

2017年度 生物工学奨励賞（江田賞）受賞



醤油酵母における香気成分 生成機構に関する研究

渡部 潤



Studies on aroma production mechanism in soy sauce yeast

Jun Watanabe (*Manufacturing Division, Yamasa Corporation, 2-10-1, Araocho, Choshi, Chiba, 288-0056*) *Seibutsu-kogaku* **96**: 106-112, 2018.

はじめに

日本の伝統的な発酵調味料である醤油には300種類を超える香気成分が含まれている。メーカーごとに醸造に使用する微生物や製造方法が異なるため、規格上は同じ「こいくち」に分類される醤油であっても、その香りは千差万別である。このような香りの差は、改めて述べるまでもなく、香気成分の組成や量の差に起因すると考えられる。

醤油に含まれる香気成分の多くは、醤油の主発酵酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) によって生産される。たとえば、醤油の特徴香成分である4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2*H*)-furanone (HEMF) や¹⁾、醤油の代表的なオフフレーバー成分であるイソ吉草酸などの短鎖分岐鎖脂肪酸は、*Z. rouxii* の働きによって生成されることが知られている²⁾。しかし、これらの香気成分がどのような機構により生産されているのかについては未解明な点が多い。したがって、この機構を解明し、生成する香気成分の組成や量をコントロールすることができれば、醤油の高品質化が可能になると考えられる。そこで筆者らは、これら香気成分の生成機序を明らかにすべく、一連の詳細な解析を行った。なお本稿では、*Z. rouxii* の特定の株が醤油諸味表面に形成する皮膜を産膜と呼び、産膜形成に伴うオフフレーバーを産膜臭と呼ぶ。

HEMFの生成に関与する遺伝子の網羅的な探索³⁾

HEMFは今から約40年前に天然物として初めて醤油か

ら単離された化合物であり⁴⁾、カラメル様の甘く好ましい香気を有するだけではなく、抗腫瘍作用や抗白内障作用などを発揮する機能性成分としても知られている^{5,6)}。味噌においては、HEMF濃度と官能評価スコアとの間に正の相関が認められており⁷⁾、HEMFと食品の嗜好性との関連が注目されている。

先行研究から、すでに三つのHEMF生成経路が提唱されていた(図1)。一つ目は、ペントースリン酸経路の中間代謝産物(セドヘプチュロース-7-リン酸など)が酵母の酵素反応で変換され、HEMFが生成する経路である^{8,9)}。二つ目は、ペントースとアミノ酸のメイラード反応で生じたC₅前駆体とグルコース由来のC₂前駆体(おそらくアセトアルデヒド)が、酵母の酵素反応で結合してC₇前駆体となった後、酵素反応もしくは化学反応によりHEMFが生成する経路である¹⁾。そして三つ目は、生成する反応中間物については二つ目の経路とほぼ同じであるが、化学反応のみによりHEMFが生成する経路である¹⁰⁾。

筆者らは、HEMF生成に影響を与える遺伝子をスクリーニングすることで、HEMF生成機構の手がかりがつかめるのではないかと考えた³⁾。そこで、*Z. rouxii*と同様に、HEMFを生産することが知られているモデル微生物*Saccharomyces cerevisiae*の非必須遺伝子破壊株(約5,000株)を1株ずつ培養し、生産されたHEMFをHPLCにより定量した。その結果、HEMF生産性が、親株(BY4743株)と比較して1.8倍以上の高生産株が14株、0.4倍以下の低生産株が100株程度取得された(図

