[J. Appl. Glycosci. (応用糖質科学), Vol. 46, No. 2, p. 169-178 (1999)]

糖質関連酵素化学シンポジウム

Corticium rolsii のグルコアミラーゼに関する研究*

永坂曜介**, 村木信子**, 木村淳夫¹, 北本勝ひこ², 横田 篤, 富田房男***

北海道大学農学部生物機能化学科 (060-8589 札幌市北区北9条西9丁目)

¹北海道大学農学部生命科学科 (060-8589 札幌市北区北9条西9丁目)

²東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 (113-8657 東京都文京区弥生1-1-1)

Study of Glucoamylase from *Corticium rolsii**

Yosuke Nagasaka,** Nobuko Muraki,** Atsuo Kimura,¹
Katsuhiko Kitamoto,² Atsushi Yokota and Fusao Tomita***

Department of Bioscience and Chemistry, Faculty of Agriculture, Hokkaido University
(Kita-9 Nishi-9, Kita-ku, Sapporo 060-8589, Japan)

¹Department of Applied Bioscience, Faculty of Agriculture, Hokkaido University
(Kita-9 Nishi-9, Kita-ku, Sapporo 060-8589, Japan)

²Department of Biotechnology, Graduate School for Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo
(1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan)

Corticium rolsii AHU 9627 secretes strong raw-starch-saccharifying enzyme (RSSE) that is superior to other enzymes. The RSSE consisted of five forms of glucoamylase (G1-G5) and a small amount of α -amylase. These glucoamylases showed nearly identical characteristics, except that G4 and G5 were unable to hydrolyze raw starch. A cDNA coding for *C. rolsii* glucoamylase G2 was cloned. This clone (CG 15) contains an entire coding region for a polypeptide of 579 residues, which has catalytic domain and starch-binding domain like other glucoamylases from filamentous fungi. Some differences were observed in the starch-binding domain and in the linker region between catalytic domain and the starch-binding domain. The obtained cDNA was introduced into *Saccharomyces cerevisiae* AH 22. The transformants acquired starch-saccharifying ability. The amount of secreted glucoamylase, however, was very small (0.001 U/mL). Therefore the cDNA was introduced into *Aspergillus oryzae* for better production. Through optimization of the culture conditions, the amount of recombinant glucoamylase obtained in the culture supernatant reached 100 mg/L (3.5 U/mL). The glucoamylase G2 secreted from *A. oryzae* (G2AO) had almost the same specific activity as native G2 from *C. rolsii*. Thermal and pH stabilities of G2AO, however, were significantly lower than those of native G2. To clarify domain relationships and to compare their properties with those of other glucoamylase, two chimeric glucoamylases whose domains were interchanged with that of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* glucoamylase (GAI) were made, and their enzymatic characteristics were investigated. The chimeric glucoamylases showed the pH and thermal stabilities similar to those of glucoamylases from which their catalytic domain derived. Native G2, GAI secreted from *A. oryzae*, and two chimeric glucoamylases showed a similarly good rate of hydrolysis of raw potato starch, although G2AO showed a significantly lower rate of hydrolysis.

*"Proceedings of the Symposium on Amylases and Related Enzymes, 1998."

**Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science.

***Corresponding author.

1. はじめに

従来、工業的に澱粉を糖化する場合、30-40%の生澱粉懸濁液を加熱蒸煮により糊化させ、 α -アミラーゼを作用させて液化した後、グルコアミラーゼを作用させるという方法が取られてきている。しかしながら、この方法は加熱蒸煮の過程で多大なエネルギーを必要とすること、また2種類のアミラーゼの作用 pH および温度が異なるため生産工程が煩雑であることなどから、省エネルギーかつ効率的な製法への改良が課題となっている。そこで生澱粉分解性グルコアミラーゼを用い、蒸煮をせずに一段階で糖化を行う方法（無蒸煮糖化法）が提案され、とくに酵母を併用した無蒸煮エタノール発酵という形で研究開発が進んでいる。この方法のネックとなるのは強力に生澱粉に作用し、かつ安価なグルコアミラーゼであり、現在までに多くの研究者によって、生澱粉分解性グルコアミラーゼの研究が行われてきた。

われわれの研究室でこの目的にかなう微生物を探索した結果、トマトの茎より単離した担子菌 *Corticium rolfsii* AHU 9627 が非常に優れた生澱粉糖化酵素 (RSSE) を分泌することを見いだした^{1,2)}。生澱粉分解力の一つの指標として、糊化澱粉分解活性に対する生澱粉分解活性の割合 (%) をあらわした生澱粉分解能 (RDA 値)^{1,3)} が挙げられるが、*C. rolfsii* 培養上清の RDA 値は、市販の *Rhizopus delemere* (RDA 値=14) や *Aspergillus niger* (RDA 値=4) のグルコアミラーゼ剤に比べ 32 と非常に高い値を示す¹⁾。また実際に無蒸煮糖化法に要求される条件—高濃度生澱粉懸濁液 (30%)、酸性条件下 (pH 3.0-4.0)—で強力に作用することができ、産業的に生産を試みるところまで応用が進んだものの、培養の難しさからまだ実用化には至っていない。そこで、この酵素遺伝子の有効利用、および酵素の分子構造面から生澱粉への作用機構を探ることを目的として、cDNA クローニング、および酵素遺伝子の他菌株における発現、さらにドメインごとに酵素分子を組換えたキメラ酵素の作製を行った⁴⁾。

