

氏名(本籍)	ひがし 東岸	かず 和	あき 明	(広島県)
学位の種類	農学博士			
学位記番号	博乙第154号			
学位授与年月日	昭和58年7月31日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
審査研究科	農学研究科			
学位論文題目	放線菌の α -L-アラビノフラノシダーゼに関する研究			
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	須賀原亮三	
副査	筑波大学教授	農学博士	田淵武士	
副査	筑波大学教授	理学博士	鈴木恕	

論文の要旨

アラビナンは植物細胞壁を構成するヘミセルロースの一種で、植物界に広く分布するアラビノフラノースよりなる多糖類である。アラビナンを加水分解するアラビノフラノシダーゼについて、多くの微生物が生産する事が知られているが、単離精製され、その性質が詳細に検討された例は非常に少ない。著者らはバイオマスの利用の立場からアラビナン分解酵素生産菌を検索し、その結果、糸状菌、酵母、放線菌を分離した。糸状菌の酵素はこれ迄に報告されている *Aspergillus niger* の酵素と同様にアラビナンの分解限度は90%程度と高く、一方放線菌酵素の分解限度は低く、40~50%で、酵母はこの中間であった。

本論文はアラビナン分解酵素生産性放線菌の分離、分離菌の同定、菌体外アラビノフラノシダーゼの分離精製とその性質の解明、本酵素のアラビナン分解限度の低い原因の追究、菌体内に含まれる別種の新アラビノフラノシダーゼの分離精製とその性質の解明などについて述べられている。

第一章では酵素反応の基質の調製及びその構造の確認に関係している。ビートパルプよりアルカリ抽出したアラビナンは本研究に使用するには純度が不十分であるので、これを更にNaOH-NaBH₄加熱還元処理後DEAE-セフアデックスクロマトグラフィーにより精製する方法を考案し、約30%の収率で純度95%の精製アラビナンを得た。このメチル化分析で構造の確認を行なった。次にフェニル α -L-アラビノフラノシドの合成につき改良法を考案し、フェニル α -L-アラビノフラノシドを効果的に調製すると共に、その外の3種のフェニルアラビノシドの異性体をも分離精製する

事に成功し、これら化合物をその後の研究に使用した。更にアラビナンの部分加水分解により2種のアラビノビオースを単離し、アラビノースのみよりなる事を確認し以後の研究に供した。

第二章では土壌よりアラビナン分解酵素生産菌の分離、該放線菌の形態学的、生理学的検討結果から、*Streptomyces diastatochromogenes* 065 と同定した結果が述べられている。

第三章ではこの放線菌の生産する菌体外酵素、新に発見された菌体内酵素、比較対象とするための *Aspergillus niger* IFO 6662 菌の菌体外酵素、これらの分離精製と性質の比較検討、及び放線菌菌体外酵素のアラビナン分離限度が低い原因の追求などが述べられている。

即ち、放線菌 065 株の生産する菌体外酵素をDEAEセファデックスA-25, CM-セルロースカラムクロマトグラフィー、等電点電気泳動法により、ディスク電気泳動で単一な成分にまで精製した。また菌体内に別種の酵素の存在を新たに発見し、菌体破碎液の遠心上清から硫酸分画沈澱、ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーにより、これを部分精製した。一方対照として *Aspergillus niger* IFO 6662 株の菌体外酵素をDEAE-セファデックスA-25 カラムクロマトグラフィー、ゾーン電気泳動およびゲル濾過法により部分精製した。

放線菌の菌体外酵素は至適pH 6.1, 至適温度 55°C, pH 4.5~7.0の間、及び45°C以下で安定であった。H₂S⁺⁺、プロモコハク酸イミド及びSDSにより強く阻害された。一方放線菌の菌体内酵素は安定領域が幾分広くpH 6.0~8.0である事を除けば殆んど同様の性質を示し、両酵素は酵素化学的に非常に類似している事を明らかにした。また菌体外、菌体内いずれの酵素もアラビナン、フェニル- α -L-アラビノフラノシドを加水分解する能力を持つが、両者ともアラビナン分解の初期からアラビノースのみを遊離することから、いわゆる α -L-アラビノシダーゼ (EC 3・2・1・55) に属する事を明らかにした。またフェニル α -L-アラビノフラノシドに対する活性は、アラビナンに対する活性を等しく100とした時、菌体外酵素、菌体内酵素 *A. niger* IFO 6662 株の酵素ではそれぞれ16:61:107と明らかな差が認められ、菌体外酵素は低分子基質に作用し難い特性を持つ事が示唆された。

