黒麹菌グルコアミラーゼの多様性とその発現機構

林 田 晋 策*

Mechanism of Formation of Multiple Glucoamylases in Black-Koji Molds

Shinsaku HAYASHIDA

Department of Agricultural Chemistry, Kyushu University
(Fukuoka, 812, Japan)

A single strain of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* produced three glucoamylases, raw starch-digesting GAI, raw starch-indigesting GAI' and II, which were classified respectively into type A, B, C based on the difference in hydrolysis curves for glycogen. The raw starch-digesting amylase was selectively obtained in the submerged Culture A. Limited stepwise degradations of glucoamylase with co-existent proteases and glycosidases resulted in the occurrence of multiple glucoamylases. GAI (MW 90000, N-terminal Ala, C-terminal Arg) was converted to GAI' (MW 83000, N-terminal Ala, Ile, C-terminal Arg, Thr) and an inactive glycopeptide Gp-I (MW 7000, N-terminal Ala, C-terminal Ser) with proteases. The liberated Gp-I abundant in hydroxy amino acids, preserved the adsorbability onto raw starch observed in GAI. By the characteristics of Gp-I, "Raw starch-affinity site" essential for raw starch-digestions was proposed in the part corresponding to Gp-I on GAI molecule. A protease-, glycosidase-negative mutant HF-15 produced a highly raw starch-digesting GAO (MW 250000) under all tested cultural conditions. The mutant α -amylase and GAO were bound to chitin at "Chitin-binding site" so tight that a "Chitin-immobilized amylase" was obtained without the aid of a cross linking glutaraldehyde. This preparation digested even raw starch to the high extent as glucose but lacked transglucosidase activity. Experiments using the immobilized amylase for production of glucose syrup and alcohol fermentation demonstrated the possibilities of recycling the enzyme. An ethanol tolerant Philippine yeast *Saccharomyces uvarum inulyticum* var. nov. w-y-2 and the mutant HF-15 liquid koji were applied for the high concentration-ethanol fermentation up to 20%v/v of uncooked corn starch materials.

1. はじめに

黒麹菌アミラーゼの多様性については、1965年の本アミラーゼシンポジウムに掲載していただいたことがある。当時は、現在汎用されているカラムクロマトグラフィおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動はまだ使用できない時代であったから、黒麹菌グルコアミラーゼ(GA)の特異性である生澱粉分解活性を指標にして、フスマ培養抽出液の酸、アルカリ処理、硫安分画、リパノール分画および生澱粉被吸着分画における微小な差異に基づいて、3種のグルコアミラーゼ、すなわち GAI, GAI' および

GAII をそれぞれ分別した。各 GA は相互に異なる基質分解曲線を示し、また GAI だけが特異的に生澱粉分解能を有するが、他の2種の GAI' および GAII は生澱粉分解能をまったく示さないことを認めた。さらに、同一基質曲線を示す GA、つまり同一タイプの GA の間に、pH 安定性を相違する GA も見いだされた。このような GA 多様性の発現機構として、生澱粉分解能および吸着能の変動に基づきプロテアーゼによる GAI から GAI' への変換を提示したが、既往にはポリペプチド主鎖の限定分解による酵素活性の質的变化に関する報告はなく、タンパク質の純度および分子量の確認技術に乏しい当時としては、この機構が直ちに容認される状況にはなかった。

* 九州大学農学部 (812 福岡市東区箱崎)

ペプシンなどのようにペプチド鎖の限定分解による酵素前駆体の活性化現象は周知のとおりであるが、完成品としての酵素分子はプロテアーゼによる主鎖の限定分解によって酵素機能を喪失する。しかし主鎖の限定分解が必ずしも酵素の失活に至らない例が知られている。ウシすい臓 RNase など二、三の酵素では、限定分解により、単独では活性を示さないペプチドとタンパク質に分解されるが、両者の 1:1 の会合により活性が再現された。また馬鈴しょホスホリラーゼでは、長期間の保存によってサブユニットの分子量はほぼ 1/2 になるのに、活性の変化はほとんど認められなかった。さらにこのようなオリゴマー酵素のなかには、限定分解の結果、その柔構造によって、かえって活性が大幅に向上する例もアスパルターゼで報告された。

