

学 位 論 文 題 名

Studies on α -Glucosidase from
Alkalophilic *Bacillus* sp. HM00127(アルカリ *Bacillus* sp. HM00127 由来 α -Glucosidase に関する研究)

学位論文内容の要旨

α -グルコシダーゼ [EC 3.2.1.20, α -D-glucoside glucohydrolase] は、 α -グルコシド結合をもつ種々の基質に作用し、非還元末端から α -グルコースを遊離する典型的なエキソ型酵素である。Henrisat のグリコシドヒドロラーゼの分類にしたがうと、family 13 と family 31 に分けられる。

この酵素は、微生物、植物、動物のいずれにも広く存在し、基質特異性が広いのが特徴である。一般に、 α -グルコシダーゼはまた酸性 α -グルコシダーゼ（至適 pH 4~5）と中性 α -グルコシダーゼ（至適 pH 6~7）に2大別することも可能である。植物の α -グルコシダーゼは酸性域に至適をもち、動物や微生物の酵素は両者で作用することが知られている。それぞれにおける活性発現のための必須解離基の同定が速度論的方法や特異的化学修飾法、部位特異的変異法などで調べられている。

今日、アルカリ領域で作用する種々の加水分解酵素が報告され、各種の洗剤などにおいてそれらが利用されている。しかし、アルカリ側において高い活性を示す α -グルコシダーゼの報告やその利用はまだない。本研究では、アルカリ培地で生育する *Bacillus* sp. HM 00127 菌株の産生する α -グルコシダーゼについて、電気泳動レベルで単一に精製しその各種酵素化学的性質を調べた。

グラム陽性の鞭毛をもつ好気性桿菌 *Bacillus* sp. HM 00127 は研究室で分離されたものを用いた。30℃における培養の最適 pH は 9.65 であった。培養液から、硫酸分画、DEAE-Sepharose CL-6B、Bio-HTP (Hydroxylapatite)、Bio-Gel P-100 の各クロマトグラフィー、調製用電気泳動、Mono-Q (FPLC) を経て、単一に α -グルコシダーゼ精製した。*p*-ニトロフェニル α -グルコシド (*p*NPG) の水解でみた精製度および回収率は、125 (pH 8.3) ~149 (pH 6.4)

倍、17.3 (pH 8.3) ~20.6% (pH 6.4) であった。SDS-電気泳動法による分子量は 63,000 であった。

pNPG とマルトースを用いて幾つかの性質を調べた。pNPG を基質とした場合、6.4 と 8.3 で作用至適のピークが見られ、至適温度は 43℃、pH に関しては 5.5~9.0 の範囲で、温度については 40℃まで安定であった。一方、マルトースを基質とした場合には、至適 pH は 6.4、至適温度は 43℃、pH に関しては 5.5~7.7 の範囲で、温度については 43℃まで安定であった。各種の金属イオン、EDTA、DTT、PMSF などによる両基質に対する加水分解作用の影響も調べた。 Fe^{2+} や Zn^{2+} は両基質の水解反応を強く阻害した。EDTA と PMSF は pNPG の水解を、DTT はマルトースの水解反応を特に阻害した。 α -グルコシダーゼの pNPG (pH 8.3)、マルトース (pH 6.4) およびイソマルトース (pH 6.4) に対する速度パラメーターは、 K_m がそれぞれ 0.34 mM、11.8 mM、4.1 mM、 V_{max} はそれぞれ 39.6 $\mu\text{mole/mg/min}$ 、115 $\mu\text{mole/mg/min}$ 、71.1 $\mu\text{mole/mg/min}$ であった。pNPG の加水分解におけるマルトースの存在の影響を調べた。PH 6.4 ではマルトースの濃度に比例して阻害が大きかったが、pH 8.3 ではほとんど阻害が認められなかった。このことは pH 6.4 と pH 8.3 における pNPG の水解の様式が異なることを示唆している。PH 6.4 における阻害様式は典型的な拮抗型であった。30 mM のスクロース、ツラノース、トリスなどの存在下における pNPG 水解活性を調べた。いずれの場合にも pH 6.4 の活性はほとんど影響を受けず、pH 8.3 の水解活性のみが影響を受けた。

以上をまとめると、アルカリ *Bacillus* sp. HM00127 菌株より、中性およびアルカリ性で pNPG 加水分解活性を示す α -グルコシダーゼを単一に精製した。これまでに報告のある α -グルコシダーゼでは最もアルカリ側で作用至適 pH を示した。中性領域 (pH 6.4) では、マルトースやイソマルトースにも水解作用を示した。アルカリ領域 (pH 8.3) における活性は、スクロース、ツラノースおよびトリスなどで特徴的に阻害された。本酵素は、至適 pH 8.3 の特徴から、アルカリ α -グルコシダーゼと呼ぶことができる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	松井博和
副査	教授	浅野行蔵
副査	教授	木村淳夫
副査	教授	横田篤

