の個性化に寄与していたと考えられる。

泡盛酒造所ではこのように、以前は（結果として）酒造所ごとに異なる微生物を使用していたと考えられる。しかしながら、第二次世界大戦の沖縄戦により多くの酒造所が壊滅的な被害を受けたことで、人的被害はもちろん、泡盛醸造に関する技術やノウハウとともに、受け継がれてきた醸造微生物の多くが消失した。戦後、泡盛醸造は一時的に衰退したものの、その後、先人達の努力により泡盛が復興し、この過程で泡盛醸造に適した黒麹菌および酵母株が選抜され、現在の泡盛醸造において優良株として活用されている。

酵母に関しては、1981年にエタノール生産性および芳香性の高い泡盛1号酵母が選抜され^{5),6)}、醸造の大幅な安定化が実現した。1988年には、この泡盛1号から「泡なし酵母」である泡盛酵母101株が分離され醸造中に気泡が形成されにくいため生産効率がさらに向上した⁷⁾。この101株が現在ほぼ全ての酒造所で用いられ、唯一の汎用泡盛酵母となっている。

一方、発酵学や微生物工学の発展はめざましく、様々な酒類を対象とした研究成果が多く得られている。これらの研究のほとんどは、ビール、清酒、ワイン、ウイスキーなど主要な酒類を対象とした成果が中心となっている。また、昨今の酒類の市場では、特徴ある風味が嗜好されるなどカテゴリ全体での風味のバラエティー化が注目されている。このような状況の中で、地域発酵食品である泡盛においても、新たな泡盛醸造の学術的基盤や技術開発が求められており、他の酒類の研究成果の応用とともに、泡盛に特有な成分や現象の研究を進める必要性がある。

4 泡盛で注目される香味成分

泡盛の品質に影響する成分は、数百種類あると考えられているものの、多くの成分は風味との直接的な関連性は不明であり、官能表現との関連性が報告されている成分はこのうち30程度である⁸⁾⁻¹⁰⁾。さらに、これらの成分にはオフフレーバーも多く、高含有することにより泡盛の風味向上が期待できる成分は限られている。本研究では、このうち酢酸イソアミル、およびバニリンに注目した研究を行った（図4）。

清酒の吟醸香成分として知られている酢酸イソアミルおよびカプロン酸エチルは、泡盛にも含まれている成分で、高含有することによりフルーティーで爽やかな風味になることから、泡盛においても好まれる成分である。このうち、酢酸イソミルは、酵母の代謝により生成される（図5）。この経路では、ピルビン酸から、 α -アセト乳酸、 α, β -ジヒドロキシイソ吉草酸、 α -ケトイソ吉草酸、 α イソブ

ロピルリンゴ酸、 β -イソプロピルリンゴ酸、 α -ケトイソカプロン酸、イソバレルアルデヒド、イソアミルアルコールを経て酢酸イソアミルが生成される。また、この経路の α -ケトイソカプロン酸からはロイシンが合成される。一方、 α -ケトイソ吉草酸から α -イソプロピルリンゴ酸への変換を触媒する α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ Leu4 は、ロイシンによるフィードバック阻害を受けることでロイシンの細胞内含量を調節している (図 5)¹¹⁾。従って、ロイシンによるフィードバック阻害が抑制されるなどロイシンを高生産する酵母株が得られれば、Leu4 の活性が維持され、ロイシンとともに酢酸イソアミルの高生産が期待できる。

一方バニリンは、泡盛の重要な古酒香成分の 1 つで、熟成により増加し、

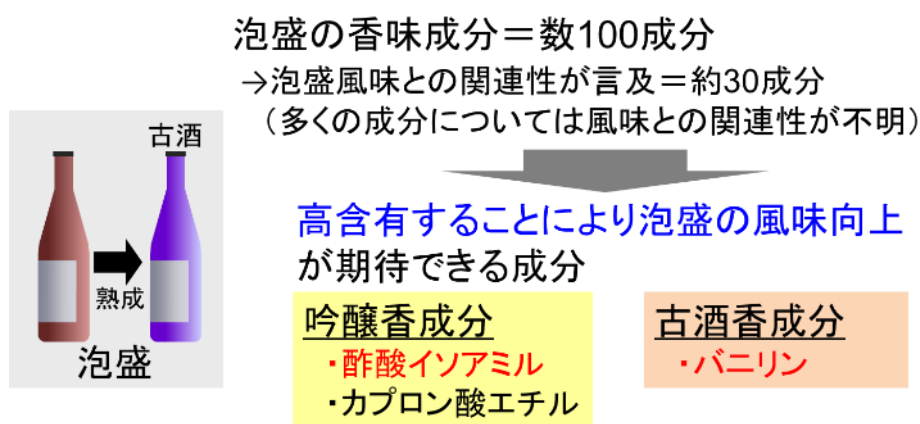


図 4 本研究で注目する泡盛の重要な香味成分である酢酸イソアミルおよびバニリン

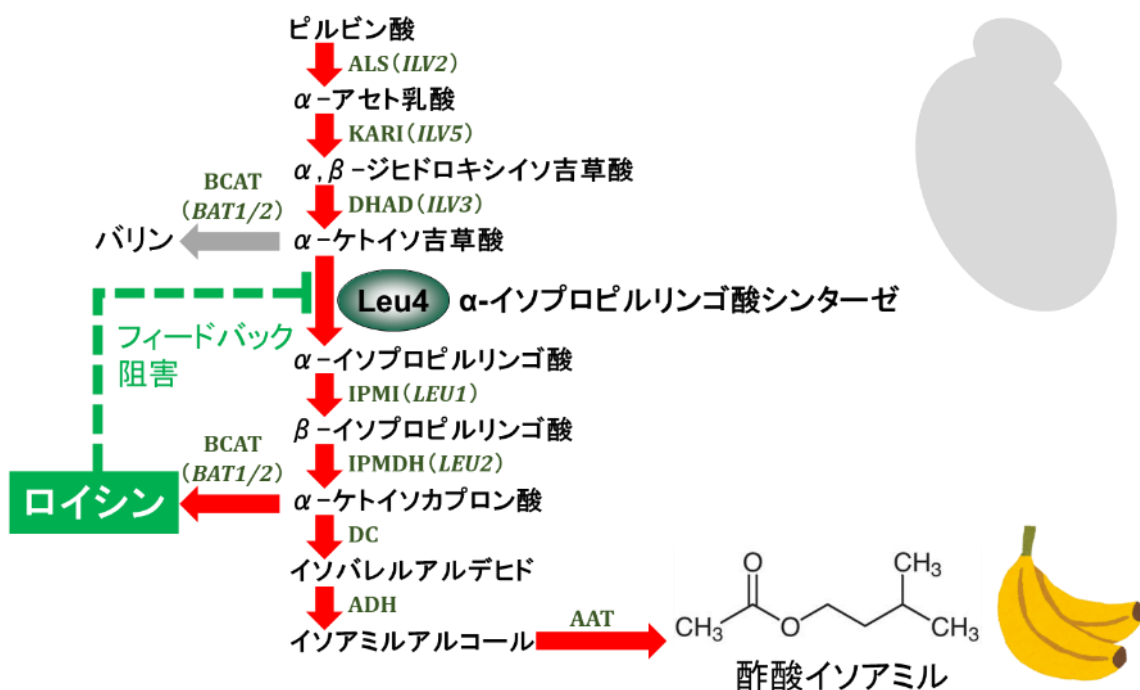


図 5 酵母における酢酸イソアミル生成経路

古酒香の大きな付加価値である甘い風味の増強に寄与する成分である。バニリンは、以下の過程で泡盛古酒に含まれることが分かっている¹²⁾。原料米に含まれる細胞壁を構成するアラビノキシランとエステル結合しているフェルラ酸が酵素によりもろみ中に遊離する。このフェルラ酸がもろみ中で酵母など微生物の作用により 4-ビニルグアヤコール (4-VG) に変換される。もろみの蒸留時に、フェルラ酸は蒸留液に移行しないものの、4-VG は蒸留液に移行し泡盛中に含有される。その後、年単位の貯蔵の過程で 4-VG からバニリンに変換する (図 6)。泡盛以外の酒類では 4-VG はオフフレーバーとして低減を目指した取り組みも多く、これまでに、ワイン¹³⁾、ウイスキー¹⁴⁾、ビール¹⁵⁾、および清酒¹⁶⁾において酵母あるいは乳酸菌がフェルラ酸を脱炭酸し 4-VG に変換することなどが報告されている。また、焼酎では醸造用酵素剤を用いて 4-VG 濃度を上昇させる取り組みの報告がある¹⁷⁾。一方、泡盛においては、最近、フェルラ酸から 4-VG への変換に黒麹菌の関与が報告され、現在の一般的な泡盛醸造の環境では、泡盛に含まれる 4-VG 濃度は黒麹菌の寄与が高いことが示されている¹⁸⁾。

本研究では、泡盛の品質に重要なこれらの酢酸イソアミル、およびバニリンに注目し、酵母およびその他の醸造微生物について研究を行った。

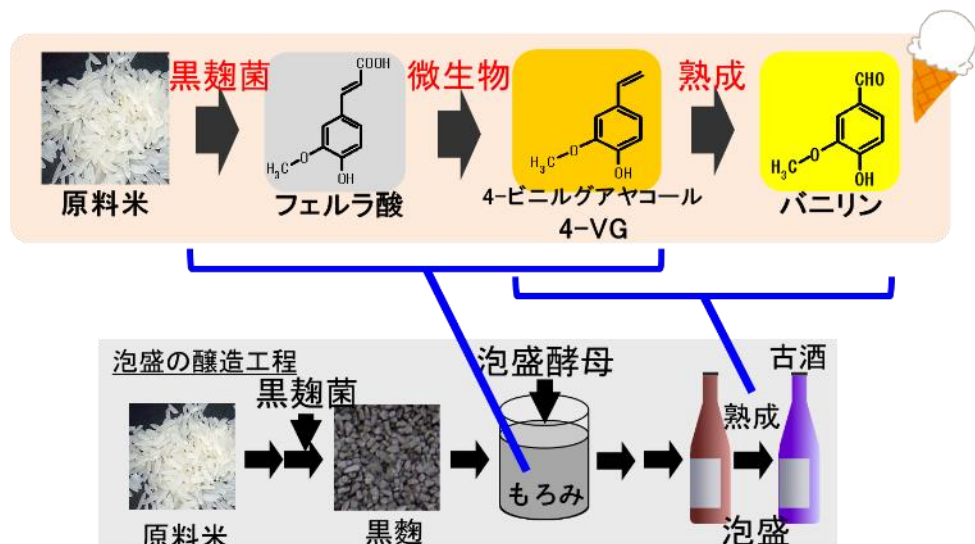


図 6 泡盛醸造におけるバニリンの生成過程

第 1 章 従来の泡盛酵母を親株とした新たな酵母の育種

1-1 泡盛酵母 101 株の全ゲノム解析

1-1-1 背景

従来の泡盛酵母である 101 株は、1980 年代に泡盛もろみより分離された親株から得られた唯一の汎用泡盛酵母株で、この親株である泡盛 1 号酵母は、泡盛もろみから分離された^{5)・7)}。親株である 1 号酵母は、その形態や生化学的特性などから *Saccharomyces cerevisiae* であることが確認されている⁶⁾。一方、酵母の詳細な遺伝子情報や系統的な位置づけが不明であることから、ここでは全ゲノム情報を取得し、解析を行った。

1-1-2 材料と方法

1) 試料

沖縄国税事務所で分離され（独）酒類総合研究所で維持管理されている *S. cerevisiae* AW101 株を使用した。

2) 全ゲノムデータの取得

供与された菌体は、YPD Broth 4 ml で 3-4 日間培養した菌体を集菌後、凍結破砕し、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール（PCI）法に従いゲノム DNA を抽出精製した。ゲノム DNA は Qubit (Thermo Fisher Scientific) にて定量し、Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina) を用いてライブラリを作製し、MiSeq Reagent Kit v2 および v3 (Illumina) により全ゲノムデータを取得した。

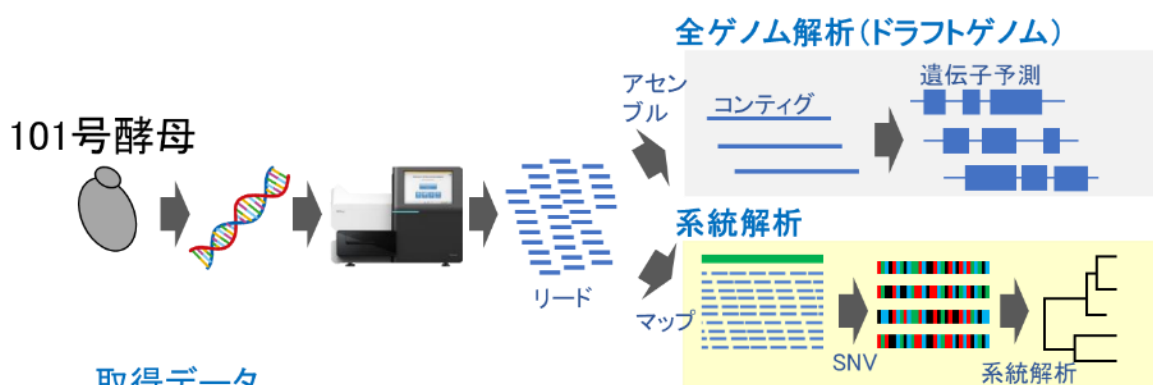
3) ドラフトゲノム配列の構築

得られた全ゲノムデータは、CLC Genomics Workbench バージョン 8.5.1 (Qiagen) を使用して品質評価を実施し、quality score (limit, 0.05) に基づいてトリミングを行った。次に、*S. cerevisiae* S288c (GCF_000146045.2) を参照ゲノムとして de novo アセンブリを実行した。参照ゲノムは、de Bruijn グラフとそれに続くコンティグの作製には使用せず、グラフのあいまいさを解決するためにのみ使用した。遺伝子予測は、Augustus バージョン 2.5.5 (4) と *S. cerevisiae* の利用可能なトレーニングセットを使用

して行った。

4) 単塩基変異を用いた系統解析

系統解析は、以下の方法に従って実施した¹⁹⁾。次世代シーケンサーにより得られたデータおよびデータベース上のリードデータを用いた。これらのリードを *S. cerevisiae* S288c のゲノム配列に対してマッピングし、それらの結果から変異情報を抽出し、SNV をつなげた仮想配列を作製しそれらと比較した。これらの解析には CLC Genomics Workbench v22.0.2 (Qiagen)、変異情報から仮想配列の作製には独自に作製したスクリプトを用いた²⁰⁾。これらの配列をもとに、MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software²¹⁾を用いて Neighbor-joining 法にて系統樹を作製した。



取得データ

取得リード数	8,623,236 reads
冗長度	174

ドラフトゲノム

コンティグ数	351
N50 contig size	75,854 bp
maximum contig length	297,490 bp

ドラフトゲノム解析結果

酵母株	泡盛酵母 101号酵母 (ドラフトゲノム)	清酒酵母 <i>S. cerevisiae</i> K7	実験室酵母 <i>S. cerevisiae</i> S288c
推定ゲノムサイズ	11,455,750	11,881,178	12,157,105
GC content	38.2%	38.37%	38.2%
推定ORF数	6,185	5,726	6,591

図 7 泡盛酵母 101 株の全ゲノム解析の方法概要と結果

1-1-3 結果と考察

1) 泡盛酵母 101 株のドラフトゲノムの作製と解析²²⁾

泡盛酵母 101 株を対象として全ゲノム情報を取得した。得られたデータを用いて、ドラフトゲノムの作製、および詳細な系統解析を行った (図 7)。その結果、冗長度約 174 の 8,623,236 リードが得られ十分なリード数であることを確認した。このデータを用いて、アセンブルを行い、コンティグ数 = 351、N50 = 75,854 bp、最大コンティグ長 = 297,490 bp のドラフトゲノムが得られた。推定ゲノムサイズは 11,455,750 bp、GC 含量 = 38.2%、で 6,185 個の Open Reading Frame が推定された。これらの値を実験室酵母である *S. cerevisiae* S288c、代表的な清酒酵母である *S. cerevisiae* K7 と比較したところ、大きな差異はなく類似していることが確認された²²⁾。

2) 泡盛酵母 101 株の詳細な系統解析

S. cerevisiae の種内の詳細な系統を解析に関して、これまでに複数の報告がある²³⁾⁻²⁵⁾。これらの報告によると、酵母の系統は採取地域の傾向とともに、ワイン酵母、清酒酵母など商用酵母のグループを形成し、パン酵母はワイン酵母グループに近いこと、また、それらの間に系統的に離れた各地域の野生酵母が位置していることなどが示されている (図 8)。

本研究では、101 株と同様に、10 株の酵母についてゲノム DNA を抽出しショートリードの全ゲノムデータを取得した (表 1)。また、データベースから 20 株の Sequence Read Archive (SRA) data を入手し (表 2)、合計 30 株を用いて新たに構築した解析パイプライン (詳細は後述) により系統解析を行った (図 9)。その結果、本研究の新たな解析方法においても既報と同様に、清酒酵母、ワイン酵母の汎用酵母がグループを形成し、パン酵母はワイン酵母グループに近く、清酒酵母とワイン酵母の間にやや系統的に離れた野生株が位置するという結果が得られた (図 10)。このことから、今回の解析方法は、精度や結果に大きな問題はなく、*S. cerevisiae* の種内の詳細な系統解析に活用できると考えられた。

本法により泡盛酵母 101 株を解析したところ、清酒酵母グループに属することが明らかになった (図 10)。また、清酒酵母グループの中では清酒醸造に広く利用されている K7 酵母とはやや離れた系統的な位置であることがわかった。現在広く用いられている 101 株が清酒酵母グループであったことは、泡盛酵母の歴史を理解する上で極めて興味深く、重要な情報であると考えられる。

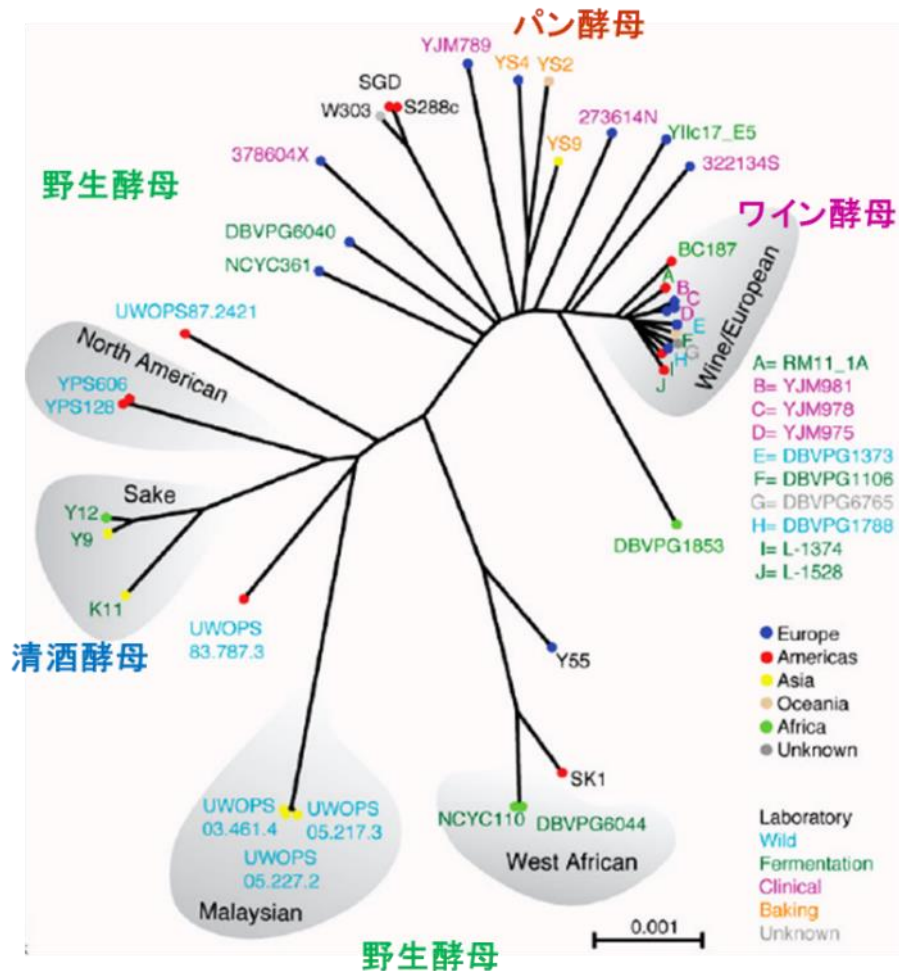


図 8 *S. cerevisiae* の詳細な系統解析 (文献 25 を一部修正し引用) 分離元は株名の色、採取地はドットの色で示す。灰色の範囲は見いだされた系統のグループを示す。

また、これらの結果は、酵母の系統による泡盛風味のバラエティー化を目指した取り組みでの基盤情報として活用できる。

S. cerevisiae の種内の詳細な系統解析についてのこれまでの報告では、特定の遺伝子に焦点を当てた手法^{23),24)}、およびゲノム全体を対象とした手法²⁵⁾などが用いられている。特定の遺伝子に焦点を当てた解析手法^{23),24)}は、対象となる領域がゲノム全体のごく一部であることから、精度や分解能に課題があると考えられる。一方、全ゲノム情報を用いて1塩基置換 (SNV) を対象とした系統解析の手法は²⁵⁾精度が高く、本研究の手法に近い。しかしながら、この方法ではシーケンスにヘテロ変異の情報が含まれないようにするため、ゲノム抽出前に一倍体を作製しており²⁵⁾、解析対象とする全ての株で一倍体を取得するのは極めて労力が大きいこと、また、SRA などのデータベースに保存されている二倍体のシーケンス情報をそのまま用いることはできないという

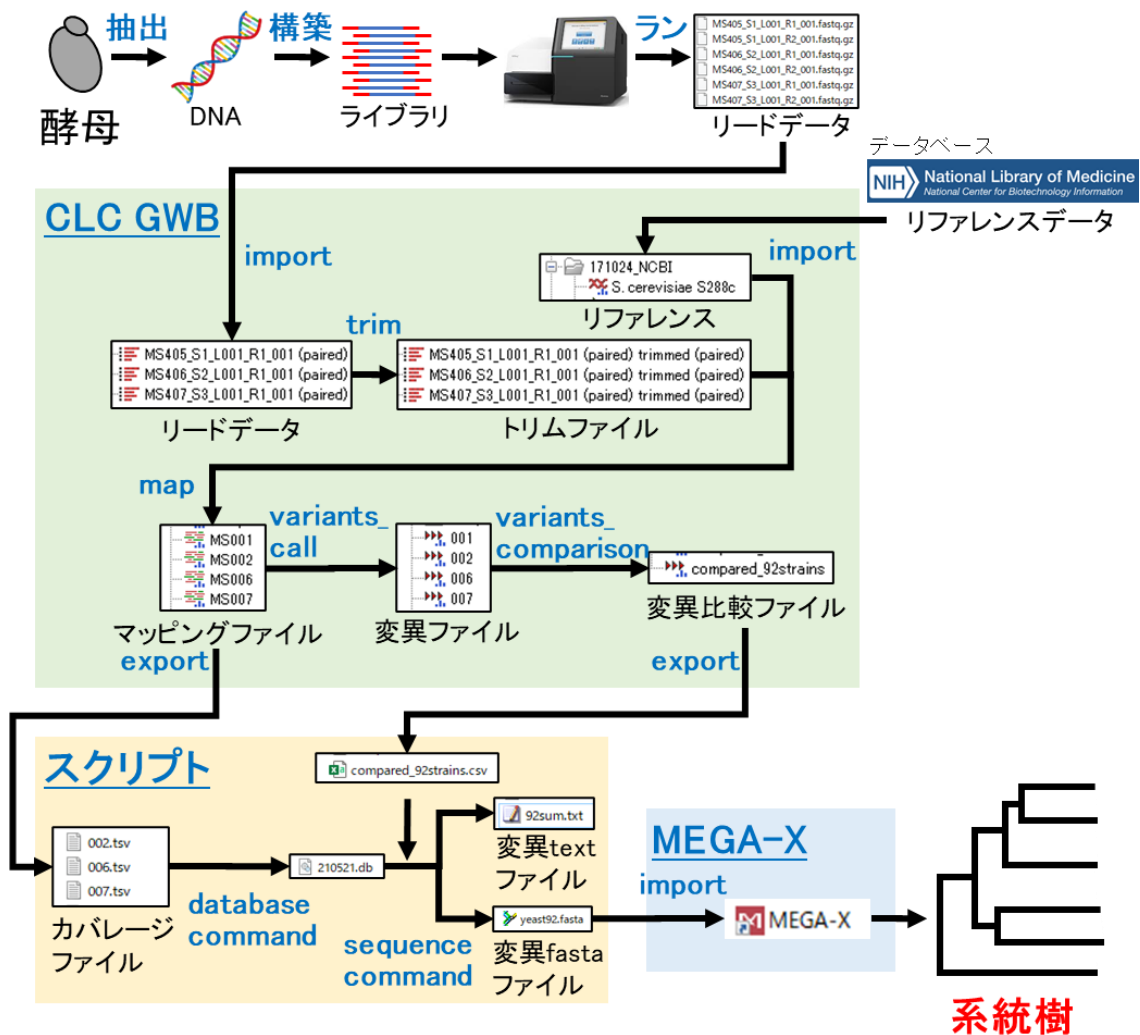


図 9 全ゲノム情報を用いた詳細な系統解析パイプラインの概要

得られた全ゲノム情報は CLC Genomics Workbench (CLC GWB) により解析し、マップングファイルと変異比較ファイルを作製した。これらのデータを独自のスクリプト²⁰⁾により変異 fasta ファイルを作製し、MEGA-X を用いて系統樹を描画した。

大きな問題点がある。本研究で用いた方法では、2 倍体の全ゲノム情報をそのまま用いることが可能で、ヘテロ変異はデータ比較の中で取り除き、ホモ変異のみを解析対象とするというアルゴリズムを採用している。以上のことから、本研究で用いた解析方法は、*S. cerevisiae* の種内の詳細な系統解析に極めて有用であることが示された。

表 1 本研究で全ゲノム情報の取得および分析を行った酵母株

No.	Strain ID	Strain name	Discription
1	MS010	101_18	商用泡盛酵母
2	MS056	RIB_K7	清酒酵母
3	MS080	OUT7009	<i>Saccharomyces awamori</i> Inui、南満州鉄道研究所
4	MS103	EC1118	ワイン酵母
5	MS142	OUT7007	<i>Saccharomyces awamori</i> Inui、南満州鉄道研究所
6	MS143	OUT7008	<i>Saccharomyces awamori</i> Inui、南満州鉄道研究所
7	MS826	NBRC2373	1952年
8	MS852	NBRC0249	1941年、中沢亮治株
9	MS853	NBRC0282	1946年、長西廣輔株、南満州鉄道研究所
10	MS854	NBRC0965	1958年、中沢亮治株

表 2 本研究で参照した酵母株

No.	Strain ID	Discription	Accession number
1	ZP793	Okayama_JP_plants	ERR754615
2	ZP778	Okayama_JP_plants	ERR754619
3	ZP652	Chiba_JP_plants	ERR747924
4	ZP649	Chiba_JP_plants	ERR915348
5	YPS128	USA_plants	SRR4074383
6	YJM1387	JP_wine	SRR800824
7	Y9	JP_plants	SRR3481380
8	Y55	France_wine	ERR1308763
9	S288c	R64_300mer_fragment	GCF_000146045.2
10	M5	Itaria_bread	ERR1309325
11	M22	Itaria_bread	ERR1308788
12	K12	JP_sake	SRR3481424
13	IR2	Indonesia_food	DRR164885
14	bread004	baker's yeast, Belgium	SRR5678552
15	bread003	Belgium	SRR5678574
16	bread002	Belgium	SRR5678575
17	bread001	Belgium	SRR5678580
18	BG1	Brazil_plants	SRR403237
19	BC187	bread	SRR9617887
20	AWRI796	bread	SRR2967854

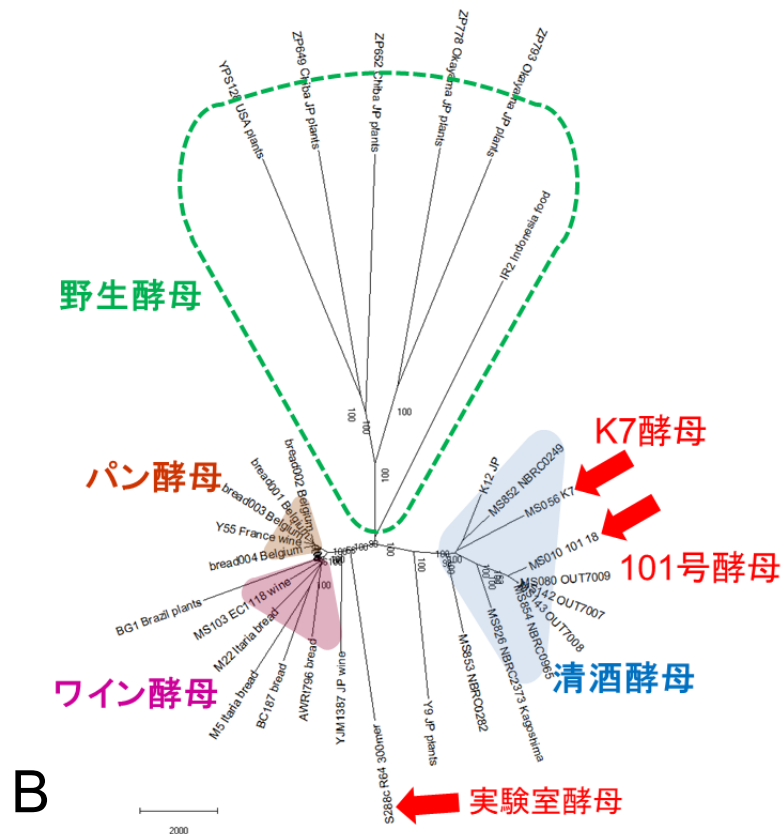
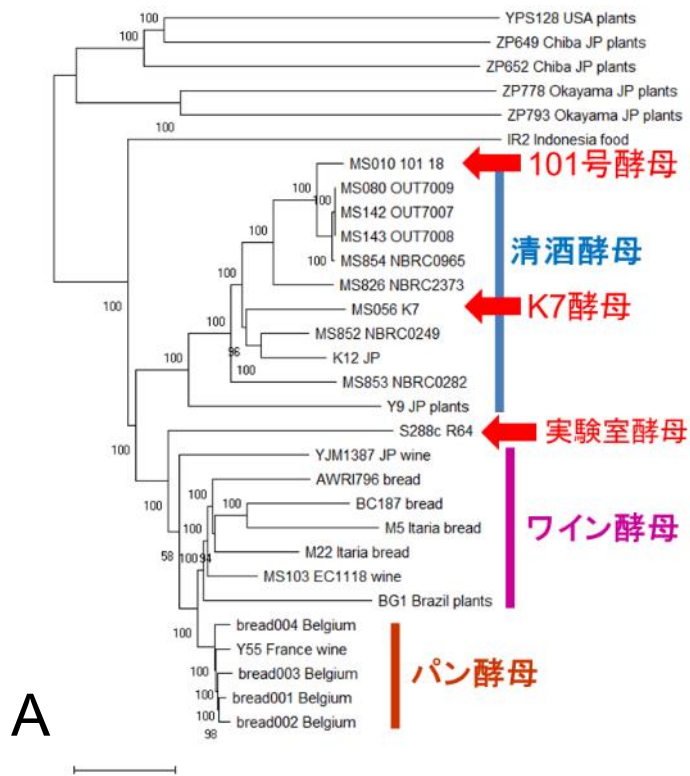


図 10 *S. cerevisiae* での泡盛酵母 101 株の系統解析
 (A) Traditional tree (B) Radiation phylogenetic tree で示した。系統樹は Neighbor-Joining 法を、距離は最大複合尤度法をそれぞれ使用した。

1-2 泡盛酵母 101 株を親株とした育種²³⁾

1-2-1 背景

泡盛のもろみは、黒麹菌が生産するクエン酸の濃度が高いため低 pH であること、発酵後のもろみのエタノール濃度は他の酒類と比較して高い 19%を上回るレベルであること、発酵温度が比較的高いことなどから、泡盛もろみの酵母は複合的なストレス環境にある。したがって、泡盛酵母はストレス環境下においても高いエタノール生産性や香气成分の効率的な生産を維持できる能力が必要である。これまでに、清酒酵母では香气成分の生成能を向上させた複数の報告があり^{27)・29)}、これらのうちのいくつかは実用化に至っている。

泡盛醸造では、沖縄県酒造協同組合より唯一の汎用酵母「泡盛酵母 101」が頒布され、一般の泡盛は当該株を用いて醸造されている。泡盛酵母 101 は、泡盛もろみでのエタノール生産性が高く、得られる泡盛の芳香が豊かでバランスが良いことなど、泡盛醸造において極めて優れた特性を有している⁷⁾。したがって、101 株は泡盛醸造に適した基本となる遺伝的背景を有していると考えられる。これらのことから、本研究ではこの 101 株の優れた醸造特性を活用し、さらに芳香性に優れた泡盛酵母を育種することを試みた。

具体的には、泡盛で好まれる芳香成分である酢酸イソアミルの増強を目指した。前述したように、酢酸イソアミルは酵母の代謝の中でピルビン酸から α -ケトカプロン酸、イソアミルアルコールを経て生成され、 α -ケトカプロン酸からはロイシンが生成される。ロイシンの細胞内濃度はロイシンによる Leu4 活性のフィードバック阻害により抑制され調節されている。トリフルオロロイシン (TFL) は、ロイシンのアミノ酸アナログであり酵母に対して毒性を有する。TFL の毒性は、ロイシン含量との比の影響を受けることから、酵母染色体への変異導入によりロイシンを高生産する株が得られた場合には、TFL 耐性が上昇していることが期待される。したがって、TFL 耐性が上昇している変異株をスクリーニングすることで、ロイシンの高生産とともに酢酸イソアミル生産性の向上が期待できる (図 5、図 11)。

これらのことから、本研究では泡盛酵母 101 株を親株として TFL 耐性およびロイシン生産性の上昇を指標として、酢酸イソアミル生産性が向上した育種株の取得を試みるとともに、その機構の解析を行った。

