

論文内容の要旨  
Abstract of Dissertation

氏 名 Name 梶谷 賢吾

D-アスパラギン酸 (D-Asp) は抗生物質の原料として有用であり、ヒトに有益な生理作用を示すことから、その生産方法が重要となっている。ある種の乳酸菌は細胞質でアスパラギン酸ラセマーゼ (RacD) により L-Asp から D-Asp を生産し、D-Asp を細胞壁構成成分として使用している。実際に、乳酸菌 *Levilactobacillus brevis* JCM1170 株の培養液上清中に約 317  $\mu\text{M}$  の D-Asp が確認されている。したがって、多量の D-Asp を生産する乳酸菌は、D-Asp の工業的発酵生産に有用であると考えられる。

D-Asp を含む D-アミノ酸の測定は HPLC 用いて行われるが、測定のために蛍光誘導体化などの前処理が必須であること、1 回に 1 試料しか測定できないことから、多数の乳酸菌培養液の D-Asp を測定することが困難である。一方、D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO) を使用した酵素学的な測定法では、前処理を必要とせず、1 度の測定で多数の試料を測定できるため、多数の乳酸菌培養液の D-Asp 定量に有用と考えられる。DDO は酸性 D-アミノ酸を基質とするため D-Glu にも作用してしまうが、当研究室では、D-Asp に対してのみ高い特異性を有する、酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 由来の DDO (ChDDO) の単離に成功しており、ChDDO を使用することによって D-Asp 特異的な測定法の開発が可能であると考えられる。そこで本研究では、ChDDO を用いた D-Asp 高生産乳酸菌の酵素学的スクリーニング法の開発を行い、スクリーニングによって得られた D-Asp 高生産乳酸菌の高い D-Asp 生産能にかかわる因子の解明を目的とした。

ChDDO を使用して D-Asp を測定するため、発色試薬の選定を行ったところ、N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfoethyl)-3-methylaniline (TOOS) と 4-aminoantipyrine (TOOS/4AAP) の組み合わせが最も感度が良好であった。加えて、乳酸菌の汎用的な培地である MRS 培地による干渉を受けず、D-Asp 濃度が 0 – 2 mM の範囲で検出限界と定量限界がそれぞれ、13  $\mu\text{M}$  と 40  $\mu\text{M}$  であった。D-Asp 生産乳酸菌と非生産菌の培養液上清を使用した対照試験では、D-Asp 生産乳酸菌の培養液上清でのみ高い濃度の D-Asp が検出されたことから、D-Asp 高生産乳酸菌のスクリーニングに有用であると考えられた。新潟県内の野菜・果物や発酵食品から D-Asp 高生産乳酸菌のスクリーニングを行い、キャベツの塩漬けから既知の D-Asp 高生産乳酸菌である *Lv. brevis* JCM1170 の約 2.6 倍の D-Asp 生産能を有する WDN19 株の取得に成功した。WDN19 株を含む D-Asp 生産が見られた乳酸菌に対して分子系統解析を行ったところ、乳酸菌の D-Asp 生産能は属や種ではなく、株レベルで異なることが示唆された。

WDN19 株の同定を行ったところ、WDN19 株は *Latilactobacillus curvatus* DSM 20019 に近縁であった。WDN19 株と *Lt. curvatus* DSM 20019 の D-Asp 細胞外生産能の比較から、WDN19 株の D-Asp 細胞外生産能は DSM 20019 株よりも 13.7 倍高く、高い D-Asp 生産能は WDN19 株のみに見出された。D-Asp は RacD により L-Asp から生産されることから、両株の L-Asp 細胞外濃度を測定したところ、D-Asp 細胞外濃度の増加に応答して L-Asp 細胞外濃度が減少し、RacD による D-Asp 生産が示唆された。WDN19 株における L-Asp 細胞外濃度の低下速度と

D-Asp細胞外濃度の増加速度は、DSM 20019株よりも著しく速かったことから、WDN19株の高いD-Asp生産能は高いRacD活性に起因する可能性が示唆された。さらに、WDN19株ではL-Asp細胞外濃度が減少した後に、L-Asp細胞外濃度の増加が見られたことから、L-Asp生産能も高い可能性が示された。両株の粗抽出液におけるRacD活性を測定したところ、WDN19株の対数増殖期初期のRacD活性はDSM 20019よりも12.9倍高かった。両株の対数増殖期初期の *racD* 遺伝子の転写量を測定したところ、WDN19株はDSM20019株よりも3.1倍高かった。さらに、両株のRacD分子活性を測定したところ、WDN19株はDSM20019よりも1.8倍高かった。以上のことから、WDN19株は *racD* 遺伝子転写量とRacD活性の双方が高いことが示された。L-Aspを含まない化学合成培地（CDM）で両株を培養し、D, L-Asp細胞外濃度を測定したところ、WDN19株でのみD, L-Asp細胞外濃度の増加が見られたことから、WDN19株はDSM20019株よりも高いL-Asp生産能を有していることが示唆された。CDMにL-Asp前駆体を添加して両株を培養したところ、L-Asn添加時に両株においてL-Asp生産が確認され、特にWDN19株では顕著なL-Asp細胞外濃度の増加が観察された。L-Aspはアスパラギナーゼ（AnsA）によってL-Aspから生合成されると推定されることから両株の粗抽出液のAnsA活性を測定したところ、対数増殖期中期と定常期初期においてWDN19株のAnsA活性がDSM 20019株よりも高かった。さらに両株の遺伝情報から、WDN19株ではL-Asp代謝酵素遺伝子が破壊されていることが推定された。以上のことから、WDN19株の高いD-Asp生産能はD-Asp生産を担うRacDの分子活性と発現量が高いことと、高AnsA活性とアスパラギン酸代謝酵素遺伝子破壊によるRacDへの高いL-Asp供給量によることを明らかにした。

氏 名 Name ●●●●●●

It is commonly observed that the surface function of an industrial product influences the product performance and quality. Surface functions, such as frictional and attritional properties and optical and magnetic properties (including the accuracy of surface finishing of component parts), are deeply related to the geometric properties of fine surface asperity.

- 上部余白：18～24mm 程度
  - 左右余白：20～24mm 程度
  - 1 行の文字数：40 文字
  - 1 ページの行数：40 行
  - 文字サイズ：9～11 ポイント
  - 文字種：明朝体
  - 文字数：2,000 字程度
- (Formatting Guidelines)
- Head margin: Approx. 25 mm
  - Left margin: Approx. 30 mm
  - Line spacing: Approx. 6.4 mm
  - Number of characters per line: Approx. 40 characters for Japanese
  - Font size: Approx. 9–10.5 point
  - Number of characters: Approx. 2,000 characters in Japanese or 500 words in English
  - Font: MS Mincho for Japanese, Times New Roman is recommended for English