ガラクタナーゼとその糖転移反応に関する研究

中 野 博 文*

Studies on Galactanases and Their Transfer Reaction

Hirofumi NAKANO

*Osaka Municipal Technical Research Institute
(6-50, Morinomiya, 1-chome, Joto-ku, Osaka 536, Japan)*

1. Galactanases from *Penicillium citrinum* and *Bacillus subtilis* were purified and characterized. Two galactanases from *P. citrinum* had essentially the same properties and hydrolyzed β -1, 4-galactosidic linkages of soybean arabinogalactan (SAG) in an endo-manner. *B. subtilis* galactanase was an exo-enzyme which hydrolyzed SAG and oligosaccharides to produce galactobiose from the non-reducing ends.

2. Transfer reaction catalyzed by the galactanases were studied. The *P. citrinum* enzyme degraded *o*-nitrophenyl- β -galactoside after a lag phase. A reaction mechanism which involved transglycosylation in addition to hydrolysis was proposed. The endo- and exo-galactanases showed broad acceptor specificities and transglycosylated various alcohols, phenols, sugar alcohols, and saccharides. Structural feature of the products from glycerol was different among the galactanases and *Escherichia coli* β -galactosidase: the galactanases transglycosylated preferentially the secondary OH-group of glycerol rather than primary OH-groups which were almost specifically transgalactosylated by the β -galactosidase.

3. Glycosides with glycerol and trimethylolpropane (TMP) moieties, which were prepared by the transfer reaction, acted as effective substrates for the lipase-catalyzed esterification.

1. はじめに

ガラクタナーゼはいわゆるヘミセルラーゼの一種であり、植物の細胞壁などに存在するガラktan系多糖の主鎖ガラクトシド結合を加水分解する酵素である。この酵素の活性は主に細菌や植物病原菌である糸状菌などの微生物に見出され、基質となる多糖の加水分解作用を中心に研究が行われてきた¹⁾。そこで本研究では、この酵素の応用途の一つとして糖転移反応に着目した。

まず *Penicillium* (*P.*) *citrinum*²⁾ および *Bacillus* (*B.*) *subtilis*³⁾ に属するそれぞれ一菌株をガラクタナーゼ生産菌として選択した。両起源の酵素とも豆腐糟（おから）から調製したダイズアラビノガラktan (SAG) を加水分解するとともに、適当な受容体の存在下では、

強い転移活性を示した。そこでこれらを精製し、諸性質を検討した。次に両酵素の糖転移作用によるさまざまなガラクトオリゴ糖合成の可能性を示した。さらに転移生成物を原料とするグリセロ糖脂質の合成を試みた。

2. ガラクタナーゼの性質^{2,3)}

P. citrinum はフスマ培養、*B. subtilis* は脱脂ダイズ粉を含む培地を用いた液体培養をそれぞれ行くと、ガラクタナーゼを分泌した。まず両起源の酵素を電気泳動的に均一となるまで精製し、諸性質を調べた (Table 1)。*P. citrinum* のガラクタナーゼは、PAGE でわずかに易動度が異なる 2 種類の酵素 (I, II) に分画されたが、両酵素の酵素化学的な性質に本質的な差は認められなかった。そこで以降は I を用いた。*B. subtilis* の酵素は、等電点やその他の性質が *P. citrinum* の酵素と多少異なっていた。しかし基質特異性では、両起源の酵素とも主鎖

* 大阪市立工業研究所 (536 大阪市城東区 森之宮 1-6-50)

Table 1. Summary of properties of galactanases from *Penicillium citrinum*²⁾ and *Bacillus subtilis*.³⁾

Properties	<i>P. citrinum</i>		<i>B. subtilis</i>
	I	II	
Specific activity (U/mg)	238	244	67.4
Isoelectric point	4.20	4.22	7.9
Molecular weight	35000	35000	36000
Optimum pH	4.5	4.5	6.5
pH stability	4-10	4-10	6-10
Optimum temperature (°C)	55	55	60
Thermal stability (°C)	55	55	55
Inhibitor	Hg ²⁺ , Fe ³⁺	Hg ²⁺ , Fe ³⁺	Hg ²⁺ , Fe ³⁺ , pCMB
Substrate specificity			
Soybean AG (K_m , %)	+(0.055)	+(0.044)	+(0.106)
Coffee bean AG	—	—	—
Loach wood AG	—	—	—
Gum arabic	—	—	—
ONPG	+(lag)	+(lag)	—
PNPG	+(lag)	+(lag)	—
Gal ₂	+(lag)	+(lag)	—
Lactose	—	—	—
Product	Gal-Gal ₄	Gal-Gal ₄	Gal ₂ ≫Gal ₄
Anomer type	β	β	β
Action pattern	endo	endo	exo