2. 生澱粉糖化酵素 (RSSE) の成分解析

C. rolfsii の分泌する RSSE は 3 種類の生澱粉分解性グルコアミラーゼ (G1, G2, G3)、2 種類の生澱粉非分解性グルコアミラーゼ (G4, G5) と 1 種類の生澱粉非分解性 α -アミラーゼを含んでいる (Fig. 1)⁴⁾。各グルコアミラーゼを精製し、諸性質を解析した結果、G1-G3 の酵素活性に関する性質はほぼ等しく、分子量、pI 等の物理的性質にわずかな違いがみられるのみであった。G4, G5 も互いにはほぼ等しく、G1-G3 に *C. rolfsii* プロテアーゼ画分を作用させると、それぞれより G4, G5 が生成すること、5 種類のグルコアミラーゼの N-末端アミノ酸配列が同じであり、さらにアミノ酸組成がほぼ等しいことなどから G1-G5 は一つの遺伝子よりつくられる多型酵素と推定された⁴⁾。

精製後の *C. rolfsii* 生澱粉分解性グルコアミラーゼは、粗酵素 (RSSE) にくらべ生澱粉に対する作用が低下し、とくにジャガイモ生澱粉に対してはほとんど作用しなかった。そこで他の糸状菌由来の生澱粉分解性グルコアミラーゼで観察されているような、 α -アミラーゼによる相乗効果⁵⁻⁷⁾を予想し、精製酵素の生澱粉に対する作用が α -アミラーゼの添加によって粗酵素レベルまで回復するかどうかを調べた。RSSE に含まれる α -アミラーゼの量は、クロマトグラム上、

Fig. 1. DEAE-Toyopearl 650 M column chromatography of a crude enzyme.

C. rolfsii was cultivated in an optimum medium for RSSE production.²⁾ The supernatant was precipitated with ammonium sulfate and subjected to Bio-gel P-6 gel filtration,⁴⁾ then applied to DEAE-Toyopearl 650 M. Column size: 2.1×22 cm. Fraction volume: 6 mL. Equilibration: 10 mM acetate buffer (pH 5.0). Elution: linear gradient of NaCl (0-0.25 M). Flow rate: 30 mL/h.

⁴⁾ 本研究における 1) 生澱粉分解活性 (培養上清)、2) 生澱粉分解活性 (精製酵素)、3) 糊化澱粉分解活性、4) グルコアミラーゼ活性の活性測定法は、それぞれ基質として 1) 2.5%、2) 0.5%のウルチ米生澱粉、3) と 4) は 0.5%可溶性澱粉を用い、1) は 40℃、2) と 3) と 4) は 30℃で反応させ、1) と 2) と 3) は還元糖量、4) はグルコース量を測定している⁴⁾。

Fig. 2. Hydrolysis of raw starch with *C. rolfssii* glucoamylase.

Graph a, raw nonglutinous-rice starch with crude or purified enzyme; Graph b, raw potato rice starch with crude or purified enzyme; Graph c, effect of various amounts of α -amylase on raw potato starch; G2, purified glucoamylase G2; RSSE, crude enzyme; A, α -amylase fraction of *C. rolfssii*. Omitted components are indicated by dashes. The figure in front of "G2" or "RSSE" indicates the glucoamylase activity per mL of reaction mixture (U/mL). Each figure in front of "A" indicates the ratio of protein amount of α -amylase to that of glucoamylase.

A_{280} の曲線によって表される各ピークの面積比より、生澱粉分解性グルコアミラーゼ G1, G2, G3 の総量の約 1/10 であった。1% 生澱粉の加水分解実験の結果 (Fig. 2), 1/10 量の α -アミラーゼ画分の添加により

ジャガイモ生澱粉の加水分解の速度、率ともに粗酵素のレベルまで回復していることがわかった (Fig. 2, Graph a). ウルチ米澱粉に対しても同様に粗酵素レベルまでの回復が確認された (Graph b). Graph c より α -アミラーゼの添加効果は、1/50 以上の量よりほぼ頭打ちとなっていることがわかる。ただし基質に対するグルコアミラーゼの量が少なければ、添加効果の上限としての α -アミラーゼ画分のみ (わずかな G1 が混入している) の加水分解率とその酵素量とともに増大していることからより予想できる (Graph c). また *C. rolfssii* グルコアミラーゼ単独ではジャガイモ生澱粉に対してほとんど作用しないが、ごく微量 (1/250) の α -アミラーゼの存在で劇的な分解率の変化が起こることもわかる (Graph c). 一例として、グルコアミラーゼが電気泳動的に単一のバンドを示している、ジャガイモの加水分解の結果によって α -アミラーゼの混在が示唆できるほどであることを挙げておく。一般に生澱粉はその種類により酵素分解を受けやすいものと受けにくいものがあり、ウルチ米生澱粉はもっとも作用を受けやすく、ジャガイモ生澱粉はもっとも受けにくいものの一つである。どのような構造が酵素による加水分解を受けにくくしているのかについてはまだ明確な答えは見つかっていない。 α -アミラーゼの相乗効果については 1970 年代および 80 年代にすでに報告されており⁵⁻⁸⁾ α -アミラーゼの種類によらずほぼ同様の効果があることも報告⁷⁾ されているが、その機構についても、いまだ解明されていない。

