

学 位 論 文 題 名

キチンの利用に関する研究

—主として酵素による構成糖およびその誘導体の生産法—

学位論文内容の要旨

キチンは、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）が β -1,4結合した多糖類の一種で、カニ、エビ等の甲殻類、カブトムシ、コオロギ等の昆虫類、その他、シイタケ、菌類等の細胞壁の構成成分として含まれ、植物界におけるセルロースのように生物体の支持や防護の役割を担っている。また、キチンの脱アセチル体であるグルコサミン（GlcN）のポリマーをキトサンと称している。このキチンは、地球上で推定1000億トン／年も生物生産される大きく活用されるべき未利用の天然資源として注目されている。とくに、海洋資源であるカニ、エビ、オキアミ等の甲殻中には、カルシウムやタンパク質とともに主な構成成分として大量に含まれ、また大量に入手し易いことから、その利用が一層期待されている。

そこで、筆者は、キチン、キトサンを加水分解して得られるオリゴ糖や単糖の利用は、未利用の海洋資源としてのキチンの高度利用を達成するうえで極めて重要なことと考え、これらのオリゴ糖であるキチンオリゴ糖、キトサンオリゴ糖および単糖であるN-アセチルグルコサミン、グルコサミンの効率的生産法とその利用について検討した。

まず、キチンオリゴ糖およびキトサンオリゴ糖の酸加水分解法による効率的生産法について検討した。キチンオリゴ糖では、目的とする重合度のオリゴ糖を得るための加水分解条件を明らかにした。また、キチン加水分解液からのオリゴ糖の回収、すなわち中和により副生した塩類の除去を、イオン交換膜電気透析法で試み、従来の活性炭カラムによる方法では達成できなかったGlcNAcの回収を含め、キチンオリゴ糖の大量生産の可能性を示した。さらに、得られたキチンオリゴ糖はさわやかな甘味を有し、また、ビフィズス菌にも利用されることから、新しい食品素材として利用できる可能性を明らかにした。一方、キトサンオリゴ糖では、従来の方法に比べ、使用する塩酸量が少なくしかも飛躍的に短時間でオリゴ糖の生産が行える加水分解条件を見出した。また、キトサンオリゴ糖の分解精製において、予めメタノールに対する溶解性の違いを利用

して、キトサン分解物から不要の GlcN を除去することにより、多量のキトサンオリゴ糖を一度の操作で分離する効率的生産法を開発した。

次に、単糖である GlcNAc および GlcN の酵素的生産法について検討した。GlcNAc においては、酸加水分解によって調製したキチンオリゴ糖を基質とし、*N. orientalis* の生産するキチン分解酵素(キチナーゼおよび β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ)を固定化した担体を充填したバイオリアクターによる連続生産法を開発した。すなわち、タンニン-キトサン担体に酵素を物理吸着させた固定化酵素は、GlcNAc の生産に極めて有効であり、その諸性質および GlcNAc の最適生産条件を明らかにした。さらに、カラムリアクターを用いた連続生産を行い、キチンオリゴ糖から GlcNAc を90%以上の収率で130日間以上連続的に得ることに成功した。この方法は、従来からの化学合成法に代わる新しい GlcNAc 生産法として工業的に利用可能と思われる。また、このようにして生産された GlcNAc は化学合成品でないことから、国内では食品素材として有効に利用できるものである。

一方、GlcN においては、*N. orientalis* の生産する新規酵素エキソ- β -D-グルコサミニダーゼとキトサナーゼの精製を行い、その諸性質を明らかにし、キトサン分解酵素による GlcN の生産法を開発した。従来、キトサンを分解する酵素として多くのキトサナーゼが知られているが、これらの酵素はオリゴ糖を生産する典型的なエンド型酵素であったことから、キトサンから GlcN の生産を達成することができなかった。筆者は、キトサンを加水分解して GlcN を生産する新規酵素エキソ- β -D-グルコサミニダーゼを発見したことにより、GlcN の酵素的生産法を開発することができた。すなわち、キトサン(部分アセチル化キトサン)を分解するためには、エキソ- β -D-グルコサミニダーゼと β -N-アセチルヘキソサミニダーゼの併用が著しく効果的であることを明らかにし、さらに、キトサナーゼを併用することにより、キトサンの完全分解をより速やかに達成できることを明らかにした。このキトサンの酵素による完全分解法は、GlcN の生産のみならず、キトサンの特性を示す重要な指標であるアセチル化度の測定にも応用できると考えられた。

次に、GlcNAc の高度利用を目的とし、GlcNAc 残基を含む有用物質のひとつである N-アセチラクトサミン (NAL) の糖転移反応による酵素合成を試みた。NAL は、ガラクトースと GlcNAc が β -1,4 結合した二糖類で、糖タンパク質および糖脂質の糖鎖中に基本構造として存在する重要な糖質として知られている。従来、NAL は化学合成法もしくは酵素法で調製されている。しかし、化学合成法では種々の保護基の導入など工程が複雑であること、また酵素法では収率が低いことなどの理由で、大量に調製することが困難であった。そこで筆者は、GlcNAc

