

氏名	和田 裕
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第1916号
学位授与の日付	平成11年3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生物資源科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Studies on the survey of novel nitrile hydratase producing microorganisms and their application for the synthesis of useful amide (新しい特性を持つニトリルヒドラーターゼ生成菌の探索と有用アミド合成に関する研究)
論文審査委員	教授 杉尾 剛 教授 白石 友紀 教授 山田 哲治

学位論文内容の要旨

環境適応型のバイオプロセスを化学工業に導入する試みが盛んである。その代表例は *Rhodococcus rhodochrous* J1 菌のニトリルヒドラーターゼを用いたアクリルアミドの工業生産である。本方法はニコチンアミドの工業生産にも応用され、今後本酵素の応用範囲は更に拡大する兆しである。本論文では、第一章で工業用アミド生産菌 *R. rhodochrous* J1 がこれまで検討されてきた高分子型のニトリルヒドラーターゼと異なる低分子型のニトリルヒドラーターゼを生成することを見出し、本酵素を精製単離してその諸性質を明らかにした。第二章では、J1 菌の2種のニトリルヒドラーターゼ生成に対する培養温度の影響を調べた。第三章では、37-50°C の中高温度域における新しい有用菌株の分離を試み、*Streptomyces* 属菌が初めてニトリルヒドラーターゼを生成することを見出し、本酵素の諸性質を明らかにした。第四章では、家畜の飼料添加剤 α -ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸アミドをニトリルヒドラーターゼを用いて生産する方法を検討し、極めて効率的な新しい α -ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸アミド生産法を確立した。

論文審査結果の要旨

高温、高圧、強酸、強アルカリあるいは各種有機溶媒を用いた従来の化学的合成方法に代わって、最近、環境適応型のバイオプロセスを化学工業に導入する試みが盛んである。その代表的な例は、ニトリルヒドラーゼを用いたアクリロニトリルの水和によるアクリルアミドの工業生産である。本方法はニコチンアミドの工業生産にも応用され、今後本酵素の応用範囲は更に拡大する兆しをみせている。

本研究は、工業用アミド生産菌である *Rhodococcus rhodochrous* J1 が高分子型ニトリルヒドラーゼ(H-NHase)と、低分子型ニトリルヒドラーゼ(L-NHase)の2種類のニトリルヒドラーゼを生産することに着目し、これまで検討がなされていなかったL-NHaseを単一に精製し、本酵素が芳香族ニトリルにも作用する広い基質特異性を示すが、H-NHaseに比べて熱安定性では劣っていることを明らかにした。更に、*Rhodococcus rhodochrous* J1の生産する2種類のニトリルヒドラーゼ生成に対する培養温度の影響を検討し、37℃培養において得られる菌体は、28℃培養で得られる菌体に比較して5倍高いH-NHase活性を示すが、L-NHase活性は28℃培養菌体においてのみ活性が存在すること、これらの現象がH-NHaseの熱安定性に原因していることを明確にした。ニトリルヒドラーゼ生成菌の分離は、分離に用いるニトリルが揮発性であるため37℃以下で集積培養が行われてきた。沸点の高いジニトリルを用いた中高温度域(37-50℃)での集積培養を新たに試み新規なニトリルヒドラーゼ生産菌(*Streptomyces* sp. 45A40)を分離し、放線菌がニトリルヒドラーゼを生産することを初めて示すとともに、本菌からNHaseを単一に精製し、本酵素がコバルトをコファクターにすること、広い基質特異性を示すが熱安定性に関してはJ1株のH-NHaseに劣っていることなどの諸性質を明らかにした。最近、 α -ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸やそのアミド体は、生体内でメチオニンに変換されることから、家畜の飼料添加剤として注目されている。 α -ヒドロキシ-4-メチルチオニトリルに作用するニトリルヒドラーゼ生産菌を広く検索し、*Rhodococcus* 属細菌を分離した。本菌を用いた培養条件の最適化を図り、休止菌体を直接触媒として用いることにより、16時間の反応で、100%の転換収率で最大1701mM (254 g/L)の α -ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸アミドの生産に成功した。

以上のように本研究は、環境適応型のバイオプロセスとして重要なニトリルヒドラーゼを精製して性質を明らかにするとともに、酵素生産に及ぼす培養温度の影響について詳細な検討を加えた。また、放線菌がニトリルヒドラーゼを生産することを初めて見だし、本酵素を単一精製し性質を明らかにした。更に、飼料添加剤 α -ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸アミドの新しい微生物的生産法を確立し、環境適応型のバイオプロセスの研究分野に重要な知見を加えた。よって、本論文は博士(農学)の学位に値するものと判定した。