3. 生澱粉分解性グルコアミラーゼの cDNA クローニング

1) cDNA クローニング

C. rolfssii の菌糸より RNA を抽出し、生産量が多く、精製の容易であったグルコアミラーゼ G2 の内部アミノ酸配列をもとに cDNA クローニングを行った⁹⁾。得られた cDNA クローンは、579 アミノ酸残基からなるポリペプチド鎖をコードしていた。他菌株由来のグルコアミラーゼとアミノ酸配列を比較した結果、*Aspergillus niger* との相同性が高かった、56% であった。

2) カタリティックドメイン

多くのグルコアミラーゼにおいて保存され¹⁰⁾ カタリティックドメインを構成する¹¹⁻¹³⁾ 領域 [S1-S5] が *C. rolfssii* グルコアミラーゼにも存在していた (Fig. 3).

C. rolsii のグルコアミラーゼは、カタリティックドメインと SBD の間 (リンカー領域) が糸状菌の中で最も短く (Fig. 3, 4), *Aspergillus* 属や *Rhizopus oryzae* のグルコアミラーゼのリンカー領域の後半部分にみられるような Thr 残基, Ser 残基に富んだ領域 (TS 領域^{19,20}), O-グリコシド鎖が豊富に付加している²¹⁾ が

存在していなかった。TS領域の機能として、ポリペプチド鎖の伸展した状態を保ち、両ドメインの距離を保つ²²⁾、熱に対する安定性を向上させる^{23,24)} 同様にカタリティックドメインをとりまき安定性を向上させる¹²⁾、基質表面への複相吸着を抑制し単相吸着を促進する²⁵⁾、細胞外への分泌の促進^{26,27)} などさまざまな報告がなされ、とくに、生澱粉を分解する際に、生澱粉の結晶構造を、その糖鎖が水和することによって促進しているとするもの²⁸⁻³¹⁾ と、分解反応にはほとんど関与していないとするもの^{22,26)} に意見がわかれている。

5) cDNA の酵母における発現

C. rolsii グルコアミラーゼ cDNA を酵母発現用シャトルベクター pAAH5 (AH22 株とともに北海道大学薬学部鎌滝哲也教授よりご供与いただいた) のアルコールデヒドロゲナーゼ I 遺伝子のプロモーターとターミネーターの間に挿入し、グルコアミラーゼ発現用プラスミド pACG 115 を構築した。pACG115 を導入した *Saccharomyces cerevisiae* AH22 株は澱粉分解能を獲得し、可溶性澱粉を含む寒天培地においてハロー (ヨウ素による染色) を形成した。また、培養液上清の酵素活性を測定した結果、糊化澱粉分解活性が 1.5×10^{-3} U/mL、生澱粉分解活性が 4.5×10^{-4} U/mL (脚注 1 の活性測定法 2) より)、RDA 値は 30 であり、ごく微量ながら C. rolsii グルコアミラーゼ cDNA が酵母において発現していることが明らかとなった⁹⁾。

4. Corticium rolsii グルコアミラーゼの *Aspergillus oryzae* における発現

A. oryzae は古くから工業的に用いられ、その安全性および優れた蛋白質生産能力のため、宿主・ベクター系の開発が進められ、キモシン等の異種蛋白質の大量生産に成功している³²⁾。そこで C. rolsii グルコアミラーゼを A. oryzae を用いて発現させることを試みた。宿主として A. oryzae M-2-3 株 (*argB*⁻)、ベクターとしてホスホグリセレートキナーゼ遺伝子のプロモーターとターミネーターをもつ pBPT、発現用プラスミドとして pBPT に C. rolsii グルコアミラーゼ cDNA を連結した pCGA1 を用いた。プロトプラスト-PEG 法³³⁾ による形質転換を行い、pCGA1 によって得られた形質転換体 5 株を A. oryzae TF1-TF5 とし、pBPT による形質転換体 14 株のうちランダムに 5 株を選択し、A. oryzae CR1-CR5 とした。

1) サザン解析と上清の生澱粉分解活性

得られた A. oryzae 形質転換体について、ゲノム DNA への C. rolsii グルコアミラーゼ cDNA の組み

Fig. 5. Southern blot analysis of *A. oryzae* transformants.

