

学 位 論 文 題 名

乳酸菌の酸性ウレアーゼの性質とその応用に関する研究

学位論文内容の要旨

アルコール飲料には、発癌性物質であるウレタンが含有されており、ウレタン含量を低減させる方法の開発は重大な関心事となっていた。著者は、ウレタンがエチルアルコールと尿素から生成すると推定し、ウレタンの蓄積抑制のためには前駆体である尿素の分解が有効であると考え、酸性ウレアーゼを適用して、通常酸性である酒類中の尿素の分解技術を確立することを目的に本研究を行った。

まず、酸性ウレアーゼを生産し得る微生物を、広く自然界および保存菌株中に検索した結果、動物消化管内容物および糞便からの分離株16,324株のうちの700株と、保存菌株118株のうちの3株に本活性を見出した。これら酸性ウレアーゼ生産菌の菌学的諸性質を検討した結果、大部分（98%）は、*Streptococcus* 属、*Lactobacillus* 属に属していたほか、*Staphylococcus* 属、*Bifidobacterium* 属、*Escherichia* 属、*Morganella* 属の4属にも分布していた。

次に、*Lactobacillus* 属および *Streptococcus* 属に属する酸性ウレアーゼ生産菌37菌株の菌体抽出液を用いて、これらの産生する酸性ウレアーゼが、電気泳動的に6タイプの分子種に分類されることを示した。各タイプから代表酵素を1つずつ選び、それらの分子量、等電点、酵素活性および安定性におよぼす pH および温度の影響を調べ、いずれの性質にも多様性があることを明らかにした。酸性領域で最も安定に活性を維持し得た酵素は、*L. fermentum* IFO14511、*L. reuteri* RT-5、*S. mitior* PG-118由来の酵素であり、この性質は、既知の中性ウレアーゼのいずれにも認められないものである。

酸性域で安定性の高い *L. fermentum* IFO14511、*L. reuteri* RT-5、*S. mitior* PG-118由来の酵素を電気泳動的に単一になるまで精製し、その諸性質を明らかにした。精製酵素の分子量はそれぞれ220,000、220,000、200,000で、等電点は4.8、4.7、4.6であった。いずれの精製酵素も分子量の異なる3サブユニットから構成されており、サブユニット分子量は、 α : 66,000~68,000、 β : 15,000~16,800、 γ : 8,600~8,800の範囲に分布していた。サブユニットの構成比は $(\alpha_1\beta_2\gamma_1)_2$ と推定され、 $(\alpha_1\beta_2\gamma_1)$ ユニットあたり2モルのニッケルを含有していた。

3 精製酵素のアミノ酸組成は互いに近似しており、チロシン、メチオニンの含量が中性ウレアーゼより高いことが特徴的であった。*L. fermentum* IFO14511由来の酵素の α , β , γ サブユニットを分離し、それぞれのアミノ酸組成およびN末端アミノ酸配列を決定した。3 精製酵素の基質特異性は同じ特徴を示し、尿素とヒドロキシ尿素を基質とした。それぞれの至適反応 pH は、2, 2, 4.5であり、至適反応温度はいずれも65℃であった。精製酵素の至適反応 pH, 37℃における K_m 値は、それぞれ2.7, 2.8, 2.0mM であり、 V_{max} 値は、それぞれ440, 580, 460 μ mol/min/mg protein であった。いずれの酵素活性も pH 3～9 の範囲で安定であり、一方 pH 4 の緩衝液中で種々温度で30分間保温したところ、*L. fermentum* IFO14511, *L. reuteri* RT-5 由来の精製酵素活性は50℃まで、*S. mitior* PG-118由来の精製酵素活性は40℃まで安定であった。3 精製酵素活性とも Hg^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , パラクロロメリクリ安息香酸、アセトヒドロキサム酸により阻害された。

次に、*L. fermentum* IFO14511による酸性ウレアーゼ生産のための最適培養条件の検討を行った。酸性ウレアーゼ生産に対して最適な炭素源はグルコースであり、窒素源はペプトン、肉エキス、酵母エキスであった。尿素を添加して酵素を誘導生産させたところ、単位液量あたり酵素量は4倍にも増加した。0.005% (W/V) 硫酸ニッケル6水和物と、0.005% (W/V) 硫酸マンガン4～5水和物の添加が有効であり、これら2金属塩は酵素生産に対して相乗効果を示した。至適生育温度は34～42℃であり、酵素生産は30～36℃の範囲で高く、32℃で最も高かった。そこで種培養は37℃で、酵素生産培養は32℃で培養した。炭酸ナトリウムを中和剤として培養 pH を4～4.5に制御することにより、酵素生産量が高くなった。これらの結果をもとに、2,000 ℓ 発酵槽での最適培養条件を設定して培養を行ったところ、酸性ウレアーゼの活性は40units/mlに達し、これは検討開始時の約20倍の上昇であった。

次いで、*L. fermentum* IFO14511由来の酸性ウレアーゼを用いて、清酒中での尿素除去に影響する種々の要因について調べた。清酒中で保温すると中性ウレアーゼは不安定であったが、酸性ウレアーゼは安定であり、30℃で16日間保温後も、約50%の活性が残存していた。尿素の除去に対する至適温度は30～40℃であった。pH4.9以下では、pHが高いほど尿素の除去は速かった。30units/ ℓ の酸性ウレアーゼを添加し、15℃で反応させることにより、4日間で30ppmの尿素を完全に除去することが出来た。一方、30ppmの尿素を含む清酒を、30℃で3日間保温すると120ppbのウレタンが生成した。これに対し、酸性ウレアーゼで尿素を除去した清酒を同条件で保温しても、ウレタンの生成は認められず、本酵素がウレタンの生成抑制に有効であることが示された。酸性ウレアーゼ（菌体抽出液）の変異原性および毒性試験の結果、いずれも異常は認めら

