

学 位 論 文 要 旨

氏 名 泉 秀作

題 目

微生物の 1,5-アンヒドロ-D-フルクトースへの応答とその代謝酵素の研究
(Studies on response of microorganisms to 1,5-anhydro-D-fructose and their
metabolizing enzymes.)

1,5-アンヒドロ-D-フルクトース (AF) は、 α -1,4-グルカンリアーゼを澱粉に作用させて得られる抗酸化能を持つ食品素材である。本研究では、様々な微生物に対する AF の作用について調べた。また、AF の代謝に関わる微生物由来の酵素について詳細に解析した。

本研究で試験したグラム陽性菌は、培地に添加した AF により生育が抑制された。すなわち、*Listeria monocytogenes* は、塩化ナトリウムと AF を併用することで相加的に生育が抑制された。枯草菌 (*Bacillus subtilis*) では、AF は菌体の生育と芽胞の形成、芽胞の発芽を抑制した。グラム陽性菌の代表株とした黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、低濃度の AF でも生育が強く抑制された。一方、グラム陰性菌の代表株である大腸菌 (*Escherichia coli*) は、生育がほとんど抑制されなかった。黄色ブドウ球菌と大腸菌の培養液中には、AF が還元されて生じる 1,5-アンヒドロ-D-グルシトール (AG) が生成すること、更に大腸菌は、培地中の AG を吸収、資化することを見出した。細菌の生育の抑制は、AF を還元するための補酵素 NADPH の枯渇が主因であるが、大腸菌では AG の更なる代謝により NADPH が再生すると推察した。

真菌類の代表のパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は、AF を AG のみならず、AG の C₂ エピマーである 1,5-アンヒドロ-D-マンニトール (AM) にも変換した。また、両誘導体は、エネルギー源として利用されないことを明らかとした。パン酵母から、AF を AM あるいは AG に変換する二つの AF 還元酵素 (ScAFR-AM、ScAFR-AG) をそれぞれ単離し、諸性質を明らかにした。ScAFR-AM は、調べた基質では AF のみに還元活性を示し、酸化活性は認められなかったことから、本酵素は AF 還元酵素 (AM 生成) であると提唱した。真核生物で AM 生成に関わる酵素の報告はこれが初めてである。

ScAFR-AG は、NADP を補酵素として D-アラビノースを D-アラビノラクトンに酸化する D-アラビノース脱水素酵素とアミノ酸配列が一致した。AF の還元反応での活性が D-アラビノースの酸化反応よりも高いことや、還元反応の至適 pH が生理学的な値であることから、本酵素は D-アラビノース脱水素酵素というよりは、AF 還元酵素 (AG 生成) であると提唱した。次いで、ScAFR-AG の AF 還元と L-キシロース酸化により、NADP-NADPH をサイクリングする新たな AG 製法を提案した。

本研究では、さまざまな微生物に対する AF の影響を明らかにし、AF を抗菌素材として評価できた。また、大腸菌や酵母から 3 つの AF 還元酵素を単離し、諸性質を詳細に調べ、新規糖質である AF の代謝に新たな知見をもたらした。

学 位 論 文 要 旨

氏 名 Shusaku Izumi

題 目 Studies on response of microorganisms to 1,5-anhydro-D-fructose and their metabolizing enzymes.
(微生物の1,5-アンヒドロ-D-フルクトースへの応答とその代謝酵素の研究)

1,5-Anhydro-D-fructose (AF) is a sugar with an antioxidant capacity, which is produced by the action of α -1,4-glucanlyase on starch. This study examined the effect of AF on the growth of various microbes. The enzymes responsible for AF metabolism in two different microorganisms were also studied in detail.

The growth of gram-positive bacteria in this study was inhibited by the addition of AF to the medium. The growth of *Listeria monocytogenes* was partly inhibited by the addition of AF or NaCl, while additive inhibition was observed with a combination of AF and NaCl. AF also inhibited growth, formation, and germination of spores of *Bacillus subtilis*. The growth of *Staphylococcus aureus* (a typical Gram-negative bacterium) was strongly inhibited, whereas the growth of *Escherichia coli* (a typical Gram-negative bacterium) was barely inhibited. AF was converted to 1,5-anhydro-D-glucitol (AG) by *S. aureus* and *E. coli*, and released into the medium. AG was adsorbed and metabolized by *E. coli* in the medium.

