The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	好熱菌由来のプルラン加水分解酵素に関する研究
Author(s)	栗木, 隆
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37465
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【26】

氏名・（本籍）	栗（くり）　木（き）　隆（たかし）
学位の種類	工　学　博　士
学位記番号	第　9272　号
学位授与の日付	平成2年6月27日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**好熱菌由来のプルラン加水分解酵素に関する研究**
論文審査委員	（主査）教授 今中 忠行
	教授 大嶋 泰治　教授 山田 靖宙　教授 菅 健一
	教授 二井 将光　教授 高野 光男　教授 吉田 敏臣

論文内容の要旨

本論文は，異なった2種のプルラン加水分解酵素について，生産菌の分離，酵素化学的検討及び遺伝子レベルでの研究を行い，うち1つの酵素についてはタンパク質工学的研究並びにその工業的応用についても検討したものであり，序論，本文6章及び総括からなっている。

序論では糖質関連酵素研究の現況について概観したうえで，プルラン加水分解酵素研究の意義と，本研究の目的を示し，本論文の位置付けを行っている。

第1章では，自然界からネオプルラナーゼを生産する好熱菌を分離し，酵素精製の後，反応特異性を調べて，本酵素が現在までに報告されたプルラン分解酵素のいずれとも異なる新酵素であることを明らかにしている。また，これとは別に耐熱性プルラナーゼを生産する好熱菌も分離し，酵素の精製と諸性質の検討を行っている。

第2章では，プルラン中に存在する構造の直鎖あるいは分岐オリゴ糖に対するネオプルラナーゼの反応を調べている。その結果，本酵素はα-(1→4)-グルコシド結合のみならず，いくつかの分岐オリゴ糖において特定のα-(1→6)-グルコシド結合を加水分解することを明らかにしている。またこれらの結果からネオプルラナーゼがプルランを加水分解する場合の反応様式のモデルを提案し，反応中間体を分析することにより，このモデルが正しいことを確認している。

第3章では，枯草菌を宿主としてネオプルラナーゼ構造遺伝子のクローニングを行い，本酵素遺伝子が枯草菌内で効率良く発現することを明らかにしている。またネオプルラナーゼ構造遺伝子の塩基配列を決定し，コードするアミノ酸配列を明らかにしている。

第4章では，枯草菌を宿主として耐熱性プルラナーゼ構造遺伝子のクローニングを行い，本酵素遺伝子

が枯草菌と大腸菌内で共に発現することを明らかにしている。また耐熱性プルラナーゼ構造遺伝子の塩基配列を決定し，コードするアミノ酸配列を明らかにしている。

第5章では，ネオプルラナーゼのアミノ酸配列上の相同性をα－アミラーゼ等の種々の糖質関連酵素と比較し，タカ－アミラーゼAの立体構造をもとにネオプルラナーゼの触媒活性中心に存在するアミノ酸残基を推定している。それらのアミノ酸残基を部位特異的変異操作により置換し，活性の完全に消失したもの，あるいはα－（1→4）－とα－（1→6）－グルコシド結合の加水分解活性の比率が様々に変化した変異型ネオプルラナーゼを得ている。

第6章では，抗う蝕性のオリゴ糖であるパノースの連続生産システムを開発するための予備的研究としてネオプルラナーゼの固定化を試みている。固定化したネオプルラナーゼは効率よく基質のプルランを加水分解し，反応生成物中のパノースの比率は遊離酵素の場合の約70％から約84％にまで向上したことを示している。

最後に，本研究で明らかとなった結果を総括し，本論文の結論としている。

論文審査の結果の要旨

本論文は工業的に有用な2種類のプルラン加水分解酵素について，生産菌の分離から酵素化学的研究及び遺伝子レベルでの研究を行い，うち1つの酵素についてはタンパク質工学的研究並びに応用面についても検討したものである。主な成果を要約すると以下のとおりである。

(1) プルランを加水分解し，有用オリゴ糖であるパノースを生成する酵素を生産する好熱菌を分離し，さらに本酵素が新酵素であることを示してネオプルラナーゼと命名している。同時に澱粉加工工業において有用な耐熱性プルラナーゼの生産菌も分離している。また，これら2種の酵素の精製を行い諸性質を明らかにしている。

(2) 新酵素ネオプルラナーゼがα－（1→4）－グルコシド結合のみならず，α－（1→6）－グルコシド結合をも加水分解することを示している。また，本酵素がプルランを加水分解しパノース，マルトース及びグルコースを生成する反応様式のモデルを提案し，これが正しいことを立証している。

(3) 枯草菌（*Bacillus subtilis*）を宿主としてネオプルラナーゼ構造遺伝子をクローニングし,遺伝子を単離している。同時に遺伝子増幅効果により本酵素の生産性を元株の約28倍に向上させている。また，本遺伝子の塩基配列を決定し，本酵素の一次構造を明らかにしている。

(4) 枯草菌を宿主として耐熱性プルラナーゼ構造遺伝子をクローニングし，大腸菌（*Escherichia coli*）においても発現させている。また本遺伝子の塩基配列を決定し，本酵素の一次構造を明らかにしている。

(5) ネオプルラナーゼの触媒活性中心部位の解析を行い，本酵素が同一触媒活性中心でα－（1→4）－及びα－（1→6）－グルコシド結合を加水分解することを明らかにしている。また，タンパク質工学的手法により，この両結合の加水分解活性の比率を様々に改変した変異型のネオプルラナーゼを作成している。

(6) ネオプルラナーゼを固定化したカラムを作成し，プルランから，抗う蝕性のオリゴ糖であるパノースの連続生産を試み，これが工業的にも適用可能であることを示している。

以上の結果は，酵素工学の発展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。