れなかった。

著者らが本研究で開発した、酸性ウレアーゼを酒質保全剤として清酒に添加する方法は、国税庁の認可を経てすでに清酒製造業界において広く実施されて、極めて有効な方法であることが、工業的規模で実証されている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 野 喺 司

副 査 教 授 千 葉 誠 哉

副 査 教 授 富 田 房 男

アルコール飲料には、発癌性物質であるウレタンが含有されており、ウレタン含量を低減させる方法の開発は、重大な関心事であった。本論文は、ウレタンの蓄積抑制のためには酒類中に含まれる尿素の分解が有効であると考え、酸性ウレアーゼを適用して通常酸性であるアルコール飲料中の尿素分解技術を確立した結果をまとめたもので、総頁数95、表30、図18、引用文献95からなる和文の論文である。その他に関連論文7編が添えられている。主な内容は以下のように要約される。

1. 酸性ウレアーゼ生産菌の検索とその菌学的性質

酸性ウレアーゼを生産しうる微生物を広く自然界および保存菌株中に検索し、703株に本活性を見出した。これら酸性ウレアーゼ生産菌の菌学的諸性質を検討した結果、大部分（98％）は、*Lactobacillus* 属、*Streptococcus* 属に属していたほか、*Staphylococcus* 属、*Bifidobacterium* 属、*Escherichia* 属、*Morganella* 属の4属にも分布していた。

2. 酸性ウレアーゼの多様性

Lactobacillus 属および *Streptococcus* 属に属する酸性ウレアーゼ生産菌37菌株の菌体抽出液を用いて、これらの生産する酸性ウレアーゼが、電気泳動的に6タイプの分子種に分類されることを示した。各タイプから代表酵素を1つずつ選び、それらの分子量、等電点、酵素活性および安定性におよぼす pH および温度の影響を調べ、いずれの性質にも多様性があることを明らか

にした。*L.fermentum* IFO14511, *L.reuteri* RT-5, *S.mitior* PG-118由来の酵素は酸性領域で最も安定に活性を維持し、この性質は、既知の中性ウレアーゼのいずれにも認められないことを示した。

3. 精製酸性ウレアーゼの蛋白化学的および酵素学的性質の解析

酸性域で安定性の高い、*L.fermentum* IFO14511, *L.reuteri* RT-5, *S.mitior* PG-118由来の酵素を電気泳動的に単一になるまで精製した。3精製酵素の分子量は200,000~220,000, 等電点は4.6~4.8の範囲に分布していた。いずれの酵素も異なる3種のサブユニット(α , β , γ)から成り、その構成比は $(\alpha_1\beta_2\gamma_1)_2$ と推定された。更に、金属含量、アミノ酸組成、サブユニットのN末端アミノ酸配列、などの蛋白化学的特性を明らかにした。一方、3酵素は、尿素とヒドロキシ尿素を基質とする同じ基質特異性を有することを示すとともに、それぞれの至適反応pH, 至適温度, K_m と V_{max} 値, 安定なpH領域および熱安定性, 阻害剤などの酵素学的性質を明らかにした。

4. 酸性ウレアーゼ生産条件の検討

L.fermentum IFO14511による酸性ウレアーゼ生産のための最適条件の検討を行った。最適な炭素源はグルコースであり、窒素源はペプトン, 肉エキス, 酵母エキスであった。尿素添加により酵素の誘導生産がみられ、酵素量は4倍に増加した。硫酸ニッケルと硫酸マンガンの添加が有効であり、これら2金属塩は酵素生産に対して相乗効果を示した。種培養を37℃に酵素生産培養を32℃とし、炭酸ナトリウムを中和剤として培養pHを4~4.5に制御しつつ2,000ℓ醗酵槽で培養したところ、酸性ウレアーゼの活性は検討開始時の約20倍に上昇し、40units/mlという高い価に達した。

5. 酸性ウレアーゼによる清酒中の尿素除去とウレタン生成の抑制

酸性ウレアーゼを用いて清酒中の尿素的除去活性に影響する因子について明らかにするとともに、30units/ℓの酸性ウレアーゼを添加し、15℃で反応させると、4日間で30ppmの尿素を完全に除去することを確認した。一方、30ppmの尿素を含む清酒を、30℃で3月間保温すると120ppbのウレタンが生成した。これに対し、酸性ウレアーゼで尿素を除去した清酒を同条件で保温してもウレタンの生成は認められず、本酵素はウレタンの生成抑制に有効であることを示した。酸性ウレアーゼ(菌体抽出液)の変異原性および毒性試験の結果、いずれも異常は認められなかった。

本研究で著者らが開発した酸性ウレアーゼをウレタン生成抑制のための酒質保全剤として清酒に添加する方法は、国税庁の認可を経て清酒製造界で広く実施されており、極めて有効な方法であることが工業的規模で実証されている。本研究は、このように産業上重要な貢献をすると同時に、酸性ウレアーゼを精製し、酵素学的あるいは蛋白化学的に詳しく調べた初めてのものであり、学術的にも高く評価されるものである。

よって審査員一同は、別に実施した学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者柿本茂八は農学博士の学位を受けるに十分な資格があるものと認定した。