

氏名(本籍)	なが た なお き 長 田 直 樹 (北 海 道)		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 甲 第 1072 号		
学位授与年月日	平 成 5 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当		
審査研究科	農 学 研 究 科		
学位論文題目	FERMENTATIVE PRODUCTION OF POLY (MALIC ACID) BY <i>AUREOBASIDIUM</i> SP. A-91 (<i>Aureobasidium</i> sp. A-91株によるポリリンゴ酸の発酵生産)		
主査	筑波大学教授	農学博士	中 原 忠 篤
副査	筑波大学教授	工学博士	中 村 以 正
副査	筑波大学教授	農学博士	富 田 文 一 郎
副査	筑波大学助教授	農学博士	星 野 貴 行

論 文 の 要 旨

ポリリンゴ酸は、リンゴ酸が分子間でエステル結合により重合した酸性の高分子であり、結合様式の違いにより α 、 β およびその混合型の3種の構造が考えられる。このポリマーは、生体内で加水分解し、生ずるリンゴ酸が生体吸収性であるだけでなく、化学修飾可能なカルボキシル基を持つため、近年、生体内分解吸収性ポリエステルとして、Drug Delivery System (DDS) への応用が注目を集めている。これまでにポリリンゴ酸の化学合成法が検討されてきたが、まだ実用化されるに十分な反応収率および分子量は得られていない。生物由来のポリリンゴ酸は、*Penicillium cyclopium*の生産するプロテアーゼインヒビターや粘菌の1種である*Physarum polycephalum*の生産するDNAポリメラーゼのインヒビターとして報告されているのみであり、両者とも生産量は極めて微量であった。

本研究では、自然界から新たに分離した*Aureobasidium* sp. A-91株によるポリリンゴ酸の発酵生産、ポリリンゴ酸の化学構造と物理化学的諸性質の検討および形態変化に注目した変異株の造成を試みた。

最初に好氣的代謝の旺盛な酵母の分離を目的として、マンニトールを主炭素源とした集積培養で、天然から多数の黒色酵母、*Aureobasidium*属菌を分離した。これらの菌について、グルコースを基質に炭酸カルシウム存在下で培養したところ、菌株によっては菌体外に多量の酸性物質が生産された。この酸性物質は、培養ろ液にメタノールを添加することによりカルシウム塩として沈殿、回収された。化学的定性反応やPPC, NMR, IR等の分析によって、供試した黒色酵母の生産物はリンゴ酸の

エステル結合による重合体、すなわちポリリンゴ酸であると推定された。次にポリリンゴ酸の生産能が最も強いA-91株について、12%のグルコースを基質とし25°Cで7日間培養した結果、61g/lのポリリンゴ酸カルシウム塩（遊離のポリリンゴ酸として47g/lに相当）が回収された。ポリリンゴ酸カルシウム塩は蒸留水に再溶解し、添加メタノール量を調節することにより3つの画分に分画した。各画分の分子量をGel Permeation Chromatography (GPC)で測定した結果、それぞれ12,000（主画分）、8,000、6,000ともとめられた。なお、ポリアニオンであるポリリンゴ酸の分子量をGPCで測定する場合には、移動層に十分なイオン強度を与えるために、0.2Mのリン酸緩衝液（pH6.8）を用いた。主画分の水溶液をイオン交換樹脂により脱カチオン処理後、凍結乾燥して遊離のポリリンゴ酸を得た。この遊離のポリリンゴ酸について、酸およびアルカリ条件下での加水分解挙動を調べた。分解挙動はポリリンゴ酸の生体内分解吸収性高分子としての応用を検討する上で重要と考えられる。ポリリンゴ酸を100°C加熱下、酸加水分解した場合、反応5時間後にポリマーの98%がL-リンゴ酸モノマーとして回収された。残りの2%はフマル酸およびマレイン酸であった。ポリリンゴ酸はアルカリに非常に不安定であり、室温で速やかにけん化を受け分解した。この場合、酸加水分解と異なりL-リンゴ酸以外に生成したフマル酸およびマレイン酸は全体の約20%に達した。なお、共同研究者の藤重らは、本ポリマーをリン酸緩衝液中（pH 6）、室温下という温和な条件下で自己触媒的に加水分解すると、分解産物としてL-リンゴ酸のみが得られることを報告している。以上の実験事実に基づき、アルカリおよび酸加水分解時に不飽和二塩基酸が生成する原因について考察した。分解反応速度が非常に速い場合、分解時に水の付加が遅れ、その結果として不飽和二塩基酸が生成するという考え方を示した。また、Differential Scanning Calorimetry (DSC)により水の付加を可及的に抑えた条件下でポリマーの熱特性を調べたところ、180°Cに分解点がみられ、フマル酸およびマレイン酸を順次生じつつ熱分解した。本ポリマーのガラス転移点および融点についてはDSCで観察されなかった。

