



Title	伝統発酵食品乳酸菌のデンプン分解酵素の研究
Author(s)	金, 鍾賢
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49518">https://hdl.handle.net/11094/49518</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	キム 金	ジョン 鍾	ヒョン 賢
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)		
学位記番号	第 2 2 8 9 4 号		
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科応用生物工学専攻		
学位論文名	伝統発酵食品乳酸菌のデンプン分解酵素の研究		
論文審査委員	(主査) 教授 福崎英一郎	(副査) 教授 福井 希一	教授 金谷 茂則 教授 小林 昭雄 教授 原島 俊 教授 清水 浩

## 論文内容の要旨

本論文は伝統発酵食品乳酸菌のデンプン分解酵素の研究についての研究成果をまとめたものであり、緒論（一章）、本文（二、三章）、総合考察（四章）の4章からなっている。

第一章の緒論では、発酵産物から分離されたデンプン分解性乳酸菌の現状を示し、伝統発酵食品から分離した乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* L137株が持つデンプン分解能と発酵後期過程での優勢種としての生存性の関連性を本研究の目的とする意義を論じた。

第二章では、*L. plantarum* L137からデンプン分解酵素遺伝子 *orf2* をクローニングし、塩基配列を決定した。*orf2* 遺伝子は全長 6,171 bp で、推定アミノ酸総数が 2,056 残基、分子質量が 215,625 Da であった。アミノ酸レベルでの同源性検索の結果、デンプン分解酵素でよく保存されている触媒に関与する 4 つの保存領域を見出した。さらに、*orf2* 遺伝子はセンス鎖 5' 末端と 3' 末端領域に特徴的なヌクレオチド繰返し配列をもち、アミノ酸レベルでも N 末端と C 末端の両方に特徴的な繰返し配列を保有していることを見出した。*orf2* 遺伝子の機能を明らかにするため、高発現させたタンパク質を精製した。それはデンプン分解酵素活性を有し、推定アミノ酸配列の N 末端から 36 アミノ酸残基のシグナル配列が切除された分泌酵素 (分子質量は 211,537 Da) であった。組換え遺伝子産物は、プルランからはマルトトリオースだけを産生し、デンプンからは主にマルトトリオースとマルトテトラオースを産生した。以上の結果から、クローニングした *orf2* はデンプン分解酵素に属するアミロプurlラナーゼをコードする遺伝子で、本遺伝子を *apuA* と命名した。

第三章では、アミノ酸の繰返し配列の機能を調べた。*apuA* 遺伝子産物は N 末端に 6 アミノ酸残基で構成された 39 個の繰返し配列と、C 末端に 3 アミノ酸残基で構成された 50 個の繰返し配列を持っている。C 末端に存在する特異的な繰返し配列の酵素における機能を調べるため、野生型の *ApuA* と C 末端繰返し配列を除去した変異型 *ApuA* Δ との間で、酵素の安定性 (pH、温度)、種々の化合物の活性への影響、基質特異性や反応速度定数、基質の分解パターンを比較した。*ApuA* Δ の方が、酵素の生産性や比活性では *ApuA* より高かった。最適 pH と最適温度、安定性 (pH、温度)、基質特異性に関しては、両酵素とも大差はなかった。しかし、変異型 *ApuA* Δ の方が野生型 *ApuA* よりプルランに対して触媒効率でよい値を示した。以上のように、C 末端の繰返し配列を除去しても分解活性を保持していることから、C 末端の繰返し配列はタンパク質の構造に大きな変化を及ぼさないと考えられた。加水分解産物の解析ではデンプンにおいては変化は見られなかったが、アミロースとプルランにおいては変異型の *ApuA* Δ の方が *ApuA* より速く基質を分解し、分解産物としてより多くの低分子のオリゴ糖を生産した。従って、C 末端の繰返しア

ミノ酸配列をもつことによって α-1,6-グルコシド結合分解能が抑えられ、α-1,4-グルコシド結合のアミロース含量が多いデンプンに適したアミロプurlラナーゼになったと考えられる結果を得た。