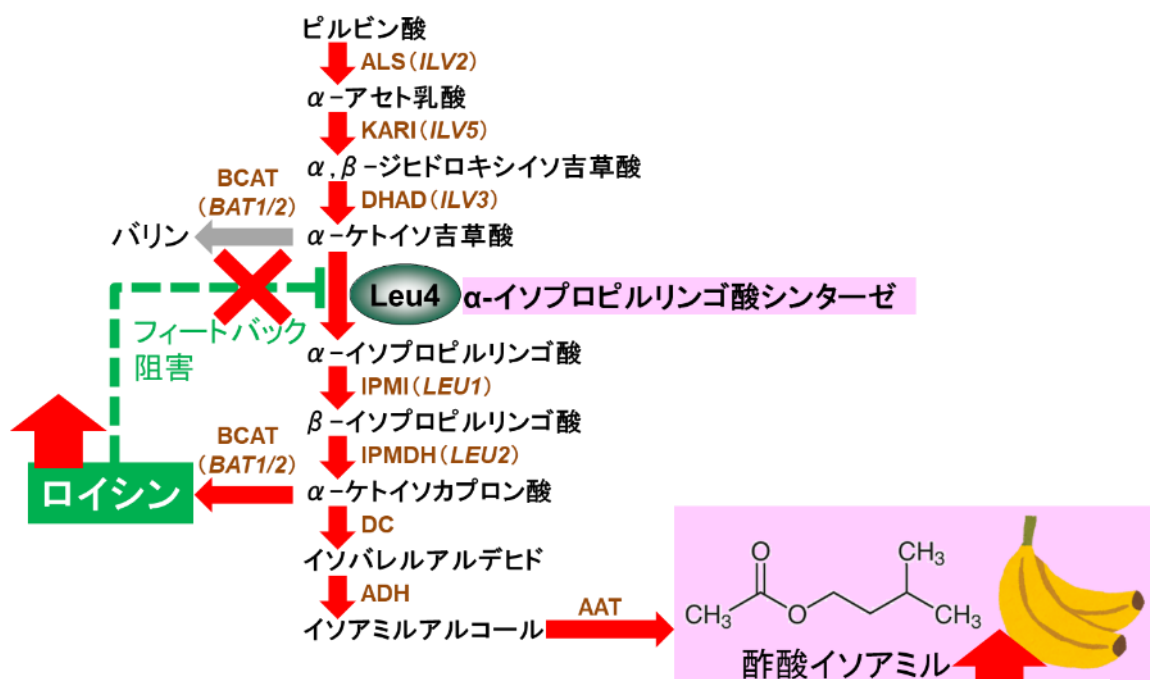
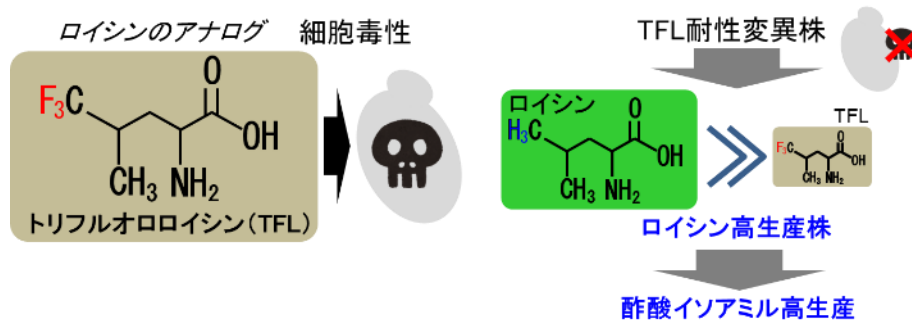


図 11 TFL 耐性株の取得によるロイシン、酢酸イソアミル生産性上昇株の取得の概要

1-2-2 材料と方法

1) 酵母株とプラスミド

泡盛酵母 101 株は酒類総合研究所より入手した。G418 耐性遺伝子 (*KanMX4*) を含むセントロメア型の低コピー数プラスミド pYC130 (国立醸造研究所提供)³⁰⁾および *ADH1* プロモーターとターミネーターを含む 2 μ プラスミドをベースとした高コピー数プラスミド pAD4 (九州工業大学 J. Nikawa 提供)³¹⁾を使用して、*LEU4* 遺伝子をサブクローニングし、発現させた。大腸菌株 DH5 α (*F λ - Φ 80lacZ Δ M15 Δ (*lacZYA argF*) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17 (r k^- m k^+) supE44 thi-1 gyrA96*) を使用してプラスミドを構築した。*

2) 培地

S. cerevisiae の増殖は、YPD 培地 (2% グルコース、1% 酵母エキス、2% peptone) および合成培地 SD+Am (2% グルコース、0.5% 硫酸アンモニウム、0.67% yeast nitrogen base without ammonium sulfate and amino acids [Difco Laboratories])を用いた。*S. cerevisiae* 組換え株は、200 µg/ml G418 を含む YPD 培地または SD+Glu 培地 (2% グルコース、0.1% グルタミン酸、0.67% yeast nitrogen base without ammonium sulfate and amino acids) で増殖させた。発酵試験には、200 µg/ml の G418 を含む YM 培地 (酵母エキス 0.3%、麦芽エキス 0.5%、polypeptone 1%、グルコース 1%) を用いた。大腸菌組換え株は、50 µg/ml ampicillin を含む Luria-Bartani (LB) 完全培地³²⁾で増殖させた。必要に応じて 2% Agar を含む寒天培地を用いた。

3) L-ロイシンアナログ耐性変異株の分離

6% ethyl methanesulfonate³³⁾で処理することにより変異を誘導した。変異を誘発した細胞を、150 µg/ml TFL (約 0.8 mM) (和光純薬工業) を含む SD+Am 寒天培地に塗布した。30°C で 3 日間培養した後、得られたコロニーを回収し、細胞内のアミノ酸含量を評価した。

4) 細胞内アミノ酸含有量の測定

酵母を 5 ml の SD+Am 培地または SD+Glu 培地 (必要に応じて G418 を含む) で培養した。30°C で一晩培養した後、培養サンプル 1 ml を洗浄し、上記培地 5 ml に接種した ($OD_{600}=0.25$)。回転振盪しながら 30°C で 48 時間培養した後、細胞 ($OD_{600}=10$) を 2 回洗浄し、細胞内アミノ酸を沸騰水で 20 分間抽出した。遠心分離 ($15,000 \times g$ で 5 分間) 後、各上清をアミノ酸分析装置 (JLC-500/V、JEOL) で定量した。各アミノ酸の含有量は、乾燥重量の百分率で示した。

5) 泡盛の発酵試験と蒸留

実験室規模の泡盛醸造は、50 g の黒麹 (*Aspergillus luchuensis* [石川種麹])を用いて培養)、65 ml の水、および 0.3 ml の酵母の前培養液 (初期濃度 2×10^5 cells/ml に合わせる) を用いた。もろみを 25°C で 14 日間培養し、最終もろみを得た。もろみの上澄みをろ過し、可搬式アルコール検出器 (AL-3; 理研計器) を用いてエタノール濃度を分析した。もろみ中の揮発性成分は、質量分析 (GC-MS) と組み合わせたヘッドスペーストラップガ

スクロマトグラフィーを使用して定量した。GC-MS 分析は、QP5000 (Shimadzu) とキャピラリー カラム (Agilent DB-WAX; 30 m x 0.25 mm x 0.5 μ m) の GC-17A (Shimadzu) を用いて、水素炎イオン化検出器で検出した。キャリアガスとしてヘリウムを流速 1.5 ml/分で用いた。カラムの初期温度は45°Cで2分間保持し、3°C/分の速度で220°Cまで昇温し、220°Cで12分間保持した。インジェクター温度は 230°C、スプリットモード(スプリット比 1:5)で噴射した。試料は精製水で希釈し、エタノール濃度を 5% または 15% に調整した。希釈したサンプル溶液を 20 ml バイアルに加え、バイアル内の揮発性化合物を選択イオンモニタリング (SIM) モードで MS によって同定し、内部標準法によって定量した。質量分析計の条件は次のとおりである。イオン化エネルギー: 70 eV、イオン源温度: 200°C、界面温度: 230°C、スキャン質量範囲: m/z: 29-400。パイロットスケールの泡盛醸造は、ラボスケールの 20 倍の規模で行った。また、さらに実機モデルでの小仕込み試験は、ラボスケールの 20 倍の規模で行うとともに、商業生産で実際に使われている麴(神村酒造)を用いて、仕込み後 5 日間は 1 回/日の攪拌を行い、以降は攪拌作業以外は密閉し、1 回/2 日の攪拌を行いながら発酵した。フレーバーの生成を分析するために、もろみの蒸留は水蒸留器 (MH943SBS; メガホーム) を使用して常圧蒸留で行い、エタノール濃度が 10%に達した時点で停止した。留出物を収集し、上記の方法に従って GC-MS にて分析した。

6) 遺伝子クローニングと塩基配列解析

TFL 耐性変異株 18-T55 とその親株である 101 株のゲノム DNA から、KOD Plus DNA ポリメラーゼ (東洋紡) を用いた PCR により、オープンリーディングフレームの前後 500 bp を含む全長 *LEU4* 遺伝子を増幅した。プライマー *LEU4*-up (5'-TGACAC TTC CAC TCG GCT GTT AT-3') および *LEU4*-down (5'-GAT CTG CGA GAG TTC TTA CTG TT-3') を使用した。PCR 産物の塩基配列は、キャピラリーシーケンサーにより確認した。BLAST 検索プログラムを用いて、泡盛酵母の *LEU4* の DNA 配列を実験室株 *S. cerevisiae* S288c の DNA 配列と比較した (*LEU4* の GenBank アクセッション番号 = M12893)。

7) *LEU4* 遺伝子の発現プラスミドの構築

野生型 *LEU4* 遺伝子を発現するプラスミド pAD4-*LEU4* を構築するために、*LEU4* 遺伝子のコーディング領域を、KOD Plus DNA ポリメラーゼを

使用した PCR により、101 株のゲノム DNA からプライマー LEU4 Fw (*Hind*III) (5'-CCC AAG CTT ATG GCT AAA CAG AGT ATT ATT GCT CTT GCT GAG AAT GCG GCC TC-3') および LEU4 Rv (*Sac*I) (5'-CGC GAG CTC TTA TGC AGA GCC AGA TGC CGC AGC ATT CTT ACC TTC GAC CTC GGC-3') を用いて増幅し、pAD4 の *Hind*III-*Sac*I サイトにクローニングした。下線を引いた配列は、それぞれ *Hind*III および *Sac*I 制限部位の位置を示す。PADH1-LEU4-TADH1 融合体は、pAD4-LEU4 を鋳型として用い、融合プライマー Fw:LEU4 (5'-GCG TAC GCG TCG ACG GTA CCG GGA TCG AAG AAA TGA TGG TAA ATG-3') および in-fusion Rv:LEU4 (5'-GTT TAA ACG AAT TCG GTA CCG TGT GGA AGA ACG ATT ACA ACA GG-3') を、In-Fusion HD Cloning によって pYC130³⁰⁾の *Kpn*I サイトに In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ) を用いてクローニングし pYC130-Leu4 を構築した。下線を引いた配列は、*Kpn*I 制限部位の位置を示す。

変異した *LEU4* 遺伝子を発現するプラスミド pYC130-LEU4 (S542F)、pYC130-LEU4 (A551V)、および pYC130-LEU4 (S542F/A551V) は、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) および以下のプライマーを用いて pYC130-LEU4 から構築した。プライマー LEU4 (S542F) q-change Fw (5'-CGT AGC AAA CTA CAC AGA GCA TTT* TCT AGG TTC TGG TTC TTC TAC GCA AGC-3') および LEU4 (S542F) q-change Rv (5'-GCT TGC GTA GAA GAA CCA GAA CCT AGA A*AA TGC TCT GTG TAG TTT GCT ACG-3')、LEU4 (A551V) q-change Fw (5'-CTC TAG GTT CTG GTT CTT CTA CGC AAG T*TG CTT CTT ACA TCC ATC-3') および LEU4 (A551V) q-change Rv (5'-GAT GGA TGT AAG AAG CAA* CTT GCG TAG AAG AAC CAG AAC CTA GAG-3')、および LEU4 (S542F A551V) q-change Fw (5'-CGT AGC AAA CTA CAC AGA GCA TTT* TCT AGG TTC TGG TTC TTC TAC GCA AGT* TGC TTC TTA CAT CCA TC-3') および LEU4 (S542F/A551V) q-change Rv (5'-GAT GGA TGT AAG AAG CAA * CTT GCG TAG AAG AAC CAG AAC CTA GAA* AAT GCT CTG TGT AGT TTG CTA CG-3')。アスタリスクは、ヌクレオチド変異の位置を示す。101 株は、酢酸リチウム法により pYC130-LEU4 またはその変異体で形質転換した。形質転換体は、200 µg/ml G418 を含む YPD 寒天培地で選択した。

8) 形質転換体の増殖能の評価

G418 を含む SD+Glu 液体培地で 30°C、2 日間培養した後、各株の約 10^6 個および 10^{-1} ~ 10^{-4} の段階希釈液を SD+Glu 寒天培地にスポットし、培養することでコロニーの増大を観察した。

9) Leu4 活性の評価

Leu4 活性は、以下の手順に従って、acetyl-CoA と 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)との反応による 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB)の増加をモニターすることによって測定した³⁴⁾。YPD 培地（必要に応じて G418 を含む）で 30°C、2 日間培養した後、細胞を回収し、蒸留水で洗浄し、250 mM Tris-HCl (pH 8.5) に再懸濁した。細胞抽出物は冷却下、マルチビーズショッカー（安井機械）でガラスビーズで破碎することにより調製し、酵素源として使用した。反応混合物は、最終容量 0.25 ml で以下を含む：200 mM Tris-HCl (pH 8.5)、80 mM KCl、200 μ M acetyl-CoA、4 mM β -ケトイソ吉草酸、および酵素溶液。30°Cで 10 分間インキュベートした後、0.75 ml のエタノールを加えて反応を停止させた。その後、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中の 1 mM DTNB 0.5 ml を加え、室温で 15 分間インキュベートし、黄色の発色を 412 nm で測定した。得られた値は、 β -ケトイソ吉草酸を含まないブランクを用いて補正した。反応速度は、TNB の吸光係数 $15,570 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を使用して計算した。1 単位は、30°Cで 1 μ mol TNB/時間 の形成を触媒する酵素の量として定義した。タンパク質濃度は、標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを用いた Bio-Rad タンパク質アッセイキットを使用して測定した。

10) Leu4 の立体構造予測

Leu4 の各アミノ酸置換の影響を分析するために、SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) を使用した相同性モデリングにより、野生型および変異型 Leu4 構造を構築した³⁵⁻³⁷⁾。モデリングには、結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* 由来の L-ロイシンに結合した LeuA を鋳型構造として用いた (PDB ID code: 3FIG)。*M. tuberculosis* LeuA と、泡盛酵母の野生型、Ser542Phe、Ala551Val、および Ser542Phe/Ala551Val の変異型 Leu4 とのアミノ酸配列同一性は、それぞれ 45.73%、45.73%、45.73%、および 45.55% であった。chain A の構造は、Ser542Phe および Ala551Val の変異型 Leu4 に使用し、chain B の

構造は、野生型および Ser542Phe/Ala551Val 変異型 Leu4 に使用した。

11) 変異型 LEU4 を発現する組換え株の香気成分含有量の測定

酵母菌株をYM液体培地（必要に応じて G418 を含む）で 200 ml の三角フラスコを用いて 30℃ で 3 日間培養し、香味の生成を GC-MS で分析した。GC-MS 分析は、AOC-5000 PLUS オートサンプラーを備えた GCMS-QP2010 SE（島津製作所）で実施した。キャリアガスとしてヘリウムを流速 0.61 ml/分 で使用した。カラムの初期温度を 40℃ で 5 分間保持し、4℃/分 の速度で 60℃ まで昇温し、1℃/min の速度で 70℃ まで昇温し、10℃/分 の速度で 120℃ まで昇温し、15℃/分 の速度で 240℃ まで昇温し、240℃ で 5 分間保持した。インジェクター温度は 250℃、スプリットモード（スプリット比 1:5）で噴射した。PTFE セプタムキャップで密封された 20 ml バイアル中の精製水中の各イソアミルアルコール溶液（0.3～300 µg/ml）1.8 ml に、精製水中の n-アミルアルコール溶液（20 µg/ml）0.2 ml を加えた。内部標準として水を用いた。サンプル溶液は精製水で 10 倍に希釈した。希釈したサンプル溶液を、イソアミルアルコール溶液と同じ方法を使用して、内部標準とともに 20 ml バイアルに加えた。標準溶液と試料溶液のバイアルを 70℃ で 30 分間処理し、バイアル中の気相を 2 ml 注入し、気相のイソアミルアルコールと n-アミルアルコールを HP-INNOWAX カラム（60 m × 0.25 mm、膜厚 0.25 µm; Agilent Technologies）を使用し、選択イオンモニタリング（SIM）モードで MS によって測定し、内部標準法によって定量化した。質量分析計の条件は、イオン化エネルギー、70 eV、イオン源温度 200℃、界面温度 250℃、SIM 選択イオン モニタリング：イソアミルアルコール（m/z: 70、55）、n-アミルアルコール（m/z: 55、70）とした。

1-2-3 結果と考察

1) 泡盛酵母の TFL 耐性株からの L-ロイシン高生産変異株の分離

TFL は、実験室酵母および清酒酵母において L-ロイシンの毒性アナログであることが知られていることから^{38),39)}、二倍体泡盛酵母 101 株から TFL 耐性変異株の分離を試みた。101 株は、150 µg/ml の TFL 濃度での生育が強く阻害されたものの、固形培地に L-バリンや L-イソロイシンを添加せず、同濃度の L-ロイシンを添加すると TFL による生育阻害は完全に相補された（データは示さず）。このことから、TFL 耐性変異株から細胞内 L-ロイシンの生産性が増加した変異株を分離できると考えられた。6% エチルメタンスルホン

酸エチルで処理した細胞を 150 µg/ml TFL を含む SD 寒天培地に直接播種した場合、3 回の独立した実験から合計で約 60 個の TFL 耐性コロニーが得られた。一方、突然変異処理を行わない場合には、コロニーは得られなかった。次に、TFL 耐性変異株とその親株の細胞内アミノ酸含量をアミノ酸アナライザーで測定した（データ示さず）。予想どおり、L-ロイシンの含有量は親株よりも変異株の方が高かった。TFL 耐性変異株 14 クローンについて評価したところ、L-ロイシン含量は、親株（乾燥細胞重量の 0.098%）と比較して、変異株では 2-7 倍（0.20-0.66%）であった。対照的に、これらの変異株で他のアミノ酸含有量は、親株と比較してほとんど増加していなかった（データ示さず）。これらの結果は、泡盛酵母においても清酒酵母と同様に、細胞内 L-ロイシンを蓄積する変異株を取得するためには、TFL 耐性を指標とすることが有効であることが示された^{39),40)}。

2) L-ロイシン蓄積泡盛酵母変異株の泡盛発酵試験

細胞内 L-ロイシン蓄積が泡盛醸造に及ぼす影響を調べるために、L-ロイシン含量が顕著に増加を示した 4 つの TFL 耐性変異株を用いて発酵試験を行った。その結果、18-T55 株は、実験室規模とパイロット規模の両方の条件

表 3 実験室規模およびパイロット規模の発酵試験におけるもろみの揮発性芳香成分

Compounds (µg/ml)	Laboratory-scale			Pilot-scale		
	101	18-T55	Fold change	101	18-T55	Fold change
1-Hexadecanol	0.03	0.02	0.68	0.02	0.02	0.94
Isoamyl alcohol	466.32	695.35	1.49	269.06	352.49	1.31
Isoamyl acetate	16.28	16.81	1.03	6.06	4.76	0.79
Ethyl caprylate	0.98	0.75	0.77	4.37	4.68	1.07
Ethyl stearate	0.75	0.93	1.24	0.26	0.34	1.27
Ethyl laurate	0.18	0.13	0.73	2.25	2.07	0.92
Ethyl palmitate	3.92	4.69	1.20	4.77	4.53	0.95
Ethyl myristate	0.49	0.47	0.97	1.80	1.72	0.95

1 回の実験データを示す。

下で、評価した TFL 耐性変異株の中で最も高い濃度のイソアミルアルコールを生成し、その濃度は親株である 101 株よりも約 30-50% 多かった（表 3）。これは、L-ロイシン含量が親株（乾燥細胞重量の 0.098%）と比較して 18-T55 株（0.41%）で著しく増加したことが関与していると考えられた。また、18-T55 株は、実験室規模とパイロット規模の両方の条件下で、ステアリン酸

エチルの濃度が約 20% 増加していた。

3) 18-T55 株の Leu4 活性と LEU4 遺伝子の配列

S. cerevisiae における L-ロイシンの生合成は、L-ロイシンによる Leu4 活性のフィードバック阻害によって調節されている^{34),38),39),41)}。そこで、101 株、18-T55 株での Leu4 活性を評価した (表 4)。その結果、101 株の Leu4 活性は 10 mM L-ロイシンによって著しく阻害され、泡盛酵母の Leu4 活性は L-ロイシンによるフィードバック阻害を受けることが示された。つまり、Leu4 は泡盛酵母での L-ロイシン生合成における律速酵素であることがわかった。一方、18-T55 株の Leu4 活性は、10mM の L-ロイシンの存在下でも約 80% に維持されていた。この結果は、TFL 耐性変異株 18-T55 で発現した Leu4 は、野生型株の同酵素よりもフィードバック阻害の影響を受けにくいことを示唆している。

表 4 各酵母の Leu4 活性の比較

Strains	IPMS activity ($\mu\text{mol CoA/h/mg}$) in the presence of		Activity remaining in the presence of 10 mM L-leucine (%)
	No L-leucine	+10 mM L-leucine	
101-18	0.372 \pm 0.02	0.022 \pm 0.01	5.9
18-T55	0.308 \pm 0.06	0.247 \pm 0.04	80.2
101-18 (+WT)	0.390 \pm 0.08	0.025 \pm 0.01	6.4
101-18 (+S542F)	0.428 \pm 0.04	0.179 \pm 0.04	41.9
101-18 (+A551V)	0.467 \pm 0.01	0.193 \pm 0.03	41.4
101-18 (+S542F/A551V)	0.374 \pm 0.06	0.221 \pm 0.09	59.0

独立した 3 回の実験の平均値を示した。

次に、ダイレクト PCR での DNA シーケンスにより、101 株と 18-T55 株の *LEU4* 遺伝子の塩基配列を解析した (図 12)。その結果、101 株の *LEU4* の配列は実験室株 S288c の配列と同一であった。18-T55 株では、1,625 番目と 1,652 番目の塩基が C と T の混合塩基に変異したヘテロ変異であり、Ser542 が Phe に、Ala551 が Val にそれぞれ置換されていた (図 12)。*S. cerevisiae* の実験室株では、TFL 耐性の原因となる Leu4 の 6 つのアミノ酸置換、Gly514Asp、Gly516Asp、Ser519Thr、Glu540Lys、His541Pro、および Ala552Thr が、L-ロイシンによるフィードバック阻害の抑制をもたらすことが報告されている⁴¹⁾。また、清酒酵母の TFL 耐性変異株における Leu4 の Asp578Tyr 置換は、L-ロイシンによるフィードバック阻

害に対する感受性が低下することがわかっている³⁹⁾。今回見出された Ala551Val および Ser542Phe を伴う変異は、いずれも L-ロイシンによるフィードバック阻害を抑制する新規な変異であった⁴¹⁾。

4) L-ロイシン生合成および Leu4 活性に対する LEU4 変異の影響

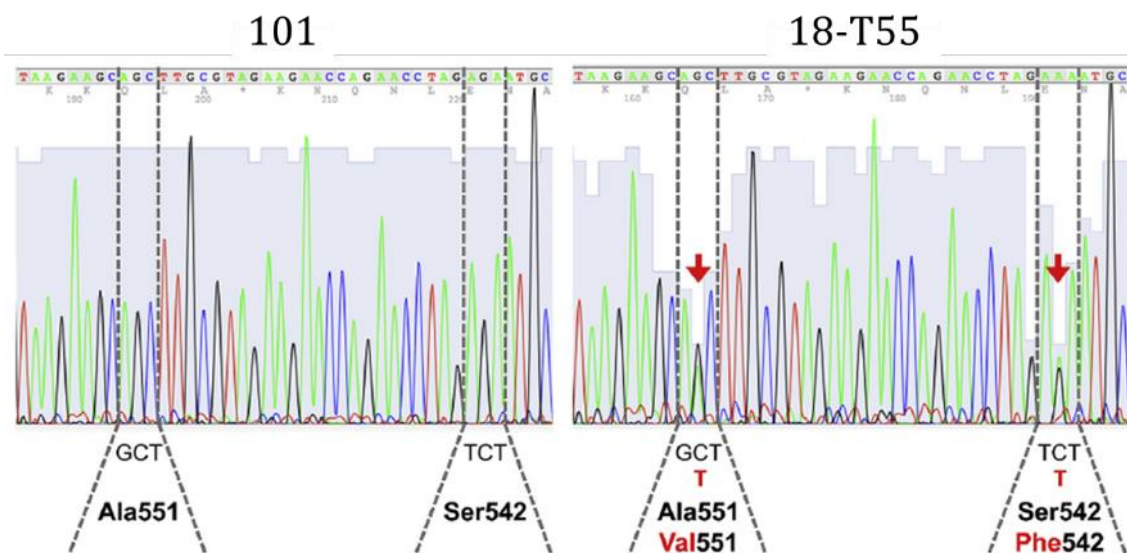


図 12 101 株および 18-T55 株の *LEU4* 遺伝子の塩基配列結果の一部
上部の塩基配列は DNA の相補鎖を示す。赤矢印は、18-T55 株で見出した
変異を示す。

18-T55 株で見出した *LEU4* の変異をさらに解析するため、Leu4 変異体 (*LEU4*^{S542F}、*LEU4*^{A551V}、および *LEU4*^{S542F/A551V}) の発現プラスミドを構築し、101 株に導入した。その結果、*LEU4*^{S542F}、*LEU4*^{A551V}、および *LEU4*^{S542F/A551V} の発現は、酵母に対して強い TFL 耐性を付与した。また、野生型 *LEU4* 遺伝子のみを含む細胞は TFL に感受性を示した (図 13A)。101 株は二倍体であることから、この結果は TFL に対する耐性を付与する *LEU4*^{S542F} および *LEU4*^{A551V} 対立遺伝子は優性であることを示している。次に、組換え株の Leu4 活性を評価した (表 4)。L-ロイシンの非存在下では、野生型酵素の活性と比較して変異型 Leu4 の活性に顕著な低下はみられなかった。これは、Leu4 の触媒部位では構造変化がほとんど起こっていなかったことを示している。18-T55 株と同様に、変異型 Leu4 (*Ser542Phe*、*Ala551Val*、および *Ser542Phe/Ala551Val*) は、10 mM L-ロイシンの存在下でフィードバック阻害に対して非感受性だったが、野生型 Leu4 の L-ロイシン非存在下での活性は 6.4% に低下していた。次に、細胞の L-ロイシン含量に対する *LEU4* 変異の寄与度を調べた (図 13B)。その結果、*LEU4*^{S542F}、

LEU4^{A551V}、および *LEU4*^{S542F/A551V} を発現する酵母の L-ロイシン含有量は、野生型 *Leu4* を保有する酵母の約 2.0 倍であることがわかった。一方、*LEU4*^{S542F/A551V} での結果から、2 箇所のアミノ酸置換について、L-ロイシン産生に対する優位な相加効果は観察されなかった。これらの結果は、変異型 *Leu4* におけるフィードバック阻害に対する感受性の低下が、泡盛酵母の細胞内 L-ロイシン蓄積を引き起こすことを示している。しかし、*Leu4* 変異体を過剰発現する 101 株における L-ロイシン生産性およびフィードバック阻害耐性は、18-T55 株よりも低かった。これは、上記の表現型に影響を与える *LEU4* 以外の変異が 18-T55 株に導入されたためと考えられる。今後、次世代シーケンシングによる 18-T55 株の全ゲノム配列の解析により、L-ロイシンの過剰生産に寄与する他の変異の発見が期待できる。

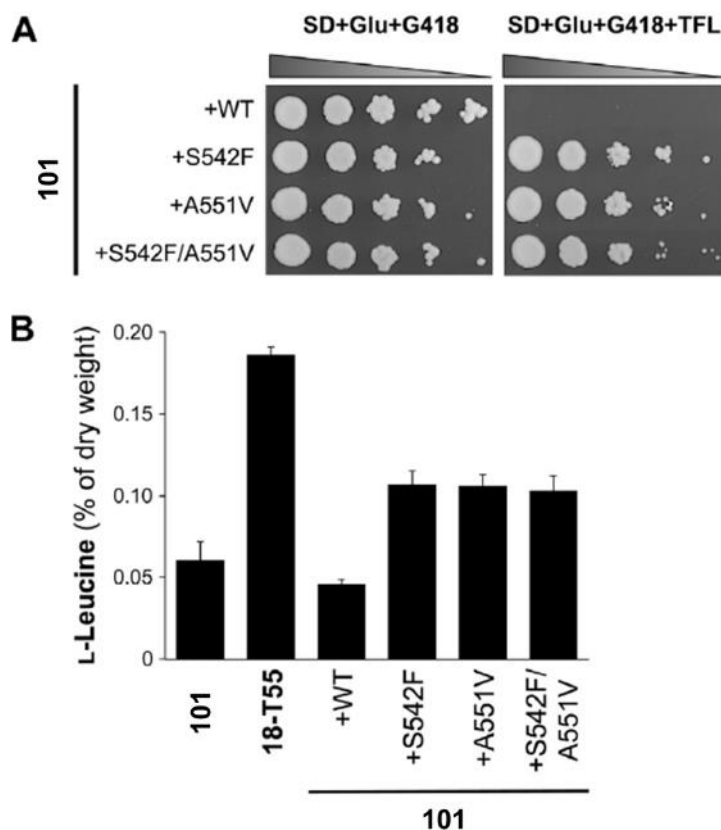


図 13 泡盛酵母における L-ロイシン生合成に対する *LEU4* 変異の影響
 (A) 野生型 *Leu4* (+WT)、*LEU4*^{S542F} (+S542F)、*LEU4*^{A551V} (+A551V)、*LEU4*^{S542F/A551V} (+S542F/A551V) の増殖
 (B) 101 株、18-T55 株、野生型 *LEU4* (+WT)、*LEU4*^{S542F} (+S542F)、*LEU4*^{A551V} (+A551V)、*LEU4*^{S542F/A551V} (+S542F/A551V) を発現する株での細胞内 L-ロイシン含量。値は 3 回の独立した実験の平均と標準偏差で示す。

5) Leu4 における L-ロイシン結合部位の構造予測

アミノ酸置換が Leu4 のアロステリック調節に及ぼす影響を立体構造予測により解析した。*Mycobacterium tuberculosis* (PDB ID Code: 3FIG) の α -Isopropylmalate synthase の X 線結晶構造⁴²⁾から、L-ロイシンによるフィードバック阻害に關与する泡盛酵母 (*S. cerevisiae*) の Leu4 の

Sake yeast Kyokai no. 7	1	-----MAKQSIIALAENAASRASRVIPFVKLAYKNMLKDFSSSKYKPF---NAPKLSN	49
Awamori yeast 101	1	-----MAKQSIIALAENAASRASRVIPFVKLAYKNMLKDFSSSKYKPF---NAPKLSN	49
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1	MAITSESPD AT YTESFGAHTIVKPGAPFRVQPSWNPQRASSM EV NR Y RPFAEEVEPIRLRN	60
Sake yeast Kyokai no. 7	50	RFWPDNRITRAPRWLSTDLRDGNQSLPDPMSVEQKKEYFHKLVNIGRKEIEVSPFASQT	109
Awamori yeast 101	50	RFWPDNRITRAPRWLSTDLRDGNQSLPDPMSVEQKKEYFHKLVNIGRKEIEVSPFASQT	109
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	61	RTWPDNRVIDRAPLWCAVDLRDGNQALIDPMS PA RKRRM ED LVRMG Y KKEIEVGFPSASQT	120
Sake yeast Kyokai no. 7	110	DFDFIRYAVEN--APDDVSIQCLVQSREHLIKRTVEALTGAKKATIHHTYLATSDMRREIV	167
Awamori yeast 101	110	DFDFIRYAVEN--APDDVSIQCLVQSREHLIKRTVEALTGAKKATIHHTYLATSDMRREIV	167
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	121	DFDFVREIIEQGAI PDDV IQVLI Q CRPELIERTFQACSGAPRAIVEHFNSTISILQRRV	180
Sake yeast Kyokai no. 7	168	FNMSRBEAITHAVEATKLVKRLTKDDPSQQAIRMSYEFSPFCFSDTPGEFAVEICEAVK	227
Awamori yeast 101	168	FNMSRBEAITHAVEATKLVKRLTKDDPSQQAIRMSYEFSPFCFSDTPGEFAVEICEAVK	227
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	181	FRANRAEVQA IT TDGA---RKCVEQAAYPGTQ NR FEYSPESYTGTELEYAKQVCD AV GE	237
Sake yeast Kyokai no. 7	228	AWEPTDENPIIFNLPATVEVASPNVYADQIEYFATHITEREKVCIS TH CHNDRGCGVAAT	287
Awamori yeast 101	228	AWEPTDENPIIFNLPATVEVASPNVYADQIEYFATHITEREKVCIS TH CHNDRGCGVAAT	287
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	238	VIA PT PERPIIFNLPATVEMITTPNVYAD SI EWMSRNLANRE SV ILSL PH PNDRGTAVAA	297
Sake yeast Kyokai no. 7	288	ELGMLAGADRVEGCLFNGERTGNVDLVTVAMNMYTQGVSPNLD FS DLTSLVDVVERC NK	347
Awamori yeast 101	288	ELGMLAGADRVEGCLFNGERTGNVDLVTVAMNMYTQGVSPNLD FS DLTSLVDVVERC NK	347
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	298	ELGFAGADR VE GCLFNGERTGNV CL VLGLNLF SR GWDEQID FS NIDEIRRTVEY CN Q	357
Sake yeast Kyokai no. 7	348	IPVSRAPYGGDLVQAFSGSHQDAIKKGFEN---LQKKRA--QGETQWRIPYLPID PKD	402
Awamori yeast 101	348	IPVSRAPYGGDLVQAFSGSHQDAIKKGFEN---LQKKRA--QGETQWRIPYLPID PKD	402
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	358	LPVHER HP YGGDLVY T AFSGSHQDA IK KGLDAMKLDADAADCVD DM LWQV Y LPID PKD	417
Sake yeast Kyokai no. 7	403	I GR DYEA V IRVNSQSGKGG AA WVILRS L GLDLPR N MQIEFSSAVQ DH ADSL---GRELKS	459
Awamori yeast 101	403	I GR DYEA V IRVNSQSGKGG AA WVILRS L GLDLPR N MQIEFSSAVQ DH ADSL---GRELKS	459
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	418	VGR I DYEA V IRVNSQSGKGG V YIMKTDH GL SLPRLQIEFSQVI Q KIREGTAGEGGEVSP	477
Sake yeast Kyokai no. 7	460	DEISKLFKEA NY NDEQYQAISLVNYNVEKFGTERRVETGQVKVGDQIVD EG TGNGPIS	519
Awamori yeast 101	460	DEISKLFKEA NY NDEQYQAISLVNYNVEKFGTERRVETGQVKVGDQIVD EG TGNGPIS	519
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	478	K EM WD AE AE YL APV R PLE R IRQ H VD AA DD GG TT SI -TATVKINGVETE IS SGSGNGPLA	536
Sake yeast Kyokai no. 7	520	SI VD ALSNLLN V REAV ANY TEHSLGSGSSTQAAS Y IHL SY RRNADNEKAYK W GVGV S EDV	579
Awamori yeast 101	520	SI VD ALSNLLN V REAV ANY TEHSLGSGSSTQAAS Y IHL SY RRNADNEKAYK W GVGV S EDV	579
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	537	AFV HA LADV-GFDVAVLDY EH AMSAGDDAQA AY VEASVTIASPAQ P GEAGRHASDPVT	595
Sake yeast Kyokai no. 7	580	GDSSVRAIFATINNIHSGDVSIPSLAEVEGKNAAASGSA-----	619
Awamori yeast 101	580	GDSSVRAIFATINNIHSGDVSIPSLAEVEGKNAAASGSA-----	619
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	596	IASPAOPGEG R HASDPVTSKTVWGVGIAPSIT TS SLRAVVS AV NRAAR	644