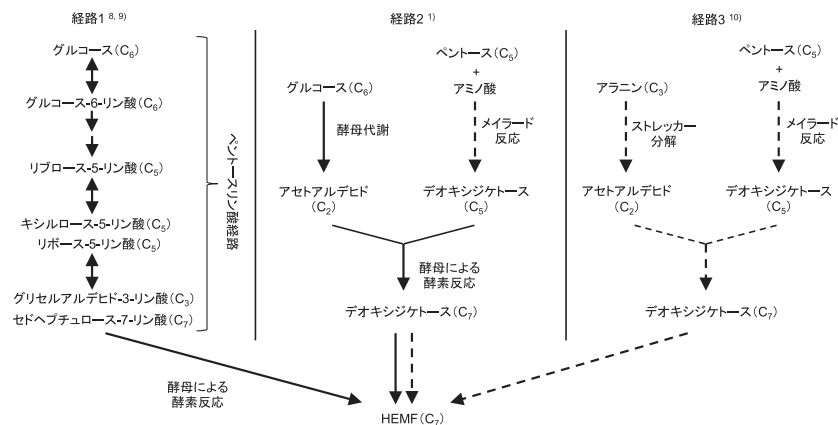


図1. 先行研究において提唱された三つのHEMF生成経路。実線の矢印は酵素反応を、点線の矢印は化学反応を示す。

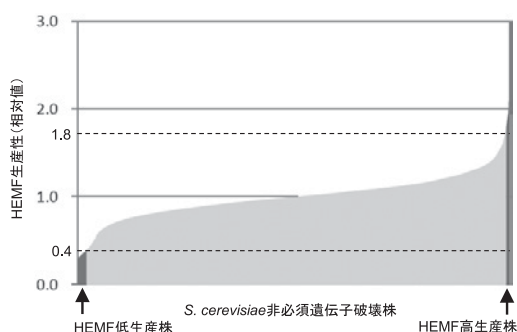


図2. *S. cerevisiae* 非必須遺伝子破壊株のHEMF生産性。親株 (BY4743) のHEMF生産性を1とした場合の相対値。

2). もっとも高いHEMF生産性を示した株は、アルコールデヒドロゲナーゼをコードする *ADHI* 遺伝子の破壊株であった³⁾。この酵素はアルコール発酵において、アセトアルデヒドからエタノールへの変換を触媒する。アセトアルデヒドはHEMF前駆体の一つと考えられていたことから(図1)、*ADHI* 遺伝子破壊株におけるHEMF高生産は、前駆体であるアセトアルデヒドの蓄積によるものと推定された。実際に、*ADHI* 遺伝子破壊株の培養上清中のアセトアルデヒド濃度は、対照株と比較して顕著に高く、かつアセトアルデヒドを捕捉するグルタチオンの添加により、HEMF生産性の低下が観察された³⁾。また、*Z. rouxii*においても、*ADHI* 遺伝子ホモログの破壊により、*S. cerevisiae* 同様のHEMF生産性の向上が認められた³⁾。以上の結果は、アセトアルデヒドがHEMF前駆体の一つであるとする、従来の研究結果^{1,10)}を支持していた。

HEMF生合成酵素の単離¹¹⁾

HEMF低生産株の中には、HEMF生合成に直接関与する酵素遺伝子の破壊株が含まれると推定されたが、解析対象が多く、この結果のみでは候補を絞り込むことが

困難であった。そこで、酵母におけるHEMF生合成酵素を同定するため、*S. cerevisiae*の粗酵素抽出液から、*in vitro*アッセイでHEMF合成活性を示すタンパク質を、陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。ペプチドマスフィンガープリンティング解析により、このタンパク質は *YNL134C* 遺伝子の翻訳産物であることが判明した。興味深いことに、この *YNL134C* タンパク質 (*YNL134Cp*) は、イチゴ由来のエノン酸化還元酵素と、アミノ酸配列レベルで27%の同一性を示した¹¹⁾。イチゴのエノン酸化還元酵素は、フルクトース-1,6-ビスリン酸から合成される4-hydroxy-5-methyl-2-methylene-3(2*H*)-furanone (HMMF) を還元し、イチゴの甘い香りの原因物質である4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (HDMF) を生成する¹²⁻¹⁴⁾。また、同様の機構で(2*E*)-2-ethylidene-4-hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanone (EDHMF) を還元してHEMFを生成する^{12,13,15,16)}。これらの知見から、*YNL134C* 遺伝子が *S. cerevisiae* におけるHEMF生合成酵素遺伝子であると推測された。*YNL134C* 遺伝子の機能を探るため、*S. cerevisiae* BY4743株を親株として用い、*YNL134C* 遺伝子破壊株 ($\Delta ynl134c$)、ならびに、同遺伝子発現プラスミドを導入した *YNL134C* 高発現株を作製した。前者はHEMF生産性が6割程度減少し、一方で後者はHEMF生産性が3割程度向上することが確認された(図3)。*YNL134Cp* がHEMF生合成酵素であることを直接的に証明するため、大腸菌を用いて組換え *YNL134Cp* を作製した。この組換えタンパク質は、リボースとグリシンの加熱混合物およびアセトアルデヒドから、NADPH 依存的にHEMFを生成した(図4)。以上より、*YNL134Cp* が *S. cerevisiae* におけるHEMF生合成酵素であることが証明された。

Z. rouxii においても類似の酵素が同様の役割を果たしていると仮定し、同酵母における *YNL134C* 遺伝子のオ

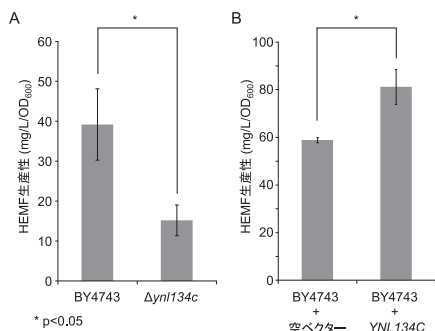


図3. *S. cerevisiae*におけるHEMF生産性に対する $YNL134C$ の影響. (A) $YNL134C$ 破壊株 ($\Delta yn134c$)のHEMF生産性. (B) $YNL134C$ 高発現株のHEMF生産性. BY4743, 親株.