を受容体基質，ラクトースを供与体基質として，NAL を多量に生成する糖転移活性の高い β - ガラクトシダーゼの検索を市販酵素の中から行い，唯一 NAL を多量に生成する β - ガラクトシダーゼ (*B. circulans* 起源) を見出すことができた。市販酵素のほとんどは，NAL の β - 1, 6 結合異性体である N - アセチルアロラクトサミン (NAAL) を圧倒的に多く生成し，NAL の生成量は少なかった。次に，本酵素を用いて生産した NAL の分離精製法について検討し，活性炭クロマトグラフィーおよびメタノールからの結晶化によって，NAL の結晶品を容易にしかも大量に得られることを示した。また，pH，温度，酵素量，基質量の影響を調べ，NAL の効率的生産条件を明らかにした。一方，NAAL についても効率的生産を試みた。 β - ガラクトシダーゼ (*K. lactis* 起源) を用いて NAAL と少量の NAL を生成した後，NAL を β - ガラクトシダーゼ (*B. circulans* 起源) で選択的に加水分解し，除去する方法を開発した。これは，*B. circulans* 起源の β - ガラクトシダーゼの NAL と NAAL に対する加水分解速度の違い (100 : 2) を利用したものであり，異性体である NAL を含む NAAL の精製を容易に行うことができる優れた方法であった。これらの開発は，従来から大量に生産することが困難で，したがって高価であるため試薬レベルの供給しかできなかったこれらの糖類を，安価に，しかも大量に供給することを可能にするものである。

以上，本研究では，キチンの利用に関し，主として酵素による構成糖およびその誘導体の生産法について検討し，新しい方法を開発するに至った。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	高 間 浩 蔵
副 査	教 授	西 田 清 義
副 査	教 授	新 井 健 一
副 査	教 授	羽田野 六 男
副 査	助教授	鈴 木 鐵 也

キチンは N - アセチルグルコサミンが β - 1, 4 結合した多糖類の一種である。植物界ではある種の菌類の細胞壁構成成分として含有されるが，昆虫類ではタンパク質と結合し，またエビ，カニなどの甲殻類ではタンパク質のほか，大量の炭酸カルシウムとともに存在している。本物質は，

地球上で年間約1,000億トンも生物生産されている未利用天然資源である。キチンの脱アセチル体であるキトサンともども、非溶解性の故に、それらの直接的利用が制限されているのが現状である。したがって、利用途の開発は、専ら部分加水分解物のオリゴ糖に関するものが多く、種々の生理活性について明らかにされつつあるが、それもその殆どが最近になってからである。しかしながら、オリゴ糖あるいは単糖の製造は従来法によっては効率的、かつ大量生産ができるまでには至っていない。本研究は、その点に着目し、オリゴ糖ならびに単糖の効率的生産のための酸加水分解法、および酵素法の開発とその確立を目的としておこなわれた。

本研究の得られた成果について審査員一同が評価した点は、概略以下の通りである。

- 1) 目的とする重合度のオリゴ糖を得るためのキチン酸加水分解好適条件を設定した。
- 2) とくに、酸水解液からのオリゴ糖回収法としてイオン交換膜電気透析法を応用し、従来の活性炭カラム法では達成できなかったN-アセチルグルコサミンの回収を可能にし、合わせてキチンオリゴ糖の大量生産を可能にした。
- 3) キチンオリゴ糖の効率的製造条件を見出し、従来法に比し、塩酸用量が少なく、飛躍的な時間短縮を可能にした。
- 4) キトサンの酸分解物をメタノール処理して単糖（グルコサミン）を分別することで多量のオリゴ糖を一度の操作で分解できる効率的生産法を確立した。
- 5) *Nocardia orientalis* 起源キチナーゼのタンニン-キトサン固定化物がキトサンオリゴ糖を出発物質とするN-アセチルグルコサミン製造に有効であることを見出し、いわゆる化学的合成品でない製品の新しい生産システムを提案した。本システムにより、キチンオリゴ糖から90%以上の収率で、N-アセチルグルコサミンを130日間以上にわたる連続生産に成功した。
- 6) *N. orientalis* 起源エキソ- β -D-グルコサミニダーゼの発見によりキトサナーゼ作用との併用でキトサンの酵素的完全分解を可能にし、その方法を確立した。すなわち、キトサン（部分アセチル化キトサン）をエキソ- β -D-グルコサミニダーゼとエキソ-N-アセチルヘキソサミニダーゼの併用で効率よく分解し、さらにキトサナーゼを作用させることにより、速やかなキトサンの完全分解が達成されることを明らかにした。
- 7) N-アセチルグルコサミンとラクトースから生化学的に極めて興味あるN-アセチルラクトサミンの生成に関与する糖転移活性の高い β -ガラクトシダーゼを市販酵素からの検索を行い、*Bacillus circulans* 起源の酵素に見出した。N-アセチルラクトコサミンは、従来、化学合成法のほか酵素法によっても製造されていたが、前者では種々の保護基の導入など複雑な工程を要し、後者では収率が悪いなど大量調製は困難な状態であった。

8) N-アセチルラクトサミン (β -1,4結合) の異性体であるN-アセチルアロラクトサミン (β -1,6結合) の大量生産法として, *Kluyveromyces lactis* および *B. circulans* 起源の β -ガラクトシダーゼ併用法を開発した。すなわち, 前者の酵素によりN-アセチルアロラクトサミンを主要生成物とする分解物を得, 少量混在するN-アセチルラクトサミンを後者の酵素で分解除去する方法である。

以上の成果は, 従来, 高純度でしかも大量に生産することが困難であるため高価となり, 主として試薬としての供給に限られていたキチン, キトサンのオリゴ糖や単糖, さらにはN-アセチルラクトサミンやその異性体のN-アセチルアロラクトサミンの効率的製造法を開発・確立したことにより, 試薬レベルのみならず, 食品, とりわけ生体機能の維持・向上に係わる食品素材としての活用に道をひらいた点でその意義は極めて大きい。

よって, 博士(水産学)の学位を授与されるに値するものと判定した。