

氏名(本籍)	きたむらよしあき 北村義明(滋賀県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博乙第751号
学位授与年月日	平成4年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	レボグルコサンの微生物における代謝に関する研究
主査	筑波大学教授 農学博士 中原 忠 篤
副査	筑波大学教授 農学博士 今川 弘
副査	筑波大学教授 理学博士 山根 國 男
副査	筑波大学助教授 農学博士 祥雲 弘 文

論 文 の 要 旨

レボグルコサン(1,6-anhydro- β -D-glucopyranose; 以下LG)は、グルコピラノースが1位と6位間で分子内グルコシドを形成した物質であり、セルロースや澱粉を減圧下で乾留して生じるタール中に多量に含まれている。しかし自然界に存在することはまれである。近年バイオマス有効利用の立場から、セルロース性物質からこのLGを生産し、さらに有用物質に変換しようとする研究が始められている。微生物を用いた変換も一つの重要な手段となり得る。しかしこれまで、非天然糖であるLGの微生物による代謝に関する研究は、殆ど行われていなかったと言ってよい。LGを利用できる微生物が存在することはすでに知られていたが、それらの代謝経路については全く不明であった。本研究は、LGを炭素源として利用する真菌、細菌におけるLG代謝、特にその第一段階の反応を触媒する酵素反応の解明を行ったものである。

LGは酸により容易にグルコースへと加水分解されることから、LG代謝における初発反応を触媒する酵素として加水分解酵素を想定し、まず酵母および糸状菌においてその検索を行った。LG資化性の確認されている保存菌株、および自然界より分離した資化性菌多数を用い、当該酵素活性を検索したが見つからなかった。従って一般に真菌におけるLG代謝では、その初発反応は加水分解以外の酵素反応によることを予想した。

次にLG資化性菌数株を選び、各種阻害剤の影響、 $[^{14}\text{C}]$ LGの菌体内物質への変換などを調べ、LGはかなり早い段階でグルコース代謝経路に合流することを予想した。さらに無細胞抽出液を用いた酵素反応で、LGが糖リン酸に変換されていることを観察した。この反応に焦点を絞り、さらに詳しく検討した結果、調べた全ての酵母、糸状菌中に、 Mg^{2+} の存在下にATPのリン酸基をLGに転移し、

グルコース 6 リン酸を生成するヘキソキナーゼ様の酵素活性が存在することを明らかにした。この酵素は通常のヘキソキナーゼとは明瞭に区別でき、LGに特異性が高いことから新規糖キナーゼであると判定し、レボグルコサンキナーゼ (LGキナーゼ) と命名した。そして本酵素がLG資化性真菌に普遍的に存在することを示した。

LG資化性酵母の一つ、*Sporobolomyces salmonicolor* IFO-0375よりLGキナーゼをポリアクリルアミドゲル電気泳動でほぼ単一にまで精製し、諸性質を調べた。本酵素は分子量52,000-77,000のモノマーであると推定された。反応は Mg^{2+} 要求性で、至適pHは9.5であった。本酵素はpHは6.5-9.5の範囲で安定であった。基質特異性はLGにきわめて高く、他の糖類には殆ど作用しなかった。LGに対する K_m は85mM、 V_{max} は $1.5\text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ といずれも高い値を示した。ヌクレオチド類では通常のヘキソキナーゼの場合と同様、ITPのみがATPの13%の活性を与えた。ATPに対する K_m は0.19mMであった。本酵素反応は通常のキナーゼ反応とは異なり、リン酸基転移と共に水の付加 (加水分解) も起こる点、きわめてユニークである。調べた全てのLG資化性酵母、糸状菌に本酵素活性が検出されること、それらはすべてLGで誘導されること、基質特異性がLGにきわめて高いことなどの事実から、これらの真核微生物におけるLG資化性は本酵素に依存していると結論した。

さらに原核生物である細菌にもLG資化性菌がいることを認めた。そして細菌の場合は酵母、糸状菌とは異なり、LGキナーゼ活性は全く検出されず、代わってLGから直接グルコースを生成する酵素活性が認められた。しかしその反応は単純な加水分解反応ではなく NAS^+ 要求性であり、還元、加水分解および酸化反応を含むと予想される、少なくとも3段階の酵素反応より成ることを明らかにした。

以上本研究は、LGが真核微生物では水の付加を伴うリン酸化というユニークな反応により、グルコース 6 リン酸に直接変換されること、細菌においては酸化還元反応を含む複雑な系により、グルコースに変換されることなどを初めて明らかにした。また非天然糖であるLGを資化する微生物が、広く自然界に存在することをも示した。

審 査 の 要 旨

本論文は、これまで全く知られていなかったレボグルコサン (LG) の微生物による代謝経路を調べ、真核および原核生物各々に固有の代謝系を明らかにしたものである。LGは糸状菌、酵母などの真核微生物ではグルコース 6 リン酸へ、細菌ではグルコースへと変換される。このようにLG代謝のごく初期にグルコース代謝系へ合流する事実は、グルコースの代わりにLGを種々の発酵原料として利用できる可能性を示したものであり、バイオマス有効利用の観点からも大変意義のある結果である。さらに糸状菌および酵母のレボグルコサンキナーゼが、一つの酵素でATPからのリン酸基転移と水の付加反応を同時に行うことを明らかにした。これは本酵素が転移酵素と、そしておそらく加水分解酵素の二つの機能を合わせ持つことを示唆し、酵素学的にもきわめて興味深い反応である。一方細菌の代謝系では、酸化還元反応と加水分解反応を含むと思われる複雑な系により、LGがグル

コースへ変換されることを明らかにした。このように微生物によるLG代謝では、LGの分子内グルコシド結合を直接加水分解することはできず、ATPのエネルギーを借りたり何段階もの手続きを経たりして加水分解反応を達成している。天然に殆ど存在しないLGを資化できる微生物が沢山存在し、しかもこのように巧みな変換反応を行うという事実に驚かされる。

以上本研究は、これまでまったく知られていなかったと言える微生物のLG代謝に関し、その分布、代謝経路、酵素反応の性質などにおいて新知見をもたらした。これら成果は学術的に、またバイオマス有効利用という応用的な意味からもきわめて高く評価されるべきものである。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。