

氏名(本籍)	篠山浩文(茨城県)
学位の種類	農学博士
学位記番号	博甲第633号
学位授与年月日	平成元年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	$\beta$ -キシロシダーゼの糖転移作用を利用した $\beta$ -キシロシンドの合成
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 井上嘉幸
副査	筑波大学教授 農学博士 高橋穰二
副査	筑波大学教授 工学博士 中村以正

### 論文の要旨

最近糖質の持つ新しい生理作用，機能特性の研究とあいまって，有用糖質の調製に高い関心が寄せられてきている。オリゴ糖や配糖体を得る方法として，酵素の糖転移反応の利用が考えられる。転移生成物を蓄積させるためには適切な酵素の選択と反応条件の検討が必要である。これまで申請者の所属する研究室においては多くの $\beta$ -キシロシダーゼに関する比較研究が行われてきており，その結果 *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* 等の酵素は他のグリコシダーゼに比べて糖転移作用が著しい事が判明している。このような背景から申請者は酵素法による有用糖質の合成を目的として，転移作用の強い $\beta$ -キシロシダーゼを有機溶媒を含む反応系で作用させる事により，オリゴ糖や配糖体の合成を試みた。

第1章に於ては“水溶性有機溶媒共存下における各種糸状菌由来 $\beta$ -キシロシダーゼの加水分解活性と糖転移反応”につき述べられている。

難水溶性基質の場合，反応を有効に進めるための一方法として，反応系に有機溶媒を加え均一系にする事が考えられる。また水溶性有機溶媒の場合，酵素の安定性が問題となる。そこで各種糸状菌由来の $\beta$ -キシロシダーゼ活性および転移反応に及ぼす水溶性有機溶媒の影響を調べた。*A. niger*の酵素はアセトン存在下に於ても活性の低下は少なく，またアルコール中の反応に於ても試験した他の3菌株由来の酵素より優れていた。また*A. niger*の酵素の加水分解活性は30℃ではアセトン50% (v/v) 存在下に於ても無添加時の約50%の活性を保持し，水溶性アルコール50% (v/v) 存在下では対照の約80~150%の活性を示した。一方キシロビオースを基質とし，アセトン存在下で*A. niger*酵素を作用させた場合，反応がキシロトリオース合成に傾きながら進行していたが，2-プロ

パノールのようなアルコールの存在下ではキシロトリオースの生成はほとんど見られず、アルキル $\beta$ -キシロシドの生成が示唆された。

第2章では“*A. niger*  $\beta$ -キシロシダーゼの糖転移反応を利用したキシロピオースからアルキル $\beta$ -キシロシドの酵素合成”が述べられている。

アルキル $\beta$ -キシロシドの化学的合成は古くから行われているが、キシロースから幾つかの誘導体を経由し、操作が複雑で時には収率の低い場合も多くあった。そこで *A. niger* 酵素の転移作用を利用した合成を検討した。メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノールのような水溶性アルコール (25% (v/v)) とキシロピオース (50mM) を含む水溶液中で酵素を作用させたところ、アルキル $\beta$ -キシロシドおよびキシロースをほぼ等モル生成し、理論値に近い収率を示した。また1-ブタノール、1-ペンタノール、1-ヘキサノール、2-ブタノールのような難水溶性アルコールに於ても、かなりの $\beta$ -キシロシドの生成が認められ、生成キシロシドの大部分がアルコール層に分布するため、アルコール層を分離濃縮して容易に精製しうる事を示した。

第3章では“アルキル $\beta$ -キシロシド合成における *A. niger*  $\beta$ -キシロシダーゼの優位性”につき述べられている。

アルコール共存下で *A. niger* 酵素がなぜアルキル $\beta$ -キシロシド合成に優れているのか、また、グリコシダーゼのアルキル-グリコシド合成における適性条件について *A. niger* 由来 $\beta$ -キシロシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼおよび $\alpha$ -グルコシダーゼ (コメ, 酵母),  $\beta$ -グルコシダーゼ (アーモンド),  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (*A. oryzae*, *E. coli*) を用いて検討した。その結果酵母 $\alpha$ -グルコシダーゼのように、失活によりグリコシドを生成しないもの、コメ $\alpha$ -グルコシダーゼのようにアルコール共存下で安定であってもアルキル-グルコシド生成能の低いもの、アーモンド $\beta$ -グルコシダーゼや *E. coli*, *A. oryzae*  $\beta$ -ガラクトシダーゼのように水溶性1級アルコールに対してのみ強い生成能を持つもの、*A. niger*  $\beta$ -キシロシダーゼのように水溶性1級アルコール以外に難水溶性アルコールや3級ブタノールなどに対しても強いグリコシド生成能を示すものに分けられた。*A. niger* の酵素は以上のような性質からアルキル $\beta$ -キシロシド合成に優れた酵素である事が示唆された。