第四章の総合考察では、伝統発酵食品乳酸菌のデンプン分解酵素について本研究で得られた成果と知見をまとめた。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は伝統発酵食品乳酸菌のデンプン分解酵素の研究についての研究成果をまとめたものであり、緒論（一章）、本文（二、三章）、総合考察（四章）の 4 章からなっている。

第一章の緒論では、発酵産物から分離されたデンプン分解性乳酸菌の現状を示し、伝統発酵食品から分離した乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* L137 株が持つデンプン分解能と発酵後期過程での優勢種としての生存性の関連性を本研究の目的とする意義を論じている。第二章では、*L. plantarum* L137 からデンプン分解酵素遺伝子 *orf2* をクローニングし、塩基配列を決定している。*orf2* 遺伝子は全長 6,171 bp で、推定アミノ酸総数が 2,056 残基、分子質量が 215,625 Da と報告している。アミノ酸レベルでの同源性検索の結果、デンプン分解酵素でよく保存されている触媒に関与する 4 つの保存領域を見出している。さらに、*orf2* 遺伝子はセンス鎖 5' 末端と 3' 末端領域に特徴的なヌクレオチド繰返し配列をもち、アミノ酸レベルでも N 末端と C 末端の両方に特徴的な繰返し配列を保有していることを見出している。*orf2* 遺伝子の機能を明らかにするため、高発現させたタンパク質を精製し、それはデンプン分解酵素活性を有し、推定アミノ酸配列の N 末端から 36 アミノ酸残基のシグナル配列が切除された分泌酵素 (分子質量は 211,537 Da) であることを示している。組換え遺伝子産物は、プルランからはマルトトリオースだけを産生し、デンプンからは主にマルトトリオースとマルトテトラオースを産生することを確認している。以上の結果から、クローニングした *orf2* はデンプン分解酵素に属するアミロプurlラナーゼをコードする遺伝子で、本遺伝子を *apuA* と命名している。第三章では、アミノ酸の繰返し配列の機能を調べている。*apuA* 遺伝子産物は N 末端に 6 アミノ酸残基で構成された 39 個の繰返し配列と、C 末端に 3 アミノ酸残基で構成された 50 個の繰返し配列を持っていることを報告している。C 末端に存在する特異的な繰返し配列の酵素における機能を調べるため、野生型の *ApuA* と C 末端繰返し配列を除去した変異型 *ApuA* Δ との間で、酵素の安定性 (pH、温度)、種々の化合物の活性への影響、基質特異性や反応速度定数、基質の分解パターンを比較し、*ApuA* Δ の方が、酵素の生産性や比活性では *ApuA* より高いことを示している。最適 pH と最適温度、安定性 (pH、温度)、基質特異性に関しては、両酵素とも大差がないことを示している。しかし、変異型 *ApuA* Δ の方が野生型 *ApuA* よりプルランに対して触媒効率でよい値を示すことを確認している。以上のように、C 末端の繰返し配列を除去しても分解活性を保持していることから、C 末端の繰返し配列はタンパク質の構造に大きな変化を及ぼさないと考察している。加水分解産物の解析ではデンプンにおいては変化は見られなかったが、アミロースとプルランにおいては変異型の *ApuA* Δ の方が *ApuA* より速く基質を分解し、分解産物としてより多くの低分子のオリゴ糖を生産することを確認している。従って、C 末端の繰返しアミノ酸配列をもつことによって α-1,6-グルコシド結合分解能が抑えられ、α-1,4-グルコシド結合のアミロース含量が多いデンプンに適したアミロプurlラナーゼになったと考えられる結論を提示している。第四章の総合考察では、伝統発酵食品乳酸菌のデンプン分解酵素について本研究で得られた成果と知見をまとめている。以上のように、本論文は植物由来の乳酸菌由来のアミロプurlラナーゼの性質を詳細に検討した数少ない研究であり、乳酸醗酵食品工学技術開発へ大きな示唆を与えるものと考えられる。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。