

氏名(本籍)	近藤兼司(奈良県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第3840号		
学位授与年月日	平成17年6月30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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Biochemical Studies on α-Galactosidases from <i>Streptomyces coelicolor</i> (ストレプトマイセス スエリカラーの α -ガラクトシダーゼに関する生化学的研究)		
主査	筑波大学客員教授	工学博士	中嶋光敏
副査	筑波大学教授	農学博士	木村俊範
副査	筑波大学教授	工学博士	向高祐邦
副査	筑波大学客員助教授	農学博士	小林秀行

論文の内容の要旨

本研究は放線菌ストレプトマイセス スエリカラー由来の糖質分解酵素のファミリー27と36に属する α -ガラクトシダーゼ遺伝子をクローニングし、発現した酵素について性質、特に基質特異性について、検討をおこなったものである。

自然界に幅広く分布している α -ガラクトシダーゼの基質特異性に関する研究はガラクトースを含むオリゴ糖、多糖などを有効利用する際に重要である。本研究で用いた *Streptomyces coelicolor* は glycoside hydrolase のファミリー27と36に分類される α -ガラクトシダーゼをコードする遺伝子を有している。しかし、本酵素が実際に活性を持つかどうかは明らかではない。放線菌を培養し、ゲノムDNAを抽出後、PCRを用いてこれらの遺伝子をクローニングした。大腸菌に形質転換し、それぞれの酵素を発現、精製を行った後にそれぞれの性質を検討した。

ファミリー27と36の α -ガラクトシダーゼの分子量はそれぞれ64 kDa、58 kDaであった。また、精製後のファミリー27 α -ガラクトシダーゼは40℃、pH7.0で最大活性を示し、温度安定性は50℃まで、pH5.0-10.0の範囲で安定であった。ファミリー27 α -ガラクトシダーゼはアミノ酸配列から α -ガラクトシダーゼの触媒ドメインに加えてC末端の新規なドメイン(260アミノ酸残基)に構造的に分けられたため、触媒部位のみからなるC末端欠損遺伝子を調製した。これを大腸菌により発現させ、精製した後にファミリー27 α -ガラクトシダーゼの全長部分との比較を行う事で、*Streptomyces coelicolor* ファミリー27 α -ガラクトシダーゼの付加的なドメインの機能を調べた。その結果、*Streptomyces coelicolor* ファミリー27 α -ガラクトシダーゼの全長よりも温度安定性、pH安定性において低下が見られた。

このことから、*Streptomyces coelicolor* ファミリー27 α -ガラクトシダーゼのC末端側の新規なドメインは酵素の安定性に寄与していることが示唆された。

基質特異性に関しては、ファミリー27 α -ガラクトシダーゼは今回使用した全ての基質、メリビオース、ラフィノース、スタキオースやガラクトマンノオリゴ糖、さらにはガラクトマンナンに対して効率的に作用し、広い特異性を示した。また、C末端の新規なドメインは基質特異性に影響を及ぼさなかった。

またファミリー 36 α -ガラクトシダーゼの至適温度は 40℃, 至適 pH は 7.0 であり, 温度安定性は 40℃まで, pH6.0-10.0 の範囲で安定であった。基質特異性を検討した結果, ファミリー 36 α -ガラクトシダーゼはラフィノース, スタキオースには効率的に作用したが, メリビオースやガラクトマンノオリゴ糖, ガラクトマンナンに対しては作用しなかった。メリビオースとラフィノースに対する特異性の違いはオリゴ糖の主鎖の違いに対する認識の差と考えられ, 本酵素はガラクトースだけではなく基質の大きさやガラクトース以外の糖の種類も認識している可能性を示した。これは酵素の特異性を研究する際の良いモデルになると考えられる。また, ゲルろ過と SDS-PAGE による分子量確認により本酵素が 8 量体構造であることが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は放線菌ストレプトマイセス スエリカラー由来のファミリー 27 の α -ガラクトシダーゼの 1 次構造を既知の α -ガラクトシダーゼと比較し, 基質特異性を含めた性質と, 酵素の持つ付加的なアミノ酸配列の機能の検討を行ったものである。ファミリー 27 の α -ガラクトシダーゼの新規な付加的配列は酵素の安定性に関して役割を果たしていること, また, ファミリー 27 の α -ガラクトシダーゼについてはすべてのガラクトオリゴ糖に効果的に作用し, 更にガラクトマンナンへ作用することを明らかにしたことは, これらの糖の工業的な利用を目指す上で評価できるものである。

またファミリー 36 の α -ガラクトシダーゼに関しては, 3, 4 糖には作用するものの 2 糖であるメリビオースには作用しなかったことから, 本酵素は基質を認識する際にガラクトースだけではなく, ガラクトース以外の糖の種類や大きさも認識していると考えられた。更にこのような基質の認識機構の一部を明らかにしたことで基質特異性の厳密性の向上の可能性が示唆され, 基質特異性のコントロールによる α -ガラクトシダーゼの実用化のための今後の研究の発展が期待される。

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。