

(第5号様式)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	黒石川 嵩幸
審査委員	主査 渡邊 彰 副査 永田 信治 副査 櫻庭 春彦 副査 渡邊 誠也 副査 吉原 明秀

論文名

Studies on a novel alditol oxidase produced by *Penicillium* sp. KU-1 isolated from soil

(土壌から単離した *Penicillium* sp. KU-1 株が生産する新規アルジトール酸化酵素に関する研究)

審査結果の要旨

希少糖は、自然界にその存在量が少ない単糖類とその誘導体と定義されている。近年の研究から、希少糖の潜在的な生理活性が明らかにされ、食品、農業、医療など幅広い分野における応用の可能性が見出された。その一方で、生理活性が明らかとなっていない希少糖は未だに数多く存在しており、次世代の機能性糖類として多くの可能性を秘めている。このような希少糖に関する研究では、従来、効率的な生産方法の構築が大きな課題となってきた。これまでの希少糖生産は、異性化酵素を利用する生産戦略を主軸としてきたが、異性化反応では化学平衡により生産物の収率が低下することが多く、基質と生産物の分離も必須となるため、ほとんどの場合、効率的な生産は困難となる。このような問題を克服するために、申請者は酸化酵素を利用した希少糖の生産方法に着目して研究を行ってきた。酸化酵素が触媒する反応は不可逆反応であり、理論上 100%の変換率で基質が生成物に変換されるため、従来の方法よりも効率的な希少糖生産が可能になると考えられる。

本研究では、土壌から単離した *Penicillium* sp. KU-1 株が生産するアルジトール酸化酵素を希少糖生産に応用することを目的とし、アルジトール酸化酵素の生産条件、酵素学的諸性質の解析、異種宿主発現系の構築、および固定化酵素法を用いた希少糖生産について検討を行った。

第1章では、アルジトール酸化酵素の生産に適した *Penicillium* sp. KU-1 株の培養条件

について検討を行った。その結果、糸状菌の酵素生産に古くから利用される小麦フスマを材料とする固体培地は、本菌におけるアルジトール酸化酵素の生産においても優位性があり、米ぬかを材料とする固体培地から得られた抽出液と比較すると8倍もの差が見られた。また、本菌は液体培養ではアルジトール酸化酵素を細胞外に全く生産しなかったため、固体培地に生育した時にのみ分泌生産される酵素であることが示唆された。

第2章では、アルジトール酸化酵素を精製し、その酵素学的諸性質について検討を行った。得られた精製酵素の解析の結果、本酵素は、既知のアルジトール酸化酵素が補因子とするフラビンアデニンジヌクレオチドに特徴的な吸収スペクトルを示さなかった。また、本酵素は既知のアルジトール酸化酵素と比較すると基質特異性がたいへん広く、19種類ものアルジトールに活性を示した。また、L-エリスロ配位を持つアルジトールに高い活性を示す傾向が見られ、エリスリトールに最も高い活性を示した。さらに、反応生成物の解析により、本酵素はL-グルコースをはじめ、L-エリスロースやL-リボース、D-リキソースなどの希少糖の生産に利用できる可能性が示された。

第3章では、アルジトール酸化酵素をコードする遺伝子の解析を行い、本酵素の大量発現系の構築について検討を行った。本酵素の内部アミノ酸配列と本菌のゲノム解読情報との照合から、本酵素のオープンリーディングフレームを特定し、解析を行った。その結果、本酵素は糸状菌由来のガラクトース酸化酵素と比較的高い相同性を示した。引き続き、本酵素の大量生産を試み、大腸菌および酵母を宿主とする発現系の構築を行ったが、何れの宿主の発現系においても活性型の酵素を取得するには至らなかった。

第4章では、アルジトール酸化酵素の固定化に取り組み、固定化酵素を利用したL-グルコースの生産について検討を行った。その結果、イオン交換樹脂であるDEAE-650Mに固定化した酵素は、遊離酵素の約60%の活性を示し、十分使用可能であることが分かった。また、固定化酵素をD-ソルビトールと反応させ、繰り返し反応を行い、効率的にL-グルコースを生産することに成功した。さらに、出来た反応生成物がL-グルコースであることを、¹³C NMR および比旋光度の測定により確認した。

以上より、土壌から単離した *Penicillium* sp. KU-1 株が生産するアルジトール酸化酵素はD-ソルビトールからL-グルコースへの変換反応をはじめ、D-アラビトールからD-リキソースを変換する反応など既知のアルジトール酸化酵素では触媒することのできなかつた希少糖の生成反応を触媒できることが明らかとなった。特に、本酵素を利用するL-グルコースの生産は、安価なD-ソルビトールを基質とするため、生産コストの観点からも極めて有効な生産方法である。また、L-グルコースは抗ウイルス剤や抗がん剤の合成に利用されることから、医薬分野における需要は少なくないと考えられ、今後の応用研究にも期待ができる。よって、本研究は今後の希少糖に関する研究の発展に大きく寄与すると考えられる。

本論文に関する公開審査会は、令和3年7月28日にリモートシステムを利用して開催され、論文発表と質疑応答が行われた。引き続き行われた学位論文審査委員会で、本論文の内容を慎重に審議した結果、審査委員全員一致して博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。