

氏名(国籍)	楊 紅 (中国)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第4007号
学位授与年月日	平成18年3月24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 Glycoside Hydrolases Involved in the Degradation of Pectin Polysaccharides from Sugar Beet (シュガービートからのペクチン多糖の分解に関与する糖質分解酵素の生化学的研究)
主査	筑波大学教授(連携大学院) 工学博士 中嶋光敏
副査	筑波大学教授 博士(薬学) 柳澤純
副査	筑波大学教授 工学博士 向高祐邦
副査	筑波大学助教授(連携大学院) 農学博士 小林秀行

論文の内容の要旨

本研究はシュガービートパルプの有効利用のために、その分解に関与する糖質分解酵素の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加えたものである。

自然界に存在するバイオマスの有効利用は世界的に重要な問題であり、植物細胞壁の酵素分解による工業利用は大きな興味を持たれている。植物細胞壁の主要成分はペクチンであり、ラムノースとガラツクロン酸が交互に結合した主鎖に、アラビナンやガラクトンの側鎖がラムノースの4位の炭素に結合している。この側鎖はペクチンの物性に大きな影響を与えるものである。本研究ではペクチン側鎖の分解に関与する3種類の酵素、ガラクタナーゼ、アラビナーゼ、アラビノフラノシダーゼについて、*Thermotoga maritima*, *Streptomyces coelicolor*, *Aspergillus oryzae* から遺伝子をクローニングし、大腸菌、酵母に形質転換し、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。

超好熱菌 *Thermotoga maritima* の b-1, 4-ガラクタナーゼ遺伝子をクローニングし、大腸菌により発現させた。発現量は70mg/Lに達し、精製酵素の至適温度は90℃であり、80℃、1時間の熱処理でも安定であった。各種ガラクトンに対する特異性から、本酵素はアラビノース側鎖のないガラクトンによく作用し、トリオース、テトラオースを多く精製することが分かった。本酵素の効率的な利用のためにはアラビノフラノシダーゼとの併用が有効であることが示唆された。

次にアラビナンに対して特異性を示すアラビナーゼとアラビノフラノシダーゼについて、遺伝子のクローニングを行った。放線菌 *Streptomyces coelicolor* からDNAを抽出し、アラビナーゼ遺伝子をクローニングし、発現させた。本酵素の分子量は40kDaであり、活性の至適pHは6.0、至適温度は45℃であった。リニアアラビナンに対する活性は、脱側鎖アラビナンよりも高く、この事は側鎖アラビノースの除去がアラビナンのアラビナーゼによる分解には必要であることが示唆された。

麹菌 *Aspergillus oryzae* からアラビノフラノシダーゼ遺伝子をクローニングし、酵母 *Pichia pastoris* に形質転換し、発現させた。組換え酵素はイオン交換、疎水クロマトにより単一に精製された。本酵素は、 α 1,5-アラビノオリゴ糖よりも α 1,3-アラビノオリゴ糖をよく分解した。本酵素はアラビナン、アラビノキ

シラン、ペクチンガラクトンからアラビノースを遊離するが、リニアアラビナン、ガムアラビックを殆ど分解しなかった。この事は本酵素が比較的広い特異性を持つことを示唆している。アラビナンからのアラビノースの効率的な生成のために、アラビナナーゼとアラビノフラノシダーゼの混合利用を検討し、酵素量（19:1=アラビノフラノシダーゼ:アラビナナーゼ）が最も効率的にアラビノースを生成することを示し、この効果が両酵素活性の相乗効果によるものであることを示した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文はバイオマスの主要成分であるペクチン部分の有効利用のために糖質関連酵素による酵素分解の検討を行ったものである。その為にガラクタナーゼ、アラビナナーゼ、アラビノフラノシダーゼの3種類の酵素遺伝子をクローニングし、発現させ、そしてペクチンに対する基質特異性を検討した。その結果、ガラクタナーゼは、アラビノースを除去したガラクトンに作用し、3糖、4糖を生成する特徴を示した。また、アラビナンを効率的に分解しアラビノースを得るためには、アラビナナーゼ、アラビノフラノシダーゼを混合して利用し、アラビノース側鎖をアラビノフラノシダーゼで除去する事が重要であり、相乗効果により効率的にアラビノースを示すこれらの酵素の比率を明らかにしたことは、これらの酵素を用いたアラビノースの工業的な生産を目指す上で大いに評価できるものである。

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。