



(独)酒類総合研究所  
醸造技術応用研究  
部門・部門長  
博士（農学）  
山田 修

1985年 東京農工大学農学部卒業  
1986年 国税庁  
1987年 仙台国税局  
1990年 国税庁酒税課  
1991年 東京国税局  
1997年 福岡国税局  
2001年 酒類総合研究所

## 黒麹菌の醸造特性に関する研究 土臭非生産性について

### はじめに

黒麹菌とは、沖縄の泡盛造りに使われている有用糸状菌であり、製麹中に大量のクエン酸を生産することでもろみを酸性にし、暖かい土地での醸造に適しているとされている。また、平成 18 年 10 月 12 日、日本醸造学会において、黄麹菌 *Aspergillus oryzae*、醤油麹菌 *A. sojae* などとともに我が国を代表する微生物として「国菌」に認定されている(1)。しかし、黒麹菌として報告された菌株は、*A. luchuensis* を始めとして、10 数株にのぼり、また、欧州でクエン酸生産に用いられている *A. niger* の異名同種とする報告もあるなど、その分類には混乱が見られた。そこで我々は、黒麹菌の分類学的位置を確認するために分子生物学的な解析を行い、黒麹菌は沖縄由来の純国産菌株であるということを報告するとともに、黒麹菌を乾が初めて記載した *A. luchuensis* と呼ぶことを提案している(2)。

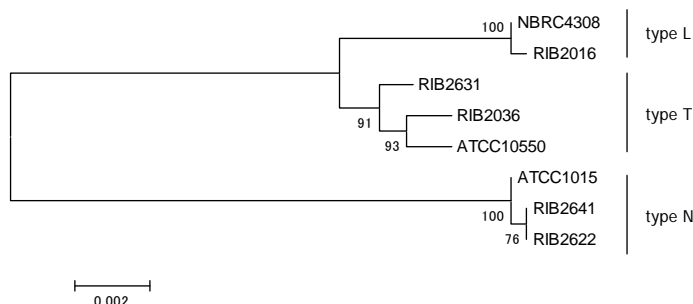


図 1 黒麹菌の分子系統解析

type L: 黒麹菌, type T: *A. tubingensis*, type N: *A. niger*

この解析の過程で我々は、*A. niger* 菌株には、特有の土様の臭気があること、この臭気が黒麹菌株には全く見られないことに気がついた。黒麹菌を利用して製造される泡盛や焼酎は嗜好品であることから、このような臭気はない方が望ましい。このことは、黒麹菌と同様にクエン酸の生成能を有する *A. niger* が酒類醸造に使われず、逆に黒麹菌が泡盛醸造に選択された理由の一つとも考えることができる。そこで、本研究では、近年明らかにされた黒麹菌及び *A. niger* のゲノム解析情報を活用し、黒麹菌の醸造特性の一つといえる土臭非生産性を遺伝子レベルで明らかとすることを目的とした。

### 黒麹菌及び *A. niger* の土臭生産性

黒麹菌及び *A. niger* の土臭生産性を確認するため、黒麹菌 14 株及び *A. niger* 20 株を合成液体培地へ植菌し 30℃で 7 日間培養した。培養上清をろ過後、GC-MS による分析に供したとこと、*A. niger* の 9 株からのみ 2- Methyl isoborneol (2-MIB) が検出され、うち 1 株からは Geosmin も検出された。これらの物質は、飲用水のカビ臭の原因物質として知られており、藍藻類や放線菌により生産されるといわれている。特に 2-MIB は、強い土様臭を有しており、*A. niger* の臭気は 2-MIB によるものと考えられた。

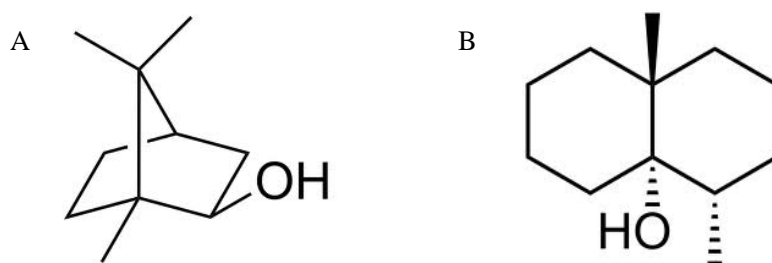


図 2 *A. niger* から検出された土臭物質  
A: 2- Methyl isoborneol (2-MIB) B: Geosmin

### 2-MIB の生合成経路

ついで、2-MIB の生合成に関与する遺伝子について文献情報を検索したところ、放線菌における生合成経路について 1 件のみ報告が見いだされた(3)。それによると geranyl diphosphate (GPP) を GPP methyltransferase がメチル化後、monoterpene cyclase (2-MIB synthase) が 2-MIB を生合成するというモデルが提唱されている。しかし、これら酵素遺伝子を *A. niger* ゲノム中に探索したがホモログ遺伝子は見いだされなかった。そこで、論文では、terpene cyclase が 2-MIB の生合成に関与していると推定し、protein families database (Pfam) の motif PF03936 (terpene

synthase family, metal binding domain)を有するものを候補遺伝子と解析していたことから、*A. niger* ゲノム中の PF03936 motif を有するタンパク質を検索したところ、7 遺伝子が見いだされた。