NADPH-dependent AF reductase (AFR) activity were observed in cell-free extracts of *S. aureus* and *E. coli*, and the enzyme that catalyzed the conversion of AF to AG was purified from *E. coli* (*Ec*AFR-AG). It is suggested that the inhibition of *S. aureus* was due to the exhaustion of NADPH after conversion of AF to AG using AFR. By contrast, *E. coli* may be able to regenerate NADPH via AG assimilation.

Saccharomyces cerevisiae converted AF to AG and 1,5-anhydro-D-mannitol (AM), which is a C₂ epimer of AG. However, neither of these derivatives were used as an energy source. Two types of AFR (*Sc*AFR-AM and *Sc*AFR-AG) were isolated from *S. cerevisiae* and characterized. *Sc*AFR-AM only reduced AF and it had no oxidizing activity, thus, the enzyme was classified as 1,5-anhydro-D-fructose reductase (AM-forming). This is the first report of the presence of AFR-AM in a eukaryote.

The amino acid sequence of *Sc*AFR-AG matched D-arabinose dehydrogenase, which catalyzes the oxidation of D-arabinose to D-arabinono-1,4-lactone. The relative activity during AF reduction was higher than that during D-arabinose oxidation and the optimum pH for the reducing reaction matched the physiological value. Thus, the enzyme was considered to be AF reductase (AG-forming) rather than D-arabinose dehydrogenase., the specificities of *Sc*AFR-AG, which reduces AF and oxidizes L-xylose, yielded a new system for AG generation with NADP-NADPH cycling.

This study examined the effects of AF on the growth of microorganisms and evaluated its potential as a bacterial growth inhibitor. Three AF-reducing enzymes purified from *E. coli* and *S. cerevisiae*, were characterized in detail to provide insights into the metabolism of the novel sugar, AF.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	泉 秀作
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 安部 淳一
	副査 鹿児島大学 准教授 花城 勲
	副査 琉球大学 教授 伊藤 進
	副査 佐賀大学 教授 光富 勝
	副査 鹿児島大学 准教授 玉置 尚徳
審査協力者	
題目	微生物の1,5-アンヒドロ-D-フルクトースへの応答と その代謝酵素の研究 (Studies on response of microorganisms to 1,5-anhydro-D-fructose and their metabolizing enzymes)
<p>1,5-アンヒドロ-D-フルクトース(AF)は、紅藻や担子菌の細胞内酵素α-グルカンリアーゼを澱粉やグリコーゲンに作用させて生成する単糖である。脱離反応により生じるこの糖は、グルコースに類似した構造を持つが、分子内に二重結合を有するため反応性に富み強い還元力を示す。本糖質を食品に使用することを考慮し、まず微生物に対する作用を詳細に調べた。</p> <p>本研究で試験したグラム陽性菌は、培地に添加したAFにより生育が抑制された。すなわち、リステリア菌は、塩化ナトリウムとAFを併用することで相加的に生育が抑制された。枯草菌では、AFは菌体の生育と芽胞の形成、芽胞の発芽を抑制した。黄色ブドウ球菌は、低濃度のAFでも生育が強く抑制された。一方、グラム陰性菌の代表株である大腸菌は、生育がほとんど抑制されなかった。黄色ブドウ球菌と大腸菌の培養液中には、AFが還元されて生じる1,5-アンヒドロ-D-グルシトール(AG)が生成すること、更に大腸菌は、培地中のAGを吸収、資化することを見出した。細菌の生育の抑制は、AFを還元するための補酵素NADPHの枯渇が主因であるが、大腸菌ではAGの更なる代謝によりNADPHが再生すると推察した。さらに、大</p>	

腸菌が生産するAF還元酵素を精製し、これが既知の2,5-ジケト-D-グルコン酸還元酵素であることを認めた。

真核生物であるパン酵母は、AFをAGのみならず、1,5-アンヒドロ-D-マンニトール (AM) にも変換するが、両誘導体は、エネルギー源として利用されないことを明らかとした。パン酵母から、AFをAMあるいはAGに変換する二つのAF還元酵素 (AM生成酵素、AG生成酵素) をそれぞれ単離し、諸性質を明らかにした。AM生成酵素は、調べた基質ではAFのみに還元活性を示し、酸化活性は認められなかった。本酵素の部分アミノ酸配列は、まだその機能が解明されていない既知の蛋白質と一致することが認められ、本蛋白質がAFの還元に関与する酵素であることを初めて見出した。さらに、その遺伝子を破壊した株を用いた実験により、酵母の代謝系において重要な位置をしめる酵素であることを見出した。なお、真核生物でAM生成に関わる酵素の報告はこれが初めてである。

