醤油麹菌のエキソ-1,5- α -L-アラビナーゼの精製と性質の応用

著者らは麹菌ヘミセルラーゼの研究を醤油の醸造工程における着色抑制とろ過率の向上を目的として行なっている。既に、麹菌 α -L-アラビノフラノシダーゼが原料に含まれるアラビノキシランからキシロースやアラビノースを遊離させる鍵酵素であることを明らかにしている。今回は、直鎖アラビナンからアラビノビオースを生産する酵素を見いだしているのので、解説していただいた。得られるアラビノオリゴ糖は保湿剤、ビフィズス菌の増殖作用、血糖値上昇抑制作用などの機能性素材として応用が将来期待される。

木村 功・大島久華・香川典子

はじめに

L-アラビノシダーゼ [α -L-アラビノフラノシダーゼ (EC.3.2.1.55) 及びエンド-1,5- α -L-アラビノフラノシダーゼ (EC.3.2.1.99)] は、アラビノキシラン、アラビナン及びアラビノガラクトンなどのヘミセルロース並びにペクチン質多糖類の分解に重要な働きをしている¹⁾。これらの酵素は発酵及び食品加工において大豆及び小麦などの原料の糖化だけでなく、食品の着色及びゲル化特性の改変並びに果汁の濁りなどを防ぐ働きに係わっている²⁾。

当センターでは醤油の醸造工程における着色原因の解明とともにろ過率の向上という観点から、醤油諸味中における麹菌ヘミセルラーゼの作用について検討し、その結果として醤油麹菌 (*Aspergillus sojae*) の α -L-アラビノフラノシダーゼが原料に含まれるアラビノキシランからキシロースやアラビノースを遊離させる鍵酵素であることを明らかにしてきた^{3~5)}。

セルロース及びヘミセルロースなどの多糖類は複数の酵素の相互作用によって分解されることから⁶⁾、アラビナンの分解に係わるエンド型の酵素群を検討していたところ、偶然にも直鎖アラビナンからアラビノビオースを生産する酵素を見いだすに至った。*Aspergillus* 属の酵素において、アラビナンをエンド型で分解する酵素については多くの報告があるが、アラビノ

ビオースを生産するエキソ型の酵素はほとんど知られていない^{7~9)}。

そこで本稿では、*Aspergillus* 属からエキソ型のアラビノビオース生産酵素 (エキソ 1,5- α -L-アラビナーゼ) の精製及びその諸性質について明らかにするとともに、本酵素の糖転移反応によるアラビノオリゴ糖の合成並びにその応用の可能性を紹介する。

1. アラビナーゼの精製と分子的特徴

(1) アラビナーゼの測定

アラビナンは α -L-アラビノフラノース残基が 1,5 結合した主鎖のところに、C-3 位あるいは C-2 位で α -L-アラビノフラノース残基が結合した構造を持つことが示されている。ビート、ナンキンマメ、リングからアルカリ抽出される場合が多いため、その構造の一部が分解されている可能性が示唆されている¹⁰⁾。

植物組織においてはペクチン質及び関連多糖類に結合した状態で存在する²⁾ ため、粗精製のアラビナンを活性測定用基質として用いた場合、アラビノフラノシダーゼ活性のほかガラクタナーゼ活性などをも測定する恐れがある。そこでアラビナーゼに特異的な直鎖アラビナン (1,5-アラビナン) を基質として活性を測定することとした。ただし 1,5-アラビナンは溶解度が低く取り扱いが煩雑であることから、カルボキシメチル化 1,5-アラビナン [CM-直鎖アラビナン (meg-

Purification and Application of Properties of an Exo-1,5- α -L-arabinanase from Soy Sauce Koji Mold.
Isao KIMURA, Hisaka OSHIMA, Noriko KAGAWA (Food Research Institute of Kagawa Prefectural Industrial Technology Center)

azyme 社製)] を活性測定用基質として用い、1 分間に L-アラビノース 1 μmol に相当する還元糖を CM-直鎖アラビナンから遊離する酵素活性を 1 ユニット (U) とした。

