

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 松島 健一朗

醤油麹菌 *Aspergillus sojae* は *A. flavus*、*A. oryzae*、*A. parasiticus* とともに *Aspergillus* 属 Flavi 節に分類される糸状菌である。このうち *A. flavus* と *A. parasiticus* は強い発ガン性をもつアフラトキシンを生産する。*A. sojae* と *A. oryzae* は東アジアにおいて麹菌として酒・味噌・醤油などの食品製造に利用されている。本論文は、*A. sojae* が何故アフラトキシンを生産しないのかを分子レベルで明らかにしたものであり、6章からなる。

第1章の序論に続き、第2章では、アフラトキシン生合成に関与する酵素のひとつ VHA (Versiconal Hemiactal Acetate) reductase の単離、精製を行った。アフラトキシン誘導培地で培養した *A. parasiticus* の細胞質画分からアフラトキシン生合成に関与する2つの VHA reductase の精製を行い、それらの諸性質について検討した。DEAE 陰イオン交換カラムで分離される VHA reductase I 及び VHA reductase II の2種類が存在した。基質の2つの光学異性体に対する光学特異性も同じであったことから、2つの VHA reductase はアイソザイムであると推定した。

第3章では、アフラトキシン生合成制御について調べるため、醤油麹菌 *A. sojae* と比較しながらそのメカニズムを検討した。まず *A. sojae* 10株を選定し、それらを形態的・生理的特徴から再分類を試みた。アフラトキシン生産性を調べるためアフラトキシン生合成誘導培地 (YES 培地) および醤油麹におけるアフラトキシン生産を調べたところ、*A. parasiticus* はアフラトキシンを生産したのに対し、*A. sojae* に属する菌を培養してもアフラトキシンは検出されなかった。以上のように選択された *A. sojae* 菌株は分類学的に *A. parasiticus* とは別種であるとともに、これらはアフラトキシンを生産しないことが確認された。

第4章では、醤油麹菌株である *A. sojae* strain477 と、アフラトキシン生合成菌として *A. parasiticus* NRRL2999 の変異株 NIAH-26 を用いて、アフラトキシン生合成経路を触媒する個々の酵素の活性を調べた。YES 培地で培養した NIAH-26 の無細胞抽出物はアフラトキシン生合成の全てのステップの酵素活性を示したのに対し、strain477 からは上記の酵素活性は認められな

った。次にノーザン解析で転写レベルでの遺伝子発現が行われているかどうかを調べた。プローブにはアフラトキシン生合成遺伝子である *pksA*、*nor-1*、*aflR* を用いた。YES 培地で培養した NIAH-26 では *pksA*、*nor-1* はいずれも転写されていたが、strain477 ではこれらアフラトキシン生合成に関する遺伝子の転写産物は検出されなかった。また、同様に種々の醤油麹菌 *A. sojae* 由来の *aflR* の転写発現を調べたところ、いずれも *aflR* は検出されなかった。このことから *A. sojae* ではアフラトキシン誘導条件下において生合成を促進する機能になんらかの欠損があり、アフラトキシン生合成酵素が生産されないと考えられた。

第5章では、アフラトキシン生合成を正に調節する転写因子である AflR の解析を行った。*A. sojae* の *aflR* 遺伝子の塩基配列を決定し、385 残基目のアルギニンが停止コドンになっていることを見いだした。これにより、*A. sojae* の *aflR* 遺伝子の翻訳産物(AflRas)は *A. parasiticus* のもの(AflRap)に較べてカルボキシル末端の 62 アミノ酸を欠失していた。酵母中において *GAL1::lacZ* 遺伝子の発現システムを利用して、AflR タンパク質の転写活性化部位の GAL4 転写活性を測定した結果、AflRas は AflRap に比べて転写活性が 15%にまで低下していることがわかった。すなわち *A. sojae* においては転写因子 AflR がその特異的な変異のために機能を失っており、そのためにアフラトキシン生合成経路は機能しないと推定された。第6章では、総合考察を行っている。

以上、本研究は、醤油麹菌 *A. sojae* におけるアフラトキシン生合成不全に関して詳細な解析を行なうとともに、これらの知見をもとに醤油醸造における *A. sojae* の安全性を確立したものであり、学術上、応用上貢献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。