

氏 名 (本 籍)	丸 井 正 樹 (東京都)
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	博 乙 第 295 号
学 位 授 与 年 月 日	昭和61年 2 月 28 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	放線菌キシラナーゼの β キシロシドによる誘導生産およびその生産された酵素の性質
主 査	筑波大学教授 農学博士 安 井 恒 男
副 査	筑波大学教授 理学博士 新 井 勇 治
副 査	筑波大学助教授 農学博士 中 原 忠 篤
副 査	筑波大学教授 農学博士 草 野 忠 治

論 文 の 要 旨

農産廃棄物などのバイオマスの主成分はセルロース、ヘミセルロース、リグニンよりなり、これらは再生産される資源であって、各成分の有効利用の研究が多くの研究者達によって精力的に進められている。特にヘミセルロースの中のキシランはその存在量がセルロースに次で多く、これを利用するための加水分解には適切なキシラナーゼが是非とも必要である。種々の起源のキシラナーゼの性質を詳細に研究する事は応用面で重要であるが、同時に基礎的には酵素化学の研究上価値がある。

本論文は以上のごとき応用面を背景として行われたものであって、その内容は放線菌の生産する3種類のキシラナーゼを均一蛋白にまで精製し、それらの性質を詳細に比較検討したものである。

第一章ではキシラナーゼの誘導物質である β キシロシドの構造と誘導活性について述べられている。即ち幾つかの β キシロシドを新たに合成し、その誘導活性を比較した。アグリコンに直鎖アルキル基を持つ β キシロシドではn-ブチル(C_4)が最も有効なことが示された。また水酸基、メシルオキシ基、アジド基、アミノ基等の置換基を持つエタノール誘導体の β キシロシドにおいては、それらの置換基が誘導活性に余り影響しないことが明らかにされた。

第二章では誘導物質で生産される酵素の性質が述べられている。先づグルコース培地で菌体増殖を行い、その菌体をメチルキシロシドを含む培地で酵素誘導培養を行った。この方法で得られた培養液にはキシラナーゼ以外の不要蛋白質が少なく、DEAE Sephadex A-25 カラムの通過液を限

外沝過で濃縮し、ゲル沝過、等電点電気泳動法により 3 成分のキシラナーゼ(X-I, X-II-A, X-II-B)を均一蛋白として得ることができた。これら 3 種の酵素の比較検討がなされた結果、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で得られた分子量はX-I が 50,000, X-II-A 及びBは共に 25,000, 等電点はX-I が 7.1, X-II-A 及びBが 10.1 と 10.3 であった。アミノ酸の組成の面では 3 者ともアスパラギン酸とグリシンの含量が高く、X-II-A 及びBに於てグルタミン酸とアラニン含量がX-I に比し少なく、チロシン、スレオニン、セリン含量が高いことが示された。チロシンはX-II-A 及びBにおいてモル比でX-I の 2 倍以上存在し、一方X-II-A 及びBの分子量がX-I の半分であることを考え、X-II-A またはBがX-I の一部を構成していることはありえず、またX-II-A もしくはBがX-I から由来したものでもないと結論された。末端アミノ酸についてはX-I のアミノ末端はアラニンで、カルボキシル末端はアスパラギン酸であり、X-II-A 及びBの末端はともにスレオニンで、X-II-Bのカルボキシル末端はアラニンであることが明らかにされた。

酵素作用に対する温度の影響では、X-I, X-II-A 及びBの間にはほとんど差がなく、60-65°C に至適温度が認められ、0-55°C で 30 分間は安定であった。至適pHはX-I が 5.5-6.5, X-II-A 及びBはともに 5.0-6.0 であって、pH に対する安定性については酸性域、アルカリ性域ともにX-II-A 及びBがX-I よりも広い範囲で安定であった。金属イオンその他化学物質に対する傾向は 3 者ともほとんど同じであった。3 者とも水銀とSDSで強く阻害されたが、X-I の方が強く阻害され、この点でのみ異っていた。また 3 種の酵素はいずれもpCMBの影響を受けないことからSH酵素ではないと推論している。

また 3 者とも作用面ではほとんど差が認められず、いずれもキシロビオース、マルトース、セロビオース、可溶性澱粉、カルボキシメチルセルロースに作用せず、キシラン、キシロトリオース以上のキシロオリゴ糖のみを分解し、キシロースとキシビオースを生成した。また見掛け上転移反応は認められず、キシロオリゴ糖の分解では重合度の大きい方が分解され易い傾向を示した。

