

Development of Production Process of Difructose Anhydride (DFA III) from Inulin-containing Dahlia (*Dahlia* sp.) Tubers using *Nonomuraea* sp. ID06-A0189 (=AHU1850) Inulin fructotransferase (DFA III-forming) (*Nonomuraea* sp. ID06-A0189 (=AHU1850) 由来イヌリン果糖転移酵素を用いたイヌリンを含有するダリア (*Dahlia* sp.) 球根からのDFAIII生産方法の開発)

学位論文内容の要旨

骨の主要構成物質であるカルシウムの摂取不足により、骨粗しょう症による股関節骨折がアジア諸国で増加してきている。骨粗しょう症の予防のためには、カルシウム摂取の他に摂取されたカルシウムの吸収効率が重要である。

Di-D-fructofuranose 1, 2':2, 3' dianhydride (DFAIII)はラットおよびヒトにおいてカルシウム吸収を促進させることから、骨粗しょう症を予防するための食品成分として認められている。DFAIIIは微生物のイヌリン果糖転移酵素(inulin fructotransferase;*ift*)によってイヌリンから作られる。本実験では、インドネシアの土壌から単離された放線菌*Nonomuraea* sp. ID 06-A0189由来の*ift*を用いてイヌリンを含有するダリア球根からDFAIIIを生成した。ダリア球根はインドネシアにあるダリア農園から収穫された。ダリアは切り花生産のためにインドネシアで一般的に栽培されている。酵素の生産方法、遺伝子解析、ダリア球根からのDFAIII生成について説明する。

1. *Nonomuraea* sp. ID 06-A0189が産生する*ift* (DFA III生成)の生産方法

インドネシアの土壌から単離された 100 株の放線菌から、培養液上清に *ift* を生産する分離株 ID06-A0189 が選択された。表現型と遺伝子型の分析による分類学的同定により、分離株は *Nonomuraea* sp.と同定され、この属では *ift* 生産株が初めて発見された。粗酵素の最適温度は 65℃、最適 pH は 5.5 であり、イヌリンから 80%の変換率と同様に 70℃まで熱に安定であった。イヌリンは *ift* 生産にとって最適の炭素源であった。窒素源として酵母エキスと共に硫酸アンモニウムを添加すると酵母エキスのみの場合よりも酵素活性が増加した。20g/l のイヌリン、1g/l の酵母エキス及び 5g/l の硫酸アンモニウムを含む培養液において 41units/mL の酵素活性が得られた。

2. *ift* 遺伝子の解析

Nonomuraea sp. ID06-A0189 の *ift* 遺伝子はインバース PCR 法によって増幅された。遺伝子配列は *Escherichia coli* を用いて決定、発現させられた。1,326 塩基対の遺伝子は *Nsp-ift* に指定され、推定 37 のアミノ酸からなるシグナルペプチドと 404 のアミノ酸からなる成熟タンパク質から構成されるタンパク質をコードしていた。推定されるリボソーム結合配列は開始コドンから 12 塩基上流にあることが確認された。酵素の推定アミノ酸配列は *Frankia* sp. EAN1pec の持つイヌリン果糖転移酵素 (DFAI 生成) の推定アミノ酸配列に最も類似していた (72% 一致)。 *ift* の推定アミノ酸配列の系統発生解析は *Nonomuraea* sp. ID06-A0189 が *Frankia* sp. EAN1pec と共に他 *Arthrobacter* sp. H65-7, *A. globiformis* and *Bacillus* sp. snu-7 由来の知られた酵素とははっきり異なる分岐群を形成することを示し、それぞれ 57%、56%、56% 一致していた。

3. *Nonomuraea* sp. ID06-A0189 *ift* によるダリア (*Dahlia* sp.) 球根からの DFA III 生成

ダリア球根はイヌリンの分解を防ぐため乾燥球根チップに加工された。ダリア球根はまたフェノール性化合物とアルカロイドであるアトロピンを含んでいる。多くの *Asteraceae* 科の生の球根に見られる高活性ポリフェノール酸化酵素は、加工中にポリフェノール性化合物を酸化することで球根を黒くする可能性がある。アトロピンを除去することとダリア球根が黒くなるのを軽減させることを目的としてブランチングが用いられた。乾燥チップはブランチング条件 100℃ で 5 分では色が薄かったが、85℃ で 10 分では茶色に変色した。生のダリア球根からのダリア粉末の変換率は 16.8 % ± 2.5 (w/w) であった。最適温度および最適 pH において 25ml の 10 mM クエン酸水酸化ナトリウム緩衝液中で 1600mg のダリア粉末 (56g/l) を用いて酵素反応を行ったところ、6 時間後に 885.7mg の DFAIII が得られ、ダリア粉末から DFAIII への変換率は 63.3% であった。同じ濃度においてダリア粉末の量はより多い量の DFAIII を得るために最適化されたままだろうと考えている。ダリア粉末と生のダリア球根のイヌリン含有量はそれぞれ 63.3 % (w/w) と 10.6 % (w/w) であると推定された。80℃ のイヌリン抽出過程を省いても DFAIII 生成には影響を与えない傾向が見られ、従ってより効率的であるといえる。

4. 結論

Nonomuraea sp. は新規の *ift* 生産株であると考えられる。*Nonomuraea* sp. の培養上清は DFAIII の大量生産に期待できる特性を示した。*Nonomuraea* sp. が生産する酵素は過去に報告された他の *ift* とははっきり異なることが明らかにされた。イヌリンを含有するダリア球根からの DFAIII 生産へ *ift* を利用することは DFAIII の大量生産にダリア球根を用いることができる可能性を示した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	浅野行蔵
副査	准教授	曾根輝雄
副査	客員教授	鎌形洋一
副査	特任准教授	田中みち子