Each genomic DNA (4 mg) of *A. oryzae* M-2-3 (lane 1), TF 1 (lane 2), TF 2 (lane 3), TF 3 (lane 4), TF 4 (lane 5), TF 5 (lane 6), CR 1 (lane 7), CR 2 (lane 8), and CR 3 (lane 9) was digested with *Eco* RI, and 1.5 pg (lane 10), 7.5 pg (lane 11), and 15 pg (lane 12) of pCGA 1 were digested with *Not* I. Probe DNA (cDNA fragment) was labeled by the ECL system. Numbers and the arrow at the left margin indicate the estimated length (kb) of DNA and the cDNA fragment, respectively.

込みを、サザン法により解析した (Fig. 5)。pCGA1 を導入した形質転換体 5 株のゲノムには、cDNA が組み込まれていることが確認でき、また、シグナルの強さから、導入された cDNA のコピー数が最も多い株は TF5 株で、次に TF2 であると推測できた。

2) 培養上清の活性測定

導入した cDNA の上流は、解糖系の酵素であるホスホグリセレートキナーゼのプロモーターであるため、グルコースによるカタボライト抑制はかからないはずである。したがって、グルコースを単一炭素源にして培養を行うと、A. oryzae 由来の生澱粉分解性グルコアミラーゼ (GAI) は生産が抑制され、導入した C. rolsii cDNA 由来のグルコアミラーゼのみ生産されると期待される。そこで、従来のデキストリン、およびグルコースを炭素源とした 2 種類の培地 (DP 培地、GP 培地: 1 L あたりデキストリンもしくはグルコース 20 g, ポリペプトン 10 g, KH_2PO_4 5.0 g, NaNO_3 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 初発 pH 6.0) を用いて培養を行い、その上清の澱粉分解活性を経時的に測定した (Table 1, 2)。

GP 培地における培養において、すべての株は培養 48 時間後に生育 (核酸量) が最大となり (データ省略)、TF 株では酵素活性が最大値を示した。親株である M-2-3 と pBPT を導入した CR 株は 48 時間まで活性がなく、グルコースによって A. oryzae GAI の生

Table 1. Raw-starch-digesting activity of *A. oryzae* in GP medium.

Strain	Raw-starch-digesting activity (U/mL)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
M-2-3 (parent)	nd	nd	0.25	0.44
TF 1	0.17	0.54	0.37	0.30
TF 2	0.26	1.03	0.32	0.40
TF 3	nd	0.45	0.35	0.39
TF 4	0.54	0.82	0.26	0.36
TF 5	nd	0.28	0.64	0.35
CR 1	nd	nd	0.30	0.40
CR 2	nd	nd	0.33	0.47

nd, not detected.

Table 2. Raw-starch-digesting activity of *A. oryzae* in DP medium.

Strain	Raw-starch-digesting activity (U/mL)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
M-2-3 (parent)	0.28	0.79	1.32	2.87
TF 1	0.28	0.78	1.12	3.15
TF 2	0.13	0.96	1.43	2.73
TF 3	0.25	0.89	1.55	3.67
TF 4	0.45	1.05	1.09	2.80
TF 5	nd	0.19	2.03	1.79
CR 1	0.25	0.62	1.17	3.10
CR 2	0.43	0.85	0.94	2.44

nd, not detected.

産が抑制されていると考えられる。また、培地中のグルコースが消費された培養48時間以後から、TF株の活性が減少し、CR株やM-2-3株と同じくらいの値になった。おそらくプロテアーゼによって*C. rolfssii* cDNA由来のグルコアミラーゼが分解されたためと推定される。DP培地での培養では、TF株、CR株、M-2-3株の活性の差は小さく、培養時間とともに活性値が増加した。デキストリンによる*A. oryzae*のGAIの誘導が起こっていると思われる。

外来遺伝子の発現は一般に、そのコピー数と組み込まれる染色体上の影響を受けるといわれている。今回の結果ではコピー数(TF5>TF2>TF4>TF3>TF1)と上清の生澱粉分解活性(TF2>TF4>TF5>TF1>TF3)の間には関連性はみられず、おそらく染色体上の位置による影響が強く現れているものと考えられる。

3) 培地の最適化

GP培地中のグルコースが消費しつくされた後、発現した*C. rolfssii*グルコアミラーゼ(G2AO)が減少す

るという現象が観察されたため、グルコース消費後、100 mLの培地に対し新たに4 g/10 mLグルコースを添加してみたところ、添加したグルコースはまったく消費されず、G2AOの生産も改善されなかった。そこで、グルコースの初発濃度を、20 g/Lから、30, 40 g/Lと上げたところ、グルコース初発濃度が高いほど酵素活性値が最大に達する培養時間が長くなり、最大酵素活性も増大した(データ省略)。さらにグルコース濃度を50, 60 g/Lと上げて、大幅な活性増大は認められなかった。*A. oryzae*において、プロテアーゼの発現がグルコースによって制限されるという報告³⁴⁾があり、おそらくG2AOの生産性の向上もプロテアーゼのカタボライトリプレッションによるものと推察される。

