

2023年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	黒麹菌由来フェノール酸脱炭酸酵素の誘導・発現制御機構の解明
キーワード	①黒麹菌、②フェノール酸脱炭酸酵、③泡盛

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	マエダ マユミ 眞榮田 麻友美
配付時の所属先・職位等 (令和5年4月1日現在)	東京農業大学 応用生物科学部 助教
現在の所属先・職位等	東京農業大学 応用生物科学部 助教
プロフィール	2018年 琉球大学大学院農学研究科 修士課程 修了 2021年 鹿児島大学大学院連合農学研究科 博士課程 修了 現在は東京農業大学応用生物科学部醸造科学科で助教をしています。学生のころから泡盛の製造に使用されている黒麹菌の研究をしており、この研究が沖縄の泡盛業界に役立てる日を目指して日々研究しています。現在は泡盛だけではなく、味噌や醤油についても研究を始めたところです。

1. 研究の概要

泡盛は沖縄の伝統的な蒸留酒であり、3年以上熟成させると芳醇な香りを持つ古酒になる。泡盛古酒の特徴香の1つとしてバニリンが知られている。バニリンは米の細胞壁に含まれているフェルラ酸 (FA) が脱炭酸されてバニリンの前駆体である4-ビニルグアヤコール (4-VG) に変換され、その4-VGが貯蔵中に非酵素的な酸化によってバニリンに変換されることが知られている。我々はこれまでに醸造中のFAから4-VGへの変換が黒麹菌が生産するフェノール酸脱炭酸酵素 (AIPAD) が主要因であることを明らかにしている (図1)。しかし、AIPADの誘導・発現メカニズムについては明らかになっていない。よって、本研究ではAIPADの誘導・発現メカニズムを明らかにするために、米ぬかを構成している糖を用いたAIPADの誘導試験および転写因子破壊ライブラリーを用いて4-VG生成に関連する転写因子の探索を行った。その結果、AIPADは自己消化が起こると発現する可能性が示唆された。

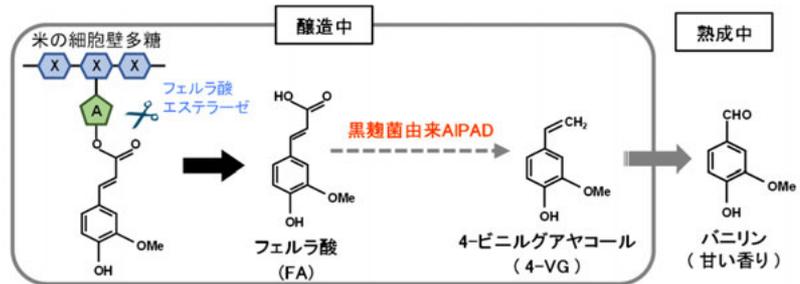


図1. 泡盛古酒の特徴香であるバニリンの生成過程

2. 研究の動機、目的

バニリンを含む古酒は評価が高くなることから、これまでに植物細胞壁分解酵素と4-VG生成酵母を組合わせた製造方法の開発 (向井ら、2005、醸協) や蒸留方法の検討 (福地ら、2000、沖縄県工業技術センター研究報告書) など4-VGを多く含む製造方法が模索されてきた。我々はこれまでに泡盛醸造中の4VG生成の主要因が黒麹菌であることを明らかにしており、米ぬかやFAで誘導されること (図2)、製麹後期にAIPADの発現量が増加することを明らかにしてき

た (図 3)。しかし、1%米ぬかに含まれている FA 量のおよそ 2 倍量を添加しても米ぬかに対して 1/3 程度しか活性が見られなかったことから米ぬかには FA 以外にも AIPAD を誘導する物質があると考えられた。また、米ぬか培養上清中の糖を調べた結果、培養初日に糖類は検出されたが、その後消費されていたことが確認された。このことから、AIPAD の誘導に糖類が影響を与えている可能性が考えられた。その他、製麴後期に AIPAD が発現する理由についても明らかになっていない。AIPAD がどのような条件で誘導されるのか、そして AIPAD の発現がどのように制御されているのかを明らかにすることは、バニリン香に富む泡盛製造に貢献できると期待される。

そこで本研究では、AIPAD がどのような条件で誘導されるのかを調べるために米ぬかを構成している糖を用いた AIPAD の誘導試験と転写因子破壊ライブラリーを用いて各転写因子破壊株の 4-VG 生成量の比較を行い、4VG 生成に関わる転写因子を明らかにすることを目的とする。