第4章では“*A. niger*  $\beta$ -キシロシダーゼによるアルキル $\beta$ -キシロシドの生成および蓄積要因につき述べられている。

*A. niger* 酵素によるアルキル $\beta$ -キシロシドの生成に及ぼすアルコールの影響が検討された。メタノール濃度25% (v/v) までは、基質の分解初速度、メチル $\beta$ -キシロシドの生成量ともに増加し、転移率 (反応した基質の減少量に対するアルキル $\beta$ -キシロシドの生成率) も上昇していた。メタノールが35~50%となると基質の分解初速度が低下するが、転移率は50%濃度に於て最大となった。一方アルコールの種類による影響を調べた処、水溶性アルコール添加時には基質分解初速度が上昇し、アルコール間で差が認められた。転移率はアルコール間で殆んど差が見られず、90%前後の値を示した。ただし、3級ブタノールについては基質分解初速度、転移率ともに低い値を示し、これは構造の問題と推定された。更にアルキル $\beta$ -キシロシドの蓄積要因につき検討された。アルキル $\beta$ -キシロシドの *A. niger* 酵素による加水分解性を調べた処、分解性の低いものが多く、この分解性の

低さが蓄積要因の1つと考えられた。しかし2-プロピル $\beta$ -キシロシドのように比較的高い分解性を示すものもあって分解性の低さのみからは説明はできず、他の要因が検討された。反応系に2-プロパノール、メタノールが存在すると2-プロピル $\beta$ -キシロシドの分解は強く阻害され、25% (v/v) のアルコールの存在下では分解は見かけ上認められなかった。しかしメタノール存在下でメチル $\beta$ -キシロシドの生成が確認された事から、2-プロピル $\beta$ -キシロシドの分解過程で生成するキシロシル酵素が再び2-プロパノールと反応しキシロシドが生成されるため、見かけ上分解が起こらず、蓄積するものと思われ、結局平衡の問題に帰結された。

第5章では“*A. niger*  $\beta$ -キシロシダーゼの糖転移反応における反応受容体の範囲”について述べられている。

*A. niger* の酵素は脂肪属アルコール以外に、かなり広い範囲のOH化合物に糖転移が可能で、2-メルカプトエタノール、2,3-エポキシ-1-プロパノール、グルコール酸エチル、乳酸エチル、セリン、スレオニンのようなアミノ酸類、グリセリン、エチレングリコール、フェノール類、各種糖類などを受容体として転移生成物を与える事を示した。

第6章では“ $\beta$ -キシロシドの工業的生産に対する検討と $\beta$ -キシロシドの応用”につき述べられている。

工業的生産を考慮して、キシロビオースの代わりに、キシロオリゴ糖混合物、キシランのキシラナーゼ加水分解物の利用を検討した。これらの糖液中のキシロースの存在はキシロシド生成を阻害するが、2.5%程度のキシロースでは生成量に影響をおよぼさない事が明らかにされた。キシランの放線菌キシラナーゼによる加水分解物、キシロオリゴ糖混合物などは何れもキシロビオース同様アルキル $\beta$ -キシロシド合成のキシロシル供与体となりうる事を示した。一方、アルキル $\beta$ -キシロシドのうち1-ヘプチル $\beta$ -キシロシドについて臨界ミセル濃度 (CMC) を測定した所、既知の有効な界面活性剤の示す CMC 値に近い値を持ち、界面活性剤への応用の可能性を示唆した。

## 審 査 の 要 旨

申請者は $\beta$ -キシロシダーゼの強い糖転移作用に着目し、 $\beta$ -キシロシドや少糖類の合成に積極的利用を試みた。その結果 *Aspergillus niger* 由来の酵素がキシロシド合成に数々の優位的性質を持つ事を認め、キシロビオースを原料とし好収率でしかも容易に $\beta$ -キシロシドを合成する方法を考案した。本酵素は脂肪属アルコール以外にセリンなどのアミノ酸のキシロシドや3級アルコールのキシロシドも生成し、非常に広範なキシロシル受容能を持つ点で酵素化学的特異性からも興味を持たれる。更に工業的生産にも十分の考慮がなされ、応用面についても可能性を示した。これらの点で評価される。

今後、種々の受容体のキシロシドの単離同定、工業的生産のための酵素の固定化、プロセスの連続化等の研究が進められるべきであるが、幸に申請者は日本学術振興会特別奨学生に採用され、化学技術研究所で研究が続けられる事になっている。

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と認めた。