

氏名(本籍)	ちん 陳	ぶん 文	びん 彬	(中国)
学位の種類	農	学	博	士
学位記番号	博甲第369号			
学位授与年月日	昭和61年3月25日			
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当			
審査研究科	農学研究科			
学位論文題目	Studies on the Endo- β -1.3-Xylanases of <i>Aspergillus terreus</i> (<i>Aspergillus terreus</i> の生産するEndo- β -1.3-Xylanasesに関する研究)			
主査	筑波大学教授	農学博士	安井恒男	
副査	筑波大学教授	農学博士	新井勇治	
副査	筑波大学教授	農学博士	日下部功	
副査	筑波大学教授	農学博士	佐藤昭二	

論 文 の 要 旨

陸生植物の細胞壁を構成する多糖類中、キシラン (β -1.4-キシラン) は普遍的に且つセルロースに次いで多量に存在しており、キシラン分解酵素に関する研究も β -1.4-キシランに関するものが大勢を占めている。一方海生植物に於て、緑藻の *Bryopsis*, *Caulerpa*, *Halimeda* 属には β -1.3-キシランが含まれ、また紅藻の *Rhodymenia Palmata* には β -1.4-, β -1.3-結合をもつキシラン(ロジメナン)が存在しているが、これまで海藻キシランの構造及びその分解酵素に関する知見は非常に乏しかった。

本研究の目的は自然界からEndo型 β -1.3-キシラナーゼ生産菌の分離、その生産する β -1.3-キシラナーゼの研究及びその酵素を用いての多糖瓶構造解析、バイオマス利用への応用を行う事にある。本論文は β -1.3-キシランを分解する微生物を検索し、糸状菌をえ、これを *Aspergillus terreus* と同定し、この菌の生産する酵素がEndo型のキシラナーゼである事を明らかにしたものである。更に酵素を単一成分にまで純化し、その性質を詳細に研究して特徴を明らかにし、この酵素の特性を応用してロジメナンの構造解析を行ったものである。

第一章では酵素反応基質の調製について述べられている。*Bryopsis maxima*, *Caulerpa sp.* の乾燥藻体 (100g) から β -1.3-キシランをアルカリ抽出、精製し、それぞれ5g, 10gの精製品をえた。これら精製品の構成糖はキシロースのみで他の糖を含まず、メチル化分析及び ^{13}C -NMR分析の結果 β -1.3-結合よりなる事が確認された。次にダルス (*Rhodymenia palmata*, 60g) から水溶性

キシランを抽出し、精製品15gをえた。この構成糖もキシロースのみで、メチル化分析の結果等より、得られた精製ロジメナンは β -1.4-, β -1.3-キシロシド結合を持つ事が確認された。

第二章では β -1.3 キシラナーゼ生産菌の検索、分離同定及び酵素生産条件が述べられている。海藻粉末 (*Lessonia nigricans*) を炭素源とする集積培養、液体培養による一次スクリーニング法により、海藻、海湾近くの土壌、海砂等より分離を試みた。その結果幾つかの糸状菌が得られたが、最終的には β -1.3-キシラン分解酵素を生産する一糸状菌A-07株を選出した。本菌は形態的観察から *Aspergillus terreus* に属するものと同定された。また本菌の酵素生産条件を検討し、条件を設定した。

第三章ではA-07株の生産する酵素が β -1.3-キシランをendo-wiseに分解する酵素を含む事を確認した結果が述べられている。この粗酵素は反応の初期からキシロピオース、トリオースを生成し、キシロースは後に検出される。本章ではまた β -1.3-キシロオリゴ糖の調製法が述べられている。 β -1.3-キシラン (20g) を2%硫酸、100°C、15分の加水分解で得られる糖液を炭示カラムクロマトグラフィーで分画した。各エタノール溶出分画を集め濃縮結晶化し、オリゴ糖各々約1gをえた。構成糖分析、平均重合度の測定、メチル化分析等より、純度、構造が決定され、それぞれ β -1.3-キシロピオース、同トリオース、同テトラオースである事が確認された。

第四章では該菌の β -1.3-キシラナーゼの精製について述べられている。培養液を硫酸分画沈澱、SP-Sephadex C-25クロマトグラフィー、Biogel P-100カラムによるゲル濾過、等電点電気泳動法により、6種の酵素分画(EF-1~6)が得られた。各分画はポリアクリルアミドディスク電気泳動で均一である事が示された。

第五章では前章の如く精製された精製 β -1.3-キシラナーゼの諸性質について述べられている。6種の酵素の性質は下表のようにまとめられ、総体的に性質は類似しているが、分子量や等電点などに明かな相違も見られた。

	EF-1	EF-2	EF-3	EF-4	EF-5	EF-6
分子量	11.000	20.000	14.500	14.500	11.000	13.500
等電点	3.7	4.6	6.2	6.9	4.4	7.1
反応の至適pH	5.0	5.5	5.0	4.0	4.5	4.5
反応の至適温度	55°C	45°C	50°C	40°C	40°C	50°C
pH安定性	3-6	3-6	3-6	3-6	3-6	3-6
熱安定性	60°Cまで	60°Cまで	60°Cまで	60°Cまで	50°Cまで	50°Cまで

