Cloning and Expression of Genes Encoding Fructosyltransferases from Higher Plants in Food Technology

(Received January 29, 2004)

Norio Shiomi* and Keiji Ueno

Department of Food Production and Utility Development, Graduate School of Dairy Science Research, Rakuno Gakuen University
 (Department of Food Sciences, Faculty of Dairy Science, Rakuno Gakuen University)
 (582 Midorimachi, Bunkyo-dai, Ebetsu, 069-0851, Japan)

Abstract: Recently, we have investigated enzymic production of non-digestible oligosaccharides which have several functional activities as “tertiary functional ingredients” of foods. Fructo-oligosaccharides synthesized from sucrose by *Eurotium repense* fructosyltransferase had the effect of no elevation of blood glucose or insulin concentrations in rats. Fructosylxyloside formed from sucrose and xylose with fructosyltransferase action of *Scopulariopsis brevicaulis* cells suppressed serum glucose and insulin responses and / or promoted the absorption of calcium and magnesium ions in rats administered with sucrose. On the other hand, we studied purification and characterization of several fructosyltransferases; sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST), fructan: fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) and a new enzyme, fructan: fructan 6^G-fructosyltransferase (6G-FFT) from asparagus roots. Previously, we reported that the asparagus 1-FFT synthesized new functional oligosaccharides elongated with one or two additional fructose units by fructosyltransfer from 1-kestose to 4^G- β -D-galactosylsucrose and the saccharides selectively stimulated growth for *Bifidobacteria*. In this study, we have tried the isolation and expression of cDNAs encoding 6G-FFT, 1-FFT and 1-SST from asparagus for industrial use. The cDNAs encoding 6G-FFT, 1-FFT and 1-SST were isolated from a cDNA library of asparagus leaves or roots. The isolated cDNAs were named AoFT 1, AoFT 2 and AoFT 3, respectively. The deduced amino acid sequences of these cDNAs showed a high homology with those of plant fructosyltransferases. Expression of these cDNAs was done using *Pichia pastoris*. The recombinant protein from *Pichia* transformed with AoFT 1 produced 1^F,6^G-di- β -D-fructofuranosylsucrose, neokestose and sucrose from 1-kestose, while the transformant with an empty vector produced no saccharides. These results show that 6G-FFT is expressed in *P. pastoris*. In the same way, recombinant protein from *Pichia* transformed with AoFT 2 produced nystose from 1-kestose and AoFT 3 recombinant protein produced 1-kestose from sucrose. These results also show that 1-FFT and 1-SST are expressed in *P. pastoris*. Three recombinant proteins had enzymatic properties similar to those of 6G-FFT, 1-FFT and 1-SST from asparagus roots, respectively.

Key words: asparagus, fructo-oligosaccharide, fructosyltransferase, fructosyltransfer, *Pichia pastoris*

高等植物起源の Fructosyltransferase の利用を目的とした遺伝子のクローニング

塩見徳夫*, 上野敬司

酪農学園大学大学院酪農学研究科食生産利用科学専攻 (酪農学園大学酪農学部食品科学科)
 (069-8501 江別市文京台緑町 582)

近年、健康志向の高まりと甘味離れという時代のニーズに呼応して、整腸作用や低カロリーなどの機能性を有する糖質が各種の糖質関連酵素を用いて製造されている。フルクトオリゴ糖もその一つであり、*Aspergillus*¹⁾, *Arthrobacter*²⁾, *Aureobasidium*³⁾, *Penicillium*⁴⁾, *Eurotium*⁵⁾, *Scopulariopsis*⁶⁾などの微生物起源の β -fructofuranosidase や fructosyltransferase を用いて工業的に製造されている。

