α -1, 4- $\rightarrow$ -1, 6-グルカンの分解と合成に 関する微生物酵素の研究

坂 野 好 幸*

(昭和 60 年 11 月 22 日受理)

Microbial Enzymes Relating to Hydrolysis and Synthesis of α -1, 4- $\rightarrow$ -1, 6-Glucan

Yoshiyuki SAKANO

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tokyo Noko University
(3-5-8, Saiwai, Fuchu, Tokyo 183, Japan)

(1) Isopullulanase [EC. 3. 2. 1. 57 pullulan 4-glucanohydrolase] from *Aspergillus niger* was highly purified by acetone-precipitation, ion-exchange chromatography and gel-filtration. This enzyme hydrolyzed α -1, 4-glucosidic linkages adjacent to α -1, 6-linkages of pullulan to produce only isopanose (6-maltosylglucose). Its substrate specificity was different from those of pullulanase [EC. 3. 2. 1. 41] and isoamylase [EC. 3. 2. 1. 68]. From the results, it was expected that isopullulanase would be used as a suitable enzyme for the structural analysis of α -1, 4- $\rightarrow$ -1, 6-glucooligosaccharide. (2) Cell free extract of *Aureobasidium pullulans* synthesized pullulan from UDPG in the presence of ATP. It was suggested that pullulan would be synthesized through a sugar-lipid intermediate. (3) *Thermoactinomyces vulgaris* α -amylase hydrolyzed α -1, 6-linkages in partial hydrolyzates of pullulan as well as α -1, 4-linkages in starch and pullulan. *Pseudomonas stutzeri* maltotetraose-forming amylase hydrolyzed starch from non-reducing end to produce α -anomer of maltotetraose, whereas glucoamylase and β -amylase hydrolyze starch from non-reducing end to produce β -anomer. (4) Large scale preparation of isopanose and panose from pullulan was facilitated by the use of special enzymes, isopullulanase and *T. vulgaris* α -amylase.

多糖類は生物界、とくに植物界においては他の生体高分子、核酸や蛋白質などよりはるかに多量に存在する生体成分である。多糖類は構成糖が全く単一の場合と 2 糖以上からなるものに類別できる。グルコースのみからなるいわゆるホモグルカンでも、グルコースが β -結合で連なっているセルロースは高等植物の細胞壁組織の形体維持に役立っている。一方、 α -結合でグルコースが連なっている澱粉、グリコーゲンは植物、動物界を問わずエネルギー源（エネルギー 備蓄型多糖¹⁾）として存在することが一般に知られている。

この研究は、この備蓄型ホモグルカンの澱粉の枝分れ構造部分の α -1, 6-グルコシド結合およびその近傍に作

用する酵素に関するもので、1. イソプルラーナーゼ、2. プルランの生合成、3. 新しいアミラーゼの作用、4. 分枝オリゴ糖の酵素的調製法の 4 部からなる。

1. イソプルラーナーゼ

澱粉やグリコーゲンの α -1, 6-グルコシド結合を加水分解する酵素、イソアミラーゼ [EC. 3. 2. 1. 68] やプルラーナーゼ [EC. 3. 2. 1. 41] は酵母、細菌、放線菌、植物に発見されていた²⁾。カビにもこのような枝切り酵素（枝切りアミラーゼ）が存在するだろうと考え検索を開始した。もともとカビは強力な α -アミラーゼやグルコアミラーゼを生産するので、可溶性モチゴメ澱粉のヨウ素との呈色が赤褐色から青褐色に変化する割合を測定するいわゆる小林法ではなくて、プルランを基質に用いる

* 東京農工大学農学部農芸化学科生物化学研究室
(183 東京都府中市幸町 3-5-8)

Fig. 1. Patterns of enzymatic hydrolyses of pullulan.

1) glucoamylase, 2) pullulanase, 3) isopullulanase, 4) *Thermoactinomyces vulgaris*-amylase. ○, glucose; ⊙, reducing end; —, α -1,4-glucosidic linkages; |, α -1,6-glucosidic linkage.