学位論文題名

Studies on α -Glucosidase from Alkalophilic *Bacillus* sp. HM00127

(アルカリ *Bacillus* sp. HM00127 由来 α -Glucosidase に関する研究)

α -グルコシダーゼ [EC 3.2.1.20, α -D-glucoside glucohydrolase] は、 α -グルコシド結合をもつ種々の基質に作用し、非還元末端から α -グルコースを遊離する典型的なエキソ型酵素である。Henrisat のグリコシドヒドロラーゼの分類にしたがうと、family 13 と family 31 に分けられ、前者はいわゆる α -アミラーゼファミリーの一員として知られている。

この酵素は、微生物、植物、動物のいずれにも広く存在し、基質特異性が広いことからこれに基づいて幾つかのグループに分けられる。また、 α -グルコシダーゼは酸性 α -グルコシダーゼ（至適 pH 4~5）と中性 α -グルコシダーゼ（至適 pH 6~7）に 2 大別することも可能である。

今日、アルカリ領域で作用する種々の加水分解酵素が報告され、各種の洗剤などにおいてそれらが利用されている。しかし、アルカリ側において高い活性を示す α -グルコシダーゼの報告やその利用はまだない。本研究では、アルカリ培地で生育する *Bacillus* sp. HM 00127 菌株の産生する α -グルコシダーゼについて、電気泳動レベルで単一に精製し、一般的性質のほか、速度論的基質特異性、各種阻害剤による影響など、種々の酵素化学的性質を調べた。

グラム陽性の鞭毛をもつ好気性桿菌 *Bacillus* sp. HM 00127 は研究室で分離されたものを用いた。30℃における培養の最適 pH は 9.65 であった。培養液から、硫酸分画、DEAE-Sepharose CL-6B、Bio-HTP (Hydroxylapatite)、Bio-Gel P-100 の各クロマトグラフィー、調製用電気泳動および Mono-Q (FPLC) を経て、電気泳動的に単一レベルに α -グルコシダーゼ精製した。*p*-ニトロフェニル α -グルコシド (*p*NPG) の水解でみた精製度および回収率は、125 (pH 3.3) ~ 149 (pH 5.4) 倍、

17.3 (pH 8.3) ~20.6% (pH 6.4) であった。 SDS-電気泳動法による分子量は 63,000 であった。

pNPG とマルトースを用いて幾つかの性質を調べた。pNPG を基質とした場合、6.4 と 8.3 で作用至適のピークが見られ、至適温度は 43℃、pH に関しては 5.5 ~ 9.0 の範囲で、温度については 40℃ まで安定であった。pH 8.3 のアルカリ領域で作用最大を示す α -グルコシダーゼの最初の発見である。マルトースを基質とした場合には、至適 pH は 6.4、至適温度は 43℃、pH に関しては 5.5 ~ 7.7 の範囲で、温度については 43℃ まで安定であった。各種の金属イオン、EDTA、DTT、PMSF などによる両基質に対する加水分解作用の影響も調べた。Fe²⁺ や Zn²⁺ は両基質の水解反応を強く阻害した。EDTA と PMSF は pNPG の水解を、DTT はマルトースの水解反応を特に阻害した。 α -グルコシダーゼの pNPG (pH 8.3)、マルトース (pH 6.4) およびイソマルトース (pH 6.4) に対する速度パラメーターは、Km がそれぞれ 0.34 mM、11.8 mM、4.1 mM、Vmax はそれぞれ 39.6 μ mole/mg/min、14.6 μ mole/mg/min、71.1 μ mole/mg/min であった。pNPG の加水分解におけるマルトースの存在の影響を調べた。pH 6.4 ではマルトースの濃度に比例して阻害が大きかったが、pH 8.3 ではほとんど阻害が認められなかった。このことは pH 6.4 と pH 8.3 における pNPG の水解の様式が異なることを示唆している。pH 6.4 における阻害様式は典型的な拮抗型であった。30 mM のスクロース、ツラノース、トリリスなどの存在下における pNPG 水解活性を調べた。いずれの場合にも pH 6.4 の活性はほとんど影響を受けず、pH 8.3 の水解活性のみが影響を受けた。

以上のように、アルカリ *Bacillus* sp. HM00127 菌株より、中性およびアルカリ性で pNPG 加水分解活性を示す α -グルコシダーゼを単一に精製した。これまでに報告のある α -グルコシダーゼでは最もアルカリ側で作用至適 pH を示した。中性領域 (pH 6.4) では、マルトースやイソマルトースにも水解作用を示した。アルカリ領域 (pH 8.3) における活性は、スクロース、ツラノースおよびトリリスなどで特徴的に阻害された。本酵素は、至適 pH 8.3 の特徴から、アルカリ α -グルコシダーゼと呼ぶことができる。

上記の成果は、 α -グルコシダーゼの研究において画期的な進展をみせたものであり、学術的に高く評価され、また今後の工業的応用も期待されるものと言える。よって審査員一同は、王 一 (Wang Yi) が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。