

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 岩 下 和 裕

β -グルコシダーゼは、セロピオースなどの β -1, 4-グリコシド結合を持つ物質の加水分解を触媒する酵素であり、焼酎醸造では甘藷焼酎の特徴香形成において重要な役割を果たしている。甘藷焼酎の特徴香（ネロール、ゲラニオール、リナロール、 α -テルピネオール、シトロネロール）は、その不揮発性の前駆体である配糖体（ネリル- β -グルコシド、ゲラニル- β -グルコシド）が白麹菌の β -グルコシダーゼにより加水分解され、さらに、蒸留時の熱等により化学変化を受け、生成するものと考えられている。本研究は、白麹菌の β -グルコシダーゼの遺伝子構造ならびに酵素化学的諸性質等について検討を行ったもので、4章からなる。

第1章では、白麹菌の β -グルコシダーゼの精製及び諸性質について述べている。生産条件等について、固体培養、液体培養により検討を行い、本菌株は培地中に分泌される「遊離型」の酵素と、菌体細胞壁に結合した状態で存在する「結合型」の酵素を生産していること、また、固体培養を行うと「遊離型」の酵素が多く生産され、液体培養を行うと「結合型」の酵素が多く生産されることを明らかにした。続いて、各酵素の精製を行い、2種類の遊離型 β -グルコシダーゼ（EX-1, EX-2）、と1種類の結合型 β -グルコシダーゼ（CB-1）を精製している。これらの分子質量はそれぞれ、EX-1：145kDa、EX-2：130kDa、CB-1：120kDaと異なっていた。

次に精製酵素の特徴について検討を行い、3種の酵素の至適pHは5.0、至適温度は60℃、また、基質特異性や阻害剤の影響等についてもほとんど差がないことを示している。続いて精製酵素のN末端および、C末端アミノ酸配列について検討したところ、すべての精製酵素が同じアミノ酸配列を持っていることが明らかとなった。さらに、エンドグリコシダーゼHを用いてN結合糖鎖の消化を行ったところ、すべての精製酵素の分子量は、同一の分子質量、約98kDaとなった。これらの結果から、精製した酵素がすべて同一遺伝子産物に由来すると推定した。

第2章では、 β -グルコシダーゼをコードする遺伝子（*bglA*）のクローニング及び遺伝子破壊株の作成による機能解析を行っている。 β -グルコシダーゼCB-1の内部アミノ酸配列をもとに、本遺伝子をクローニングし、*bglA*遺伝子と命名した。cDNA及び染色体DNA塩基配列から、*bglA*は860アミノ酸からなる推定分子質量約91kDaのタンパク質をコードし、6つのイントロンを含んでいることを明らかにした。

次に、*bglA*遺伝子の破壊株の作成を行い、 β -グルコシダーゼ生産について検討を行ったところ、液体培養、固体培養ともに、総 β -グルコシダーゼ活性は10%以下になっており、特に、遊離型 β -グルコシダーゼ活性は1%以下となっていた。この結果から、遊離型 β -グルコシダーゼも*bglA*によってコー

ドされることを明らかにした。また、わずかながら結合型 β -グルコシダーゼ活性が、細胞壁面分に残っていたことから、ウエスタンブロッティングと液体クロマトグラフィーにより検討を行い、 β -グルコシダーゼに相当するシグナルは検出されず、わずかに残った活性は *bgIA* 遺伝子以外の産物であることを確認している。以上のことから、白麹菌が生産する主な β -グルコシダーゼは *bgIA* によってコードされ、培養条件により、その遺伝子産物の局在性および糖鎖の修飾がコントロールされることを明らかにした。

第3章では、白麹菌が生産する可溶性多糖 (ESP) の精製と β -グルコシダーゼの安定性に対する影響について述べている。遊離型 β -グルコシダーゼは、何らかの可溶性多糖類により細胞壁への吸着を阻害され、培地中に遊離の状態でしかも安定に存在しているのではないかと考えられた。そこで、麹の抽出液中から β -グルコシダーゼの安定性に関与する可溶性多糖 (Extracellular Soluble Polysaccharide: ESP) を精製した。その分子量はおおよそ10,000~15,000で、糖組成を検討したところ、マンノース、グルコース、ガラクトースにより構成されることを示した。つづいて精製ESPによる遊離型精製 β -グルコシダーゼ (EX-1、EX-2) の安定化について検討したところ、pH3.0~7.0の範囲、50℃以下の範囲でいずれの遊離型酵素も安定化されることを示した。

第4章では、ESPに影響を受ける他の白麹菌酵素について解析を行い、固体、液体培養間で酵素の局在性が異なる α -グルコシダーゼも、 β -グルコシダーゼ同様にESPにより安定化されることを示し、白麹菌が生産するESPは、多数の酵素の局在と安定性に関与している可能性を示している。

以上、本論文は白麹菌の β -グルコシダーゼの遺伝子構造及び酵素化学的諸性質等について解析したもので、学術上、応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。