

氏名(本籍)	かね 金子	さとし 哲 (栃木県)
学位の種類	博士(農学)	
学位記番号	博甲第1,340号	
学位授与年月日	平成7年3月23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 SUBSTRATE SPECIFICITIES OF α -L-ARABINOFURANOSIDASES (α -L-アラビノフラノシダーゼの基質特異性に関する研究)	
主査	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 村上 和雄
副査	筑波大学教授	農学博士 山口 彰
副査	筑波大学助教授	農学博士 神山 由

論 文 の 要 旨

α -L-アラビノフラノシダーゼはヘミセルロースの末端に存在するアラビノースの結合を加水分解する酵素であり、微生物の植物病原性、植物細胞壁多糖の構造と機能、ヘミセルロースの利用、食品等に関連して研究されてきたが、基質特異性に関する研究は少なく、未だ不明な点が多い。そこで、アラビノフラノシダーゼの基質特異性を詳細に調べることを目的とし、アラビノースを含む様々な基質に対する特異性を明らかにした。酵素は *Aspergillus niger* 5-16, *Bacillus subtilis* 3-6, *Aspergillus awamori* IFO 4033, *Streptomyces diastatochromogenes* 065, *A. niger* (Megazyme 社) 由来のものを用いた。基質はアラビノキシラン, アラビノガラクトサン, アラビアガム, アラビナン, アラビノキシロオリゴ糖 {末端にアラビノースを持つもの (A_1X_2), 側鎖アラビノースを持つもの (A_1X_3) とキシロシルアラビノースの結合を持つもの (A_1X_4)}, アラビナンの基本構造であるメチルアラビノピオシド ($A_f1 \rightarrow 2 A_f$, $A_f1 \rightarrow 3 A_f$, $A_f1 \rightarrow 5 A_f$) とメチルアラビノトリオシド { $A_f1 \rightarrow 5 (A_f1 \rightarrow 3) A_f$ } を用いた。まず, *A. niger* 5-16の菌体内アラビノフラノシダーゼを精製し, 特異性を明らかにした。この酵素はアラビナン, A_1X_2 には作用したが, アラビノキシラン, アラビアガム, A_1X_3 , A_1X_4 には作用しなかった。次に, *B. subtilis* 3-6の酵素を精製し, 特異性を明らかにした。この酵素はアラビナン, A_1X_2 , A_1X_3 には作用したが, アラビノキシラン, アラビアガム, アラビノガラクトサン, A_1X_4 には作用しなかった。*S. diastatochromogenes* 065の酵素は A_1X_2 にわずかに作用したが, A_1X_3 , A_1X_4 には作用しなかった。*A. awamori* IFO 4033の酵素はアラビナン, 側鎖のないアラビナン, アラビノキシラン, アラビノガラクトサン, A_1X_2 , A_1X_3 には作用したが, アラビアガム, A_1X_4 には作用しなかった。*A. ni-*

ger (Megazyme 社) の酵素はアラビナン, A_1X_2 , A_1X_3 には作用したが, アラビノキシラン, アラビアガム, アラビノガラクトン, A_1X_4 には作用しなかった。このことから, アラビノフラノシダーゼが基質に作用する際, 少なくとも 2 通りの様式が存在する事が明らかとなった。1つは末端のアラビノースのみを加水分解するもの, 2つ目は側鎖のアラビノースも加水分解するものである。

