

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（工学）	氏名	羅 宮臨風	
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当			
論文題目				
Basic and applied research on psychrophile-based simple biocatalysts for production of valuable chemicals (低温菌シンプル酵素触媒を用いた有用化学品生産に関する基礎及び応用研究)				
論文審査担当者				
主査	准教授	田島 誉久	印	
審査委員	教授	加藤 純一	印	
審査委員	教授	黒田 章夫	印	
審査委員	教授	中島田 豊	印	
〔論文審査の要旨〕				
<p>本論文は低温菌を酵素触媒の宿主として活用するための基礎および応用に関する研究をまとめたものである。低温菌を宿主として物質変換酵素を異種発現させた細胞を中温で熱処理することにより、競合する宿主由来の酵素活性を抑制し、細胞膜の部分的損傷により基質と変換酵素の接触が高まることから効率的変換が期待された。このシンプル酵素触媒の構築にあたり、低温菌の代謝酵素および細胞の膜透過性が受ける熱処理の影響を評価し、本触媒による効率的変換を示した。第一章では序論として低温菌や酵素触媒に関する研究背景が述べられている。第二章では低温性 <i>Shewanella</i> 属細菌における代謝酵素が熱処理により受ける影響を調査し、リンゴ酸酵素が低温菌の代謝酵素でありながら耐熱性を示すことを明らかにした。第三章では中温の熱処理により低温菌シンプル酵素触媒は基質の膜透過性が向上するとともに、イタコン酸の効率的生成を可能とした。第四章では本触媒についての考察と今後の展望が議論されている。</p> <p>第一章では細胞を用いた酵素触媒に関する既往の研究について代謝酵素の失活と基質の膜透過性向上など課題がまとめられ、本研究で構築した低温菌を活用したシンプル酵素触媒はそれらを解決しうる手法であることが利点とともに示されている。</p> <p>第二章では低温性 <i>Shewanella</i> 属細菌において代謝酵素の耐熱性について調査を行った結果がまとめられている。中央代謝経路であるクエン酸回路とその周辺の酵素について中温以上での熱処理が酵素活性に及ぼす影響を評価したところ、ほとんどの酵素は 50℃で失活したものの、リンゴ酸酵素 (SL-ME) は 60℃でも活性が残存していた。そこで、当該酵素と大腸菌のリンゴ酸酵素 (MaeB) をそれぞれ精製し生化学的特性、耐熱性、円二色性による温度特性を解析した。SL-ME は 60℃まで活性を保持し、3 時間の熱処理にも変化は見られなかった。また、円二色性による解析から変性中点温度は MaeB の 64.4℃に対し、</p>				

SL-ME は 71.9℃であり、顕著な耐熱性を示した。この新奇な耐熱性酵素の発見は低温性 *Shewanella* 属細菌における生物学的意義や他の *Shewanella* 属細菌における保存性など、今後解明すべき興味深い課題を提起するものとなった。

第三章では低温性 *Shewanella* 属細菌をシンプル酵素触媒の宿主として適用してポリマー素材として有用なイタコン酸に変換する触媒を構築した成果が示されている。中温性のアコニターゼと *cis*-アコニット酸脱炭酸酵素を発現させた低温菌を 40℃で 15 分間熱処理することでイタコン酸生産性が 14.2%向上し、大腸菌を宿主にしたとき (3.7%) よりも高く、低温菌を中温で熱処理することで基質の膜透過性の向上が示された。変換酵素の熱失活条件を考慮し 45℃で 15 分熱処理した細胞においてイタコン酸を最も高収率で生成することに成功した。また、細胞を繰り返し利用して変換反応に用いることも可能とし、シンプル酵素触媒が効率的な変換に有用であると結論づけている。

第四章では本研究を総括し、低温菌をシンプル酵素触媒の宿主として活用することに関してその有用性や課題が議論されている。

本研究により、低温菌をシンプル酵素触媒の宿主として利用することで効率的な物質変換を実現できることが示された。また、予想外に発見した低温菌のリンゴ酸酵素の耐熱性についても今後のさらなる研究により生物学的意義の解明と工学的活用が望まれる。低温菌の新たな工学的利用を示した本手法は様々な有用物質の生物学的変換への活用が期待される。よって、本論文の著者は、博士 (工学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。

備考 審査の要旨は、1,500 字程度とする。