図 14 清酒酵母協会 7 号 (GenBank DG000051)、泡盛酵母 101、結核菌 (AL123456) の LeuA のアミノ酸配列比較

同一および類似のアミノ酸残基は、それぞれ黒と灰色の網掛けボックスで示した。ダッシュは、これらの位置に対応するアミノ酸残基がないことを示す。

Ser542 と Ala551 が推定でき、*M. tuberculosis* の Ala558 と Ala567 にそれぞれ対応した (図 14)。泡盛酵母の Leu4 は、結核菌の同酵素とアミノ酸配列で約 46%の相同性がみられた。

そこで、結核菌 LeuA (3FIG) を鋳型としてホモロジーモデリングを行い、泡盛酵母の Leu4 における L-ロイシン結合部位周辺の構造を予測した (図 15)。L-ロイシンが野生型 Leu4 の空洞にスムーズに収まることは明らかであり (図 15A)、Leu4 のモデル化された構造が合理的であることを示している。野生型 Leu4 の Ser542 と Ala551 は、L-ロイシン結合部位を含む空洞の近くに位置していた。変異型 Leu4 のモデリングは、542 番目の Ser542 が Phe

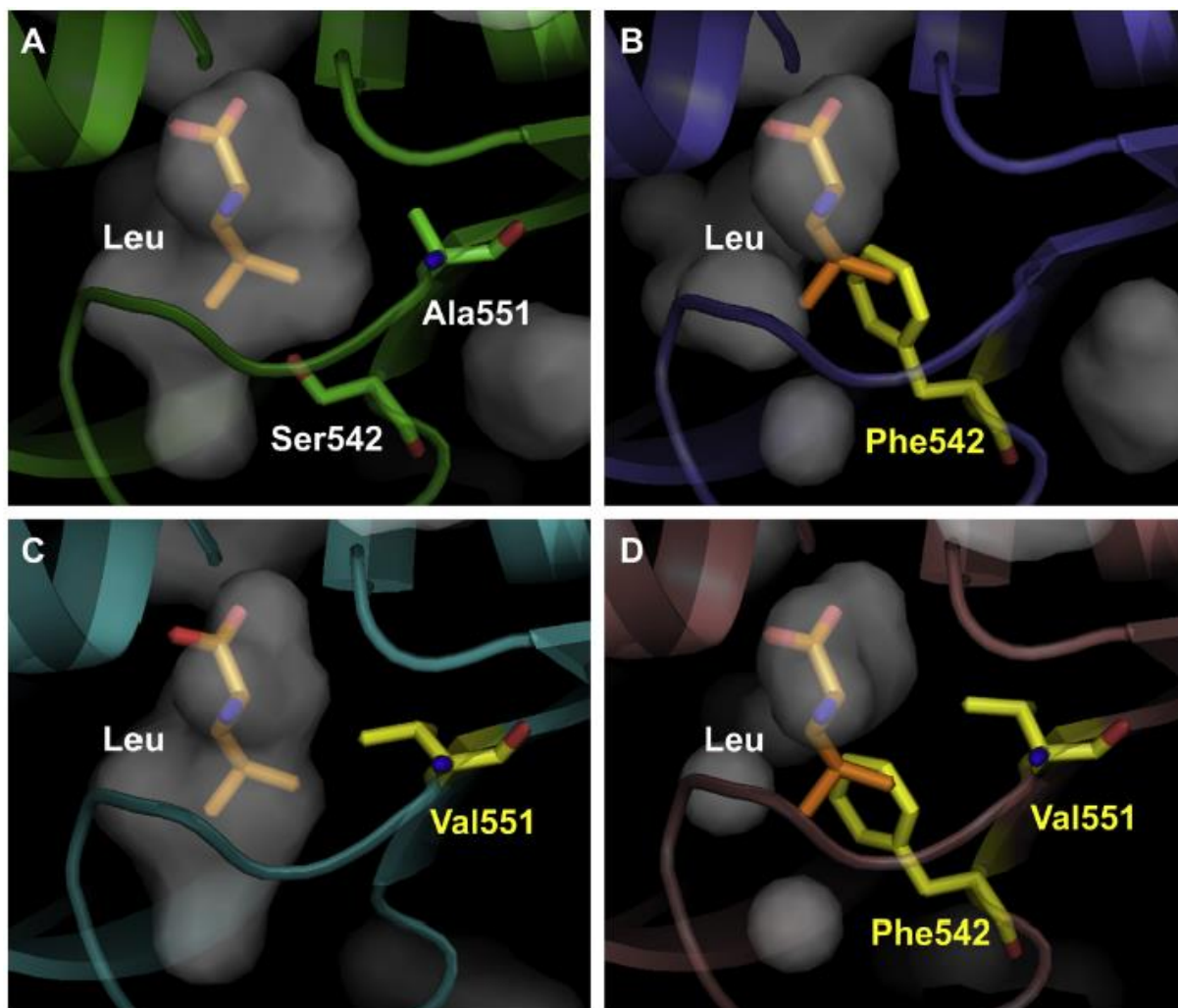


図 15 泡盛酵母の Leu4 における L-ロイシン結合部位の立体構造予測
各変異型 Leu4 を立体構造グラフィックで示した。野生型 (A)、Ser542Phe (B)、Ala551Val (C)、Ser542Phe/Ala551Val (D) の各変異型 Leu4 は、それぞれ緑、紫、水色、ピンクで、L-ロイシンはオレンジ色で示し、変異残基は黄色で示した。Leu4 の空洞は、それぞれ灰色で表示した。

に置換されることで Phe のベンジル側鎖により L-ロイシン結合空間が狭まることが示された (図 15B)。さらに、Ala551 が Val に置換されると、Val の側鎖が大きいため空洞サイズが減少し、L-ロイシン結合の障害となる (図 15C)。

また、Ser542Phe/Ala551Val の構造は、それぞれの単一置換の構造とほぼ同じであると予測された (図 15D)。以上のことから、ホモロジーモデリングにより、L-ロイシンの結合がこれらのアミノ酸置換 (Ser542Phe、Ala551Val) によって弱まり、L-ロイシンによるフィードバック阻害が抑制されたと考えられた。これまでに報告されたフィードバック阻害を抑制する残基は、実験室株の Gly514、Gly516、Ser519、Glu540、His541、Ser547、および Ala552⁴¹⁾ および清酒酵母の Asp578³⁹⁾ であり、今回はこれらに加えて、新たに泡盛酵母の Leu4 にて Ser542 および Ala551 を見出し、これらが L-ロイシンによるフィードバック阻害に関与する重要な残基であることを示した。

S. cerevisiae の Leu4 の R 領域と呼ばれる部分が、L-ロイシンによるフィードバック阻害と、CoA による Zn²⁺を介した不活化の両方には関与していると報告されている⁴¹⁾。清酒酵母では、L-ロイシンフィードバック阻害の抑制を示す TFL 耐性変異株 (*LEU4*^{D578Y}) とその親株の Leu4 活性は、高濃度の CoA の添加によって著しく阻害され、Leu4 変異体は CoA による Zn²⁺を介した不活性化に対して依然として感受性が高かった³⁹⁾。泡盛酵母の Leu4 における 2 つのアミノ酸置換 Ser542Phe および Ala551Val が、CoA による Zn²⁺を介した不活性化に影響を与えるかどうかを調べるには、CoA 存在下での酵素活性を解析する必要がある。

6) 変異型 *LEU4* を発現する泡盛酵母でのイソアミルアルコール生産性

TFL 耐性変異株における L-ロイシンの蓄積は、泡盛醸造中のイソアミルアルコールの増加をもたらした (表 3)。そこで、変異型 *LEU4* を発現する組換え株を YM 培地で培養し、GC-MS を用いたヘッドスペース法により揮発性物質由来の香味量を測定した (図 16)。予想どおり、イソアミルアルコール濃度は L-ロイシン含量に比例して、野生型 *LEU4* 酵母 (約 240 µg/ml) よりも *LEU4*^{S542F}、*LEU4*^{A551V}、および *LEU4*^{S542F/A551V} を発現する酵母 (約 560-630 µg/ml) で高濃度であった (図 16A)。YM-5 培地で培養した場合、泡盛酵母 101 株の細胞外イソアミルアルコール濃度は、清酒酵母 K30 の約 2.5 倍高かった³⁹⁾。これらの結果は、L-ロイシンによるフィードバック阻害に対する脱感作を伴う変異型 *LEU4* が、泡盛酵母で L-ロイシンの細胞内蓄積とイソアミルアルコールの細胞外過剰生産を引き起こすことを示している。

吟醸酒の品質には、バナナ様の香気成分として知られる酢酸イソアミルが重要な役割を果たしており、酢酸イソアミルの生成がイソアミルアルコールの濃度とアルコールアセチルトランスフェラーゼの活性に大きく依存することが報告されている⁴⁰⁾。YM 培地を用いた発酵試験では、18-T55 株 および変異型 *LEU4* を有する組換え株は、101 株および野生型 *LEU4* を発現する組換え体と比較して、酢酸イソアミルの濃度が約 20% および 50% 増加した (図 16B)。対照的に、今回の検討では泡盛中の 101 株と 18-T55 株の間で酢酸イソアミル産生量にほとんど差がなかった (表 3)。この結果は、泡盛醸造の複雑さを示しており、醸造スケールや攪拌効率、頻度などの醸造条件による影響が考えられる。18-T55 株の酢酸イソアミル含有量が増加しなかった理由は不明のままであるものの、18-T55 株では遺伝子発現またはアルコールアセチルトランスフェラーゼの酵素活性が、泡盛製造中に未知のメカニズムで抑制された可能性も考えられる。イミダゾール系抗真菌剤であるエコナゾールは、清酒酵母のアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性を阻害する細胞内不飽和脂肪酸を減少させることが報告されている⁴³⁾。したがって、エコナゾール耐性変異株の分離は、泡盛酵母の酢酸イソアミル生産性をさらに向上させる有効な方法であると考えられる。

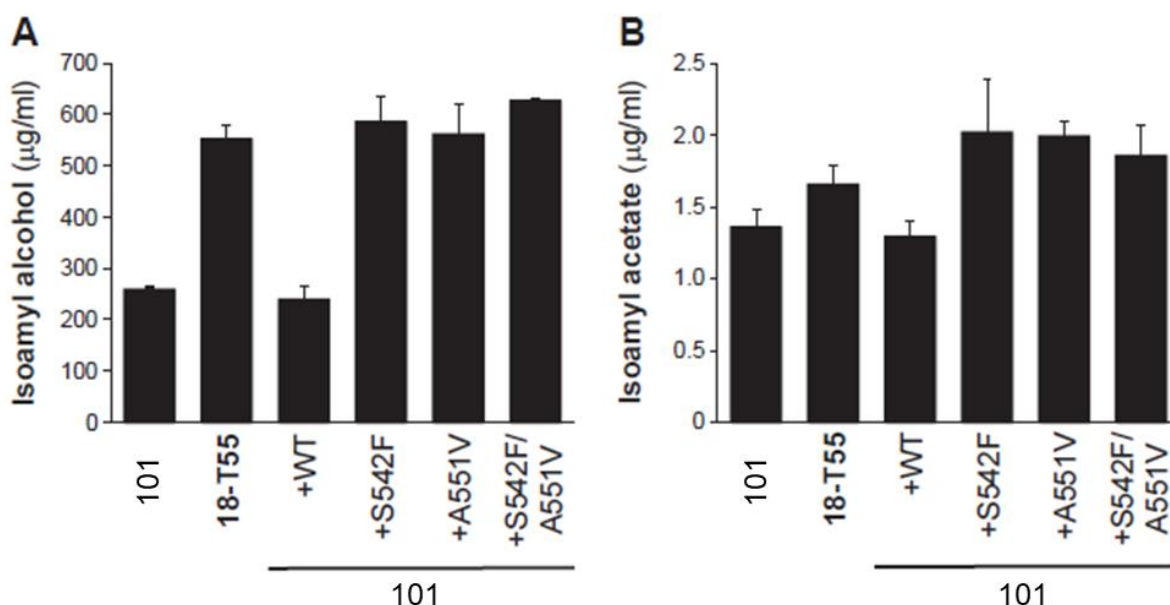


図 16 泡盛酵母の細胞外イソアミルアルコールおよび酢酸イソアミル含有量 101、18-T55、および野生型 *LEU4* (+WT)、*LEU4*^{S542F} (+S542F)、*LEU4*^{A551V} (+A551V)、*LEU4*^{S542F/A551V} (+S542F/A551V) を発現する株。値は 3 回の独立した実験の平均と標準偏差で示す。

7) 実機モデル小仕込み試験での酢酸イソアミルの濃度

実験室レベルおよびパイロットレベルでの仕込み試験では、18-T55 株は親株と比較してイソアミルアルコール含量は増加したが、酢酸イソアミル含量の増加は観察されなかった（表 3）。この原因は不明であったことから、泡盛の商業醸造の条件に近づけるためラボスケールよりも規模が大きいパイロットスケールでの仕込み試験により、酢酸イソアミル濃度の増加が観察されるかどうか検討した（図 17）。パイロットスケールでの小仕込み試験は、ラボスケールの 20 倍の規模として、商業生産で実際に使われている麴（神村酒造）を用いて、仕込み後 5 日間は 1 回/日の攪拌を行い、以降は攪拌作業以外は密閉し、1 回/2 日の攪拌を行った。その結果、イソアミルアルコール、酢酸イソアミルともに、親株である 101 株と比較して約 2 倍に増加していた。このように、ラボスケールとパイロットスケールでともにイソアミルアルコールの増加は同様であったものの、酢酸イソアミルの増加に違いが見られた。この原因については不明であるものの、麴の品質や攪拌条件の影響などが考えられる。

本研究は、イソアミルアルコールを過剰生産する泡盛酵母の変異株の分離を報告した最初の研究である。また、泡盛酵母の変異型 *Leu4* (*LEU4*^{S542F}、*LEU4*^{A551V}) が *Leu4* の L-ロイシンによるフィードバック阻害に対する脱感作を引き起こし、細胞内に L-ロイシンが蓄積することを明らかにした。近年、味や風味の異なる泡盛を製造するために、泡盛酒造所は新しい酵母菌株を必

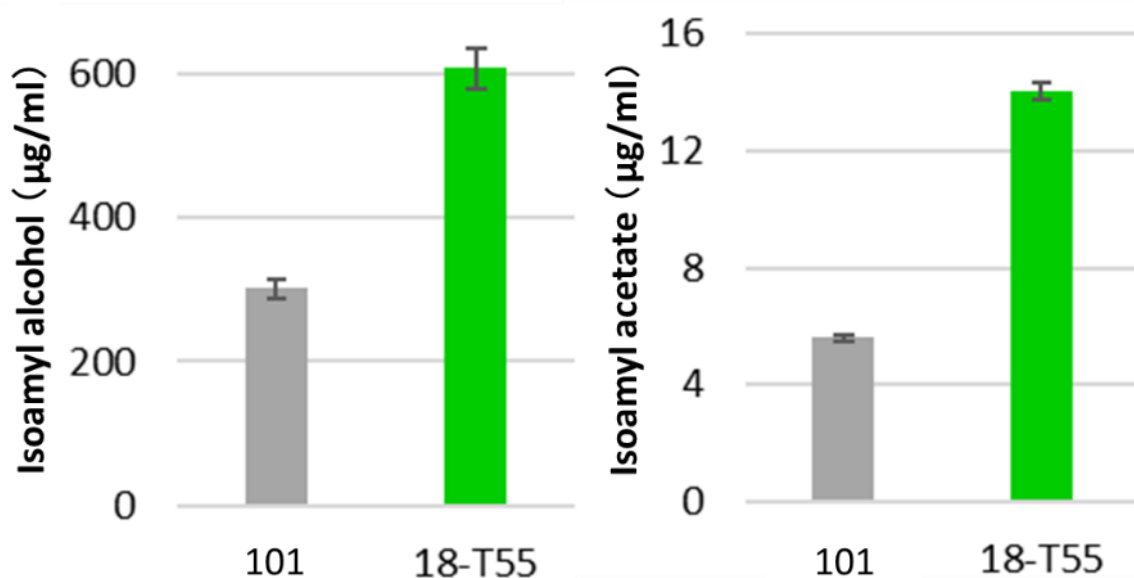


図 17 18-T55 株を用いて実機モデル小仕込み試験で醸造した泡盛のイソアミルアルコール、酢酸イソアミル濃度
値は 3 回の独立した実験の平均と標準偏差で示す。

要としている。酵母の DNA 配列のみから成るセルフクローニング酵母は、遺伝子組換え酵母として扱う必要はないものの⁴⁴⁾、本研究で用いた酵母を育種するという従来の方法は、食品製造に用いる微生物として消費者に受け入れられやすいと考えられ、これらのアプローチは、新しい泡盛酵母を育種するための実用的な方法として重要であると考えられる。

本研究で得られた 18-T55 株を用いて実際に商品開発が行われ、新里酒造(株)より「ハイパーイースト 101」が商品化された(2016 年)。

第 2 章 ハイビスカス酵母の取得および新たな酵母の育種¹⁹⁾

2-1 沖縄の自然界からのハイビスカス酵母の取得と解析

2-1-1 背景

泡盛醸造に用いることができる汎用酵母は泡盛酵母 101 株のみであり、ほとんどの泡盛がこの 101 株を用いて醸造されている。この 101 株は、泡盛もろみでのアルコール生産性が高く、得られる泡盛の芳香が豊かでバランスが良いことなど、泡盛醸造において極めて優れた特性を有している⁷⁾。したがって、101 株は泡盛醸造に適した基本となる遺伝的背景を有していると言える。一方、酵母は酒類の風味に大きく影響することから、異なる系統の泡盛酵母の確立は、泡盛全体の酒質バラエティー化を目指した取り組みとして大きな意味がある。

最近では、一部の泡盛でマンゴーや黒糖など、沖縄の自然由来の酵母を使った泡盛が製造・販売されている。これらの泡盛は、実際に従来酵母菌株で製造されたものとは異なる味と風味の特徴を持っているとアピールされている。しかし、新たに分離された酵母株の遺伝子解析や得られた泡盛の風味に関する科学的な研究はほとんど行われていない。これらのことから、本研究では、沖縄の自然界から泡盛醸造に適した酵母を分離し、酵母の全ゲノム情報を取得しその系統を明らかにするとともに、発酵試験などにより当該株の特徴を科学的に評価することを目的とした。

2-1-2 材料と方法

1) 培地

酵母は、栄養豊富な YPD 培地（2%グルコース、1%酵母エキス、2%ペプトン）で培養した。

2) ハイビスカスの花からの泡盛酵母の分離

沖縄のハイビスカスの花を合計 23 検体を採取した。これらの試料を 4% エタノールを含む YPD 培地で 32℃で 3 日から 2 週間培養した。濁度が上昇した培地の懸濁液を YPD 寒天培地に播種し、32℃で培養した。24-48 時間培養後、十分に成長した単一コロニーを採取し、実験室規模の発酵試験

により、エタノール生産性の高い株を選択した。

3) 採取株の種の判別

試料となる酵母を培養し、ゲノム DNA を抽出した。このゲノム DNA をテンプレートとして、プライマー NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG AAAG-3') および NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') を用いて PCR を行うことで、26S rDNA 領域の一部 (560 bp) を増幅した。増幅した PCR 産物は塩基配列解析を行い、BLAST 検索などにより種を判断した。

4) 泡盛の発酵試験と蒸留

実験室での小仕込み試験は以下の条件で行った²³⁾。200 ml 三角フラスコに米麴 50 g、水 65 ml、前培養酵母 0.1 ml を混合した。この醪を 25°C で 14 日間培養して最終もろみを調製した。もろみの上澄みをろ過し、可搬式アルコール検出器 (AL-3; 理研計器) を用いてエタノール濃度を分析した。香気成分濃度を分析するために、水蒸留器 (MH943SBS; メガホーム) を使用して常圧蒸留で蒸留し、エタノール濃度が 10% に達した時点で停止した。

5) 高速液体クロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー分析

Shimadzu HPLC システムを使用して 4-VG の定量を行った。蒸留した泡盛液をポアサイズ 0.45 μm のフィルターに通した。濾過したサンプルを C18 カラムにロードし、メタノールを含む酢酸緩衝液で 0.5 ml/分の流速で溶出した。溶出は、溶媒 A (50 mM 酢酸、pH4) で開始し、溶媒 B (100% メタノール) を 90% になるまで徐々に増やした。吸光度 254 nm のクロマトグラムでは、標準液と同じ保持時間に 4-VG のピークが検出された。ピーク面積を計算し、標準溶液と比較して濃度を評価した。

揮発成分の分析は、Heracles II システム (アルファ・モス) を用い、カラムは MTX-5 および MTX-WAX を使用した。アルコール濃度を 30% に合わせた試料を 10 ml 分注し、60°C で 10 分間加熱した後、固相マイクロ抽出ファイバー (65 μm PDMS/DVB StableFlex/ss) を用いて 60°C で 30 分間吸着した。試料は、50 $\mu\text{l/s}$ で 1 μl 注入し、初期温度 40°C、昇温速度 1.50°C/s、最終温度 250°C で分析した。定量は標準試料との面積比で計算した。

6) ゲノム配列データの取得と系統解析

酵母を培養し、集菌した菌体からゲノム DNA を抽出した。得られたゲノム DNA は Qubit (Thermo) で定量した。Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina) を用いてプロトコルに従い、各ゲノムの NGS

ライブラリを構築した。得られたゲノムライブラリーは、MiSeq Reagent Kit v2 または v3 (Illumina) を用いて MiSeq (Illumina) でシーケンスした。得られたデータおよび Sequence Read Archive (SRA) からのシーケンスデータを用いて、CLC Genomics Workbench v22.0.2 (QIAGEN) にて解析を行った。解析は、リードをトリミング後、*S. cerevisiae* S288c (GCA_000146045) のリファレンスへのマッピング、バリエントコールを行った。coverage table file と variants table file をエクスポートした。これらは、カスタムスクリプト (https://github.com/BiojetCoLtd/GW_to_phylogeny) を使用して合成配列の fasta ファイルに変換した。このスクリプトは、カバレッジとバリエントのデータからホモ接合 SNP のみの塩基配列を生成することができる。fasta ファイルは、MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis ソフトウェア⁴⁵⁾を使用した近隣結合法により系統解析を行った。

2-1-3 結果と考察

1) 沖縄の自然界からのハイビスカス酵母の取得

沖縄のハイビスカス花から泡盛醸造に適用可能な新たな酵母株の取得を目指した。ハイビスカスの花 23 検体を試料として、4% エタノールを含む YPD 培地で 32°C で培養したところ、3 日から 2 週間の培養期間で全ての試料において高い濁度が得られた。これらの懸濁液を YPD 寒天培地に播種し、十分に成長した単一コロニーを採取し、実験室規模の発酵試験により、エタノール生産性の高い株を選択した。その結果、酵母コロニーの中で、エタノール生産性の高い HC02-5-2 株を分離した。HC02-5-2 株の遺伝子解析により種を同定したところ、26S rDNA 配列から *S. cerevisiae* であると判断された。

ハイビスカス酵母 HC02-5-2 株 が泡盛醸造に用いることが可能かどうかを調べるために、実験室規模の小仕込み試験を行った。もろみを 14 日間培養後、HC02-5-2 株 で発酵させたもろみのエタノール濃度は 18.75% で、従来の泡盛酵母 101 株は 17.71% であった (図 18A)。この結果から、HC02-5-2 株は泡盛もろみ中で十分なエタノール生産性があることを確認した。

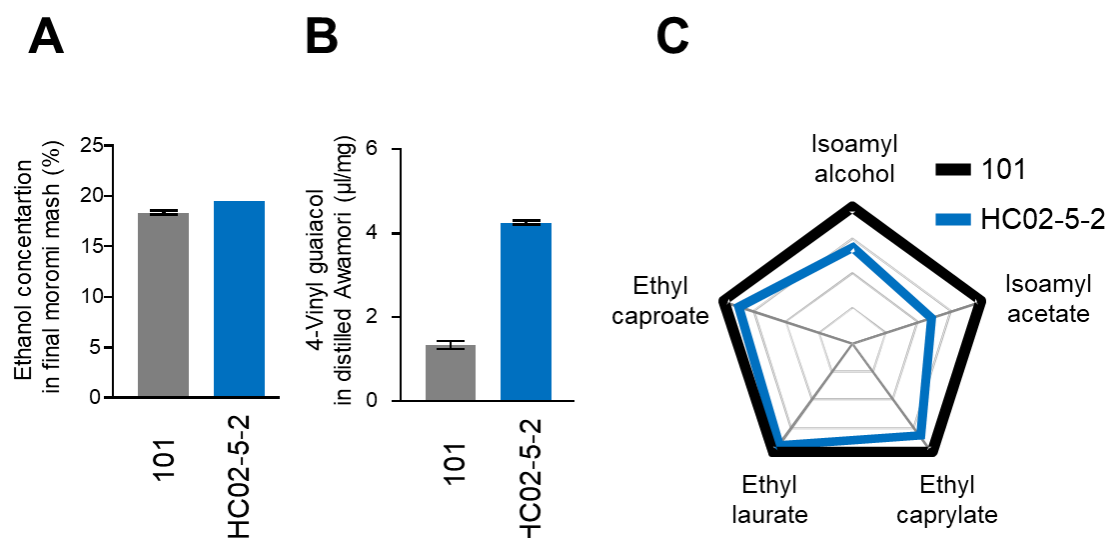


図 18 泡盛酵母 101 株およびハイビスカス酵母 HC02-5-2 株の実験室規模の発酵試験

(A) 最終もろみのエタノール濃度。(B) 泡盛の 4-ビニルグアヤコール濃度。値は 2 回の独立した実験の平均値、最大値および最小値で示した。(C) 泡盛の低沸点香り成分含量比のレーダーチャート。101 株の値を 1 とした含有量の比で示した。

2) ハイビスカス酵母 HC02-5-2 株の詳細な系統解析

次に、HC02-5-2 株の全ゲノム解析を行った。その結果、リファレンスとして用いた *S. cerevisiae* S288c に対して 99.01% のデータがマッピングされ、冗長度は x113 であった。この結果、HC02-5-2 株が *S. cerevisiae* に属することが確認された。次に、HC02-5-2 株と他の酵母株との関係を調べるために、取得データおよび SRA データを用いて一塩基変異体 (SNV) を比較して、全ゲノム情報を使用した系統解析を行った (表 5、6)。その結果、HC02-5-2 株はワインの酵母を含むクレードに属し、101 株は清酒および焼酎醸造用の酵母を含むクレードに属し、HC02-5-2 株および 101 株は、系統樹の異なるクレードに位置することがわかった (図 19)。これらの結果から、HC02-5-2 株は、清酒または焼酎酵母株と祖先を共有していないことを示しており、従来の株とは異なる系統の酵母であり、新たな風味の泡盛酵母として期待できると考えられた。

表 5 本研究で配列取得および分析を行った酵母株

No.	Strain ID	Strain name	Discription
1	MS010	101_18	商用泡盛酵母
2	MS056	RIB_K7	清酒酵母
3	MS080	OUT7009	<i>Saccharomyces awamori</i> Inui、南満州鉄道研究所
4	MS103	EC1118	ワイン酵母
5	MS142	OUT7007	<i>Saccharomyces awamori</i> Inui、南満州鉄道研究所
6	MS143	OUT7008	<i>Saccharomyces awamori</i> Inui、南満州鉄道研究所
7	MS826	NBRC2373	1952年
8	MS852	NBRC0249	1941年、中沢亮治株
9	MS853	NBRC0282	1946年、長西廣輔株、南満州鉄道研究所
10	MS854	NBRC0965	1958年、中沢亮治株
11	MS007	HC02-5-2	ハイビスカス酵母

表 6 本研究で参照した酵母株

No.	Strain ID	Discription	Accession number
1	ZP793	Okayama_JP_plants	ERR754615
2	ZP778	Okayama_JP_plants	ERR754619
3	ZP652	Chiba_JP_plants	ERR747924
4	ZP649	Chiba_JP_plants	ERR915348
5	YPS128	USA_plants	SRR4074383
6	YJM1387	JP_wine	SRR800824
7	Y9	JP_plants	SRR3481380
8	Y55	France_wine	ERR1308763
9	S288c	R64_300mer_fragment	GCF_000146045.2
10	M5	Itaria_bread	ERR1309325
11	M22	Itaria_bread	ERR1308788
12	K12	JP_sake	SRR3481424
13	IR2	Indonesia_food	DRR164885
14	bread004	baker's yeast, Belgium	SRR5678552
15	bread003	Belgium	SRR5678574
16	bread002	Belgium	SRR5678575
17	bread001	Belgium	SRR5678580
18	BG1	Brazil_plants	SRR403237
19	BC187	bread	SRR9617887
20	AWRI796	bread	SRR2967854

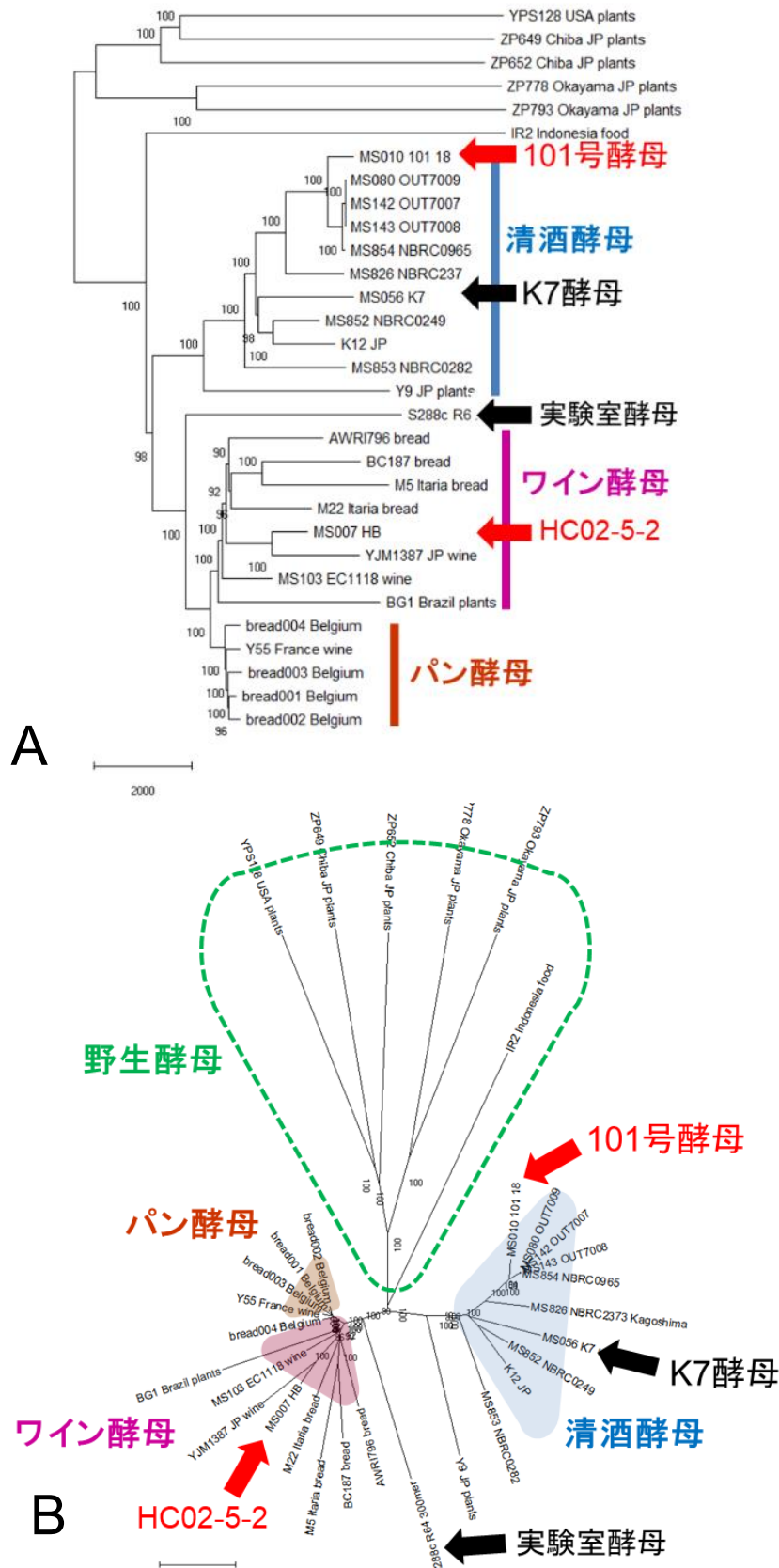


図 19 *S. cerevisiae* におけるハイビスカス酵母 HC02-5-2 株の系統解析 (A) Traditional tree (B) Radiation phylogenetic tree で示した。系統樹は Neighbor-Joining 法、距離は最大複合尤度法を使用した。

3) ハイビスカス酵母 HC02-5-2 株の泡盛醸造特性

ハイビスカス酵母 HC02-5-2 株の泡盛の醸造特性を評価するため、泡盛で好ましい香気成分として知られている吟醸香成分の 1 つである酢酸イソアミル、および古酒香成分バニリンの前駆体である 4-VG を対象として (図 4、5、6)、小仕込み試験で得られた泡盛での含有量について評価した (図 18)。その結果、4-VG は 101 株の約 3 倍含有していることがわかった (図 18B)。