一般に細胞内酵素は、このようなオリゴマーをなして柔らかい構造をもち、活性部位以外の部分にアロステリック部位などの特異領域を形成して酵素機能の調節を行うことができる。これに対し細胞外酵素は単量体であり、単純で硬い構造をもつとされており、細胞内にあってはシグナルペプチド部位を有するが、分泌時に切断されて完成分子となる。完成品としての細胞外酵素には活性部位以外の特異領域は認められていない。

本報では、典型的な細胞外酵素である黒麹菌 GA について、ゲル電気泳動による分子量測定法の導入を契機に再開された研究結果を総合し、まず多様性の実態を明確にし、多様性の発現がプロテアーゼやグリコシダーゼなどの随伴酵素による GA 原型分子の段階的分解の過程として一元的に把握されることを明らかにし、単に酵素活性の量的変動にとどまらず限定分解によって酵素活性が質的に変化して、生澱粉分解能は失われるが糊化澱粉分解能は保持され、基質分解曲線も変動することを明示し、次いで分子上の活性部位のほかの部分に、生澱粉分解能の発現に必須の生澱粉親和部位およびキチンとの結合に関与するキチン結合部位などの特異領域が存在し、そのため GA は糸状菌細胞壁に分布するキチンに固定化された状態でも不溶性基質である生澱粉を糖化分解できること、すなわち固相酵素-固相基質の糖化を認め、さらに生澱粉の分解機構を考究した。それらの事項について以下に略述する。

2. ゲルコアミラーゼの多様性と分類

黒麹菌の単一菌株の培養液から前述のような古典的手法で分取された GAI, GAI' および GAII は、その後 DEAE-セファデックスカラムにより 3 個の明確なピー

クとして分画されて、基質分解曲線を相違する 3 種の GA の存在が明示された。次いで 30 l 容ジャーファメンター 4 基の並列使用による比較培養を行い、3 種の GA をそれぞれ選択的に生産するための深部培養条件、Culture A, B および C が決定された。いずれも培養 pH 6.8 の自動制御下に、培養組成と培地温度をそれぞれ相違させて培養し、それによって各 GA が単一菌株によって選択的に生産された。たとえば Culture A の条件によれば、生澱粉分解能をもつ GAI だけを特異的に生産することができ、深部培養による生澱粉分解性 GA の生産法が確立された。さらに従来知見と異なり、GA の生産に必ずしも低 pH での培養は必要でなく、むしろ本菌株では中性付近で短時間に高力価の GA が得られ、また、同じ pH 6.8 培養でも、pH 安定性を相違する GA が生産された²⁾。

かくして、*Aspergillus awamori* var. *kawachi* の単一菌株から 3 種の GA の各単一標品が多量に調製されるようになった。すなわち各標品は、それぞれつねに一定の酵素化学的性質を有し、一定の比活性をもち、ゲル電気泳動によって均一であり、また Table 1 のように一定の N 末端および C 末端アミノ酸残基を示したことから、単一タンパク質と認められた。この 3 種の GA は、1% の糊化馬鈴しょ澱粉およびグリコーゲン液を基質にして、それぞれ異なる分解曲線を示した。分解率は $GAI > GAI' > GAII$ であり、分子量、結合糖鎖量、安定性もこの順序で低下した。この 3 種の基質分解曲線に準拠して、本菌の GA をタイプ A, B および C と定義して分類することにした。タイプ A と B は、糊化馬鈴しょ澱粉に対して同一分解曲線を示し、ともに分解限度は 90% であったが、グリコーゲンに対しては、タイプ A は分解率 100%, B は 80% でほぼ限界に達した。タイプ C は Table 1 のように、どちらの基質にも低い分解率を示した。基質分解曲線の相違は馬鈴しょ澱粉の結合リン酸およびグリコーゲン内鎖の極端な短鎖長部位に対する各 GA の態度の相違に起因するものであった¹⁾。GA のタイプによる分類には、生澱粉分解能の有無は考慮に入れず、もっぱら上記基質分解曲線のパターンに基づくものとした。後述するように、タイプと生澱粉分解能は必ずしも一致せず、たとえば A タイプは同分解能を有する GA と有しない GA をともに内包するからである。既往の各種糸状菌 GA は、もし高度の精製標品によって比較されるならば、すべてこの三つのタイプ、A, B および C に分類されるものと推察される。

Table 1. Multiple Glucoamylases of parent strain.