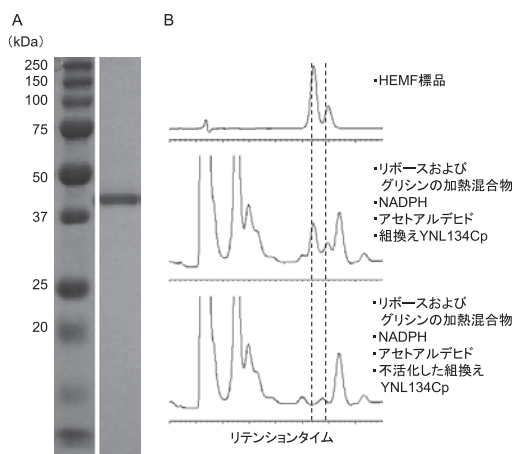


図4. 組換えYNL134CpによるHEMF生産. (A) 精製した組換えYNL134CpのSDS-PAGE解析. (B) 組換えYNL134CpによるHEMF生産 (HPLCクロマトグラム). *in vitro*アッセイ反応液組成を右に示した.

ルソログを探索した. 醤油諸味から単離される *Z. rouxii* の大部分は, 近縁の2種が異種交雑してできた種間交雑株であると考えられており, $YNL134C$ 遺伝子のオルソログを2コピー保持していると推定された. *Z. rouxii* NBRC110957株のゲノムデータに対して相同性検索を実施した結果, 予想通り配列が異なる二つのホモログが見いだされ, その遺伝子座周辺のシンテニーから, 両遺伝子は $YNL134C$ のオルソログであることが示唆された. これらオルソログ遺伝子の2重破壊株では, *S. cerevisiae* の $YNL134C$ 遺伝子破壊株と同様に, HEMF生産性の低下が認められた (図5A). さらに, 一方のオルソログ遺伝子を *S. cerevisiae* の $YNL134C$ 遺伝子破壊株に導入すると, HEMF生産性が部分的に回復することが確認された (図5B). 以上の結果は, *Z. rouxii* においても, $YNL134C$ 遺伝子オルソログの翻訳産物がHEMF生合成を担っていることを示していた.

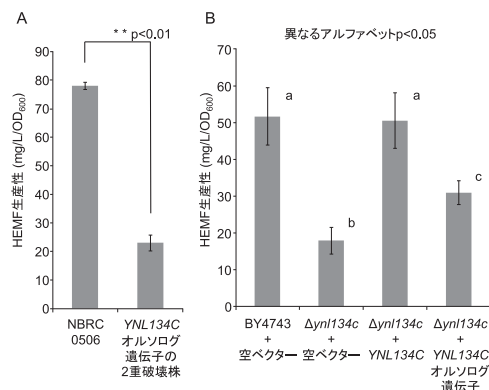


図5. *Z. rouxii*における $YNL134C$ オルソログ遺伝子の機能. (A) *Z. rouxii* $YNL134C$ オルソログ遺伝子破壊株のHEMF生産性. (B) *S. cerevisiae*において $Z. rouxii$ の $YNL134C$ オルソログ遺伝子を発現させた際のHEMF生産性. BY4743, 親株; $\Delta yn134c$, $YNL134C$ 破壊株.

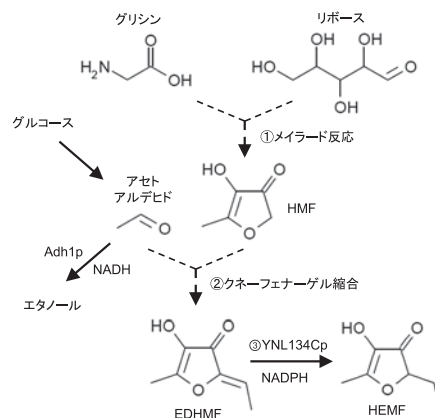


図6. 推定HEMF生成経路. 実線は酵素反応を, 点線は化学反応を示す.

HEMF生成経路¹¹⁾

前述の通り, $YNL134Cp$ はイチゴのエノン酸化還元酵素と27%のアミノ酸配列同一性を示した. このことから, 酵母においてもイチゴと同様に, HEMFの直接の前駆体はEDHMFであると予測された. EDHMFは, 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone (HMF) とアセトアルデヒドを, 触媒である酢酸銅存在下で加熱することで化学合成されることが報告されている¹³⁾. また, HMFは糖とアミノ酸とのメイラード反応によって生成することが知られている^{17,18)}. 以上の情報を総合すると, HEMFは図6に示した経路により生成すると考えられた. すなわち, ①リボースとグリシンのメイラード反応によりHMFが生成し, ②このHMFと発酵の過程で発生したアセトアルデヒドが縮合することでEDHMFが生成され, ③最終的にEDHMFがNADPH依存的に $YNL134Cp$ により還元され, HEMFが生成する. この仮説を検証するため, 反応の各段階でHMF, EDHMF,