が β -1,4-ガラクトシド結合から構成されている SAG を分解し、 β -1,3 結合を含む多糖には作用しなかった。したがってこれらは β -1,4-ガラクターナーゼ [EC 3.2.1.89] に分類されると考えられた。

両酵素はまったく異なる作用様式を示した。SAG からの生成物を GPC モードの HPLC で分析した結果を Fig. 1 に示す。*P. citrinum* の酵素は、ガラクトース (Gal) および一連のガラクトオリゴ糖を生成するエンド型酵素であった。一方 *B. subtilis* の酵素を作用させた場合、中間生成物は観察されず、ガラクトビオース (Gal₂) が反応の全期間で著量蓄積した。なお少量の Gal₄ は Gal₂ を受容体とする転移反応により生成すると推定された。さらに *B. subtilis* の酵素を、還元末端が *o*-nitrophenyl (ONP) 基で置換されたガラクトオリゴ糖 (Gal₂-ONP ~ Gal₅-ONP) に作用させた場合も、Gal₂-ONP と Gal₄-ONP からのみ ONP が生成した。したがってこの酵素が基質の非還元末端からガラクトビオース (Gal₂) 単位で切断するエキソ型酵素であることが明らかになった。従来単純なエキソ型の作用様式を示す β -1,4-ガラクターナーゼの報告はなく、本酵素は新規な例であった。

基質として使用した SAG に関しては、主鎖を構成する 4 残基の Gal に対して、平均 2 残基のアラビノース側鎖が存在する構造が提唱されてきた⁴⁾。しかし両ガラクターナーゼによる分解生成物としてアラビノースを含むヘテロオリゴ糖は検出されなかった。またエキソ型ガラクターナーゼを十分に作用させ (分解限度、約 40%)、透析後、残存する多糖にエンド型ガラクターナーゼを作用させたが、分解は認められなかった³⁾。これらの結果は、SAG のアラビノース側鎖の割合が従来推定されていたほど高くなく、むしろ直鎖ガラクトン部分とアラビナン部分からなるとする構造⁵⁾を支持した。

3. ガラクターナーゼの糖転移反応

1) *P. citrinum* ガラクターナーゼによる低分子ガラクトシドの分解⁶⁾

P. citrinum のエンド型酵素は、基質特異性の一部として *o*-nitrophenyl- β -D-galactoside (ONPG)、*p*-nitrophenyl- β -D-galactoside (PNPG)、Gal₂ などの 2 糖類に相当する低分子ガラクトシドを分解した^{2,6)}。しかもその際の反応初期には生成物がほとんど認められないラグ

Fig. 1. Comparison of the hydrolysis products of SAG by *P. citrinum* and *B. subtilis* galactanases.

The reaction and analytical conditions were described in Ref. 3.

(lag) 期が観察された。ラグ期は基質濃度が増加すると短縮する傾向がみられ、また ONPG と Gal₃, Gal₄, SAG などがそれぞれ共存すると、通常の分解曲線が得られた。Fig. 2 に ONPG 分解の際の生成物を TLC で分析した結果を示す。ONP が生成する期間には、さまざまな ONP 置換オリゴ糖やその分解物の消長が観察された。これらの結果から次のような分解機構を推定した。本酵素は本来多糖を良好な基質とするため、重合度が低い ONPG には非常に作用しにくい。しかしこの律速段階の後、ONPG を受容体、供与体とする転移反応で、本酵素が作用しやすいオリゴ糖が生成すると、これが基質となり、転移、加水分解両反応が速やかに進行し始めると考えられた。なお一定条件下で無機水銀により本酵素の SH 基を修飾するとこのような低分子ガラクトシドに対する活性のみが増加する特異な現象も見出された^{7,8)}。