このフルクトオリゴ糖の合成に関与する fructosyltransferase は植物にも存在し、シュクロースから 1-kestose を生成する sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST)⁷⁻⁹⁾, 1-

kestose あるいはフルクトオリゴ糖のフルクトース残基の 1 位炭素の水酸基にフルクトースを転移し、nystose あるいはさらに重合度の高い糖を生成する fructan: fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT)^{10,11)} やシュクロースあるいはフルクトオリゴ糖のグルコース残基の 6 位炭素の水酸基へ選択的にフルクトースを転移し、neokestose あるいは neokestose 誘導体を生成する fructan: fructan 6^G-fructosyltransferase (6G-FFT)^{12,13)} が存在する。さらに 1-FFT および 6G-FFT のような転移位置の選択性の高い酵素は微生物界には存在しないことから、これらの酵素を工業的に利用することができれば浸透圧がより低く、消化管にやさしい新規な構造を有するフラクトオリゴ糖を効率よく生産できると考えられる。しかし微生物起源の酵素に比べて大量に酵素を得るこ

* Corresponding author (Tel. +81-11-388-4754, Fax. +81-11-388-4754, E-mail: n-shiomi@rakuno.ac.jp).

とが困難なことから、これまで両酵素が工業的に用いられたことはなかった。我々はこれまでに 1-SST^(8,9), 1-FFT⁽¹⁰⁾ および新規酵素として 6 G-FFT をアスパラガス⁽¹²⁾, タマネギ⁽¹³⁾ から見出して精製を行い、酵素の諸性質を検討してきた。

本研究では高等植物起源の fructosyltransferase の大量生産技術を確認するための基礎的研究として、アスパラガス cDNA ライブラリーから 1-SST, 1-FFT および 6 G-FFT をコードする cDNA を単離し、その塩基配列を解析するとともにメタノール資化性酵母による組み換え酵素の発現を試みた。

1. ユリ科植物のフルクタン類

フルクタンは一般的にシュクロースにフルクトースが結合したものでフルクトースのみ結合したものも含まれる。フルクタンは構造上三つの型に大別される (Fig. 1)。イヌリンタイプ: $\beta(2 \rightarrow 1)$ 結合した D-フルクトース残基から

Fig. 1. Structure of fructans in higher plants.

なるもので、 $1^F(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_m \text{ sucrose}$ ($m=1 \sim 35$) の構造を有し、換言すれば 1-kestose ($m=1$) の誘導体である。キク科植物のゴボウ、タンポポ、キクイモなどに含まれている。またこの型はさらに拡張して $1^F(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_m\text{-}6^G(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_n \text{ sucrose}$, すなわち neokestose ($m=0, n=1$) の誘導体、も入れることが可能であり、最近イヌリンネオシリーズまたはイヌリンネオタイプといわれている。ユリ科植物のタマネギ⁽¹⁴⁾, アスパラガス⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ (Fig. 2) などに多く含まれていることが知られている。レバンタイプ: $\beta(2 \rightarrow 6)$ 結合した D-フルクトシル残基から成るもので牧草のチモシーに含まれ、微生物も作る。グラミナンタイプ: $\beta(2 \rightarrow 1)$ 結合と $\beta(2 \rightarrow 6)$ 結合の両フルクトース残基から成るものでイネ科植物に含まれている。

2. ユリ科植物のフルクタン合成に関与する酵素

ユリ科植物であるアスパラガス根のフルクタンは三種のフルクトシルトランスフェラーゼにより合成される⁽¹⁹⁾ (Fig. 3)。第 1 の酵素は sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST)⁽⁸⁾ でシュクロースに作用し 1-kestose とグルコースを生成する。第 2 の酵素は fructan: fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT)⁽¹⁰⁾ で 1-kestose あるいはその誘導体 [1^F

1-SST

1-FFT

6G-FFT

Fig. 3. Three kinds of fructosyltransferases involved in the synthesis of fructo-oligosaccharides in asparagus roots.

Fig. 2. Anion exchange chromatogram of neutral soluble carbohydrate extracted from asparagus roots.