およびHEMFが生成しているかどうかを検証した。その結果、リボースとグリシンの加熱混合物には多量のHMFが含まれていることが確認された¹¹⁾。さらに、HMFとアセトアルデヒドは、酵母を培養する際の温和な条件(30°C)であっても縮合し、EDHMFを生成することが明らかになった¹¹⁾。また、化学合成したEDHMFに組換えYNL134Cpを作用させると、NADPH依存的にHEMFが生成することが確認された。以上の結果から、酵母では、図6に示した経路でHEMFが生成することが強く示唆された。

産膜形成原因遺伝子の同定¹⁹⁾

*Z. rouxii*は醤油の特徴香成分HEMFを生産する重要な役割を有している一方で、特定の株は産膜を形成し、産膜臭を生成することで、醤油の品質を著しく低下させる。もちろん醤油諸味にスターターとして添加されるのは非産膜形成株のみだが、産膜形成株は醤油蔵のいたるところに棲み付いており、その混入を完全に防止することは困難である。産膜形成と産膜臭生成との関連は古くから経験的に知られており、醤油諸味に産膜が形成された場合は、産膜を諸味へ押し込む「カビ消し」という作業が伝統的に実施されてきた。しかし、なぜこのような作業が必要であるのかという点や、どのような機構により産膜が形成され、産膜臭が生成されるのかといった点は未解明であった。そこで、筆者らは産膜形成株のゲノムライブラリーを調製し、得られたゲノムDNA断片を含むプラスミドを非産膜形成株に導入することで、産膜形成原因遺伝子の同定を試みた。この解析によりクローニングされた*FLO11D*遺伝子は、N末端のFlo11ドメインとC末端のグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカー付加シグナルが、セリンに富む反復配列でつながれた、典型的なFlo11様タンパク質をコードしていた(図7)。*S. cerevisiae*のFlo11ドメインは疎水的であり、このドメインを介した疎水的相互作用により、凝集やバイオフィーム形成などの多様な表現型を示すことが知られている²⁰⁾。今回クローニングされた*FLO11D*遺伝子は、調査した範囲において産膜形成株のみが保持しており、産膜形成に伴い*FLO11D*遺伝子の発現が認められた¹⁹⁾。また、*FLO11D*遺伝子のコピー数は株によって異なっており、産膜形成株において1-3コピーの間で多様性が認められた。*FLO11D*遺伝子を3コピー保持する*Z. rouxii* NBRC110957株を供試し、同遺伝子破壊株の産膜形成能を解析したところ、3重破壊株で産膜形成能が完全に消失し(図8A)、かつ*S. cerevisiae*における*FLO11D*遺伝子の異種発現が産膜形成を誘導したことから(図8B)、この遺伝子が産膜形成の直接的な原因遺伝

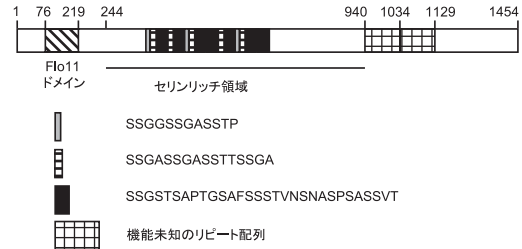


図7. *Z. rouxii*のFlo11dタンパク質の一次構造

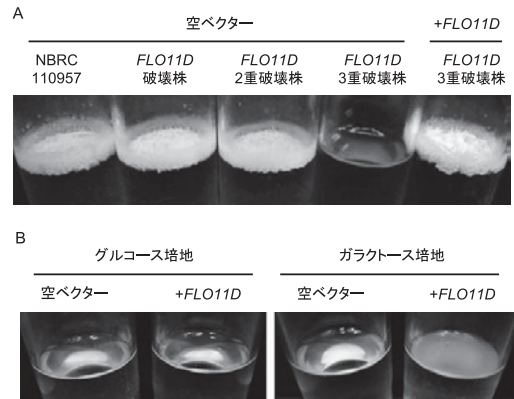


図8. *FLO11D*遺伝子破壊株の表現型。(A) *Z. rouxii* *FLO11D*遺伝子破壊株の表現型。NBRC110957, 野生株。(B) *S. cerevisiae* BY4743株における*FLO11D*遺伝子の発現。*FLO11D*遺伝子の発現にはガラクトース誘導性プロモーターを用いた。

子であることが確認された。さらに、遺伝子発現解析から、*FLO11D*遺伝子の発現はグルコース非存在下において、浸透圧により誘導されることが明らかになった¹⁹⁾。このことは、*Z. rouxii*に特徴的な浸透圧依存的産膜形成をよく説明するものであった。