2) 受容体特異性⁹⁻¹¹⁾

2 種類のガラクターナーゼの受容体特異性^{9,10)}を Table 2 に示す。両酵素ともさまざまな脂肪族アルコール類、糖アルコール類、糖類に対して広い受容体特異性を示した。特異性と受容体の構造に明確な関係は認められなかったが、受容体としての効率が相対的に異なること、また 2-propanol など受容体とならない化合物もあることから、酵素によるなんらかの構造的な認識は行われていると考えられた。転移生成物の重合度は両酵素の作用

Fig. 2. Thin-layer chromatogram of products from ONPG formed by *P. citrinum* galactanase.⁶⁾

The reaction and analytical conditions were described in Ref. 6. M1, Marker (ONPG, Gal₃-ONP, Gal₅-ONP); M2, Marker (Gal₂-ONP, Gal₄-ONP); M3, Marker (Gal-Gal₄).

Table 2. Acceptor specificity of galactanases from *P. citrinum*⁹⁾ and *B. subtilis*.¹⁰⁾

Compound	Product		Compound	Product	
	Pc	Bs		Pc	Bs
Methanol	++	++	Erythritol	##	##
Ethanol	++	++	<i>myo</i> -Inositol	++	##
Ethylene glycol	##	##	D-Ribitol	+	ND
1-Propanol	++	+	D-Galactitol	+	ND
2-Propanol	—	—	D-Glucitol	+	ND
1, 2-Propanediol	##	++	D-Ribose	##	++
1, 3-Propanediol	++	++	D-Xylose	##	++
Glycerol	##	##	L-Arabinose	##	++
1-Butanol	++	+	D-Lyxose	##	++
2-Butanol	—	—	D-Galactose	##	##
1, 2-Butanediol	##	++	D-Glucose	++	++
1, 3-Butanediol	++	++	D-Mannose	++	+
1, 4-Butanediol	++	++	D-Fructose	—	+
2, 3-Butanediol	++	++	D-Fucose	##	+
1, 2-DHB	##	++	Lactose	++	++
1, 3-DHB	##	++	Maltose	+	++
1, 4-DHB	##	++	Sucrose	+	+

Pc, *P. citrinum* enzyme ; Bs, *B. subtilis* enzyme ; ND, not determined ; DHB, dihydroxybenzene.

Table 3. Acceptor specificity of *P. citrinum* galactanase and several β -galactosidases toward phenols.¹¹⁾

Acceptor (%)	Transfer product				
	Pc	Ec	Bc	Ao	Pm
1, 2-DHB (1)	##	+	+	+	+
1, 3-DHB (1)	##	+	+	+	+
1, 4-DHB (1)	##	+	—	+	+
1, 2, 3-THB (1)	##	+	+	+	+
1, 3, 4-THB (1)	++	+	+	+	+
HB (2. 5)	+	—	—	—	—
2-HBAD (5)	—	—	—	—	—
3-HBAD (5)	##	—	+	+	+
4-HBAD (5)	++	—	+	+	+
2, 3-DHBAD (1)	—	—	—	—	—
2, 4-DHBAD (1)	+	—	—	—	—
2, 5-DHBAD (1)	+	—	—	—	—
2, 6-DHBAD (1)	—	—	—	—	—
3, 4-DHBAD (1)	++	+	+	—	—
3, 5-DHBAD (1)	++	+	+	—	—
2, 3, 4-THBAD (1)	+	—	—	—	—
2, 4, 6-THBAD (1)	+	—	—	—	—
3, 4, 5-THBAD (1)	##	+	+	—	—

HB, hydroxybenzene ; HBAD, hydroxybenzoic acid ; DH, dihydroxy ; TH, trihydroxy ; Pc, *P. citrinum* galactanase ; Ec-Pm : β -galactosidases from *E. coli*, *B. circulans*, *A. oryzae* and *P. multicolor*.