続いて、分離したポリリンゴ酸のNMRによる一次構造の解析を進めた。遊離ポリリンゴ酸とそのカルシウム塩のNMRスペクトルおよび種々のpH条件下でのNMRスペクトルを比較検討した結果、本ポリマーの主鎖は β -型であることが明らかとなった。さらに分枝構造の有無を調べるため、加熱時での自己触媒的加水分解の挙動を追跡することにより、NMRでの主鎖および末端由来のシグナルの帰属を行った。本ポリマーの分子量が12,000と大きいにもかかわらず、主鎖のシグナルに比べて末端のシグナルがより強く検出されたことから、分枝構造を有するものと判断された。以上の知見を総合して*Aureobasidium* sp. A-91株の生産するポリリンゴ酸は、分枝構造を有する（ β -L-ポリリンゴ酸）であることが判明した。

次にA-91株によるポリリンゴ酸の生産条件を検討した。鉄イオンの添加はポリリンゴ酸の生産量を増加させたが、一方、ポリリンゴ酸からプルランへの発酵転換を強く促進した。この影響は、培地への亜鉛イオンの添加により抑制された。硫酸鉄5 ppm、硫酸亜鉛2 ppmを含む培地を用い、25°C 7日間の回転振盪培養において、12%のグルコースから4.7%のポリリンゴ酸が生産された。また、3菌種、17菌株の*Aureobasidium*属菌についてもポリリンゴ酸の生産性を調べたところ、*A. pul-*

lulans 4 菌株と *A. mansonii* 1 菌株がポリリンゴ酸を生産した。

Aureobasidium sp. A-91株は不完全菌に属し、培養時において酵母状のみならず菌糸状の細胞も生じる。このことが本菌の大量培養時の培養管理を困難にすることが予想されたので、酵母状の細胞をとり続ける形態変異株の造成を試みた。変異株の造成はシクロヘキシミド耐性を選択マーカーとして持つ親株をエチルメタンスタンスルフォネート処理することにより行った。その結果、2%モルツアガー培地上で菌糸の形成を示さない変異株CE-91を含む数種の変異株を得ることができた。CE-91株のポリリンゴ酸生産活性はA-91株の約80%であった。

審 査 の 要 旨

本研究は、天然から分離した *Aureobasidium* sp. A-91株によるポリリンゴ酸の発酵生産についての一連の研究をまとめたものである。

まず、非発酵性のマンニトールを含む選択培地を工夫し、新たに多数の黒色酵母、*Aureobasidium* 属菌を分離した。そのうちA-91株が菌体外に多量の酸性物質を蓄積することを見出し、各種化学分析の結果、ポリリンゴ酸であることを確認した。メタノール沈殿により回収した本ポリリンゴ酸の分子量は、合成物に比べ高い値を示した。次にポリリンゴ酸の分解挙動をアルカリおよび酸触媒下で調べ、L-リンゴ酸以外にフマル酸とマレイン酸の不飽和二塩基酸が生成するという新しい現象を観察した。なお自己触媒的加水分解においてはL-リンゴ酸のみを与える。熱分解についても検討を加えている。さらにポリリンゴ酸のNMRによる一次構造の解析を進め、本ポリリンゴ酸が分枝構造を有するポリ(β -L-リンゴ酸)であることを明らかにした。一方、生産学的観点から生産条件を検討し、鉄イオンの制限と亜鉛イオンの添加が有効なことを見出した。形態変化に注目した変異株の造成も行っている。今後はポリリンゴ酸の生合成機構について酵素レベルでの研究が必要であろう。

以上、本研究は、新たに分離した *Aureobasidium* 属菌を用いて、Drug Delivery Systemにおいて薬剤担体としての応用が注目されているポリリンゴ酸の効率的な発酵生産に成功している。生産学的観点からだけでなく、ポリリンゴ酸の物理化学的性質を詳細に検討し、新しい基礎的知見を加えており、本研究は、基礎・応用の両面から高く評価される。

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。