

氏名	BHATNAGAR SHARAD		
学位の種類	博士（農学）		
学位記番号	博 甲 第 9316 号		
学位授与年月日	平成元年10月31日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Efficient Production of Extracellular Pigments from <i>Talaromyces purpurogenus</i> and Their Applications ( <i>Talaromyces purpurogenus</i> による効率的色素生産とその応用)		
主査	筑波大学教授	博士（農学）	青柳 秀紀
副査	筑波大学教授	博士（工学）	市川 創作
副査	筑波大学准教授 (連携大学院)	博士（生命科学）	小堀 俊郎
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	野村 名可男

## 論 文 の 要 旨

持続可能な社会の構築という観点から環境低負荷型の生産システムの開発が社会的ニーズとして求められている。色素は食品、化学、衣料、材料など幅広い分野で使用されているが、化石燃料由来の化学合成品も多く、微生物などを用いた環境低負荷型の生産への変換が国内外で期待され、盛んに研究がなされている。しかしながら、微生物による色素生産は、(1) 生産される色素の大部分が菌体内に蓄積するため、代謝的、空間的制限を受けて生産量が低く抑えられる、(2) 色素を回収する際に、菌体を破碎し、有機溶媒などを用いて抽出するプロセスが必要であり、環境への負荷が大きい、(3) 水に難溶性の色素が多く、用途が制限される、等の問題があり、実用的利用に至っているものは非常に少ない。この現状を踏まえ著者は、寒天平板培地で培養した際に、寒天培地に赤色色素を分泌する *Talaromyces purpurogenus* に着目し、三角フラスコを用いて *T. purpurogenus* を液体振盪培養した結果、培養液中への赤色色素の分泌生産が認められ、連続生産の可能性を示唆している。著者は、*T. purpurogenus* の培養特性を解析し、赤色色素以外にも黄色や橙色の色素が生産されており、500 nm、400 nm、460 nm の吸光度を測定することで、それぞれの色素の生産量を評価できることを示している。また、著者は、(a) 色素は水溶性で、その生産型式は増殖非連動型であること、(b) 培養条件の中で特に、培地成分が色素生産に及ぼす影響が大きいこと、を明らかにしている。色素の生産性の向上を目指し、著者は種々の培養実験をおこない、有効な炭素源、窒素源、金属塩類、界面活性剤をスクリーニングした後、応答曲面法 (Response Surface Methodology) による統計学的解析をおこない、色素生産用の最適培地を設計し、色素の菌体外への分泌生産量を数十倍増大させ、効率的生産に成功している (既報の研究と比べて最も高い菌体外への分泌生産性が得

られた)。

効率的生産が可能になった *T. purpurogenus* の色素の諸特性を解析した結果、耐熱性、耐酸性、耐アルカリ性、UV 耐性、抗菌性を有することが示された。

さらに著者は、菌体外に分泌生産された *T. purpurogenus* 色素を還元剤として光照射下で使用することで硝酸銀水溶液から銀ナノ粒子 (AgNPs) を生成できることを示すと共に、水酸化ナトリウムを添加し、pH 12 の条件で反応させることで、色素による AgNPs の生成を顕著に促進する現象を独自に見出している。種々検討した結果、AgNPs の最適生成条件を設定している。透過型電子顕微鏡 (TEM) や動的光散乱 (DLS) を用いて AgNPs を解析した結果、約 5~40 nm の粒径分布を有することや、DLS やゼータ電位の測定結果から、溶液中で AgNPs が多分散で安定に存在していることを示している。生成した AgNPs は大腸菌や表皮ブドウ球菌に対する抗菌性が認められた。また、ヒト子宮頸癌細胞株 (HeLa)、ヒト肝癌細胞株 (HepG2) を用いて AgNPs の抗癌活性を評価した結果、濃度依存的に効果を示すとともに、AgNPs は正常細胞株に比べて、癌細胞株に対して効果が高く、ある程度の選択性が認められた。さらに著者は、HepG2 を用いた系で AgNPs と悪性腫瘍薬の 5-Fluorouracil (5-FU) の効果を比較した結果、AgNPs と 5-FU の IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ、11.1 µg/ml と 154.9 µg/ml を示し、AgNPs は 5-FU よりも強い抗癌活性があると結論づけている。

## 審 査 の 要 旨

本論文で著者は従来の微生物を用いた色素生産の問題点を踏まえ、*T. purpurogenus* に着目し、*T. purpurogenus* の培養特性の把握や応答曲面法を活用した色素生産最適培地の設計をおこなうことで、水溶性色素の菌体外への高濃度分泌生産を達成している。微生物による色素の菌体外生産性として国内外を通じて最も高い値であり、色素の回収に菌体の破碎を伴わないため連続生産も可能であり、環境低負荷型の生産系として有用性、実用性は高く評価できる。複雑な処理無しに菌体外に分泌生産された色素を還元剤として、光照射下、アルカリ条件下 (pH 12) で硝酸銀水溶液に作用させ、AgNPs を生成する方法は新規性があり、安価で環境低負荷型の新たな AgNPs の生成法として評価できる。本法は他の金属ナノ粒子の生成への適用できる可能性もあり、今後の拡がり期待できる。また、本法で生成した AgNPs は 5-FU (悪性腫瘍薬) に比べて高い抗癌活性を示しており、今後、*in vivo* の研究が進む事により、医療分野での活用も期待できる。

令和元年9月13日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。