

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	HUI CHUN WAI
論文題目	Screening of food-related microorganisms for tomatinase activity and its application in tomatidine production (トマチナーゼ活性を有する食品微生物の探索およびトマチジン生産への応用について)		
(論文内容の要旨)			
<p>トマチジンは、トマト由来の二次代謝産物であり、主にその配糖体である<math>\alpha</math>-トマチンとして茎・葉・未熟果実などすべての部位で蓄積されている。また、筋萎縮抑制効果や抗がん・抗ウイルスなどの生理活性を有することから、高齢化社会において機能性食品・サプリメントとしての応用が期待されている。現在、<math>\alpha</math>-トマチンの糖鎖を加水分解により切断しトマチジンに変換する方法として、塩酸による酸加水分解法や植物病原菌由来のトマチナーゼによる酵素的加水分解法が報告されているが、どちらの方法も安全面での課題があり、健康促進作用を有するトマチジンの有効な生産法は確立されていない。</p> <p>本論文では、トマチナーゼ活性を有する食品関連微生物の探索および目的反応を触媒する酵素の諸特性の解明を行い、得られた知見に基づき、トマトの葉抽出液を原料とする選抜菌株によるトマチジン生産を検討した。</p> <p>第一章では、天然から単離した食品関連微生物、もしくは保存機関から購入した様々な発酵食品関連微生物を用いて、<math>\alpha</math>-トマチンからのトマチジン生産に有効なトマチナーゼ活性を有する菌株のスクリーニングを行った。乳酸菌、麹菌、納豆菌、酵母など計1,016株の食品関連微生物を各々に適した栄養培地 (10 mLまたは15 mL) にて培養し、得られた菌体を約1 mMの<math>\alpha</math>-トマチンを含む500 <math>\mu</math>Lの反応液に懸濁、37 °Cで24時間振とうすることで休止菌体反応に供した。その結果、<i>Aspergillus</i>属<i>Nigri</i>節の黒麹菌11株がトマチナーゼ活性を示した。さらに、各黒麹菌の菌糸、分生子および培養上清におけるトマチナーゼ活性を比較し、高いトマチジン生産能を示し、かつ非毒素生産株である<i>Aspergillus luchuensis</i> JCM 22302株を選抜した。本菌は、スクリーニングで使用した反応条件において菌糸および分生子にトマチナーゼ活性を示したが、取り扱いが容易な分生子に着目し、反応条件の検討を行った。その結果、本菌の分生子が、pH 5.5 (50 mM酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液)、37 °Cの反応条件下にて高活性を示すことを明らかにした。また、最適反応条件下で<i>A. luchuensis</i> JCM 22302株の分生子を用いて反応の経時変化を調べると、高速液体クロマトグラフィー分析にて反応中間体の存在が確認されなかったことから、<i>A. luchuensis</i> JCM 22302株由来のトマチナーゼは<math>\alpha</math>-トマチンの糖鎖を一段階で加水分解し、アグリコンであるトマチジンを生成すると示唆された。</p> <p>第二章では、基質である<math>\alpha</math>-トマチンを培地に添加し<i>A. luchuensis</i> JCM 22302を培養すると、培養上清にも酵素が分泌されることを見いだした。続いて、培養上清より、限外ろ過、および、疎水性相互作用カラム・イオン交換カラム・ゲルろ過カラムの三種類のカラムを用いたクロマトグラフィーによりトマチナーゼを精製した。精製タンパク質は、SDS-PAGE解析において分子量約120,000の単一バンドとして観察された。このバンドのN末端アミノ酸配列を解析し、得られた配列を基にBLAST検索を行った結果、精製した目的酵素のN末端アミノ酸配列は麹菌の<math>\beta</math>-ガラクトシダーゼのアミノ酸配列と高い相同性を示すことを見いだされた。また、精製したトマチナーゼは、N-結合型糖鎖切断酵素であるEndo Hにて処理することにより、SDS-PAGE解析においてより低分子のバンドとして観察され、本酵素が糖鎖修飾を受けていることが示唆された。一方、糖鎖切断のトマチナーゼ活性への影響を評価したところ、糖鎖切断はトマ</p>			