学位論文題名

Development of Production Process of Difructose Anhydride (DFA III) from Inulin-containing Dahlia (*Dahlia* spp.) Tubers using *Nonomuraea* sp. ID06-A0189 (=AHU1850) Inulin fructotransferase (DFA III-forming) (*Nonomuraea* sp. ID06-A0189 (=AHU1850) 由来イヌリン果糖転移酵素を用いたイヌリンを含有するダリア (*Dahlia* spp.) 球根からのDFAIII生産方法の開発)

本論文は、英文173頁、図35、表27、11章からなり、参考論文5編、特許1編が付されている。

骨の主要構成物質であるカルシウムの摂取不足により、骨粗しょう症による股関節骨折がインドネシアで増加してきている。骨粗しょう症の予防のためには、カルシウム摂取の他に摂取されたカルシウムの吸収効率が重要である。

Di-D-fructofuranose 1, 2':2, 3' dianhydride (DFAIII)はラットおよびヒトにおいてカルシウム吸収を促進させることから、骨粗しょう症を予防するための食品成分として認められている。DFAIIIは微生物のイヌリン果糖転移酵素(inulin fructotransferase; *ift*)によってイヌリンから作られる。本実験では、インドネシアの土壌から単離された放線菌*Nonomuraea* sp. ID 06-A0189由来の*ift*を用いてイヌリンを含有するダリア球根からDFAIIIを生成した。ダリアは切り花生産のためにインドネシアで一般的に栽培されており、ダリア球根は容易に入手できる。酵素の生産方法、遺伝子解析、ダリア球根からのDFAIII生成について説明する。

1. *Nonomuraea* sp. ID 06-A0189が産生する*ift* (DFA III生成)の生産方法

インドネシアの土壌から単離された100株の放線菌から、培養液上清に*ift*を生産する分離株ID06-A0189が選択された。表現型と遺伝子型の分析による分類学的同定により、分離株は*Nonomuraea* sp.と同定され、この属では*ift*生産株が初めて発見された。粗酵素の最適温度は65℃、最適pHは5.5であり、イヌリンから80%の変換率で70℃まで熱に安定であった。イヌリンは*ift*生産にとって最適の炭素源であった。窒素源として酵母エキスと共に硫酸アンモニウムを添加すると酵母エキスのみの場合よりも酵素活性が増加した。20g/lのイヌリン、1g/lの酵母エキス及び5g/lの硫酸アンモニウムを含む培養液において41 u/mLの酵素活性が得られた。

2. *ift* 遺伝子の解析

Nonomuraea sp. ID06-A0189 の *ift* 遺伝子はインバース PCR 法によって増幅された。遺伝子は *Escherichia coli* を用いて決定、発現させられた。1,326 塩基対の遺伝子は Nsp-*ift* と命名され、推定 37 のアミノ酸からなるシグナルペプチドと 404 のアミノ酸からなる成熟タンパク質から構成されるタンパク質をコードしていた。推定されるリボソーム結合配列は開始コドンから 12 塩基上流にあることと推定された。酵素の推定アミノ酸配列は *Frankia* sp. EAN1pec の持つイヌリン果糖転移酵素(DFAI 生成)の推定アミノ酸配列に最も類似していた(72%相同)。 *Ift* の推定アミノ酸配列の系統発生解析は *Nonomuraea* sp. ID06-A0189 が *Frankia* sp. EAN1pec と共に他 *Arthrobacter* sp. H65-7, *A. globiformis* あるいは *Bacillus* sp. snu-7 由来の知られた酵素とははっきり異なるクラスターを形成することを示し、それぞれ 57%、56%、56%の相同性であった。

3. *Nonomuraea* sp. ID06-A0189 *ift* によるダリア(*Dahlia* sp.)球根からの DFA III 生成

ダリア球根はイヌリンの分解を防ぐため乾燥球根チップに加工された。ダリア球根はまたフェノール性化合物とアルカロイドであるアトロピンを含んでいる。多くの *Asteraceae* 科の生の球根に見られる高活性ポリフェノール酸化酵素は、加工中にポリフェノール性化合物を酸化することで球根を黒くしてしまう。ダリア球根が黒くなるのを防止することとアトロピンを除去することを目的としてブランチングが用いられた。乾燥チップはブランチング条件 100℃で 5 分では色が薄かったが、85℃で 10 分では茶色に変色した。生のダリア球根からのダリア粉末の変換収率は $16.8\% \pm 2.5$ (w/w)であった。最適温度および最適 pH において 25ml の 10 mM クエン酸水酸化ナトリウム緩衝液中で 1600mg のダリア粉末(56g/l)を用いて酵素反応を行ったところ、6 時間後に 885.7mg の DFAIII が得られ、乾燥ダリア球根粉末から DFAIII への変換率は 57%であった。この DFAIII 生成反応の結果から、乾燥ダリア球根粉末と生のダリア球根のイヌリン含有量はそれぞれ 63.3 % (dry w/dry w) と 10.6 % (dry w/wet w)であると推定された。より効率的な条件を検討し、イヌリンを抽出する行程なしにダリア根から直接 DFAIII を生成する方法を確立してパイロットプラントでの試験を実施している。

4. 結論

本研究における新規発見は、①インドネシアで分離した希少放線菌 *Nonomuraea* sp. はイヌリンフラクトトランスフェラーゼの活性があり、DFAIII を産生できた。②分離した *Nonomuraea* sp. 株の *ift* 遺伝子は、機知の配列と異なるクラスターに分別された。③本属の基準株には、*ift* 遺伝子も活性も無かった。④イヌリンを抽出精製工程なしにダリア球根から直接的に DFAIII を高効率で産生する加工法を開発したことであり新規性が評価できる。

よって、審査員一同は、Sri Pudjiraharti が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。