(2) アラビナーゼの精製

糸状菌は固体培養において特徴的な糖質分解酵素の生産性が高い¹¹⁾ ことから、小麦フスマを用いた固体培養でアラビナーゼの生産を検討したが、ほとんど生産されなかった。セルラーゼと同様に誘導酵素⁶⁾ であることが考えられたので、ビートアラビナンを誘導物質兼炭素源とした液体培養によってアラビナーゼの生産と精製を試みた。

醤油麹菌 *A. sojae* no 3 (ATCC 200440) をポテトデキストロース寒天培地において 30°C で培養し、本菌の孢子懸濁液 5 ml ($1.0 \times 10^5/\text{ml}$) を 2.0 g ビートアラビナン、0.6 g ペプトン、0.2 g 酵母エキス及び 1.0 g KH_2PO_4 を含む 200 ml の液体培地 (pH 5.3) に接種し、30°C で 72 時間静置培養した。培養液を 4 層のガーゼでろ過し硫酸塩析後、HiPrep 16/10 Q-SepharoseFF イオン交換カラム (Amersham Bioscience Co. Piscataway) で分離した。アラビナーゼの活性画分を回収後、限外ろ過によって濃縮し、Hi-Prep Sephacryl S-100 HR ゲルろ過カラム (Amersham Bioscience) で分離した。活性画分を回収し、1 mM リン酸緩衝液 pH 6.8 を用いて透析後、Bio-scale CHT 2-I ヒドロキシアパタイトカラム (Bio-Rad Labs.) で分離し活性画分を回収した。本画分を未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native-PAGE) によって分析したところ、電気泳動的に均一なタンパク質にまで精製されていることが確認できた (第 1 図-A)。以上の操作によるアラビナーゼの精製過程を第 1 表に示した。Q-SepharoseFF によるクロマトグラフィーで活性回収率が低下するものの、ゲルろ過クロマトグラフィーによって比活性が有意に上

第 1 図 精製酵素の Native 及び SDS-PAGE 結果
A, Native-PAGE; B, SDS-PAGE; レーン 1, 精製酵素標品 (5 μg); レーン 2, 標準低分子分子量マーカー (Amersham Bioscience)

昇することがわかった。精製酵素標品は比活性 17.5 U/mg タンパク質であり、活性回収率は培養液に対しておよそ 3 %であった。

(3) 精製酵素の分子的特徴

精製酵素標品の分子量は TSK gel G 3000 SWXL (東ソー株式会社製) を用いたゲルろ過クロマトグラフィー及びドデシル硫酸ナトリウム (SDS) -PAGE によって、それぞれ 43 kDa と 41 kDa と見積もった。本酵素は SDS-PAGE で単一なバンドを有することから (第 1 図-B), 単量体タンパク質であることが示された。また等電点電気泳動の結果、精製酵素の等電点 (pI) は 3.7 であり、酸性タンパク質であることが明らかになった。

第 1 表 *A. sojae* のエキソ-1,5- α -L-アラビナーゼの精製

工程	液量 (ml)	全活性 (u)	全タンパク質 (mg)	比活性 (u/mg)	収量 (%)
培養液	940	244	1231.4	0.2	100
硫酸塩析	47	259	248.0	1.0	106
Q-Sepharose FF	52	60	41.6	1.4	25
Sephacryl S-100	50	23	3.0	7.7	9
Hydroxyapatite	8	7	0.4	17.5	3

第2表 *A. sojae* のエキソ-1,5- α -L-アラビナーゼの基質特異性

基質	主要な結合様式	相対活性(%)
CM-直鎖アラビナン	α -1,5-Araf	67.0
1,5-アラビナン	α -1,5-Araf	82.0
ビートアラビナン	α -1,5-Araf	36.8
大豆アラビノガラクトサン	α -1,5-Araf, β -1,4-Galp	0
唐松アラビノガラクトサン	α -1,3-Araf, β -1,3-Galp	0
アカシアガムアラビナン	α -13-Araf, β -1,6-Araf	0
柑橘ペクチン	α -1,4-GalUA	0
オレンジポリガラクトuron酸	α -1,4-GalUA	0
いなわらアラビノキシラン	α -1,3-Araf, β -1,4-Xylp	0
アラビノビオース	α -1,5-Araf	0
アラビノトリオース	α -1,5-Araf	52.6
アラビノテトラオース	α -1,5-Araf	100
PNP- α -L-アラビノフラノシド		0
PNP- β -L-アラビノピラノシド		0
PNP- α -D-キシロピラノシド		0
PNP- β -D-キシロピラノシド		0
PNP- α -D-ガラクトピラノシド		trace
PNP- β -D-ガラクトピラノシド		0
PNP- α -D-グルコピラノシド		0
PNP- β -D-グルコピラノシド		0

