

博士（農学） 荒 勝 俊

学位論文題名

洗剤用アミラーゼの研究

学位論文内容の要旨

世界的傾向として洗剤は、環境と安全性に対する配慮から、酵素を配合して比較的穏やかな条件で洗浄するマイルドな組成の洗剤が望まれている。しかし一般に洗剤に使用される酵素は、洗剤中での保存時のpH、温度条件下で安定であり、且つ洗浄剤成分で阻害される事なく、充分にその特性を発揮できるものが望まれているが、そのような特性を有する酵素は未だ少ないので現状である。一方、近年我々は、枝切り酵素とアミラーゼを併用する事で洗浄性能を飛躍的に向上させる事を初めて見い出した。

本研究では、この様な背景の中で、

1. 洗剤用としての特性を満たすブルラナーゼ、アミロブルラナーゼ（双頭酵素）、イソアミラーゼ、液化型及び糖化型 α -アミラーゼを生産する各種*Bacillus*属細菌を自然界から分離した。
2. 突然変異によりアルカリアミロブルラナーゼ及びアルカリ液化型 α -アミラーゼの生産性の向上を図った。
3. 各酵素の精製を行い、物理化学的、酵素学的特性を明らかにして、これらを他酵素と比較した。
4. アルカリアミロブルラナーゼの活性中心部位を酵素速度論的手法、限定分解による解析手法、電子顕微鏡による構造解析及びX線小角散乱法による手法により解析した。
5. アルカリアミロブルラナーゼ及びアルカリ液化型 α -アミラーゼの遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定して、酵素の構造を推定した。
6. 遺伝子構造及び酵素構造を他起源の遺伝子・酵素と比較した。

本研究によって、新規なブルラナーゼ、アミロブルラナーゼ、イソアミラーゼ、液化型及び糖化型 α -アミラーゼ生産性*Bacillus*属細菌を見い出し、その酵素特性や遺伝子及び酵素の構造を明らかにすると共に、酵素生産性の向上を果たして、*Bacillus*属の澱粉加水分解酵素の酵素学及び遺伝子工学の発展に寄与した。

本研究の結果を要約すると、

1. 洗剤用としての特性を満たす各種アミラーゼを生産する各種*Bacillus*属細菌の探索を行い、*B. fermus*に近縁の好アルカリ性KSM-1378株、*B. circulans*に近縁の好アルカリ性KSM-1876株、好アルカリ性KSM-3309株及び*B. megaterium*に近縁の好アルカリ性SAA-111株を自然界から分離した。
2. 好アルカリ性*Bacillus* sp. KSM-1378株の生産するアルカリアミロブルラナーゼを精製し、その諸性質を明らかにした結果、分子量約21万の巨大蛋白で α -アミラーゼ及びブルラナーゼ活性共にアルカリ側に至適pHを有する事が判った。
3. アルカリアミロブルラナーゼの酵素反応速度論的解析手法による活性中心の解析の結果、本酵素は一蛋白で二つの活性部位を有するモデルに完全に一致する事を明らかにした。更に限定分解プロテアーゼにより本酵素を分解したところ、 α -アミラーゼ活性

フラグメントとブルラナーゼ活性フラグメントに分かれた事から、二つの活性部位を有する双頭酵素である事が判った。

4. アルカリアミロプルラナーゼの構造を明らかにする為、低角度回転白金蒸着法を用いて試料を調製後、透過型電子顕微鏡により解析したところ、二つの活性ドメインが連結部位で結合し、カスタネット状を呈している事を明らかにした。更にX線小角散乱法による測定データをフーリエ変換後ギニエプロットし、その傾きから慣性半径を求めた結果、液体中で球状に近い形を呈しており、半径が122Åの蛋白である事が明らかになった。

5. アルカリアミロプルラナーゼ遺伝子の解析を行った結果、N末端側に α -アミラーゼ、C末端側にブルラナーゼ活性ドメインが存在し、それぞれの構造遺伝子上にアミラーゼファミリーの活性中心に存在する特有の共通配列が認められ、両ドメインは連結部位によって結合している事が明らかとなった。