表 1 *A. niger* 中の PF03936 motif を有する遺伝子

Sequence	E-value	Description
An03g04890	2.8e-17	strong similarity to pentalenene synthase
An12g10670	1.5e-13	similarity to hypothetical lyase
An09g06090	2.6e-13	strong similarity to pentalenene synthase
An16g00260	6.6e-06	similarity to geranylgeranyl diphosphate synthase
An14g02060	5.3e-08	similarity to aristolochene synthase
An08g10830	2.7e-05	strong similarity to geranylgeranyl pyrophosphate
An11g06260	6.8e-07	weak similarity to pentalenene synthase

### An03g04890 遺伝子の解析

*A. niger* ゲノム中に見いだされた PF03936 motif を有するタンパク質遺伝子の 2-MIB 生合成への関与を調べるため、まず An03g04890 遺伝子の破壊を試みた。*A. oryzae* 由来 pyriothiamine 耐性遺伝子 *ptrA* をマーカーとした破壊カセットを InFusion 法により作製し、protoplast-PEG 法により *A. niger* ATCC 1015 株へ導入し形質転換体を得た。形質転換体から genome DNA を抽出し PCR により遺伝子破壊の有無を確認したところ、50 株中 1 株でのみ破壊カセットの An03g04890 遺伝子 locus への導入が確認されたが、この形質転換体の純化 (*Aspergillus* 属の多くは菌糸内に複数の核を有するため純化が必要となる)を試みたがヘテロカリオンしか得られず、An03g04890 遺伝子が致死遺伝子であることが示唆された。また、protoplast 化率が *A. oryzae* に比べて極端に悪く、また相同組換え頻度も約 2%と低かったことから、当研究所の高橋らにより黒麹菌形質転換法として開発された *Agrobacterium* 法の *A. niger* への適用と、その遺伝子破壊により相同組換え頻度の大幅な向上が報告されている *ligD* 遺伝子の破壊を試みることにした(4, 5)。

### *A. niger* ATCC 1015 *ligD* 遺伝子破壊株の造成

*A. niger* genome database から *ligD* 遺伝子を検索し hygromycin 耐性遺伝子をマーカーに InFusion 法により破壊カセットを作製し、*Agrobacterium* 用 vector pRIE へ連結しエレクトロポレーションにより *Agrobacterium* へ導入した。形質転換 *Agrobacterium* と *A. niger* ATCC 1015 を共培養、感染させ破壊カセットを *A. niger* へ導入し、hygromycin 耐性により形質転換体を取得した。得られた形質転換体から genome DNA を抽出し、サザン解析を行ったところ 3 株において *ligD* 遺伝子の

破壊が確認され、Agrobacterium 法が *A. niger* にも有効であることが示された。

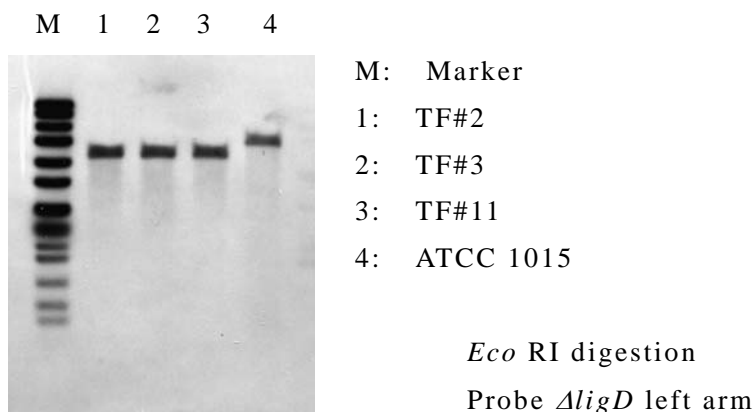


図 3 *A. niger* ATCC 1015 *ligD* 遺伝子破壊株の造成

現在、*A. niger* ATCC 1015 *ligD* 遺伝子破壊株において相同組換え効率が上昇しているか確認するとともに、PF03936 motif を有する遺伝子の破壊を順次行っている。これにより、黒麹菌の醸造特性である土臭非生産性を分子レベルで明らかとしていきたい。

## 謝辞

本研究を助成して頂きましたサッポロ生物科学振興財団に深く感謝いたします。また、助成候補者としてご推薦下さいました蓼沼 誠先生に御礼申し上げます。

## 引用文献

- (1) <http://www.jozo.or.jp/koujikinnituite2.pdf>
- (2) Yamada, O. *et al.*: Molecular biological researches of Kuro-Koji molds, their classification and safety., *J Biosci. Bioeng.*, **112**, 233–237 (2011)
- (3) Komatsu, M. *et al.*: Identification and functional analysis of genes controlling biosynthesis of 2-methylisoborneol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7422–7427 (2008)
- (4) Takahashi, T. *et al.*: Development of an efficient gene-targeting system in *Aspergillus luchuensis* by deletion of the non-homologous end joining system., *J Biosci. Bioeng.*, **112**, 529–534 (2011)
- (5) Mizutani, O. *et al.*: A defect of LigD (human Lig4 homolog) for nonhomologous end joining significantly improves efficiency of gene-targeting in *Aspergillus oryzae.*, *Fungal Genet. Biol.*, **45**, 878–889 (2008)