さらに窒素源の検討を経て、GP培地のグルコース量を40 g/L、ポリペプトン量を20 g/Lに改変したGP-M培地を最適培地とした。上清の生澱粉分解活性は3.47 U/mLとなり、GP培地で培養したとき(1.08 U/mL)の3倍以上となった。*C. rolfssii*培養上清の活性(80 U/mL)には及ばなかったが、形質転換酵母の培養上清(約0.001 U/mL)の3,000倍以上の活性である。

4) 発現したグルコアミラーゼの諸性質

*A. oryzae*にて発現した*C. rolfssii*グルコアミラーゼ(G2AO)を精製し、native G2(*C. rolfssii*培養上清より精製したもの)と比活性を比較したところ、生澱粉分解活性、糊化澱粉分解活性およびグルコアミラーゼ活性においてほぼ同じ値であった(データ省略)。

反応至適pHは生澱粉を基質とした場合、両酵素ともpH 4.5だった。糊化澱粉を基質とした場合native G2はpH 5.5、G2AOはpH 6.0とわずかに異なったがほぼ等しかった。しかし、pH安定性は生澱粉、糊化澱粉ともに、native G2はpH 2.5-8.0の広い範囲で安定であるのにもかかわらず、G2AOはpH 4.0-6.5と安定範囲が非常に狭くなっていた。熱安定性に関しても、同様にG2AOは大きく低下しており、生澱粉、糊化澱粉ともにnative G2が55℃まで安定であったのに対し、G2AOは40℃までであった。反応至適温度に関しても安定性の低下を反映して、G2AOはnative G2に比べ低い値となった。

*A. oryzae*にて発現した*C. rolfssii* G2(G2AO)の分子量は76-80 kDaでありnative G2(72 kDa)より大きくなっていた。両酵素をEndoglycosidase Hで消化したところ、ほぼ同じ分子量(64 kDa)になったことより、分子量の増加は糖鎖によるものであり、

N-グリコシド鎖がその大きな要因であることが示された。おそらく安定性の低下もこの糖鎖の違いによるものと推定される。A. oryzae にて発現した蛋白質の Hyperglycosylation の報告は珍しくないが、その多くの安定性は不変、もしくは上昇しており、このように顕著に低下した例はまれである。

5. Corticium rolfssii と Aspergillus awamori var. kawachi の キメラグルコアミラーゼの 作製と諸性質の検討

C. rolfssii のグルコアミラーゼを、ドメインごとに他菌株由来のグルコアミラーゼと組み替えたキメラ酵素を作製して、その諸性質を解析することを試みた。具体的には、現在多くの研究者によって論議されている TS 領域の機能、C. rolfssii グルコアミラーゼを A. oryzae で発現させた際の問題点である安定性の低下はどの部分によって起こっているか、C. rolfssii グルコアミラーゼのアミノ酸配列上特徴のあるリンカー領域やスターチバインディングドメインが、機能の上ではどのような特徴をもっているか、などについて知見を得るために検討を行った。

1) キメラ酵素の作製

C. rolfssii のグルコアミラーゼ (G2) と、グルコアミラーゼの中でも生澱粉分解活性が強く、解析の進んでいる Aspergillus awamori var. kawachi のグルコアミラーゼ (GAI, ここでは A. oryzae の GAI と区別するため aGAI と表記する) をドメインごとに組換え、A. oryzae を宿主として発現させた。A. awamori var. kawachi グルコアミラーゼ cDNA として用いた pUC 119-GAI³⁵⁾ は九州大学農学部発酵学講座の古川謙介教授・後藤正利助手よりご供与いただいた。C. rolfssii と A. awamori var. kawachi のグルコアミラーゼのスターチバインディングドメインを取り替えたもの、さらに A. awamori var. kawachi の TS 領域を含むものと含まないものを考え、計 4 種のキメラ酵素を作製することにした (Table 3)。PCR によって各ドメインを増幅したあと、連結することによって遺伝子を合成し、プラスミド pBPT, A. oryzae M-2-3 を用いてキメラ酵素の発現、生産を行った。TS 領域を含まないキメラ酵素である as07 と ca10 については培養上清の生澱粉分解活性が低く、以降の精製を断念した。

形質転換株の培養上清より、硫酸アンモニウム塩析、Bio-Gel P-6 カラムによるゲル濾過、DEAE-Toyoprep 650 M によるイオン交換カラムクロマトグラ

Table 3. Domain structures of glucoamylases.

Enzyme name	Source of domain				Producing strain
	CD	LR	TS	SBD	
aGIAO	Aa	Aa	Aa	Aa	A. oryzae
atc04	Aa	Aa	Aa	Cr	A. oryzae
ac07	Aa	Aa	—	Cr	A. oryzae
ca10	Cr	Cr	—	Aa	A. oryzae
cta13	Cr	Cr	Aa	Aa	A. oryzae
G2AO	Cr	Cr	—	Cr	A. oryzae
G2	Cr	Cr	—	Cr	C. rolfssii

CD, catalytic domain; LR, linker region; TS, TS-region (a part of linker region); SBD, starch-binding domain; Aa, A. awamori var. kawachi; Cr, C. rolfssii.

