

生物機能応用科学専攻

氏名	グェン ヴェット アインテイ
学位記番号	生博 甲第 126 号
学位記授与の日付け	平成 14 年 3 月 25 日
学位論文題目	Basic Studies on Remediation of Acid Soil and Production of Alcohol without Sterilization by Acid Tolerant Yeasts (酸性耐性酵母による酸性土壌の修復と無殺菌アルコール発酵に関する基礎研究)
論文審査委員	主査 教授・久松 眞 教授・大宮 邦雄 教授・小畑 仁 助教授・妹尾 啓史

要 旨

酵母は種々のストレス耐性があるため厳しい環境下で生育できる。酒、味噌、醤油のような発酵食品で重要な役割を担っている酵母は原料に高濃度の塩や糖あるいは酸を加えても生育できるので、雑菌の汚染による腐敗をまねくことなく発酵できる。本研究では、酵母のこのようなストレス耐性を環境改善に利用する目的で自然界から新たに酸性耐性酵母を分離し、酸性土壌の改善や強酸性中でのアルコール発酵の基礎技術の開発を行った。得られた研究成果を項目別に以下に要約する。

1. 酸性耐性酵母の分離同定

酸性温泉として知られる草津や万座温泉街を流れる河川から、多数の酸性耐性の酵母を得た。これらの中から、酸性耐性が非常に強い株として赤色酵母 *Rhodotorula glutinis* R-1 を分離同定した。また酸性条件下で澱粉資化性を示す酵母として *Candida fluviatilis* 2C と *Candida intermedia* 3A を分離同定した。

2. *Rhodotorula glutinis* R-1 の酸性耐性特性

R-1 株は、pH1.5 の酸性培地でも緩やかに生育し、pH2.5 では中性付近とほぼ同等の生育曲線を示した。また、透過型電子顕微鏡観察により培地の pH が低くなるに従って細胞膜にあたる層が肥大する現象を見つけた。この現象は、本菌の耐性メカニズムと深く関係するものと考えられる。

3. *Rhodotorula glutinis* R-1 のアルミニウム・マンガンイオン耐性特性

酸性土壌では各種無機塩がイオン化するが、酸性土壌中に多く存在し且つ生物毒性の強いアルミニウムとマン

ガンイオンに対する耐性は酸性土壌中で使用する場合重要な要因となる。そこで、R-1 株の耐性試験を行ったところ、金属イオンが溶ける限界に近い 300-500mM のイオン濃度でも生育できることが確認された。

4. *Rhodotorula glutinis* R-1 の酸性培地の中和能力

酸性硫酸塩土壌の酸度は一般に pH3 前後であるので、pH3 の培地に 100mM のアルミニウム・マンガンイオンを含んだ培地で長期生育試験を行った。その結果、10 日すぎから pH が急激に上昇する現象を発見した。また、緩衝能が比較的低い酸性土壌の場合は本菌を生育させると土壌の酸性値が上昇することが分かった。

5. *Candida fluviatilis* 2C と *Candida intermedia* 3A の各種糖質資化能

澱粉資化性酸性耐性酵母 2 株は、多数の炭素源を資化できることが分かった。また炭酸ガス発生を調べる試験から、グルコース、マルトース、トレハロース、砂糖に対して発酵能があることを確認した。

6. *Candida fluviatilis* 2C と *Candida intermedia* 3A のアルコール発酵

発酵性が示唆された糖質を中心とした炭素源を酸性培地に添加して培養し、培養液中のアルコールや有機酸を高速液体クロマトグラフィーにより分析した。その結果、アルコール生産能はグルコースと砂糖のみに検出され、その他の糖ではリンゴ酸などの有機酸や短鎖脂肪酸類を生産することが分かった。