チナーゼ活性には影響しなかった。

第三章では、トマトの葉を天然の $\alpha$ -トマチン源とする黒麹菌分生子によるトマチジン生産を検討した。トマトの収穫過程で廃棄される茎・葉および未熟果実には、 $\alpha$ -トマチンが豊富に含まれている。トマト葉抽出液を作製し分析したところ、約1 mMの $\alpha$ -トマチンが高速液体クロマトグラフィー質量分析により確認できた。そこで、*A. luchuensis* JCM 22302株の分生子をトマト葉抽出液に加え、最適温度 (37 °C) にて24時間反応させた結果、60 mol%の $\alpha$ -トマチンがトマチジンに変換された。さらに、24時間反応後の反応液中に残存する分生子を遠心分離により回収し、回収した分生子に新たなトマト葉抽出液を加え2回目の24時間反応を行った結果、残存分生子にトマチナーゼ活性が維持されていることが確認された。二回目の反応開始時、分生子のトマチナーゼ活性が既に一度目の反応の間に誘導されていたため、変換率は初回反応時の60 mol%から66 mol%まで上昇した。本反応は、約1 mMの $\alpha$ -トマチンを含有するトマト葉抽出液を凍結乾燥してから水を加えて10倍濃縮になるように再懸濁した濃縮トマト葉抽出液を用いても有意に進行し、同様に調製した2倍濃縮液を用いた際に最も高い変換効率が観察された。以上により、トマト葉抽出液を原料とする黒麹菌分生子をもちいたトマチジン生産法を確立した。

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。

(論文審査の結果の要旨)

筋萎縮抑制効果、抗がん、抗ウイルス等の様々な生理活性を有するトマチジンが注目されており、健康食品およびサプリメント産業において、より安全かつ効率的な生産手法の確立が求められている。本論文は、食品関連微生物に $\alpha$ -トマチンからトマチジンを生産できる菌株を探索し、高いトマチナーゼ活性を示した菌株を対象に生理学的、酵素学的諸特性を解析した。さらに、得られた知見を基に、天然の $\alpha$ -トマチン源としてトマト葉抽出液を用いて、効率的なトマチジン生産法を確立した。評価すべき点として、以下の3点があげられる。

1. *Aspergillus*属*Nigri*節の11株の黒麹菌がトマチナーゼ活性を示し、 $\alpha$ -トマチンの糖鎖を一段階で切断することを明らかにした。本酵素はこれまで、植物病原菌のみに見いだされ、トマトへの感染機構に関与すると報告されていた。本論文での食品関連微生物におけるトマチナーゼ活性の発見は新規な知見である。また、*A. luchuensis* JCM 22302株の分生子を用いた反応条件の最適化により、約1 mMの $\alpha$ -トマチンを含む反応液から変換率78 mol%にてトマチジンを生産することができた。
2. *A. luchuensis* JCM 22302株由来のトマチナーゼは基質である $\alpha$ -トマチンによって誘導され、培養上清へ分泌されることを見いだした。さらに、本酵素が麹菌の $\beta$ -ガラクトシダーゼと高いアミノ酸配列相同性を示し、*N*-結合型糖鎖が付加されていることを明らかにした。また、糖鎖の除去が酵素活性に影響しないことを明らかにした。
3.  $\alpha$ -トマチンを含むトマト葉抽出液を基質とし、*A. luchuensis* JCM 22302株の分生子を活用するトマチジンの効率生産が可能であることを見いだした。さらに、本菌の分生子は繰り返し使用が可能であること、濃縮トマト葉抽出液を用いても有意に反応が進行することを見いだした。これらにより、トマト葉抽出液を原料とする黒麹菌分生子を用いたトマチジン生産法を確立した。

以上のように、本論文は、食品関連微生物を対象とした探索研究から新規に見いだしたトマチナーゼ高活性の*Aspergillus*属*Nigri*節の黒麹菌*A. luchuensis* JCM 22302株に関して、その生理学的・酵素学的特徴や培養特性を解明し、その知見を、基質である $\alpha$ -トマチンの天然供給源としてのトマト葉抽出液を用いる、安全かつ効率的なトマチジン生産に応用したものであり、発酵生理学、応用微生物学、応用生化学の発展に寄与するところが大きい。

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、令和5年7月20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) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表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（学位授与日から3ヶ月以内）