Glucoamylase	I	I'	II	I-a	I-b
Molecular weight	90,000	83,000	57,000	86,000	84,000
N-terminal amino acid	Ala	Ala, Leu	Ile	Ala	Ala
C-terminal amino acid	Arg	Arg, Thr	Lys	Arg	Arg
Carbohydrate content %	7.6	4.6	1.0	2.2	2.4
Sedimentation coefficient	4.7	4.6	4.08		
Isoelectric point	3.55	3.45	3.28	3.55	3.55
Optimum pH at 30°C	3.8	3.8	4.0	3.8	3.8
pH-stability at 30°C, 20hr	2-10	3-9	4-7	3-9	4-7
Thermo-stability	65°C	50°C	40°C	50°C	40°C
Action toward raw starch	+	—	—	+	+
Adsorption onto raw starch	+	—	—	+	+
Type	A	B	C	A	A
Adsorption onto chitin	+	—	—	+	+
Hydrolysis % by chitin-immobilized enzyme					
Raw corn starch	—			—	—
Glycogen	100			100	100
Gelatinized potato starch	90			90	90

3. グルコアミラーゼの多様性発現機構

GAI は、アラニンとアルギニンで N および C 末端基とする、分子量 9 万の一本鎖ポリペプチドであった。Culture A という一定の培養条件で生産され、一定の方法で精製された GA はつねに一定の末端基を示した。この点、市販酵素剤から精製された GA がしばしば多様な末端基を示すのと相違している。前述の方法で単一タンパク質と保証された GAI 標品 100mg を 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) 5 ml に溶解し、これにサブチリシン (細菌プロテアーゼ) 1mg ないし 10mg を混和して、20°C、36 時間保持した。その結果、GAI は糊化馬鈴薯澱粉に対する活性をほぼそのまま保持したが、生澱粉に対する分解能および吸着能を完全に喪失した。つまり生澱粉を基質とする限りでは GAI はサブチリシン処理により完全に失活したことになる。一方、グリコーゲンに対する分解率は 80% まで低下してタイプ B の分解曲線を示すに至った。また DEAE-セファデックスカラムにおける GA 活性の溶出ピークは GAI' の位置へ移動し、溶出 GA の分子量は GAI' と同じ 83,000 へと減少し、さらに GAI' と同じく N 末端基にアラニンとロイシンを、また C 末端基にアルギニンとトレオニンをもつ二本鎖のポリペプチドとなり、また結合糖鎖量、等電点、至適 pH、至適温度および安定性でも GAI' と一致した。したがってサブチリシン処理 GAI は GAI' と同

定され、GAI がサブチリシンの作用によって GAI' へ変換することが明示された³⁾。この変換過程において分子量 7000 のグリコペプチド (Gp-I) が遊離生成し、遊離した Gp-I は高速液体クロマトグラフィによって 2 成分、a と b に分離され、主要な a のアミノ酸組成は Thr₂₁, Ser₈, Glu₁, Gly₆, Ala₅, Val₂, Cys₁, Lys₂ で、結合糖鎖量は 42.1% であった。どちらも N 末端基はアラニン、C 末端基はセリンと認められたが、N 末端アミノ酸の配列は、一つは Ala-Ala-Gly-であるのに対し、他は Ala-Gly-で、サブチリシンによる GAI 上の一次分解点は、Thr-Ala* または Ala*-Ala、および Ser-Leu と推察された。GAI 分子内において、これらのペプチド結合が限定分解されることによって、Gp-I が遊離されて一本鎖の GAI は二本鎖の GAI' となり、同時に生澱粉の分解能が失われるのである。

一方、本黒麹菌の酸性プロテアーゼによっても、上記のサブチリシンの場合と同様、GAI は GAI' へ変化した。この反応は pH 3~7 の広い範囲で容易に進行したが、ただ pH 4 では進行は困難であった。GA の多様性は培養の間に容易に生起することが明示された⁴⁾。

他方、プロナーゼ (放線菌プロテアーゼ) を GAI に作用させ、経時的に処理酵素液を DEAE-セファデックスカラムに供与すると、初期には GAI' のピークが溶出されたが、処理時間の経過とともに GAII のピークが

