

学 位 論 文 題 名

キトサナーゼの精製と、キトオリゴ糖の調製  
および利用に関する研究

学位論文内容の要旨

キチンは、*N*-アセチル-D-グルコサミン（2-acetoamido-2-deoxy-D-glucose, GlcNAc）が $\beta$ -1, 4-結合によって重合した多糖であり、甲殻類の殻、昆虫類の表皮、菌類の菌糸の細胞壁などに広くみられる。キトサンは、キチンを脱アセチル化して得られるD-グルコサミン（2-amino-2-deoxy-D-glucose, GlcN）の重合体であるが、自然界の分布はきわめて少ない。キチンは、生物が生産する物質の中でセルロースに次いで広く地球上に分布し、年間数十億トン生合成されると推定されているが、現在、その大部分は未利用であり、わずかにキトサンに変換されて利用されているに過ぎない。未利用資源であるキチン、キトサンの有効利用を目的として、最近種々の分野で活発に研究が行なわれている。キトオリゴ糖および*N*-アセチルキトオリゴ糖は種々の生理活性をもつことが報告され、キチン、キトサンの高度利用の観点から注目されている。これらのオリゴ糖は、一般にキチンおよびキトサンの酸加水分解により調製されているが、この方法には生理活性をもつ重合度4以上のオリゴ糖の収率が著しく低く、同時に多量の単糖を生成するという欠点がある。この欠点を改善する方法として酵素分解法が考えられるが、キトサナーゼによるキトサンからのオリゴ糖の生成、その分解様式についてはほとんど明らかにされていない。このような観点から、本研究は、強力なキトサナーゼ生産菌の探索、そのキトサナーゼを利用したキチン、キトサンの有効利用を意図してなされたものである。研究の結果は以下のように要約される。

1. キトサナーゼ生産菌を土壌中から探索して *Bacillus* sp. No. 7-M株を分離した。その培養濾液からキトサナーゼをCM-セファデックスC-50クロマトグラフィーおよびファデックスG-100ゲル濾過により電気泳動的に均一な標品にまで精製した。本酵素（分子量、41,000；至適pH、6.0）は、これまで報告された *Bacillus* 属由来のキトサナーゼと異なり、キトサナーゼ活性と同時にCMCase活性をも示した。本酵素によるキトサンの分解様式はエンド型であり、酵素分解によって  $(\text{GlcN})_2 \sim (\text{GlcN})_8$  などのキトオリゴ糖が生成し、GlcNは

ほとんど生成されないことを明らかにした。

2. 本キトサナーゼの部分*N*-アセチル化キトサンに対する作用様式を検討した。本酵素による部分*N*-アセチル化キトサンの分解はキトサンの脱アセチル化度によって大きく影響された。すなわち、完全脱アセチルキトサンは本酵素により分解されてオリゴ糖のみを生成したが、脱アセチル化度が低下するに従い、未分解の高分子画分が残存した。さらに、脱アセチル化度76%の部分*N*-アセチル化キトサンのキトサナーゼ分解物をバイオゲルP-2を用いて分離し、得られたオリゴ糖の化学構造をエキソ-β-D-グルコサミニダーゼ分解、FAB マススペクトル法および<sup>1</sup>H-NMR スペクトル法により決定した。その結果、(GlcN)<sub>2</sub>、(GlcN)<sub>3</sub>および(GlcN)<sub>4</sub>とともにヘテロキトオリゴ糖 GlcN-GlcNAc-(GlcN)<sub>3</sub>、(GlcN)<sub>2</sub>-GlcNAc-(GlcN)<sub>2</sub>、GlcN-GlcNAc-(GlcN)<sub>4</sub>および (GlcN)<sub>2</sub>-GlcNAc-(GlcN)<sub>3</sub>の生成が確認された。これらのオリゴ糖の還元末端および非還元末端すべて GlcN であることから、本酵素はキトサン分子の GlcN - GlcN 結合を特異的に切断することが明らかになった。従来の報告では、キチナーゼはいずれも部分*N*-アセチル化キトサン分子中の*N*-アセチル-β-グルコサミニド結合を切断することから、本キトサナーゼは、部分*N*-アセチル化キトサンに対する作用様式においてキチナーゼと異なることが明らかとなった。

