

最終試験結果の要旨	
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
実施年月日	令和 3 年 1 月 22 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)	
<input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、令和3年1月22日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏 名

眞榮田 麻友美

[質問1] FAを細胞内に取り込んで細胞内で代謝する過程でトランスポーターやその他の4-VGを代謝する酵素などの関係する遺伝子は*alpad*の遺伝子の近傍にありますか？

[回答1] *Aspergillus*属においてFAのトランスポーターや4-VGを代謝する酵素などが同定されていない。また、*alpad*の周辺の領域に関係しそうな遺伝子は現在のところ見出されていない。今後調べていきたい。

[質問2] FAよりもAIPADの誘導能を有する物質があるのは間違いないか。

[回答2] 米ぬかと同濃度のFAで誘導を行っても、米ぬかよりも活性が低い。よって、FAよりも高い誘導性を持つ物質があるか、またはFAと複合的に関わる物質があると考えている。

[質問3] 実験には*Aspergillus luchuensis* var. *awamori*(アワモリ菌)を使用しているが、*A. luchuensis* var. *saitoi*(サイトイ菌)や*A. luchuensis* mut. *kawachii*(カワチ菌：白麹菌)などでAIPAD生産量の違いや4-VG生産量能力などの違いはあるのか？

[回答3] アワモリ菌とサイトイ菌で比較するとアワモリ菌の方が活性が高いことがわかっている。また、アワモリ菌と比較するとカワチ菌は活性が弱く、*Aspergillus oryzae*(黄麹菌)ではほとんど活性がなかった。

[質問4] モロミ中で黒麹菌が死んでいるとなっているが、休止状態にあるとは考えていないのか？

[回答4] 本研究においては、モロミ中の黒麹菌を培養したことがないので、死んでいるのか休止状態にあるのかわかっていないが、モロミから培養しても黒麹菌の生育は観察されなかったという報告がある。

[質問5] 麹菌がモロミ中で死んでしまうのは、モロミ中のエタノールが原因と考えているのか？

[回答5] エタノールというよりは、麹菌は好気性の微生物であり麹を水の中に入れると、酵母により水中の溶存酸素が無くなっていくことで生存できなくなっていると考えている。

[質問6] 米ぬかとFAの両方を混ぜるともっと発現が上がることはないのか？

[回答6] 米ぬかとFAを混ぜて活性測定を行ったことがない。これまでに、米ぬか抽出物に含まれるFA濃度(0.5 mM)よりも高い1 mMや2 mMのFAで活性を測定しても活性が若干上がる程度だったため、米ぬかとFAを混ぜても変化は小さいと考える。

[質問7] 製麹中の4-VGは菌体内に保たれているのか、それとも作られていないのか？麹の4-VG定量はどのように行っているのか。

[回答7] 麹から菌体を分離することができないので、麹中の4-VGが菌体内にあるのか菌体外にあるのかは判別できていない。麹中の4-VGの定量は液体窒素で冷却した麹をマルチピーズショッカーを用いて破砕し、AIPAD阻害剤を含む緩衝液を用いて抽出を行っている。

[質問8] 4-VGのトランスポーターに関するデータはあるのか。

[回答8] 4-VGのトランスポーターに関するデータはないが、測定結果から4-VGを菌体外に放出していることは間違い無い。

[質問9] 破壊株の作製は現場で使われているISH1の野生株で作っているが、実験株である4314株の*AligD*などの相同組み換え効率が高い株で行った方が良いと思うが、なぜ、実用株で行おうと思ったのか。

[回答9] 当初、4314株*AligD*を親株として遺伝子破壊を行ったが、親株のFAD活性(FAを4-VGに変換する活性)が極めて低く、破壊株との差が極めて小さかった。実用菌株であるISH1株は実験株よりも極めて高いFAD活性があり、実際に現場で使用されているため、実用菌株を用いて破壊株の作製を行った。

[質問10] 製麹30時間から35時間の品温は通常上げたままなのか、下げているのか、製麹時間によるAIPADの発現量は製麹の温度に関連しているのか？

[回答10] 麹の品温は、種付けから18時間までは38℃、24時間からは36℃、30時間以降は34℃で保持している。温度を下げたことでAIPADの発現が誘導されたのかは分からない。今後、温度条件がAIPADの発現誘導に関係するのか調べたい。

[質問11] 製麹時間に伴うFA量の増減はどうなっているのか？

[回答11] 野生株においては、モロミ中で製麹時間30時間のFA量が最も高く、その後4-VGの増加に合わせて減少している。これはAIPADが30時間まではほとんど発現しておらず、FAが4-VGに変換されないためだと考えられる。*alpad*破壊株で観察されるFAが実際に製麹時間に伴って遊離するFA量であり、製麹42時間まで増大し、その後は維持されている。

[質問12] *alpad*破壊株でもFAが取り込まれるのであれば、モロミ中のFAが減少すると思いますがどうですか？

[回答12] モロミ中に遊離しているFAを*alpad*破壊株が取り込むのと同時に、菌体外酵素であるフェルラ酸エステラーゼが米からFAを徐々に遊離させるために、結果的にモロミ中のFA量は減少しないものと考えている。

[質問13] 老麹だと発現量が高くなるが、老麹に誘導物質があるとは考えていないのか。

[回答13] 老麹中に含まれる誘導物質については検討していないが、今後、検討していきたい。

[質問14] AIPADの生理的な役割は？

[回答14] FAに抗菌作用があると考えられていたので、破壊株ではFAで生育が抑制されると考えていたが、FA含有培地でも野生株と同様に生育していたので、AIPADはFAの抗菌作用のために機能しているのではなく、他の生理的な役割があると考えている。

[質問15] 米ぬか中に含まれるFA以外の誘導物質に関して、FAはアラビノキシランに結合しているのでアラビノースやキシロースで誘導される可能性があると思うがどうか？

[回答15] アラビノースやキシロースをC源として培養した時の静止菌体反応の結果、FAよりも活性が低かった。アラビノースやキシロース単体では、AIPAD誘導性は低いと考えられる。

[質問16] 蒸留粕に4-VGが沢山残っているのはなぜか。

[回答16] 蒸留時の連続的な加熱によって、モロミ中のFAは徐々に4-VGに変換されるが、4-VGは沸点が高く蒸留液に移ってくるのは蒸留後期である。加熱・蒸留を続ければ、4-VGの蒸留液への移行量は増えるが、蒸留液のエタノール濃度を10%(w/w)でカットする本実験条件においては、FAから変換された4-VGの一部しか蒸留液に移行せず、結果として、蒸留粕に4-VGが沢山残っていると考えられる。