熟成泡盛の代表的なフレーバーとされるバニリンは、熟成後の古酒香として泡盛に甘いバニラの香りを付与する⁴⁶⁾。バニリンは、黒麹菌により遊離したフェルラ酸から 4-VG が生成され、4-VG がもろみから蒸留液に移行すると熟成期間中にバニリンに変換される^{47),48)}。*S. cerevisiae* では、*PAD1* (phenylacrylic acid decarboxylase をコード) および *FDC1* (ferulic acid decarboxylase をコード) 遺伝子がフェルラ酸の脱炭酸を触媒する上で重要な役割を果たしている⁴⁹⁾。しかし、泡盛酵母 101 株は *FDC1* 遺伝子にナンセンス変異があり、4-VG 産生活性が失われている⁵⁰⁾。したがって、新しい泡盛を醸造するために、フェルラ酸デカルボキシラーゼが機能する酵母菌株の単離または構築が期待される。

ハイビスカス酵母 HC02-5-2 株の全ゲノムデータを用いて、*PAD1* および *FDC1* 遺伝子の配列を取得し、実験室酵母 S288c 株、清酒酵母 K7 株、泡盛酵母 101 株と翻訳後のアミノ酸配列を比較した (図 20、21)。その結果、*FDC1* は、泡盛酵母 101 株および清酒酵母 K7 株で 54 番目のアミノ酸がナンセンス変異を起こしていることが確認されたものの、HC02-5-2 株は全てのアミノ酸残基が S288c 株と相同であった (図 20)。また、*PAD1* は、HC02-5-2 株では、His38Tyr、Ala47Val のアミノ酸置換が確認され、これらのアミノ酸置換は K7 株、101 株でも同様に保有しており、ナンセンス変異などは確認されなかった。HC02-5-2 株の小仕込み試験で得られた泡盛に含まれる 4-VG は高い濃度であったことから (図 18B)、*PAD1*^{H38Y/A47V} は、4-VG 生産に大きな影響を及ぼさないと考えられ、結果としてハイビスカス酵母 HC02-5-2 株は 4-VG 生産性が十分に高い酵母であると考えられた。

一方、HC02-5-2 株を用いた泡盛に含まれる酢酸イソアミルは 101 株の約 60%と低かった (図 18C)。酢酸イソアミルは泡盛の香気成分として重要であることから、HC02-5-2 株を親株として酢酸イソアミル生産性の向上を試みた。

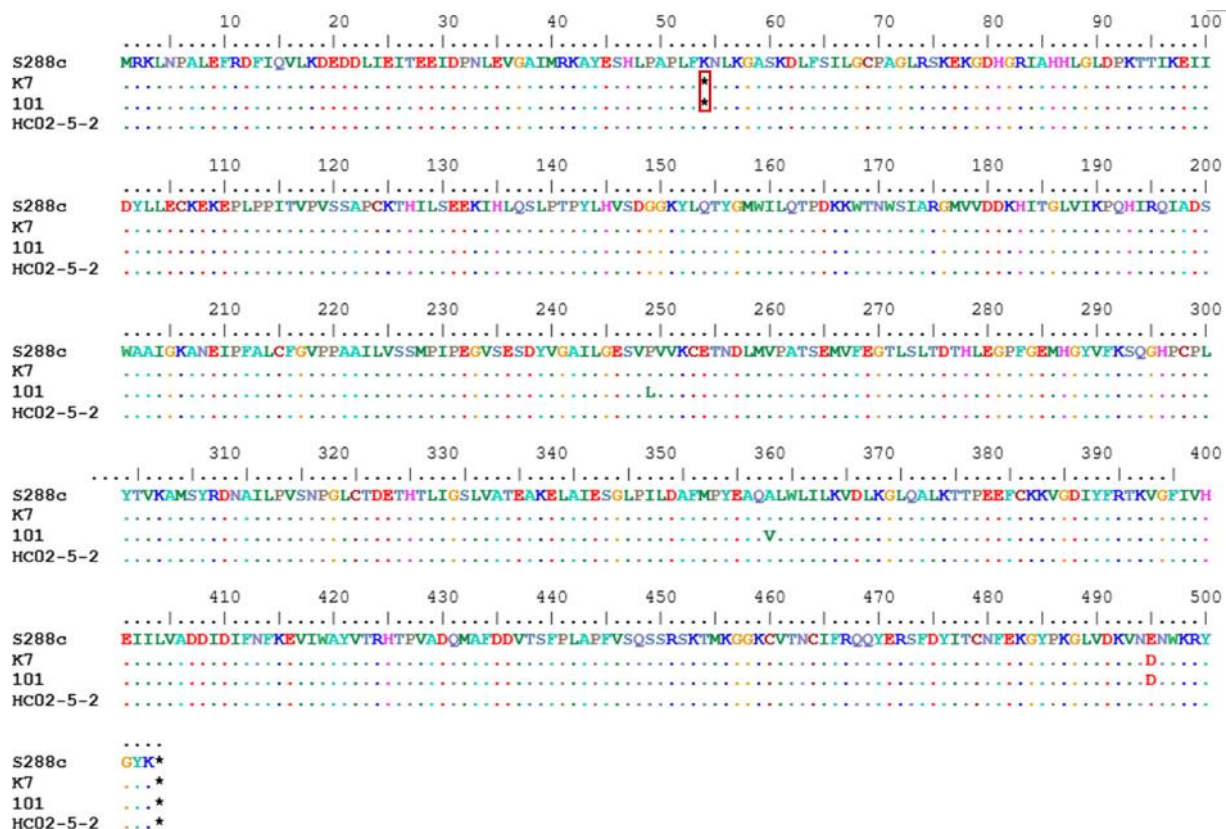


図 20 各酵母における *FDC1* 産物のアミノ酸配列比較

実験室酵母 S288c 株、清酒酵母 K7 株、泡盛酵母 101 株、ハイビスカス酵母 HC02-5-2 株について、全ゲノム情報から *FDC1* の cDNA 配列を取得しアミノ酸配列に翻訳し比較した。清酒酵母 K7 株、泡盛酵母 101 株のナンセンス変異を赤四角で示した。

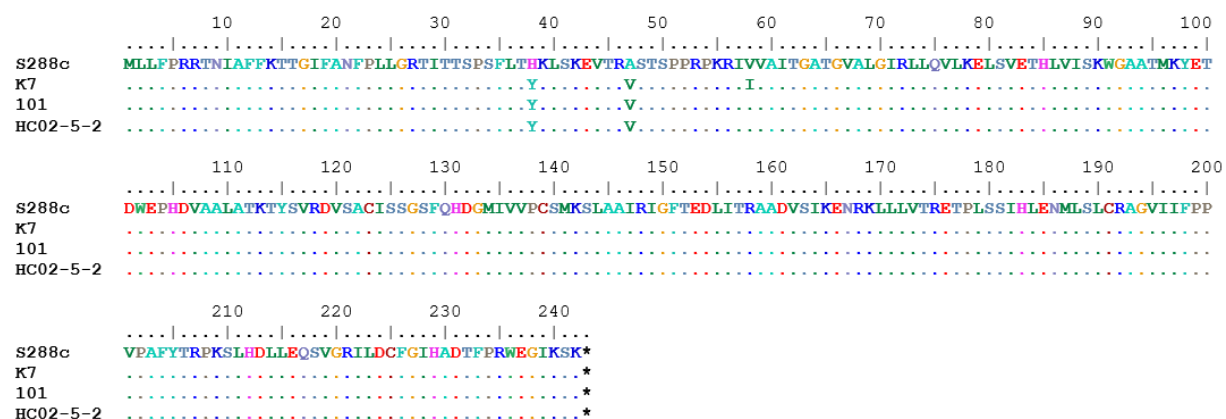


図 21 各酵母における *PAD1* 産物のアミノ酸配列比較

実験室酵母 S288c 株、清酒酵母 K7 株、泡盛酵母 101 株、ハイビスカス酵母 HC02-5-2 株について、全ゲノム情報から *PAD1* の cDNA 配列を取得しアミノ酸配列に翻訳し比較した。

2-2 ハイビスカス酵母 HC02-5-2 株を親株とした新たな酵母の育種

2-2-1 背景

ハイビスカス酵母 HC02-5-2 株を用いた泡盛に含まれる酢酸イソアミルは 101 株の約 60%と低かったことから (図 18C)。HC02-5-2 株の酢酸イソアミル生産性を向上させる育種を試みた。

イソアミルアルコールは、ピルビン酸から α -ケトイソ吉草酸、 α -ケトイソカプロン酸などを経て、イソアミルアルコールからアルコールアセチルトランスフェラーゼ (AAT) によって酢酸イソアミルに変換され (図 5)、ロイシンの毒性アナログである TFL に対する耐性を指標とすることで酢酸イソアミル高生産株の取得が期待できる (図 11)。HC02-5-2 株は、泡盛酵母 101 株や清酒酵母と異なる系統であるものの、*S. cerevisiae* であったことから、これらの代謝経路は維持されていると考えられ、同様の育種により酢酸イソアミル高生産株の取得が期待できる。そこで、ハイビスカス酵母 HC02-5-2 株を親株として、TFL 耐性を指標とした酢酸イソアミル高生産株の取得を試みた。

2-2-2 材料と方法

1) 培地

酵母は、栄養豊富な YPD 培地 (2%グルコース、1%酵母エキス、2%ペプトン) で培養した。酵母の細胞内アミノ酸含有量の分析には、合成培地 SD+Am (2% グルコース、0.5% 硫酸アンモニウム、0.67% yeast nitrogen base without ammonium sulfate and amino acids (Difco Laboratories)) を使用した。TFL 耐性の HC02-5-2 変異株の選択には、唯一の窒素源として 0.5% アラントインを含む SD 培地 (SD+Alt) を使用した。

2) HC02-5-2 株を親株とした TFL 耐性変異株の分離

変異を誘発するために、HC02-5-2 株を 6%メタンスルホン酸エチル (EMS) で処理した³³⁾。突然変異を誘発した細胞を、40 $\mu\text{g/ml}$ の TFL を含む SD+Alt 寒天培地に播種し、30°C で 3 日間培養した。得られたコロニーを SD 液体培地で培養した後、ロイシン高含有変異株を選択するためにアミノ酸分析装置に供した。

3) 遺伝子クローニングとプラスミド構築

G418 耐性遺伝子 (KanMX4) を含むセントロメアベースの低コピー数プラスミド pYC130 (国立醸造研究所から提供)³⁰⁾および 2 μ ベースの高コピー数プラスミド pAD4 (*ADH1* プロモーターおよびターミネーターを含む)(J. Nikawa、九州工業大学より提供)³¹⁾を使用して、それぞれ *LEU4* 遺伝子をサブクローニングおよび発現させた。大腸菌株 DH5 α (F λ - Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA argF*) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(*r_k⁻m_k⁺*) *supE44 thi-1 gyrA96*) を使用してプラスミドを構築した。

HC02-5-2 株のゲノム DNA から、*LEU4* のコード領域の 5' および 3' 末端に *Hind*III および *Sac*I 認識部位を付加して、KOD FX Neo ポリメラーゼ (東洋紡) を使用して *LEU4* 遺伝子全長を増幅した。PCR 産物を *Hind*III - pAD4 の *Sac*I サイト (pAD4-*LEU4*) にクローニングした後、pAD4-*LEU4* から PADH1-*LEU4*-TADH1 融合物を増幅し、それぞれ 5' および 3' 末端に *Kpn*I および *Mlu*I 認識部位を追加した。PADH1-*LEU4*-TADH1 融合の領域の増幅産物を pYC130 にサブクローニングして、酵母細胞で発現プラスミド(pYC130-*LEU4*)を構築した。

LEU4 変異体 [pYC130-*LEU4*(G516S) 、 pYC130-*LEU4*(S452F/A551V)、および pYC130-*LEU4*(G516S/S542F/A551V)] を発現するためのプラスミドは、Quick-Change II Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) を使用して調製した。プラスミドを構築するための部位特異的変異誘発は、次のプライマーを用いた: *LEU4* (G516S) q-change Fw (5'-GAA GGT ACA GGT AAT AGT CCA ATC TCT-3') '-AGA AGA GAT TGG ACT ATT ACC TGT ACC TTC-3')、*LEU4* (S542F/A551V) q-change Fw (5'-TCT CGT AGC AAA CTA CAC AGA GCA TTT TCT AGG TTC TGG TTC TTC TAC GCA AGT TGC TTC TTA CAT CCA TC-3')、*LEU4* (S542F/A551V) q-change Rv (5'-GAT GGA TGT AAG AAG CAA CTT GCG TAG AAG AAC CAG AAC CTA GAA AAT GCT CTG TGT AGT TTG CTA CG-3')。酢酸リチウム法³³⁾を用いて発現プラスミドを HC02-5-2 株に形質転換し、200 μ g/ml の G418 を含む YPD 寒天培地上で形質転換体を選択した。本研究で新たに構築した PCR 増幅産物とプラスミドの DNA 配列は、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いてサンガー法に基づく配列解析により確認した。

4) Leu4 活性の評価

酵母を YPD 液体培地で 30°C で 2 日間培養した。培養液を遠心分離して酵母細胞を回収し、ペレットを 1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) を含む 250 mM Tris-HCl (pH 8.5) に懸濁した。細胞懸濁液を Multi-Beads Shocker (安井器械) で 4°C 処理し、ガラスビーズで破碎して全細胞抽出液を調製し、その上清を粗酵素液とした。Leu4 活性の測定は、酵素活性の 1 単位は、37°C で 60 分間、2-ケトイソ吉草酸から 2-イソプロピルリンゴ酸への酵素的トランスアシル化反応によって生成されるアセチル CoA から遊離した補酵素 A (CoA) の量として定義した²⁶⁾。タンパク質濃度は、Bradford 法による Bio-Rad Protein Assay Dye reagent concentrate を使用して測定した。各サンプルのタンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンの標準曲線に基づいて、595 nm での吸光度の指標から推定した。

5) 細胞内アミノ酸含量の定量

酵母を、200 µg/ml の (必要に応じて G418 を含む) 5 ml の SD+Am 培地で、30°C で 2 日間培養した (OD₆₀₀=10.0)。回収した細胞を 500 µl の蒸留水に懸濁し、100°C で 20 分間煮沸して細胞間アミノ酸を抽出した。13,000×g で 5 分間遠心分離した後、上清を 0.2 µm シリンジフィルター (mdiTM) でろ過した。ろ過試料は、アミノ酸分析装置 (AminoTacTM JLC-500/V、JEOL) または LC/MS アミノ酸システム (UF-Amino Station、Shimadzu) により、アミノ酸含有量を定量した。LC/MS によってアミノ酸含有量を分析するための実験手順は、以前に報告されたとおりに実施した⁵²⁾。各アミノ酸の含有量は、乾燥細胞重量の百分率として表した。

6) Leu4 の立体構造予測

Leu4 における各アミノ酸置換の影響を解析するために、SWISS-MODEL ([//swissmodel.expasy.org/](http://swissmodel.expasy.org/)) を使用したホモロジーモデリングにより、野生型および変異型 Leu4 構造を構築した。モデリングは、結核菌由来の L-ロイシンが結合した LeuA の構造を鋳型に用いた (PDB ID コード:3FIG)。HC02-5-2 株 Leu4 と結核菌 LeuA とのアミノ酸配列の相同性は、45.37% であった。

2-2-3 結果と考察

1) L-ロイシンを蓄積するハイビスカス酵母変異株の分離

第 1 章で泡盛酵母 101 株から L-ロイシンを蓄積する TFL 耐性変異株 18-T55 株を分離し、酢酸イソアミルを高含有する泡盛醸造に応用したことを報告した²⁶⁾。そこで、ハイビスカス酵母 HC02-5-2 株についても、泡盛醸造に適した特性を付与するため、酢酸イソアミルの高生産株の取得を目指し、細胞内に L-ロイシンを蓄積する TFL 耐性変異株の分離を試みた。HC02-5-2 株を 6% EMS の存在下で 1 時間インキュベートし、未処理細胞の 30% の生存率を示した EMS 処理細胞を、40 $\mu\text{g/ml}$ の TFL を含む SD 寒天培地に播種した。その結果、多くの TFL 耐性コロニーが得られたが、そのうち 1 つの変異株 (T25 株) の細胞内 L-ロイシン含量が特に多かった。

次に、親株 HC02-5-2 株と変異株 T25 の細胞内 L-ロイシン量を評価した。その結果、T25 株の細胞内 L-ロイシン濃度 (乾燥細胞重量の $0.225 \pm 0.033\%$) は、親株 HC02-5-2 株 (乾燥細胞重量の $0.066 \pm 0.006\%$) よりも有意に高かった (図 22)。興味深いことに、T25 株で L-バリンと L-イソロイシンの両方の濃度が低下しており (図 22)、T25 株に導入された複数の変異が分岐鎖アミノ酸の生合成経路に影響を与えることが示唆された。

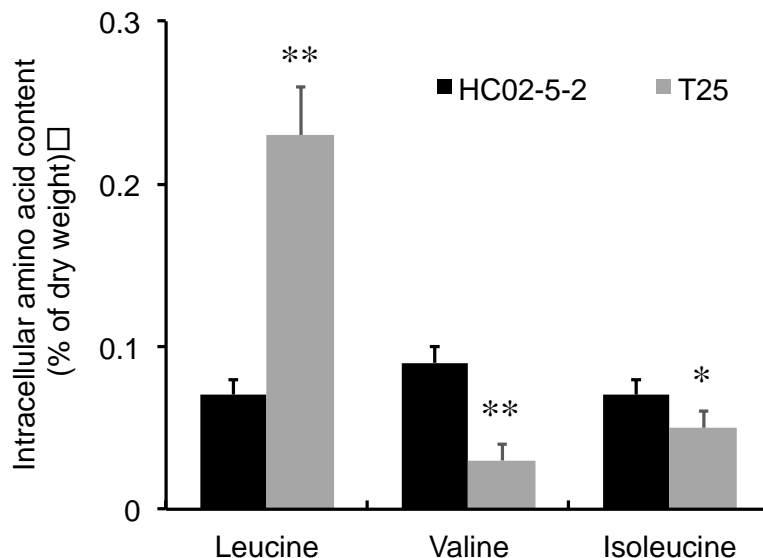


図 22 ハイビスカス酵母 HC02-5-2 株と T25 株の細胞内アミノ酸含量
酵母細胞を 5 ml の SD+Am 培地で 30°C、2 日間培養した ($\text{OD}_{600} = 10.0$)。値は 3 回の独立した実験の平均と標準偏差で示す。スチューデント t 検定による有意差を示した (* $p < 0.01$ および ** $p < 0.05$)。

2) T25 株の Leu4 活性と LEU4 遺伝子配列

以前の報告では、Leu4 活性の L-ロイシンによるフィードバック阻害に対する感受性の低下が、L-ロイシンの過剰合成を引き起こすことが示された^{39),26)}。T25 株における L-ロイシン蓄積の分子メカニズムを解明するために、T25 株および HC02-5-2 株における Leu4 活性を評価した。10 mM L-ロイシンの存在下または非存在下での Leu4 活性は、それぞれの株からの粗細胞抽出物を使用して測定した。その結果、HC02-5-2 株の Leu4 活性は 10 mM L-ロイシンによって著しく阻害され、この株の Leu4 活性が L-ロイシンフィードバック阻害によって調節されていることが示された。一方、T25 株からの Leu4 活性は、10 mM L-ロイシンの存在下でも約 80%維持されており、T25 株の Leu4 は、親株よりも L-ロイシンによるフィードバック阻害に対する感受性が低いことが示された (図 23A)。

次に、HC02-5-2 株と T25 株の LEU4 遺伝子の DNA 配列を解析した。PCR による遺伝子増幅および塩基配列の解析により、T25 株が 1,546 番目

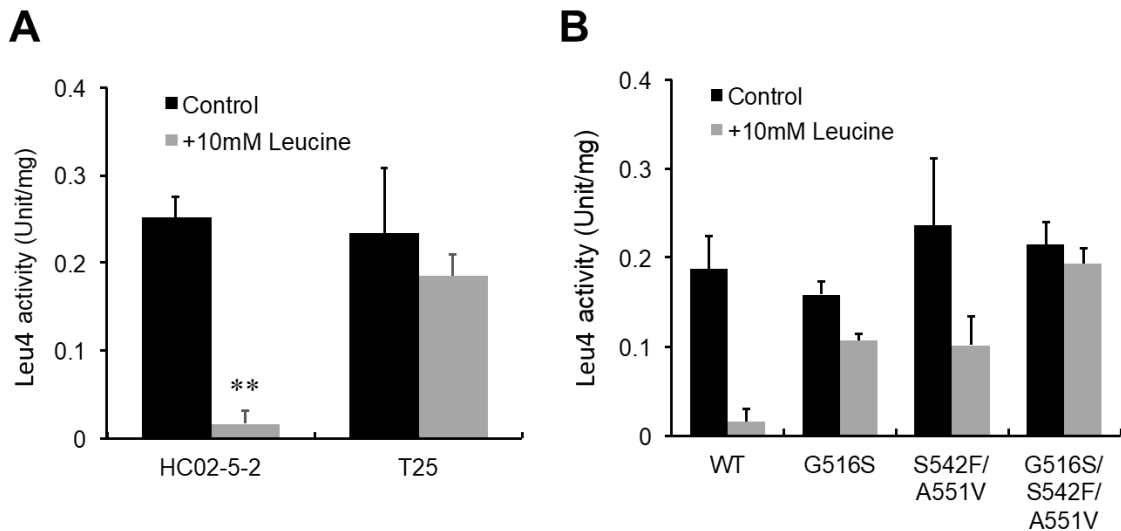


図 23 各株の L-ロイシン存在下、非存在下での Leu4 活性の比較

(A) HC02-5-2 株、T25 株、(B) LEU4 (WT)、および LEU4^{G516S}(G516S)、LEU4^{S542F/A551V}(S542F/A551V)

、LEU4^{G516S/S542F/A551V}(G516S/S542F/A551V)を発現する HC02-5-2 株。酵母細胞抽出物を酵素溶液として使用した。Leu4 活性の 1 単位は、37°C で 60 分間の酵素反応によってアセチル CoA から生成された CoA の量として定義した。黒と灰色のバーは、それぞれ 10 mM L-ロイシンの存在下、非存在下での Leu4 活性を示す。値は 3 回の独立した実験の平均と標準偏差で示す。スチューデント *t* 検定による有意差を示す (**p*<0.01)。

の塩基に A/G の混合塩基であったのに対し、HC02-5-2 株は G であった。この塩基の G から A への変異は、Leu4 の 516 番目のアミノ酸が Gly から Ser へのアミノ酸置換 (Gly516Ser) を伴うことから、T25 株は Gly516Ser を伴う Leu4 変異をヘテロに有する株であることがわかった。

3) *LEU4* 変異が Leu4 活性と L-ロイシン生合成におよぼす影響

T25 株で同定された *LEU4* 変異を解析するために、各 *LEU4* 遺伝子の発現プラスミドを HC02-5-2 株に導入した。また、*LEU4*、*LEU4*^{G516S}、*LEU4*^{S542F/A551V}、および *LEU4*^{G516S/S542F/A551V} 遺伝子を過剰発現する形質転換体における Leu4 活性を評価した。野生型 *LEU4* 遺伝子を過剰発現させると、Leu4 活性は 10 mM L-ロイシンの存在下で著しく阻害された。前章で述べたように²⁶⁾、*LEU4*^{S542F/A551V} 遺伝子を過剰発現する細胞における Leu4 活性は、野生型 *LEU4* 遺伝子よりも L-ロイシンに対する感受性が低かった。また、*LEU4*^{G516S} および *LEU4*^{G516S/S542F/A551V} 遺伝子の過剰発現により、L-ロイシンの存在下で Leu4 活性が増加することが確認された (図 23B)。

LEU4^{G516S} 遺伝子が HC02-5-2 株に TFL 耐性と L-ロイシン蓄積を付与するのに十分かどうかを確認するため、TFL を含む SD 寒天培地での形質転換体の増殖を調べるとともに、細胞内 L-ロイシン含量を測定した。野生型 *LEU4* 遺伝子を過剰発現する酵母細胞は、TFL の存在下では増殖できなかった (図 24A)。一方、*LEU4*^{G516S}、*LEU4*^{S542F/A551V}、および *LEU4*^{G516S/S542F/A551V} 遺伝子の過剰発現は、TFL に対する耐性をもたらした。これらの形質転換体では、細胞内の L-ロイシン濃度は、野生型株 HC02-5-2 株 よりも高かった (図 24B)。これらの結果は、Gly516Ser 置換が Leu4 活性の L-ロイシンに対する感受性を低下させることで、細胞内 L-ロイシンが蓄積することを示している。

4) 変異型 Leu4 における L-ロイシン結合部位の構造予測

T25 株における L-ロイシンの蓄積は、Leu4 の Gly516Ser 置換によって引き起こされることが確認された (図 22、24B)。Leu4 は、*S. cerevisiae* における L-ロイシンによるフィードバック阻害を介して L-ロイシンの生合成を調節する重要な酵素である (図 5)。Gly516Ser 変異型 Leu4 における L-ロイシン結合部位の構造予測を行うためホモロジーモデリング解析を行った。その

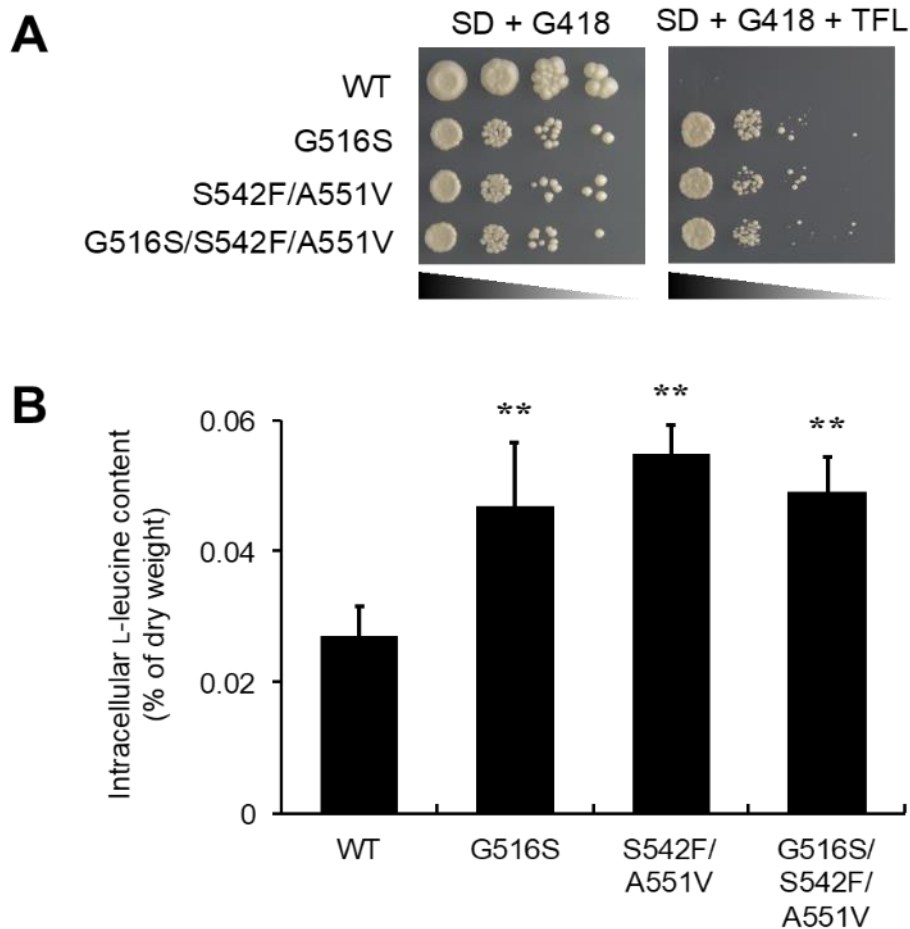


図 24 各酵母における TFL 感受性と L-ロイシン含量

(A) 野生型 *LEU4* (WT)、*LEU4*^{G516S} (G516S)、*LEU4*^{S542F/A551V} (S542F/A551V)、および *LEU4*^{G516S/S542F/A551V} (G516S/S542F/A551V) を発現する HC02-5-2 株の 200 μg/ml G418 を含む SD+Alt 培地での増殖表現型。G418 含有 SD+Am 培地で 30°C、2 日間培養し、約 10⁶ 個の細胞と 10⁻¹ から 10⁻⁴ の段階希釈 (左から右) をスポットし、200 μg/ml G418 と 150 μg/ml TFL を含む SD+Alt 寒天培地に播種し、30°C で 2 日間培養した。

(B) 野生型 *LEU4* (WT)、*LEU4*^{G516S} (G516S)、*LEU4*^{S542F/A551V} (S542F/A551V)、および *LEU4*^{G516S/S542F/A551V} (G516S/S542F/A551V)。酵母を 5 ml の SD+Am 培地で 30°C、2 日間培養した (OD₆₀₀ = 10.0)。値は 3 回の独立した実験の平均と標準偏差で表した。スチューデント *t* 検定による有意差を示す (**p* < 0.01)。

結果、Gly516 はアロステリック調節ドメイン内の L-ロイシン結合部位を含む α14 ヘルックス上に位置することが示唆された⁴²⁾。さらに、変異型 Leu4 の Ser516 は、結合空洞の立体障害により L-ロイシン結合を直接妨害し、L-ロイシンによるフィードバック障害の脱感作を引き起こすと考えられた (図 25)。

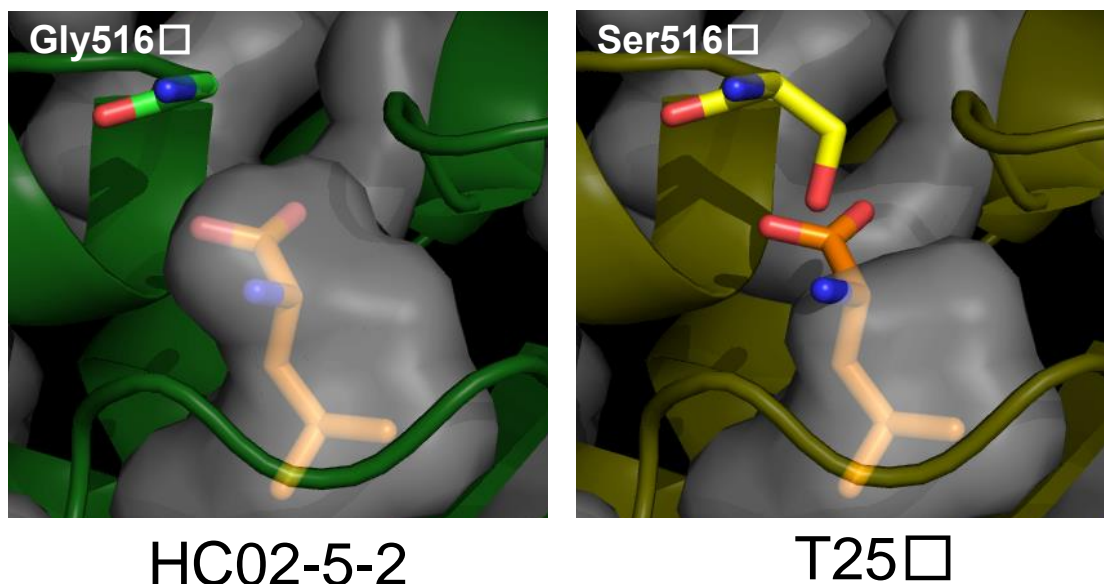


図 25 HC02-5-2 株と T25 株の Leu4 における L-ロイシン結合部位の模式図

L-ロイシンと結合した野生型 (HC02-5-2) および変異型 (T25) Leu4 の立体構造は、結核菌 LeuA (PDB ID コード: 3FIG) の構造を参照した。Leu4 および結合部位に位置する L-ロイシンはスティックモデルで示した。L-ロイシンは、野生型 Leu4 (緑) が形成する空洞 (灰色) にはフィットして配置し、一方、変異型 Leu4 (黄色) では Ser516 が空洞を狭め L-ロイシン結合を妨害すると考えられた。

5) T25 株の泡盛発酵試験とエタノールおよび香気成分の分析

次に、泡盛醸造における T25 株の特性を評価した。まず、エタノール生産性を評価するために、実験室規模の発酵試験を実施した。T25 株で発酵させた最終もろみのエタノール濃度は 18.05% に達し、親株である HC02-5-2 株および 101 株と同等であった (図 26A)。T25 株での 4-VG 濃度は、101 株の約 3 倍で HC02-5-2 株と同等であった (図 26B)。次に、蒸留した泡盛をガスクロマトグラフィーで分析した。その結果、細胞内 L-ロイシン含量に比例して、T25 株は HC02-5-2 株の 2.3 倍のイソアミルアルコールおよび酢酸イソアミルを生成した (図 26C)。一方、酢酸イソアミルやイソアミルアルコールとともに泡盛の低沸点香気成分と呼ばれる香気成分であるカプリル酸エチル、ラウリン酸エチル、カプロン酸エチルの濃度は 3 系統 (HC02-5-2 株、T25 株、101 株) 間でほぼ同じであった (図 26C)。このように、ハイビスカス酵母由来の T25 株は、古酒香成分バニリンの前駆体である 4-VG および吟醸香成分である酢酸イソアミルをともに高生産しうることから、泡盛醸造への応用が期待

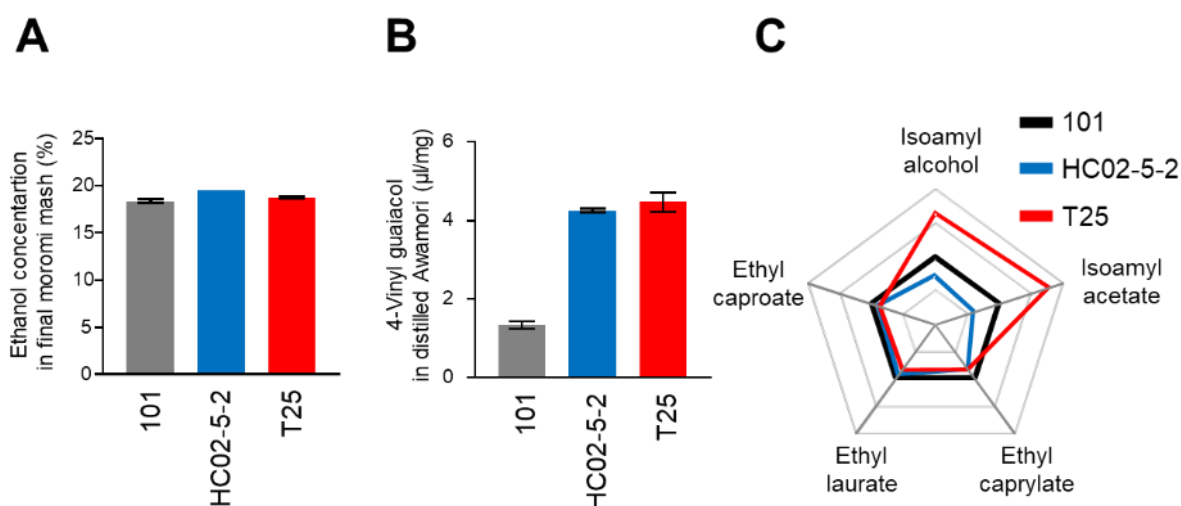


図 26 T25 株の実験室規模の発酵試験

(A) 最終もろみのエタノール濃度。(B) 泡盛の 4-ビニルグアヤコール濃度。値は 2 回の独立した実験の平均値、最大値および最小値を示した。(C) 泡盛の低沸点香り成分含量比のレーダーチャート。101 の値を 1 とした含有量の比で示した