様式が異なるため、当然相違が認められた。すなわち *P. citrinum* のエンド型酵素を用いた場合、Gal 残基の重合度が異なる一連のオリゴ糖が、また *B. subtilis* のエキソ型酵素を用いた場合は、Gal₂ 単位で糖鎖が延長したオリゴ糖がそれぞれ生成した。

さらに両酵素ともフェノール性水酸基への転移反応も触媒した。とくに *P. citrinum* のエンド型ガラクターゼを用いた場合¹¹⁾、代表的な数種類の β -ガラクトシダーゼと比較して、広範な芳香族化合物が受容体として有効であっただけでなく、多量の転移生成物の蓄積が認められた (Table 3)。これはガラクターゼによる低分子量の転移生成物の加水分解速度が、 β -ガラクトシダーゼよりきわめて遅いことが原因の一つであると考えられた。

3) グリセロールへの転移反応^{10,12)}

両起源のガラクターゼともグリセロールへの転移反応を効率よく触媒した。すなわちいずれの酵素の場合も、グリセロール濃度 5% で、転移効率は約 60% であった。2種類のガラクターゼおよび *Escherichia coli* の β -ガラクトシダーゼによるグリセロールへの転移生成物を比較した (Fig. 3)。 β -ガラクトシダーゼを用いた場合、グリセロールの 1(3) 位の水酸基に Gal が結合したものが、全転移生成物の約 90% を占めた。一方エンド型ガラクターゼでは、グリセロールの 2 位水酸基に Gal あるいは Gal₂ が結合したものが全体の約 80% 生成した。*B. subtilis* のエキソ型ガラクターゼでは、糖残基の結合位置における特異性は他の酵素より低く、グリセロールの 1 級および 2 級水酸基に Gal₂ 残基をそれぞれ約 1 対 2 の割合で転移した。この比率は受容体濃度や反応時間によらずほぼ一定であった。なお ¹³C-NMR による構造解析の結果、1 級水酸基への転移生成物は 1 位、3 位に 1 残基の Gal₂ がそれぞれ結合した異性体の混合物であった¹⁰⁾。

4. グリセロ糖脂質およびその類縁体の酵素的な合成¹³⁻¹⁵⁾

グリセロールへの転移生成物を、脂質分解酵素の 1 種であるリパーゼによりエステル化し、グリセロ糖脂質の合成を試みた。なおポリオールとしては、糖転移、エステル化両反応において良好な効率を示すトリメチロールプロパン (TMP) も使用した。ポリオールと糖からなるグリコシド類の調製には、ガラクターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 α -グルコシダーゼ、 β -フラクトシダーゼなどの加水分解酵素、ならびにシクロデキストリン合成酵素の糖転移反応を利用した。*Candida cylindracea* 由来の

Fig. 3. Comparison of transfer products of glycerol formed by exo-, endo-galactanases and *E. coli* β -galactosidase.

Reaction and analytical conditions were described in Ref. 10. 1-MG, 1(3)-O- β -galactosyl glycerol; 2-MG, 2-O- β -galactosyl glycerol; 1-DG, O- β -galactosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -galactosyl-[1 $\rightarrow$ 1(3)]-glycerol; 2-DG, O- β -galactosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -galactosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-glycerol.

リパーゼによるオレイン酸エステルの合成結果を Table 4 に示す。ショ糖やメチルグリコシドと比較して、ポリオール、とくに TMP を含むグリコシドは高いエステル合成率を示した。また合成率は糖残基の種類や結合様式よりも、含まれるポリオールの種類と糖残基の重合度に大きく依存した。なお、脂肪酸としては、オレイン酸の他、炭素数 8~12 の中鎖飽和脂肪酸も有効であった。生成物としてはモノ、ジ、トリエステルが確認された。またモノエステルではポリオール残基がエステル化されたものが優先的に生成した。

5. おわりに

ガラクトース残基を含むオリゴ糖や配糖体の酵素的な合成には、 β -ガラクトシダーゼが用いられている。本研

Table 4. Synthesis of glycosides by transglycosylation and their esterification by *Candida cylindracea* lipase.