出現して、GAI のピークはしだいに減少した。つまり、プロナーゼ標品中に検出されたグリコンダーゼ活性により GAI' の結合糖鎖が一部除去され、そのため酵素主鎖の新たなペプチド結合が限定分解を受けやすくなり、GA の低分子化がさらに進行した結果、GAII が出現すると推論した。これを実証するため、第 1 図のように GAI にマンノシダーゼを作用させ、糖鎖の一部を分解除去して GAI-a とし、これにサブチリシンを作用させると GAI' が検出された。しかし、GAII への変化は認められなかった。これに対し GAI に、強力な *N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性をもつ Tubro-グリコンダーゼを作用させて GAI-b とした後、さらにサブチリシンを作用させた結果、GAII への変換を認めた。つまり GAI のタンパク質に結合している *N*-アセチルグルコサミン残基を一部切除することによって、新たなペプチド結合がプロテアーゼにより分解されるようになったのである⁵⁾。

Table 1 の pH および温度安定性を比較すると、どちらも GAI' と GAI-a または GAII と GAI-b の間で一致している。したがって、GA の安定性は、結合糖鎖に依存することが明らかになった。つまり安定性は主

鎖の限定分解に直接的に起因するのではなく、それにより糖鎖が失われることによるものである。これと類似の結果が高温糸状菌のセルラーゼ群でも見いだされ、等モルのマンノースと *N*-アセチルグルコサミンから構成された結合糖鎖によって、95℃、5 分間処理でも 50% の活性が残存する高度耐熱性が付与された。糖鎖の *N*-アセチルグルコサミン残基相互間に形成される水素結合が、酵素の安定性に寄与するものと推察される。結合糖鎖は糸状菌酵素の安定性付与に重要な役割を果たしていることが明確になった^{6,7)}。一方、安定性を異にする GAI, GAI-a および GAI-b が、いずれもタイプ A に属することから、GA のタイプは糖鎖とは無関係で、ポリペプチド主鎖の限定分解によって招来される活性部位の三次元構造の微小変化に起因すると考察される。

4. グルコアミラーゼにおける生澱粉親和部位の存在、構造、機能

前述のとおり、GAI (分子量 9 万) はサブチリシンによって GAI' (分子量 83,000) と Gp-I (7000) の 2 成分に分解され、生澱粉分解能を喪失した。同分解能はこの 2 成分を混合しても再現できなかった。しかし GAI' に

Fig. 1. Mechanism for formation of multiple glucoamylases.

は GAI の糊化澱粉分解能が、また Gp-I には GAI の生澱粉吸着能が保持された。この事実は、生澱粉吸着能に関与する部位が GAI 分子上の Gp-I に相当する領域に存在することを示している。また生澱粉分解能と生澱粉吸着能は、Fig. 1 にも示したとおりつねに並行して消長しており、この生澱粉への吸着に関与する部位を“生澱粉親和部位”と名付け、生澱粉分解能の発現には GA 分子上に活性部位と親和部位との併存が必須であると考察した⁹⁾。この考察はさらに、親和部位をキチンでマスキングされた GA が、生澱粉吸着能と同分解能を全く示さないが、糊化澱粉分解能をタイプ A のまま保持すること、GA をキチンでマスキングした後、サブチリシンを作用させると親和部位はキチンに残存して GAI が遊離すること、また、NBS により GAI の活性部位のトリプトファンを特異的に酸化すると、生澱粉および糊化澱粉の分解能はともに失活したが生澱粉吸着能はそのまま保持されること、さらに次章で述べるように黒麹菌変異株の産生する巨大分子の GAO にも上述同様の現象が認められ、免疫学的手法によって GAI および GAO に抗原決定基としての親和部位の存在が認められること、などからも支持された。

親和部位の機能を明らかにするため、Gp-I の化学構造を検討している。Gp-I は44個のアミノ酸からなり、前章に示したとおり親水性アミノ酸に富む点に特徴がみられた。結合糖鎖は42.1%に達し、大部分はマンノースで、残りは N-アセチルグルコサミンであった。アミノ酸配列は N 末端側から 1/3 だけわかり、Ala-Ala-Gly-Gly-Glu-Gly-Ser-Thr-X-Ala-Ala-----Ser であった。N 末端側の Gly-Gly は屈曲構造を示しており、また Gp-I の中央部に存在する多数の親水性アミノ酸は、結合糖鎖とともに広範囲の親水性領域を形成して GA 分子の表面に露出して生澱粉に吸着すると考察される。GAI と生澱粉との吸着は pH 依存性であり、吸着量と生澱粉分解活性はともに pH 3.6 において最大となった。この点、生澱粉分解能を有しない細菌 α -アミラーゼの生澱粉への吸着が、アルコールや硫酸の存在下でのみ認められる非特異的吸着であるのと対照的である。

