

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 杉山 雅一

キシリトールは炭素数5の糖アルコールである。甘味料やオーラルケア製品、輸液などの食品・医薬品用途で用いられ、その市場は拡大を続けている。現行の工業的製法は植物体を加水分解して得られるD-キシロースを化学的に接触水素化する方法である。本研究の目的は、安価で安定供給可能な炭素源であるグルコースを出発原料とした微生物変換によるキシリトール新製法の開発である。グルコースから、キシリトールの2位のエピマーであるD-アラビトールを発酵生産するプロセスがすでに開発されており、アラビトールをキシリトールに高収率で異性化することが出来れば、グルコースからキシリトールが生産可能になると考えられた。本論文はキシリトール新製法確立に向けた、微生物変換によるD-アラビトールのキシリトールへのエピメリ化工程の開発に関するものである。

### (1) *G. oxydans* AJ 2847 によるD-アラビトールからのキシリトール変換

アラビトールをキシリトールへ変換する活性を有する微生物を探索し、細菌23株においてキシリトール生成活性を見出した。変換の中間体はD-キシロースであった。1つの微生物を用いたアラビトールからのキシリトール生産は、本研究が初の知見であった。これら1次選抜株より、変換活性の最優良株として *Gluconobacter oxydans* AJ 2847 株を選抜した。本菌株では高活性の膜結合型アラビトールデヒドロゲナーゼ(AraDH)とNADH依存型可溶性キシリトールデヒドロゲナーゼ(XDH)の2つの酵素の連続反応により変換されていた。

反応条件を検討したところ、10% (w/v)の洗浄菌体を用いることにより、52.4 g/lのアラビトールから29.2 g/lのキシリトールが生成した(収率56%)。ここで残存するキシロースの還元に必要な還元力NADHを供給するために種々炭素源の添加効果を検索したところ、エタノールとグルコースの添加が効果的であることを見出した。5 g/lのグルコースと5% (w/v)のエタノールを追添したところ、キシリトールの生成量は51.4 g/l(収率98%)に達した。即ち、変換反応条件を整えることにより、本菌株を用いて高収率でアラビトールからキシリトールが生産可能であることが明らかとした。なお、エタノールからのNADH再生はNAD依存型可溶性アルコールデヒドロゲナーゼとのNADHのカップリングであることが強く示唆された。

## (2) *G. oxydans* のキシリトールデヒドロゲナーゼ高発現株の構築と生産性の向上

*Gluconobacter* を用いたキシリトール変換の工業化に向けては、キシロロースのキシリトールへの還元反応の生産性向上が望まれた。このために、XDH 高発現株の構築を行った。まず *G. oxydans* AJ2847 株での形質転換系を開発した。次に、XDH を精製し、諸性質を明らかにすると共に、N 末アミノ酸配列に基づき *xdh* 遺伝子をクローニングした。プラスミド上で *xdh* を AJ2847 株に導入することにより、XDH 活性を親株の 11 倍に増強した菌株を造成することに成功した。また、実際に XDH 高発現によるキシリトール生産性向上の効果を見出した。

## (3) *G. oxydans* における還元力 NADH 生成経路の解明

残る課題は還元力 NADH 供給能の向上であると考えられたが、*G. oxydans* での NADH 再生系路については不明瞭であった。そこで更なる菌株育種に向けて NADH 再生経路の解明を行った。まず、*in vitro* でのアラビトール→キシリトール変換反応系を構築し、この系を用いて、キシリトール生成量増加因子としてペントースリン酸回路の酵素である transaldolase/glucose-6-phosphate isomerase bifunctional enzyme (TAL-PGI) と ribulokinase を単離・同定した。さらにペントースリン酸化回路の鍵酵素である glucose-6-phosphate dehydrogenase と 6-phosphogluconate dehydrogenase をそれぞれクローニングして補酵素特異性を解析し、これらの酵素の両方が NADP のみでなく NAD も還元することを明らかにした。これにより、*G. oxydans* では一般的な生物とは異なり、ペントースリン酸回路で NADH の生成が可能であることが強く示唆された。

本研究で得られた知見は *G. oxydans* によるキシリトール生産菌の更なる育種も含めて、工業的に重要な微生物である酢酸菌を用いた微生物変換の開発において有用な情報を提供するものである。よって審査委員一同は、本論文が、博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。