

氏名(本籍)	うえだ 上田	まこと 誠	(大分県)
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博乙第1,034号		
学位授与年月日	平成7年1月31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	微生物変換法による光学活性ヒドロキシジカルボン酸の生産に関する研究		
主査	筑波大学教授	工学博士	向高祐邦
副査	筑波大学教授	工学博士	片岡廣
副査	筑波大学教授	農学博士	中原忠篤
副査	筑波大学教授	理学博士	山根國男

論文の要旨

医農薬の分野において光学活性体のニーズが高まってきていることから、本研究では、抗生物質などの不斉合成の原料としての利用が期待されるD-リング酸及び(S)-(+)-シトラマル酸の安価かつ簡便な生産方法を検討した。その具体的方法として、D-リング酸はマレイン酸、(S)-(+)-シトラマル酸はイタコン酸を出発原料とし、これらを新たな微生物酵素を利用して直接目的生産物に変換する方法を提示した。また併せて、マレイン酸を直接水和しD-リング酸を生成する maleate hydratase を菌体より分離精製し、その諸性質についても明らかにした。

まず、マレイン酸からのD-リング酸生産のため maleate hydratase 活性の高い微生物を土壌から分離採取した。土壌より分離したマレイン酸資化菌440株中、*Arthrobacter* sp. MC 12612と同定された菌株がマレイン酸からD-リング酸への最も高い変換能を示し、その生成リング酸は100%D型であることを明らかにした。本菌株の増殖及び酵素活性は、ソルビトール、酵母エキス、 NH_4NO_3 、L-プロリンの培地への添加により増大した。培養後の休止菌体を用いた変換反応では、界面活性剤あるいは有機溶媒を加えることにより、マレイン酸からD-リング酸への変換反応速度の増大が認められた。反応の最適pHは7.0、最適温度は30℃であった。反応過程で出来るだけ高濃度の生産物を得るために、maleate hydratase 活性を高める菌体培養条件、およびマレイン酸からD-リング酸への変換反応条件を最適化し、基質の逐次添加法によりD-リング酸生産を行ったところ、20時間で87.0 g/lの生産物が得られた。このように比較的短時間に高濃度の生産物が得られ、また変換率も86.5%であったことから、本反応系はD-リング酸生産の極めて有効な方法であることが明らかになった。

次に、*Arthrobacter* sp. MC 12612の maleate hydratase を菌体より分離精製し、その諸性質を検討した。

精製酵素の分子量は90,000で、58,000と28,000の二つのサブユニットより構成されていること、および本酵素はL-システインと Fe^{2+} により活性化され、 Fe^{2+} 以外の二価金属では活性化されないことが明らかになった。精製酵素をマレイン酸に作用させたときの生成リング酸の光学純度は100%D体で、反応の最適pHは8.5、最適温度は45℃であった。基質特異性として、マレイン酸のみならずシトラコン酸、クロロマレイン酸、プロモマレイン酸が水和反応の基質となりえることが判明した。また、ハロマレイン酸の反応結果から、水素及び水酸イオンの付加がトランスであることが明らかになった。

(S)-(+)シトラマル酸の生産方法の検討においては、まず、土壌より分離したイタコン酸資化菌140株中、*Alcaligenes denitrificans* MC 12775と同定された菌株が最も高いイタコン酸からの(S)-(+)シトラマル酸変換能を示し、その生成シトラマル酸は99.9%S型であることを明らかにした。本菌株の増殖及び酵素活性は Mn^{2+} 、D-パントテン酸、L-ロイシンの培地への添加により増大した。この休止菌体によるイタコン酸からの(S)-(+)シトラマル酸への変換反応条件を最適化した条件下、基質の逐次添加反応操作により30時間で変換率80.0%、27.0g/lの生産物が得られた。

このように、本研究では、水和活性の高い菌をスクリーニングし、その培養条件および培養菌体を用いた反応条件を最適化することにより、安価な物質から比較的短時間に高濃度の光学活性ヒドロキシ酸が生産できることを示した。

審 査 の 要 旨

本論文では、医薬等原料として利用が期待されている光学活性カルボン酸の安価かつ簡便な生産方法の開発を目的として、原料を直接目的物質に変換する微生物の発見とそれに関与する酵素の性質の解明がなされ、この微生物酵素を利用することにより実用的見地からも高く評価できる新プロセスが提示された。具体的には、D-リング酸と(S)-(+)シトラマル酸の生産が検討されているが、この2つの物質は現状ではそれぞれに生産方法はあっても分割剤や出発原料が高価なため実用的ではなく、工業生産できるまでには至っていない。これを本論文では、D-リング酸はマレイン酸から、(S)-(+)シトラマル酸はイタコン酸からと、ともに安価な物質を原料として、微生物酵素で生産する方法を確立している。またこの検討の過程で、分離菌のマレートヒドラーゼが菌体から分離精製され、これまでほとんど知られていなかった本酵素の諸性質が明らかにされるなど学術的にも極めて興味深い知見も示されている。本論文で確立された微生物変換法による光学活性カルボン酸の生産方法は、簡便かつ経済的で実用的にも学術的にも高く評価され、発酵工業の今後の発展に貢献するものである。

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。