

氏名(本籍)	氏家満里子 (群馬県)
学位の種類	農学博士
学位記番号	博甲第274号
学位授与年月日	昭和60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 応用生物化学専攻
学位論文題目	<i>Chaetomium trilaterale</i> の生産する β -キシロシド分解酵素に関する研究
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 今川弘
副査	筑波大学教授 農学博士 高橋穰二
副査	筑波大学教授 理学博士 鈴木恕

論文の要旨

バイオマスの一主成分であるキシランの酵素加水分解のためには、液化型キシラナーゼと β -キシロシダーゼが必要であり、有用な β -キシロシダーゼを探索する事は応用面から、現在重要視されている。一方グリコシダーゼの一つとしての β -キシロシダーゼの研究は、グリコシダーゼの触媒機構の解明、 β -キシロシダーゼの比較生化学及び分類の面から酵素化学的に意義がある。

本論文はこれらの観点から、*Chaetomium trilaterale* の生産する β -キシロシド分解酵素を取り上げ、均一蛋白まで精製し、その性質を詳細に検討したものである。

第一章では酵素の精製について述べられている。既にその存在が報告されている糸状菌、*Chaetomium trilaterale* の β -キシロシド分解酵素を、DEAE-Sephadex クロマトグラフィー、ゲル濾過、等電点電気泳動により精製し、ディスク電気泳動的に単一の標品まで純化した。この精製酵素は β -キシロシダーゼ活性の外に更に強力な β -グルコシダーゼ活性を持つ事が明らかにされ、両活性が同一活性部位によるか否かが問題とされた。

第二章では酵素の蛋白化学的性質が述べられている。即ち精製酵素は一つの均一な蛋白として行動し、分子量は約24万の糖蛋白で等電点は4.86、分子量のほぼ等しい2つのサブユニットからなるオリゴマー酵素である事が明らかにされた。

第三章は酵素化学的性質の検討に関係し、酵素反応に及ぼす諸条件に於ける両酵素活性の動向、また種々の金属塩や阻害剤の影響の相違について調べられ、更に各種グルコシダーゼ基質に対する特異性について検討されている。その結果、至適 pH、pH 及び熱に対する安定性が両活性について

幾分異なる事、また各種阻害剤に対して両活性が同じような動向を示したが、ノジリマイシンとグリコノー-1.5-ラクトンの阻害の程度が両活性で異なる事が示された。これらの結果は本酵素 β -キシロシダーゼと β -グルコシダーゼよりなる複合酵素である事を推論させる事実と思われる。

第四章では各種阻害剤の阻害様式が述べられている。グリコノー-1.5-ラクトンとノジリマイシンはグリコシダーゼ活性を拮抗的に、キシロシダーゼ活性を非拮抗的に阻害した。またメチルー β -グルコシドもこれらと同様の傾向を示したが、メチルー β -キシロシドは全く逆の傾向を示し、キシロシダーゼ活性を拮抗的にグリコシダーゼ活性を非拮抗的に阻害した。これらの結果は両活性がそれぞれ別の活性部位による事を示唆するものと考えられた。

第五章では動力的検討がなされている。2種の異なる活性が同一活性部位で触媒されているのか、またはそれぞれ異なる活性部位によるのかを証明する手段として、広海らの動力的手法、およびSchramらの混合基質による実験法がよく用いられているが、本章ではこれら2つの手法を用いて解析がなされている。フェニルー β -キシロシドとフェニルー β -グルコシドの混合基質を用いた検討結果から、両活性は明らかに同一活性部位により触媒されている事が証明された。

しかしこのような結論は、前章までの研究でえられた、両活性には各々別の活性部位が関与しているのではないかとする推論と相反するものである。そこで両者の統一した解釈として、本酵素のキシロシダーゼとグリコシダーゼ活性は同一触媒部位で触媒されているが、両基質の結合に関し異った要因(結合部位)が存在すると云う結論に達した。

