

氏 名 ^{あき}秋 ^ば葉 ^{しゅん}俊 ^{いち}一
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)
 学 位 記 番 号 論 農 博 第 2225 号
 学位授与の日付 平成 11 年 3 月 23 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当
 学 位 論 文 題 目 Studies on Protease-Resistant Endo- β -1, 4-glucanase from *Aspergillus niger*
 (黒こうじカビが生産するプロテアーゼ耐性セルラーゼに関する研究)

(主査)

論文調査委員 教授 熊谷英彦 教授 江崎信芳 教授 井上國世

論 文 内 容 の 要 旨

セルラーゼを洗剤に利用するには、界面活性剤やプロテアーゼ等の洗剤成分に対する耐性を有することが重要であるが、これまでその様な観点からの研究報告はない。著者は、黒こうじカビ *Aspergillus niger* の一株が、界面活性剤およびプロテアーゼに耐性なセルラーゼを生産することを発見し、本酵素について基礎及び応用研究を行った。

その内容は以下のように要約できる。

1. *A. niger* IF031125 の培養液からセルラーゼを 20% の収率で約 46 倍に精製、単離した。精製酵素の分子サイズは約 40kDa で、約 8.9% の糖を含有する。基質特異性から本酵素は、エンド- β -1, 4-グルカナーゼであると結論した。カルボキシメチルセルロースに対する作用 pH は 3.0 から 11.0、至適 pH は 6.0 から 7.0 であった。至適温度は 70℃ にあり、pH 7.0、60℃ で 2 時間保温後も活性の低下はなく、70℃、2 時間後も約 70% の活性が残存した。
2. 本酵素を市販の洗剤用プロテアーゼ数種とともに、pH 7.5、40℃ で保存し、3 日後でも活性の低下はないこと、2 週間保存後も 70% 以上の活性を有していることを確認した。また、本酵素は各種界面活性剤あるいはキレート剤によって活性に影響を受けないことを明らかにした。
3. 精製酵素にエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを作用し、脱糖鎖酵素 1 (CD-1) を得た。また、 α -マンノシダーゼを作用し、コンカナバリン A に吸着しない画分から脱糖鎖酵素 2 (CD-2)、吸着した画分から部分脱糖鎖酵素 (PD) を得た。

未処理酵素、PD、CD-2、CD-1 の各酵素の分子サイズは、40、39、38、37kDa、糖含量は 9.0、4.5、1.3、0.8% であった。脱糖鎖による酵素活性の変化は見られなかった。CD-1 は N-アセチルグルコサミン 1 残基が結合した酵素、CD-2 は N-アセチルグルコサミン 2 残基にマンノース 1 残基が結合した酵素、PD は糖鎖のマンノースオリゴマーが部分的に除去された酵素であると考えられた。いずれの標品も、糖鎖を除くことによって熱安定性が低下することはなかったが、洗剤用プロテアーゼやプロナーゼ処理により、CD-1 のみに顕著な活性の低下が見られた。

4. キャピラリー電気泳動により、各酵素標品は、脱糖鎖の割合が大きいほど遅く泳動することを明らかにした。各脱糖鎖酵素の表面の荷電量と糖残基数の相関を求めた結果、脱糖鎖酵素タンパク質の表面は天然の酵素タンパク質の表面に比べてマイナスに荷電しており、マンノースオリゴマーからなる糖鎖が表面の電荷に影響していることを示した。次に、各酵素標品の表面疎水性を水性二相分配系の疎水性度と酵素標品の分配係数から算出し、各標品の表面疎水性は脱糖鎖されるに従い減少することを明らかにした。

5. 本酵素が、 β 結合を有する p-ニトロフェニル糖化合物や n-アルコールを受容体として、セロオリゴ糖を転移することを認めた。1-オクタノールを受容体に、セロペンタオースを糖供与体として、アセトニトリルの存在下で糖転移反応を行った後、糖転移物を単離し、MS 分析により 1-オクチルセロトリオシドであることを確認した。

論文審査の結果の要旨

セルラーゼはセルロースの β -1,4-グリコシド結合を加水分解する一群の酵素の総称である。近年、セルラーゼは洗剤成分として利用されているが、そのためには界面活性剤やプロテアーゼ等の他の洗剤成分に対する耐性を有することが重要である。著者は、洗剤成分に耐性を有するセルラーゼのスクリーニング、精製、酵素化学的性質の解明、プロテアーゼに対する耐性の実証、その機構の検討を行った。また、本酵素の触媒特性の新たな用途を検討した。

評価すべき点は以下のとおりである。

1. スクリーニングの結果、耐プロテアーゼ活性が極めて高かった*A. niger* IFO31125が生産するセルラーゼを精製、単離し、その諸性質を明らかにした。本酵素が分子内に8.9%のN-グリコシド結合型の糖鎖を含有することを明らかにし、その糖鎖構造を解明した。
2. 本酵素が熱安定性に優れ、洗剤成分である界面活性剤あるいはプロテアーゼに対してもこれまでにない強い耐性を有しており、洗剤用酵素として有用であることを実証した。
3. 本酵素の安定性に対する糖鎖の影響を検討するために、糖鎖を部分的に除いた酵素を調製した。そして、脱糖鎖はpH安定性、熱安定性へ影響を与えないが、プロテアーゼに対する耐性に影響すること、さらにN-グリコシド結合糖鎖の結合部のコアの3糖がこの耐性に強く関与していることを明らかにした。
4. 本酵素の糖鎖が、酵素タンパク質表面の電荷に影響し、表面疎水性を増加させていることを解明した。
5. 本酵素が、セロオリゴ糖をさまざまなn-アルコールに転移する活性を有することを発見し、これによりアルキルセロピオシド、アルキルセロトリオシドを合成した。この結果は、界面活性剤や液晶の新たな素材の合成法を示唆したことになる。

以上のように、本論文において著者は、耐熱性、耐プロテアーゼ性を持つ新規セルラーゼを発見し、その性質を解明するとともに、用途を示したものであり、酵素化学、応用微生物学に寄与するところが大きい。

よって本論文は、博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成11年1月14日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。