

氏 名(本 籍)	飯塚佳恵 (群馬県)
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	博 乙 第 915 号
学位授与年月日	平成 5 年 10 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	糸状菌 β -キシロシダーゼによるキシロースの縮合反応
主 査	筑波大学教授 農学博士 中 原 忠 篤
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 山 口 彰
副 査	筑波大学助教授 農学博士 神 山 由

論 文 の 要 旨

グリコシダーゼの縮合・転移反応により種々の生理機能を有する各種オリゴ糖が相次いで生産されている。これらはグルコースを基本とした糖類であるが、キシロースなどのペントースを基質としたオリゴ糖についてはこれまで報告されていない。キシロースの縮合により生成するキシロ二糖は全部で 9 種類の異性体が存在するが、この中で β -1,4-キシロ二糖の生理機能については種々明らかにされている。しかし、 β -1,4-以外のキシロ二糖についても特殊な機能を有する可能性があり興味もたれる。一方、 β -キシロシダーゼについては、これまでに多くの研究がなされ詳細にその性質が明らかにされている。糸状菌の β -キシロシダーゼの中で *Malbranchea pulchella* の β -キシロシダーゼは他の糸状菌の酵素と異なる性質を有しており、縮合反応においても他の糸状菌由来の酵素とは異なる性質を示すことが考えられる。また、縮合反応の速度定数は加水分解反応の速度定数と共に単糖と二糖の平衡状態を決定する定数であるが、これを求めた研究は少ない。本研究では、 β -キシロシダーゼによるキシロースの縮合反応の解析を通して、縮合反応における β -キシロシダーゼの性質を明らかにし、キシロースと生成した各キシロ二糖間の平衡状態を動力学的に解明することを目的とした。

まず、基礎的知見を得るために *A. spergillus niger* 粗 β -キシロシダーゼによるキシロースの縮合反応を行った。この反応では全キシロオリゴ糖の生成速度が酵素濃度と反応温度に依存し、3.2~5.7 の範囲の pH には依存しない結果を得た。また、キシロース 1 g と粗酵素液 1 ml を混合し 50℃ で反応させた場合、全キシロオリゴ糖の収率は約 25% (w/w) で平衡に達した。この反応の生成物として β -1,1-, β -1,2-, β -1,3-, β -1,4-および α -1,4-キシロ二糖の五種類を同定した。 α -1,4-キシロ二糖は粗酵素中に混在している α -キシロシダーゼによるものと考えられた。

つぎに、四種類の糸状菌由来粗 β -キシロシダーゼおよび *Chaetomium trilaterale* 精製 β -キシロシダーゼによるキシロースの縮合反応を行った。その結果、生成した β -キシロ二糖の平衡時の収率を基にして、これらの β -キシロシダーゼを二つのタイプ、すなわち、すべての β 結合を生成するタイプの酵素 (*A. niger* 等) と β -1,4-, β -1,1-結合のみを生成するタイプの酵素 (*M. pulchella*) に分類できた。

二種類のタイプの酵素, *A. niger* IFO 6662および *M. pulchella* IFO 9855の β -キシロシダーゼを SDS-PAGE で単一タンパク質と認められる程度に精製し、それぞれを *A. n.* β -xy1 I, *M. p.* β -xy1 とした。*M. pulchella* var. *sulfurea* No.48の β -キシロシダーゼと *M. p.* β -xy1 は、その至適 pH, pH 安定性、至適温度、温度安定性および10% (w/v) β -1,4-キシロ二糖濃度における糖転移反応を触媒しない性質が一致し、互いに非常に似た性質を持っていることが示された。しかし、すでに報告されている *A. niger* IFO 6662の β -キシロシダーゼに対して、*A. n.* β -xy1 I は10℃以上高い至適温度と約4倍の糖含量を示し、*A. n.* β -xy1 I の高い糖含量が酵素の構造を熱に対して安定に保つことに関与している可能性が考えられた。