6. 好アルカリ性*Bacillus sp.* KSM-1876株の生産するアルカリプルラナーゼを精製し、その諸性質を明らかにした。本酵素はpHを10~11と高アルカリ領域に至適を有する事が明らかになった。また、阻害剤の検討の結果から、本酵素の活性中心にはトリプトファン残基が関与している事が明らかとなった。更に今までに唯一知られているアルカリプルラナーゼはグリコーゲンに対して分解活性を有しているが、本酵素はプルランのみを唯一分解する酵素である事が明らかになった。

7. 好アルカリ性*Bacillus sp.* KSM-3309株の生産する新規アルカリイソアミラーゼを精製し、その諸性質を明らかにした。本酵素はグリコーゲンの α -1,6グルコシド結合だけを特異的に分解し、プルランには殆ど作用しない事が判った。

8. 好アルカリ性*Bacillus sp.* KSM-1378株の生産する液化型 α -アミラーゼを精製し、その諸性質を明らかにしたところ、アルカリに至適を有し、分子量約5万5千で高い等電点を有する酵素である事が判った。また本酵素のN末端アミノ酸配列の解析結果から液化型特有の共通配列が存在した。更に各種マルトオリゴ糖に対する基質特異性を調べた結果、G7以上のオリゴ糖のみを分解する事が明らかとなった。

9. 液化型アルカリ α -アミラーゼを大量に生産する事を目的に変異・育種を行い、野性株に比較して約150倍生産性を向上させる事に成功し、更にパイロットスケールでの生産も可能となった。

10. 液化型アルカリ α -アミラーゼ遺伝子のクローニングを行い、遺伝子の全塩基配列を決定し解析を行った結果、構造遺伝子上にアミラーゼファミリーの活性中心に存在する特有の共通配列が認められ、更にN末端側アミノ酸配列に液化型 α -アミラーゼ特有の配列が存在する事を見い出した。

11. 好アルカリ性*Bacillus sp.* SAA-111株の生産する糖化型アルカリ α -アミラーゼを精製し、その諸性質を明らかにした。本酵素はアルカリ側に高い安定性を有し、pH12でも約50%以上の残存活性を有した。更に澱粉分解率は約55%の分解性を示し、糖化型のアルカリ α -アミラーゼである事が判った。

12. 好アルカリ性*Bacillus sp.* KSM-1378株の生産するアルカリ耐性ネオプルラナーゼをコードする遺伝子の解析を行ったところ、*Bacillus stearothermophilus*のネオプルナーゼ遺伝子と高い相同性を有する事を確認した。また本遺伝子の翻訳領域の上流にはシグマAタイプのプロモーター領域が存在し、更にカタボライト制御のオペレーターと思われる配列も認めた。

13. 取得酵素の洗浄試験を行ったところ、枝切り酵素は皿等にこびりついた汚れの除去に、また繊維にこびりついた汚れは液化型 α -アミラーゼが高い性能を有する事が判った。

以上、自然界より各種のアルカリ領域に至適を持つアミラーゼを生産する*Bacillus* 属細菌を分離し、突然変異法による酵素生産量の増大を図った。また、各澱粉加水分解酵素の精製及び遺伝子のクローニングを行い、酵素特性、遺伝子及び酵素構造を明らかにした。

学位論文審査の要旨

主査教授 富田房男
副査教授 千葉誠哉
副査教授 本間守

学位論文題名

洗剤用アミラーゼの研究

本論文は、和文245頁、図114、表112、引用文献201、12章からなり、ほかに参考論文12編が付されている。

世界的に環境と安全性に対する配慮から、酵素を配合して比較的穏やかな条件で洗浄するマイルドな洗剤が望まれているが、洗浄剤成分で阻害される事なく、充分にその特性を発揮できる酵素は少なく、その開発が望まれていた。

本研究では、洗剤用新規アミラーゼ生産菌を分離し生産性向上を図ると共に、その酵素特性や遺伝子及び酵素の構造を明らかにする事で、アミラーゼの酵素学及び遺伝子工学の発展に寄与した。