G, glucose; F, fructose; S, sucrose; inulin type oligosaccharides, $1^F(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_m \text{ sucrose}$ [3 a (1-kestose, 1-kes): $m=1$; 4 a (nystose, nys): $m=2$; 5 a (fructosynystose, f-nys): $m=3$; 6 a: $m=4$; 7 a: $m=5$]; inulin neotype oligosaccharides, $1^F(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_m\text{-}6^G(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_n \text{ sucrose}$ [3 b (neokestose, n-kes): $m=0, n=1$; 4 b: $m=0, n=2$; 4 c: $m=1, n=1$; 5 b: $m=0, n=3$; 5 c: $m=2, n=1$; 5 d: $m=1, n=2$; 6 b: $m=0, n=4$; 6 c: $m=3, n=1$; 6 d: $m=1, n=3$; 6 e: $m=2, n=2$; 7: $m+n=5$; 8: $m+n=6$; 9 x: $m+n \geq 7$].

Fig. 4. Synthesis of fructosyl-raffinose, -stachyose and -verbascone with sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from *Scopulariopsis brevicaulis* or onion seeds.

Fig. 5. Synthesis of fructosyl lactosucrose with fructan: fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) from asparagus roots.

Fig. 6. Synthesis of inulin neotype oligosaccharide with fructan: fructan 6^G-fructosyltransferase (6G-FFT) from asparagus plant.

(1- β -D-fructofuranosyl)_m sucrose] の末端フルクトース残基を他の糖のフルクトース残基の C₁(OH) 位に転移触媒し、基質より 1 フルクトシル単位だけ重合度の高い糖を生成する。第 3 の酵素は fructan: fructan 6^G-fructosyltransferase (6G-FFT)¹²⁾ でアスパラガス根から初めて見出された酵素である。1-FFT と同様の糖を基質としそれらの末端フルクトース残基を基質であるフルクトオリゴ糖のグルコース部の C₆(OH) 位に転移触媒し neokestose あるいはその誘導体 [(1- β -D-fructofuranosyl)_m-6^G- β -D-fructofuranosyl]sucrose, イヌリンネオタイプ] を生成する。

3. 1-SST, 1-FFT, 6G-FFT によるオリゴ糖の合成

1) 1-SST

現在、フルクトオリゴ糖は *Aspergillus niger* が生産する fructosyltransferase, あるいは β -fructofuranosidase を用いてシュクロースから生産されている²⁰⁾が、初期の生成物である 1-kestose の他に更に反応が進むことにより生じた nystose や fructosylnystose が含まれている。すなわち、この場合シュクロースからフルクトースを 1 残基のみ転移した糖を合成する目的には適さない。植物起源 (アスパラガ

ス, タマネギ) の 1-SST, 微生物である *Scopulariopsis brevicaulis* の fructosyltransferase は、受容体特異性がせまくシュクロースからシュクロースあるいはオリゴ糖のシュクロース部のフルクトース残基の C₁(OH) のみにフルクトース残基を転移触媒する。

このような 1-SST の基質特異性を生かし、フルクトシル供与体としてシュクロースを、受容体としてラフィノース, スタキオース, フェルバスコースを用い Fig. 4 に示すような反応によりフルクトシル-ラフィノース, -スタキオース, -フェルバスコースを作ることができる。実際、タマネギあるいは *S. brevicaulis* 1-SST の反応液について活性炭カラムクロマトグラフィー, 調製用 HPLC を行い、糖 1, 2, 3 を単離した。各糖は完全メチル化物のメタノール分解物の分析, MALDI-TOF-MS 分析, NMR 分析により糖 1, 2, 3 は O- β -D-fructofuranosyl-(2 $\rightarrow$ 1)- β -D-fructofuranosyl- $\{[O-\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]_n- α -D-glucopyranoside; n = 1 (糖 1), n = 2 (糖 2), n = 3 (糖 3), であることが確認²¹⁾された。

2) 1-FFT

1-FFT は供与体を 1-kestose としたとき、受容体オリゴ

Fig. 7. Anion exchange chromatogram of inulin neotype oligosaccharides produced from inulin type oligosaccharides using fructan: fructan 6^G-fructosyltransferase (6 G-FFT) from asparagus leaves.