3. キトサンを本キトサナーゼにより分解してキトオリゴ糖を調製した。すなわち、本酵素によるキトサン分解物を AG50W-X 8 を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより分解し、キトオリゴ糖 (GlcN)<sub>2</sub> ~ (GlcN)<sub>5</sub> を調製した。キトオリゴ糖の収率は原料キトサンに対して (GlcN)<sub>2</sub>, 10.5%; (GlcN)<sub>3</sub>, 31.7%; (GlcN)<sub>4</sub>, 24.1%; (GlcN)<sub>5</sub>, 9.1%であった。その結果、酵素分解法は酸加水分解法と比較して (GlcN)<sub>4</sub>以上の高重合度のキトオリゴ糖の収率が高く、GlcN の生成が微量であり、キトオリゴ糖の調製法として優れていることが明らかになった。さらに、キトオリゴ糖のイオン交換クロマトグラフィーを用いた製造について検討した。100 g のキトサン酵素分解物をイオン交換樹脂 AG50W-X 2 により分離し、(GlcN)<sub>2</sub> ~ (GlcN)<sub>7</sub> を調製した。キトオリゴ糖の収率は、原料キトサンから、(GlcN)<sub>2</sub>, 0.5%; (GlcN)<sub>3</sub>, 5.4%, (GlcN)<sub>4</sub>, 10.2%; (GlcN)<sub>5</sub>, 11.5%; (GlcN)<sub>6</sub>, 11.0%, (GlcN)<sub>7</sub>, 8.9%であった。その結果、キトオリゴ糖をキトサナーゼを用いて効率よく調製する方法が確立された。

4. キトオリゴ糖は不安定で保存中に着色するため、キトオリゴ糖の利用においては、着色を防止することが重要であると考えられる。ルテニウム触媒を用いてキトオリゴ糖 (GlcN)<sub>2</sub> ~ (GlcN)<sub>6</sub> の接触還元を行い、生成物を FAB マススペクトル法および<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C-

NMR スペクトル法を用いて同定した結果、還元末端が完全に還元されたキトオリゴ糖アルジトールであることが確認された。溶液の加熱試験の結果、得られたキトオリゴ糖アルジトールは、キトオリゴ糖と比較して着色しにくいことが明らかになった。

5. 10% *N*-アセチル化キトサンを本キトサナーゼで分解後、生成物をバイオゲル P-2 および P-4 を用いたゲル濾過により分離し、得られたオリゴ糖を *N*-アセチル化して *N*-アセチルキトオリゴ糖 (GlcNAc)<sub>2</sub> ~ (GlcNAc)<sub>7</sub> を調製した。10% *N*-アセチル化キトサンから *N*-アセチルキトオリゴ糖の収量は、(GlcNAc)<sub>2</sub>, 5.2% ; (GlcNAc)<sub>3</sub>, 23.4% ; (GlcNAc)<sub>4</sub>, 14.0% , (GlcNAc)<sub>5</sub>, 8.2% ; (GlcNAc)<sub>6</sub>, 12.0% ; (GlcNAc)<sub>7</sub>, 9.0% であった。酵素分解法は酸分解法と比較して (GlcNAc)<sub>5</sub> 以上の高重合度の *N*-アセチルキトオリゴ糖の収率が高く、この方法は *N*-アセチルキトオリゴ糖の調製法として優れていることが明らかになった。
6. キトサン、酵素部分分解キトサンおよびキトオリゴ糖の細菌増殖に及ぼす作用を調べた。キトサンは0.02%の濃度で *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* および *S. aureus* の増殖を阻害した。さらに、細菌増殖抑制作用は GlcN の重合度が大きく影響された。すなわち、酵素部分分解キトサン (8~40mg還元糖/gキトサン) が最も強力であり、キトサンの分解が進むに従って細菌増殖の抑制作用は弱くなった。また、キトサンは酵素部分分解キトサンよりもその作用がわずかに弱く、キトオリゴ糖はほとんど細菌増殖抑制作用を示さなかった。
7. ラットのコレステロール吸収に及ぼす種々の粘度のキトサンとキトオリゴ糖の影響を調べた。高コレステロール食を用いて飼育したラットに対して、キトサンは2%の添加で、低粘度のものから高粘度のものまで、いずれも強い降コレステロール作用を示した。しかし、キトオリゴ糖の降コレステロール作用は認められなかった。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 千 葉 誠 哉  
副 査 教 授 富 田 房 男  
副 査 教 授 本 間 守

本論文は、和文129頁、図36、表11、9章からなり、ほかに参考論文16篇が付されている。

キチンは、*N*-アセチル-D-グルコサミン (2-acetoamido-2-deoxy-D-glucose, GlcNAc) が $\beta$ -1, 4-結合によって重合した多糖であり、甲殻類の殻、昆虫類の表皮、菌類の菌糸の細胞壁などに広くみられる。キトサンは、キチンを脱アセチル化して得られるD-グルコサミン (2-amino-2-deoxy-D-glucose, GlcN) 重合体であるが、自然界の分布はきわめて少ない。キチンは、生物が生産する物質の中でセルロースに次いで広く地球上に分布し、年間数十億トン生合成されると推定されているが、現在、その大部分は未利用であり、わずかにキトサンに変換されて利用されているに過ぎない。近年、キチンあるいはキトサンから得られたオリゴ糖が免疫賦活活性、抗菌活性、エリシター活性などの生理活性をもつことが報告され、それらのオリゴ糖の製造法の確立が望まれている。