前述のとおり、糊化澱粉の分解は、触媒部位と基質結合部位から構成されている活性部位だけで進行するが、生澱粉の分解は、活性部位とともに生澱粉親和部位が GAI 分子上に併存することによって発現する。したがって活性、親和の両部位によって形成される特異な場が生澱粉分解能の発現に必須と考察される。この親和部位の主要部分は Gp-I 上に保持されているから、上述の

Gp-I に関する現知見に基づいて生澱粉の分解機構の作業仮説を試みたい。基本的には、Gp-I に認められた多数の極性基によって澱粉ミセルの中の澱粉分子が捕捉され、次いで Gp-I の可変柔構造性によって、捕捉された澱粉分子が活性部位に接触され水解されるものと推考される。Gp-I は生澱粉と特異的に吸着し、キチンを除く他のグルカンには吸着しない。糖鎖をもつ intact な Gp-I は吸着によって GAI による生澱粉分解を促進した。生澱粉表面には、GAI が吸着して分解を開始できる特異な分解開始点が存在するものと推察される、おそらくこの開始点には澱粉の非還元性末端を含むミセル外縁部が、ちょうど巻き糸の端に似て露出しており、水との接触により水和しやすい状態にあると想像される。一方、Gp-I はセリン、トレオニン、グリシン、アラニンに富み、結合糖鎖も42%に達することから、ムチン類に似て可変柔構造をとりやすいものと推察される。これによって親和部位は生澱粉の開始点に柔軟に接近し、まず糖鎖で生澱粉と弱く結合してミセルの水和を促進して、ミセルを構成する澱粉分子は部分的に水分子と水素結合を形成してミセル構造が緩められるとともに、親和部位を構成するアミノ酸残基の極性基は水和澱粉分子と水素結合を形成するようになり、ミセル間の結合が切断されて澱粉の一分子が末端から部分的にはがされて GAI に捕捉される。Gp-I の可変柔構造によって、捕捉された澱粉分子は GAI の活性部位に容易に fit されて、糊化澱粉と同様に水解されると推察される。

5. 黒麹菌プロテアーゼ・グリコシダーゼ低産生変異株のグルコアミラーゼ

実用の観点から、培養条件にかかわらず強力な生澱粉分解能をもつ GA だけを著量に生産する菌株の開発を企図した。そのため前述の多様性発現機構に基づいて、プロテアーゼとグリコシダーゼの産生能がきわめて低い黒麹菌変異株を育成すれば、生産されるグルコアミラーゼはこれらの随伴酵素による部分分解を免かれ無傷の GA 分子が生産されるものと推考して実験を行った。

まず、黒麹菌の胞子懸濁液を MNNG 処理した後、十分洗浄した胞子を NaNO_3 などの無機態窒素の培地に接種して振とう培養を行い、増殖した菌体を加糖ブイヨン培地で純粋分離し、コロニーを加糖ブイヨンで斜面培養し、数回斜面培地に継代培養した。次いでカゼイン培地で平板培養を行い、親株に比してハローの大きいまたは小さいコロニーを釣菌して、馬鈴芋培地に接種して 30℃、10 日間培養して胞子を作らせた。さらにこれをフス

マ固体培養または Culture B の振とう培養を行い、プロテアーゼおよびグリコンダーゼの活性が低い株またはとくに強い株を選出した。とくに低い株については UV 処理を行い、加糖ブイヨンで平板培養を行い、コロニーを斜面培地に移した。以上を反復実施して目的の変異株を取得した。選出されたプロテアーゼ・グリコンダーゼ低産生変異株 HF-15 は、GAI' を特異的に産生させる Culture B でも、強力な生澱粉分解能をもつ GA を高単位に産生し、マンノシダーゼを産生せず、親株の活性の 1/7 の酸性プロテアーゼ、1/2 の N-アセチルグルコサミニダーゼを産生した。この培養濾液の GA 活性は 98% までトウモロコシの生澱粉粒に吸着され、強力な生澱粉分解能を示した。次いで、本変異株の GA の精製を試み、DEAE-セフアデックスカラムでは GAI よりもさらに遅れて溶出されたことから、この変異株の GA は親株 GA とは異なる酵素と推察した。その性質を Table 2 に示したが、GAI に比し顕著に大きく 25 万という分子量を示し、糖鎖量もマンノースとして 24.3% に及んだが、単量体であった。タイプ A で、強い生澱粉分解能を示し、糊化馬鈴しょ澱粉の分解能に対する生澱粉分解能の比率は、親株 GAI の 3 倍以上に達した。変異により酵素の分子量と生澱粉が分解能増大することを明らかにした。このグルコアミラーゼを GAO と名付けた⁸⁾。