Araf, アラビノフラノース; Galp, ガラクトピラノース; GalUA, ガラクトuron酸; Xylp, キシロピラノース; PNP, *p*-ニトロフェノール; trace, < 1.0%; 精製酵素標品 (0.04 U) は 2.5 mg の基質とともに, 0.5 ml の 0.05 M 酢酸緩衝液 pH 5.0 中で 40°C, 10 分間反応させた。

2. 酵素的諸性質

(1) 酵素活性に及ぼす温度及び pH の影響

CM-直鎖アラビナンに対する精製酵素の至適 pH 及び温度は, それぞれ pH 5.0 及び 50°C であった。また酵素を 30°C で 18 時間保存した場合, 酵素活性は pH 6.0-8.0 の範囲で安定であった。一方, 本酵素は CM-直鎖アラビナンを含まない条件で, 65°C, 10 分間の加熱によって失活した。

(2) 酵素活性に及ぼす阻害剤などの影響

精製酵素 (0.02 U) を 1 mM の様々な金属イオンあるいは阻害剤と混合し, 30°C で 10 分間保持した後, 残存する酵素活性を測定したところ, Zn^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} 及び Fe^{3+} の添加によって, 活性はそれぞれ 14.8, 16.9, 12.8 及び 16.3% 阻害された。一方, Ag^{+} 及び Cr^{2+} を添加した場合は, それぞれ 58.8 及び 59.6% 阻害された。また活性を増大させる金属イオンは認められなかった。1 mM の各阻害剤と混合し, 残存活性を測定した結果, 2-メルカプトエタノール,

ヨード酢酸, *p*-クロロメリクリ安息香酸に活性の阻害効果は認められなかった。それに対して 5 mM の SDS を添加した場合, 活性は 121% に増大した。

(3) アラビナーゼの基質特異性

第2表に精製酵素標品の各種基質に対する活性を示した。精製酵素標品は CM-直鎖アラビナン, 1,5-アラビナン, アラビノテトラオース及びアラビノトリオースに強い活性を示し, 弱いながらもビートアラビナンに活性を示した。一方, ポリガラクトuron酸やペクチン, アラビノビオース及び各種合成基質に対して活性は認められなかった。*A. sojae* の生産するアラビナーゼは唐松アラビノガラクトサンの α -1,3 結合を切断できないことから, α -1,5 結合に特異的に作用することが示された。

次にビート 1,5-アラビナンを基質として, 本酵素の反応生成物について検討した。0.04 U の精製酵素標品を 10 mg の 1,5-アラビナンを含む 10 ml の 0.05 M 酢酸緩衝液 pH 5.0 とともに混合し, 40°C で 24 時間反応させた。経時的に 1 ml ずつ反応溶液を採取し,

第2図 エキソ-1,5- α -L-アラビナーゼによるビート1,5-アラビナンの加水分解物の薄層クロマトグラフィー
A2, アラビノビオース; A3, アラビノトリオース

高性能薄層クロマトグラフィーで分析した。その結果1,5-アラビナンの主要な分解物は、反応の初期（反応1時間後）からアラビノビオースに相当する成分だけであり、反応24時間目においてもアラビノビオースのみが蓄積していることがわかった（第2図）。

さらにエンド型及びエキソ型酵素の反応速度を比較した場合、エンド型酵素は1,5-アラビナンに対する K_m 値が0.72¹²⁾及び0.205 mg/ml¹³⁾であるが、本

酵素のLine-weaver-Burkプロットによる1,5-アラビナンに対する K_m 値は、5.3 mg/mlとなりエンド型酵素とは異なった。以上のことより本精製酵素標品はエキソ型でアラビノビオースを生産する酵素、すなわちエキソ1,5- α -L-アラビナーゼであると判断した。