本研究は、未利用資源としてのキチン及びキトサンの有効利用を意図してなされたものである。研究の結果は以下のように要約される。

1. キトサナーゼ生産菌 (*Bacillus* sp. 7-M株) を土壌中から分離し、その培養濾液からキトサナーゼを各種のクロマトグラフィーによる電気泳動的に均一な標品にまで精製した。本酵素 (分子量, 41000; 至適 pH, 6.0) は、キトサンから主にキトオリゴ糖 (GlcN)<sub>2</sub> ~ (GlcN)<sub>6</sub> を生成し、単糖の GlcN の生成はきわめて少ない新しいタイプのキトサナーゼであることを明らかにした。
2. 本酵素の作用様式を検討するため、部分*N*-アセチル化キトサン (脱アセチル化度, 76%) に作用させ、生成オリゴ糖をゲル濾過により分離した。それらのオリゴ糖の構造をエキソ- $\beta$ -D-グルコサミニダーゼ分解、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルおよび FAB マススペクトル測定等により解析した結果、その還元末端および非還元末端はすべて GlcN であり本酵素が、GlcNAc-GlcN あるいは GlcNAc-GlcNAc 結合を切断するキチナーゼとは異なり、GlcN-GlcN 結合のみを特異的に切断する酵素であることを明らかにした。
3. 本酵素によりキトサンを加水分解し、(GlcN)<sub>2</sub> ~ (GlcN)<sub>5</sub> を分離した。その収率は、

(GlcN)<sub>2</sub>, 10.5% ; (GlcN)<sub>3</sub>, 31.7% ; (GlcN)<sub>4</sub>; 24.1% ; (GlcN)<sub>5</sub>, 9.1%であり, GlcNが多量に生成する酸分解法に比較して (GlcN)<sub>4</sub>以上のキトオリゴ糖の収率が高いことを示し, キトオリゴ糖の酵素的製造法を確立した。

4. 保存中のキトオリゴ糖の着色防止法を検討した結果, 還元末端をルテニウム接触還元により還元しキトオリゴ糖アルジトールに導くことが着色防止に効果的であることを示した。
5. 本酵素により部分*N*-アセチル化キトサン (アセチル化度, 10%) を分解後, 分離したオリゴ糖を*N*-アセチル化して*N*-アセチルキトオリゴ糖 (GlcNAc)<sub>2</sub>~(GlcNAc)<sub>7</sub>を調製した。キトサンからの収率は, (GlcNAc)<sub>2</sub>, 5.2% ; (GlcNAc)<sub>3</sub>, 23.4% ; (GlcNAc)<sub>4</sub>, 14.0% ; (GlcNAc)<sub>5</sub>, 8.2% ; (GlcNAc)<sub>6</sub>, 12.0% ; (GlcNAc)<sub>7</sub>, 9.0%であり, GlcNAcが多量に生成するキチンの酸分解法に比較して (GlcNAc)<sub>5</sub>以上のオリゴ糖の収率が高く, 本酵素分解法が*N*-アセチルキトオリゴ糖の調製法として優れていることを示した。
6. キトサン, キトサンの酵素部分分解生成物およびキトオリゴ糖の有効利用の一環として, 細菌増殖に及ぼす効果を検討した。キトサンは0.02%において *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* および *S. aureus* の増殖を完全に阻害した (4日間)。キトサンの部分分解生成物 (8~40mg還元末端/gキトサン) は, キトサンよりも細菌増殖抑制効果が強くキトサンと共に食品保存剤としての可能性を示唆した。キトサンの分解が進むに従ってその抑制効果は減少し, (GlcN)<sub>4</sub>以下のキトオリゴ糖では抑制効果が認められないことを明らかにした。また, キトサン2%添加の高コレステロール食を用いてラットを飼育した際に, 強い降コレステロール効果のあることを認めた。

以上のように本研究は, キチン, キトサンの有効利用を意図して, キトサン分解酵素の分離精製とその作用様式の解析, キトオリゴ糖および*N*-アセチルオリゴ糖の製造法の開発を行った。それらの成果は, 学術上のみならず産業上においても寄与するところ大きいと評価される。

よって審査員一同は, 別に行った学力確認試験の結果と併せて, 本論文の提出者井爪正人は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格があるものと認定した。