

審査の結果の要旨

氏名 伊藤 考太郎

グルタミン酸はしょうゆのうま味で中心的な役割を果たす。これはおもに、原料タンパク質が黄麹菌のプロテアーゼでアミノ酸まで分解された中のグルタミン酸と、加水分解で生じたグルタミンが黄麹菌のグルタミナーゼにより変換されたグルタミン酸に由来する。黄麹菌の示すグルタミナーゼ活性としょうゆ諸味中のグルタミン酸量との間に正の相関が見られたことから、しょうゆ醸造でのグルタミン酸生成には、黄麹菌由来のグルタミナーゼが重要であると古くから考えられていた。しかし、黄麹菌のグルタミナーゼは生産量が少なく、菌体に結合しており、また黄麹菌の多量のプロテアーゼのため酵素精製が難しく、タンパク質側からしょうゆ醸造に重要なグルタミナーゼを知ることが困難であった。本論文は、しょうゆ醸造に用いる *Aspergillus sojae* と *Aspergillus oryzae* の全グルタミナーゼ遺伝子を決定し、酵素的特徴や各種変異株の特徴を詳細に分析して、実際にしょうゆ醸造にとって重要なグルタミナーゼを同定するとともに、しょうゆ醸造に適したグルタミナーゼの開発を検討した研究をまとめている。本論文は、研究背景を記述した序論、および本論4章と総括から構成される。

第1章では *Cryptococcus* 属酵母の耐塩性グルタミナーゼとその遺伝子を解析している。黄麹菌由来のグルタミナーゼは耐塩性に乏しいため、しょうゆ醸造により適した耐塩性グルタミナーゼの開発が望まれていた。そこで、耐塩性が知られていた *Cryptococcus* 属酵母の2種のグルタミナーゼについて部分アミノ酸配列を決定して遺伝子を単離した結果、既知のグルタミナーゼや機能既知のタンパク質との相同性が低く、アミダーゼモチーフを持つ酵素ファミリーの中で、これらが新規の GAH サブファミリーを構成することを提唱した。

第2章では、第1章で同定した *Cryptococcus* 属酵母の耐塩性グルタミナーゼ遺伝子と相同な遺伝子を、公開された *A. oryzae* RIB40 株のゲノム情報から探索し、相同性の高い4遺伝子を見出したが、このうち EST 解析で発現が確認できたのは *AogahA* 遺伝子だけであった。この *AogahA* のオルソログ遺伝子を、*A. oryzae* よりグルタミナーゼ活性が高いとされる *A. sojae* から単離して、*A. oryzae* を宿主に用いて大量発現させ、この酵素 AsGahA を精製して諸性質を決定した。遊離のグルタミンやアスパラギン以外に、ペプチド C 末端

のグルタミン残基やアスパラギン残基にも作用し（ペプチドグルタミナーゼ／アスパラギナーゼ活性）、その後カルボキシペプチダーゼ等でグルタミン酸を生じる機構を見出した。

第3章では、*A. oryzae* RIB40株のゲノム情報、および研究中に公開された*A. sojae* 4239株のゲノム情報から、既知のグルタミナーゼ遺伝子と相同性のある遺伝子を網羅的に探索し、*A. oryzae* ゲノムに12種、*A. sojae* ゲノムに10種のグルタミナーゼ遺伝子を見出して相同性や反応特異性などからType I～IVの4種に分類した。さらに*A. sojae*の10種のグルタミナーゼ遺伝子の単独破壊株を作製して菌体のグルタミナーゼ活性を比較したところ、Type Iの*AsgahB*遺伝子の破壊でグルタミナーゼ活性が1/10以下に低下した。この遺伝子破壊の効果は*A. oryzae*でも確認され、しょうゆ麴の主要なグルタミナーゼ活性が*gahB*遺伝子に由来することを示した。さらに、このAsGahB酵素を精製して性質を分析し、AsGahA酵素と類似の、ペプチドグルタミナーゼ／アスパラギナーゼ活性を見出した。

第4章では、各種遺伝子破壊株を用いたしょうゆの試験醸造で実際のグルタミン酸生成を評価している。試験醸造では、*A. sojae*のどのグルタミナーゼ遺伝子単独破壊株でもグルタミン酸の最終生成量がほとんど低下しなかった。そこで、各種の多重遺伝子破壊株を作製したところ、Type Iの*AsgahA*と*AsgahB*、Type IIの*AsggtA*、Type IVの*Asgls*という4遺伝子を同時に破壊すると、全グルタミナーゼ遺伝子破壊株と同等にグルタミナーゼ活性が1/100以下に低下し、それらを用いた試験醸造後のグルタミン酸量も約60%減少した。しょうゆのグルタミン酸生成には、これら4つのグルタミナーゼが相補的かつ相互に作用し、中でもType Iの*AsgahA*と*AsgahB*は活性を補完しあい、しょうゆにおいて高いグルタミン酸含量を得るためにとくに重要であることを明らかにした。

最後に、ゲノム情報のない時期（第1章）、*A. oryzae*のゲノム情報の開示後（第2章）、*A. sojae*のゲノム情報の開示後（第3、4章）にわたる成果をまとめた本研究を総括し、生化学的実験と試験醸造さらに工場での醸造における反応の違いを論じ、本研究を踏まえた計画的育種の展望を論じている。

本研究は、しょうゆのうま味、グルタミン酸を生成する黄麴菌のすべてのグルタミナーゼを遺伝子側から解明し、しょうゆ醸造における反応の寄与を多角的に評価して、これまで詳細が不明であったグルタミン酸の具体的生成機構をほぼ最終的に決定したと言える。

これらの研究成果は、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。