

Title	Biochemical study on microbial degradation and production of functional carboxylic acid derivatives(Abstract_要旨)
Author(s)	Takehara, Munenori
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2013-03-25
URL	http://hdl.handle.net/2433/175085
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	竹 原 宗 範
論文題目	Biochemical study on microbial degradation and production of functional carboxylic acid derivatives (機能性カルボン酸誘導体の微生物分解と生産に関する生化学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>カルボン酸やその誘導体は種々の生理活性を示す機能性の化合物であり、また医薬品や香料などの化学合成における重要な中間体かつ最終生成物である。カルボン酸誘導体であるエステル化合物のうち、芳香環を有するカルボン酸エステルについては、微生物分解に関する研究報告は少なく、それらの生分解過程の解明や、酵素によるケミカルリサイクル技術の確立が望まれている。また同誘導体のアミド・ペプチド化合物のうち、単一種のアミノ酸単位から構成されるホモポリペプチドについては、生合成に関する知見が乏しい。このような背景から、本論文は芳香族カルボン酸エステル並びにホモポリペプチドの酵素および微生物による物質変換技術の開発を目指し、得られた基礎的な知見と応用研究に関する成果を取りまとめたものであり、3章から構成される。</p> <p>第1章では、芳香族カルボン酸エステルの生分解について検討することを目的に、テレフタル酸ジエチルを唯一の炭素源として生育可能な微生物を土壌よりスクリーニングすることで、<i>Sporosarcina</i>属細菌eSP04株を分離した。本菌株より単離精製したカルボキシルエステラーゼ (EstAC) は、分子量43,000の単量体酵素で、至適反応pH 9、至適反応温度40°Cを示し、セリン酵素阻害剤であるフェニルメタンスルホニルフルオリドの存在下で完全に酵素活性を失った。EstACは芳香族モノカルボン酸エステル類およびジカルボン酸エステル類に加え、フェニル酢酸やフェニルプロピオン酸誘導体のエステルを幅広く加水分解できることを明らかにした。また、EstACをコードする遺伝子を大腸菌にクローニングし、塩基配列を決定した。推定アミノ酸配列の解析により、EstACはβ-ラクタマーゼやDD-ペプチダーゼと高いアミノ酸配列相同性を示した。さらに、部位特異的変異体のエステラーゼ活性の評価より、本酵素はSer-Xaa-Xaa-LysおよびTyr-Xaa-Xaa-Asnモチーフを触媒中心に有するカルボキシルエステラーゼファミリーVIIIに分類できた。</p> <p>第2章では、微生物起源のホモポリペプチドとして、ポリ(ε-L-リシン) (ε-PL) の新規生産菌の取得を試みた。ε-PLはL-リシンのα-位のカルボキシル基とε-位のアミノ基がペプチド結合したイソペプチドであり、食品保存料としての使用が認められている。塩基性ポリマーと不溶性のコンプレックスを形成するアゾ色素を用いて土壌サンプルをスクリーニングすることで、菌体外にε-PLを生産する微生物を多数分離した。このうち放線菌<i>Streptomyces aureofaciens</i> USE-82株が分泌生産するε-PLの重合度を、イオン会合クロマトグラフィーで解析したところ、市販ε-PLの生産菌である<i>Streptomyces albulus</i> NBRC 14147株由来ε-PLと比較して、USE-82株は低重合度体を生産していることを明らかにした。グルコースを炭素源とした場合と比べて、グリセロール炭素源培地でε-PLの低重合度化が促進されたが、生産されるε-PLはいずれも分子量分布が狭い単分散性を示した (グルコース培養 [重合度n=10-21、数平均分子量</p>			

$M_n=2,080\pm 20$ 、多分散度 $M_w/M_n=1.02$]；グリセロール培養 [$n=5-20$ 、 $M_n=1,660\pm 20$ 、 $M_w/M_n=1.06$]。USE-82株が生産する低重合度 ϵ -PLは、グラム陰性並びに陽性の真正細菌に抗菌活性を示し、酵母に対しても強い抗菌活性を有することを見出した。また、クエン酸回路を構成する有機酸（クエン酸や α -ケトグルタル酸）を添加して培養することで高い ϵ -PL生産性（ 4.5 g L^{-1} ）を達成できた。

第3章では、土壌より分離した*Streptomyces celluloflavus*の2菌株が、 ϵ -PL（ $n=10-29$ ）に加え、これとは異なる塩基性ポリペプチドを菌体外に分泌生産していることを見出した。精製したポリペプチドの酸加水分解物の解析により、それらの構成単位はいずれも、非タンパク質性のアミノ酸であるL-ジアミノブタン酸であることがわかった。また本ポリペプチドは、二次元NMR解析によりジアミノブタン酸の α -位のカルボキシル基と γ -位のアミノ基がペプチド結合した新規物質ポリ(γ -L-ジアミノブタン酸)（ γ -PAB）であることを明らかにした。 ^1H NMRスペクトルより、これら γ -PABの平均重合度を21、また $M_n=2,100$ と見積もった。 γ -PABはグラム陰性および陽性の真正細菌に対し抗菌性を有し、また酵母に対しても良好な抗菌活性を示した。生合成される ϵ -PLおよび γ -PABは、培養条件によらずそれぞれ単一モノマーから構成されており、いずれも基質特異性の高い重合酵素の寄与を示すことができた。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

カルボン酸やその誘導体は、抗菌性をはじめ様々な生理活性を示す機能性の化合物であり、また医薬品・香料や化成品などの化学合成における重要な中間体かつ最終生成物である。本研究は、これら有用な化合物の低環境負荷を特徴とする物質変換技術の開発を目指し、微生物酵素による芳香族カルボン酸エステルの加水分解、および微生物によるポリペプチドの合成についての基礎的知見を得ることを目的として行われたものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. 芳香族カルボン酸エステルであるテレフタル酸ジエチルを分解するエステラーゼ生産菌を分離し、精製したエステラーゼ (EstAC) が芳香族カルボン酸エステルおよびその類縁エステルを幅広く加水分解できる基質特異性が非常に広い酵素であることを明らかにした。当該酵素遺伝子の塩基配列解析より、EstACはエステラーゼでありながら、アミド加水分解酵素と高い相同性を有することを示した。
2. ポリ(ϵ -L-リシン) (ϵ -PL) を生産する土壌放線菌を多数分離し、そのうち低重合度の ϵ -PLを高生産する菌株について詳細な検討を行った。グルコース炭素源培養で生産される ϵ -PL (重合度 $n=10-21$) と比較して、グリセロール炭素源培地で ϵ -PLの低重合度化 ($n=5-20$) が促進されることを示した。低重合度 ϵ -PLは、真正細菌に加え、酵母に対しても抗菌活性を示すことを明らかにした。
3. 放線菌により ϵ -PLとともに生産される塩基性の新規ポリペプチドを発見した。二次元NMR等の解析により、本ポリペプチドの化学構造をポリ(γ -L-ジアミノブタン酸) (γ -PAB) と決定した。 γ -PAB (平均重合度21) は、真正細菌に加え、酵母に対しても抗菌活性を示すことを明らかにした。

以上のように、カルボン酸誘導体の酵素および微生物細胞による物質変換技術の確立並びに抗酵母性ペプチド化合物の発見は、加水分解酵素の分類法に新たな視座を与えるのみならず、新規な抗菌性素材の開発に資するものであり、応用微生物学、酵素化学、生命有機化学、生物機能変換学の発展に寄与する所が大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成25年2月12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降