前述の通り、*FLO11D*遺伝子のコピー数は株によって異なっていた。この多様性がどのような役割を果たしているのかを明らかにするため、*FLO11D*遺伝子のコピー数が異なる株を人為的に作製し、細胞の疎水度を評価した。すなわち、これら変異株の培養液を有機溶媒(オクタン)と混和し、オクタン添加前後における水相の細胞数(OD₆₀₀)を比較することで、細胞の疎水度を測定した。その結果、*FLO11D*遺伝子コピー数の上昇に伴い、細胞の疎水度が上昇することが明らかとなった¹⁹⁾。また、野生株および*FLO11D*破壊株を高浸透圧下で共培養し、最終的にどちらの株が優勢となるか(適応度)を調べたところ、コピー数の上昇に伴い適応度も上昇する傾向が認められた¹⁹⁾。

産膜形成は、酵母自身のアルコール発酵で悪化した液中の環境から気液界面に逃れ、酸素を利用した呼吸によりエタノールを資化し、生育を継続するための適応機構である²¹⁾。したがって、*FLO11D*遺伝子のコピー数増加により適応度の上昇が認められたことは、理にかなって

いる。FLO11D遺伝子が浸透圧依存的に発現することは、浸透圧耐性が高くない他の酵母との棲み分けであると考えられる。

産膜形成に伴う不快臭の生成機構²²⁾

産膜形成能を失ったFLO11D遺伝子破壊株は、産膜臭生成能をも失っているのだろうか？産膜臭の原因物質はイソ吉草酸やイソ酪酸であるが²⁾、これらの短鎖分岐鎖脂肪酸が*Z. rouxii*においてどのように産生されるかについて実験的に証明した例はない。一方、*S. cerevisiae*においては、分岐鎖アミノ酸の異化経路（エーリッヒ経路）を介してイソ吉草酸やイソ酪酸が生成することが知られている²³⁾。*Z. rouxii*においても同様の経路で産膜臭が生成すると仮定すれば、産膜臭生成と産膜形成との間に直接的な因果関係はなく、条件さえ整えば、産膜形成能を失ったFLO11D遺伝子破壊株も産膜臭を生成すると考えられる。筆者らは、*Z. rouxii*において、イソ吉草酸やイソ酪酸が分岐鎖アミノ酸の異化により生成するかどうかを確認するため、バリン、イソロイシン、またはロイシンを含む最少培地で*Z. rouxii*を培養し、培地中に蓄積した香氣成分を定量した。また、*Z. rouxii*の産膜形成が浸透圧依存的に起きることを利用し、食塩の有無により産膜形成を制御し、産膜を形成した場合としなかった場合の香氣成分を比較した。さらに、産膜形成能を欠損させたFLO11D遺伝子破壊株でも同様の解析を実施した。液体培地におけるアッセイの結果、バリン含有培地ではイソ酪酸が、ロイシン含有培地ではイソ吉草酸が産膜形成依存的に生成された。一方、産膜形成が起きない条件においては、これらの短鎖分岐鎖脂肪酸の蓄積は認められなかった²²⁾。以上の結果は、少なくとも見かけ上は、産膜臭が産膜形成依存的に、分岐鎖アミノ酸から生成することを示唆していた。しかしながら、この結果だけでは、産膜形成そのものに依存して産膜臭を生成しているのか、それとも、産膜形成を介した空気への暴露に依存して産膜臭を生成しているのかが不明であった。そこで、産膜を形成した状態の細胞と同様に、常に空気に暴露された状態を模すため、寒天培地上で*Z. rouxii*を培養し、培地中に蓄積した香氣成分を定量した。その結果、イソ酪酸やイソ吉草酸は、食塩やFLO11D遺伝子の有無とは無関係に、分岐鎖アミノ酸を含む培地において著量蓄積した²²⁾。この結果は、産膜臭が産膜形成自体ではなく、細胞が空気に暴露されることに依存して生成されることを示していた。さらに、好気条件および嫌気条件下で生成される香氣成分を比較した結果、ロイシン含有培地において、好気条件ではイソ吉草酸が、嫌気条件ではイソアミルアルコールが多量に生成された²²⁾。これは、エー

リッヒ経路の最終段階において、細胞の酸化還元状態に依存して、アミノ酸異化により生じたアルデヒド中間体が、アルコールあるいは酸のどちらかへ転換されるといふ、同経路の本質とよく一致していた。

エーリッヒ経路において分岐鎖アミノ酸の アミノ基転移を触媒する酵素遺伝子²²⁾

上記の結果は、産膜形成は産膜臭の生成において、細胞を好気条件に局在させるという間接的な役割を果たしているものの、その直接的な原因ではないことを示唆していた。もしそうであれば、エーリッヒ経路の遮断により、産膜は形成するが、産膜臭は生成しない酵母を作製可能なはずである。そして、このような株を作ることができれば、*Z. rouxii*における産膜臭の生成がエーリッヒ経路を介したものであり、産膜形成は産膜臭生成の直接的な原因ではないことが明確になると考えた。