される株であることが確認された。

6) T25 株のパイロットスケール醸造での香り成分の分析

泡盛酵母 101 株は、エタノールの生産性が高く、風味が良好であるためほとんどの泡盛酒造所で商業的に使用されている⁷⁾。泡盛の品質の多様化が求められている中、味や風味の異なる新規酵母の開発は泡盛産業に貢献する可能性が大きい。本研究では、ハイビスカスの花から分離した新規な酵母 HC02-5-2 株が、泡盛醸造に十分な量のエタノールを生産することを見出した。実際、HC02-5-2 株で醸造された泡盛「ハイビスカス泡盛」が市場で既に販売されている。本研究において、HC02-5-2 株を育種することで、HC02-5-2 株よりも多くのイソアミルアルコールと酢酸イソアミルを生成する望ましい T25 株を取得できた。パイロット規模の発酵では、T25 株によって醸造した泡盛は、101 株よりも大量のイソアミルアルコールと酢酸イソアミルを含有していた（図 27）。これらの結果は、HC02-5-2 株および T25 株が泡盛醸造に適していることを示している。

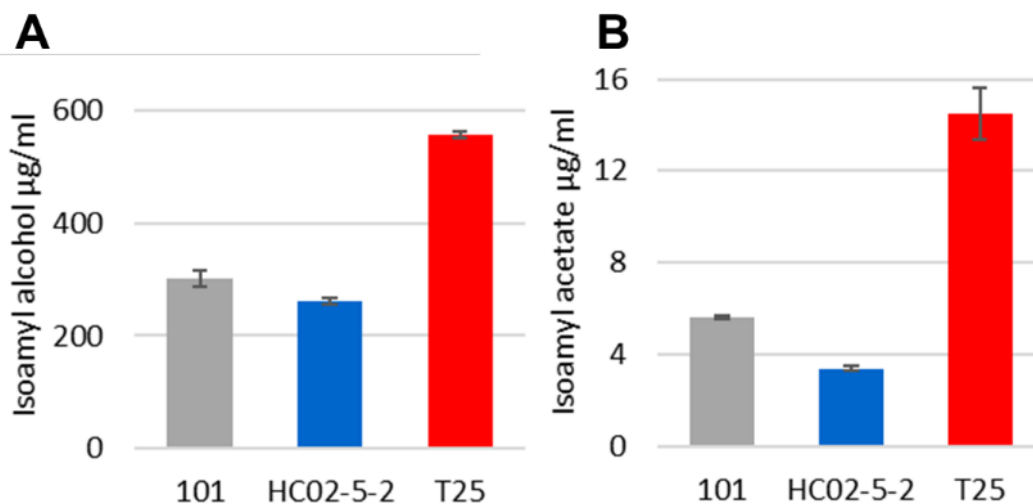


図 27 T25 株を用いてパイロットスケールで醸造した泡盛のイソアミルアルコール (A)、酢酸イソアミル (B) の濃度は独立した 3 回の実験の平均値と標準偏差で示す。

7) T25 株の泡盛酵母としての有用性

ビールなどのアルコール飲料では、4-VG はオフフレーバーとして認識されている。一方、泡盛では、4-VG は泡盛の「熟成」における古酒香成分バニリンの前駆体で、古酒の甘いバニラ香に寄与している¹⁸⁾。熟成は、泡盛にとって重要な付加価値であり、より良い熟成のための貯蔵方法などが検討されている⁵²⁾。4-VG のバニリンへの変換は、泡盛が熟成により風味が向上する現象のうち、最もその過程が明らかになっている機構である⁴⁶⁾。泡盛醸造工程での 4-VG 生産には酵母が影響し、酵母の *PAD1* および *FDC1* が関与しており、これらに変異を有する株では、4-VG 濃度が低下することがわかっている^{49),50)}。101 株は *FDC1* にナンセンス変異を有しており、4-VG 生産性が低い。一方、T25 株は HC02-5-2 株と同様に *PAD1* および *FDC1* が野生型で (図 20、21)、泡盛に含まれる 4-VG 濃度が 101 株と比較して高いことが確認された (図 26)。以上のことから、T25 株は、泡盛の古酒香の 1 つであるバニリン濃度を高める特性を有する酵母であることが確認された。

一方、吟醸香は、清酒とともに泡盛でも好まれる香り成分である。これまでに、商用酵母株に 1 つまたは複数の自然突然変異を導入することで、清酒の果実様の芳香化合物含量が増加したと報告されている^{53),54)}。第 1 章では、泡盛酵母である 101 株を親株として L-ロイシンアナログ耐性変異株がイソアミルアルコールと酢酸イソアミルを過剰生産することを確認した²⁶⁾。HC02-5-2

株は低沸点香り成分、特にイソアミルアルコール、酢酸イソアミルの生産性が低く泡盛酵母として課題があることから（図 18）、HC02-5-2 株を親株とした育種を試みた。その結果、得られた L-ロイシン蓄積変異株 T25 は親株である HC02-5-2 株より多くのイソアミルアルコールと酢酸イソアミルを生産した（図 26、27）。

興味深いことに、T25 株は親株の約 3 倍の L-ロイシンを生成したが、T25 株の L-バリンと L-イソロイシンの細胞内含量は、それぞれ親株で観察された値の約 30%と 70%に減少した（図 22）。以前の研究では、*S. cerevisiae* では細胞内アミノ酸のバランスが厳密に制御されていることが示されている^{55),56)}。また、L-ロイシンと同様に分岐鎖アミノ酸（BCAA）に分類される L-バリンや L-イソロイシンは、最初の 4 段階で同じ酵素（アセト乳酸合成酵素、アセトヒドロキシ酸レダクトイソメラーゼ、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ）経路で生合成される⁵⁷⁾。したがって、今回の結果から酵母細胞内の L-ロイシン含量の増加が他の BCAA 含量の減少に関与している可能性が考えられた。

以上の結果から、ハイビスカスの花から新たに分離された酵母 HC02-5-2 株は、ワイン系の *S. cerevisiae* 株であることがわかった。HC02-5-2 株およびその変異株 T25 株は、フルーティーな風味である酢酸イソアミルと熟成に伴う甘い風味のバニリンの両方を増強した泡盛を醸造しうる好ましい特徴を持っており、新たな泡盛酵母として有用であると考えられた。

本研究で得られた T25 株を用いて実際に商品開発が行われ、(有)神村酒造より「尚 KAMIMURA」が商品化された（2019 年）。

第 3 章 島バナナ酵母の取得および新たな酵母の育種⁵⁸⁾

3-1 沖縄の自然界からの島バナナ酵母の取得と解析背景

3-1-1 背景

ここまでの取り組みにより、101 株を親株とし吟醸香成分である酢酸イソアミルを高生産する 18-T55 株（第 1 章）、ハイビスカス酵母 HC02-5-2 株を親株とし古酒香成分バニリンの前駆体である 4-VG および酢酸イソアミルを高生産する T25 株（第 2 章）を取得することができた。一方、これらの酵母の詳細な系統解析から、18-T55 株は清酒酵母グループ（図 10）、T25 株はワイン酵母グループ（図 19）に属していた。酵母は泡盛の酒質に大きく影響し、酵母の系統が著しく異なれば新たな風味バランスの泡盛醸造が可能になると考えられるため、さらに新たな系統の泡盛酵母の開発は重要である。また、18-T55 株および T25 株はいずれも商用酵母のグループに属していたことから、従来の商用酵母グループに属していない新たな系統の酵母が沖縄の自然界から得ることができれば、風味バランスの差別化とともに、地域独自の酵母としてのアピールが可能で、より付加価値の高い泡盛酵母となることが期待される。

以上のことから、沖縄の自然界に存在し、従来の商用酵母グループに属していない系統であるとともに、泡盛醸造に適した特性の新たな酵母の取得を目指した。

3-1-2 材料と方法

1) 培地

酵母は、栄養豊富な YPD 培地（2%グルコース、1%酵母エキス、2%ペプトン）で培養した。

2) 島バナナからの泡盛酵母の分離

沖縄の島バナナの葉、実、茎を合計 76 検体を採取した。これらの試料を 4% エタノールを含む YPD 培地で 32°C で 3 日から 2 週間培養した。濁度が上昇した培地の懸濁液を YPD 寒天培地に播種し、32°C で培養した。24・48 時間培養後、十分に成長した単一コロニーを採取し、実験室規模の発酵試

験により、エタノール生産性の高い株を選択した。

3) 採取株の種の判別

試料となる酵母を培養し、ゲノム DNA を抽出した。このゲノム DNA をテンプレートとして、プライマー NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG AAAG-3') および NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') を用いて PCR を行うことで、26S rDNA 領域の一部 (560bp) を増幅した。増幅した PCR 産物は塩基配列解析を行い、BLAST 検索などにより種を判断した。

4) 泡盛の発酵試験と蒸留

実験室での小仕込み試験は以下の条件で行った²³⁾。200 ml 三角フラスコに米麴 50 g、水 65 ml、前培養酵母 0.1 ml を混合した。この醪を 25°C で 14 日間培養して最終もろみを調製した。もろみの上澄みをろ過し、可搬式アルコール検出器 (AL-3; 理研計器) を用いてエタノール濃度を分析した。香気成分濃度を分析するために、水蒸留器 (MH943SBS; メガホーム) を使用して常圧蒸留で蒸留し、エタノール濃度が 10% に達した時点で停止した。

5) 高速液体クロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー分析

Shimadzu HPLC システムを使用して 4-VG の定量を行った。蒸留した泡盛液をポアサイズ 0.45 μm のフィルターに通した。濾過したサンプルを C18 カラムにロードし、メタノールを含む酢酸緩衝液で 0.5 ml/分の流速で溶出した。溶出は、溶媒 A (50 mM 酢酸、pH4) で開始し、溶媒 B (100% メタノール) を 90% になるまで徐々に増やした。吸光度 254 nm のクロマトグラムでは、標準液と同じ保持時間に 4-VG のピークが検出された。ピーク面積を計算し、標準溶液と比較して濃度を評価した。

揮発成分の分析は、Heracles II システム (アルファ・モス) を用い、カラムは MTX-5 および MTX-WAX を使用した。アルコール濃度を 30% に合わせた試料を 10 ml 分注し、60°C で 10 分間加熱した後、固相マイクロ抽出ファイバー (65 μm PDMS/DVB StableFlex/ss) を用いて 60°C で 30 分間吸着した。試料は、50 $\mu\text{l/s}$ で 1 μl 注入し、初期温度 40°C、昇温速度 1.50°C/s、最終温度 250°C で分析した。定量は標準試料との面積比で計算した。

6) 全ゲノム情報の取得と系統解析

酵母を培養し、集菌した菌体からゲノム DNA を抽出した。得られたゲノム DNA は Qubit (Thermo) で定量した。Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina) を用いてプロトコルに従い、各ゲノムの NGS

ライブラリを構築した。得られたゲノムライブラリーは、MiSeq Reagent Kit v2 または v3 (Illumina) を用いて MiSeq (Illumina) でシーケンスした。得られたデータおよび Sequence Read Archive (SRA) からのシーケンスデータを用いて、CLC Genomics Workbench v22.0.2 (QIAGEN) にて解析を行った。解析は、リードをトリミング後、*S. cerevisiae* S288c (GCA_000146045) のリファレンスへのマッピング、バリエントコールを行った。coverage table file と variants table file をエクスポートした。これらは、カスタムスクリプト (https://github.com/BiojetCoLtd/GW_to_phylogeny) を使用して合成配列の fasta ファイルに変換した。このスクリプトは、カバレッジとバリエントのデータからホモ接合 SNP のみの塩基配列を生成することができる。fasta ファイルは、MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis ソフトウェア⁴⁵⁾を使用した近隣結合法により系統解析を行った。

3-1-3 結果と考察

1) 沖縄の自然界からの島バナナ酵母の取得

沖縄の島バナナから泡盛醸造に適用可能な新たな酵母株の取得を試みた。島バナナの葉、実、茎から合計 76 検体を採取し、4% エタノールを含む YPD 培地で 32°C で培養したところ、3 日から 2 週間の培養期間で全ての試料において高い濁度が得られた。これらの懸濁液を YPD 寒天培地に播種し、十分に成長した単一コロニーを採取した。それぞれのコロニーについて、実験室規模の発酵試験によるエタノール生産性の評価とともに、26S rDNA の解析によりそれぞれの種を同定することで選抜した。その結果、島バナナ茎の検体よりエタノール生産性が高い *S. cerevisiae* 35a14 株を分離した。

次に、島バナナ酵母 35a14 株が泡盛醸造に用いることができるかどうか確認するため、実験室規模の小仕込み試験を行った。その結果、35a14 株で発酵させもろみのエタノール濃度は 18.9% で、従来の泡盛酵母 101 株は 19.4% であった (図 28A)。これらの結果から、35a14 株は泡盛もろみ中で十分なエタノール生産性があると判断した。

2) 島バナナ酵母 35a14 株の詳細な系統解析

島バナナ酵母 35a14 株の詳細な系統を評価するため、全ゲノム情報の取得を試みた。その結果、得られたリードの 98.6% が リファレンスとして用いた *S.*

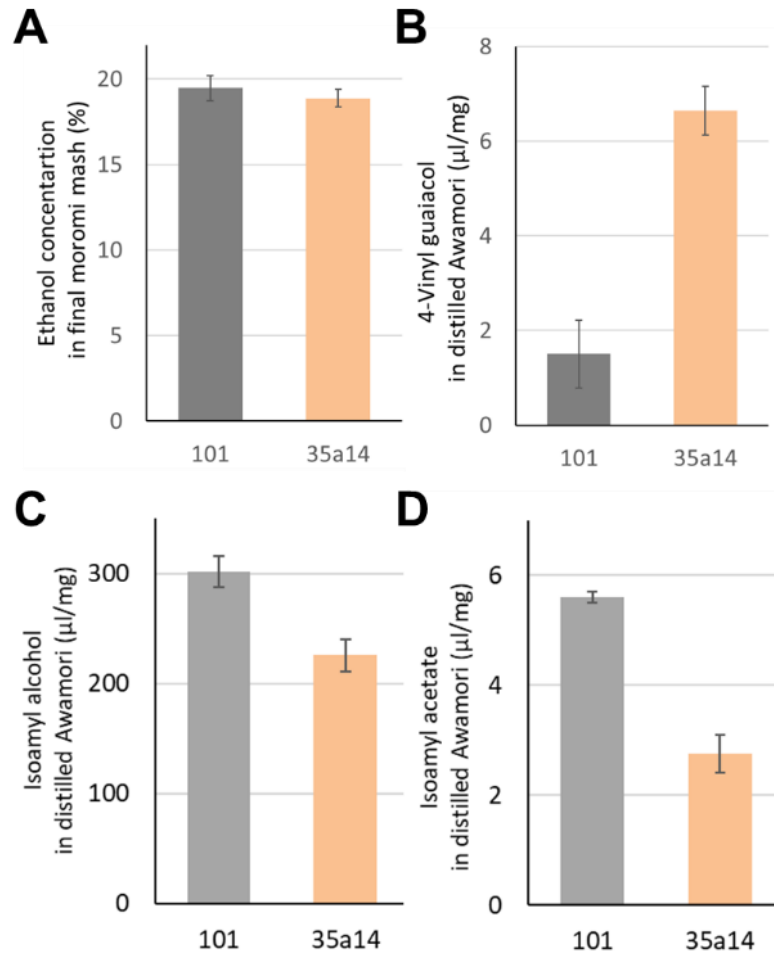


図 28 泡盛酵母 101 株、島バナナ酵母 35a14 株の実験室規模の発酵試験 (A) 最終もろみのエタノール濃度。(B) 泡盛の 4-ビニルグアヤコール濃度。(C) 泡盛のイソアミルアルコール濃度。(D) 泡盛の酢酸イソアミル濃度。値は 3 回の独立した実験の平均と標準偏差で示す。

cerevisiae S288c ゲノムにマッピングされ、35a14 株が *S. cerevisiae* に属することが再確認できた。

次に、35a14 株と他の *S. cerevisiae* との関係を知るために、全ゲノム情報をもとにした一塩基置換 (SNV) の比較による系統解析を行った¹⁹⁾。比較対象には、清酒、パン、またはワインおよび商用株のグループに属していない酵母の全ゲノムデータを用いた (表 7、8)。その結果、それぞれの商用株は既報と同様のグループを形成し^{19), 25), 59)}、35a14 株は、ワイン酵母、パン酵母、清酒酵母の典型的な商用酵母グループに属していないことが明らかとなった (図 29)。35a14 株の近傍にはマレーシア、米国、日本で分離された野生酵母が位置していたものの、35a14 株と野生酵母の間の進化的距離は、商用酵母の間の距離よりも大きく離れていた (図 29)。

これらの結果から、35a14 株は沖縄の固有株であり、他の産業用酵母や解析に用いた既存の分離株とは独立して進化したと考えられた。

表 7 本研究で配列取得および分析した酵母株

No.	Strain ID	Strain name	Discription
1	MS010	101_18	商用泡盛酵母
2	MS056	RIB_K7	清酒酵母
3	MS080	OUT7009	<i>Saccharomyces awamori</i> Inui、南満州鉄道研究所
4	MS103	EC1118	ワイン酵母
5	MS142	OUT7007	<i>Saccharomyces awamori</i> Inui、南満州鉄道研究所
6	MS143	OUT7008	<i>Saccharomyces awamori</i> Inui、南満州鉄道研究所
7	MS826	NBRC2373	1952年
8	MS852	NBRC0249	1941年、中沢亮治株
9	MS853	NBRC0282	1946年、長西廣輔株、南満州鉄道研究所
10	MS854	NBRC0965	1958年、中沢亮治株
11	MS007	HC02-5-2	ハイビスカス酵母
12	MS633	35a14	島バナナ酵母

表 8 本研究で参照した酵母株

No.	Strain ID	Discription	Accession number
1	ZP793	Okayama_JP_plants	ERR754615
2	ZP778	Okayama_JP_plants	ERR754619
3	ZP652	Chiba_JP_plants	ERR747924
4	ZP649	Chiba_JP_plants	ERR915348
5	YPS128	USA_plants	SRR4074383
6	YJM1387	JP_wine	SRR800824
7	Y9	JP_plants	SRR3481380
8	Y55	France_wine	ERR1308763
9	S288c	R64_300mer_fragment	GCF_000146045.2
10	M5	Itaria_bread	ERR1309325
11	M22	Itaria_bread	ERR1308788
12	K12	JP_sake	SRR3481424
13	IR2	Indonesia_food	DRR164885
14	bread004	baker's yeast, Belgium	SRR5678552
15	bread003	Belgium	SRR5678574
16	bread002	Belgium	SRR5678575
17	bread001	Belgium	SRR5678580
18	BG1	Brazil_plants	SRR403237
19	BC187	bread	SRR9617887
20	AWRI796	bread	SRR2967854

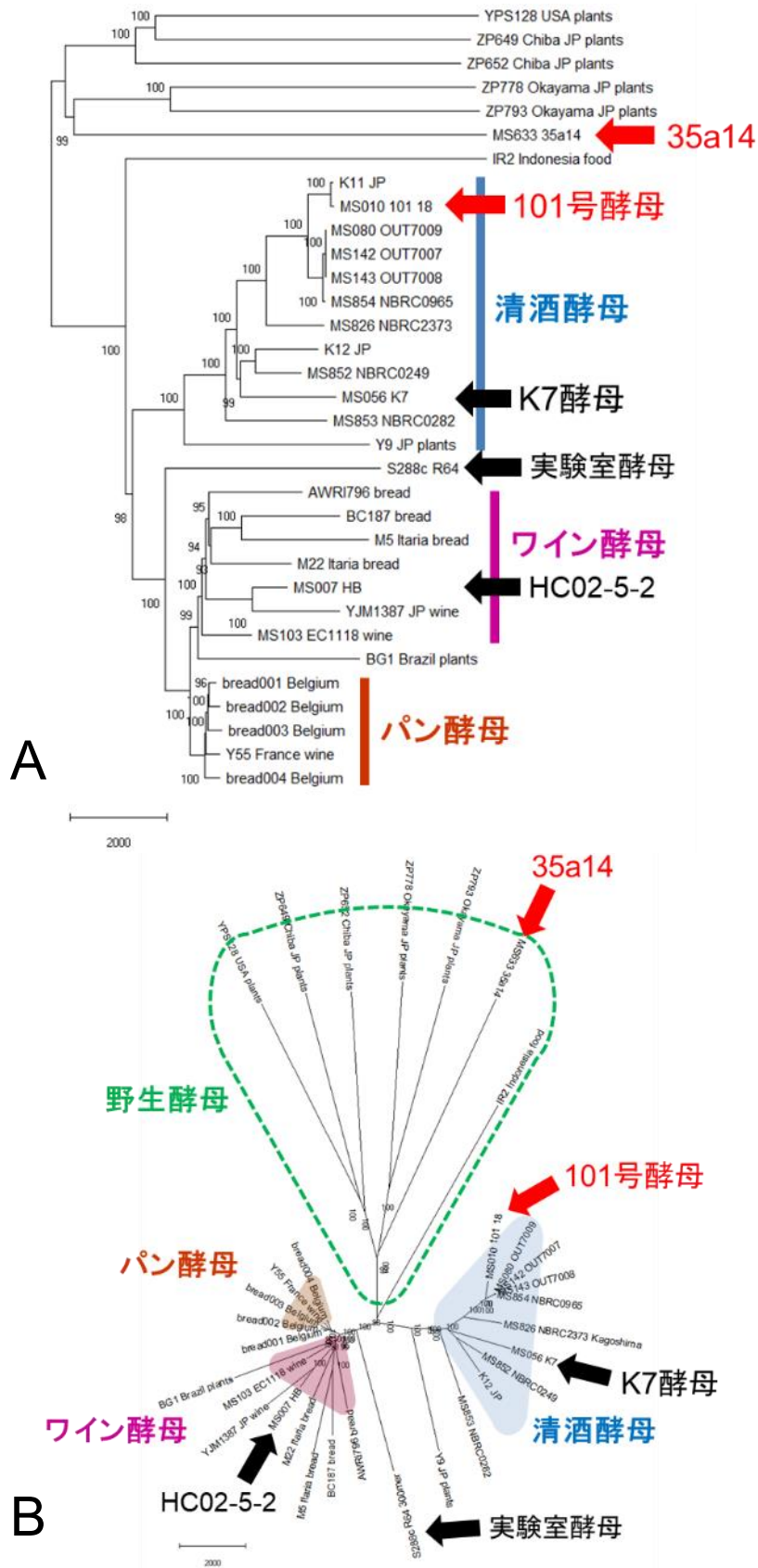


図 29 *S. cerevisiae* での島バナナ酵母 35a14 株の系統解析
 (A) Traditional tree、(B) Radiation phylogenetic tree で示す。系統樹は Neighbor-Joining 法、距離は最大複合尤度法を使用した。

3) 島バナナ酵母 35a14 株の泡盛醸造特性

島バナナ酵母 35a14 株の泡盛の醸造特性を評価するため、泡盛で好ましい香気成分として知られている吟醸香成分の 1 つである酢酸イソアミル、および古酒香成分バニリンの前駆体である 4-VG を対象として (図 4、5、6)、小仕込み試験で得られた泡盛での含量を評価した (図 28)。その結果、4-VG は 101 株の約 3 倍含有していることがわかった (図 28B)。

S. cerevisiae では、*PAD1* (phenylacrylic acid decarboxylase をコード) および *FDC1* (ferulic acid decarboxylase をコード) 遺伝子がフェルラ酸の脱炭酸を触媒する上で重要な役割を果たしている⁴⁹⁾。泡盛酵母 101 株は *FDC1* 遺伝子にナンセンス変異があり、4-VG 産生活性が失われている⁵⁰⁾。

島バナナ酵母 35a14 株の全ゲノムデータを用いて、*PAD1* および *FDC1* の配列を解析したところ、いずれの遺伝子も構造やアミノ酸配列の変異は確認されず野生型の *PAD1* および *FDC1* が生産されると考えられた (データ示さず)。

島バナナ酵母 35a14 株の全ゲノムデータを用いて、*PAD1* および *FDC1* 遺伝子の配列を取得し、実験室酵母 S288c 株、清酒酵母 K7 株、泡盛酵母 101 株、ハイビスカス酵母 HC02-5-2 株と翻訳後のアミノ酸配列を比較した (図 30、31)。その結果、*FDC1* は、泡盛酵母 101 株および清酒酵母 K7 株で 54 番目のアミノ酸残基がナンセンス変異を起こしていることが確認されたものの、35a14 株は HC02-5-2 株と同様に全てのアミノ酸残基が S288c 株と相同であった (図 30)。また、*PAD1* は、35a14 株では、HC02-5-2 株と同様に His38Tyr、Ala47Val のアミノ酸置換が確認され、これらのアミノ酸置換は K7 株、101 株でも同様に保有しており、ナンセンス変異などは確認されなかった。35a14 株の小仕込み試験で得られた泡盛に含まれる 4-VG は高濃度であったことから (図 28B)、*PAD1*^{His38Tyr/Ala47Val} は、4-VG 生産に大きな影響を及ぼさないと考えられ、結果として島バナナ酵母 35a14 株は 4-VG 生産性が十分に高い酵母であると考えられた。

一方、島バナナ酵母 35a14 株を用いた泡盛に含まれるイソアミルアルコールおよび酢酸イソアミルの含量はそれぞれ 101 株の約 75%、約 50%と低かった (図 28C、D)。酢酸イソアミルは泡盛の香気成分として重要であることから、島バナナ酵母 35a14 株を親株として酢酸イソアミル生産性の向上を試みた。

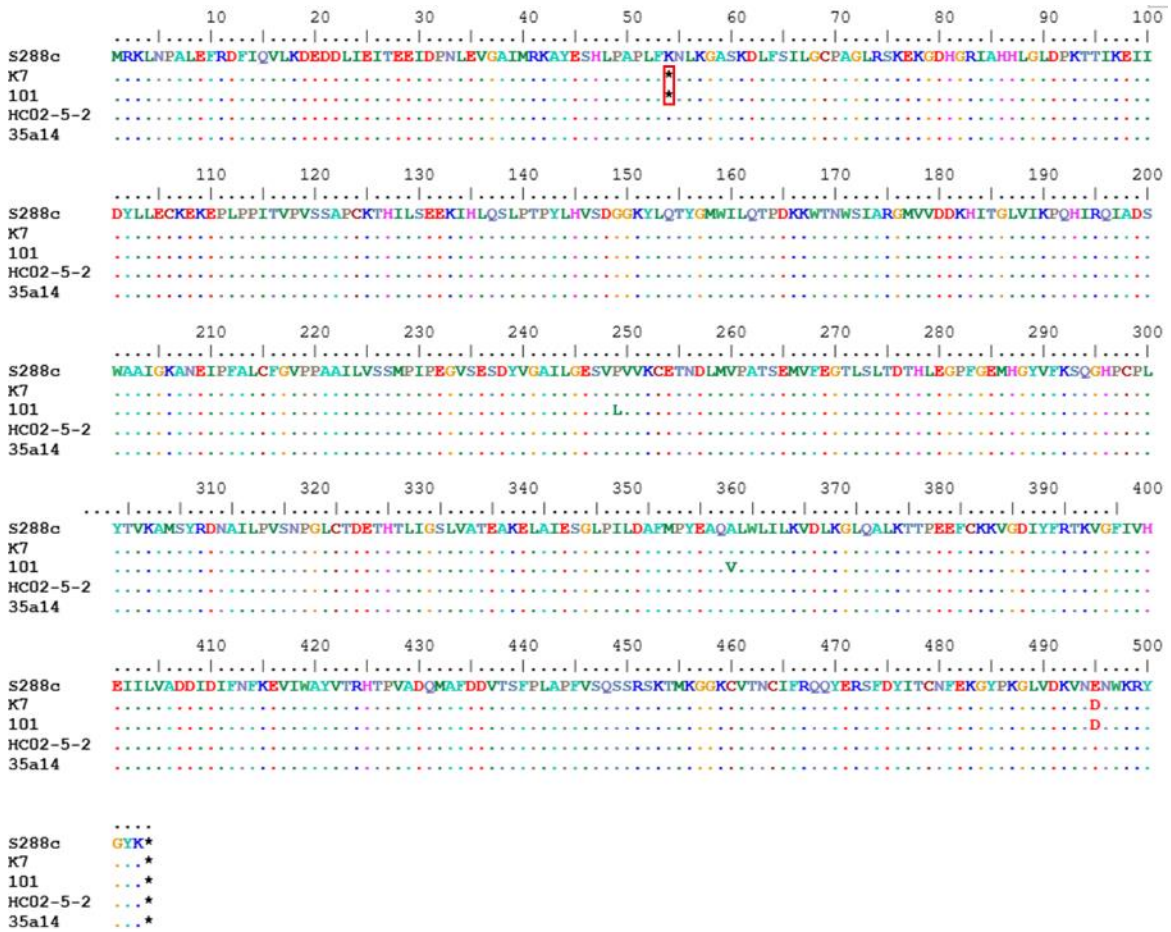


図 30 各酵母における *FDC1* 産物のアミノ酸配列比較

実験室酵母 S288c 株、清酒酵母 K7 株、泡盛酵母 101 株、ハイビスカス酵母 HC02-5-2 株、島バナナ酵母 35a14 株について、全ゲノム情報から *FDC1* の cDNA 配列を取得しアミノ酸配列に翻訳し比較した。清酒酵母 K7 株、泡盛酵母 101 株のナンセンス変異を赤四角で示す。

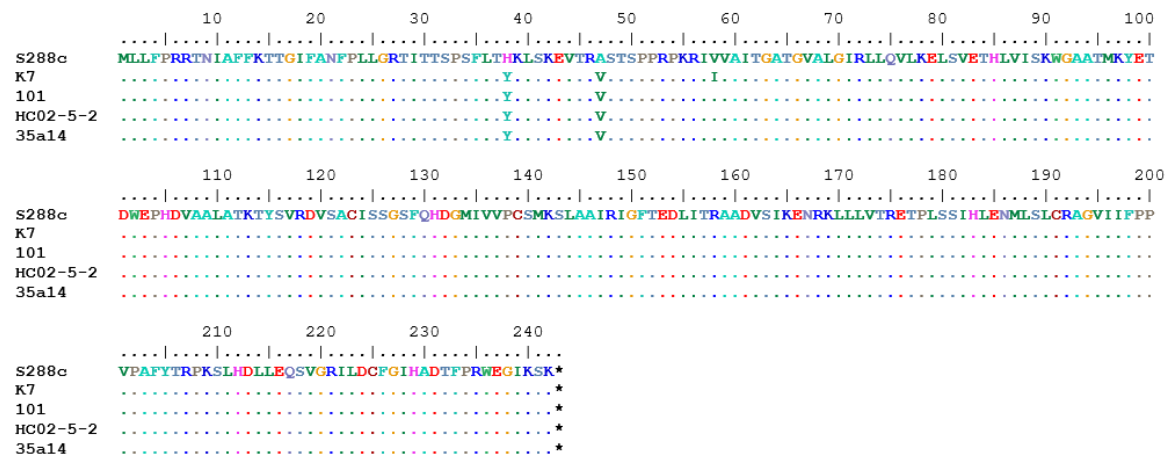


図 31 各酵母における *PAD1* 産物のアミノ酸配列比較

実験室酵母 S288c 株、清酒酵母 K7 株、泡盛酵母 101 株、ハイビスカス酵母 HC02-5-株について、全ゲノム情報から *PAD1* の cDNA 配列を取得しアミノ酸配列に翻訳し比較した。

3-2 島バナナ酵母 35a14 株を親株とした新たな酵母の育種

3-2-1 背景

島バナナ酵母 35a14 株を用いた泡盛に含まれる酢酸イソアミルは 101 株の約 60%と低かったことから (図 18C)。HC02-5-2 株の酢酸イソアミル生産性を向上させる育種を試みた。

イソアミルアルコールは、ピルビン酸から α -ケトイソ吉草酸、 α -ケトイソカプロン酸などを経て、イソアミルアルコールからアルコールアセチルトランスフェラーゼ (AAT) によって酢酸イソアミルに変換され (図 5)、ロイシンの毒性アナログである TFL に対する耐性を指標とすることで酢酸イソアミル高生産株の取得が期待できる (図 11)。島バナナ酵母 35a14 株は、従来の商用酵母とは異なる系統であるものの、*S. cerevisiae* であったことから、これらの代謝経路は維持されていると考えられ、同様の育種により酢酸イソアミル高生産株の取得が期待できる。そこで、島バナナ酵母 35a14 株を親株として、泡盛酵母 101 株やハイビスカス酵母 HC02-5-2 株と同様に TFL 耐性を指標とした酢酸イソアミル高生産株の取得を試みた。

3-2-2 材料と方法

1) 培地

酵母は、YPD 培地 (2%グルコース、1%酵母エキス、2%ペプトン) で培養した。酵母の細胞内アミノ酸含有量の分析には、合成培地 SD+Am (2%グルコース、0.5% 硫酸アンモニウム、0.67% yeast nitrogen base without ammonium sulfate and amino acids (Difco Laboratories))を使用した。TFL 耐性変異株の選抜には唯一の窒素源として 0.5% アラントインを含む SD 培地 (SD+Alt) を使用した。

2) 島バナナ酵母 35a14 株を親株とした TFL 耐性酵母変異株の分離

変異を誘発するために、35a14 株を 6 分間の紫外線照射で処理した³³⁾。突然変異を誘発した細胞を、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の TFL を含む SD+Alt 寒天培地に播種し、30°C で 3 日間培養した。得られたコロニーを SD 液体培地で培養した後、L-ロイシン蓄積株を選択するためにアミノ酸アナライザーに供した。

3) 遺伝子クローニングとプラスミド構築

G418 耐性遺伝子 (KanMX4) を含むセントロメアベースの低コピー数プ

ラスミド pYC130 (国立醸造研究所から提供)³⁰⁾および 2 μ ベースの高コピー数プラスミド pAD4 (ADH1 プロモーターおよびターミネーターを含む)(J. Nikawa、九州工業大学より提供)³¹⁾を使用して、それぞれ *LEU4* 遺伝子をサブクローニングおよび発現させた。大腸菌株 DH5 α (F λ - Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA argF*) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻m_k⁺) supE44 thi-1 gyrA96*) を使用してプラスミドを構築した。