次にアラビナンの基本構造であるアラビノオリゴ糖に対する特異性を検討した。*A. niger* 5-16, *B. subtilis* 3-6, *S. diastatochromogenes* 065の酵素はメチルアラビノピオシドを $Af1 \rightarrow 2 Af > Af1 \rightarrow 3 Af > Af1 \rightarrow 5 Af$ の順に加水分解し, また, メチルアラビノトリオシドの $1 \rightarrow 3$ 結合を $1 \rightarrow 5$ 結合より速く加水分解した。*A. awamori* IFO 4033の酵素はメチルアラビノピオシドを $Af1 \rightarrow 5 Af > Af1 \rightarrow 2 Af > Af1 \rightarrow 3 Af$ の順に加水分解し, また, メチルアラビノトリオシドの $1 \rightarrow 3$ 結合を $1 \rightarrow 5$ 結合より速く加水分解した。*A. niger* (Megazyme 社) の酵素はメチルアラビノピオシドを $Af1 \rightarrow 5 Af > Af1 \rightarrow 2 Af > Af1 \rightarrow 3 Af$ の順に加水分解し, また, メチルアラビノトリオシドの $1 \rightarrow 3$ 結合, $1 \rightarrow 5$ 結合をほぼ同様に加水分解した。この事から, アラビノ 2 糖の結合に対するアラビノフラノシダーゼの特異性には少なくとも 2 通りあることが明らかとなった。1つは $Af1 \rightarrow 2 Af > Af1 \rightarrow 3 Af > Af1 \rightarrow 5 Af$ の順に加水分解するもの, もう1つは $Af1 \rightarrow 5 Af > Af1 \rightarrow 2 Af > Af1 \rightarrow 3 Af$ の順に加水分解するものである。しかし, $Af1 \rightarrow 3 Af$ を最も速く分解するものはなかった。また, アラビノ 3 糖に対しても 2 通りの分解様式が存在した。1つは $1 \rightarrow 3$ 結合を $1 \rightarrow 5$ 結合より速く加水分解するもの, もう1つは $1 \rightarrow 3$ 結合, $1 \rightarrow 5$ 結合をほぼ同様に加水分解するものである。しかし, $1 \rightarrow 5$ 結合を優先的に加水分解するものはなかった。これらアラビノオリゴ糖とアラビノキシロオリゴ糖の両基質に対する特異性にはいくつか異なった点が存在し, これは立体障害によるものと考えられた。今後, より複雑な構造を持つ様々な基質を用いての更なる特異性の解明が必要である。

審 査 の 要 旨

アラビノースを含む多糖類とそれらのアラビノースの結合を切断する α -L-アラビノフラノシダーゼは自然界に広く分布している。このような関係から, 多種多様な酵素が種々の起源から発見されており, アラビノースの調製や食品加工との関連性において研究が行われている。しかし, 精製酵素の性質, 特に基質特異性の解明を行った研究は数少なく, 同酵素の研究レベルは全般的に低い。これは, 特異性の解明に必要な種々のオリゴ糖の調製が困難であること, 酵素の精製も難儀であることに起因している。このような現状から, 著者は新しい種々の基質を化学合成すると共に, 異なった起源から数種の酵素を精製して取得し, それらの基質に対する α -L-アラビノフラノシダーゼの特異性を明らかにする研究を行った。著者の研究における新規な成果は以下の通りである。1. α -L-アラビノフラノシダーゼの特異性の研究に必要な基本的基質として, 3 種のアラビノ 2 糖とアラビノ 3 糖を, 自ら開発した化学合成法によって調製した。2. *Aspergillus niger* や *Bacillus subtilis* から新しい酵素を見出し, それら精製酵素の諸性質を明らかにした。3. 糸状菌, 放線菌及び細菌など, 広範な起源の酵素の特異性を研究した結果, i) 末端アラビノースの結合を分解する酵素と末端と側鎖の両結合を

分解する2種の酵素が存在すること。ii) アラビノ2糖に対して、 $Af1 \rightarrow 2 Af > Af1 \rightarrow 3 Af > Af1 \rightarrow 5 Af$ の順に、 $Af1 \rightarrow 5 Af > Af1 \rightarrow 2 Af > Af1 \rightarrow 3 Af$ の順に作用する2種の酵素が存在すること。iii) アラビノ3糖に対しては、 $Af1 \rightarrow 3 Af > Af1 \rightarrow 5 Af$ の順に作用すること。

上記の結果、著者が開発したオリゴ糖の合成は、今後のアラビノフラノシダーゼの研究と糖質化学の発展に貢献し、一方、種々の精製酵素の諸性質、特に基質特異性の解明を行った研究は、糖質関連酵素化学の発展に貢献した点で高く評価できる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。