

氏名(本籍)	うちだひろみ (栃木県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	博甲第1157号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Studies on the Enzymatic Hydrolysis of Xylan (キシランの酵素加水分解に関する研究)
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 村上 和雄
副査	筑波大学教授 農学博士 田 仲 可 昌
副査	筑波大学助教授 農学博士 神 山 由

論 文 の 要 旨

本研究は、微生物に由来したキシラン分解酵素系の特性を明らかにすること、およびこの酵素系において重要な役割を果たしている酵素を精製し、諸性質を明らかにすることを目的としている。

バイオマスという用語は、本来は生態学の分野で「生物現存量」として用いられていたものであるが、今日ではエネルギー源としての生物量を示す場合が多い。バイオマスの中で、量的に最も多いのは植物体であり、例えば、世界の森林資源は約34,000億 m^3 、わが国の森林資源は約21億 m^3 と推定されている。しかし、わが国では、1年間に約2,600万 m^3 、重量にして約1,300万tの未利用木材資源が排出されている。また、世界の利用可能な非木材繊維資源の量は、約10.3億tと推定されているが、そのほとんどは廃棄物として処理されている。これらの未利用バイオマス資源を活用する試みは、エネルギーの有効利用のために不可欠であり、燃料化や糖化、アルコール生産の目的で、様々な方法が開発されている。

前述の廃棄物中には、多量のヘミセルロースが含まれており、その主成分はキシランである。キシランは β -1,4結合したキシロースのポリマーであるが、L-アラビノフラノースやD-グルクロン酸(およびその4-O-メチル誘導体)の側鎖を有している。

当研究室において、キシランを加水分解する方法が研究されてきたが、キシランを放線菌 *Streptomyces olivaceouridis* E-86のキシラナーゼで加水分解すると、アラビノフラノーズやグルクロン酸、4-O-メチルグルクロン酸の側鎖を有するヘテロキシロオリゴ糖が得られることが既に知られている。第I章では、*Aspergillus niger* 5-16の菌体内酵素系によって、このヘテロキシロオリゴ糖を単糖にまで加水分解する方法を検討した。

キシランやその加水分解物を炭素源にして *A. niger* 5-16 を培養すると、菌体内に β -キシロシダーゼ、 α -グルクロニダーゼ、 α -アラビノフラノシダーゼからなるキシラン分解酵素系が誘導されることが認められた。これらの酵素の活性、および安定性に対する pH、温度の影響はほぼ等しく、これらの酵素が同一条件下で作用することが示唆された。そこで、0.05% のアジ化ナトリウム溶液で処理した *A. niger* 5-16 のペレット状の菌体を詰めたカラムによって、前述のヘテロキシロオリゴ糖溶液の加水分解を試み、これらが単糖にまで加水分解されることを確認した。

湿重量で 16g の菌体（水分量は 90%）を詰めたカラムによる 1 日のキシロース生産量は 3.4g から 5.3g であった。この菌体カラムの加水分解の限界濃度はおよそ 5% と推定され、これが、*A. niger* 5-16 の β -キシロシダーゼのキシロースによる生成物阻害に起因することが実証された。したがって、より高濃度のヘテロキシロオリゴ糖溶液を加水分解するには、キシロース耐性のある β -キシロシダーゼを探索することが必要であった。

α -グルクロニダーゼは、キシラン側鎖のグルクロン酸、4-O-メチルグルクロン酸の α -1, 2 結合を加水分解する酵素である。前述のキシラン分解酵素系のうち、 β -キシロシダーゼと α -アラビノフラノシダーゼに関しては多くの研究がなされているが、 α -グルクロニダーゼに関する報告は非常に少ない。そこで、第 II 章では、*A. niger* 5-16 の菌体内 α -グルクロニダーゼを精製し、その諸性質を明らかにした。精製の途中で、 α -グルクロニダーゼは 2 つの成分（CM-I と CM-II）に分離され、それぞれ SDS-PAGE で単一バンドを示す標品が得られた。両酵素とも分子量は SDS-PAGE で 130,000、ゲル濾過で 150,000 であった。反応の至適温度および pH は、それぞれ 60°C、4.8 であり、50°C 以下および pH 4.5 から 7.0 の間で安定であった。また、両酵素の活性は Ag^+ 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 、SDS、モノヨード酢酸、N-ブロモスクシンイミドで著しく阻害された。

グルクロノシル-キシロトリオース、4-O-メチルグルクロノシル-キシロトリオースに対する K_m 値は、CM-I でそれぞれ 0.77、0.37、CM-II でそれぞれ 0.82、0.47 mM であり、同基質に対する V_{max} 値は、CM-I でそれぞれ 5.20、1.42、CM-II でそれぞれ 17.1、4.68 $\mu\text{mol of glucuronic acid formed/min/mg of protein}$ であった。*A. niger* 5-16 の α -グルクロニダーゼは合成した基質、pNP- α -glucuronide、D-glucuronosyl- α -D-glucuronide、benzyl-4-O- α -D-glucuronosyl- β -D-glucoside を加水分解しなかった。さらに、これらの基質は α -グルクロニダーゼの競争阻害剤としても作用しなかったことから、*A. niger* 5-16 の α -グルクロニダーゼは厳密な基質特異性を有するものと判断された。

