

氏 名	すずき たけし 鈴 木 剛 司
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2465 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Enzymological Studies of Cold-active Esterases from Psychrotrophic Bacteria. (低温菌由来の低温活性エステラーゼに関する酵素学的研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 江 崎 信 芳 教 授 清 水 昌 教 授 加 藤 暢 夫

論 文 内 容 の 要 旨

近年、極限環境微生物やそれらの生産するユニークな酵素の開発が進み、低温菌や低温で高い活性をもつ酵素（低温活性酵素）に対する関心も高まりつつある。しかし、好熱菌の耐熱性酵素と比較すると、低温活性酵素に関する研究は遅れており、特に応用面の開発は進んでいない。本研究は、応用微生物学と応用酵素学の視点で低温菌やその低温活性酵素を取り上げ、それらに関する基礎的な特性解明と応用面の開発をめざしたものである。具体的には、低温で速やかに生育し、高い脂質分解能をもつ微生物に的を絞って、寒冷地土壌や深海水などから優れた菌株を単離するとともに、その微生物学的な特性を解明し、さらに低温活性脂質分解酵素の産業利用の可能性を検討したものである。その成果は以下のように要約される。

1. 寒冷地土壌や深海水などから脂質分解活性をもつ低温菌をスクリーニングし、低温での生育速度が高く、低温で高い脂質分解活性を示す菌株を単離した。最も高い脂質分解活性を示す菌株 (No. 6) を選別し、その生理性状試験と 16S rDNA の塩基配列解析の結果に基づいて本菌を *Acinetobacter* 属細菌の 1 菌株と同定した。本菌は、Tween 80 を含む培地で培養したとき、熱に不安定であるが低温での相対活性が高い、低温活性酵素特有の性質を示すリパーゼを菌体外に生産した。本酵素の基質特異性は広く、種々の脂肪酸エステルに作用することから、低温での脂質分解に幅広く利用できると指摘している。

2. 種々のエステル加水分解酵素によって分解可能なトリブチリンをスクリーニングの基質とすることにより、*Acinetobacter* sp. No. 6 から、4 種のエステル加水分解酵素遺伝子を単離し、その塩基配列を決定した。4 種の酵素のアミノ酸配列のいずれにもセリンプロテアーゼファミリーのコンセンサス配列である Gly-X-Ser-X-Gly が見いだされた。しかしながら、相互のアミノ酸配列相同性は低く、タンパク質データベースを用いて検討したところ、それぞれ別種のタンパク質サブファミリーに属することが明らかになった。

3. 得られたエステル加水分解酵素遺伝子のうち A17 にコードされる酵素は、芳香族化合物代謝経路に位置する β -ケトアジピン酸エノールラクトンヒドロラーゼと顕著な相同性を示し、実際に本酵素は各種カルボン酸のビニルエステルに対して高い分解活性を示した。一方、A1 遺伝子にコードされる酵素は、従前の酵素にはみられないユニークな基質特異性を示すことから、新奇のエステラーゼと推論した。いずれの酵素も低温での活性が高く、常温酵素の場合と比較して反応の活性化エネルギーが顕著に低いことが明らかになった。また、これらの酵素を利用すれば、有機溶媒中、 -30°C の低温下において、効率よくエステル類を合成することができた。

4. 低温菌 *Acinetobacter* sp. No. 6 は低温で高いリパーゼ生産能をもつことから、低温下での油脂分解に本菌を利用する可能性を検討し、実際に本菌を用いて 4°C 、5 日間の処理で 60% 以上的大豆油を分解できることを明らかにした。また本菌は、A17 遺伝子にコードされる低温活性エステラーゼも生産することから、低温下での芳香族化合物の分解にも利用できると推論され、検討の結果、本菌を用いれば廃液に含まれる種々の芳香族化合物を低温下で速やかに分解できることが明らかにされた。

論文審査の結果の要旨

低温菌や低温活性酵素にはユニークな応用面があると期待されているが、技術的な問題にも起因して研究は進展していない。本研究は、寒冷地土壌や深海水などから低温菌を単離し、それらの菌の生産する低温活性脂質分解酵素について、その特性を解明し、応用法を検討したものであり、評価すべき点は次のとおりである。

1. 低温での生育速度が高く、低温で高い脂質分解活性を示す *Acinetobacter* sp. No.6 を単離し、低温活性酵素特有の性質を示すリパーゼを効率よく生産することを明らかにした。*Acinetobacter* 属細菌は廃液処理にしばしば利用されており、低温下での廃液処理に適用可能な低温菌を単離した意義は大きい。また、本菌の生産する低温活性リパーゼにも種々の応用面が期待され、応用酵素学的な観点からも本研究は評価できる。

2. トリブチリン分解能を指標とする低温下でのスクリーニング法を駆使することで、*Acinetobacter* sp. No.6 から特徴ある低温活性エステラーゼ遺伝子を単離することに成功した。不安定で、取り扱いが困難な低温活性酵素の遺伝子を効率よくクローニングできたことは、注目に値する。また、取得したエステラーゼ類がそれぞれ別種のサブファミリーに属することを明らかにしており、エステル分解酵素群の新しい網羅的単離法を提示した意義は大きい。

3. クローニングで得た低温菌エステラーゼの低温活性酵素としての特性を明らかにすることで、酵素化学的に重要な知見を得ている。また、有機溶媒中での酵素反応を試み、低温活性エステラーゼを用いると、 -30°C においてもエステル合成反応が効率よく進行することを実証した。これは、低温活性酵素が不安定な物質の化学変換に適することを示唆するもので、注目に値する。

4. 低温菌を利用することで、油脂類や芳香族化合物を低温で効率よく分解できることを実証した。冬季、低温下で廃液処理するのに、低温菌が役立つと考えられてきたが、それに対する現実的な成果を提示したものとして評価できる。

以上のように本論文は、低温活性酵素の特性や応用法に関してユニークな視点で新知見を提示しており、応用微生物学および酵素学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、平成15年1月9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。