35a14 株のゲノム DNA から、Leu4 のコード領域の 5' および 3' 末端に *Hind*III および *Sac*I 認識部位を付加して、KOD FX Neo ポリメラーゼ (東洋紡) を使用して *LEU4* 遺伝子全長を増幅した。PCR 産物を *Hind*III-pAD4 の *Sac*I サイト (pAD4-*LEU4*) にクローニングした後、pAD4-*LEU4* から PADH1-*LEU4*-TADH1 融合物を増幅し、それぞれ 5' および 3' 末端に *Kpn*I および *Mlu*I 認識部位を追加した。PADH1-*LEU4*-TADH1 融合の領域。増幅産物を pYC130 にサブクローニングして、酵母細胞で発現プラスミド (pYC130-*LEU4*) を構築した。

pYC130-*LEU4* (Asp578Asn) を発現するためのプラスミドを Quick-Change II Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) を使用して調製した。酢酸リチウム法³³⁾を用いて発現ベクター pYC130 vector、pYC130-*LEU4*、pYC130-*LEU4*^{Asp578Asn} をそれぞれ 35a14 株に形質転換し、200 μ g/ml の G418 を含む YPD 寒天培地上で形質転換体を選択した。本研究で新たに構築した PCR 増幅産物とプラスミドの DNA 配列は、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いてサンガー法に基づく配列解析により確認した。

4) 細胞内アミノ酸含量の定量

酵母を、200 μ g/ml の (必要に応じて G418 を含む) 5 ml の SD+Am 培地で、30 $^{\circ}$ C で 2 日間培養した (OD₆₀₀=10.0)。回収した細胞を 500 μ l の蒸留水に懸濁し、100 $^{\circ}$ C で 20 分間煮沸して細胞内のアミノ酸を抽出した。13,000 \times g で 5 分間遠心分離した後、上清を 0.2 μ m シリンジフィルター (mdiTM) でろ過した。ろ過試料は、イオン交換クロマトグラフィーとポストカラムニンヒドリン誘導体化を備えたアミノ酸アナライザー (JLC-500 / V2、JEOL、東京、日本) により、アミノ酸含量を定量した。LC/MS によってアミノ酸含量を測定するための実験手順は、以前に報告されたとおりに実施した⁵²⁾。各アミノ酸の含量は、乾燥細胞重量の百分率として表した。

5) Leu4 の立体構造予測

Leu4 における各アミノ酸置換の影響を評価するために、SWISS-MODEL ([//swissmodel.expasy.org/](http://swissmodel.expasy.org/)) を使用したホモロジーモデリングにより、野生型および変異型 Leu4 構造を構築した。モデリングは、結核菌由来の L-ロイシンに結合した LeuA の構造を鋳型にして行った (PDB ID コード:3FIG)。

3-2-3 結果と考察

1) L-ロイシン蓄積を伴う島バナナ酵母変異株の分離

第 1 章、第 2 章において、泡盛酵母 101 株あるいはハイビスカス酵母 HC02-5-2 株から L-ロイシンを蓄積する TFL 耐性変異株 (18-T55 株²⁶⁾ および T25 株¹⁹⁾) を分離し、それぞれ酢酸イソアミルを高含有する新たな泡盛醸造への応用を報告した。そこで、島バナナ酵母 35a14 株についても、泡盛醸造に適した特性を付与するため、酢酸イソアミルの高生産株の取得を目指し、細胞内に L-ロイシンを蓄積する TFL 耐性変異株の分離を試みた。35a14 株を 6 分間の紫外線照射により変異を誘発した (生存率約 1.7%)。TFL (50 mg/L) を含む SD 培地に播種したところ、約 100 個の TFL 耐性コロニーが得られた。これらのコロニーから、L-ロイシンを高生産する株をスクリーニングし、最終的に BNNL80 株を選抜した。

BNNL80 株は、親株 35a14 株と比較して、乾燥重量当たりの L-ロイシン含量が約 3.3 倍に増加していた (図 32)。このことから、BNNL80 株において L-ロイシンによる Leu4 へのフィードバック阻害が抑制され、L-ロイシンおよび酢酸イソアミルが高生産されることが期待された。

2) BNNL80 株の LEU4 遺伝子配列の解析

第 1 章、第 2 章において、泡盛酵母 101 株あるいはハイビスカス酵母 HC02-5-2 株から L-ロイシンを蓄積する TFL 耐性変異株 (18-T55 株²⁶⁾ および T25 株¹⁹⁾) を分離し、解析した方法と同様に、島バナナ酵母 BNNL80 株の LEU4 遺伝子配列を解析した。

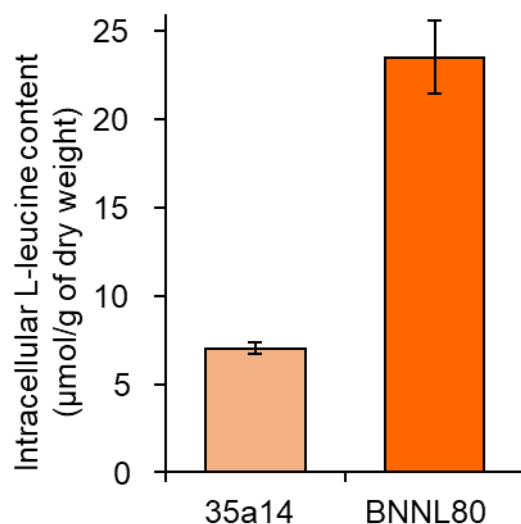


図 32 島バナナ酵母 35a14 株と BNNL80 株の細胞内 L-ロイシン含有量
酵母細胞を 5 ml の SD+Am 培地で 30℃、2 日間培養した (OD600 = 10.0)。値は 3 回の独立した実験の平均と標準偏差で示す。

その結果、*LEU4* 遺伝子の 1,732 番目の塩基がグアニンからアデニンへのホモ接合変異を特定し、この変異は、Leu4 タンパク質の Asp578Asn のアミノ酸置換を伴うことを確認した。清酒酵母の研究により、Leu4 の Asp578 を Tyr に置換すると、L-ロイシンによるフィードバック阻害に対する感受性が低下し、L-ロイシンが過剰生産されることで清酒中のイソアミルアルコールと酢酸イソアミルの含量が増加することが報告されている³⁹⁾。したがって、BNNL80 株の Leu4 の Asp578Asn 置換は、Asp578Tyr 置換と同様に、L-ロイシンによるフィードバック阻害に対して脱感作することが考えられた。

3) *LEU4* 変異が L-ロイシン生合成におよぼす影響

BNNL80 株の Leu4 の Asp578Asn 置換が L-ロイシン生合成に影響するかどうかを確認した (図 33)。pYC130_LEU4 の発現ベクター²⁶⁾ の *LEU4* 遺伝子に Asp578Asn 置換に対応する変異を導入し、pYC130_LEU4^{Asp578Asn} を得た。pYC130 ベクター、pYC130_LEU4 および pYC130_LEU4^{Asp578Asn} を含む酵母形質転換体について、唯一の窒素源としてグルタミン酸および形質転換体中のプラスミドを維持するための抗生物質である G418 を含む SD 培地で培養し、細胞内 L-ロイシン含量を測定した。その結果、Leu4^{Asp578Asn} を発現する 35a14 株は、空ベクターを含む 35a14 株および親株 35a14 株と比較して乾燥細胞重量当たり 1.6 倍および 1.4 倍高い L-ロイシンを蓄積していることがわかった (図 33)。この結果は、

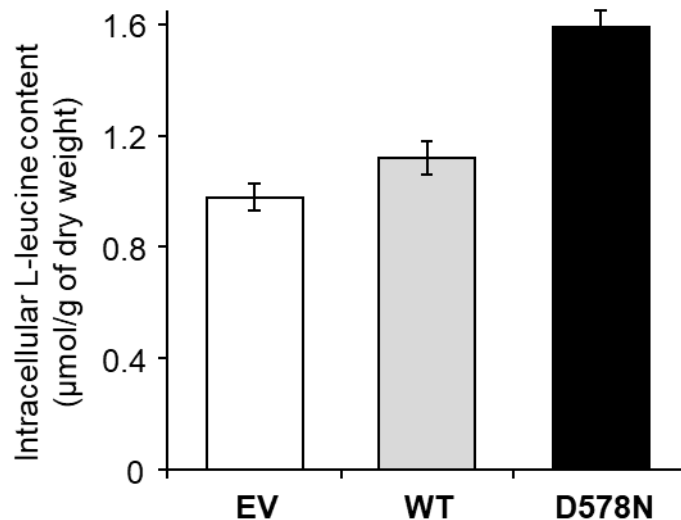


図 33 BNNL80 株の *Leu4* 変異による細胞内 L-ロイシン含有量への影響
pYC130 ベクターのみ (EV、白)、pYC130_LEU4 (WT、グレー)、および
pYC130_LEU4^{Asp578Asn} (D578N、黒) を保有する酵母細胞の細胞内 L-ロ
イシン含有量。

値は 3 回の独立した実験での平均と標準偏差で示す。

Leu4 の Asp578Asn 置換が L-ロイシンフィードバック阻害に対する感受性を低下させ、L-ロイシンの高生産につながることを示唆している。

4) *LEU4* 変異体における L-ロイシン結合部位の構造予測

フィードバック阻害を引き起こす L-ロイシンと結合した結核菌由来の *LeuA* の結晶構造 (PDB ID: 3FIG) では、2 つの L-ロイシン結合部位が隣接する単量体の調節ドメインで構成されている⁴²⁾。*Leu4* の活性を阻害する L-ロイシンは、*Leu4* の Asn515、Ile518、Thr549、Glu577、Val579 に対応する Asn532*、Leu535*、Ala565、Pro625、Ile627 によって認識される (アスタリスクは、隣接するモノマー残基を示す)。

L-ロイシンと結合した結晶構造と L-ロイシンを含まない結晶構造 (PDB ID: 3HPZ) の比較では、Asn532*と Ala565 の空間位置が L-ロイシンを認識するように変化していることが示された。参照構造として L-ロイシン (PDB ID: 3HPZ) を使用せずに *Leu4* から構築した *Leu4* のホモ二量体構造モデル (Swiss-model repository P06208) では、Asp578 は 2 つの隣接するモノマーのモノマー-モノマー界面に位置し、Asp578 の側鎖のヒドロキシル基は、Asp581 とのモノマー内相互作用、および Lys489*および Arg495*とのモノマー間相互作用していると予想された (図 34)。

一方、L-ロイシンを結合した MtIPMS (3FIG) を鋳型として構築された Leu4 の構造モデルでは、Glu577、Lys489*、Arg495*の側鎖の向きを変えることで、Asn515*が L-ロイシンを認識するように移動することが示唆された(図 34)。さらに、Asp578 と Arg495* の間の相互作用は L-ロイシン結合によって遮断され、Asp578 が L-ロイシンを介したコンフォメーション変化に寄与することが示唆された。したがって、578 位のアスパラギン酸をアスパラギンに置換すると、この相互作用がなくなることで、同じモノマーの Glu577 と隣接するモノマーの Asn515 の空間位置が変化し、それによって L-ロイシンの結合が妨げられると考えられた。既報の Asp578Tyr 置換³⁹⁾は、Leu4 の局所構造に同様の影響を与える可能性があるものの、Leu4 のアロステリック調節における Asp578 の詳細な役割を明らかにするには、さらに生化学的および構造解析を行う必要がある。

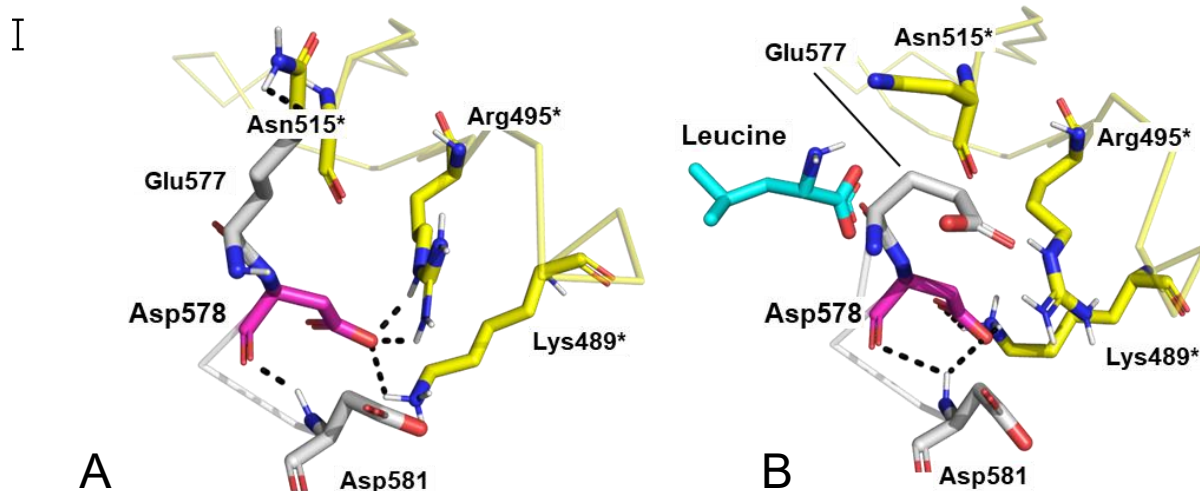


図 34 変異型 Leu4 における L-ロイシン結合部位の構造予測

(A) L-ロイシンが結合していない状態、(B) L-ロイシンが結合した状態について、MtIPMS を使用して構築された Leu4 の構造モデルを示した。それぞれは L-ロイシン (水色)、Asp578 (マゼンタ)、Glu577 (灰色)、Asp581 (白)、Lys489* (黄)、Arg495* (黄)、Asn515* (黄) のスティックモデルとして表示した。黒い点線は、推定水素結合を示す。Glu577 と Asp581 の間の残基は白いリボンで示し、Lys489* と Asn515* の間の残基は黄色で示す。

5) BNNL80 株の泡盛酵母としての有用性

BNNL80 株は、Leu4 の Asp578Asn 置換に伴う Leu4 の立体構造への影響により、フィードバック阻害を抑制していると考えられた。この BNNL80 株を用いて、小仕込み試験を行い得られた泡盛に含まれる 4-VG、イソアミルアルコール、酢酸イソアミルの濃度を評価した (図 35)。その結果、4-VG 濃度は 101 株と比較して約 4 倍で、親株の 35a14 株と同等の値であり、BNNL80

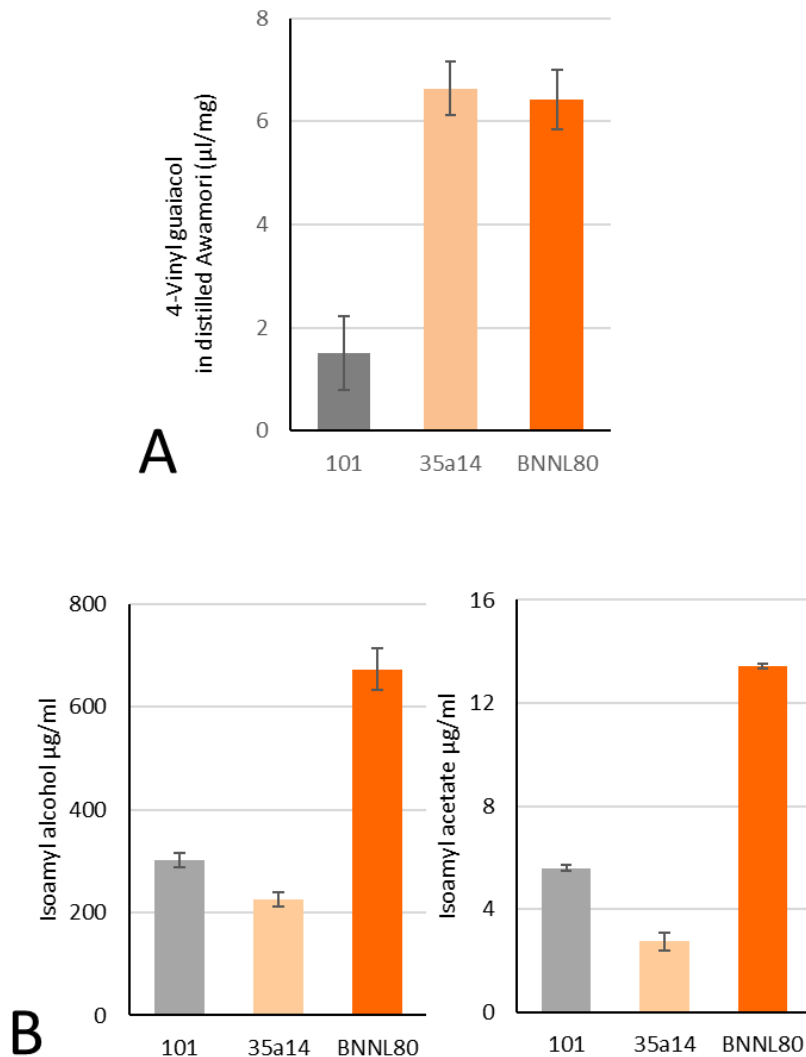


図 35 BNNL80 株を用いた小仕込み試験での泡盛の香気成分 (A) 4-VG 濃度、(B) イソアミルアルコール、酢酸イソアミル濃度。値は 3 回の独立した実験の平均と標準偏差で示した。

株は 4-VG を高生産することが確認された (図 35A)。一方、イソアミルアルコール、酢酸イソアミルは、101 株と比較して、35a14 株では低かったものの (約 87%、60%)、BNNL80 では親株 35a14 株の 3-5 倍に増加していた (図

35B)。以上の結果から、BNNL80 株を用いることで、泡盛酵母 101 株と比較して、古酒香成分バニリンの前駆体である 4-VG 濃度、および吟醸香成分である酢酸イソアミルの濃度がともに高い泡盛醸造が可能であることが示された。

今回、バナナの茎から分離された 35a14 株を親株として育種された BNNL80 株は、①従来の商用酵母とは系統的に異なり沖縄独自の系統と考えられる株で、本菌株を用いることで、②泡盛古酒香のバニリンの前駆体である 4-VG を高含有、かつ、③吟醸香の一つである酢酸イソアミルを多く含む泡盛の醸造が可能な酵母であることが確認された。さらに、BNNL80 株の解析により酢酸イソアミル高生産に寄与する機構を解明することができた。

BNNL80 株は、新たな泡盛酵母として付加価値の高い特性を持つ有することが確認された。本菌株を用いた泡盛の開発を泡盛酒造所と進めており、新たな泡盛として 2023 年に商品化される予定である。

第4章 泡盛醸造に關与する微生物の機能解析と泡盛醸造への応用

4-1 黒麹菌の系統解析と泡盛醸造への応用⁶⁰⁾

4-1-1 背景

沖縄県の伝統的酒類「泡盛」の醸造に用いられている黒麹菌は、分生子が黒色を呈する *Aspergillus* 属の糸状菌である。この黒麹菌の定義や学名については、形態や生化学的な特性などから整理が試みられてきたものの、国際的なコンセンサスが得られない状況が続いていた。黒麹菌の最初の記述は 1901 年の乾による単離であり、続いて宇佐美、中澤らが黒麹菌を単離してそれぞれ独立に報告している⁶¹⁾。当時の純粋培養でない泡盛黒麹には様々な形態を有する糸状菌が存在したと考えられ、異なる研究者から多様な新種が報告された。これらの分類、整理を行った村上は、黒麹や他由来の黒アスペルギルス類糸状菌を黒麹菌群（アワモリ群）と黒カビ群（ニガ一群）に大別した⁶²⁾。しかしながら海外においては、「*Aspergillus awamori* と名付けられた黒カビ群に属する株」が黒麹菌の標準株とみなされて分類され、黒麹菌群も黒カビ群も *A. niger aggregate* としてまとめるべきだという主張もなされるなど、黒麹菌分類の初期における種名の未整理や錯誤により、黒麹菌の実態に合わない分類体系が課題となっていた。近年、遺伝子解析を応用した取り組みにより、黒麹菌群として分類されている菌種が *Aspergillus luchuensis* としてまとめられた^{61),63)}。種として再定義された *A. luchuensis* は産業上重要な微生物であることから、さらに、RIB2604 (NBRC4314) 株を対象とした全ゲノム解析が行われた。ゲノムの全長は約 34.7 Mb、約 12,000 の遺伝子をコードしていること、および機能性に関連した各遺伝子群の様態や他の種との違いなどが明らかになった^{64),65)}。

泡盛醸造の現場において現在用いられている黒麹菌は、ほぼ全てがいわゆるアワモリ株 (ISH1)、サイトイ株 (ISH2) の混合利用（複菌麹）である。アワモリ株とサイトイ株は発酵特性が異なることが経験的に知られており、混合して用いることで酒質に変化を与える工夫がなされている。これらの麹菌以外にごく一部であるが利用されている株として、坂口が戦前に単離した瑞泉株 (JCM22320) がある。一方、これらの株は醸造特性が異なるにも関わらず、従来のバーコーディング配列の比較においてはその差が見られない^{66),67)}。

以上のことから、株間の詳細な解析を行い、過去の形態的な観察や醸造の現場で認められている黒麹菌の多様性の背景を明らかにすることの意義は大きいと考えられる。本論文では、各所に保存された黒麹菌株やその近縁種株のゲノム情報の取得を行い、全ゲノム情報を用いた比較解析により詳細な分類を試みた。多くの黒麹菌株のゲノム情報の詳細な比較と整理は、黒麹菌の新たな産業利用につながる重要な基盤情報になると考えられる。

4-1-2 材料と方法

1) 試料

黒アスペルギルス類の菌株あるいはゲノム DNA は、各菌株保存機関（（独）酒類総合研究所、（独）製品評価技術基盤機構、（国研）理化学研究所）からの分譲、および株式会社瑞泉酒造、石川種麹店からの供与株を用いた（表 9）。

2) 全ゲノムデータの取得

菌株およびゲノム DNA からの全ゲノムデータ取得は、Miseq (Illumina)を用いた。供与された菌体の DNA は、YPD Broth 4 ml で 3-4 日間培養した菌体を集菌後、凍結破砕し、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (PCI) 法に従い抽出精製した。菌体より抽出した DNA および DNA の状態で供与された試料は Qubit (Thermo Fisher Scientific) にて定量した。定量した DNA を試料として、Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina) を用いてライブラリを作製し、MiSeq Reagent Kit v2 または v3 (Illumina) をにより全ゲノムデータを取得した。

3) 単塩基変異を用いた系統解析

系統解析は、以下の方法に従って実施した¹⁹⁾。次世代シーケンサーにより得られたデータおよびデータベース上のリードデータをトリミングした。解析に供するデータ量をそろえるために、それぞれのリードデータの総塩基数が、リファレンスゲノム配列である *A. luchuensis* RIB2604 (NBRC4314) の塩基数の 35-50 倍となるようリードをランダムにサンプリングした。これらのリードを *A. luchuensis* RIB2604 (NBRC4314) のゲノム配列に対してマッピングし、その結果から変異情報を抽出し、SNVs をつなげた約 2,441 kbp の仮想配列を作製しその比較を行った。以上の解析には CLC Genomics Workbench v10.1.1 (Qiagen) を用いた。変異情報からの仮想配列の作製には独自に

作製したスクリプトを用いた²⁰⁾。この配列を基に MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software²¹⁾を用いて Neighbor-joining 法にて系統樹を作製した。

4-2-3 結果と考察

1) 全ゲノム情報を用いた変異解析

次世代シーケンサーを用いて菌株保存機関や種麴を扱う企業より供与、分譲された 31 株の黒麴菌および近縁種の全ゲノム情報を取得した (表 9)。また比較としてデータベース上のショートリードの情報 (Sequence reads archives, SRA) を用いた (表 10)。得られた各株のリード情報は *A. luchuensis* RIB2604 (NBRC4314) 株のゲノム情報 (GCA_001602395.1) をリファレンス配列としてマップした。

株間の比較のため、まず、マッピング結果から各株における約 31 kb のミトコンドリア DNA (mtDNA) 全長のコンセンサス配列を取得し比較解析を行った。その結果、*A. luchuensis* の種内の差異は数塩基であり、目的とする系統解析には不十分であることが確認された (データ示さず)。

次に、全ゲノム配列へのマッピング結果から抽出される変異情報を用いて対象領域を広げた解析を検討した。本研究においては一意にコールされる単塩基変異を homozygous SNVs とし、これらを対象とした解析により¹⁹⁾、黒アスペルギルス類内の系統関係の解析を行った。

進化の過程では、遺伝子には単塩基置換のような小さな変異から、比較的長い挿入や欠失のような大きな変異まで様々な規模の変異が蓄積されており、株間の詳細な系統関係の判断にはこれらの総合的な比較解析が必要と考えられる。一方、小さな変異である homozygous SNVs は他の変異と比較して頻度が高く、その他の変異の程度と一定の相関性があることが期待される。これを確認する目的で、homozygous SNVs 数と、欠失など比較的大きい変異の程度を反映するリードがマッピングされなかった参照配列の領域 (unmapped area) の割合とを比較した (図 35)。その結果、両者は、ほとんどの株では線形な関係 ($R^2 = 0.87$) であったことから、homozygous SNVs を用いた解析により大きな変異を含めた株間の総合的な系統関係の評価が可能であると判断された。

表 9 本研究で全ゲノム情報の取得および分析した菌株分類は系統解析結果により判断した。Unmapped area、Number of variants は RIB2604 (NBRC4314) を参照配列として解析した。Accession number は、DDBJ / EMBL / GenBank の登録番号。

Classification in this study	No.	Strain ID	Description	Origin or application	Unmapped area (%)	Number of variants	Accession number
<i>A. luchuensis</i> Group A	1	RIB 2604	NBRC 4314, <i>A. luchuensis</i> Usami	Awamori koji	2.0	10	DRR308506
	2	JCM 2261	Nakazawa et al. alpha strain	Awamori koji	2.2	37	DRR308524
	3	RIB 2019	NBRC 4338, JCM 22336, <i>A. aureus</i>	Awamori koji	0.4	651	DRR308518
	4	RIB 2642	NBRC 4281, JCM 39132	Awamori koji	1.7	1,894	DRR308510
	5	ISH1	Awamori industrial strain	Awamori koji	1.7	563	DRR308507
	6	RIB 2061	Sugama et al.	Awamori koji	1.2	2,570	DRR308527
<i>A. luchuensis</i> Group SK	7	JCM 22320	Sakaguchi et al. R-6822	Awamori koji	1.6	4,620	DRR308509
	8	ISH2	Awamori industrial strain	Awamori koji	2.3	3,268	DRR308508
	9	RIB 2005	Miyauchi et al., Kawachi kuro-koji	Shochu koji	0.6	4,380	DRR308522
	10	RIB 2004	Noshiro et al., Kawachi kuro-koji	Shochu koji	0.7	3,999	DRR308512
	11	RIB 2051	NBRC 6086, JCM 22239, Higuchi Co.	Shochu Tane-koji	0.5	4,811	DRR308526
	12	RIB 2505	Shirousamii strain, Kawachi shiro-koji	Shochu koji	0.5	4,768	DRR308523
	13	RIB K7	Sugama et al., <i>A. saitoi</i>	Awamori koji	0.6	4,892	DRR335993
	14	RIB K49	Sugama et al., <i>A. saitoi</i>	Awamori koji	2.1	3,259	DRR335991
	15	RIB K53	Sugama et al., <i>A. saitoi</i>	Awamori koji	0.6	4,664	DRR335994
	16	RIB K54	Sugama et al., <i>A. saitoi</i>	Awamori koji	0.8	3,862	DRR335992
<i>A. luchuensis</i> unclassified	17	RIB 2605	NBRC 4116, JCM 22324, Nakazawa et al.	Awamori koji	1.1	6,762	DRR308514
	18	RIB 2016	NBRC 4123, Nakazawa et al.	Awamori koji	1.4	41,777	DRR308513
	19	JCM 22302	CBS 125.52, Sakaguchi et al. R-0436	Awamori koji	2.4	39,512	DRR308532
<i>A. tubingensis</i> or <i>A. tubingensis</i> related	20	RIB 2631	NBRC 4050, <i>A. ficuum</i>	unknown	7.9	1,166,055	DRR308520
	21	RIB 2036	NBRC 4407	Soil	8.1	1,150,701	DRR308521
	22	RIB 2623	NBRC 6670, <i>A. phenicis</i>	Awamori koji	8.2	1,165,361	DRR308519
	23	JCM 22294	Sakaguchi et al. R-3821	Awamori koji	8.5	1,136,860	DRR308529
	24	JCM 22299	Sakaguchi et al. R-0136	Awamori koji	8.8	1,063,650	DRR308531
	25	JCM 22295	Sakaguchi et al. K-3931	Awamori koji	8.5	1,129,144	DRR308530
<i>A. niger</i> or <i>A. niger</i> related	26	RIB 2643	NBRC 4043, <i>A. cinamomeus</i>	unknown	19.5	1,757,501	DRR308516
	27	RIB 2641	NBRC 33023, <i>A. niger</i> E-neotype	Industrial	19.3	1,746,878	DRR308515
	28	RIB 2602	NBRC 4388	Awamori koji	18.9	1,788,047	DRR308517
	29	JCM 22292	Sakaguchi et al. R-1031	Awamori koji	19.7	1,667,802	DRR308525
	30	JCM 22293	Sakaguchi et al. R-1219	Awamori koji	21.3	1,397,257	DRR308528

表 10 本研究で参照した黒アスペルギルス属の株
Unmapped area、Number of variants は RIB2604 (NBRC4314) を参照配
列として解析した。

Species	Accession (Strain)	Accession (reads)	Unmapped area (%)	Number of variants
<i>Aspergillus vadensis</i>	CBS 113365	SRR4125764	9.1	1,328,510
<i>Aspergillus piperis</i>	CBS 112811	SRR4125758	5.1	603,792
<i>Aspergillus costaricaensis</i>	CBS 115574	SRR4125631	7.6	1,142,697
<i>Aspergillus eucalypticola</i>	CBS 122712	SRR4125641	10.0	1,053,694
<i>Aspergillus neoniger</i>	CBS 115656	SRR4125644	8.2	1,121,079
<i>Aspergillus tubingensis</i>	CBS 134.48	SRR402757	12.6	869,797
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 13496	SRR1801279	20.0	1,738,366
<i>Aspergillus phoenicis</i>	ATCC 13157	SRR1801280	20.1	1,739,982
<i>Aspergillus lacticoffeatus</i>	CBS 101883	SRR4125639	19.5	1,739,005
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CBS 101740	SRR3927523	35.3	1,068,215
<i>Aspergillus luchuensis mut. kawachii</i>	NBRC 4308	DRR262015	0.5	3,416

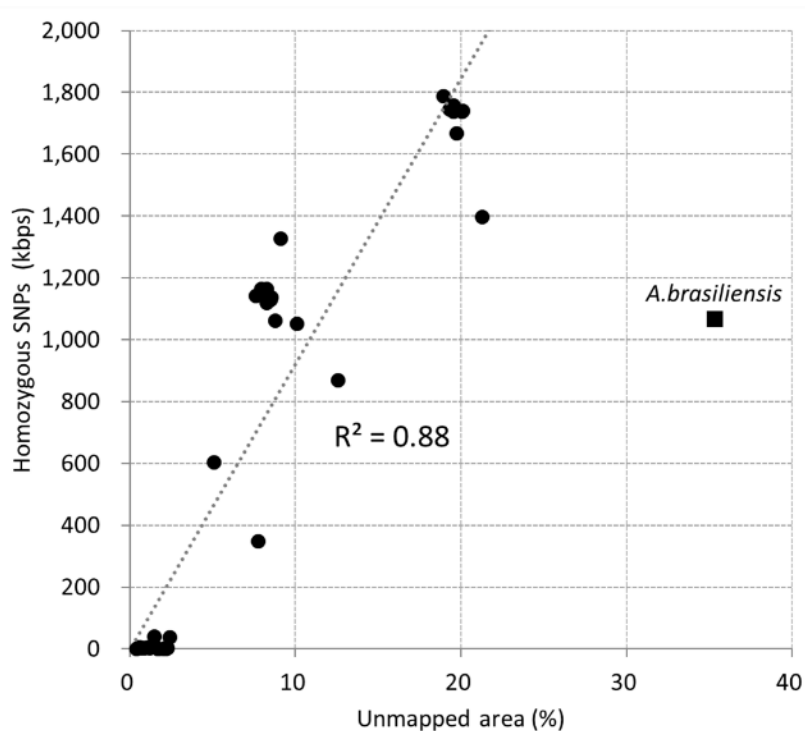


図 35 1 塩基変異の数とゲノム構造の比較
ホモ SNV の数と各株のマッピングされていない領域を表 1 に示す。

一方、*A. brasiliensis* は他の株の線形な関係から外れ、unmapped area の割合と比較して相対的な SNVs 数が少なかった。このことから、*A. brasiliensis* のように他と大きく離れた株については、SNVs のみを用いた解析では系統的距離が実際より近いと判断される可能性があり、このような株の系統的距離の相互比較は検討が必要であると考えられた。

2) 黒アスペルギルス類における *A. luchuensis* の系統的位置

対象株について *A. luchuensis* RIB2604 (NBRC4314) 株へのマッピングにより得られた homozygous SNVs を用いて系統樹を作製したところ、*A. luchuensis*、*A. tubingensis*、*A. niger* を含むクレードがそれぞれ形成され、これら 3 種を区別し得ることが確認された (図 36)。これらの結果は、これまでの系統解析の報告とよく一致している (61), (68)。