フィー、 α -サイクロデキストリン-Sepharose 6B カラムによるアフィニティークロマトグラフィー、および透析を行って、各酵素を精製した。

2) キメラ酵素の諸性質

各精製酵素 (G2, G2AO, aGIAO, atc04 および cta13) について A_{280} より酵素のモル濃度を求め、10 nmol あたりの比活性を比較したところ、atc04 がやや低い値ではあるが、生澱粉分解活性、糊化澱粉分解活性、および RDA 値もほぼ同じ値であった (データ省略)。

生澱粉を基質にした場合の pH 安定性を Fig. 6 に示した。まず親である aGIAO, G2AO および G2 についてみると、G2AO はやはり native の G2 より低下しており、G2 と aGIAO を比較すると、両酵素とも広い範囲で安定しておりほぼ同じ曲線が得られているが、pH 2.0 では G2 が、pH 9.0 では aGIAO がわずかに高い値を示した。これらのキメラである atc04 と cta13 については、両酵素とも、そのカタリティクドメインの由来する曲線によく似ている。ただし atc04 は似ているものの、少し低下していた。次に生澱粉を基質にした場合の熱安定性についてみてみると (Fig. 6), pH 安定性と同じ傾向を示していることがわかった。すなわち、キメラ酵素 atc04 はそのカタリティクドメインの由来する aGIAO に、キメラ酵素 cta13 は G2AO とよく似た曲線を示した。また、糊化澱粉を基質として同様に pH 安定性と熱安定性を測定した結果、生澱粉を基質にした場合とまったく同じ曲線が得られた。

以上のことより、生澱粉分解性グルコアミラーゼの安定性は、ほかのドメインの影響はほとんどなく、ほぼその活性ドメインに由来すると考えられ、同様にスターチバインディングドメインはカタリティクドメイ

Fig. 6. Effects of pH and temperature on the stabilities of glucoamylases.

Symbols: ◇, aGIAO; ○, G2; □, G2AO; ◆, atc04; ■, cta13.

ンより安定 (もしくは可逆的な変性) であるということがいえ、このことは *A. niger* のグルコアミラーゼについて、田中³⁶⁾の報告している熱量計を用いた熱変性の測定結果とも符合している。したがって、生澱粉分解性グルコアミラーゼの安定性を向上させるためにはカタリティックドメインの改変がもっとも効果的であると思われる。カタリティックドメインが α -ヘリックスによって構成される α/α バレル構造をもつこと¹²⁾、またスターチバインディングドメインが2枚の β -シートを合せた構造をもつこと³⁷⁾はすでに報告されている。一般に β -シート構造は α -ヘリックス構造より堅固であり、今回の結果はこれらの知見にも一致している。

TS領域の役割として、結合している豊富なO-グリコシド鎖がカタリティックドメインをとり巻くように位置し、その安定性を向上させていることがX線結晶構造解析により示唆され、実際に糖鎖の除去による安定性の低下や^{22,24)}、TS領域の増幅によって安定性が増す²⁹⁾ことも報告されているが、今回の結果では、安定性の低下した *C. rolfii* グルコアミラーゼへのTS領域の付加 (cta13, 厳密にはスターチバインディングドメインも入れ変わっている) について、安定性の向上効果は現れなかった。

1%ジャガイモ生澱粉の α -アミラーゼ存在下での加水分解の結果をFig. 7に示した。4種類のグルコアミラーゼはほぼ同様に良好な結果 (24 hで60%以上の

加水分解率) であったが、G2AOに関しては分解速度、分解率ともに大きく低下していた。比活性はほぼ等しかったことを考えると、pH 4.0, 40°Cという条件のもとでの長時間の反応で、安定性の低下が反映されているものと思われる。しかし、興味深いことにG2AOと同程度に安定性の低下していたcta13につい

Fig. 7. Hydrolysis of raw potato starch.

Symbols: ◇, aGIAO; ○, G2; □, G2AO; ◆, atc04; ■, cta13. The reaction conditions were almost the same as the experiment in Fig. 3. The mixture, consisting of 0.5 mL of 2% raw potato starch suspension in 0.1 M acetate buffer (pH 4.0) and 0.5 mL of the enzyme solution (10 U/mL of glucoamylase and its 10% (w/w) of α -amylase), was incubated with shaking at 40°C.