方法で検索した。その結果, *Aspergillus niger* ATCC-9642 の生産するプルラン分解酵素はいわゆるイソアミラーゼやプルラーゼと異なり, プルランの α -1,6-結合に隣接する還元性末端側の α -1,4-結合を特異的に加水分解することを発見した³⁾。これとを同じくして, 同じ考え方で別の *A. niger* 株から同じ酵素が辻阪先生らも発見された⁴⁾。

プルランの酵素的分解型式⁵⁾は4種考えられる (Fig. 1)。1971年に *A. niger* から発見されたプルラン分解酵素は3)の型式でプルランの α -1,4-結合を分解して, イソパノースを生成するので, 通称名 isopullulanase, 系統名 pullulan 4-glucanohydrolase [EC. 3.2.1.57]と命名された。また, 当時4)の型式でプルランを分解する酵素は発見されていなかった。しかし, 1978年 Shimizu ら⁶⁾は *Thermoactinomyces vulgaris* α -アミラーゼがプルランの α -1,4-結合を切断してパノースを生成することを明らかにした。この α -アミラーゼに関する著者らの研究についても後述する。

1) イソプルラーゼの精製⁷⁾

A. niger ATCC-9642 を 30°C で3日間培養した小麦麴麩に10倍量の冷水を加え酵素を抽出した。その抽出液を30°C 以下で1/10容量以下まで減圧濃縮し, 濃縮液に冷アセトン (-20°C) を43%濃度になるまで加えて, 酵素を沈殿させ, 粗酵素粉末とした。粗酵素粉末 0.5g を10ml の5mM クエン酸緩衝液 (pH 3.8) に溶解後, 同緩衝液で一夜透析した。透析酵素を同緩衝液で平衡化した *p*-セルロース (2×30cm) に吸着させ, 食塩濃度0から0.3Mまで上昇させて, 酵素を溶出した。この操作で, 粗酵素標品に含まれているマルトース分解活性の99%以上は除去できる。

活性画分をコロジオンバッグで濃縮後 10mM の酢酸

Fig. 2. Gel filtration of isopullulanase on Sephadex G-150.

The concentrate of the isopullulanase eluted from DEAE-cellulose column was applied on a Sephadex G-150 column (2×70cm) equilibrated with 0.01M sodium acetate buffer (pH 5.5). The elution was performed by the same buffer at flow rate 10 ml/hr, and 3.0 ml fractions were collected.

緩衝液 (pH 5.5) で一夜透析後, 同緩衝液で平衡化した DEAE-セルロース (2×30cm) に吸着させた。食塩濃度を0から0.3Mまで上昇させて酵素を溶出させた。この操作により得られた酵素標品にはマルトース分解活性は全く認められなかった。

活性画分をコロジオンバッグで濃縮後, 10mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) で緩衝化したセファデックス G-150 (2×70cm) でゲル濾過した (Fig. 2)。精製酵素は比活性 48 U/mg で, 小麦麴麩水抽出液の比活性より430倍上昇した。収率は3.5%であった。この酵素標品にはマルトース分解活性はもちろんのことアミラーゼ活性, デキストラゼ活性, トランスグルコシダーゼ活性も認め

Fig. 3. Effect of pH on isopullulanase.

The enzyme (isopullulanase) eluted from Sephadex G-150 column was incubated at 40°C with 0.2 ml of 5% pullulan solution and 0.3 ml of 0.2M KCl-HCl buffer at pH 1.1-2.7 (●), 0.2M glycine-HCl buffer at pH 2.4-3.5 (△), or 0.2M sodium acetate buffer at pH 2.4-6.0 (○).

