

氏名(本籍)	たけ　うち　とし　お 竹　内　寿　男(愛　知　県)
学位の種類	博　士(生物資源工学)
学位記番号	博　乙　第　1768　号
学位授与年月日	平成13年10月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Studies on Endo-Alginate Lyases and Their Applications (エンド型アルギン酸リアーゼとそれらの応用に関する研究)
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　前川　孝　昭
副査	筑波大学教授　農学博士　田　仲　可　昌
副査	筑波大学併任助教授　農学博士　小　林　秀　行

### 論　文　の　内　容　の　要　旨

本研究はエンド型アルギン酸リアーゼの探索、同酵素の精製と諸性質の解明、および同酵素によるアルギン酸の利用開発を目的として行った。

褐藻類の主成分であるアルギン酸は、 $\beta$ -D-マンヌロン酸(M)と $\alpha$ -L-グルロン酸(G)から構成され、それらはMのみから成るM-ブロック、GのみのG-ブロック、MGの混合ポリマーであるMG-ブロックの3種が共存するブロック共重合体の酸性多糖である。このような複雑な化学構造をもつアルギン酸の分解には、多種多様な酵素の関与と存在が予想されるが、未発見と思われる酵素が多い。

一方、アルギン酸は高粘度多糖であるが、部分分解やCa置換(アルギン酸NaがCaで置換される)により水溶液の粘度は大きく変化する。また、アルギン酸プロピレングリコールも工業生産されており、これらの理化学的特性は、食品や化粧品、水処理、染色・繊維分野、諸工業に広範に利用されている。さらに最近では、アルギン酸の部分分解物である酸性オリゴ糖は様々な生理機能を有することが報告されている。このような背景から、本研究では3つのブロックに特異的に作用するエンド型アルギン酸リアーゼの探索と、同酵素とアルギン酸の利用開発を目的として研究に着手した。

第1章では、*Flavobacterium multivolum* からエンド型グルロニドリナーゼ(EndoGase)を単離した。本酵素の分子量は43-kDa(以下SDS-PAGE法)で等電点は8.7、酵素反応の至適のpHと温度は各々8と40℃であり、pH6~9の範囲で30℃まで安定であった。また、EDTAやモノヨード酢酸(MIA)、N-ブロモシクシニミド(NBS)で著しい阻害を受けた。本酵素はG-ブロックとMG-ブロックに作用し、種々のオリゴ糖(重合度2~4)を生成したことから、EndoGase(EC4.2.2.11)であると判定した。

第2章では、アワビ臓器のアセトン粉末からエンド型マンヌロニドリナーゼ(EndoMase)を単離した。本酵素の分子量は35-kDaで、反応の至適のpHと温度は7.5~9と30℃まで安定であった。本酵素はMnやCa、Mgの存在下で酵素の活性が増大したが、NiやCd、Cu、Pb、Zn、Feなどの2価金属の存在で活性は著しく低下した。一方、本酵素はM-ブロックとMG-ブロックに作用し、種々のオリゴ糖(重合度3~6)を生成したことから、EndoMase(EC4.2.2.3)に分類される酵素であると判定した。

第3章では、*F. multivolum* からエンド型マンヌロニドグルロニドリナーゼ(EndoMGase)を単離した。本酵素の分子量は32-kDaで等電点は8.2、反応の至適のpHと温度は7.5と40℃で、pH6~9の範囲で40℃まで安定であっ

た。酵素活性はSDSやMIA、NBSにより強く阻害されたが、EDTAやPCMBでは阻害されなかった。本酵素はM-、G-およびMG-ブロックの全てをほぼ同じ速度で分解し、各々のブロックからオリゴ糖（重合度2～5が主産物）を生成した。以上の結果から、本酵素はEndoMGaseに属すると判定した。これ迄に知られている酵素は、GaseかMaseのいずれかに属しているが、本研究で発見されたMGaseは、EC番号の付されていない新しい酵素であると判断される。

第4章では、アルギン酸のG-とMG-ブロックを分解するが、M-ブロックを残存させる*F.multivolum*のGaseの特性を応用し、アルギン酸からM-ブロックの簡易調製法を実現した。

第5章では、*F.multivolum*の粗酵素によるアルギン酸の低分子化に関する工業規模を想定した研究を行った。本酵素は食品添加物として認可されているNaClやKCl、 $MgCl_2$ の共存により酵素反応は増大し、また、アルギン酸のNaやK、 $NH_4$ 塩の他にグリコールエステルの粘度を急速に低下させた。同酵素により4.9kgのアルギン酸Na (M/G; 1.04)の水溶液をpH6.8、45℃で2.5時間分解した結果、粘度が4センチポイズ (3.5%w/w)の低分子アルギン酸溶液（平均分子量約3,000）を製造することを実現した。

本研究において、基質特異性の異なる3種の酵素を探索し、それら精製酵素の諸性質の解明と応用研究を提示したが、今後、アルギン酸とその関連酵素の研究及び利用拡大が期待される。

## 審査の結果の要旨

褐藻類の主成分であるアルギン酸はM-ブロック、G-ブロックおよびMG-ブロックの3種が共存する重合体であり、理化学的に複雑な構造を有する酸性多糖である。このような背景から著者はアルギン酸の生分解には多種多様な酵素が存在することを予想し、酵素の探索研究を開始した。その結果、アワビからEndoMase、微生物からEndoGaseとEndoMGaseを見出した。これ迄に、MaseとGaseは既に報告されているがMGase（EC番号が付されていない）は未発見であった。著者は*F.multivolum*の粗酵素にMGaseが存在することを発見したが、新酵素の発見によってアルギン酸分解酵素の研究レベルを高めたと同時に、同酵素の研究推進に注目される実績をあげたと言える。因に、他の研究者もその後MGaseを見出している。また、特異性の異なる3種の酵素の探索とそれら酵素の精製および諸性質の解明を行った研究成果は、酵素化学の発展に寄与した点において高く評価できる。

一方、著者の研究は、酵素の探索と諸性質を解明したことにとどまらず、自己の探索した酵素の応用研究を行っている。すなわち、これ迄にアルギン酸の部分分解物は様々な生理活性を示すことから、酵素法によるアルギン酸の部分分解法の開発が望まれていた。このような現状から著者はGaseの基質特異性を応用し、アルギン酸から酵素法によるM-ブロックの簡便的な調製法を実現した。また、工業規模を想定してアルギン酸の部分分解物の調製研究を行い、酵素法がアルギン酸の低分子化に利用できることを実証した。著者の研究は新酵素の発見に貢献しており、またアルギン酸の利用拡大に一步近付けたものであり、工業化に期待する。

よって、著者は博士（生物資源工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。