

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	眞榮田 麻友美
審査委員	主査 琉球大学 教 授 平良 東紀
	副査 琉球大学 教 授 外山 博英
	副査 佐賀大学 教 授 後藤 正利
	副査 鹿児島大学 准教授 二神 泰基
	副査 琉球大学 准教授 水谷 治
審査協力者	印
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-Vinylguaiaicol production by <i>Aspergillus luchuensis</i> phenolic acid decarboxylase in awamori 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。本学位論文では、この FA から 4-VG への変換に関わる要因を明らかにすることを目的とした。</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）と相同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> 属と相同性のある <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</p>	

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、*A. luchuensis* の菌体および麹において 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、*alpad* 破壊株 ($\Delta alpad$ 株) を作製し、野生株と 4-VG 生産能を比較した。

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。*alpad* 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、*A. luchuensis* 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。製麹中の FA 脱炭酸活性 (FAD 活性) は製麹時間に伴い増大し、その活性は麹中の AIPAD の量と相関していることがわかった。

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、製麹時間に伴い増加した。 $\Delta alpad$ 株では、4-VG 量は著しく低く、どの製麹時間においても変化しなかった。これらの結果から、製麹 42-66 時間の麹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。

本学位論文は、沖縄の伝統的蒸留酒「泡盛」の最大の特徴である古酒化における特徴香バニリンの前駆体生成メカニズムについて、酵素科学、遺伝子工学および醸造学の手法を用いて、その主要因が黒麹菌の持つ酵素であることを明らかにしたものである。本研究で得られた成果は、泡盛醸造において付加価値の高い芳醇な香りを持つ古酒の製造に貢献することが期待されるとともに、酒類の醸造において主に糖化酵素によるブドウ糖生成やプロテアーゼによるアミノ酸生成等関わると思われていた麹菌が香り生成にも強く寄与することや、植物のリグニン成分を真菌がどのように利用しているのか等、学術的にも新たな視座を与えている。よって、本学位論文が博士 (農学) の学位論文としての価値を十分に満たしていると判断した。