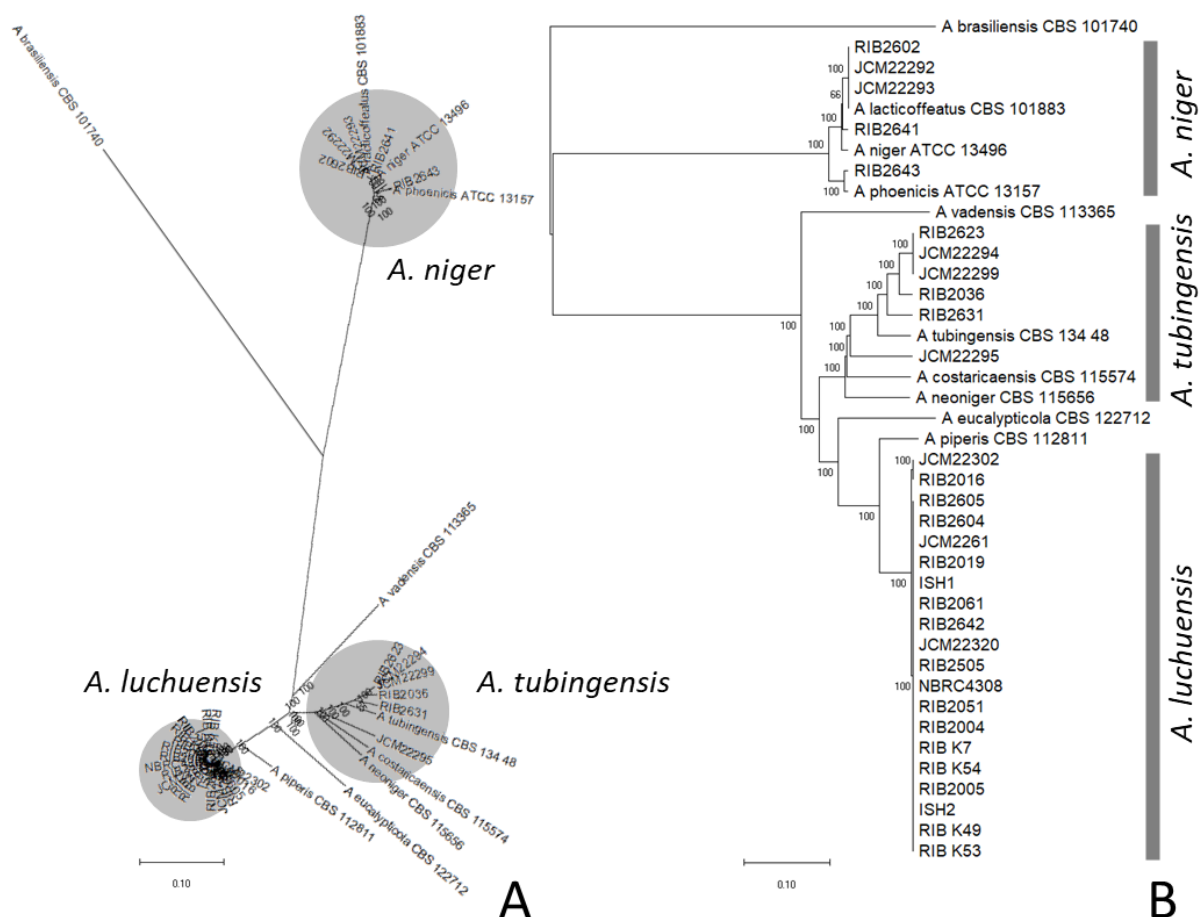


図 36 黒アスペルギルス属の系統樹

(A) Radiation phylogenetic tree (B) Traditional tree で示す。系統樹は Neighbor-Joining 法、距離は最大複合尤度法を使用した。

3) *A. luchuensis* の種内系統解析

A. niger を含めた系統樹全体で *A. luchuensis* 内の系統関係を俯瞰すると、既報と同様に *A. luchuensis* 内の株間の差異は小さかった (図 36)。そこで、系統樹の *A. luchuensis* を含む枝を拡大して評価した結果、*A. luchuensis* は、大別すると泡盛実用菌 ISH1 (アワモリ株) が含まれる A グループ、および泡盛実用菌 ISH2 (サイトイ株) や *A. luchuensis* mut. *kawachii* (カワチ株) が含まれる SK グループに分けられることが分かった (図 37)。ISH1 および ISH2 は、醸造特性が異なることが知られており、これら商用株がそれぞれ異なるグループに分配されていた。また、A グループには商用株である ISH1、および RIB2604 (NBRC4314) が含まれ、これらが系統的に近いことがわかった。一方、SK グループには、泡盛商用株である ISH2 や焼酎醸造に用いられる白麹菌株、菅間らが 1975 年に単離した株⁶⁹⁾ (RIBK7、RIBK49、RIBK53、RIBK54) などが含まれていた。

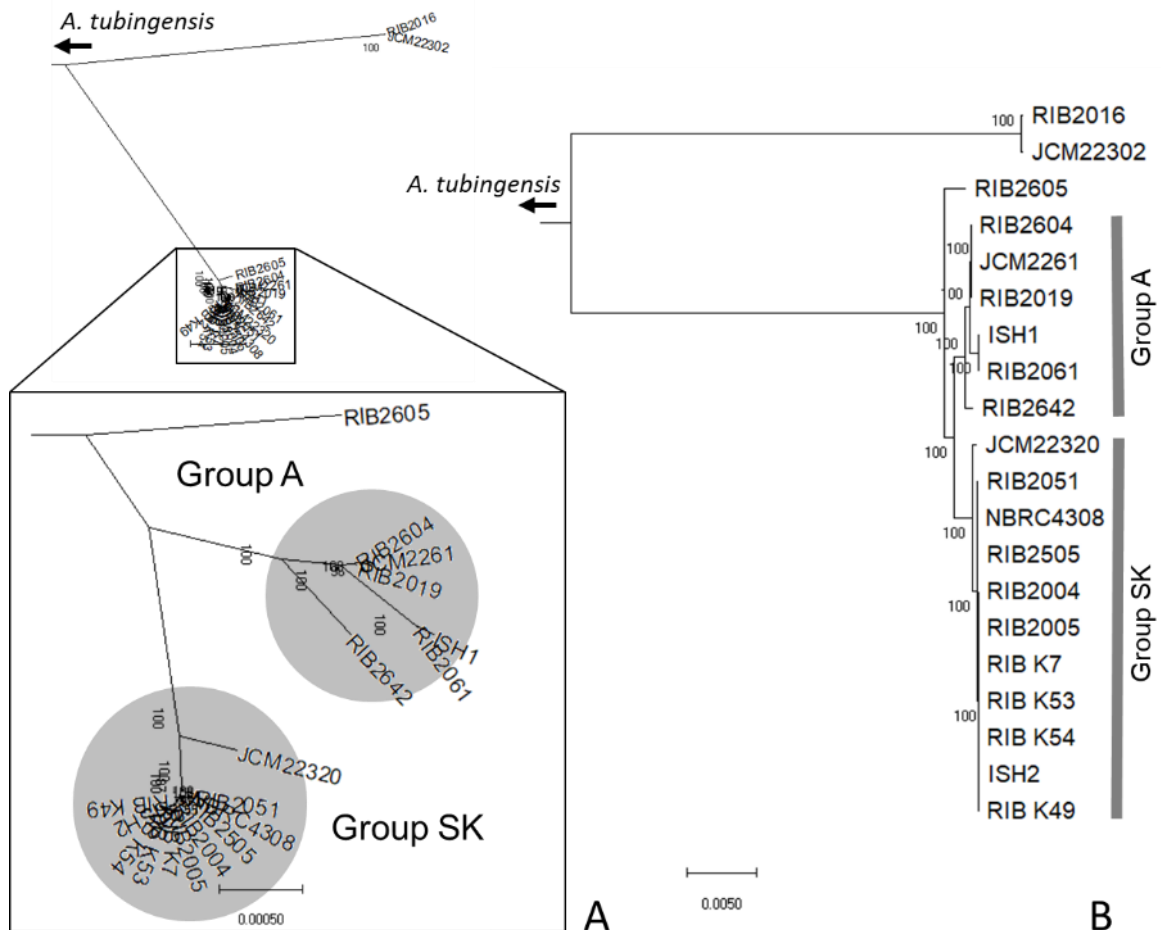


図 37 *Aspergillus luchuensis* の系統樹

(A) Radiation phylogenetic tree (B) Traditional tree で示す。系統樹は Neighbor-Joining 法、距離は最大複合尤度法を使用した。

さらに、A および SK グループに含まれない側鎖に位置した株 (RIB2016、JCM22302、RIB2605) の存在が明らかとなった。これらのうち RIB2016 (NBRC4123) および RIB RIB2605 (NBRC 4116) は、共に中澤亮治氏により 1936 年に泡盛麴から分離した株として報告され⁷⁰⁾、RIB2016 (NBRC4123) は、*A. aureus* var. *pallidus* (株番号 A.10)、RIB2605 (NBRC 4116) は、*A. awamori* var. *piceus* (株番号 A. 02) と記載されている。また、JCM22302 は、坂口謹一郎氏により 1949 年に R-0436 株として記載されている^{71),72)}。これら側鎖に位置した株がいずれも戦前に分離された株であることは、戦前の泡盛醸造所には分子系統的にさらにバラエティーに富んだ黒麴菌株が存在していたことを示唆しており興味深い。

歴史的に使われなくなった黒麴菌株には、醸造に適さない株とともに現代の新たな嗜好性に合う泡盛醸造に適した株や、以前の醸造設備では用いることが困難であったものの今は利用可能な株が埋もれている可能性が考えられる。例えば、泡盛醸造ではこれまで腐造防止の目的からクエン酸生産能が高い黒麴菌株が用いられ、亜熱帯環境下での安定した醸造に貢献してきた。一方、現代の泡盛酒造所は衛生管理が改善され、クエン酸生産能への依存度は低下していることから、利用可能な黒麴菌株の幅が広がったと考えられる。これらのことから、これまで用いられていない黒麴菌株の中には、利用価値の高い優良株が存在すると考えられ、今回の詳細な系統解析の結果は新たな泡盛黒麴菌開発への活用が期待できる。

4) *A. luchuensis* 内の分岐年代の推定

泡盛醸造は、600 年以上の歴史を有すると考えられているものの、第 2 次世界大戦の地上戦により数多くの歴史的書物が失われた影響などから、黒麴菌の利用開始時期などを含め泡盛醸造技術の歴史はほとんどわかっていない。今回、全ゲノム解析により得られた系統解析の結果から黒麴菌株の分岐年代を推定し、泡盛醸造の歴史との比較を試みた。

まず、SK グループの株のみを対象とした詳細な系統関係の解析を行った。その結果、鹿児島で採取された河内源一郎商店由来株 NBRC4308、RIB2505、および焼酎種麴から分離された RIB2051 の 3 株の白色変異株が 1 つのグループを形成し、白色変異株とともに採取された RIB2004、RIB2005 および ISH2 などを含む黒色分生子株のグループと分離した (Fig. 38)。これらの白色変異株と黒色分生子株の分岐は近縁と考えられる複数の

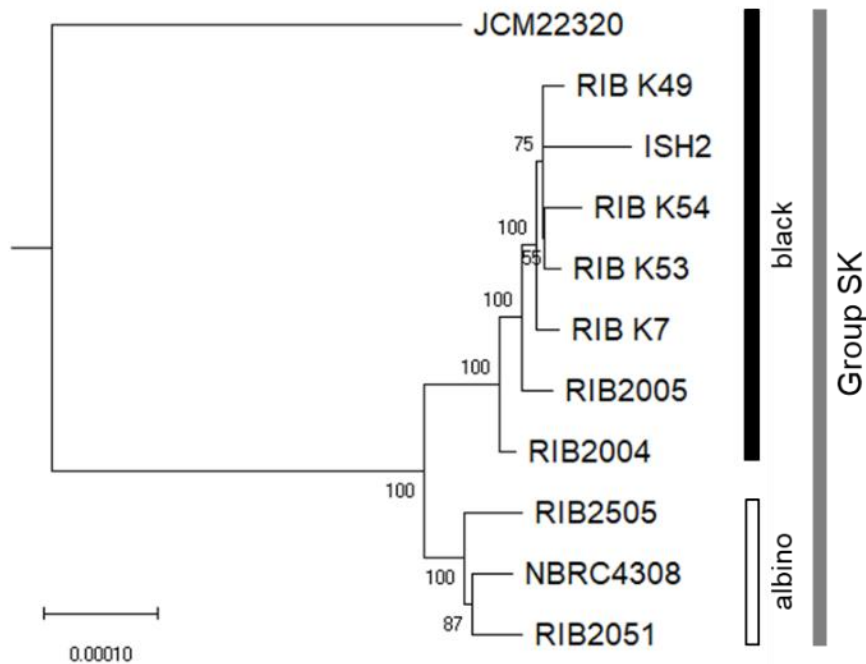


図 38 *Aspergillus luchuensis* Group SK の系統樹
各株の分生子の色（黒、アルビノ）を示す。

株を用いた解析に基づいていることから、この分岐時期は白色変異株が生まれた年代に近いと考えられた。また、これらのうち ISH2 は泡盛黒麹菌株として商業利用され続けていることから期間に応じた変異が蓄積しており、ISH2 と白色変異株の分岐年代は白色変異株の生まれた年代を反映していると考えられる。

黒麹は明治末期の 1907-1910 年頃に鹿児島に渡り、1918 年に河内源一郎商店によりこの黒麹から白色変異株 NBRC4308 などが分離された^{62),71),72)}。従って、白色変異株は沖縄で生まれ泡盛黒麹に含まれた状態で鹿児島に渡ったか、あるいは鹿児島への移出後に生まれたかのいずれかである。この時代の沖縄県内での泡盛醸造では種麹を用いていなかったものの、目視により高い品質の黒麹が選択され次の製麹に用いられており⁷³⁾、他の色調のカビが見られないことが重要な選択条件であった。さらに、沖縄から鹿児島への黒麹の移出は焼酎醸造への黒麹の利用が目的であり^{62),71),72)}、より高い品質の黒麹が選抜されたと推測されることから、黒麹に混在すれば目視で比較的容易に判別できる白色変異株は鹿児島に移出した黒麹には含まれず、これ以降に生まれたとも考えられる。この場合、白色変異株は約 100 年前に生まれたことになる。一方、もし沖縄で白色変異株が生まれ黒麹に混在

した状態で維持されその後鹿児島に持ち込まれていた場合、沖縄での泡盛醸造において黒色の麴が選択され続けるという選択圧の中で白色変異株が混在し続けたことになるため、この期間は一定以下であると考えられる。今回、この期間を100年以下とし、白色変異株は200年前以降に生まれたと推定した。以上のことから、ISH2と白色変異株の分岐年代を100年前から200年前の間と推定した。

この値を指標として分岐年代の推定を行った結果、AおよびSKグループは泡盛醸造が始まるかなり昔の1,500-3,000年前に分岐し、また、AおよびSKグループのほとんどの黒麴菌株は泡盛醸造の約600年の歴史に含まれる250-500年前に分岐したと推測された(図39)。これらの結果は、ゲノム解析により泡盛醸造技術の歴史の一端を明らかにした成果であると考えている。

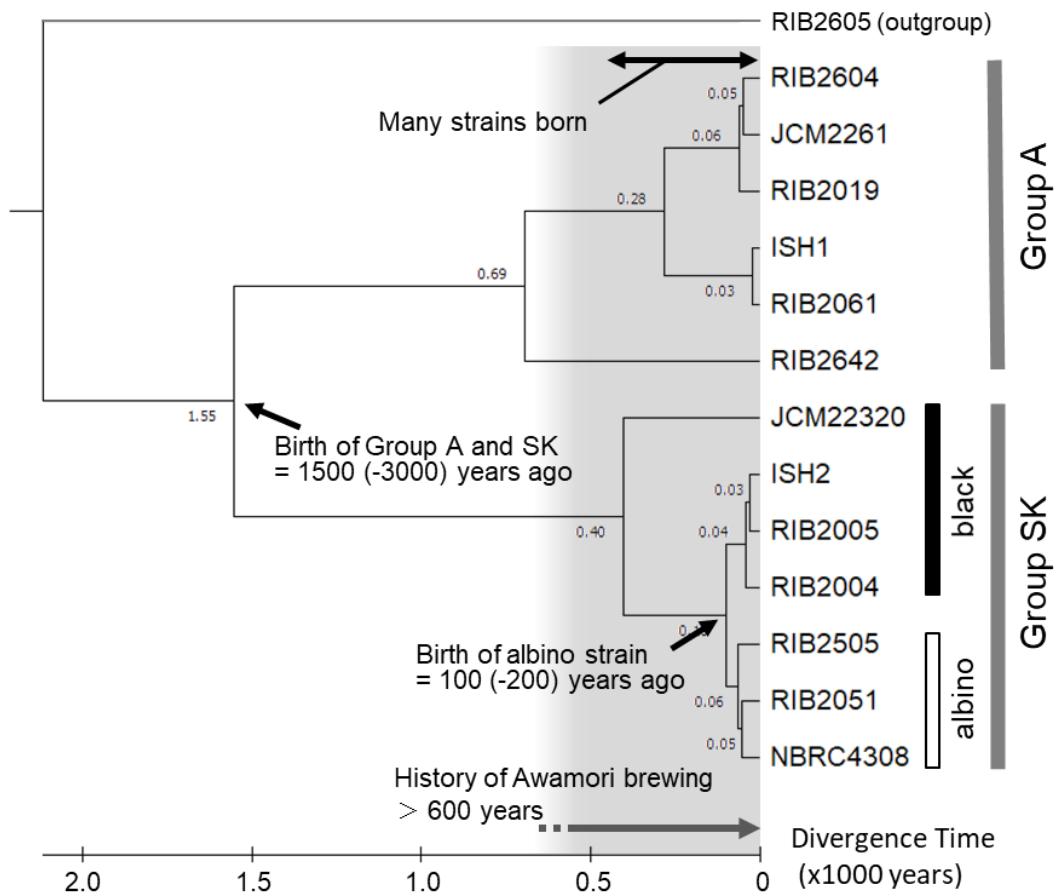


図 39 *Aspergillus luchuensis* Group A および SK の進化系統樹
 スケールバーは分岐時間を示す(x1000 年)。灰色は沖縄で泡盛醸造
 が行われていたと考えられる時代。

4-2 泡盛もろみ乳酸菌が泡盛風味成分に及ぼす影響⁷⁴⁾

4-2-1 背景

バニリンは、泡盛古酒に含まれる重要な成分で、蒸留後の泡盛に含まれる4-VGから熟成中にバニリンに変換される^{12),46),47)}。様々な酒類でこれらの成分が風味に寄与していることが報告されており、ワイン⁷⁵⁾、ウイスキー⁷⁶⁾、ビール¹⁵⁾、および清酒⁷⁷⁾において酵母あるいは乳酸菌がフェルラ酸の脱炭酸を行い4-VGに変換することなどが報告されている。また、焼酎では醸造用酵素剤を用いて4-VG濃度を上昇させる報告がある⁷⁸⁾。一方、泡盛においては、最近、フェルラ酸から4-VGへの変換への黒麹菌の関与が報告され、現在の一般的な泡盛醸造において泡盛に含まれる4-VG濃度への黒麹菌の寄与が高いことが示された¹⁸⁾。

泡盛醸造において、4-VGは古酒香の増強に関与する重要な成分であるとともに、もろみ中の乳酸菌など夾雑微生物は醸造現場での環境管理の問題に直結することから⁷⁷⁾、泡盛醸造においても、4-VG生成がこれら夾雑微生物の影響を受けるかどうかについて検討することは重要である。以上のことから、泡盛もろみにおけるフェルラ酸から4-VGへの変換について、乳酸菌の影響を検討した。

4-2-2 材料と方法

1) 泡盛酒造所のもろみおよび蒸留液の試料

泡盛もろみ及び蒸留液は、沖縄県内の4酒造所(a, b, c, d)から採取した。

2) もろみ生酸菌の分離及び数の測定

もろみ0.5 gに4.5 mlリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を加え30秒間振り混ぜた。その後 10^{-1} から 10^{-5} まで段階希釈し、0.5%炭酸カルシウム含有MRS寒天培地(DIFCO)を用いて混釈培養を行った。嫌気条件下で30°C、24時間培養し、ハローを形成したコロニーを生酸菌と判断して分離した。もろみに含まれる生酸菌は、ハローを形成したコロニー数より算出した。

3) フェルラ酸及び4-VG、バニリンの定量

試料を0.45 µm再生セルロース製シリンジフィルター(トムシック)にてろ過し、高速液体クロマトグラフィーLC-20A(島津製作所)を用いて定量した。カ

ラムは Cosmosil 5-C18-MS-II (4.6 mm I.D.×250 mm、ナカライテスク) を 40°C で用いた。分離は、1.0 ml/min で 48%メタノール (0.5%ギ酸含有) にて 3 分間アイソクラティック分析後、0.5 分間で 75%メタノール (0.5%ギ酸含有) に上昇させ 2 分間維持する条件で行い、フォトダイオードアレイ検出器 SPD-M20A (島津製作所) で検出した。各成分は標準品の保持時間と UV スペクトルの比較で同定し、各標準品で作製した検量線により定量した。

4) 生酸菌によるフェルラ酸から 4-VG への変換試験

MRS 培地で 1-2 日間前培養した生酸菌 50 µl をフェルラ酸を 70 µg/ml 含む MRS 培地 2 ml に植菌し、30°C で 48 時間培養を行い、各香気成分の測定を行った。*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007、*Lactiplantibacillus plantarum* NBRC 15891 は (独) 製品評価技術基盤機構からの分譲株を用いた。

5) 生酸菌のゲノム DNA 抽出及び 16S rDNA 部分配列の解析

泡盛もろみから分離した生酸菌は、MRS 培地で 1-2 日間培養後に集菌し、ISOPLANT II (ニッポンジーン) を用いてゲノム DNA を抽出した。この DNA をテンプレートとして、TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) 及びプライマー M27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、520R (5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3') を用いて、98°C で 10 秒、54°C で 30 秒、72°C で 30 秒の反応を 28 サイクル行い、16S rDNA の部分配列の増幅を行った。PCR 産物は、2%のアガロースゲルで確認し、AMPure XP (Beckman Coulter) で精製後、ユーロフィンジェノミクス社にシーケンス解析を依頼した。得られた塩基配列は、BLAST による相同性解析を行い、最も相同性が高い種をその菌株の推定種とした。一方、*Bacillus* 属については、相同性が同程度高い種が複数見出され種の推定が困難であったことから *Bacillus. sp.* とした。

6) 製麴、小仕込み試験

原料米 (タイ米) を 30 分間浸漬処理し、蒸し器で 30 分間、2 回蒸煮した。種麴は石川種麴店の種麴から分離した株 (アワモリ株、サイトイ株) を 1:1 の比で混合して用い、種付けから 27 時間まで 36°C、その後 42 時間まで温度 34°C、加湿条件下で製麴した。麴 50 g、汲水歩合 170%、前培養した 101 株を用いて 25°C でもろみ発酵を行い、エタノール濃度はアルコメイト AL-3 (ウッドソン) を用いて測定した。もろみの蒸留は、ガラス製蒸留器具を用い、

末垂れエタノール濃度は 10%とした。

もろみと蒸留液の 4-VG 濃度の関係性評価については、14 日間の発酵を行ったもろみをを分取し、もろみでの濃度が 0.3 (未添加)、5、10、20、40 $\mu\text{g/ml}$ となるよう 4-VG (和光純薬工業) を添加した。これらを蒸留し、もろみと蒸留液の 4-VG 濃度を HPLC にて定量した。

4-2-3 結果と考察

1) 泡盛もろみに含まれる生酸菌数、およびフェルラ酸、4-VG 濃度

泡盛酒造所より発酵中のもろみ試料を採取し、含まれる生酸菌数の変化を調べた (図 40)。その結果、生酸菌は発酵初期に多い傾向にあること、また、生酸菌数が極めて低レベルで推移する酒造所があることなどがわかった。これらの結果は、これまでの報告とほぼ一致した⁷⁹⁾。

これらのもろみのフェルラ酸濃度は、発酵初期は急激に、その後一部の酒造所 (a, c) では緩やかに上昇した (図 41A)。4-VG 濃度は発酵初期に上昇後 4 日以降はほぼ一定で、最終濃度は酒造所間で 3~14 $\mu\text{g/ml}$ と大きな違いがあることがわかった (図 41B)。また、蒸留液の 4-VG 濃度を分析したところ、もろみの 4-VG 濃度と泡盛の 4-VG 濃度には、強い正の相関関係が確認された (図 41C)。一方、蒸留前のもろみに 4-VG を段階的に添加したもろみのモデルを調整しそれぞれ蒸留したところ、もろみの 4-VG 濃度と泡盛の 4-VG 濃度には直線的な関係が確認された (図 41D)。以上の結果から、もろみに含まれる 4-VG 濃度は泡盛の 4-VG 濃度に直接影響していることがわかった。

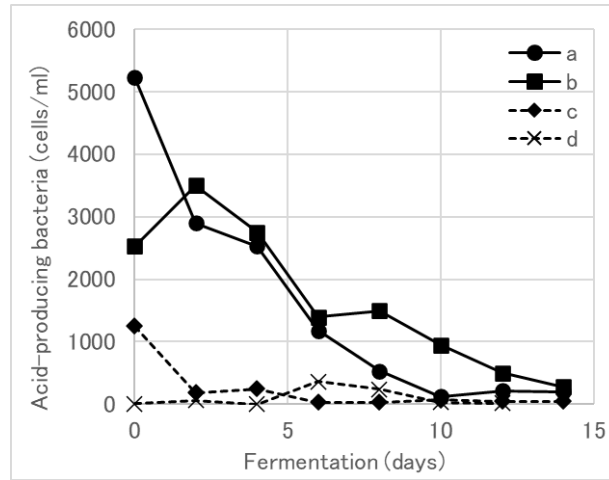


図 40 泡盛もろみに含まれる生酸菌数の推移
(a~d はそれぞれ泡盛酒造所を示す)

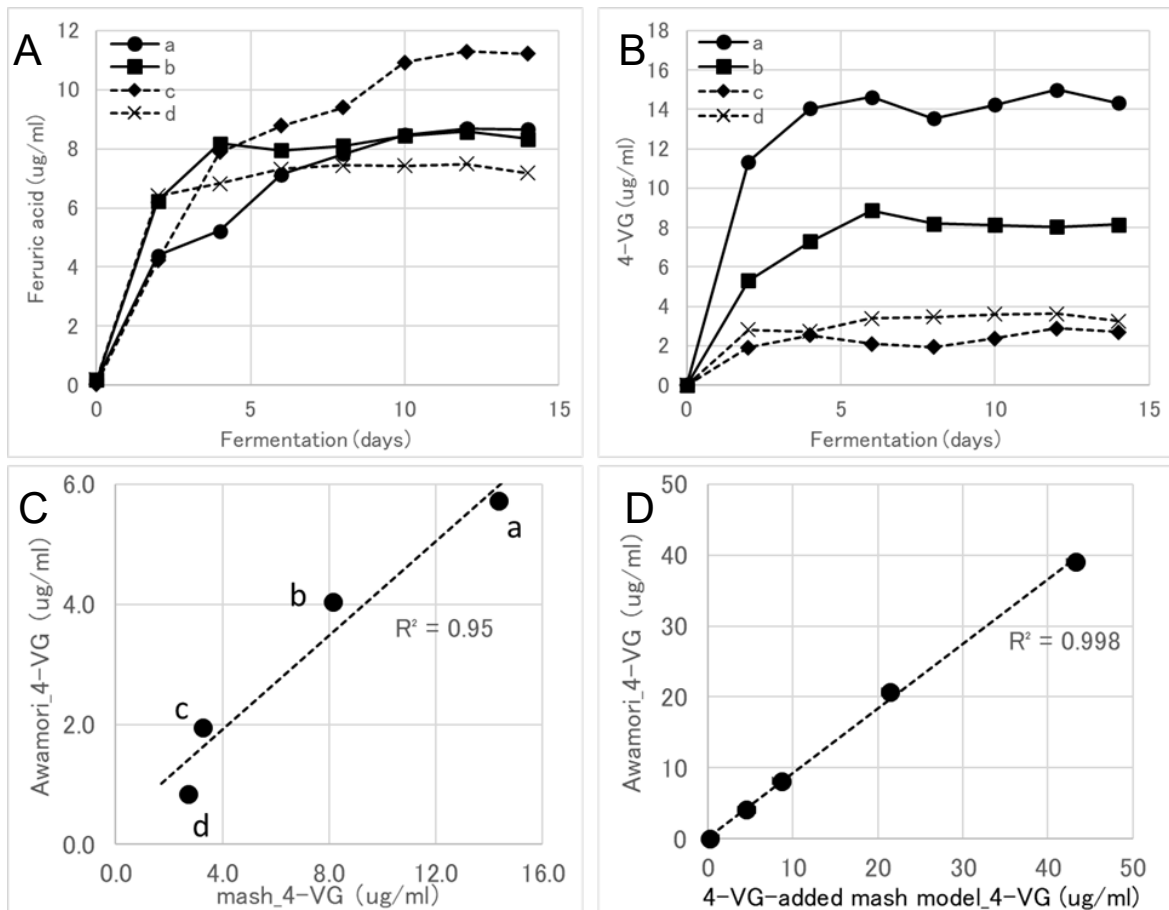


図 41 泡盛もろみ中のフェルラ酸と 4-VG の推移

(A-C) 泡盛醸造所試料のデータ、(A) フェルラ酸濃度、(B) 4-VG 濃度、(C) もろみと泡盛の 4-VG 濃度比、(D) 泡盛に異なる 4-VG 濃度で添加したもろみモデルでのもろみと泡盛の 4-VG 濃度比。泡盛の 4-VG 濃度はアルコール度数 30%の換算値。(a~d はそれぞれ泡盛酒造所を示す)

2) 泡盛もろみに含まれる生酸菌の同定

得られた生酸菌 78 株について 16S rDNA の配列により同定を行った。その結果、これらの生酸菌は 10 グループに分けられ、*Lactobacillus* 属とともに、*Lactococcus lactis*、*Leuconostoc citreum*、*Propionibacterium acidipropionici* などの種と推定された (表 11)。これまでに、焼酎を含め、酒類の発酵液中からは複数の生酸菌が報告されており、*Lactobacillus* 属が多く、*Leuconostoc* 属、*Pediococcus* 属などの存在が示されている^{79)・84)}。

今回、泡盛もろみにおいても、他の酒類と同様に *Lactobacillus* 属の他、様々な生酸菌が生きた状態で存在することが確認された。酒造所ごとに検出された種を見ると、今回の解析では、全ての酒造所で共通した種は見い出されず、酒造所ごとに菌叢が異なるという結果が得られた (表 11)。今回の4酒造所の試料で用いられている原料米および黒麹菌は同一であったことから、共通の乳酸菌が見い出されなかった理由として、これら原料のロットによる差異がある、あるいは酒造所での混入に起因しているなどの可能性が考えられた。

表 11 泡盛もろみから分離された生酸菌の推定種とそのフェルラ酸資化活性
数字は分離株数を示す。(a~d はそれぞれ泡盛酒造所を示す)

Species	Brewery				FA to 4-VG	FA to DFA
	a	b	c	d		
<i>Bacillus</i> sp. 1	-	3	7	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. 2	-	2	1	-	+	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	1	3	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	2	7	-	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	6	-	10	-	-
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	8	1	-	8	-	+
<i>Lactococcus lactis</i>	2	-	-	2	+	-
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	-	-	-	1	-	-
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	-	-	9	2	+	-

3) 泡盛もろみに含まれる生酸菌のフェルラ酸変換活性の評価

分離した全ての生酸菌について、フェルラ酸を添加した培地で培養を行い、培養前後の HPLC での分析結果を比較することで、フェルラ酸から 4-VG への変換活性を有するかどうか検討した (表 11)。その結果、*Bacillus* sp. 2、*Lactococcus lactis*、*Staphylococcus gallinarum* に分類された株におい

て、顕著なフェルラ酸のピークの減少および 4-VG のピークの増加が確認され、フェルラ酸から 4-VG への変換活性を有すると考えられた。それぞれの菌種におけるフェルラ酸から 4-VG への変換活性はいずれの株も高く、今回の評価方法では、その強さに大きな差は見られなかった。また、今回、推定した種名が同じ生酸菌はフェルラ酸から 4-VG への変換活性の有無に違いは見られなかった。

次に、これらのうち、食品製造への応用を考慮して米国食品医薬品局 (FDA) より食品添加物に与えられる安全基準合格証 GRAS に含まれ安全性が高い種と判断できる *Lactococcus lactis* に注目した。標準株である *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007 について、同様に活性を評価したところ、フェルラ酸から 4-VG への変換活性が確認された (図 42)。従って、フェルラ酸から 4-VG への変換活性は *L. lactis* が広く保有する特性と考えられた。

一方、*Lactiplantibacillus plantarum* に分類された株では、フェルラ酸の減少とともに 4-VG 以外の物質の増加が観察された。乳酸菌は、フェルラ酸などのフェノール酸を様々な物質に代謝することが知られており⁸³⁾、*L. plantarum* についてはフェルラ酸からジヒドロフェルラ酸 (dihydroferulic acid; DFA) を生成することが報告されている⁸⁵⁾。このことから、DFA の標準

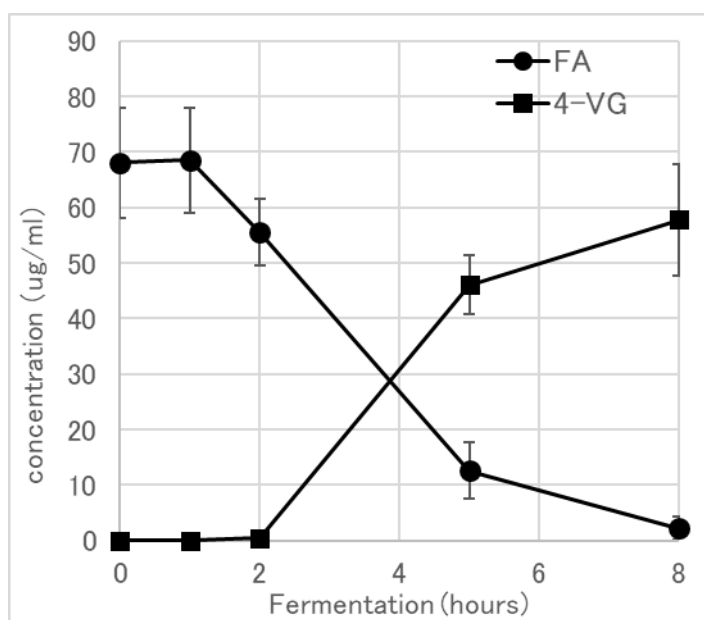


図 42 *L. lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007 の MRS 培地におけるフェルラ酸から 4-VG への変換活性値は 3 回の独立した実験の平均と標準偏差で示す。

品を用いて HPLC による保持時間と UV スペクトルから判断したところ、増加した成分は DFA であると考えられた (表 11)。さらに、標準株である *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBRC 15891 を用いて、フェルラ酸を添加した培地で培養を行い、培養前後の HPLC での分析結果を比較したところ、顕著なフェルラ酸のピークの減少および DFA のピークの増加が確認された。従って、フェルラ酸から DFA への変換活性は *L. plantarum* が広く保有する特性と考えられた。一方、泡盛もろみに約 100 µg/ml の DFA (もろみのフェルラ酸濃度の約 10 倍) を添加し蒸留したところ、蒸留液で DFA は検出されなかったことから (検出限界 0.5 µg/ml)、もろみに含まれる DFA は蒸留液に移行せず、泡盛は DFA を含有しないと考えられた。

4) 小仕込み試験による乳酸菌の影響の解析

泡盛もろみでのフェルラ酸から 4-VG 変換に対する乳酸菌の影響を検討するため、実験室規模での小仕込み試験を行った。仕込時に、*L. lactis* K2、あるいは *L. plantarum* K34 を 1×10^5 cells/ml となるように添加し、発酵試験を行った。その結果、発酵過程のエタノール濃度は、いずれも 2 日経過以降で上昇し、これらの乳酸菌の添加による大きな差異は見られなかった (図 43A)。乳酸菌数は、2 日経過以降で急激に低下し、5 日後以降ではいずれの株も検出されなかった (図 43B)。このことから、添加した乳酸菌は、エタノール濃度の上昇に伴い死滅したと考えられた。フェルラ酸濃度は、K2 株では添加無しと比較して約半分、K34 株では 8 割程度で推移し、4-VG 濃度は、K2 株では添加無しと比較して約 2 倍、K34 株では半分以下の値で推移し、それぞれの乳酸菌のフェルラ酸に対する特性が泡盛もろみにおいても確認された (図 43C、43D)。一方、K2 株での 4-VG 濃度は発酵後半で減少傾向が観察された (図 43D)。実際の泡盛醸造ではこのような減少は見られないこと (図 41B) から、過剰な乳酸菌の存在やスケールの規模など小仕込み試験固有の条件の違いが影響していることが考えられた。また、これらのもろみを蒸留し、泡盛の 4-VG 濃度を評価したところ、K2 株では無添加の約 1.6 倍、K34 株では半分以下であり、乳酸菌の影響が泡盛においても確認された (図 43E)。