免疫学的な検討もなされた。即ちウサギを用いてX-I とX-II-Bに対する抗血清を調製し、オクタロニー二重拡散法と抗血清による酵素活性の阻害が調べられた。X-I は抗II-B血清により不活性化されず、沈降反応も示さなかった。またX-II-A とBは抗I血清と沈降反応を示さず、抗I血清により不活性化されなかった。以上の結果からX-II-A 及びBは免疫学的にX-I とは無関係な蛋白質であることが強く示唆された。X-II-A とBは抗II-B血清に対するオクタロニー二重拡散法で、それぞれの沈降線が完全に融合したことから、抗II-B血清がX-II-A とBを不活性化したことから、免疫学的に非常に近縁の蛋白質（共通抗原部を持つ）であることが示唆された。

以上のごとく蛋白化学的性質、酵素化学的性質、免疫学的性質の検討結果から、X-I はX-II-A 及びBとは異なる蛋白質であり、一方、X-II-A とBはよく似た蛋白質であることが示唆された。しかしこれら 3 種の酵素は作用面では全く区別できないことが強調された。

第三章では酵素活性部位の検索につき述べられている。1-エチルー3-ジメチルアミノプロピカルボジイミドおよびトリエチルオキソニウムフルオロボレイトによるカルボキシル基の修飾によって酵素作用に影響を認めたこと、アミノ酸分析によるカルボキシル基の修飾の確認などから、放線

菌キシラナーゼの活性部位似カルボキシル基が関与することが明らかにされた。N-プロモスクシンイミドによる作用では、トリプトファン残基がX-Iで2残基、X-II-Bで1残基修飾されても酵素活性に影響はなく、2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルプロミドによる影響も認められなかったことから、トリプトファン残基の酵素活性部位への関与は否定された。ジエチルピロカーボネイト、ヨード酢酸またはメチレンブルー（ヒスチジン残基の修飾）、2, 3-ブタンジオン（アルギニン残基の修飾）、三ヨウ化イオンまたはN-アセチルイミダゾール（チロシン残基の修飾）、クロラミンT（メチオニン残基の修飾）のいずれによっても酵素活性が影響を受けなかったことから、これらのアミノ酸残基は酵素活性部位にほとんど関係していないと結論された。アミノ基の関与も否定的であった。

以上を総括して、本放線菌キシラナーゼは他の放線菌のキシラナーゼと比較して、蛋白化学的性質を異にするが、酵素作用はほとんど同じであると結論している。また酵素活性部位にカルボキシル基が関与する点ではリゾチーム、セルラーゼ、 β -ガラクトシダーゼと類似しているが、トリプトファン残基とヒスチジン残基が関与しない点でそれらと異なるとしている。

審 査 の 要 旨

放線菌のキシラナーゼが種々の β キシロシドで誘導されることは協同研究者が既に明らかにしたことであるが、構造と誘導活性の相関関係を更に明らかにした点進歩が認められる。またこれら非代謝性の誘導物質（メチルキシロシド）を酵素生産に応用することにより、目的酵素以外の不純物の少ない培養液が得られ、酵素の精製を非常に効果的に行った点は評価される。

これ迄放線菌の酵素は一種類と考えられていたが、本研究では3種類(X-I, X-II-A, X-II-B)が生産されることを明らかにした。そしてそれぞれの酵素を均一蛋白質にまで精製し、それらの性質を詳細に検討したことは酵素化学的に意義がある。X-Iは分子量50,000、X-II-A及びBは25,000と大いに差があり、等電点もX-Iは7.1、X-II-AとBは10.1と10.3と非常に異っている。これらの点とアミノ酸組成、免疫学的性質の比較からX-IとX-II（A及びB）は蛋白化学的に全く別種のものであることが明らかにされた。しかしこのように異なる蛋白質でありながら作用面、基質の分解様式などほとんど差がないことが示され、応用面ではこれら酵素を同様に扱ってよいことを示唆した。

1個の生物体が同種の機能をもつ酵素を生産する場合、これらの酵素をアイソザイムと呼ぶが、本論文の場合免疫学的研究によってアイソザイムX-IとX-IIグループは全く別種の蛋白質であり、X-II-AとBは同一起源から生産されたものであることが示唆された。

プロテアーゼについては酵素活性部位の研究は非常によく行われているが、カーボハイドラーゼについては余り研究がなされていない。キシラナーゼに関する研究はこれまでほとんどなく、詳細に研究された例の最初のものと思われる。その結果カルボキシル基の関与がほぼ確実である証拠を

与え、また他の残基は余り関係していないことを示すなど重要な結論を与えていると考えられる。

以上の如くキシラナーゼ誘導基質の構造と誘導活性の相関、キシラナーゼの酵素化学に幾つかの新知見を与え、応用面にも関係する事実を示しており、論文内容から申請者は十分な酵素化学的素養及び技術を持っていると判断され、本論文は農学博士学位論文に値すると判定された。

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。