A mixture of 6 G-FFT (25 μ L, 0.54 U), McIlvaine buffer (pH 5.5, 25 μ L), 5% inulin type oligosaccharides [$1^F(1\text{-}\beta\text{-D-fructofuranosyl})_{1-9}$ sucrose] and toluene (a trace amount) was incubated at 30°C for 96 h. After the reaction was stopped by heating at 100°C for 3.5 min, the reaction mixture was diluted 100 times with distilled water and an aliquot (10 μ L) was injected to HPAEC. Inulin type oligosaccharide: $1^F(1\text{-}\beta\text{-D-fructofuranosyl})_m$ sucrose [3 a (1-kestose): $m=1$; 4 a (nystose): $m=2$; 5 a (fructosynystose): $m=3$; 6 a: $m=4$; 7 a: $m=5$; 8 a: $m=6$; 9 a: $m=7$, 10: $m \geq 8$]; inulin neotype oligosaccharides, $1^F(1\text{-}\beta\text{-D-fructofuranosyl})_m\text{-}6^G(1\text{-}\beta\text{-D-fructofuranosyl})_n$ sucrose [3b(neokestose): $m=0$, $n=1$; 4b: $m=0$, $n=2$; 4c: $m=1$, $n=1$; 5c: $m=1$, $n=2$; 5d: $m=2$, $n=1$; 6in~9in: $m+n=4\text{-}7$].

Fig. 8. Anion exchange chromatogram of inulin neotype oligosaccharides produced from 1-kestose using fructan: fructan 6^G-fructosyltransferase (6 G-FFT) from asparagus leaves.

The reaction mixture was similar to that shown in Fig. 5 except for using 0.2 M 1-kestose as a substrate, and was incubated for 24 h. Analysis of saccharides produced by 6 G-FFT was done with HPAEC as shown in Fig. 5. Markers: G, F, S and 3a-5d represent the same saccharides as listed in Fig. 2.

糖のフルクトース残基の $C_1(\text{OH})$ 位にフルクトース残基を転移触媒するが、生成物を受容体とし更に重合度の高いオリゴ糖を生成する。供与体として 1-kestose, 受容体としてラクトシュクロースを用いアスパラガス 1-FFT を作用させ Fig. 5 に示す反応を行った。反応液について調製用 HPLC を行うことにより 2 種のフルクトシルラクトシュクロース (糖 4, 5) を単離した。糖 4, 5 は各種構造分析に

より $[O\text{-}\beta\text{-D-fructofuranosyl}\text{-}(2\rightarrow1)]_n\text{-}\beta\text{-D-fructofuranosyl}\text{-}O\text{-}[\beta\text{-D-galactopyranosyl}\text{-}(1\rightarrow4)]\text{-}\alpha\text{-D-glucopyranoside}$; $n=1$ (糖 4), $n=2$ (糖 5), であることが同定^{22,23)}された。

3) 6G-FFT

イヌリンネオタイプオリゴ糖はイヌリンタイプオリゴ糖と比較して β -fructofuranosidase による加水分解を受けやすい。例えば *Bifidobacterium adolescentis* G₁ 由来の oligo β -

fructofuranosidase は 1-kestose をよく加水分解²⁴⁾するが、neokestose も、同程度以上に早く水解²⁵⁾する。事実 neokestose は *Bifidobacterium* 属菌により 1-kestose よりすみやかに資化される。従ってイヌリントタイプオリゴ糖の *Bifidobacterium* 属菌による資化性はイヌリントタイプからイヌリンネオタイプに変換 (Fig. 6) することにより改善されることが期待されよう。イヌリントタイプオリゴ糖 [$1^F(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_m$ sucrose, $m=1-9$ の混合物] を基質としアスパラガス 6 G-FFT を作用させたときの反応生成物についての HPLC 図を Fig. 7 に示す。数字は糖の重合度を、a はイヌリントタイプオリゴ糖を、b, c, d, in はイヌリンネオタイプオリゴ糖を示す。