Glycoside	Enzyme	Donor	Component	Oleic ester synthesis (%)
Sucrose	—	—	Glc, Frc	0.2
Glc- α -Me	—	—	Glc, MeOH	2.3
Gal- β -Me	—	—	Gal, MeOH	1.9
Glycerol(Gl)	—	—	—	83.3
Gal-1-Gl	β -Galactosidase	Lac	Gal, Gl	19.1
Gal ₂ -1-Gl	Exo-galactanase	SAG	2Gal, Gl	6.8
Gal-2-Gl	Endo-galactanase	SAG	Gal, Gl	13.7
Gal ₂ -2-Gl	Endo-galactanase	SAG	2Gal, Gl	5.6
Glc-1-Gl	α -Glucosidase	Starch	Glc, Gl	23.0
TMP	—	—	—	77.1
Glc-TMP	CGTase	Starch	Glc, TMP	58.0
Glc ₂ -TMP			2Glc, TMP	39.8
Glc ₃ -TMP			3Glc, TMP	3.3
Gal-TMP	β -Galactosidase	Lac	Gal, TMP	43.4
Gal ₂ -TMP	Exo-galactanase	SAG	2Gal, TMP	41.9
Frc-TMP	β -Fructosidase	Suc	Frc, TMP	63.1

Enzyme origins, reaction conditions and abbreviations for glycosides were described in Ref. 13-15.

究によりガラクトナーゼの中にも比較的強い糖転移活性を示すものがあり、しかも β -ガラクトシダーゼと転移の効率や生成物が異なる場合があることがわかった。したがってガラクトナーゼのこのような特異性を有効に活用することができれば、前述のような目的への応用も可能ではないかと考えられる。今後、有機化学的な手法だけでは達成することが困難な化合物の合成など、糖転移反応の利用範囲を広げることも試みたいと考えている。

本研究を進めるにあたり、ご指導と多くの激励を賜りました園田学園女子短期大学教授 渡辺保人博士（元大阪市立工業研究所長）、榊林原総合研究所副社長 辻坂好夫博士（元当研究所長）、江崎グリコ㈱・生物化学研究所長 岡田茂孝博士（元当研究所生物化学課長）に厚く御礼申し上げます。また終始ご指導とご助言をいただきました当研究所、竹西繁行博士、北畑寿美雄博士、富永嘉男博士ならびに生物化学課の諸氏、共同研究者の方々に深く感謝申し上げます。最後に恩師、九州大学名誉教授、現熊本工業大学教授 上田誠之助博士に深謝いたします。

文 献

- 1) R. F. H. DEKKER and G. N. RICHARDS : *Adv. Carbohydr. Chem.*, **32**, 277-352 (1976).
- 2) H. NAKANO, S. TAKENISHI and Y. WATANABE : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3445-3454 (1985).
- 3) H. NAKANO, S. TAKENISHI, S. KITAHATA, H. KINUGASA and Y. WATANABE : *Eur. J. Biochem.*, **193**, 61-67 (1990).
- 4) M. MORITA : *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 626-630 (1965).
- 5) J. M. LABAVITCH, L. E. FREEMAN and P. ALBERSHEIM : *J. Biol. Chem.*, **251**, 5904-5910 (1976).
- 6) H. NAKANO, S. TAKENISHI and Y. WATANABE : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 3005-3012 (1986).
- 7) H. NAKANO, S. TAKENISHI and Y. WATANABE : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1077-1083 (1987).
- 8) H. NAKANO, S. TAKENISHI and Y. WATANABE : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1865-1870 (1987).
- 9) H. NAKANO, S. TAKENISHI and Y. WATANABE : *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1319-1322 (1988).
- 10) H. NAKANO, S. KITAHATA, H. KINUGASA, Y. WATANABE, H. FUJIMOTO, K. AJISAKA and S. TAKENISHI : *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2075-2082 (1991).
- 11) H. NAKANO, S. KITAHATA, H. OHGAKI and S.

- TAKENISHI : 澱粉科学, **39**, 1-6 (1992).
- 12) H. NAKANO, S. TAKENISHI and Y. WATANABE : *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1913-1921 (1988).
 - 13) H. NAKANO, S. KITAHATA, Y. TOMINAGA and S. TAKENISHI : *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2083-2089 (1991).
 - 14) H. NAKANO, S. KITAHATA, Y. TOMINAGA, Y. KIKU, K. ANDO, Y. KAWASHIMA and S. TAKENISHI : *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 237-238 (1992).
 - 15) 規矩夕美, 中野博文, 安藤健司, 川嶋右次, 北畑寿美雄, 富永嘉男, 竹西繁行 : 日本澱粉学会講演要旨集, p. 25, 東京 (1991).

(平成4年9月24日受理)