3. 様々な微生物のエキソ-アラビナーゼ

第3表に示すように、様々な微生物がエキソ-アラビナーゼを生産するが、分子量、pH安定性及び阻害剤の影響などは、起源によってそれぞれ異なっていることがわかる。*A. sojae*の生産するエキソ-アラビナーゼは至適pHや最終生産物などで*P. chrysogenum*¹⁶⁾由来の酵素と類似しているが、分子量において若干異なっていた。そこで本酵素のタンパク質のN末端アミノ酸配列25残基(AETPTTFSEVTIFSPSPDYVILPTL-)をSwiss-prot, TrEMBL, 及びBLAST¹⁸⁾を用いたPIRによるタンパク質データベースプログラム(www.au.expasy.org/tools/)により相同性を検索したところ*P. chrysogenum*の酵素と69%の相同性を示した。このことから、*A. sojae*のエキソ-アラビナーゼは*P. chrysogenum*と酵素のモジュール構造で異なっている可能性が推測された。

第3表 様々な微生物のエキソ1,5- α -L-アラビナーゼの諸性質

諸性質	<i>A. sojae</i> No. 3 ^{*1}	<i>E. carotovora</i> IAM 1024 ¹⁴⁾	<i>P. fluorescens</i> ^{15)*2}	<i>P. chrysogenum</i> ¹⁶⁾	<i>A. niger</i> (var. <i>aculeatus</i>) ¹⁷⁾
SDS-PAGE	41 kDa	—	34 kDa	47 kDa	67 kDa
ゲルろ過	43 kDa	—	—	—	—
等電点 (pI)	3.7	—	—	—	2.85
至適pH	5.0	6.0	—	4.0	4.0
至適温度 (°C)	50	—	—	40	60
pH安定性	6.0-8.0 ^{*3}	5.0-11.0 ^{*4}	—	3-8 ^{*5}	—
温度安定性 (°C)	up to 45	—	—	up to 50	—
阻害剤	Ag ⁺ (1 mM), Cr ²⁺ (1 mM)	Hg ²⁺ (0.2 mM)	—	Hg ²⁺ (1 mM)	—
1,5-アラビナンの 反応生産物:	アラビノビオース	アラビノトリオース	アラビノトリオース	アラビノビオース	アラビノビオース
K_m 値 (mg/ml)	5.3	—	3.75	—	—

*1 本研究; *2 組換えアラビナーゼ; *3 30°Cで18時間反応; *4 2°Cで96時間反応; *5 1 mMで70%以上の阻害活性; —, 定量せず

第3図 糖転移反応生成物の HPLC クロマトグラム
An, 1,5-アラビナン; A2 X, 転移生成物;
A2, アラビノビオース; X, 糖受容体

4. 糖転移反応物の分析

SAKAMOTO らは, *P. chrysogenum* のエキソ-アラビナーゼを用いて様々な受容体への糖転移作用を検討し, 転移生成物であるアラビノビオグリセロールの構造を明らかにしている¹⁹⁾。そこで *P. chrysogenum* に類似した本酵素についても各種糖類への転移作用を検討し, 新規オリゴ糖の合成を試みた。

糖転移反応は SAKAMOTO 他¹⁹⁾ の基づいて分析した。すなわち 10 μ l の 2% (w/w) 1,5-アラビナン溶液を供与体, 10 μ l の 50% (w/w) 各種糖類を受容体として含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 及び 0.002 U の精製酵素標品を混合し 40°C で 1 時間反応させた。沸騰湯浴中で 10 分間保持し反応を停止した後, 蒸留水で 1 ml に定容した。反応生成物は Shodex KS-802 カラム (昭和電工株式会社製) を備えた HPLC システムを用い, 示差屈折率計を検出器として分析した。