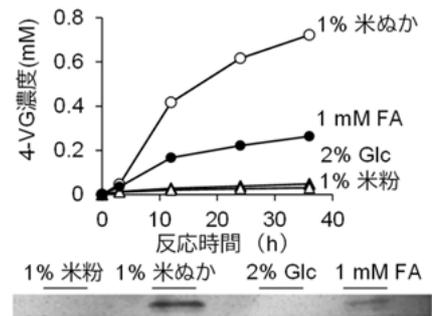


図2. AIPAD誘導物質の探索

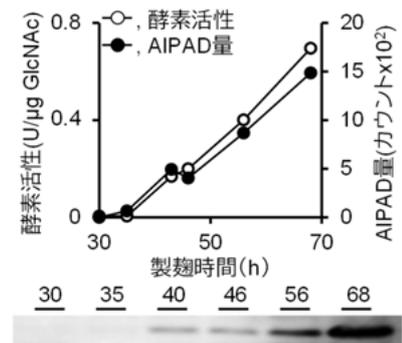


図3. 麴の無細胞抽出液を用いた酵素活性とウエスタンブロットング

3. 研究の結果

まず始めに、米ぬかを構成しているグルコース、キシロース、アラビノース、フルクトースを用いて培養を行い、AIPAD が発現するかどうか調べた。その結果、フルクトースを除く全ての糖において、糖を全て消費してから 48-72 時間後に AIPAD の発現量が増加することが確認された (図 4)。また、その際に菌体量が減少することが確認された (図 5)。このことから AIPAD は自己消化が起こるときに発現する可能性が示唆された。

次に転写因子破壊ライブラリーを用いて 4-VG 生成に影響を与える転写因子をスクリーニングした。その結果、4-VG 高生産株および低生産株が存在することが確認された。4-VG 高生産株については有性生殖に関連する転写因子が破壊されており、なぜこの転写因子が破壊されたことで 4-VG 生成量が増加したのか明確にすることはできなかったが、培養時の菌体の状態を確認すると菌糸体の塊が培養を経過するごとに崩壊し、菌体量が減少していることが確認された。4-VG 低生産株については、炭素源飢餓に応答する遺伝子であった。また、高生産株と比較して、菌体の減少量はわずかであった。

以上のことから AIPAD の発現は自己消化が起こる条件下で発現する可能性が示唆された。

4. 研究者としてのこれからの展望

麴菌は日本の発酵食品において重要な微生物でその役割は原料の分解になります。しかし、本研究のように原料の分解だけではなく、麴菌が生産する香气成分も存在します。また、発酵食品において麴菌が生産する酵素 1 つ 1 つが与える影響については詳しく調べられていません。私は麴菌が実際に発酵食品中の香气成分や呈味成分にどの程度の影響を与えているのかについて詳しく調べていきたいと考えています。

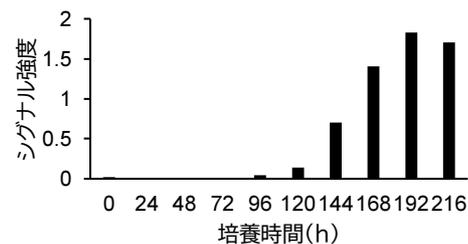


図4. グルコース培養菌体のウエスタンブロットングのシグナル強度

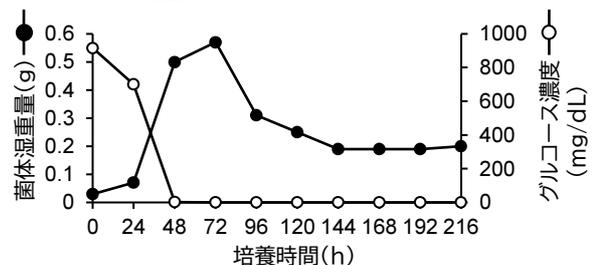


図5. 菌体湿重量および培養上清中のグルコース量

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

この度は、本研究にご支援をいただきまして誠にありがとうございます。学生時代から本酵素がどのような条件下で誘導されるのか研究しており、今回の研究により自己消化が起こるような条件下で発現する可能性を見出すことができました。今後も本酵素の誘導・発現メカニズムについて調べ、最終的には泡盛製造への応用に繋げていきたいと思っております。今回ご支援を頂きました日本私立学校振興・共済事業団の関係者各位ならびにご寄付をいただいた皆様に心より感謝申し上げます。



図6. 実験の様子