7. *Candida fluviatilis* 2C と *Candida intermedia* 3A の耐糖・耐塩性

近い将来澱粉を主成分とした生分解プラスチックが食

品のトレーなどに大量に利用されると予想される。それらのプラスチックの使用後さらに再利用することを考え基礎研究を行った。澱粉を硫酸で完全加水分解し

pH2.5 に調製後、酸性耐性酵母の発酵試験を行った。その結果、10%グルコース、5%硫酸塩、pH2.5 の培地中でアルコール生産を確認できた。

生物機能応用科学専攻

氏名	鈴木 恒一
学位記番号	生博 甲第 127 号
学位記授与の日付け	平成 14 年 3 月 25 日
学位論文題目	アマエビの殻に存在する脂溶性タンパク質の単離と構造決定
論文審査委員	主査 教授・今井 邦雄 教授・小宮 孝志 教授・古市 幸生 教授・天野 秀臣

要 旨

本論文ではアマエビ殻の2種類の新規脂溶性タンパク質の構造決定の詳細を記した。

本研究の着想の原点は、カイコの休眠ホルモン及びその活性を増強する脂溶性クチクラペプチド (Bm ACP-6.7) にあった。Bm ACP-6.7 は Val, Ala, および Pro の3種のアミノ酸と繰り返し配列に富み、極めて脂溶性が高い特異なペプチドである。また、このペプチドはカイコ成虫のクチクラに存在し、その主成分であるキチンに吸着するという興味深い特徴が明らかにされている。このペプチドの興味深い諸特徴と特異な構造は、他生物中にも類似タンパク質が存在するか否かを検討する研究に著者を導いた。

材料としては昆虫と同じ節足動物であるアマエビ (*Pandalus borealis*) の殻を選択した。その理由は、アマエビは一般に生食されており、廃棄される殻は生のまま大量に入手が可能と判断したためである。本研究では1.5kgのアマエビから得た殻を出発材料とした。この材料をアセトン脱脂脱水した後に、メタノール:ジクロロメタン (1:1) 混合溶媒 (M/C) で抽出し、粗抽出物とした。ついでこの試料を、各種溶媒を用いる溶媒分配で粗精製し、逆相クロマトグラフィーで精製を繰り返した結果、分子量が約 12,700 の純粋なタンパク質が入手でき、Pb CP-12.7 と命名した。このタンパク質は、休眠ホルモンの活性を 10 倍増強するとともに、キチンに強く吸着するという Bm ACP-6.7 と似た性質を示した。また、Pb CP-12.7 は極めて脂溶性が高く、M/C などの

有機溶媒に易溶であるが、水には難溶であり、特に中性から弱塩基性の水には全く溶けなかった。このタンパク質を構造決定すべく、直接アミノ酸配列解析したところ、N 末端から 45 残基目までの配列を解明できた。Pb CP-12.7 内部のアミノ酸配列を調べるためには酵素分解を適用し、生成した断片ペプチドは、アンハイドロトリプシン-アガロースによる親和性クロマトグラフィーと逆相 HPLC を組み合わせて精製した。得られた純粋な各断片の構造を全て解明し、重複配列を考慮しつつ、断片ペプチドの配列を組み合わせることにより、全一次配列を解明することに成功した。この構造は 7 個の XAGXXPY/F という繰り返し配列を持っていた。また、Bm ACP-6.7 とは 4 種の共通トリペプチド配列を持っていたが、長鎖の共通配列を見いだせなかったことから、抗 Bm ACP-6.7 抗体による認識機構は不明のまま残った。ついで、このタンパク質の相同性検索を試みたが、類似タンパク質は全く見いだされず、Pb CP-12.7 が新規タンパク質であることが判明した。

ここで、Pb CP-12.7 の精製過程を振り返ってみたところ、逆相 HPLC 上でこのタンパク質と似た挙動を示す、より低分子量のタンパク質の存在をみとめた。そこで、この低分子量タンパク質をサイズ排除 HPLC 精製し、最終的に逆相 HPLC で単離した。単離試料を質量分析したところ分子量が約 8,300 であったことから、このタンパク質を Pb CP-8.3 と命名した。早速、アミノ酸配列解析を試みたが、直接解析ではアミノ酸が全く検出されず、N 末端は遊離していないことが判明した。