られなかった。

2) イソプルラーゼの分子特性

イソプルラーゼの至適 pH は 3.0~3.5 である (Fig. 3)。至適温度は pH 3.5 の 30 分間の酵素反応では 40℃ 付近と求められた。酵素を 30℃ で 24 時間保持すると pH 2.3~6.0 で安定であった。また、pH 3.7 で 30 分間保持すると 55℃ まで安定であり、この酵素は中性~アルカリ性側より酸性側で安定であった。バイオゲル P-150 によるゲル濾過法で求めた分子量は約 74,000 となった。イソプルラーゼはプルランに endo-wise に作用して、最終生成物としてイソパノースを作用することを明らかにした。これらのイソプルラーゼの分子的特性を Table 1 にまとめて示す。

Table 1. Enzymatic properties of isopullulanase from *Aspergillus niger*.

Optimum pH	3.0-3.5
Optimum temperature	40℃
pH stability	2.1-8.0 (40℃) 2.3-6.0 (30℃)
Thermal stability	~55℃ (pH 3.7) ~40℃ (pH 6.0)
Molecular weight	74,000
Action mode	endo-wise

Fig. 4. Action pattern of isopullulanase from *Aspergillus niger*.

○, glucose unit; ⊙, reducing end; —, α-1,4-glucosidic linkage; |, α-1,6-glucosidic linkage; ↓, site of enzymatic attack.

3) イソプルラーゼの基質特異性

イソプルラーゼはプルラン中の α-1,6-結合の還元性末端側の α-1,4-結合に特異的に作用してイソパノースを生成する。そこで、イソプルラーゼのプルランに対する作用を、Nelson-Somogyi 法による還元糖の増加、オストワルド粘度計による反応液の粘度変化の測定で追跡した。その結果、反応初期において反応液の粘度が、還元糖の生成量に比べて、急激に低下することが観測された。この事実は、イソプルラーゼは exo-wise というのよりむしろ endo-wise にプルランに作用することを示している。

さらに基質特異性を明らかにするために、構造の明らかな α-1,4-: -1,6-グルコオリゴ糖に酵素を作用させた。その結果 (Fig. 4), イソプルラーゼはパノース (6²-α-グルコシルマルトース), 6³-α-グルコシルマルトリオース, 6²-α-マルトシルマルトースに作用して、それぞれ、イソマルトースとグルコース、イソマルトースとマルトース、イソパノースとグルコースを生成した。しかし、6²-α-マルトシルマルトースの C-6 位で α-1,6-結合に関与しているグルコースの C-4 位にグルコシル基が結合した 6²-α-マルトシルマルトリオースには全く作用しなかった。さらに、イソパノース (6-α-マルトシルグルコース), イソマルトリオース, イソマルトース, マルトリオース, マルトースにも作用しなかった。イソプルラーゼの基質特異性が非常に厳格であることがわかる。

2. プルランの生合成

Aureobasidium pullulans (旧名 *Pullularia pullulans*) の生産する多糖プルランはマルトリオースが α-1,6-結合で連なっている粘性ホモグルカンであると報告されていた⁸⁾。そこで、3 種の菌株 S-1 (九州大学の上田誠之助先生より恵与), OUT 4242, IFO 6353 がショ糖から菌体外に生産するプルランを精製し、プルランの構造の均一性を検討した⁹⁾。3 菌株の精製プルランを *Klebsiella pneumonia* のプルラーゼや *A. niger* のイソプルラーゼで分解し、生成オリゴ糖をペーパークロマトグラフィーで同定した。次に、過ヨウ素酸分解により 3 種のプルランの α-1,6-結合と α-1,4-結合の割合を比較した。それらの結果から、プルランは枝分れ構造をもたず (Fig. 1 参照), マルトリオースを 93~95%, マルトテトラオースを 5~7% 含む直鎖構造をとり、菌株によらず同じ構造をしていることを明らかにした。

A. pullulans S-1 株のアセトン菌を pH 6.0, 30℃ で

Table 2. Pullulan synthesis from nucleotide sugar by cell-free extract from *Aureobasidium pullulans*.

