

氏名(本籍)	しもかわともこ (鹿児島県)			
学位の種類	博士(農学)			
学位記番号	博甲第1,814号			
学位授与年月日	平成10年3月23日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	農学研究科			
学位論文題目	Studies on Substrate Specificities of Endo-Alginate Lyases (エンド型アルギン酸リアーゼの基質特異性に関する研究)			
主査	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	神山	由
副査	筑波大学教授	農学博士	山根	國男
副査	筑波大学併任助教授	農学博士	小林	秀行 (食品総合研究所)

論文の内容の要旨

褐藻類の主成分であるアルギン酸は、グルロン酸 (G) とマンヌロン酸 (M) を構成糖とする酸性多糖類であり、現在、その粘性を利用して広範に使用されており、酵素分解産物にも様々な生理活性のあることが報告され、注目を集めている。従って、アルギン酸分解酵素の研究、特に基質特異性の研究はアルギン酸の広範な利用に発展することが期待される。本研究はエンド型アルギン酸リアーゼ基質特異性の解明を主目的として行った。対象酵素がエンド型であるため、高重合度のオリゴ糖基質が要求されるが、既存の方法ではアルギン酸から同基質を調製すること及びその分析は困難であった。そのため、蛍光試薬 (8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid) を用いた中性糖の電気泳動法を、オリゴアルギン酸に適合させるための泳動条件の改善を行った。その結果、オリゴアルギン酸の分離・分析にはアクリルアミド濃度30-40%のゲルが適当であり、バンドの蛍光強度の測定から0.25から4 nmol の範囲で定量することが可能になった。酸性オリゴ糖の調製は、BioGel P-6によるゲルろ過とQ Sepharose FF による陰イオン交換クロマトグラフィーを組み合わせることで、アルギン酸の部分分解物から、飽和オリゴグルロン酸の単糖から9糖までのシリーズと、非還元末端に不飽和構造を持つ不飽和オリゴグルロン酸の2糖から7糖までのシリーズを調製した。また、飽和オリゴマンヌロン酸、不飽和オリゴマンヌロン酸の7糖前後までのシリーズも同様の方法で調製した。各オリゴ糖について、FAB-MS、NMRによる構造の確認を行った。エンド型アルギン酸分解酵素の3種類を精製し、その諸性質の解明を行った。*Enterobacter cloacae*M-1の菌体内酵素は、分子量は39,000、等電点は8.9、酵素反応の至適pHは7.5、至適温度は40℃であり、pH6-8、20℃以下で安定であった。この酵素をpoly-M、poly-MG、poly-Gのそれぞれに作用させた結果、poly-Gに対して最もよく作用したことから、同酵素はpoly(α -L-1,4-guluronide) lyaseであった。また、*Streptomyces violaceoruber* IFO 15732の菌体外酵素は、分子量は27,000、等電点は9.5、至適pHは8.0、至適温度は65℃であり、pH4-10、40℃以下で安定であった。同酵素はpoly-Gに最もよく作用したことからpoly(α -L-1,4-guluronide) lyaseであった。さらに、*Dendryphiella salina* IFO 32139の菌体外酵素は、分子量は35,000、等電点は3.5、至適pHは5.0、至適温度は45℃であり、pH4-10、40℃以下で安定であった。同酵素はpoly-Mに特異的に作用したことからpoly(β -D-1,4-mannuronide) lyaseであった。次に、各種オリゴ糖に精製酵素を作用させ、電気泳動法を中心とした方法によって分解産物の解析を行った。*E. cloacae* のpoly(α -L-1,4-guluronide)

lyase は、5 糖以上の飽和・不飽和オリゴグルロン酸に作用し、分解速度は重合度が増すごとに上昇した。各種飽和オリゴ糖の分解様式から、同酵素は7糖単位のサブサイト構造を有し、酵素の活性部位はサブサイトの非還元末端より2番目と3番目の部位にあると推定した。飽和糖と不飽和糖とでは、同重合度であっても切断頻度が異なり、分解速度を7糖までのオリゴ糖で比較したところ、不飽和オリゴ糖の方が速やかに分解されることが明らかとなった。また、*S. violaceoruber* の poly (α -L-1,4-guluronide) lyase は、5 糖以上の重合度の飽和・不飽和オリゴグルロン酸に作用したが、分解速度の重合度依存は見られなかった。各種の飽和オリゴ糖の分解様式から、同酵素は5糖単位サブサイト構造を有し、酵素の活性部位はサブサイトの非還元末端より2番目と3番目の部位にあると推定した。一方、*D. salina* の poly (β -D-1,4-mannuronide) lyase は、不飽和オリゴマンヌロン酸は3糖以上を分解したが、飽和オリゴマンヌロン酸3糖を分解しなかった。各種の飽和オリゴ糖の分解様式から、同酵素のサブサイト構造は5糖単位であり、活性部位はサブサイトの非還元末端より2番目と3番目の部位にあると推定した。

審査の結果の要旨

これ迄に、エンド型アルギン酸分解酵素はいくつか発見されているが、基質特異性の明らかにされた酵素は数少なく、また、サブサイト構造が明らかにされた酵素は見当たらない。これは、酸性オリゴ糖（各種のアルギン酸オリゴ糖）の調製が極めて困難で入手が不可能なこと、および基質特異性の研究に適合する酸性オリゴ糖類の分別定量法がなかったことに起因している。

著者はアルギン酸オリゴ糖の調製研究に挑戦し、種々のオリゴ糖（飽和・不飽和のオリゴマンヌロン酸及びオリゴグルロン酸、またこれらの2から7糖までのシリーズ）の調製を可能にした。一方、酸性オリゴ糖の分別定量法の開発研究を行い、それを実用化した。著者は自ら開発したオリゴ糖類の調製と分別定量法を巧みに使い、酵素のサブサイト構造を明らかにするに至った研究は、酵素化学の発展に貢献している。さらに、特異性の異なる3種の微生物酵素を単一蛋白とみなし得る段階にまで精製し、それらの酵素化学的諸性質を克明に解明した研究も見事である。

著者が提示した一連の研究成果は、糖質関連酵素の中でも研究困難な酸性多糖分解酵素の研究発展に寄与しており、また、著者が開発した一連の研究手法は、他の糖質関連酵素の研究推進にも適用できる点において高く評価できる。

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。