ては、分解がよく進んでいた。今回の検討からは、TS 領域が酵素の安定性の向上によるものではなく、実際に生澱粉の加水分解を促進しているのではないかと考えられる結果が得られた。

6. おわりに

今までに生澱粉分解性グルコアミラーゼの機能を解析するために、部位特異的変異や、同一酵素内でのドメインの組換え(欠失や重複)などの手法が行われてきているが、他菌株の酵素とドメインを組み換えた手法はとられていない。キメラ酵素の諸性質については現在さらに解析をすすめており、SBD の生澱粉に対する吸着様式に違いのあることがわかってきている。今後さらに、酵素分子における各ドメインの関連や機能をより明らかにするとともに、他菌株由来の酵素とのドメインごとの機能の比較をしてゆきたいと考えている。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金による助成を受けた。

文 献

- 1) H. Sasaki, K. Kurosawa and S. Takao : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1661-1664 (1986).
- 2) S. Takao, H. Sasaki, K. Kurosawa, M. Tanida and Y. Kamagata : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1979-1987 (1986).
- 3) H. Ishigami, H. Hashimoto and K. Kainuma : *J. Jpn. Soc. Starch. Sci.*, **32**, 189-196 (1985).
- 4) Y. Nagasaka, K. Kurosawa, A. Yokota and F. Tomita : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 323-330 (1998).
- 5) 檜作 進 : 発酵と工業, **45**, 564-568 (1987).
- 6) S. Ueda and S. Kano : *Stärke*, **27**, 123-128 (1975).
- 7) J. Abe, K. Nakajima, H. Nagano and S. Hizukuri : *Carbohydr. Res.*, **175**, 85-92 (1988).
- 8) 山本晋平 : 応用糖質, **41**, 283-289 (1994).
- 9) Y. Nagasaka, N. Muraki, A. Kimura, M. Suto, A. Yokota and F. Tomita : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 451-458 (1995).
- 10) T. Itoh, I. Ohtsuki, I. Yamashita and S. Fukui : *J. Bacteriol.*, **169**, 4171-4176 (1987).
- 11) M. R. Sierks, C. Ford and P. J. Reilly : *Protein. Engng.*, **6**, 75-79 (1993).
- 12) A. Aleshin, A. Golubev, L. M. Firsov and R. B. Honzatko : *J. Biol. Chem.*, **267**, 19291-19298 (1992).
- 13) E. M. S. Harris, A. Aleshin, L. M. Firsov and R. B. Honzatko : *Biochemistry*, **32**, 1618-1626 (1993).
- 14) B. Svensson, H. Jespersen, M. R. Sierks and E. A. MacGregor : *Biochem. J.*, **264**, 309-311 (1989).
- 15) N. J. Belshaw and G. Williamson : *FEBS Lett.*, **269**, 350-353 (1990).
- 16) C. L. Lawson, R. van Montfort, B. Strokopytov, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, G. E. de Vries, D. Penninga, L. Dijkhuizen and B. W. Dijkstra : *J. Mol. Biol.*, **236**, 590-600 (1994).
- 17) P. M. Countinho and P. J. Reilly : *Protein. Engng.*, **7**, 749-760 (1994).
- 18) P. M. Countinho and P. J. Reilly : *Protein. Engng.*, **7**, 393-400 (1994).
- 19) T. Ashikari, N. Nakamura, Y. Tanaka, N. Kiuchi, Y. Shibano, T. Tanaka, T. Amachi and H. Yoshizumi : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 957-964 (1986).
- 20) S. Hayashida, K. Nakahara, K. Kuroda, T. Miyata and S. Iwanaga : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 135-141 (1989).
- 21) A. Gunnarsson, B. Svensson, B. Nilsson and S. Svensson : *Eur. J. Biochem.*, **145**, 463-467 (1984).
- 22) G. Williamson, N. J. Belshaw and M. P. Williamson : *Biochem. J.*, **282**, 423-428 (1992).
- 23) B. C. Shenoy, A. G. A. Rao and M. R. R. Rao : *J. Biosci.*, **6**, 601-611 (1984).
- 24) H. Hayashida and E. Yoshino : *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 927-933 (1978).
- 25) G. Williamson and N. J. Belshaw : *Carbohydr. Poly.*, **21**, 147-149 (1993).
- 26) C. B. Libby, C. A. G. Cornett, P. J. Reilly and C. Ford : *Protein. Engng.*, **7**, 1109-1114 (1994).
- 27) R. Evans, C. Ford, M. Sierks, Z. Nikolov and B. Svensson : *Gene*, **91**, 131-134 (1990).
- 28) S. Hayashida, K. Nakahara, W. Kanlayakrit, T. Hara and Y. Teramoto : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 143-149 (1989).
- 29) T. Semimaru, M. Goto, K. Furukawa and S. Hayashida : *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2885-2890 (1995).
- 30) M. Goto, K. Ekino and K. Furukawa : *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2940-2943 (1997).
- 31) M. Goto, E. Kuwano, W. Kanlayakrit and S. Hayashida : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 16-20 (1995).
- 32) K. Tsuchiya, T. Nagashima, Y. Yamanoto, K. Gomi, K. Kitamoto, C. Kumagai and G. Tamura : *Biosci. Biotech. Biotech.*, **58**, 895-899 (1994).
- 33) 五味勝也, 原 昌道 : 蛋白質 核酸 酵素, **35**, 2552-2566 (1990).
- 34) G. Jarai and F. Buxton : *Curr. Genet.*, **26**, 238-244 (1994).
- 35) S. Hayashida, K. Kuroda, K. Ohta, S. Kuhara, K. Fukuda and Y. Sasaki : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 923-929 (1989).
- 36) 田中晶善 : 応用糖質科学, **45**, 199-205 (1998).
- 37) A. J. Jacks, K. Sorimachi, M. F. Le Gal-Coeffet, G. Williamson, D. B. Archer and M. P. Williamson : *Eur. J. Biochem.*, **233**, 568-578 (1995).