HPLC を用いた糖転移反応生成物の分析例を第3図に示した。反応溶液 20 μ l を HPLC に注入し, 流速 1 ml/min で分析した結果, 転移生成物はアラビノビオースよりも高分子側にほぼ単一のピークとして溶出された。また本転移生成物 (A2 X) は, 反応系に受容体が存在する場合にのみ生成した。さらに転移生成物 (A2 X) の画分を回収し 0.2 N 塩酸で加水分解後, 構成糖比を調べたところアラビノースと糖受容体の割合は 2:1 となり, アラビノビオースが糖受容体に転移していることが認められた。

上記分析条件を用いて様々な化合物への転移活性を調べたところ, L-アラビトール, キシリトール, エ

第4表 各種化合物に対する転移活性

受容体	A 2	TG	TG/A 2
無添加	16506	0	0
D-マンノース	28582	4556	15.9
D-ガラクトース	34402	8660	25.2
D-キシロース	13253	4011	30.3
D-ソルボース	8247	2649	32.1
D-アラビノース	29035	11579	39.9
D-フルクトース	10522	4535	43.1
D-グルコース	15467	7166	46.3
L-ソルボース	14980	7159	47.8
L-アラビトール	25960	13546	52.2
キシリトール	11737	9242	78.7
D-リボース	8448	6933	82.1
リビトール	11069	12011	108.5
エリスリトール	9132	13370	146.4
グリセロール	4687	10091	215.3

数値はクロマトグラムのピーク面積を示す。TG, 転移生成物; A 2, アラビノビオース; TG/A 2, 転移率

リスリトール及びグリセロールなど糖アルコールに対する転移活性が高いことがわかった (第4表)。この結果は *P. chrysogenum* に由来する酵素の特異性にほぼ一致した¹⁹⁾。また糖アルコールに対する転移活性は, 炭素数が減少するに伴って上昇することがわかった。糖転移反応は酵素の触媒部位に基質である供与体及び受容体が結合することによって起きることが知られている。グリセロール (C 3) に対する転移活性が, L-アラビトール (C 5) やエリスリトール (C 4) よりも高いことは, 炭素数の少ない糖アルコールが触媒部位に結合しやすいことにあると考えられた。

5. 糖転移反応条件

転移反応の最適温度を調べた結果, 反応温度 40°C において最も高い転移活性が認められた。一方, 反応生成物への pH の影響を調べたところ, pH 5.0 において最も高い転移活性が認められた (第4図)。これらの温度及び pH の最適条件は, いずれの受容体を用いた転移反応においても同様の結果を示した。加水分解酵素の糖転移作用は, 加水分解の一反応と解釈できる。これを裏付けるように, 本酵素の糖転移反応における最適温度及び pH は, CM-直鎖アラビナンの最適加水分解条件に一致する結果となった。

糖転移反応は供与体及び受容体の濃度に依存することから, 反応液中の供与体濃度を一定とし, 受容体濃

第4図 糖転移反応へのpHの影響

第5図 受容体糖濃度の反応生成物への影響
TG, 転移生成物; A2, アラビノビオース

度を0-20%まで変化させた場合における転移反応生成物量を検討した。その結果、アラビノビオースと転移生成物の比は受容体糖濃度が増加するに伴いほぼ直線的に増加した(第5図)。

一方、供与体濃度を高めることにより、転移反応生成物量が増加すると考えられるが1,5-アラビナンの溶解度が低いため、本研究では検討するに至らなかった。標準条件において反応時間が転移生成物量に及ぼす影響を調べた結果、転移生成物は5時間で最大値を示した後、平衡化することがわかった(第6図)。

おわりに

近年、特異的な機能を有する酵素が幅広い分野から

第6図 反応時間が反応生成物に及ぼす影響
Area, 転移生成物のクロマトグラム面積

求められている。特に、加水分解酵素は糖転移反応を利用して様々なオリゴ糖が合成できるとともに、植物多糖類などの構造解析においても有用なツールとなることから、多くの研究機関で新しい作用様式を有する酵素の研究が進められている。オリゴ糖は保湿性及びビフィズス菌の増殖作用を有することから、プレバイオテックス、化粧品及び健康増進作用などで注目される素材である²⁰⁾。その多くが糖質加水分解酵素の糖転移反応を利用して製造されることから、新しい作用様式を有する酵素が新しいオリゴ糖を生産できる可能性を有している。