A. n. β -xy1 I を用い、高濃度 β -1,4-キシロ二糖の加水分解とキシロースの縮合反応を行い、両者同一の平衡状態に収束することを確認した。また、縮合反応の速度定数に基づき、*A. n.* β -xy1 I および *M. p.* β -xy1 が異なる「縮合反応の生成物特異性」を有することを示した。さらに、平衡定数を用いて Gibbs の標準自由エネルギー変化 (ΔG°) を計算し、*A. niger* のグルコアミラーゼを用いたグルコースの縮合反応における ΔG° の値と比較した。その結果、両反応における各結合生成 ΔG° の値の大きさの範囲はほぼ同じであったが、 ΔG° の値の大小の順番が異なり、キシロース間の結合では、1,4-結合が生成されやすいのに対し、グルコース間の結合では、6位の炭素の存在のために1,4-結合が生成されにくくなっていると考えられた。

平衡定数、縮合反応の速度定数、加水分解反応の速度定数を用いて、Runge-Kutta 法により各 β -キシロ二糖生成量の経時的变化をシミュレートした。その結果、*M. p.* β -xy1 による縮合反応では、計算値と実測値がよく一致したが、*A. n.* β -xy1 I では特に β -1,4-キシロ二糖において反応初期の計算値が実測値よりも大きく β -キシロ二糖の収率に糖転移反応が影響している可能性が示唆された。また、高濃度キシロースにより加水分解反応が強く阻害されていることが明らかになった。

M. pulchella β -キシロキダーゼは、*A. niger* β -キシロシダーゼにくらべて低いフェニール β -D-キシロシド分解活性で縮合反応を触媒した。そこで、これらの酵素のキシロビオース (β -1,4-キシロ二糖) 分解活性も測定することが必要となった。そのために、Glucose C-Test 試薬を用いた高濃度キシロビオース溶液中の微量のキシロースの定量法を開発した。そして、数種の糸状菌の β -キシロシダーゼを、そのフェニール β -D-キシロシド分解活性とキシロビオース分解活性の比を基にして三種類に分類した。この定量法は他のグリコシダーゼの二糖分解活性の測定にも応用できると考えられた。ただし、*A. niger* の培養ろ液のように C-Test 試薬の発色を阻害する物質を含む酵素液の活性は測定できないという欠点も存在した。

審 査 の 要 旨

本研究は、 β -キシロシダーゼによるキシロースの縮合反応により、キシロ二糖を合成すると同時に酵素の性質を明らかにすることを目的として行った基礎的研究である。

まずはじめに、*A. niger* 粗酵素液を用い、生成する二糖の種類とその量について検討し、天然には存在しない β -1,1-や β -1,2-キシロ二糖もその量は少ないが生成することを明らかにした。つぎに、数種の糸状菌の β -キシロシダーゼを用い、生成するオリゴ糖の種類から、 β -キシロシダーゼを二つのタイプに分類した。この二つのタイプの代表として、*A. niger* IFO 6662と*M. pulchella* の β -キシロシダーゼを選び、精製し、その酵素化学的性質を調べた。この反応ではキシロースと各種キシロ二糖間に縮合と加水分解反応のみが起こり、キシロースはキシロ二糖以外の物質に変化しない、という反応系を想定し、この二つの精製酵素を用いて、縮合反応と加水分解反応の速度定数ならびに平衡定数を求めた。そして、生成二糖の経時変化をシミュレートすることにより想定した反応系を解析した。その結果、*M. pulchella* の酵素の場合は反応モデルと一致し、 β -1,1-キシロ二糖の収率に最大値があることが明らかになった。一方、*A. niger* の酵素の場合は、糖転移反応も起こっている、と考えられた。最後に、Glucose C-Test 試薬を用いた多量のキシロ二糖中の微量のキシロースの定量法を開発し、酵素の二糖加水分解活性の測定を容易にした。この方法は他のグリコシダーゼにも応用できることを示した。

以上のように、本研究は、キシロースと各種キシロ二糖間の平衡状態を酵素の性質との関連においてはじめて動力学的に解析したものである。また、この研究により、天然には存在しない入手困難な基質についても酵素の特異性を明らかにすることができることを示したものであり、これらの成果は基礎、応用の面から高く評価できる。

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。