GAO は、GAI の場合と同様、サブチリンンの作用により主鎖に限定分解が起こり、分子量 17 万で生澱粉の分解能と吸着能を完全に喪失した GAO' へと変換した。この GAO' は GAI とは異なり依然タイプ A であり、

これは生澱粉分解能と吸着能を示さないキチン固定化 GAI がタイプ A であるのと同じであった。つまり、GAO は高分子であるから親和部位の欠落が活性部位に直接の影響を与えないと推察される。一方、高温性 *Rhizopus* sp. の一菌株は生澱粉の分解能と吸着能を有するにもかかわらずタイプ B の基質分解曲線を示すグルコアミラーゼ GAR を生産した。この GAR はサブチリンンの作用によって、生澱粉分解能と吸着能をもたずタイプ B の基質分解曲線を示す GAR' へと変化した。これらの事実は、GA の生澱粉分解能がタイプとは直接的関連性を示さず、つねに GA 分子上の生澱粉親和部位の存否にかかわっていること、さらに生澱粉分解能の発現に親和部位が必須であることを明示している¹⁰⁾。

GAO は、GAI と同様にキチンと強く結合するので、既往のような架橋試薬を使用することなく容易にキチン固定化グルコアミラーゼが調製できた。しかし、この固定化 GAO は、キチン固定化 GAI と異なって生澱粉分解能と同吸着能を示した。とくに、まず GAO に生澱粉を吸着させて親和部位を保護した後キチンと結合させて調製した固定化 GAO は、生澱粉分解能、吸着能とも顕著に増大した。キチンは GAI とは親和部位でのみ結合したが、GAO には親和部位だけではなく、それとは別の特異な部位で結合することが判明した。さらに、親和部位を失った GAO' が GAI' とは異なってキチン結合能を有することからも、この特異部位の存在が強く支持された。GAO のこの特異部位を“キチン結合部位”と名付けた¹²⁾。キトサンは GAO および GAI のどちらにも結合しないので、キチンのアセチル基が固定化

Table 2. Glucoamylase of protease-glycosidase-negative mutant HF-15.

Glucoamylase	O	O'	O-a	O'-a
Molecular weight	250,000	170,000	160,000	120,000
Carbohydrate content %	24.3	15.2	14.2	8.9
Action toward raw starch	卅	—	+	—
Adsorption onto raw starch	+	—	+	—
Type	A	A	A	A
Adsorption onto chitin	卅	+	+	—
Hydrolysis % by chitin-immobilized enzyme				
Raw corn starch	+	—	—	—
Glycogen	100	100	100	
Gelatinized potato starch	90	90	90	

O': Subtilisin-moified GA O.

O-a: Protease K-partially modified GA O.

O'-a: Protease K-completely modified GA O.

に必須と考えられる。GAO は糸状菌の細胞壁にも結合し、結合後も生澱粉分解能、吸着能を示した。GA とキチンとの結合は pH に依存せず、GA 安定域のどの pH でも認められた。また高いイオン強度でも、GA をキチンから溶離させることは困難であった。既往の GA がキチンとの固定化に架橋試薬を必要としたのは、供試 GA が市販酵素剤であり、したがって親和部位およびキチン結合部位が欠落していたためと推察される。変異株 HF-15 の α -アミラーゼも GAO と同様キチンに強く結合したが、トランスグルコシダーゼは全く結合せず、生澱粉分解能を特徴とするキチン固定化アミラーゼが調製された。この固定化酵素をガーゼに包み込み、これを生澱粉懸濁液に浸すと、生澱粉はガーゼ内に侵入し固定化アミラーゼに吸着されて、固相-固相間で糖化が進行した。元来、糸状菌の菌糸ではアミラーゼは、細胞壁表層のキチンに結合されて存在し、近傍の生澱粉粒を吸着してこれを糖化し、グルコースを細胞内に取り込むものと考察される。また固相間酵素反応では、酵素分子における活性部位以外の領域の重要性が考察された。

