

氏名(本籍)	かわ ばた やす ゆき (大阪府)			
学位の種類	博士(農学)			
学位記番号	博甲第1,441号			
学位授与年月日	平成7年10月31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	STUDIES ON SUBSTRATE SPECIFICITIES OF α -GLUCURONIDASES (α -グルクロニダーゼの基質特異性に関する研究)			
主査	筑波大学教授	農学博士	日下部	功
副査	筑波大学教授	理学博士	多比良	和 誠
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	山口	彰
副査	森林総合研究所木材化工部長	工学博士	志水	一 允

論 文 の 要 旨

本研究は、キシラン分解酵素系の1つである α -グルクロニダーゼについて、同酵素を生産する微生物を探索し、同酵素を精製し、同酵素の基質特異性をはじめとする性質を明らかにすることを目的としている。

キシランは、植物細胞壁を構成するヘミセルロースの構成成分で、農産廃棄物(稲わら、麦わら、トウモロコシ穂軸、サトウキビ搾汁残さなど)に多く含まれている。これらの農産廃棄物は、その多くが未利用なバイオマス資源として、燃料化や糖化、アルコール生産の目的で有効な利用法の開発研究が行われている。

キシランは、 β -1,4-結合したキシロースのポリマーであり、L-アラビノースや、D-グルクロン酸、4-O-メチル-D-グルクロン酸の側鎖を有している。キシランを酵素法により完全に加水分解するには、 β -キシラナーゼ、 β -キシロシダーゼ、 α -L-アラビノフラノシダーゼ、 α -グルクロニダーゼなどの酵素が必要となる。これらの酵素の中で α -グルクロニダーゼについては、他の酵素に比べて報告が少なく、基質特異性についてもほとんど知見がない。そこで、同酵素の基質特異性の解明を主な目的として研究を進めた。

まずはじめに、 α -グルクロニダーゼの基質特異性を明らかにするために必要な α -D-グルクロシノール-D-キシロース(GA-2X, GA-3X, GA4X)を3種類合成した。適切な保護基を導入したグルクロン酸ドナーとキシロースアクセプターを用いてグルコシル化反応を行った。グルコシル化反応は種々検討した結果、イミデート法が選択性と収率の点で最も優れていた。

次に木材腐朽菌の担子菌70種から α -グルクロニダーゼ生産菌を選抜した。選抜の方法としては、2-O- α -D-グルクロシノール-D-キシロース(GA-2X)と

-nitroフェニル α -D-グルクロシノール-D-グルクロニド(PNP-GA)の2種類の基質を用いて検討した。その結果、数種の担子菌はGA-2Xを分解する酵素を生産したが、PNP-GAを分解する菌株は見つからなかった。また、先に化学合成したGA-X位置異性体を基質として担子菌の生産する酵素について基質特異性を検討した。対照として*Aspergillus niger* 5-16の酵素を用いたところ、*A. niger*の酵素は、GA-2Xのみを加水分解するのに対して、担子菌の生産する酵素は3種類の基質をすべて分解した。このことから、*A. niger*の α -グルクロニダーゼは厳密な基質特異性を持つが、担子菌の酵素は広い特異性を持つことが示唆された。しかし担子菌の α -グルクロニダーゼは、4℃中性条件下で保存しても活性の低下が著しく、精製して性質を調べるまでに至らなかった。

一方、市販の軟体動物の中腸腺アセトンパウダー（アワビ、かさ貝、カタツムリ）について PNP-GA 分解活性について調べた。その結果、いずれにも PNP-GA を加水分解する酵素（PNP-GAase）が含まれていることがわかった。そこで高い活性を含むカタツムリのものについて精製を行い性質を検討した。種々のクロマトグラフィーにより、PNP-GAase を電気泳動的に単一になるまで精製した。精製酵素の分子量はゲル濾過では 180,000、SDS-PAGE で 97,000、等電点は 6.8 であった。酵素活性の至適は pH 3.0、至適温度は 50℃ であり、また pH 3-7、50℃ 以下で安定であった。本酵素の活性は Hg^{2+} 、PCMB、SDS、NBS で強く阻害された。本酵素は、PNP-GA だけでなく、GA-2X、GA-3X、GA-4X、 α -D-glucuronosyl- α -glucuronide (GA)、benzyl4-O- α -D-glucuronosyl- β -D-glucoside も加水分解した。いくつかの α -グルクロニドについて加水分解速度を比較したところ、PNP-GA >> GA-2X > MeGA-2X = GA-GA の順に加水分解した。

以上の結果から α -グルクロニダーゼは次の 3 種類に分類されるものと結論した。

- a) *A. niger* のように、GA-2X のみを加水分解する酵素。
- b) 担子菌のように、GA-X を加水分解するが、PNP-GA は加水分解しないもの。
- c) カタツムリのように、PNP-GA と、その他の α -グルクロニドも加水分解するもの。

このように、本研究では化学合成した基質を用いて α -グルクロニダーゼの基質特異性を詳細に検討することにより、新規な酵素を発見し、酵素化学的諸性質を明らかにすることができた。

審 査 の 要 旨

α -グルクロニド結合はグルクロノキシランとして木材やイネ科植物などに普遍的に存在している。従って、その結合を加水分解する微生物・酵素（ α -グルクロニダーゼ）も自然界に普遍的に存在しているものと予想される。しかし、これ迄に知られている酵素は数少なく、また精製酵素の性質、特に基質特異性についても不明な点が多く、糖質関連酵素の中でも、同酵素の研究レベルは全体的に低い。これは発見された酵素が数少ないこと、酵素の精製が難儀であること、基質特異性の解明に必要な種々のオリゴ糖の調製が困難であることなどに起因している。このような現状から、著者は種々の新しい基質を化学合成した。次に異なった起源から数種の酵素を発見し、それらを精製して取得し、精製酵素の諸性質と基質特異性を明らかにする研究を行い、多くの新しい事実を提示した。著者の研究における新規な成果は以下の通りである。

- 1) 酸性糖の合成は困難であるが、著者は新しい方法を考案し、種々の位置異性体の合成を実現した。
- 2) α -グルクロニダーゼは糸状菌、担子菌、軟体動物などに普遍的に存在することを発見し、また酵素の精製と諸性質を明らかにした。
- 3) 自己の合成した基質を使って酵素の基質特異性の分類を可能にした。一方、著者は国際酵素委員会に、 α -グルクロニダーゼに対して酵素番号の付設を申請している。

上記の結果、著者が開発した糖質の合成は、今後の α -グルクロニダーゼの研究と糖質化学の発展に貢献し、一方、酵素の発見と特異性の解明を行った研究は、糖質関連酵素化学の発展に寄与した点で高く評価できる。

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。