AG生成酵素は、既報のD-アラビノース脱水素酵素と部分アミノ酸配列が一致した。AFの還元反応での活性がD-アラビノースの酸化反応よりも高いことや、還元反応の至適pHが生理学的な値であることから、本酵素はD-アラビノース脱水素酵素というよりは、AF還元酵素 (AG生成) であると提唱した。次に、AFの還元とL-キシロース酸化をカップリングすることによりNADPHの枯渇を回避する新たなAG製法を提案した。

本研究は、澱粉から生産される機能性糖質に対する微生物の応答、微生物の代謝系酵素、そして遺伝子破壊株や酵素反応を利用したポリオール類の生産に関する研究であり、学術および実用面からも高く評価され、学位論文として十分価値があると判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	泉 秀作
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 安部 淳一
	副査 鹿児島大学 准教授 花城 勲
	副査 琉球大学 教授 伊藤 進
	副査 佐賀大学 教授 光富 勝
	副査 鹿児島大学 准教授 玉置 尚徳
審査協力者	
実施年月日	平成 25 年 1 月 15 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査の 5 名は、平成 25 年 1 月 15 日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士 (農学) の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏名

泉 秀作

[質問1] 1,5-アンヒドロ-D-フルクトース(AF)を酵母は資化しないが、細菌と同じくNADPHが枯渇して増殖は抑制されないのか？

[回答1] AFの濃度を上げると酵母でも増殖の抑制が認められたが、黄色ぶどう球菌のような強い増殖抑制はなかった。

[質問2] 大腸菌ではどうであったか？

[回答2] 大腸菌ではAFの濃度が高いときは、対数増殖期前の遅れが長くなることが認められた。

[質問3] NADPHの再生ができないことについてグルコースを増やせば共役が成立するのではないか？グルコン酸を加えてもよいのではないか？

[回答3] グルコースがNADPHを増加させるという考えで、遺伝子破壊株を用いて継時的にグルコースを加える実験をしており、その結果共役が成立していると考えた。還元糖の実験しかしておらず、グルコン酸については今後試みたい。

[質問4] 酵母のAM生成酵素が不安定なためにカルシウムイオンを加えているが、デヒドロゲナーゼは基本的にマグネシウムイオンではないか？

[回答4] カルシウムを使用したが、調べたところではマグネシウムと同程度の効果があった。

[質問5] AGの生成酵素が還元のみ、酸化のみという結果であるが、逆反応が起きない事を示せれば大変面白い。このことをどう考えているか？反応のpHはどのように設定したか？

[回答5] このことについては、今のところ何も考えが無いが、これを確かめるために今後さら蛋白質の構造解析実験を行い、明らかにしたい。還元反応はpH 7で、酸化反応はpH 9で行った。

[質問6] 枯草菌の芽胞の形成と発芽の阻害実験を行っているが、細菌の増殖阻害実験とは少し異なると思う。どういう考えで試したのか？

[回答6] AFの食品へのアプリケーションであり、幅広い利用の一つとして行った。

[質問7] 枯草菌の成育抑制と芽胞形成・発芽の抑制メカニズムは似ているのか？

[回答7] どちらもグルコースと構造が似ているAFが誤認識で取り込まれるのが原因ではないかと考えた。

[質問 8] 酵母により生成したAGとAMは、再利用されないようであるが、酵母にとってAFを還元する意義は何か？

[回答 8] 酵母の菌体内にもAFが存在するが、このAFを無害化して排出する意味があるのではないかと考えている。

[質問 9] 酵母にはAG生成酵素とAM生成酵素の2種があるが、大腸菌はAG生成酵素だけで、AM生成酵素はないと考えてよいのか？

[回答 9] 非常に高感度の分析を行ったが、大腸菌の反応系からはAMが検出できなかったためAG生成酵素のみを持つと考えている。

[質問 10] 抗菌活性についてラクトバシラスを抑制するが、食品へのアプリケーションとしてそれでよいのか？

[回答 10] 量を調節して加えることにより、乳酸発酵が進みすぎるのを逆に抑制できて日持ちさせる効果がある事が期待できる。

[質問 11] 細菌増殖抑制実験で用いた2%のAF濃度というのは高いのではないか？

[回答 11] AFを食品として捉えるか、抗菌剤として捉えるかで異なるが、食品として考えれば妥当と考えた。