いずれの酵素活性も H_g^+ 、 M_n^{++} N-プロモサクシンイミドにより強く阻害されるが、その他の金属イオン、EDTA、SH試薬、SDS等によっては何れの酵素活性も影響されず、これらの点は共通していた。

これら6種の酵素は何れも β -1.3-キシランとロジメナンに活性を示したが、 β -1.4-キシラ

ン、 β -1.3-グルカン、セルロース等には全く作用せず、その他のグリカナーゼ、グリコシダーゼの基質にも作用しなかった。また何れの酵素も β -1.3-キシロビオース(X_2)、同トリオース(X_3)に作用しなかったが、 β -1.3-キシロテトラオース(X_4)に対してはEF1.4及び5のみが作用し、EF-1は X_2 とisomeric xylo-tetraose(iso X_4)、EF-4は X_3 と少量のキシロース(X_1)、EF-5は X_3 とiso X_4 を生成し、オリゴ糖加水分解パターンが異なる事が示されている。

β -1.3-キシランの分解パターンから2群に大別される。I群にはEF-1.2及び5が属し、分解産物として X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 及び構造未確認のキシロビオースを生成する。II群はEF-3.4及び5が属し、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 及び一種類のisomeric xylo-trioseを生成する。これらの結果から6種の酵素はいずれもendo型の β -1.3-キシラナーゼである事が確認された。

第六章では精製 β -1.3-キシラナーゼ(EF-6)によるロジメナンの加水分解について述べられている。ロジメナンをEF-6で分解すると各種のオリゴ糖(X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_2)を生成する事がパークロマトグラフィー(PPC)で確認された。これらのオリゴ糖はmalbrancheaの β -1.4-キシロシダーゼの作用ですべてキシロースになる事から、生成したオリゴ糖は β -1.4-キシロオリゴ糖であると結論した。加水分解で生成したオリゴ糖の大部分はトリオースであり、テトラオース、ペンタオースは少量で、キシロビオースは更に少量であった。以上の結果からロジメナンは β -1.4-キシロトリオース単位が大部分を占め β -1.4-テトラオース及びペンタオース単位は少なく、更にビオース単位は非常に少ない事が示唆され、また β -1.3-キシラナーゼはロジメナン中の β -1.3-結合のみを特異的に切断する事が確認された。一方ロジメナンを放線菌の β -1.4-キシラナーゼで分解するとキシロースと数種のオリゴを生成する事がPPCで確認された。この糖液にmalbrancheaの β -1.4-キシロシダーゼを作用させると大部分のオリゴ糖は消滅し、キシロースとisomeric xylo-trioseのみとなった。このisomeric xylo-trioseを分離、精製して、酵素による分解性、構成糖、メチル化分析、融点、施光度等の検討を行った結果、その構造は3-0- β -D-Xylopyranosyl-4-0- β -D-Xylopyranosyl-D-Xyloseである事が確認された。これらの結果から放線菌の β -1.4-キシラナーゼは β -1.4結合に特異的で、 β -1.3-結合には全く作用しない事、ロジメナン中の β -1.3結合の非還元基側の β 1-4結合を切断するが、還元基側の結合は切断しない(しがたい)事が明らかにされ、また β -1.3-キシラナーゼの加水分解の結果から推論されたロジメナンの構造を支持する結果を与えた。

以上の如く、*Aspergillus terreus*-A-07の β 1.3-キシラナーゼ(EF-1)の作用様式及び β 1.3-特異性はより一層確実なものとなり、ロジメナンの構造についても一段と詳細な構造が提示された。

審 査 の 要 旨

これ迄 β -1.3-キシラン分解酵素についての研究は少なく、単にその活性を認めた程度の不十分な研究が大部分であった。酵素を精製し検討したものとしては*Chaetomium globosum*の酵素がある

のみで、これはexo型 β -1.3 キシラーナーゼであった。これ迄endo型の β -1.3 キシラーナーゼについての報告はなく、その存在を実証し、詳細に酵素化学的検討を加えたものは本論文が初めてである。本研究に使用された基質はすべて市販されておらず、海藻の採取から始まり、各種キシラン及びキシロオリゴ糖の調製などかなりの時間と労力が費されている。これらのキシラン、キシロオリゴ糖の純度、構造の確認など確実に行われており、結果の信頼度を高めている。

一方菌の分離源を海藻、海湾の物件にもとめ、乾燥藻体を炭素源とした集積培養など、菌の分離にも工夫が見られる。分離菌は*aspergillus terreus*と同定されたが*A. terreus*の他の菌株にも β -1.3 キシラーナーゼ活性が認められ、本菌の同定に誤りのない事が裏付けられている。

該菌から6種の酵素が生産されているが、このような事実は他の微生物の多くの酵素の生産に於ても認められている。この6種の酵素は互に類似している部分が多いが、必しも同じではなく明らかに区別する事ができる。キシラン分解のパターンから6種の酵素が2群に分けられる事を示しているが、免疫学手法を用いて蛋白質の異同を判断する事が可能であり今後検討の余地がある。

酵素の応用としてロジメナンの構造解析を行っているが、この結果ロジメナンの構造は一層明確化され、また本菌の β 1.3-キシラーナーゼの特異性も実証された事になり重要な結論を与えている。このように基質特異性の明確な酵素は糖の構造決定に非常に有効な手段となる。

将来この酵素を用いキシラン含有藻類のバイオマスとしての利用も可能であると期待される。

よって、著者は農学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。