また 1-kestose を基質とし、6G-FFT を長時間作用させたときの HPLC 図を Fig. 8 に示す。イヌリンネオタイプのオリゴ糖が合成されている。

4. 合成オリゴ糖の機能性

1-SST, 1-FFT, 6 G-FFT を利用することによりフルクトース残基を転移合成したより重合度の高い糖はもとの糖より浸透圧が低くなり消化管にやさしい糖に改善された。また、いずれの糖も *Bifidobacterium* 属菌によって選択的に資化²²⁾された。ラクトシュクロースは小腸ラクターゼにより分解されにくい消化管を通過中にその一部は消化・吸収される。糖 4 のフルクトシルラクトシュクロースはラット小腸ラクターゼによりほとんど加水分解されず、難消化性糖として大巾に改善²²⁾された。従って摂取したほとんどの糖 4 は大腸にまで達し、腸内細菌叢の改善に役立つことが期待される。

5. 植物由来 fructosyltransferase をコードする cDNA の単離とその組み換えタンパク質の解析

1-SST, 1-FFT, 6G-FFT は機能性オリゴ糖の合成、改変に利用され得ることを述べたが、これら高等植物由来の fructosyltransferase の大量生産技術を確認するため、まず三種の酵素をコードする cDNA を単離しその塩基配列を解析し、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて組み換えタンパク質の発現を試みた。

1) 1-SST

アスパラガスの根から構築した cDNA ライブラリーを鋳型として、degenerate primer を用いて PCR を行い、植物由来 fructosyltransferase と高い相溶性を有する PCR 産物を得た。これをプローブとして、アスパラガス根 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、植物由来 fructosyltransferase と高い相溶性を示す完全長 cDNA を得た。これを AoFT 3 とした。

AoFT 3 は 2207 bp であり、628 のアミノ酸から成る一つのオープンリーディングフレームを持っていた。計算される分子量は 70073.14、等電点は 5.44 であった。推定される糖鎖付加部位であるアスパラギン-X-セリンおよびトレオニン (N-X-S/T) の配列が 6 カ所、確認された。データ

Fig. 9. Functional analysis of recombinant AoFT 3 protein expressed in *Pichia pastoris*.

A mixture of recombinant AoFT 3 protein (25 μ L), McIlvaine buffer (pH 5.5, 25 μ L), 0.2 M sucrose (50 μ L) and toluene (a trace amount) was incubated at 30°C for 0.1 and 24 h. After the reaction was stopped by heating at 100°C for 3.5 min, the reaction mixture was diluted 100 times with distilled water and an aliquot (10 μ L) was injected to HPAEC. HPAEC analysis of products from empty vector negative control was also done (No insert). Markers: G, F, S and 3a represent the same saccharides as listed in Fig. 2.

ベース検索および相同性検索の結果、タマネギ 1-SST と 71%、ニンニク 1-SST と 69%、アスパラガス invertase およびタマネギ 6G-FFT と 60%、タマネギ invertase と 59% の高い相溶性を示し、キク科、イネ科植物の fructosyltransferase とも約 50% の相溶性を示した。AoFT 3 の翻訳産物を明らかにするため、*Pichia pastoris* を用いた異種発現系を構築した。*P. pastoris* により得られた AoFT 3 組み換え粗酵素液を用いて、シュクロースを基質として 30°C で反応させ、反応生成物を HPAEC 法により分析した。その結果、シュクロースから 1-kestose を生成したことから、AoFT 3 はアスパラガス 1-SST をコードしていると考えられた²⁶⁾ (Fig. 9)。

2) 1-FFT

アスパラガス 1-FFT をコードする cDNA の単離はアスパラガス根から構築した cDNA ライブラリーから AoFT 3 の単離と同様の手法でスクリーニングした。その結果、AoFT 3 とは異なる完全長 cDNA を得、これを AoFT 2 とした。

AoFT 2 は 2190 bp であり、624 のアミノ酸から成る一つのオープンリーディングフレームを持っていた。計算される分子量は 68837.10、等電点は 4.97 であった。推定される糖鎖付加部位が 5 カ所、確認された。