第六章では両活性を保持する低分子活性画分の分離について述べられている。前述の如く両活性はアルカリ側における安定性に幾分差がある事を利用し、両活性の分離が試みられた。精製酵素をpH10.5~11に放置すると β -グリコシダーゼ活性の顕著な減少が観察されたが完全に消失させる事はできず、両活性の比は1:1で止った。そこで酵素をpH10.5で部分変性させ、ゲル濾過により、低分子量の活性を持った画分の分離に成功し、その性質を検討した。この低分子活性画分は分子量約10万でサブユニットの分子量に匹敵しており、両活性比はほぼ1:1であった。また活性のpH依存性、安定性、グルコノー-1.5ラクトンによる阻害様式などは両活性に対して殆んど同じであり、未変性の本来の酵素と比較して、その動向は著しく変化している事が明らかにされた。

著者はこれらの事実から、本酵素は分子量のほぼ等しい2つのサブユニットからなり、一方のサブユニットには両活性に触媒作用を持つ活性部位があり、他のサブユニットには触媒活性はなく、両サブユニットの結合により β -グリコシダーゼ活性を増大させ、また β -キシロシダーゼ活性にも影響を及ぼすような調節機能を持つ蛋白質であろうと推論している。

本酵素が活性部位を持つ同一サブユニット2個から構成されている事実も完全には否定されていないが、若し同一サブユニットから構成されているならば、アルカリ変性後得られる低分子活性画分は会合し、もとの酵素にもどる事が予想される。しかしこのような現象は観察されていない事から、異種サブユニットからなるとする考えが支持される。また本酵素の低分子活性画分の分析結果からも、この推論が支持されている。しかしこれらの活性を持たない、調節機能を持つ蛋白質が実際分離されているわけではなく、この物質の分離と酵素の再構成が今後の課題とされている。

審 査 の 要 旨

本論文は β -キシロシダーゼのキシランの糖化への応用と、酵素化学の基礎的研究を目的として行われたものであるが、内容は専ら後者に重点が置かれている。

グリコシダーゼは酵素化学発展の初期から研究の対象となった酵素群であるが、実際に酵素化学の進歩ではプロテアーゼに比し、非常に遅れている。

近年 β -キシロシダーゼはキシラン糖化と云う応用面で重要視され始めている。一方 β -キシロシダーゼの研究はグリコシダーゼの酵素化学の一局面を開く可能性があると考えられ研究が進められている。このような背景から本研究はある微生物の生産する酵素を均一蛋白まで精製した事、またその性質を詳細に検討した事に十分価値がある。

近年の研究から β -キシロシド分解酵素には β -キシロシドのみに作用する真性の β -キシロシダーゼ(或いは Exo 型キシラーゼ)と基質特異性が余り厳密でない β -キシロシダーゼ活性を持つグリコシダーゼがある事が知られており、本論文で得られた酵素は後者に属するものである。この種の酵素でこれまで知られているものに、古くから知られている almond emulsin の β -グルコシダーゼ、最近報告されている *Stachy botrys atra* の酵素などがあり、詳細に検討されている。現在でも幾つかのグリコシダーゼ基質の分解が同一活性部位によるのかどうか論議され、実験が繰返されている現状であるが、大体、同一部位により触媒されているとの結論に傾いている。

しかし本論文では *Chaetomium* より得た酵素を pH10.5 処理する事により、 β -グリコシダーゼ活性のみを低下させ、グリコシダーゼとキシロシダーゼ活性比約 1 : 1 の低分子活性画分を得ており、更に活性調節機能を持つサブユニットの存在を推論している。調節蛋白を含むオリゴマー酵素の存在はこれ迄にも知られているが、本研究結果はグリコシダーゼ、キシロシダーゼの関係や起源を考える上で新知見を與えるものであり、他方調節機能の解明により、酵素機能を明らかにする上で重要な知見を提供する可能性は極めて大であり、この点でも意義あるものと認められる。

本論文ではキシロシダーゼ活性を有する酵素を分離精製し、十分な酵素化学的検討が加えられている。更にサブユニット構造と酵素の活性発現に関して調節機能を持つ蛋白質の存在を推定しているが、実際には分離精製されてはおらず不十分な点である。しかしこの研究の発展により酵素の構造と機能の面で有意義な結論がえられる可能性を秘めており、端緒を開いた点で意義が認められる。期限の限られた課程博士論文として十分評価できるものである。

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みとめる。