菌体外酵素のアラビナグ加水分解限度が低いのは反応中に酵素が失活するためではない事を実験的に証明し、反応が停止した時点で菌体内酵素あるいは *A. niger* IFO 6662 株酵素を添加すると還元糖量が増大する事から、加水分解限度の差は酵素の基質特異性が異なるためであると推論した。また菌体外酵素によりアラビナンを加水分解し、反応が停止した時点で反応生成物のメチル化分析を行ったところ、アラビナンと同様の成分の存在が認められ、構造的には変化のない事を明らかにした。従って本酵素の特異性は当初考えたようなビートアラビナンの側鎖のみを優先的に加水分解するものではなく、アラビナンの非還元末端の α -1.3-, α -1.5-結合を同様の速度で加水分解する性質のもので、分解限度が低いのはむしろ低分子化による反応速度の低下が主因と結論された。

一方対照として用いた *Aspergillus niger* IFO 6662 でも放線菌の菌体外酵素と同様の結果がえられ、これ迄 *Aspergillus niger* (IFO 6662 と異なる) の酵素について得られていた結果とは異なり、 α -1.3-および α -1.5-結合を同様の速度で加水分解しているものと判断された。そこで *A. niger* IFO 6662 菌の酵素をアラビナンに作用させ、加水分解率が、12, 23, 35, 45 および 61%に達した

時点で反応を止め、これらの反応物に放線菌菌体外酵素を作用させた。加水分解率が35%以下の反応物に於ては、加水分解が進行して35%に達した時点で停止した。一方35%以上の反応物では放線菌菌体外酵素の作用は全く認められなかった。しかし菌体内酵素の添加ではいずれの分解率の反応物の場合も90%まで分解される事が明らかになった。

また放線菌菌体外酵素と*A. niger* IFO 6662 菌のアラビナンに対する活性を等しくして、フェニル- α -L-アラビノフラノシドに対する V_{max}/K_m を比較したところ前者は後者の約1/10である事が判り、これらの事実から放線菌菌体外酵素のアラビナンの分解限度が低いのは低分子基質に作用し難い事によると結論した。

審 査 の 要 旨

アラビノフラノシダーゼに関する研究は少なく、殆んどが香川大学、梶教授のもとで行われたもので、詳細な実験データに乏しく、この分野の研究は遅れていると云える。

本研究は放線菌*Streptomyces diastatochromogenes*の生産する菌体外 α -L-アラビノフラノシダーゼを均一蛋白までに精製し、その性質に関し十分なデータを与えた事は十分評価されるべき事である。また同じ加水分解酵素でもプロテアーゼの研究では基質に市販されているものが多いが、グリコシダーゼの基質は市販されているものは少なく、すべて研究者自身が調製せねばならぬ事が多く、本研究でも高純度の基質をうるための精製法の検討、合成基質調製法の改良など、努力のあとがうかがえる。

また放線菌の菌体内に別種のアラビナンの分解限度の高いアラビノフラノシダーゼが生産されている事を発見し、この酵素を部分精製しその性質を明らかにしているが、菌体内アラビノフラノシダーゼの例は少なく、精製されたものは殆んどない現状である。

放線菌の菌体外酵素はアラビナン分解限度が35%程度と低い点に特徴がある。ビートアラビナンはアラビノフラノースの α -1.5結合した直鎖に α -1.3アラビノフラノース側鎖がついた構造を持っている。これ迄*Aspergillus niger*の酵素について梶らより分解のメカニズムが詳細に検討されているが、それによると中間的に α -1.5直鎖のみからなるアラビナンの蓄積が認められる事から α -1.3側鎖が始め選択的に切断されるとされている。著者も当初、放線菌菌体外酵素の分解限度が低いのは α -1.3側鎖が選択的に水解されるためと考え研究を進めていたが、実験の結果は*Aspergillus niger*の酵素でえられたこれ迄の知見と異なり、 α -1.3結合、 α -1.5結合を同じように切断して行く事を明らかにした。分解限度が低いのはむしろ低分子基質に酵素が作用し難く、基質が低分子化されるに従い反応が進まなくなるためと結論した。この結論は完全とは云えないが、ほぼ証明しえたものと判断される。またアラビナン分解酵素のアラビナン分解機構にも異ったタイプがある事を示した点に意義がある。

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。