AoFT 2 の推定されるアミノ酸配列はタマネギ 6G-FFT と 61%、タマネギ 1-SST およびアスパラガス invertase と 59%、ニンニク 1-SST と 57% およびタマネギ invertase と 56% と高い相溶性を示し、キク科、イネ科植物の fructosyltransferase とも約 50% の相溶性を示した。

AoFT 2 の翻訳産物を明らかにするため、*P. pastoris* を用いて AoFT 2 組み換え粗酵素液を得た。AoFT 2 組み換え

Fig. 10. Functional analysis of recombinant AoFT 2 protein expressed in *Pichia pastoris*.

All the experiments were done similarly to those for functional analysis of recombinant AoFT 3 protein except for using recombinant AoFT 2 protein and 1-kestose. Markers: G, F, S and 3a-5a represent the same saccharides as listed in Fig. 2

粗酵素液を用いて 1-kestose を基質として 30°C で反応させ、反応生成物を HPAEC 法により分析した。その結果、6G-FFT の反応生成物である neokestose や 1^F, 6^G-di-β-D-fructofuranosylsucrose (4c) の生成は認められず、1-FFT の反応生成物である nystose と少量の fructosylnystose が生成された (Fig. 10)。このことから AoFT 2 はアスパラガス 1-FFT をコードしていると考えられる²⁷⁾。

3) 6 G-FFT

アスパラガス 6 G-FFT をコードする cDNA の単離はアスパラガス葉から構築した cDNA ライブラリーから AoFT 2, AoFT 3 の単離と同様の方法でスクリーニングした。その結果、AoFT 2, AoFT 3 とは異なる完全長 cDNA を得、これを AoFT 1 とした。

AoFT 1 は 2201 bp であり、610 のアミノ酸から成る一つのオープンリーディングフレームを持っていた。計算される分子量は 68311.42, 等電点は 5.4 であった。推定される糖鎖付加部位が 6 カ所、確認された²⁸⁾。

データベース検索および相同性検索の結果、タマネギ 6 G-FFT と 68%, アスパラガス invertase と 59%, タマネギ 1-SST および invertase と 58%, ニンニクの 1-SST と 57% の高い相同性を示し、キク科、イネ科植物の fructosyltransferase とも約 50% の相同性を示した。

AoFT 1 の翻訳産物を明らかにするため、*P. pastoris* により得られた AoFT 1 組み換え粗酵素液について 1-kestose を基質として 30°C で反応させ、反応生成物を HPAEC 法により分析した。その結果、4c および neokestose の生成が確認されたことから、6 G-FFT 活性が認められた (Fig. 11)。さらに 1-FFT の反応生成物である nystose の生成もわずかに確認されたが、6 G-FFT 活性と比べて、1/10 程度の低い酵素活性であった。

このことから AoFT 1 はアスパラガス 6 G-FFT をコードしていることが明らかとなった^{28,29)}。

Fig. 11. Functional analysis of recombinant AoFT 1 protein expressed in *Pichia pastoris*.

HPAEC analysis of reaction products formed from 100 mM 1-kestose. All the experiments were done similarly to those for functional analysis of recombinant AoFT 2 protein except for using recombinant AoFT 1 protein. Markers: G, F, S and 3a-6d₂ represent the same saccharides as listed in Fig. 2.

Fig. 12. Comparison of amino acid sequences of conserved regions of AoFT 1, 2 and 3 with those of fructosyltransferases and invertases from higher plants.

Asp (D) and Glu (E) in these motifs were involved in catalytic reaction.