Substrate and additives	Yield of pullulan(%) (pullulan/nucleotide sugar)
UDPG + ATP(phosphate buffer)	54
UDPG + ATP(Tris-HCl buffer)	38
- ATP	0
ADPG + ATP	0
- ATP	0

10% ショ糖に作用させるとプルランが生成した。そこで、S-1 株の無細胞抽出液を用いてプルランの生合成を検討した結果、ショ糖から直接プルランは合成されないが ATP が存在すると UDPG からプルランが合成されることが明らかになった (Table 2)。さらに、プルランの生合成に糖脂質中間体が関与していることを示唆した¹⁰⁾。最近、Catley と McDowell¹¹⁾ は α -1,4-: -1,6-グルコオリゴ糖-脂質中間体の存在を推測している。

3. アミラーゼの新しい作用

1) *Thermoactinomyces vulgaris* α -アミラーゼ

Thermoactinomyces vulgaris の α -アミラーゼ (TVA) は澱粉に作用してマルトースを多量に生成するのみならずプルランに作用してパノースを生成する新規な α -アミラーゼ [EC. 3.2.1.1] として Shimizu ら⁹⁾ が 1978 年に報告した (Fig. 1 を参照)。著者らは Shimizu らの方法を改良して、*T. vulgaris* の培養液から DEAE-セルロース (pH 5.5), CM-セルロース (pH 5.0), DEAE-セルロース (pH 7.5) によるイオン交換クロマトグラフィーおよびバイオゲル P-100 (pH 5.0) によるゲル濾過 (Fig. 5) で TVA を精製した。精製 TVA の比活性は培養上澄の比活性の 1500 倍以上に上昇した。精製標品はディスク電気泳動および SDS 電気泳動で単一バンドを示した¹²⁾。

TVA の短鎖アミロース (DP=17) とプルランに対する K_m および V を Lineweaver-Burk プロットから求めた。短鎖アミロースに対する K_m 値, V 値はそれぞれ 16 mM グルコース当量, 0.18 mM グルコース当量/分, プルランに対する K_m 値, V 値はそれぞれ 20 mM グルコース当量, 0.06 mM グルコース当量/分と求められた。そこで短鎖アミロースの濃度を 6.8 mM グルコース当量と固定し、プルランの濃度を 0 から 27 mM グルコース当量まで変化させ反応速度を測定した。その結

Fig. 5. Chromatography of *Thermoactinomyces vulgaris* α -amylase on Bio-Gel P-100.

The dialyzed enzyme solution after rechromatography on DEAE-cellulose was applied on Bio-Gel P-100 column (2×54 cm) bufferized with 50 mM acetate (pH 5.0) containing 5 mM CaCl_2 . Elution performed with the same buffer at a flow rate of 3.8 ml/cm² hr, and 1.6 ml fractions were collected. $\blacktriangle$, starch-saccharifying activity; $\square$, pullulan-hydrolyzing activity; $\circ$, absorbance at 280 nm.

Fig. 6. v vs. s plot for mixed substrates.

Concentration of substrate is expressed as glucose equivalent (ge). The concentration of short chain amylose was fixed at 6.8 mM and the concentration of pullulan was varied from 0 to 27 mM. Values of K_m and V used to calculate the theoretical values of the initial rate were, respectively, 15 mM and 0.18 mM/min for short chain amylose, and 20 mM and 0.06 mM/min for pullulan. $\circ$, observed; solid line, calculated from the single site model; dotted line, calculated from the two site model. mMge, mM of anhydro-glucose unit.

