

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	眞榮田 麻友美
題 目	泡盛醸造における <i>Aspergillus luchuensis</i> 由来フェノール酸脱炭酸酵素による 4-ビニルグアヤコール生産 (4-Vinylguaiacol production by <i>Aspergillus luchuensis</i> phenolic acid decarboxylase in <i>awamori</i> brewing.)
<p>泡盛は沖縄の伝統的な蒸留酒である。泡盛は蒸米に黒麹菌 <i>Aspergillus luchuensis</i> を生やした麴と泡盛酵母を用いて作られる。3年以上熟成させた泡盛を古酒（コース）と呼ぶ。原料米中のフェルラ酸 (FA) に由来するバニリンは、泡盛古酒の特徴的な香りの1つである。FA は <i>A. luchuensis</i> が生産するフェルラ酸エステラーゼによって米の細胞壁から遊離する。FA の脱炭酸反応により、4-ビニルグアヤコール (4-VG) が生成され、その 4-VG が蒸留液中に移り、熟成中に非酵素的に酸化されてバニリンとなる。しかしながら、泡盛醸造中の FA から 4-VG への変換メカニズムはわかっていない。</p> <p><i>A. luchuensis</i> のゲノム解析より、FA を 4-VG に変換する酵素の候補遺伝子として、細菌や <i>Candida</i> 属のフェノール酸脱炭酸酵素 (PAD), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> のフェニルアクリル酸脱炭酸酵素 (PAD1) およびフェルラ酸脱炭酸酵素 (FDC1) と同一性を有する配列が存在することが明らかになった。我々は、細菌や <i>Candida</i> 属と同一性のある <i>A. luchuensis</i> 由来フェノール酸脱炭酸酵素候補遺伝子 (<i>alpad</i>) が 4-VG 生産の主要因であるという仮説を立て研究を行った。本研究では、始めにリコンビナント AIPAD の酵素化学的諸性質について調べた。次に、<i>A. luchuensis</i> の菌体および麴において AIPAD が発現・機能しているか調べた。最後に、泡盛醸造中の 4-VG 生成への AIPAD の寄与を明らかにするために、<i>alpad</i>破壊株 ($\Delta alpad$株) を作製し、野生株と 4-VG 生産能を比較した。</p> <p>リコンビナント AIPAD はホモダイマーとして発現し、FA から 4-VG への変換を触媒し、pH 5.7 および 40°C で最適な触媒活性を示し、50°C まで安定であることが分かった。静止菌体反応試験により、米ぬかまたは FA 含有培地で培養した菌体が FA から 4-VG への変換活性を示し、その活性は AIPAD の発現量と相関することがわかった。<i>alpad</i> の ORF はシグナル配列を含まないことから、AIPAD は細胞質内に局在すると考えられる。泡盛モロミの pH は 3.5 程度で、AIPAD は pH 4 以下で活性を持たないことから菌体外では活性を発揮できない。これらのことから、<i>A. luchuensis</i> は菌体外から取り入れた FA を菌体内で AIPAD によって 4-VG に変換し、菌体外に放出していることが示唆された。製麴中の FA 脱炭酸活性 (FAD 活性) は製麴時間に伴い増大し、その活性は麴中の AIPAD の量と相関していることがわかった。</p> <p>泡盛醸造における 4-VG 生成への AIPAD の寄与を明らかにするために、$\Delta alpad$ 株を作製し、その 4-VG 生産能を野生株と比較した。野生株で仕込んだモロミの蒸留液中の 4-VG 量は、製麴時間に伴い増加した。$\Delta alpad$ 株では、4-VG 量は著しく低く、どの製麴時間においても変化しなかった。これらの結果から、製麴 42–66 時間の麴を用いた泡盛醸造試験では、4-VG 生成への AIPAD の寄与率は 88–94% と算出された。以上の結果より、泡盛醸造中の 4-VG 生産において AIPAD が主要因であることが明らかとなった。</p>	