アスパラガス 6 G-FFT (AoFT 1), 1-FFT (AoFT 2), 1-SST (AoFT 3) の推定されるアミノ酸配列は植物由来 fructosyltransferase および invertase に保存されている二つの領域を保持しており (Fig. 12), これらは glycoside hydrolase family 32 に分類される。Family 32 には酵母 invertase も含まれており、酵母 invertase において、NDPNG 領域 (β-fructosidase motif) のアスパラギン酸 (D) と MWECVD (catalytic site) のグルタミン酸 (E) が活性に関与するアミノ酸残基であることが、化学修飾および部位特異的変異を用いた解析から同定されている。これらのアミノ酸残基はアスパラガス 6 G-FFT (AoFT 1), 1-FFT (AoFT 2), 1-SST (AoFT 3) においても酵素活性に関与するだろう。

以上のようにアスパラガスから 1-SST, 1-FFT, 6 G-FFT

をコードする cDNA をそれぞれ単離し、*P. pastoris* 発現系を用いて、その組み換えタンパク質を得ることができた。それぞれの組み換えタンパク質はアスパラガス由来 1-SST, 1-FFT, 6G-FFT の性質と類似していた。しかしながら、これらの組み換えタンパク質は必ずしも多量に生産されたわけではなく、また比較的不安定であることから、大量に得るための工夫や安定性の向上などを検討する必要がある。今後これらの点について詳細に調べていきたいと考えている。

本研究に御協力いただいた小野寺秀一博士（酪農学園大学）、川上 顕博士（北海道農業研究センター）、吉田みどり博士（北海道農業研究センター）、山森 昭博士（大高酵素株式会社）に厚く御礼申し上げます。