エーリッヒ経路の律速反応は、分岐鎖アミノ酸が α -ケト酸に代謝される段階である。*S. cerevisiae*においては、BAT1およびBAT2にコードされる2つの分岐鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ(Bat1pおよびBat2p)が、この反応を触媒する²⁴⁾。また、この反応は可逆反応であり、分岐鎖アミノ酸の新規合成においても利用されるため、これら遺伝子の2重破壊株は、バリン、イソロイシン、およびロイシンを要求することが知られていた²⁵⁾。筆者らによる解析の結果、醤油醸造の主発酵酵母である*Z. rouxii*では、バリンおよびイソロイシンはBat1pによって、ロイシンはBat1pおよび α -アミノアジピン酸アミノトランスフェラーゼ(Aro8p)によって、対応する α -ケト酸へと代謝されることが明らかとなった²²⁾。したがって、*Z. rouxii*に3つの分岐鎖アミノ酸に対する要求性を付与するためには、BAT1およびARO8の破壊が必要である。これを踏まえ、BAT1破壊株、およびBAT1 ARO8 2重破壊株を作出し、それらの産膜臭生成能を解析した。その結果、これら破壊株は親株と同様に産膜を形成するものの、醤油中に蓄積したイソ酪酸やイソ吉草酸の量は著しく減少していた(図9)。以上の結果から、*Z. rouxii*は図10に示す経路で分岐鎖アミノ酸を代謝し、エーリッヒ経路が産膜臭の生成に中心的な役割を果たしていることが示された。

上で述べたように、醤油諸味表層に形成された産膜は、「カビ消し」という作業で諸味中に押し込まれる。本研究で得られた成果を基に、この作業の意義を改めて考察してみると、カビ消しとは、諸味表面の美しさを取り繕うための場当たり的な作業ではなく、産膜を嫌気的な諸味中に押し込むことで、エーリッヒ経路を還元側に傾け、産膜臭の生成を抑制するための作業であると考えること

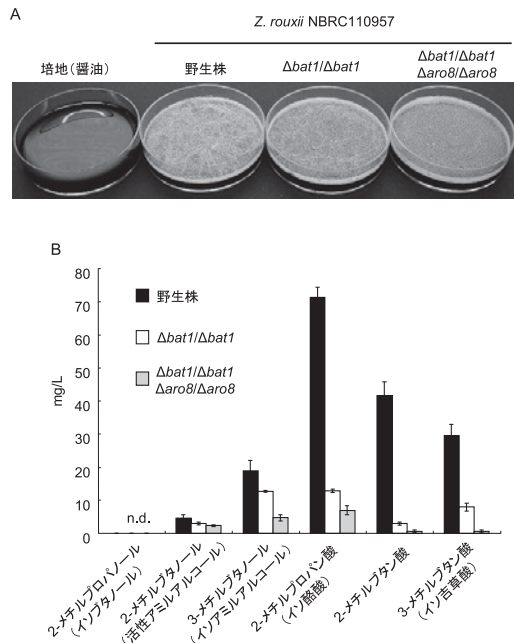


図9. *Z. rouxii* アミノトランスフェラーゼ遺伝子破壊株の産膜形成能および産膜臭生成能。(A) 遺伝子破壊株の醤油での産膜形成。(B) 遺伝子破壊株が醤油中に蓄積した香気成分. $\Delta bat1/\Delta bat1$, $BAT1$ 破壊株; $\Delta bat1/\Delta bat1 \Delta aro8/\Delta aro8$, $BAT1 ARO8$ 2重破壊株.

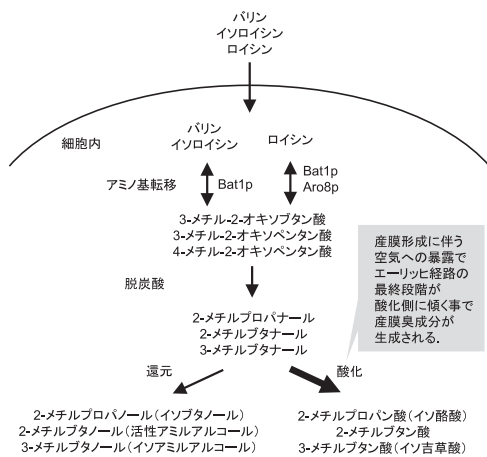


図10. 推定産膜臭生成経路

ができる。おそらく、醤油製造工程が洗練される過程において、先人たちが醤油の品質を低下させる産膜の存在に気づき、産膜を諸味に押し込むことで品質低下を防止できることを経験的に知り、それが作業として定着したと考えられる。

おわりに

醤油の香気成分に関する研究は、非常に古くから実施されているが、近年の研究においても、これまで知られていなかった新たな香気成分が発見されており、全容は未解明であるといえる。本研究では、*Z. rouxii* が生成す