第一章では、洗剤の歴史及び各種アミラーゼ酵素特性及び遺伝子の解析に関する研究史について述べている。

第二章では、アミロプルラナーゼを生産する*Bacillus*属細菌の探索を行い、下記の内容が含まれている。

1. 自然界から洗剤用アミロプルラナーゼ生産菌の探索を行い、*B. fermus*に近縁の好アルカリ性KSM-1378株を分離した。
2. 本酵素を精製し、その諸性質を明らかにした結果、分子量約210,000で両活性共にアルカリ側に至適pHを有した。
3. 本酵素の反応速度論的手法及び限定分解プロテアーゼによる解析から、一蛋白で二つの活性部位を有する事を明らかにした。
4. 本酵素の構造を透過型電子顕微鏡で解析した結果、二つの活性ドメインが連結部位でカスタネット状に結合していた。更にX線小角散乱法から、半径が122Åの蛋白であった。

第三章では、*Bacillus*属細菌のアルカリアミロプルラナーゼ遺伝子のクローニングとその解析を行い、下記の内容が含まれている。

N末端側にアミラーゼ、C末端側にプルラナーゼ活性ドメインが存在し、両ドメインは連結部位により結合していた。

第四章では、アルカリプルラナーゼを生産する*Bacillus*属細菌の探索を行い、下記の内容が含まれている。

1. 自然界から洗剤用プルラナーゼ生産菌の探索を行い、*B. circulans*に近縁の好アルカリ性KSM-1876株を分離した。

2. 本酵素を精製し、その諸性質を明らかにした結果、高アルカリ領域に至適を有し、阻害剤の検討から活性中心にトリプトファン残基が関与していた。

第五章では、アルカリイソアミラーゼを生産する*Bacillus*属細菌の探索を行い、下記の内容が含まれている。

1. 自然界から洗剤用イソアミラーゼ生産菌の探索を行い、*B. circulans*に近縁の好アルカリ性KSM-3309株を分離した。

2. 本酵素を精製し、その諸性質を解析した結果、グリコーゲンの α -1,6グルコシド結合だけを特異的に分解した。

第六章では、アルカリ液化型 α -アミラーゼを生産する*Bacillus*属細菌の探索を行い、下記の内容が含まれている。

Bacillus sp. KSM-1378株の生産する液化型 α -アミラーゼを精製し、その諸性質を解析した結果、アルカリに至適を有し、分子量約55,000で高い等電点を有し、N末端側に液化型特有の共通配列を確認した。

第七章では、アルカリ液化型 α -アミラーゼを生産する*Bacillus*属細菌の育種を行い、下記の内容が含まれている。

本酵素を大量に生産する事を目的に変異・育種を行い、野性株に比較して約150倍生産性を向上させた。

第八章では、*Bacillus*属細菌のアルカリ液化型 α -アミラーゼ遺伝子のクローニングとその解析について下記の内容が述べられている。本酵素遺伝子のクローニングを行い、全塩基配列を決定し解析を行った結果、N末端側に液化型 α -アミラーゼ特有の配列を確認した。

第九章は、アルカリ糖化型 α -アミラーゼを生産する*Bacillus*属細菌の探索を行い、下記の内容が含まれている。

Bacillus sp. SAA-111株の生産する糖化型 α -アミラーゼを精製し、その諸性質を解析した結果、高アルカリ側に至適を有し、澱粉分解率は約55%であった。

第十章では、*Bacillus*属細菌のネオプルラナーゼ遺伝子のクローニングとその解析について下記の内容が述べられている。

Bacillus sp. KSM-1378株の生産するネオプルラナーゼ遺伝子の解析を行った結果、*B. stearothermophilus*の遺伝子と高い相同意を有した。

第十一章及び第十二章には、総括及び参考文献が付されている。

以上、自然界より各種アルカリアミラーゼ生産菌を分離し、突然変異法による酵素生産性の向上、更に精製及び遺伝子のクローニングを行い、アミラーゼ研究に関して基礎的及び産業的な貢献を果たした。

よって、審査員一同は別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者荒 勝俊は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。