文 献

- H. Hidaka, M. Hirayama and N. Sumi: A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1181-1187 (1988).
- K. Fujita, K. Hara, H. Hashimoto and S. Kitahata: Transfructosylation catalyzed by β -fructofuranosidase I from *Arthrobacter* sp. K-1. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2655-2661 (1990).
- S. Hayashi, M. Noguchi, Y. Takasaki, H. Ueno and K. Imada: Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium* sp. ATCC 20524. *J. Ind. Microbiol.*, **7**, 251-256 (1991).
- H. Yasuda, T. Shitoh, T. Yamano, Y. Itoh and S. Shimura: Identification of neokestose produced from sucrose by an enzyme of *Penicillium oxalicum*. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 777-778 (1986).
- ホクレン農業協同組合連合会、竹田博幸、伊藤義春、古賀裕、塩見徳夫、小野寺秀一、佐々木博：フラクトシル転移酵素、並びに該酵素を用いた 1-kestose 及びニストースの分別製造方法。特開 2000-232878, 2000-08-29.
- H. Takeda, K. Sato, S. Kinoshita and H. Sasaki: Production of 1-kestose by *Scopulariopsis brevicaulis*. *J. Ferment Bioeng.*, **79**, 242-246 (1994).
- J. Edelman and T.G. Jefford: The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytol.*, **67**, 517-531 (1968).
- N. Shiomi and M. Izawa: Purification and characterization of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase from the roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 603-614 (1980).
- N. Shiomi, H. Kido and S. Kiriya: Purification and properties of sucrose: sucrose 1^F- β -D-fructosyl-transferase in onion seeds. *Phytochemistry*, **24**, 695-698 (1985).
- N. Shiomi: Purification and characterization of 1^F-fructosyltransferase from the roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Carbohydr. Res.*, **99**, 157-169 (1982).
- B.R. Jeong and T.L. Housley: Purification and characterization of wheat β (2 $\rightarrow$ 1) Fructan: Fructan fructosyltransferase activity. *Plant Physiol.*, **100**, 199-204 (1992).
- N. Shiomi: Purification and characterization of 6^G-fructosyltransferase from the roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Carbohydr. Res.*, **96**, 281-292 (1980).
- S. Onodera, H. Sakai and N. Shiomi: Purification and some properties of 6^G-fructosyltransferase from onion bulbs. *XIXth International Carbohydrate Symposium*. San Diego, CA. Abstract, CP 097 (1998).
- N. Shiomi, S. Onodera and H. Sakai: Fructo-oligosaccharide content and fructosyltransferase activity during growth of onion bulbs. *New Phytol.*, **136**, 105-113 (1997).
- N. Shiomi, J. Yamada and M. Izawa: Isolation and identification of fructo-oligosaccharides in roots of *Asparagus (Asparagus officinalis* L.). *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 567-575 (1976).
- N. Shiomi, J. Yamada and M. Izawa: A novel pentasaccharide in the roots of *Asparagus (Asparagus officinalis* L.). *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1375-1377 (1979).
- N. Shiomi: Two novel hexasaccharides from the roots of *Asparagus officinalis*. *Phytochemistry*, **20**, 2581-2583 (1981).
- N. Shiomi: Structure of fructopolysaccharide (asparagosin) from roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *New Phytol.*, **123**, 263-270 (1993).
- N. Shiomi: Properties of fructosyltransferase involved in the synthesis of fructan in Liliaceous plants. *J. Plant Physiol.*, **134**, 151-155 (1989).
- M. Hirayama and H. Hidaka: *Production and Utilization of Microbial Fructans; Science and Technology of Fructans*, M. Suzuki and N.J. Chatterton, eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 273-286.
- N. Shiomi and S. Onodera: Two oligosaccharides formed by sucrose: sucrose 1- β -D-fructosyltransferase from onion seeds. *J. Rakuno Gakuen Univ.*, **14**, 33-41 (1989).
- A. Yamamori, S. Onodera, M. Kikuchi and N. Shiomi: Two novel oligosaccharides formed by 1^F-fructosyltransferase purified from roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1419-1422 (2002).
- A. Yamamori, E. Fukushi, S. Onodera, J. Kawabata and N. Shiomi: NMR analysis of mono- and difructosyllactosucrose synthesized by 1^F-fructosyltransferase purified from roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Magn. Reson. Chem.*, **40**, 541-544 (2002).
- K. Muramatsu, S. Onodera, M. Kikuchi and N. Shiomi: Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1681-1685 (1993).
- 村松 圭：Bifidobacterium adolescentis G1 の機能性オリゴ糖代謝に係わる β -フルクトフラノシダーゼに関する研究。酪農学園大学、博士論文、p. 93 (1994).
- 上野敬司、小野寺秀一、川上 顕、吉田みどり、塩見徳夫：アスパラガス由来 sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase 遺伝子のクローニング。日本農芸化学会講演要旨集、p.113 (2004).
- 上野敬司、小野寺秀一、川上 顕、吉田みどり、塩見徳夫：アスパラガス由来 fructan: fructan 1-fructosyltransferase 遺伝子のクローニング。J. Appl. Glycosci. (講演要旨集)、17 (2003).
- 塩見徳夫、小野寺秀一、上野敬司、吉田みどり、川上 顕、寺見文宏：フルクタン 6^G- β -D-フルクトシルトランスフェラーゼ遺伝子、特願 200-123265, 2003-01-22.
- 上野敬司、小野寺秀一、川上 顕、吉田みどり、塩見徳夫：アスパラガス由来 6^G- β -D-fructosyltransferase 遺伝子のクローニング。J. Appl. Glycosci. (講演要旨集)、57 (2002).

【質 問】 大阪市大 飯塚 recombinant で得られた 6 G-FFT は単一酵素蛋白体であるが 1/10 位の 1-FFT 活性があるということでしょうか？
また、fructosidase 同様温度の違いで生成物の比率など変化するかどうか試されておられるのでしょうか。

【答】 この recombinant タンパク体は 6 G-FFT 活性とその約 1/10 の 1-FFT 活性を有しています。反応生成物の比率に対する温度の影響については調べておりません。

【質 問】 林原生化研 西本
1) 6 G-FFT の受容体特異性について、Glucose には転移しないのですか？
2) 1-FFT は 6 G-FFT 活性を示しますか？
3) 酵素の耐熱化の予定はありますか？

【答】
1) 転移生成物は認められておりません。
2) アスパラガスの 1-FFT は 6 G-FFT 活性を示しません。もちろん、キク科植物（キクイモ、ダリア、ゴボウ）の 1-FFT も 6G-FFT 活性を有していません。
3) 近い将来、検討する予定でおります。