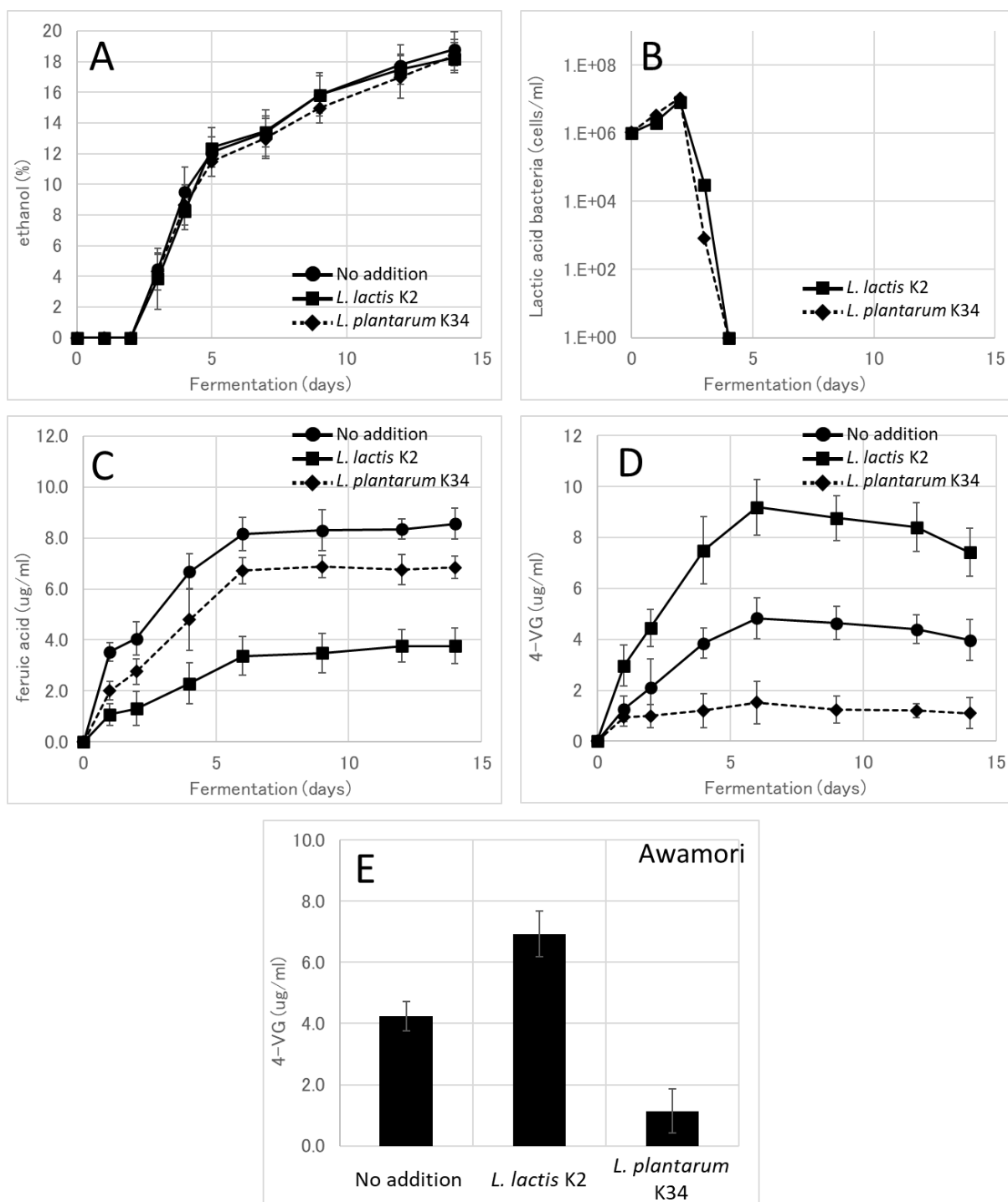


図 43 泡盛小仕込試験での乳酸菌の添加によるもろみへの影響
 (A-D)もろみの結果、(A)エタノール濃度、(B)乳酸菌数、(C)フェルラ酸濃度、(D)4-VG 濃度、(E)泡盛の 4-VG 濃度。
 泡盛の 4-VG 値は、アルコール度数 30%換算値。
 値は 3 回の独立した実験の平均と標準偏差で示す。

以上の結果から、もろみ中の乳酸菌は、*Lactococcus lactis* など 4-VG 濃度を上昇させる方向に作用する菌と、*Lactiplantibacillus plantarum* のようにフェルラ酸を 4-VG 以外の物質に変換し、結果として 4-VG 濃度上昇の抑制に作用する菌の存在が確認され、それぞれ泡盛のバニリン濃度に影響を及ぼしていることが強く示唆された (図 44)。また、*Lactococcus lactis* については、エタノール濃度への影響はほとんど見られず 4-VG 濃度を上昇できることから、泡盛もろみの 4-VG 濃度を高める新たな醸造技術として活用が期待できると考えられた。

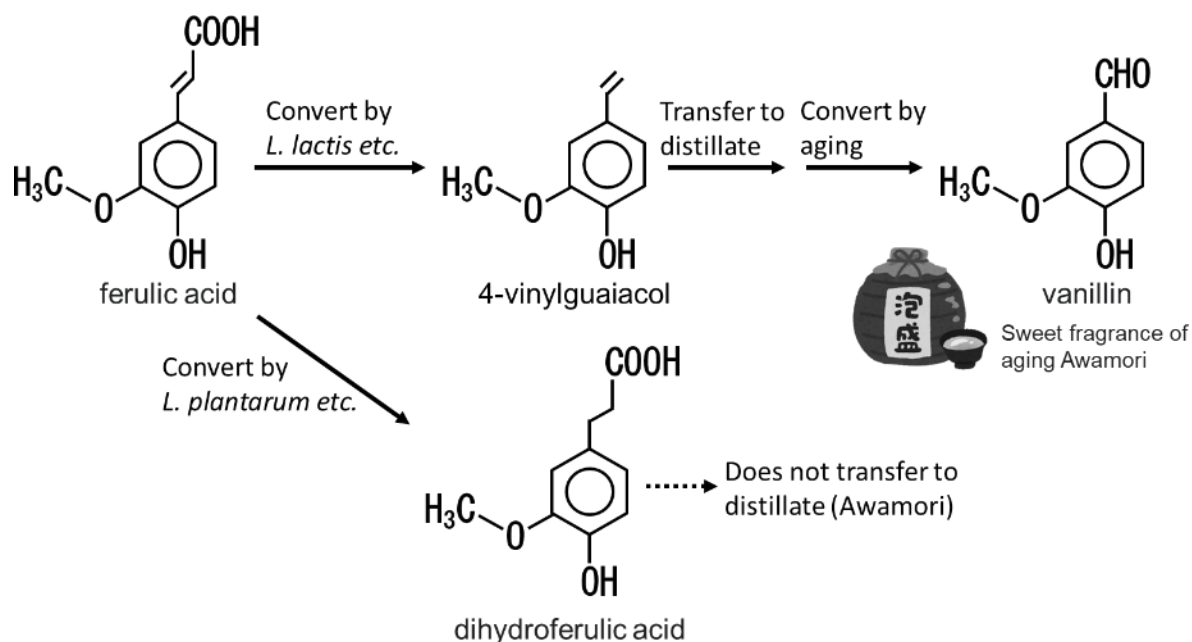


図 44 泡盛もろみ乳酸菌がバニリン生成に及ぼす影響

総括

泡盛は、日本の國酒の1つで、約600年の歴史を有する日本最古の蒸留酒である。この泡盛は、第2次世界大戦の沖縄での地上戦により、人的被害とともに、醸造のノウハウや歴史的記録、さらには醸造微生物についても多くが消失したという歴史的経緯などの影響から、泡盛醸造に関する基盤研究や、新たな泡盛醸造につながる応用研究は、他の酒類と比較して極めて少ない。本研究では、泡盛酵母における香気成分の生成について生化学的な知見を得るとともに、泡盛で重要な古酒香成分のバニリンおよび吟醸香成分の酢酸イソアミルに注目した新たな泡盛酵母の開発に取り組んだ。また、得られた技術を黒麹菌やもろみ乳酸菌の研究に応用し、泡盛醸造全体の理解を深めた。

第1章では、唯一の汎用泡盛酵母である101株を対象として全ゲノム情報を得るとともに、その詳細な系統を解析し、101株が清酒酵母グループであることを明らかにした。これらの成果は、泡盛酵母の歴史を理解する上で極めて重要であり、また酵母を対象とした泡盛風味のバラエティー化のための基盤情報として活用できることを示した。さらに、本研究で用いた全ゲノム情報を用いた詳細な系統解析方法は、*S. cerevisiae*の種内の詳細な系統解析に有用であることを示した。さらに、101株を親株として育種した18-T55株は、L-ロイシンによるLeu4へのフィードバック阻害の抑制を介して酢酸イソアミルを高生産すること、その機構はLeu4のSer542PheおよびAla551Valのアミノ酸置換によるものであることを見出した。本研究は、泡盛酵母を対象として酢酸イソアミルを過剰生産する変異株を取得した最初の研究である。

第2章では、沖縄の自然界から新たな酵母の分離を試み、ハイビスカス酵母HC02-5-2株を取得した。また、本菌株の詳細な系統解析により、泡盛酵母101株が属する清酒酵母グループとは異なり、ワイン酵母グループであることが判明するとともに、古酒香成分バニリンの前駆体4-VGを高生産することを見出し、新たな風味の泡盛醸造に有用な株であることを確認した。一方、HC02-5-2株は吟醸香成分酢酸イソアミルの生産能が低かったことから、育種により酢酸イソアミルを高生産するT25株を取得した。さらにT25株は、Leu4のGly516Ser置換により酢酸イソアミルが高生産することを明らかにした。本研究により、沖縄の自然界からワイン酵母系のハイビスカス酵母を新たに取得し、古酒香成分バニリンの前駆体である4-VGおよび吟醸香成分酢酸イソアミルを共に高生産する新たな泡盛酵母T25株を育種することができた。

第 3 章では、沖縄の自然界から新たに島バナナ酵母 35a14 株を分離し、詳細な系統解析により、清酒酵母やワイン酵母など従来の商用酵母グループとは異なる系統であり、沖縄固有の系統と考えられる株であることを確認するとともに、4-VG を高生産することを見出した。一方、35a14 株は酢酸イソアミルの生産能が低かったことから、育種により酢酸イソアミルを高生産する BNNL80 株を取得し、Leu4 の Asp578Asn 置換が酢酸イソアミル高生産に寄与していることを明らかにした。本研究により、沖縄の自然界から沖縄固有の系統と考えられる島バナナ酵母を取得し、4-VG および酢酸イソアミルを共に高生産する BNNL80 株を育種することができた。

第 4 章では、全ゲノム情報を用いた詳細な系統解析方法により、黒麹菌の詳細な系統解析を行うことで、これまで関係性が不明であった泡盛黒麹菌を含む近縁種の詳細な系統関係を明らかにした。本研究の成果は、泡盛醸造における黒麹菌の歴史の解明や、新たな泡盛黒麹菌の開発につながる重要な成果であることを示した。

また、泡盛もろみには泡盛の古酒香成分バニリンの前駆体である 4-VG 濃度を上昇あるいは下降させる乳酸菌が存在することを見出し、これらの乳酸菌を実際に泡盛もろみに添加することで泡盛の 4-VG 濃度を制御することが可能であることを示した。本研究は、泡盛もろみの常在微生物が泡盛の風味に直接影響することを示した初めての例であるとともに、古酒香成分バニリンの前駆体である 4-VG 濃度を高めることが可能な新たな泡盛醸造技術として応用し得ることを示した。

本研究により、酵母 *S.cerevisiae* の Leu4 について、L-ロイシンおよび酢酸イソアミル高生産に寄与する新たなアミノ酸置換を複数見出し、その詳細なメカニズムを解析することができた。また、これらは新たな風味の泡盛酵母として商業的に有用であり、実際の泡盛醸造に応用することができた。さらに、本研究で得られた技術により、泡盛黒麹菌の多くの株の系統関係を明らかにするとともに、泡盛もろみの乳酸菌が泡盛風味に影響することを見出した。これらの成果は、酵母や他の微生物の学術的な理解を深めるものであるとともに、泡盛を含む発酵産業の振興にさらに貢献することが期待できる。

謝辞

本研究は、多くの企業、大学、研究機関のご指導およびご助力をいただきました。特に、本研究の全体を長年に渡りご指導をいただくとともに、主査をお引き受けいただきました奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 バイオサイエンス領域ストレス微生物科学研究室の高木博史教授に深謝いたします。また、副査を引き受けていただき有益なご助言とご指導を賜りました同大学同研究科同領域バイオエンジニアリング研究室の加藤晃教授、および同大学同研究科同領域ストレス微生物科学研究室の渡辺大輔准教授に厚く御礼申し上げます。また、同大学同研究科同領域ストレス微生物科学研究室の皆様、多くのご指導、ご協力をいただきましたこと厚くお礼申し上げます。

泡盛醸造技術の研究に関して、琉球大学農学部亜熱帯生物資源科学科の外山博英教授、水谷治准教授、平良東紀教授、沖縄工業高等専門学校玉城康智教授、およびそれぞれの研究室の皆様にも多大なるご指導、ご協力をいただきました。厚くお礼申し上げます。

微生物解析や次世代シーケンサーの活用に関して、産業技術総合研究所生物プロセス研究部門生物システム研究グループの藤森一浩主任研究員、および研究室の皆様には大変お世話になりました。厚くお礼申し上げます。

また、泡盛業界および醸造現場から様々なご指導とともに、得られた研究成果の社会実装に対して、有限会社神村酒造、神谷酒造所、新里酒造株式会社、有限会社比嘉酒造、沖縄県酒造組合、沖縄県酒造協同組合、協同組合古酒の郷および関係者の皆様にも、様々なご協力をいただきました。熱くお礼申し上げます。

最後に、本研究にご協力いただいた株式会社バイオジェットの過去および現在の研究員、およびこれまでの活動を支えてくれた家族に御礼および感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 佐藤宣之 (2013), 「國酒プロジェクト」に端を発した政府の取り組みについて, 日本醸造協会誌, 108 (10), 700-706.
- 2) 国税庁: 酒税の保全及び酒類業組合等に関する法律施行規則 第十一条の五 (昭和二十八年三月六日大蔵省令第十一号).
- 3) 国税庁 (2016), 酒のしおり (平成 28 年 3 月)
<http://www.nta.go.jp/shiraberu/senmonjoho/sake/shiori-gaikyo/shiori/2016/index.htm>
- 4) 玉城 武 (2001), 発酵ハンドブック, 576, 共立出版.
- 5) 玉城武, 忍頂寺晃嗣, 今村利久, 原田哲夫 (1981), 優良な泡盛酵母の分離選抜, 日本醸造協会誌, 76(1), 59-62.
- 6) 玉城武, 忍頂寺晃嗣, 高江洲朝清, 下地博, 玉那覇勉 (1981), 泡盛 1 号酵母の形態学的, 生理学的諸性質, 日本醸造協会誌, 76 (3), 59-62.
- 7) 新里修一, 宮城剛, 高江洲朝清, 丸山新次 (1989), 泡盛 1 号酵母から分離した泡なし酵母の性質について, 日本醸造協会誌, 84 (1), 121-123.
- 8) Yukio Osafune, Kenji Toshida, Jinshun Han, Atsuko Isogai, Nobuhiko Mukai (2020), Characterisation and threshold measurement of aroma compounds contributing to the quality of Honkaku shochu and Awamori, *J. Inst. Brew.*, 126, 131-13.
- 9) 福田央, 韓錦順, 山田修 (2017), 本格焼酎鑑評会出品酒の使用麹による揮発性成分の比較検討, 日本醸造協会誌, 112, 343-349.
- 10) 長船行雄, 利田賢次, 韓錦順, 磯谷敦子, 向井伸彦 (2021), 本格焼酎・泡盛の官能評価における標準見本の策定に向けた香り成分の閾値調査及び分類, 日本醸造協会誌, 116, 279-289.
- 11) Vijay R. Baichwal, Thomas S. Cunningham, Paula R. Gatzek, Gunter B. Kohlhaw (1983), Leucine biosynthesis in yeast, *Curr. Genet.*, 7, 369-377.
- 12) 小関卓也, 岩野君夫 (1998), 泡盛中のバニリンの意義と生成機構, 日本醸造協会誌, 93 (7), 510-517.
- 13) Takashi Shinohara, Shinsi Kubodera, Fujitoshi Yanagida (2000), Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in

- wine fermentation, *J. Biosci. Bioeng.*, 90 (1), 90-97.
- 14) S. van Beek and F. Priest (2000), Decarboxylation of Substituted Cinnamic Acids by Lactic Acid Bacteria Isolated during Malt Whisky Fermentation, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (12), 5322-5328.
 - 15) 向井伸彦, 岡田明彦, 鈴木昭紀, 高橋利郎 (1998), ビール酵母とその他の醸造用酵母のビール醸造特性, 日本醸造協会誌, 93 (12), 967-975.
 - 16) 金桶光起 (2014), 清酒中の 4-ビニルグアイアコール生成要因, 日本醸造協会誌, 109 (5), 320-326.
 - 17) 向井伸彦, 木曾邦明, 家藤治幸 (2005), 4-ビニルグアイアコール含有量を高めた焼酎の製造, 日本醸造協会誌, 100 (11), 832-835.
 - 18) Mayumi Maeda, Marin Motosoko, Tatsunori Tokashiki, Jikian Tokashiki, Osamu Mizutani, Keiko Uechi, Masatoshi Goto, Toki Taira (2020), Phenolic acid decarboxylase of *Aspergillus luchuensis* plays a crucial role in 4-vinylguaiacol production during *awamori* brewing, *J. Biosci. Bioeng.*, 130 (4), 352-359.
 - 19) Takayuki Abe, Yoichi Toyokawa, Yukiko Sugimoto, Haruna Azuma, Keiko Tsukahara, Ryo Nasuno, Daisuke Watanabe, Masatoshi Tsukahara and Hiroshi Takagi (2019), Characterization of a new *Saccharomyces cerevisiae* isolated from hibiscus flower and its mutant with L-leucine accumulation for *awamori* brewing, *Front. Genet.*, 10, 490.
 - 20) https://github.com/BiojetCoLtd/GW_to_phylogeny
 - 21) <https://www.megasoftware.net/>
 - 22) Masatoshi Tsukahara, Kotaro Ise, Maiko Nezu, Haruna Azuma, Takeshi Akao and Hirohide Toyama (2021), Draft genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae* strain *awamori* number 101, commonly used to make *awamori*, a traditional spirit, in Okinawa, Japan, *Microbiol. Resour. Announc.*, 10 (25): DOI:10.1128/MRA.01414-20.
 - 23) Justin C Fay, Joseph A Benavides (2005), Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 1, 0066-0071. doi:10.1371/journal.pgen.0010005.
 - 24) Taiki Futagami, Chihiro Kadooka, Yoshinori Ando, Kayu Okutsu, Yumiko Yoshizaki, Shinji Setoguchi, Kazunori Takamine, Mikihiko Kawai, Hisanori Tamaki (2017), Multi-gene phylogenetic analysis

reveals that shochu-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains form a distinct sub-clade of the Japanese sake cluster. *Yeast* 34, 407–415. doi:10.1002/yea.3243.

- 25) Gianni Liti, David M. Carter, Alan M. Moses, Jonas Warringer, Leopold Parts, Stephen A. James, Robert P. Davey, Ian N. Roberts, Austin Burt, Vassiliki Koufopanou, Isheng J. Tsai, Casey M. Bergman, Douada Bensasson, Michael J. T. O’Kelly, Alexander van Oudenaarden, David B. H. Barton, Elizabeth Bailes, Alex N. Nguyen, Matthew Jones, Michael A. Quail, Ian Goodhead, Sarah Sims, Frances Smith, Anders Blomberg, Richard Durbin & Edward J. Louis (2009), Population genomics of domestic and wild yeasts, *Nature*, 458, 337–341.
- 26) Hiroshi Takagi, Keisuke Hashida, Daisuke Watanabe, Ryo Nasuno, Masataka Ohashi, Tomoya Iha, Maiko Nezu and Masatoshi Tsukahara (2015), Isolation and characterization of awamori yeast mutants with L-leucine accumulation that overproduce isoamyl alcohol, *J. Biosci. Bioeng.*, 119, 140-147.
- 27) 堤浩子(2011), 清酒酵母の香気生成の研究, 生物工程, 89, 717
- 28) 小金丸和義, 墨利久, 神田康三, 加藤富民雄, 田代康介, 久原哲 (2003), β -フェネチルアルコール高生産清酒酵母の分離とその生成機構, 日本醸造協会誌, 98, 201-209.
- 29) 武藤貴史, 稲橋正明, 万膳博幸, 木崎康造, 岡崎直人, 石川雄章, 佐藤和夫, 赤尾健 (2016), カプロン酸エチル高生成焼酎酵母の育種および実用化に関する研究 (第 1 報) カプロン酸エチル高生成焼酎酵母の育種, 日本醸造協会誌, 111, 556-562.
- 30) Kjeld Olesen, Pia Franke Johannesen, Lise Hoffmann, Steen Bech Sørensen, Claes Gjermansen, Jørgen Hansen (2000), The pYC plasmids, a series of cassette-based yeast plasmid vectors providing means of counter-selection, *Yeast*, 16, 1035-1043.
- 31) Jun-ichi Nikawa, Masako Yata, Miki Motomura, Nobutaka Miyoshi, Tsuyoshi Ueda, Daisuke Hisada (2006), Ternary complex formation of Ino2p-Ino4p transcription factors and Apl2p adaptin β subunit in yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2604-2612.
- 32) Joseph Sambrook, David Russell (2001), “Molecular Cloning: a Laboratory Manual”, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- 33) Mark D. Rose, James R. Broach (1991), Cloning genes by complementation in yeast, *Methods Enzymol.*, 194, 195-230.
- 34) E H Ulm, R Böhme, G Kohlhaw, G. (1972), Alpha-Isopropylmalate synthase from yeast: purification, kinetic studies, and effect of ligands on stability, *J. Bacteriol.*, 110, 1118-1126.
- 35) Konstantin Arnold, Lorenza Bordoli, Jürgen Kopp, Torsten Schwede (2006), The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22, 195-201.
- 36) Florian Kiefer, Konstantin Arnold, Michael Künzli, Lorenza Bordoli, Torsten Schwede (2009), The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nuc. Acids Res.*, 37, D387-D392.
- 37) Nicolas Guex, Manuel C Peitsch, Torsten Schwede (2009), SWISS-MODEL and Swiss PdbViewer. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*, 30(suppl.1), S162-S173.
- 38) V R Baichwal, T S Cunningham, P R Gatzek, G B Kohlhaw: Leucine biosynthesis in yeast (1983), Identification of two genes (*LEU4*, *LEU5*) that affect α -isopropylmalate synthase activity and evidence that *LEU1* and *LEU2* gene expression is controlled by α -isopropylmalate and the product of a regulatory gene. *Curr. Genet.*, 7, 369-377.
- 39) Takahiro Oba, Shuji Nomiya, Hideki Hirakawa, Kosuke Tashiro, Satoru Kuhara (2005), Asp578 in LEU4p is one of the key residues for leucine feedback inhibition release in sake yeast, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 1270-1273.
- 40) Shinzo Ashida, Eiji Ichikawa, Koji Suginami, Satoshi Imayasu (1987), Isolation and application of mutants producing sufficient isoamyl acetate, as sake flavor component, *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2061-2065.
- 41) D. Cavalieri, E. Casalone, B. Bendoni, G. Fia, M. Polsinelli, C Barberio (1999), Trifluoroleucine resistance and regulation of alpha-isopropyl malate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 261, 152-160.
- 42) Nayden Koon, Christopher J Squire, Edward N Baker (2004), Crystal structure of LeuA from *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme in leucine biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 8295-8300.

- 43) Tadao Asano, Takayuki Inoue, Naotaka Kurose, Nobutsugu Hiraoka, Sadao Kawakita (1999), Improvement of isoamyl acetate productivity in sake yeast by isolating mutants resistant to econazole. *J. Biosci. Bioeng.*, 87, 697-699.
- 44) Akihiro Hino: Safety assessment and public concerns for genetically modified food products (2002), the Japanese experience. *Toxicol Pathol.*, 30, 126-128.
- 45) Sudhir Kumar, Glen Stecher, Michael Li, Christina Knyaz, Koichiro Tamura (2018), MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549.
- 46) Takuya Koseki, Yasuro Ito, Shinji Furuse, Kiyoshi Ito, Kimio Iwano (1996), Conversion of ferulic acid into 4-vinylguaiacol, vanillin and vanillic acid in model solutions of shochu. *J. Ferment. Bioeng.* 82, 46–50.
- 47) Takuya Koseki, Shinji Furuse, Kimio Iwano, Hiroshi Matsuzawa (1998), Purification and characterization of a feruloyl esterase from *Aspergillus awamori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 2032–2034.
- 48) Mayumi Maeda, Masashi Tokashiki, Midori Tokashiki, Keiko Uechi, Susumu Ito, Toki Taira (2018), Characterization and induction of phenolic acid decarboxylase from *Aspergillus luchuensis*. *J. Biosci. Bioeng.* 126, 162–168.
- 49) Nobuhiko Mukai, Kazuo Masaki, Tsutomu Fujii, Makoto Kawamukai, Haruyuki Iefuji (2010), *PAD1* and *FDC1* are essential for the decarboxylation of phenylacrylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 109, 564–569.
- 50) Nobuhiko Mukai, Kazuo Masaki, Tsutomu Fujii, Haruyuki Iefuji (2014), Single nucleotide polymorphisms of *PAD1* and *FDC1* show a positive relationship with ferulic acid decarboxylation ability among industrial yeasts used in alcoholic beverage production. *J. Biosci. Bioeng.* 118, 50–55.
- 51) Kazutaka Shimbo, Takashi Oonuki, Akihisa Yahashi, Kazuo Hirayama, Hiroshi Miyano (2009), Precolumn derivatization reagents for high-speed analysis of amines and amino acids in biological fluid using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 1483–1492.

- 52) Makoto Kanauchi (2012), “Characteristics and role of feruloyl esterase from *Aspergillus awamori* in Japanese spirits, ‘Awamori’ production”, *Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry* (InTech), 145–162.
- 53) Yukihiro Arikawa, Masato Yamada, Makoto Shimosaka, Mitsuo Okazaki, Mikio Fukuzawa (2000), Isolation of sake yeast mutants producing a high level of ethyl caproate and/or isoamyl acetate. *J. Biosci. Bioeng.* 90, 675–677.
- 54) Toshinari Takahashi, Yusuke Ohara, Kazuo Sueno (2017), Breeding of a sake yeast mutant with enhanced ethyl caproate productivity in sake brewing using rice milled at a high polishing ratio. *J. Biosci. Bioeng.* 123, 707–713.
- 55) F. Messenguy, D. Colin, J. P. ten Have (1980), Regulation of compartmentation of amino acid pools in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on metabolic control. *Eur. J. Biochem.* 108, 439–447.
- 56) T. G. Watson (1976), Amino-acid pool composition of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of growth rate and amino-acid nitrogen source. *J. Gen. Microbiol.* 96, 263–268.
- 57) Gunter B Kohlhaw: Leucine biosynthesis in fungi (2003), entering metabolism through the back door. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 1–15, table of contents.
- 58) Masatoshi Tsukahara, Shota Isogai, Haruna Azuma, Keiko Tsukahara, Yoichi Toyokawa and Hiroshi Takagi (2022), Characterization of a new *Saccharomyces cerevisiae* isolated from banana stems and its mutant with L-leucine accumulation for awamori brewing. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 87, 240–244
- 59) Souhir Marsit, Jean-Baptiste Leducq, Éléonore Durand, Axelle Marchant, Marie Filteau & Christian R. Landry (2017), Evolutionary biology through the lens of budding yeast comparative genomics. *Nature reviews genetics*, 18: 581–98.
- 60) 塚原正俊, 東春奈, 水谷治, 山田修, 外山博英 (2022), 全ゲノム情報を用いた黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の系統解析, 日本醸造協会誌, 117, 413–421.
- 61) 山田修 (2015), 黒麹菌の学名が *Aspergillus luchuensis* になりました, 日本

- 醸造協会誌, 110, 64-67.
- 62) 村上英也編 (1986), 麴学, 財団法人日本醸造協会, 東京, 71-78.
- 63) Ronald P. de Vries, Robert Riley, Ad Wiebenga, Guillermo Aguilar-Osorio, Sotiris Amillis, Cristiane Akemi Uchima, Gregor Anderluh, Mojtaba Asadollahi, Marion Askin, Kerrie Barry, Evy Battaglia, Özgür Bayram, Tiziano Benocci, Susanna A. Braus-Stromeyer, Camila Caldana, David Cánovas, Gustavo C. Cerqueira, Fusheng Chen, Wanping Chen, Cindy Choi, Alicia Clum, Renato Augusto Corrêa dos Santos, André Ricardo de Lima Damásio, George Diallinas, Igor V. Grigoriev (2017), Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*, *Genome Biology*, 18:28, 1.
- 64) Osamu Yamada, Masayuki Machida, Akira Hosoyama, Masatoshi Goto, Toru Takahashi, Taiki Futagami, Youhei Yamagata, Michio Takeuchi, Tetsuo Kobayashi, Hideaki Koike, Keietsu Abe, Kiyoshi Asai, Masanori Arita, Nobuyuki Fujita, Kazuro Fukuda, Ken-Ichi Higa, Hiroshi Horikawa, Takeaki Ishikawa, Koji Jinno, Yumiko Kato, Kohtaro Kirimura, Osamu Mizutani, Kaoru Nakasone, Motoaki Sano, Yohei Shiraishi, Masatoshi Tsukahara, Katsuya Gomi (2016), Genome sequence of *Aspergillus luchuensis* NBRC 4314, *DNA Research*, 23, 507-515.
- 65) 山田修 (2017), 黒麴菌ゲノム情報公開, 日本醸造協会誌, 112, 530-533.
- 66) Seung-Beom Hong, Mina Lee, Dae-Ho Kim, Janos Varga, Jens C. Frisvad, Giancarlo Perrone, Katsuya Gomi, Osamu Yamada, Masayuki Machida, Jos Houbraeken, Robert A. Samson (2013), *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* in East Asia: *PLOS ONE*, 8, e63769.
- 67) Seung-Beom Hong, Osamu Yamada, Robert A. Samson (2014), Taxonomic re-evaluation of black koji molds, *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, 555-561.
- 68) 山田修 (2013), 「琉球」にちなむ黒麴菌の学名 *Aspergillus luchuensis* の復活, バイオサイエンスとインダストリー, 71, 499-503.
- 69) 菅間誠之助, 西谷尚道, 大場俊輝, 河内邦英, 照屋比呂子, 原昌道, 村上英也 (1975), 泡盛麴に関する調査 黒麴菌の分布とその性質, 日本醸造協会誌, 70, 595-598.

- 70) 中澤亮治, 霜三雄, 渡邊寛 (1936), 泡盛醗酵菌の研究(第一報), 農芸化学会誌, 12, 61-104.
- 71) 坂口謹一郎, 飯塚廣, 山崎千二 (1950), 黒麹菌に関する研究(I), 應用菌學, 3, 53-63.
- 72) 坂口謹一郎, 飯塚廣, 山崎千二 (1950), 黒麹菌に関する研究(IV), 應用菌學, 4, 1-13.
- 73) 森貞信 (1935), 泡盛を見る, 日本醸造協会誌, 30, 817-823.
- 74) 塚原正俊, 玉城康智, 東春奈, 久貝樹幹, 外山博英, 泡盛の醸造過程における4-ビニルグアヤコール生成に及ぼす乳酸菌の影響, 日本醸造協会誌, 印刷中.
- 75) Takashi Shinohara, Shinsi Kubodera, Fujitoshi Yanagida (2000), Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation, *J. Biosci. Bioeng.*, 90 (1), 90-97.
- 76) S. van Beek and F. Priest (2000), Decarboxylation of Substituted Cinnamic Acids by Lactic Acid Bacteria Isolated during Malt Whisky Fermentation *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (12), 5322-5328.
- 77) 金桶光起 (2014), 清酒中の4-ビニルグアヤコール生成要因, 日本醸造協会誌, 109 (5), 320-326.
- 78) 向井伸彦, 木曾邦明, 家藤治幸 (2005), 4-ピニルグアヤコール含有量を高めた焼酎の製造, 日本醸造協会誌, 100 (11), 832-835.
- 79) 百瀬洋夫, 内山奈々, 藤倉寛子 (1997), 泡盛もろみ中の乳酸菌, 日本醸造協会誌, 92 (6), 452-457.
- 80) 竹下淳子, 工藤哲三, 山本英樹, 水谷政美, 柏田雅徳 (2004), 焼酎もろみ中の乳酸菌同定, 宮崎県食品開発センター研究報告, 49, 119-125.
- 81) 宮川博士, 鈴木恵利香, 小境敏輝, 河野邦晃, 岩井謙一, 高瀬良和 (2016), 芋焼酎に生息している乳酸菌の単離と酒質に与える影響, 日本醸造協会誌, 111 (6), 405-411.
- 82) 稲橋正明, 戸塚堅二郎, 相良沙奈恵, 田中裕三, 岡崎直人, 石川雄章, 佐藤和夫 (2014), 清酒製造工程及び清酒から分離された乳酸菌(火落菌腐造性乳酸菌)の性質, 日本醸造協会誌, 109 (8), 603-612.
- 83) 遠藤明仁 (2012), 醸造食品に生息する乳酸菌, 日本醸造協会誌, 107 (2), 92-99.
- 84) A. F. Sanchez Maldonado, A. Schieber, M. G. Gänzle (2011), Structure-

function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria, *J. Appl. Microbiol.*, 111, 1176-1184.

- 85) Louise Svensson, Bonno Sekwati-Monang, Daise Lopes Lutz, Andreas Schieber, Michael G Gänzle (2010), Phenolic acids and flavonoids in nonfermented and fermented red sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) moench), *J. Agric. Food Chem.*, 58 (16), 9214-9220.