る香気成分の中でも、醤油のもっとも重要な特徴香成分であるHEMFと、著しく醤油の品質を低下させる産膜臭に着目し、その生成機構の一端を明らかにすることができた。この研究成果は、醤油香気の改善や、オフフレーバーの抑制を検討するための基礎的知見を供給しているが、これらの香気成分量を自在にコントロールするには、まだまだ多くの課題が残されている。たとえば、YNL134Cpは、EDHMFからHEMFへの変換を触媒する酵素であることが明らかになったが、予備的な検討により、この反応はHEMF生成の律速段階ではないことが示されている。酵素反応の前段階であるアセトアルデヒドとHMFの縮合反応、または、メイラード反応によるHMF生成効率を改善しない限り、醤油中のHEMF含量を向上させることは難しいだろう。醤油諸味へのリボースの添加は、もっとも簡単に醤油中のHEMF含量を向上させる手段であるが、「何も足さない、何も引かない」という醸造の基本原則から外れることになる。産膜臭に関しては、「カビ消し」が産膜臭を抑制する優れた方法であることの理論的裏付けが本研究により示された。しかしながら、その製法の特殊さからカビ消しを実施できず、産膜臭がもっとも発生しやすい「たまりしゅうゆ」のような品種に関しては、本研究成果のみからでは産膜臭低減のための具体的手法を提案できない。今後は、得られた知見を応用に結び付けるための、より一層の努力が必要になるだろう。

2017年に、醤油の主発酵酵母である*Z. rouxii*のゲノム解析結果が報告された^{26,27}。これで、醤油の原料である大豆²⁸、小麦²⁹に加え、醤油醸造に関わる主要な微生物(麹菌^{30,31}、乳酸菌³²)、および酵母^{26,27})のゲノムがすべて明らかになったことになる。遠くない将来、醤油の風味の違いが、ゲノム情報に基づいて遺伝子レベルで記述できる時代が訪れるかもしれない。古き良き醸造の伝統を守りつつも、これらの情報を積極的に活用し、醤油醸造技術の発展と革新に貢献していきたい。

