

氏名(本籍)	よし だ しげ き (東京都)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博乙第1,152号
学位授与年月日	平成8年1月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	STUDIES ON SUBSTRATE SPECIFICITY OF β -XYLANASE FROM <i>Streptomyces olivaceoviridis</i> E-86 (<i>Streptomyces olivaceoviridis</i> E-86の β -キシラナーゼの基質特異性の研究)
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 神山 由
副査	筑波大学教授 農学博士 田仲 可昌

論 文 の 要 旨

本論文は、*Streptomyces olivaceoviridis* E-86の生産する β -キシラナーゼのキシランに対する基質特異性、特に各種キシラン中に存在する様々な側鎖近傍に対する特異性を解明する研究を行ったものである。

キシランは、ヘミセルロースの一種で、セルロースに次いで多く存在する多糖類であり、 β -1,4-キシロシド結合の主鎖にアラビノースやグルクロン酸、キシロシルアラビノースなどの側鎖が結合している。これらの側鎖の種類や結合の頻度は起源により多種多様であるが、それらのキシランに対する分解様式については、未だ不明な点も多い。天然に豊富に存在するキシランをバイオマス資源として生化学的に利用するためには、キシラン分解のキー酵素であるキシラナーゼの特異性を解明することが重要である。

まず第一に、グルクロノキシロオリゴ糖標準品を調製するためにトウモロコシ外皮を硫酸で分解した。この糖液から活性炭カラム、Dowex I-x2カラム、さらにLiChrosorb NH₂カラムを用いたHPLCにより、6種のグルクロノキシロオリゴ糖標準品を調製した。その結果、グルクロノキシロオリゴ糖標準調製の出発材料としてトウモロコシ外皮は適しており、またLiChrosorb NH₂カラムを用いたHPLCがそれらの分離に有効であることが明らかとなった。

次いで、アラビノース側鎖に対する*Streptomyces olivaceoviridis* E-86の β -キシラナーゼの基質特異性を明らかにするために稲わらアラビノキシランを同酵素で加水分解した。分解糖液より各種クロマトグラフィーにより2種のアラビノキシロオリゴ糖を得た。それらの構造研究の結果、*Streptomyces*のキシラナーゼは、アラビノース側鎖が結合したキシロースの非還元末端側の1番目か2番目のキシロシド結合を加水分解するが、還元末端側の1番目の結合は加水分解しないものと結論した。

さらに、グルクロン酸側鎖に対する同酵素の基質特異性を明らかにするために稲わらアラビノグルクロノキシランおよび綿実グルクロノキシランを酵素加水分解した。各種クロマトグラフィーにより、稲わらキシランの酵素分解物より2種、綿実キシランより4種のグルクロノキシロオリゴ糖を得た。これらの構造研究の結果より、*Streptomyces*のキシラナーゼは、グルクロン酸側鎖が結合したキシロースの非還元末端側の1番目を加水分解しやすく、還元末端側は少なくとも2残基のキシロースを残して分解するものと結論した。

アラビノース側鎖とグルクロン酸側鎖に対する*Streptomyces*のキシラナーゼの基質特異性の差異が、側鎖の種

類あるいは側鎖の結合様式のどちらに起因するものかを明らかにするために、水溶性グルクロノキシランからグルコキシランを調製し、これを同酵素で加水分解した。この分解糖液より、各種クロマトグラフィーにより、3種のグルコキシロオリゴ糖を分離した。構造研究の結果、それらの構造は、グルクロン酸側鎖の場合と同様に、本酵素はグルコース側鎖が結合したキシロースの非還元末端側の1番目を加水分解しやすく、還元末端側は少なくとも2残基のキシロースを残して分解することを示しており、従って側鎖の種類よりも側鎖の結合様式の方が本酵素の基質特異性の決定に大きく影響を及ぼすものと結論した。

キシロースおよびキシロビオースの側鎖に対する *Streptomyces* のキシラナーゼの基質特異性を明らかにするために、広葉樹キシランを同酵素で加水分解した。この酵素分解糖液より、各種クロマトグラフィーにより、3種のキシロオリゴ糖を分離した。それらの構造研究の結果より、本酵素は、キシロースあるいはキシロビオースの側鎖が結合したキシロース残基の非還元末端側の1番目のキシロシド結合を加水分解しやすく、還元末端側の1番目は分解しないものと結論した。

以上の結果より、キシラン中の側鎖近傍に対する *Streptomyces olivaceoviridis* E-86のキシラナーゼの基質特異性は単に側鎖の種類や結合様式で決まるのではなく、それらを含めたキシラン主鎖に対する側鎖の立体的な構造により影響されるものと結論した。

審 査 の 要 旨

著者の論文は、多種多様な側鎖を持つキシランに対する放線菌キシラナーゼの基質特異性の研究を詳細に行ったものである。

同酵素はキシランの主鎖をランダムに切断するが、切断様式は側鎖の糖の種類や結合様式によって影響される。これまでも限られた側鎖に対する特異性の研究報告はあったが、多種多様な側鎖に対する特異性については不明な点が多かった。すなわち、キシランはアラビノースの側鎖以外に種々の側鎖を持つことが明らかにされていたが、特異性の研究に必要な基質の調製が困難なこと及び酵素による分解物の分離と構造研究が容易でなかったことに起因し、キシラナーゼの特異性の研究は遅れていた。著者各種の天然キシランの調製と化学合成による多様な基質の調製と分解物の研究を行うことによって、これ迄に不可能な点を克服することによってヘミセルラーゼの中でも放射菌キシラナーゼの特異性の研究をトップレベルに引き上げた。

著者の研究成果は、同酵素の特異性を詳細に解明した点で意義があるが、これに加え、糖質化学と酵素化学の発展に貢献した点で高く評価できる。今後、酵素の立体構造の研究に発展することを期待する。

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。