

氏名(国籍)	宣 鉉 珍 (韓 国)
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	博 甲 第 2998 号
学位授与年月日	平成 14 年 7 月 25 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	Effect of Xylan-binding Domain on the Action Mode of $\beta$ -Xylanase from <i>Streptomyces olivaceoviridis</i> E-86 ( <i>Streptomyces olivaceoviridis</i> E-86 $\beta$ -キシラナーゼの作用様式に対するキシラン結合ドメインの影響)
主 査	筑波大学教授 農学博士 小 澤 哲 夫
副 査	筑波大学教授 農学博士 松 尾 勝
副 査	筑波大学教授 工学博士 向 高 祐 邦
副 査	筑波大学教授 農学博士 富 田 文一郎

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

この研究は綿実キシランからのキシロオリゴ糖の調製, *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 キシラナーゼの catalytic domain (CD) と xylan-binding domain (XBD) の分離およびキシラナーゼの作用様式に対する XBD の影響について行ったものである。

綿実搾油残さを有効塩素濃度 1% の次亜塩素酸ナトリウム溶液で脱リグニン処理した後, 15% 水酸化ナトリウム溶液に浸漬した。不溶物をろ布で除去し, ろ液を硫酸で中和した。生じたキシランの沈殿を遠心分離で回収した後, 脱塩, 風乾した。得られた綿実キシランを終濃度 0.125 – 2 M の硫酸で 90°C, 15 分間加水分解し, 分解産物を糖質の蛍光標識電気泳動法 (FACE) で分析した。その結果, 0.125M 硫酸を用いた場合に広い重合度分布のオリゴ糖混合物が得られ, 高重合度のオリゴ糖調製に最適であった。次に, この分解産物を Toyopearl HW-40F と BioGel P-4 の直列カラムを用いたゲルろ過に供し, 重合度 15 までのキシロオリゴ糖の単離を行った。同条件で市販広葉樹とオート麦キシランを加水分解し, 同カラムに供した結果, 広葉樹キシランでは綿実のとはほぼ同様な結果が得られたが, オート麦キシランではヘテロオリゴ糖が各キシロオリゴ糖画分に混在し, ゲルろ過のみでは分離不可能であった。

次に, ファミリー F/10 キシラナーゼの XBD は作用様式にどのような影響を与えているのかを検討するために, 同キシラナーゼの二つのドメインを分離することを目的にパパイニンによる部分分解を行った。ファミリー F/10 キシラナーゼにパパイニンをモル比で 10 対 1 になるように加え, 25°C (pH5.6) で 24 時間反応させた結果, 二つのドメインの分離が可能であった。この分解産物を Sephacryl S-200 HR のゲルろ過カラムで精製を行い, CD と XBD を分離した。CD の性質は天然型の  $\beta$ -キシラナーゼとほとんど変わらなかった。

*S. olivaceoviridis* E-86 はファミリーの異なる 2 種のキシラナーゼを生産するがこのキシラナーゼ間におけるキシランの分解様式, 特に初期反応における差異を明らかにするため, FACE を用いて解析を行った。それと共に, XBD のキシラナーゼの作用様式に対する影響を調べるため, CD に対しても同じ解析を行った。基質は, 広葉樹由来の不溶性および水溶性キシランを用いた。キシラン 0.5g, 緩衝液 8mL, 蒸留水 10mL を T 字管に分注し, これに酵素液 2mL を加えて 50°C で反応を行った。各時間ごとに反応液をサンプリングし, 100°C で 10 分間加熱して反応を停

止させた後、反応液中の不溶物を除去した。この反応液の一部を凍結乾燥した後、蛍光標識剤8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acidで標識し、30-40%のポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動で分析した。ファミリーF/10キシラナーゼは、両基質から反応初期からDP3と4の低重合度のキシロオリゴ糖を遊離した。これは高重合度のオリゴ糖に対する作用様式と同じ結果であった。一方、ファミリーG/11キシラナーゼは、両基質からも反応初期からキシロオリゴ糖を生成し、反応の経過と共にその量が増加することが明らかとなった。また、CD初期反応生成物は天然型のキシラナーゼとほぼ同じであった。これらの結果から、ファミリーF/10キシラナーゼとファミリーG/11キシラナーゼの初期反応における作用様式の差は、ファミリーF/10キシラナーゼに存在するXBDによる影響でないことが明らかとなった。

次に、ファミリーF/10キシラナーゼとそのCDをキシロオリゴ糖に作用させ、その切断様式の解析を行った。その結果、キシロオリゴ糖に対する二つの酵素の切断様式はほとんど同じであり、XBDはキシロオリゴ糖に対する作用様式に影響していないことが明らかとなった。

最後に、ファミリーF/10キシラナーゼとそのCDのキシランに対する加水分解率の比較実験を行った。その結果、CDの不溶性キシランに対する加水分解率は天然型のキシラナーゼに比べ若干減少する傾向があった。この結果から、キシラナーゼのXBDは不溶性キシランの加水分解に影響を与えていることが明らかとなった。

## 審査の結果の要旨

高重合度のキシロオリゴ糖類、例えばDP7以上のオリゴ糖類はキシラナーゼの研究推進に不可欠な糖類であるが、市販品は見当たらない。その理由は自然界から純キシランの入手が困難であること、高重合度のオリゴ糖類を蓄積する加水分解条件が確立されていないこと、およびヘテロオリゴ糖を含むキシロオリゴ糖類の分離が容易でないことなどに起因している。著者はこれらの難問を解決し、実験的な量的レベルではあるが、その調整法を確立した点において高く評価できる。

キシラナーゼには xylan-binding domain (XBD) があるが、その機能については不明な点が多い。この機能を明確にするためには catalytic domain (CD) と XBD を分離する必要があるが、申請者はパパインでキシラナーゼを CD と XBD に切断し、生成した両 domain を簡単なゲルろ過法で分離することを可能にした。遺伝子工学的手法に頼ることなく解決した点は見事である。

一方、キシラン分解におけるキシラナーゼF/10とG/11の異同を明らかにした研究、XBDの機能を明確にした研究、および自己の調製したキシロオリゴ糖を用いてそれらに対するキシラナーゼの分解様式を解明した一連の研究成果は、キシラナーゼの研究レベルを高め、さらに糖質関連酵素の研究発展に貢献した点においても高く評価できる。今後、キシロオリゴ糖類の量的な調製法とキシラナーゼの更なる実用化研究への発展に期待する。

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。