果を Fig. 6 に示す。実測値 (○) は二つの基質アミロースとプルランが TVA の同一の活性部で触媒されるとした場合の速度式から求めた曲線 (実線) とよく一致した¹²⁾。

プルランをイソプルラーナーゼで部分分解した α -1,4-: -1,6-グルコオリゴ糖 (イソパノース, およびイソパノースの重合体の混合物) に対する TVA の作用を 2 次元ペーパークロマトグラフィーの手法を用いて検討した。その結果, イソパノースのみならず六糖類, 九糖類, …からそれぞれマルトースが生成した。このことから, TVA は非還元性末端のマルトースを認識して α -1,6-結合を切断していることが示された。すなわち, この α -アミラーゼが直接 α -1,6-グルコシド結合を加水分解していることがわかる¹³⁾。

2) *Pseudomonas stutzeri* のマルトテトラオース生成アミラーゼ

マルトテトラオース生成アミラーゼ [EC. 3. 2. 1. 60] は 1971 年に Robyt と Ackerman¹⁴⁾ により *Pseudomonas stutzeri* NRRL B 3389 から発見された。この酵素は β -アミラーゼ, グルコアミラーゼに次いで第 3 番目のエキソ型アミラーゼとして注目を集めた。その後約 10 年間このアミラーゼに関する研究はほとんどなされなかった¹⁵⁾。著者らはこのエキソ型のアミラーゼの澱粉からの生成物が α -あるいは β -アノマーであるかを明らかにするためにこの酵素の研究を始めた。

Robyt と Ackerman の培地組成で *P. stutzeri* NRRL B 3389 を 30℃ で培養した上澄に, トウモロコシ澱粉を加えて酵素を吸着させた。酵素吸着澱粉に 5 mM CaCl_2 溶液を加え, 40℃ で 20 分懸濁して酵素を溶出させた。溶出液の酵素は硫酸アンモニウム塩析 (45% 飽和) で沈殿させ, Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) で透析した。透析液をセファデックス G-100 によるゲル濾過および 2 回の DEAE-セルロースクロマトグラフィーで酵素を精製した。培養液中に認められた 2 成分 (F-1, F-2) のうち

Fig. 7. Polyacrylamide gel electrophoreses of *Pseudomonas stutzeri* maltotetraose-forming amylase eluted from the Sephadex G-100 (A) and the second DEAE-cellulose (B) column.

1, 2, PAGE; 3, SDS-PAGE. 1, 3, stained with Coomassie Brilliant Blue R solution; 2, stained with iodine-potassium iodide solution.

F-2 画分だけが電気泳動的に単一な標品として精製された¹⁶⁾ (Fig. 7)。

この精製酵素の ¹⁴C で還元性末端を標識したマルトオリゴ糖に対する作用を 2 次元ペーパークロマトグラフィーで検討した。その結果, マルトペンタオース以上のオリゴ糖に対して非還元性末端からマルトテトラオース単位で切断することが確認された。可溶性澱粉にこの酵素を作用させて, 経時的に迅速に生成物だけを集めて, その旋光度と還元糖を変旋光の前後で測定した (Table 3)。

Table 3. Mutarotation of hydrolysis products of starch hydrolyzed by *Pseudomonas stutzeri* maltotetraose-forming amylase.

Reaction time (min)	Optical rotation, angular degree			Reducing sugar ($\mu\text{mol/ml}$)	
	Before alkalization	After alkalization	Mutarotation	Before alkalization	After alkalization
0	0.712	—	—	—	—
5	1.935	1.784	-0.151	3.0	2.3
24	3.118	2.967	-0.151	10.4	8.9
40	2.735	2.478	-0.257	11.9	9.8
66	2.994	2.626	-0.258	13.4	13.2

これらの結果から α -アノマーのマルトテトラオースが酵素反応により生成したことが明らかとなった。すなわち、このマルトテトラオース生成アミラーゼは *exo*- α -amylase と考えられる¹⁶⁾。この発見後、*Klebsiella pneumoniae* のマルトヘキサオース生成アミラーゼと *Streptomyces griseus* のマルトトリオース生成アミラーゼも *exo*- α -amylase であることが示された¹⁷⁾。

4. 分枝オリゴ糖の酵素的調製法

分枝三糖のパノースやイソパノースは、従来、アミロペクチン、グリコゲン、プルランの酸加水分解物あるいはマルトースに *A. niger* NRRL337 のトランスグルコシダーゼを作用させて調製されていた。これらの方法では収率が悪く、副生物の除去に多大の労力が必要であった。著者らは特異性の高い TVA とイソプルラーゼをプルランに作用させて、パノースとイソパノースを70%あるいは90%以上の収率で得る方法を確立した¹⁸⁾。