謝 辞

本研究を実施するに当たり、多大なるご支援を賜りましたヤマサ醤油株式会社常務取締役上野潤二製造本部長、月岡祐一郎醸造部長、茂木喜信醸造課長に心から感謝申し上げます。本研究は同僚であった上原健二氏(現秋田県総合食品研究センター研究員)とともに実施したもので、彼の貢献なくしてこのような成果を上げることはできませんでした。また、HEMFに関連する一部の研究は独立行政法人酒類総合研究所の下飯仁博士(現岩手大学教授)、赤尾健博士(現同副部門長)、渡辺大輔博士(現奈良先端科学技術大学院大学助教)との共同研究で実施したものです。この場を借りて深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Ohata, M., Kohama, K., Morimitsu, Y., Kubota, K., and Sugawara, E.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 403–413 (2007).
- 2) 富田 実, 山本澄人: 醸造協会誌, **92**, 853–859 (1997).
- 3) Uehara, K., Watanabe, J., Akao, T., Watanabe, D., Mogi, Y., and Shimoi, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 453–460 (2015).
- 4) Nunomura, N., Sasaki, M., Asao, Y., and Yokotsuka, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 491–495 (1976).
- 5) Nagahara, A., Benjamin, H., Storkson, J., Krewson, J., Sheng, K., Liu, W., and Pariza, M. W.: *Cancer Res.*, **52**, 1754–1756 (1992).
- 6) Sasaki, T., Yamakoshi, J., Saito, M., Kasai, K., Matsudo, T., Koga, T., and Mori, K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1865–1869 (1998).
- 7) 菅原悦子, 雑賀 優, 小林彰夫: 日本食品工学会誌, **39**, 1098–1104 (1992).
- 8) Sasaki, M., Nunomura, N., and Matsudo, T.: *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 934–938 (1991).
- 9) Sasaki, M.: *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 230–235 (1996).
- 10) Blank, I. and Fay, L. B.: *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 531–536 (1996).
- 11) Uehara, K., Watanabe, J., Mogi, Y., and Tsukioka, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 333–341 (2017).
- 12) Raab, T., López-Ráez, J. A., Klein, D., Caballero, J. L., Moyano, E., Schwab, W., and Muñoz-Blanco, J.: *Plant Cell*, **18**, 1023–1037 (2006).
- 13) Klein, D., Fink, B., Arold, B., Eisenreich, W., and Schwab, W.: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 6705–6711 (2007).
- 14) Kulkarni, R., Chidley, H., Deshpande, A., Schmidt, A., Pujari, K., Giri, A., Gershenzon, J., and Gupta, V.: *Springerplus*, **2**, 494 (2013).
- 15) Schiefner, A., Sinz, Q., Neumaier, I., Schwab, W., and Skerra, A.: *J. Biol. Chem.*, **288**, 16815–16826 (2013).
- 16) Schwab, W.: *Molecules*, **18**, 6936–6951 (2013).
- 17) Hicks, K. B., Harris, D. W., Feather, M. S., and Loepky, R. N.: *J. Agric. Food Chem.*, **22**, 724–725 (1974).
- 18) Hicks, K. B. and Feather, M. S.: *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 957–960 (1975).
- 19) Watanabe, J., Uehara, K., and Mogi, Y.: *Genetics*, **195**, 393–405 (2013).
- 20) Kraushaar, T., Brückner, S., Veelders, M., Rhinow, D., Schreiner, F., Birke, R., Pagenstecher, A., Mösch, H. U., and Essen, L. O.: *Structure*, **23**, 1005–1017 (2015).
- 21) Fidalgo, M., Barrales, R. R., Ibeas, J. I., and Jimenez, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 11228–11233 (2006).
- 22) Watanabe, J., Uehara, K., and Mogi, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**, 7685–7697 (2015).
- 23) Hazelwood, L. A., Daran, J. M., van Maris, A. J., Pronk, J. T., and Dickinson, J. R.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 2259–2266 (2008).
- 24) Eden, A., Simchen, G., and Benvenisty, N.: *J. Biol. Chem.*, **271**, 20242–20245 (1996).
- 25) Kispal, G., Steiner, H., Court, D. A., Rolinski, B., and Lill, R.: *J. Biol. Chem.*, **271**, 24458–24464 (1996).
- 26) Sato, A., Matsushima, K., Oshima, K., Hattori, M., and Koyama, Y.: *Genome Announc.*, **5**, e01610-16 (2017).
- 27) Watanabe, J., Uehara, K., Mogi, Y., and Tsukioka, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **83**, e01187-17 (2017).
- 28) Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D. L., Song, Q., Thelen, J. J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G. D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M. K., Sandhu, D., Valliyodan, B., Lindquist, E., Peto, M., Grant, D., Shu, S., Goodstein, D., Barry, K., Futrell-Griggs, M., Abernathy, B., Du, J., Tian, Z., Zhu, L., Gill, N., Joshi, T., Libault, M., Sethuraman, A., Zhang, X. C., Shinozaki, K., Nguyen, H. T., Wing, R. A., Cregan, P., Specht, J., Grimwood, J., Rokhsar, D., Stacey, G., Shoemaker, R. C., and Jackson, S. A.: *Nature*, **463**, 178–183 (2010).
- 29) Mayer, K. F., Rogers, J., Doležel, J., Pozniak, C., Eversole, K., Feuillet, C., Gill, B., Friebe, B., Lukaszewski, A. J., Sourdille, P., Endo, T. R., Kubaláková, M., Čihalíková, J., Dubska, Z., Vrána, J., Sperková, R., Simková, H., Febrer, M., Clissold, L., McLay, K., Singh, K., Chhuneja, P., Singh, N. K., Khurana, J., Akhunov, E., Choulet, F., Alberti, A., Barbe, V., Wincker, P., Kanamori, H., Kobayashi, F., Itoh, T., Matsumoto, T., Sakai, H., Tanaka, T., Wu, J., Ogihara, Y., Handa, H., Maclachlan, P. R., Sharpe, A., Klassen, D., Edwards, D., Batley, J., Olsen, O. A., Sandve, S. R., Lien, S., Steuernagel, B., Wulff, B., Caccamo, M., Ayling, S., Ramirez-Gonzalez, R. H., Clavijo, B. J., Wright, J., Pfeifer, M., Spannagl, M., Martis, M. M., Mascher, M., Chapman, J., Poland, J. A., Scholz, U., Barry, K., Waugh, R., Rokhsar, D. S., Muehlbauer, G. J., Stein, N., Gundlach, H., Zytnicki, M., Jamilloux, V., Quesneville, H., Wicker, T., Faccioli, P., Colaiacovo, M., Stanca, A. M., Budak, H., Cattivelli, L., Glover, N., Pingault, L., Paux, E., Sharma, S., Appels, R., Bellgard, M., Chapman, B., Nussbaumer, T., Bader, K. C., Rimbart, H., Wang, S., Knox, R., Kilian, A., Alaux, M., Alfama, F., Couderc, L., Guilhot, N., Viseux, C., Loaec, M., Keller, B., and Praud, S.: *Science*, **345**, 1251788 (2014).
- 30) Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D. W., Galagan, J. E., Nierman, W. C., Yu, J., Archer, D. B., Bennett, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Fedorova, N. D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P. R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J. R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N., and Kikuchi, H.: *Nature*, **438**, 1157–1161 (2005).
- 31) Sato, A., Oshima, K., Noguchi, H., Ogawa, M., Takahashi, T., Oguma, T., Koyama, Y., Itoh, T., Hattori, M., and Hanya, Y.: *DNA Res.*, **18**, 165–176 (2011).
- 32) Kim, E., Kim, J. H., Yang, S. M., Suh, S. M., Kim, H. J., Kim, C. G., Choo, D. W., and Kim, H. Y.: *Genome Announc.*, **5**, e00304-17 (2017).