本酵素によって合成されるアラビノオリゴ糖の機能性は現時点では不明であるが、オリゴ糖が一般的に有する保湿性やビフィズス菌の増殖作用の他、健康食品素材としての機能が考えられる。特に、アラビノオリゴ糖の構成糖であるアラビノースは血糖値上昇抑制作用を有するにもかかわらず、メイラード反応性が高いことから加熱調理には不適切な糖質であった。しかし、アラビノオリゴ糖であればアラビノースの還元末端がブロックされており、還元末端が遊離したアラビノースに比較してメイラード反応性が低くなる。さらにアラビノオリゴ糖は腸内細菌などが有するアラビノフラノシダーゼ (<http://au.expasy.org/>) で分解され、遊離したアラビノースがしょ糖分解酵素の阻害作用に関わる可能性が推測される。これらの機能性や健康増進効果を確認するためにも、今後は当該オリゴ糖の大量生産技術を開発することが重要であると考えられる。

(本研究は香川県糖質バイオクラスター形成事業の一環として行った。)

<香川県産業技術センター食品研究所>

文 献

- 1) KAJI A. : L-Arabinosidases. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **42**, 383-394 (1984).
- 2) HWAANG J., PYUN Y. R. and KOKIN J. L. : *Food Hydrocolloides*, **7**, 39-53 (1993).
- 3) 木村 功, 佐々原 浩 幸 : 醸 協, **87**, 566-572 (1992).
- 4) KIMURA I., SASAHARA H. and TAJIMA S. : *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 334-339 (1995).
- 5) KIMURA I., YOSHIOKA N., KIMURA Y. and TAJIMA S. : *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 262-266 (2000).
- 6) 村尾沢夫, 荒井基夫, 阪本禮一郎, p 23 セルラーゼ 講談社 1987
- 7) BELDMAN G., SEARLE-van LEEUWEN M. J. F., De RUITER G. A., SILIHA H. A. and VORAGEN A. G. J. : *Carbohydr. Polym.*, **20**, 159-168 (1993).
- 8) ROMBOUTS F. M., VORAGEN A. G. J., SEARLE-van LEEUWEN M. F., GERAEDS C. C. J. M., SCHOLS H. A. and PILNIK W. : *Carbohydr. Polym.*, **9**, 25-47 (1988).
- 9) DUNKEL M. P. H. and AMADÒ R. : *Carbohydr. Res.*, **268**, 151-158 (1995).
- 10) 川村信一郎 : 植物の多糖類, p 197, 総合多糖類科学 2, 講談社, 東京 (1974).
- 11) 佐藤和夫 : 醸協, **87**, 558-565 (1992).
- 12) ROMBOUTS F. M., VORAGEN A. G. J., SEARLE-van LEEUWEN M. F., GERAEDS C. C. J. M., SCHOLS H. A. and PILNIK W. : *Carbohydr. Polym.*, **9**, 25-47 (1988).
- 13) DUNKEL M. P. H. and AMADÒ R. : *Carbohydr. Polym.*, **24**, 247-263 (1994).
- 14) KAJI A. and SHIMOKAWA K. : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 67-72 (1984).
- 15) MCKIE V. A., BLACK G. W., MILLWARD-SADLER S. J., HAZLEWOOD G. P., LAURIE J. I. and GILBERT H. J. : *Biochem J.*, **323**, 547-555 (1997).
- 16) SAKAMOTO T. and J.-F. THIBAULT : *Appl. Environ. Microbil.*, **67**, 3319-3321 (2001).
- 17) BELDMAN G., SCHOLS H. A., PITSON S. M., SEARLE-van LEEUWEN M. J. F. and VORAGEN A. G. J. : *Adv. Macromol. Carbohydr. Res.* **1**, 1-64 (1997).
- 18) ALTSCHUL S. F., MADDEN T. L., SCHÄFFER A. A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W. and LIPMAN D. J. : Gapped BLAST and PSI-BLAST : *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402 (1997).
- 19) SAKAMOTO T., T. FUJITA and H. KAWASAKI : *Biochem. Biophys. Acta*, **1674**, 85-90 (2004).
- 20) 北原寿美雄 : 澱粉科学, **37**, 59-67 (1990).