

氏 名	ホシ 洪	スシ 承	ビョウ 杓
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)		
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2366 号		
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 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	Studies of Thermostable Enzymes from Symbiotic Thermophiles Isolated from Compost (堆肥から単離した共生好熱菌の耐熱性酵素に関する研究)		
論文調査委員	(主 査) 教 授 江 崎 信 芳 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 熊 谷 英 彦		

論 文 内 容 の 要 旨

培養できない微生物の機能開発は、応用微生物学における重要課題の一つとなっている。共生菌は、共生者が共存しなければ単独で生育できないことから、培養できない微生物の中には、共生菌も多数含まれると考えられる。共生現象の機構解明もさることながら、共生関係にある微生物、特にそれが耐熱性酵素を生産する好熱菌であれば、その開発には産業上重要な意味がある。本研究は、堆肥から単離した好熱性共生菌についてその微生物学的な特性を解明するとともに、それらの菌の生産する耐熱性酵素の利用法を明らかにしたものである。その結果は以下のように要約される。

1. 産業上有用な耐熱性チロシンフェノールリアーゼを生産する好熱菌を堆肥からスクリーニングし、2種類の好熱性桿菌よりなる共生系を単離することに成功した。一方は、*Bacillus*に属する好気性桿菌(SK-1菌)であり、単独での培養が可能で、チロシンフェノールリアーゼを生産しないことを明らかにした。もう一方の菌は、*Bacillus* sp. SK-1に依存して生育するが、SK-1菌の培養液上清と細胞抽出液の両者を培地に加えることで、単独での培養が可能となることを見いだした。本菌を単独で培養し、微生物学的な諸性質ならびに16SrDNAの配列解析を行った。その結果、本菌はグラム陰性菌とグラム陽性菌の間に位置する特異なグループに属することを見だし、*Symbiobacterium toebii* SC-1と命名した。パルスフィールド電気泳動による解析から、SC-1菌は約2.8Mbpの環状染色体DNAをもつと推論した。

2. SC-1菌の染色体DNAよりチロシンフェノールリアーゼ遺伝子をクローニングし、本酵素を大量発現させるとともに、その酵素学的諸性質を解明した。本酵素は、*Citrobacter freundii*, *Erwinia herbicola*, *Escherichia intermedia*などのチロシンフェノールリアーゼと、高いアミノ酸一次配列相同性を示すものの、これらの菌の酵素とは異なり、高い耐熱性をもつことを見いだした。また、ピロカテコールに対する耐性も高く、本耐熱性酵素を用いることによって、L-ドーパを効率よく生産できることを明らかにした。さらに、本耐熱性酵素を用いることで、フェノール含有廃水からフェノールを効率よく除去する方法も開発した。フェノール含有廃水にピルビン酸とアンモニアを加え、フェノールを除去するとともに、溶解度の低いL-チロシンを結晶として回収する方法の確立に成功した。

3. SK-1菌から耐熱性D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子をクローニングし、高発現させるとともに、本酵素を精製してその酵素学的諸性質を明らかにした。SK-1菌のD-アミノ酸アミノトランスフェラーゼは、他の菌の酵素とは異なり、幅広い基質特異性をもつことを見いだした。本酵素を用いることにより、D-チロシンやD-フェニルアラニンなどの芳香族D-アミノ酸を、対応する α -ケト酸から効率よく生産する方法を開発した。また、SK-1菌のD-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーターを使えば、*E. coli*を宿主とする系で、外来遺伝子を大量発現させることができることを見だし、高発現ベクターpHCE系の開発に成功した。特に、本プラスミドにSK-1菌由来のグルタミン酸ラセマーゼ遺伝子を導入すると、グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子欠損変異株の中でさらに安定に保たれることを見いだした。これによって、抗生物質を使わない新しい高発現宿主ベクター系を開発することに成功した。

論文審査の結果の要旨

共生関係にある微生物は、純粋分離を基盤とする従来の培養法では培養できないために、その機能開発が遅れている。共生菌を含め、培養できない微生物の中には、産業上有用なものも多数あると期待される。本研究は、耐熱性チロシンフェノールリアーゼをはじめとする有用な酵素を生産する共生菌を見だし、それぞれの微生物学的な特性を解明するとともに、生産される有用酵素のユニークな応用法を開発したものである。評価すべき点は次のとおりである。

1. 耐熱性チロシンフェノールリアーゼを生産する好熱性共生菌 SC-1 の単離に成功した。単独での培養が可能な共生菌、SK-1 菌の培養液上清と細胞抽出液の両者を培地に加えることにより、SC-1 菌の単独培養を可能にしたことは、高く評価できる。SC-1 菌の単独培養が可能となったために、本菌の微生物学的な解析が進み、その結果、本菌はグラム陰性菌とグラム陽性菌の間に位置する特異なグループに属することが明らかになった。この意義は大きい。
2. SC-1 菌の耐熱性チロシンフェノールリアーゼ遺伝子をクローニングすることで、本酵素の大量発現が可能となり、その酵素学的諸性質も解明できた。本酵素のピロカテコールに対する高い安定性と耐熱性を利用して、L-ドーパを効率よく生産する系を確立したことは評価できる。また、本酵素を用いるフェノール含有廃水からのフェノール除去法も独創的である。フェノールを除去するだけでなく、L-チロシンとして回収する点がユニークである。
3. SK-1 菌の耐熱性 D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼにも着眼し、本酵素の幅広い基質特異性を利用して、D-チロシンや D-フェニルアラニンなどの芳香族 D-アミノ酸を効率よく生産する系を開発したことは評価できる。また、本酵素遺伝子の強力なプロモーターとともに、SK-1 菌のグルタミン酸ラセマーゼ遺伝子も導入することで、安定性が高く、抗生物質を必要としない新しい高発現宿主ベクター系を開発した意義も大きい。

以上のように本論文は、共生菌の機能開発に関して一つの指針を与えるとともに、耐熱性酵素ならびにその遺伝子のユニークな応用面も開発しており、応用微生物学、生化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13年1月11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。