【質 問】

江崎グリコ 栗木

1) キメラ酵素をデザインするときのドメインの境界はどのようにきめましたか？

2) 本 GA+ α -amylase でポテトスターチを 100% 分解 (Crude GA 並?) とのことですが, この分解に対して phosphatase の関与はありませんか?

3) 生澱粉吸着能と生澱粉分解能との相互関係についてわかっていることがあれば教えて下さい。

【答】

1) いくつかの他菌株由来のものと比較し, その相同性をもとに判断しました。Fig. 4 に示しましたドメインの境界をつなぎ目としております。

2) ジャガイモ生澱粉の加水分解は粗酵素, グルコアミラーゼ+ α -amylase とともに 90% 弱程度までで 100% は分解できませんでした。ホスファターゼの関与についてですが, 粗酵素にはホスファターゼ活性 (*p*-ニトロフェニルリン酸分解活性) はほとんどなく, またジャガイモより部分精製したホスファターゼを添加しても加水分解の大幅な上昇はみられませんでしたので, これ以上詳しくは検討しておりません。

3) 吸着できるか否かが, その酵素の分解能を決定しているのは間違いないと思っております。さらに吸着につきましては, 単に基質周囲の酵素濃度を上げているだけなのか, 吸着力の強さと生澱粉分解活性の相関はあるのか, などが非常に興味深い点であると思っており, 今後検討してゆきたいと考えております。

【質問】

東工大 中村

1) *A. oryzae* で発現させた *C. rolfii* 野生型酵素は安定性が低下していたのに対し, *A. awamori* 酵素との各キメラ体では安定性の回復が認められている。なにが安定性に対して影響を与えているのか?

2) *C. rolfii* 酵素の *A. oryzae* での発現に際し, 発現量とコピー数とが相関していない点について, どのように考えるか?

【答】

1) カタリティックドメインを *A. awamori* var. *kawachi* に変えたものについて安定性が向上しておりましたので, *C. rolfii* のカタリティックドメインが安定性の低下を起こしている部位であり, おそらくこの部位に付加している *N*-グリカンが原因ではないかと考えております。

2) *Aspergillus* において, 導入される染色体の部位によってその発現量が大きく異なるという報告があり, また, ベクター上の *arg B* は *A. nidulans* 由来のものであり, *A. oryzae* においてはランダムな相動的組換えが, より起こりやすいようです。

【質問】

福山大 不破

1) 最後の OHP で potato starch granules を gluco-

amylase がかなり分解しているが, 最初の方の OHP では crude enzyme では potato starch granules は分解されるが, 精製すると非常に弱く, これに α -Amylase を加えると上がるとの data があったが, 両者の関係は。

2) 1) との関連で TF1-TF5 の中でコピー数は TF5 が多いが glucoamylase 活性は低いので TF 2 を選んだとのことですが, 共存する少量の α -amylase の差が原因ではないか。

3) *C. rolfii* の α -amylase が澱粉粒を分解できないという証明はどのようにして行いましたか。反応上澄の還元力 (Somogyi 法) による測定では α -amylase の場合ほとんどかかってこない可能性が大了。

【答】

1) 申しわけありません。説明不足でした。精製キメラ酵素の加水分解実験においては 1/10 量の α -amylase を加えた状態で行っております。

2) 培養上清を, イオン交換カラムにて分画すると *A. oryzae* 由来の生澱粉分解グルコアミラーゼ (GAI) の存在はほとんどなかったものの α -amylase はかなりの量 (heterologous グルコアミラーゼと同じかそれ以上) 生産されていました。また上清の生澱粉分解活性の測定には, 生澱粉の中でも分解されやすいウルチ米澱粉を用いております。以上の 2 点より, 分解されにくいジャガイモ生澱粉の加水分解における少量の α -amylase のような影響—その存在量によって大きく生澱粉分解活性が異なってくる—は, ほとんどないと考えております。

3) α -amylase (画分) は精製しておりませんので, 厳密に澱粉粒に対する作用のない α -amylase とはいえないが, 糊化澱粉を基質として反応させた場合と, ウルチ米澱粉を基質として反応させた場合の遊離還元糖量を比較した結果より, ほぼ生澱粉分解活性はないと考えておりました (SDS-PAGE の結果および, 生澱粉に作用させた場合, わずかに生じる還元糖量がグルコース量と等しいことより, G1 がごく少量混入していることも間違いないと思われます)。お教えいただきました, 反応上清の, 還元力の測定では, 検出されない精製物に関しましては, α -amylase の相乗効果との関連を含め, 今後検討してゆきたいと思っております。

(平成 11 年 2 月 17 日受付)