第 I 章においては、高濃度のキシロオリゴ糖の加水分解のために、キシロース耐性のある β -キシロシダーゼを探索する必要性を示唆したが、第 III 章では、70 種の担子菌を探索した結果、*Merulius tremellosus* IFO 9667（シワタケ）の菌体内粗酵素から、目的とする β -キシロシダーゼを見出した。*M. tremellosus* の粗酵素には β -キシロシダーゼだけでなく、 β -キシラナーゼ、 α -グルクロニダーゼ、 α -アラビノフラノシダーゼ活性も認められ、さらに β -グルコシダーゼ活性も確認された。*M. tremellosus* の粗酵素によってキシロピオースは加水分解されず、前述の β -キシロシダーゼがキシロピオース加水分解能を欠くことが認められた。また、 β -キシロシダーゼと β -グルコシダーゼの

等電点が等しく、両酵素の活性が β -グルコシダーゼの阻害剤であるグルコノ- δ -ラクトンで著しく阻害されたことから、 p -ニトロフェニル-キシロシドと p -ニトロフェニル- β -グルコシドの加水分解が同一の酵素で触媒されている可能性のあることが示唆された。

*M. tremellosus*の β -キシロシダーゼによって、前述の菌体のカラムの欠点を克服することは不可能であったが、このキシラン分解酵素系によってキシランからキシロビオースやキシロトリオースを含むキシロオリゴ糖を生成することが可能であった。

第VI章では、*Merulius tremellosus* IFO 9667の粗酵素から、 β -キシロシダーゼと β -グルコシダーゼの両活性を有する酵素、すなわち β -キシロシダーゼ/ β -グルコシダーゼを精製し、その性質を明らかにした。

精製酵素の分子量はSDS-PAGEで84,000、ゲル濾過で74,000であった。反応の至適温度は50°Cで、至適pHは β -キシロシダーゼ活性で6.0、 β -グルコシダーゼ活性で5.6であった。また、35°C以下、pH5.5から7.5の間で安定であった。さらに、両酵素活性は Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 p -クロロマーキュリフェニルスルホン酸、モノヨード酢酸、N-エチルマレイミド、N-ブロモスクシンイミド、およびグルコノ- δ -ラクトンで著しく阻害された。

精製酵素は種々のキシロシド、グルコシド、およびセロビオースを加水分解したが、粗酵素の場合と同様、キシロースによる阻害を受けず、またキシロビオース加水分解しなかった。 p -ニトロフェニル- β -キシロシド、 p -ニトロフェニル- β -グルコシドに対する K_m 値はそれぞれ0.02、0.12mM、 V_{max} 値はそれぞれ4.69、16.9 μ mol of p -nitrophenol formed/min/mg of proteinであった。

β -キシロシダーゼ/ β -グルコシダーゼに関しては、Ishihara and Shimizuが、*Tyronyces palustris*について、Uziieらが*Chaetomium trilaterale*について報告している。これらの酵素は、今回の*M. tremellosus*の場合と同様、 β -キシロシドよりも β -グルコシドに対して高い活性を有することが示唆されているが、キシロビオースが加水分解されることも認められている。この点で*M. tremellosus*の β -キシロシダーゼ/ β -グルコシダーゼは、今までに報告のあったものとは異なる新奇な酵素であると考えられた。

キシロースは、甘味料以外にも食品の保存効果の向上、フレーバーの改善、着色などの目的で食品添加物として利用されている。さらに、キシロースは、フラクトースへのグルコースの異性化を触媒するキシロースイソメラーゼの誘導物質として、また糖尿病患者の代替甘味料として用いられるキシリトールの原料としての用途がある。キシロオリゴ糖についても、近年その性質が注目されており、例えば、水分活性引き下げ効果、不凍性、*Bifidobacterium*の増殖を促進する作用のあることなどが知られており、また、糖尿病の症状を緩和する作用のあることが示唆されている。

キシランをはじめとする木質系資源を加水分解する方法には、塩酸、硫酸、フッ化水素などを用いる酸分解法があるが、これには、①用いた酸の回収にコストがかかる、②耐圧・耐酸の反応容器を必要とする、③副産物が生成するなどの欠点が指摘されている。これに対し、酵素による加水分解法は、これらの欠点を改善することができるものである。本研究は、キシランを酵素によってキ

シロースまで加水分解する具体例を示したものであり、また、実用化に向けての可能性を示唆している。

審 査 の 要 旨

自然界では、キシロースのみから成るキシランは非常に稀で、ほとんどがL-アラビノースやD-グルクロン酸の側鎖を有している。本研究では、放線菌のキシラナーゼと、*Aspergillus niger* 5-16の菌体内酵素系を組み合わせ、種々の側鎖をもつキシランを単糖にまで加水分解することを可能にし、また実用化の際に克服すべき点を指摘している。

α -グルクロニダーゼに関しては、二三の糸状菌で精製された報告があるに過ぎない。本研究では、*A. niger* 5-16から本酵素を生成し、その理化学的諸性質を明らかにしている。また、合成した基質に対する反応から、本酵素が厳密な基質特異性を有することを示唆している。

担子菌 *Merulius tremellosus* IFO 9667の β -キシロシダーゼは、*A. niger* 5-16の β -キシロシダーゼと異なり、キシロースによる生成物阻害を受けないが、キシロビオースを加水分解しないことを見出した。また、同酵素により種々の β -グルコシドの加水分解も触媒されていることが認められた。本酵素は、今までに報告のあった β -キシロシダーゼ/ β -グルコシダーゼと性質を異にし、キシランからのキシロオリゴ糖の生産に応用できることが期待される。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。