プルラン (20 g) に TVA 60 単位を加え pH 6.0, 60°C で6日間反応させ、110°C で15分間煮沸し酵素反応を停止し、濾過してから減圧下で濃縮しシロップ状にした。また、プルラン (20 g) にイソプルラーゼ16単位を加え pH 3.5, 40°C で2日間反応させた。反応液を110°C で15分間煮沸し、酵素反応を止めてから、濾過後、減圧下で濾液を濃縮しシロップ状にした。それぞれのシロップを活性炭-セライトカラムに吸着させ 1-プロ

パノールの濃度を0から5%に上昇させてパノース、イソパノースをそれぞれ溶出させた (Fig. 8)。パノース、イソパノースの収率はそれぞれ70%, 90%以上であった。

この研究を遂行するにあたり貴重な菌株、オリゴ糖、アミラーゼインヒビター等を恵与された上田誠之助先生、山本武彦先生、松田和雄先生、貝沼圭二先生、J. F. Robyt 先生、小林昭一博士、大西正健博士、明治製菓(株)、大正製菓(株)に深く感謝致します。この研究は多くの協同研究者とともになされたものである。

文 献

- 1) 岡田巖太郎, 大西正健, 坂野好幸, 谷口 肇: 蛋白質・核酸・酵素, **29**, 853 (1984).
- 2) 小林恒夫: 醸協, **28**, 466 (1970).
- 3) Y. SAKANO, N. MASUDA and T. KOBAYASHI: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 971 (1971).
- 4) 辻阪好夫, 浜田信威: アミラーゼシンポジウム, **6**, 17 (1971).
- 5) 坂野好幸, 小林恒夫: アミラーゼシンポジウム, **6**, 25 (1971).
- 6) M. SHIMIZU, K. KANNO, M. TAMURA and M. SUEKANE: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1681 (1978).
- 7) Y. SAKANO, M. HIGUCHI and T. KOBAYASHI: *Arch. Biochem. Biophys.*, **153**, 180 (1972).
- 8) H. BENDER and K. WALLENFELS: *Biochem. Z.*, **344**, 79 (1961).
- 9) R. TAGUCHI, Y. KIKUCHI, Y. SAKANO and T. KOBAYASHI: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1583 (1973).
- 10) R. TAGUCHI, Y. SAKANO, Y. KIKUCHI, M. SAKUMA and T. KOBAYASHI: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1635 (1973).
- 11) B. CATLEY and W. MCDOWELL: *Carbohydr. Res.*, **103**, 65 (1982).
- 12) 坂野好幸, 平岩真一, 小林恒夫: 澱粉科学, **27**, 134 (1980).
- 13) Y. SAKANO, S. HIRAIWA, J. FUKUSHIMA and T. KOBAYASHI: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1121 (1982).
- 14) J. F. ROBYT and R. J. ACKERMAN: *Arch. Biochem. Biophys.*, **145**, 105 (1971).
- 15) J. SCHMIDT and M. JOHN: *Biochim. Biophys. Acta*, **566**, 88 (1979).
- 16) 坂野好幸, 柏木 豊, 榎山英二, 小林恒夫: 澱粉科学, **29**, 131 (1982).
- 17) T. NAKAKUKI, K. AZUMA and K. KAINUMA: *Carbohydr. Res.*, **128**, 297 (1984).
- 18) Y. SAKANO, M. KOGURE, T. KOBAYASHI, M. TAMURA and M. SUEKANE: *Carbohydr. Res.*, **61**, 175 (1978).

Fig. 8. Carbon-Celite column chromatography of pullulan hydrolyzates.

(a) Chromatography of products of pullulan hydrolyzed by *Thermoactinomyces vulgaris* α -amylase.
(b) Chromatography of products of pullulan by *Aspergillus niger* isopullulanase.