この固定化 GAO をカラムに充填し、45%濃度の液化コーンスターチを 55°C, pH 5.0 で流加した結果、20 日間にわたり 97% DE 以上でオリゴ糖の検出されないグルコースシラップが連続的に得られた¹³⁾。また、黒麹菌変異株 HF-15 の液体麹とエタノール耐性酵母を併用することにより、無蒸煮のトウモロコシ破砕粉末から 20.1 % v/v という高濃度のエタノールが 35°C, 4~5 日で安定的に生産された¹⁴⁾。

6. おわりに

黒麹菌 *Aspergillus awamori* var. *kawachi* は、通常の培養では単一菌株により、基質分解曲線、安定性、生澱粉分解能などを相違する多種の GA を生産し、生産される GA の種類は、培養条件、たとえば使用の水によっても相違し、また精製の過程によっても相違した。この研究は、この多様性を解明し、つねに一定の性質を示す酵素標品を得て、黒麹菌 GA の本体を明らかにするため行ったものである。

グルコアミラーゼは、まず基質分解曲線によって A, B および C タイプに分類され、各タイプには、安定性を相違する GA, 生澱粉分解能を有するかまたは有しない GA などの各種の GA が内包されることを認め、複雑な多様性の実態を示した。次いでタイプが GA 分子主鎖の限定分解により遷移し、安定性は結合糖鎖の分解除去によって低下し、さらに生澱粉分解能は GA 分子中

の生澱粉親和部位の存否によって決定されることを認め、GA 多様性の発現機構を明示した。この多様性のゆえにはじめ困難であった黒麹菌 GA の研究は、さらに生澱粉分解の機構、巨大分子 GAO の発見、酵素分子における結合糖鎖の存在意義と活性部位以外の部分の役割、生澱粉分解能をもつキチン固定化 GAO, 固相-固相間の糖化などへと進展した。このように、細胞外酵素においても酵素分子の活性部位以外の部分は余分なものではけっしてなく、シグナルペプチド部位やアロステリック部位のように重要なもので、不溶性基質の分解や細胞表層への結合などの役割を果たし、それによって保水環境における固相間の酵素反応が可能になるものと考察される。しかし、このような特異な構造は不安定で容易に失われ、われわれが手にしている酵素は、比較的強固な活性構造だけを残置したもので、真に native なタンパク質ではないのかもしれない。かくて、ようやく不溶性基質の酵素分解を研究する手掛りが得られたので、現在、遺伝生化学的観点からアミラーゼの生澱粉分解能に関し理解を深めるとともに、他の各種の不溶性基質分解酵素についても検討している。

文 献

- 1) I. YAMASAKI, S. UEDA and S. HAYASHIDA: *J. Ferment. Technol.*, **47**, 753 (1969).
- 2) S. HAYASHIDA: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2093 (1975).
- 3) S. HAYASHIDA, T. NOMURA, E. YOSHINO and M. HONGO: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 141 (1976).
- 4) S. HAYASHIDA and E. YOSHINO: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 927 (1978).
- 5) E. YOSHINO and S. HAYASHIDA: *J. Ferment. Technol.*, **56**, 289 (1978).
- 6) S. HAYASHIDA and H. YOSHIOKA: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1721 (1980).
- 7) S. HAYASHIDA and H. YOSHIOKA: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 571 (1981).
- 8) S. HAYASHIDA and P. Q. FLOR: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2675 (1981).
- 9) S. HAYASHIDA, S. KUNISAKI, M. NAKAO and P. Q. FLOR: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 83 (1982).
- 10) S. HAYASHIDA and P. Q. FLOR: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1639 (1982).
- 11) S. HAYASHIDA, K. OHTA, P. Q. FLOR, N. NANRI and I. MIYAHARA: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1947 (1982).
- 12) P. Q. FLOR and S. HAYASHIDA: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 905 (1983).
- 13) P. Q. FLOR and S. HAYASHIDA: *Biotech. Bioeng.*, **25**, 1973 (1983).