

学位論文

Aspergillus 属由来の糖質加水分解酵素ファミリー31

に属する α -グルコシダーゼに関する研究

Analysis of α -glucosidases belonging to
glycoside hydrolase family 31 from *Aspergillus* species

河野 敦

目次

| | |
|--|----|
| 略語表 | 1 |
| 要旨 | 2 |
| 第 1 章 緒論 | 4 |
| 第 2 章 <i>Aspergillus sojae</i> 由来の連続 α -1,6 転移 α -グルコシダーゼの解析 | |
| 2-1. 序論 | 8 |
| 2-2. 材料と方法 | |
| 2-2-1. 実験材料と試薬 | 9 |
| 2-2-2. 使用した微生物株 | 9 |
| 2-2-3. クローニング、発現ベクターの構築と形質転換 | 9 |
| 2-2-4. 酵素の精製 | 10 |
| 2-2-5. 酵素活性の測定 | 11 |
| 2-2-6. タンパク質分析 | 11 |
| 2-2-7. 転移生成物の調製 | 12 |
| 2-2-8. 転移生成物の HPLC 分析および分画 | 12 |
| 2-2-9. NMR 分析 | 12 |
| 2-2-10. MALDI-TOF MS 分析 | 12 |
| 2-2-11. 転移生成物のデキストラナーゼ加水分解による評価 | 13 |
| 2-2-12. メチル化分析 | 13 |
| 2-3. 結果 | |
| 2-3-1. AsojAgdL の発現、精製と生化学的特性 | 14 |
| 2-3-2. AsojAgdL の反応速度論的解析 | 16 |
| 2-3-3. マルトースを基質とした AsojAgdL の転移反応 | 18 |
| 2-3-4. マルトペンタオースを基質とした AsojAgdL の転移反応 | 20 |
| 2-4. 考察 | 23 |
| 第 3 章 <i>Aspergillus niger</i> 由来の α -1,2・1,3 転移 α -グルコシダーゼの解析 | |
| 3-1. 序論 | 26 |
| 3-2. 材料と方法 | |
| 3-2-1. 実験材料と試薬 | 27 |
| 3-2-2. 使用した微生物株 | 27 |
| 3-2-3. クローニング、発現ベクターの構築と形質転換 | 27 |
| 3-2-4. 酵素の精製 | 28 |
| 3-2-5. 酵素活性の測定 | 28 |
| 3-2-6. タンパク質分析 | 28 |
| 3-2-7. 転移生成物の調製 | 28 |

| | |
|--|----|
| 3-2-8. 転移生成物の HPLC 分析および分画 | 28 |
| 3-2-9. NMR 分析 | 29 |
| 3-2-10. MALDI-TOF MS 分析 | 29 |
| 3-3. 結果 | |
| 3-3-1. <i>A. niger</i> AgdB の発現、精製と生化学特性 | 30 |
| 3-3-2. <i>A. niger</i> AgdB の反応速度論的解析 | 31 |
| 3-3-3. NMR によるグルコシド結合様式の検出 | 32 |
| 3-3-4. NMR 分析によるグルコシド結合様式の比率の算出法の確立 | 36 |
| 3-3-5. マルトースを基質とした <i>A. niger</i> AgdB の転移反応 | 37 |
| 3-3-6. マルトペンタオースを基質とした <i>A. niger</i> AgdB の転移反応 | 40 |
| 3-4. 考察 | 42 |
| | |
| 第 4 章 <i>Aspergillus oryzae</i> および <i>Aspergillus sojae</i> に由来する α -グルコシダーゼの点変異導入による性質の変化 | |
| 4-1. 序論 | 45 |
| 4-2. 材料と方法 | |
| 4-2-1. 実験材料と試薬 | 47 |
| 4-2-2. 使用した微生物株 | 47 |
| 4-2-3. クローニング、発現ベクターの構築 | 47 |
| 4-2-4. 部位特異的変異導入遺伝子発現ベクターの構築 | 48 |
| 4-2-5. 形質転換 | 48 |
| 4-2-6. 組換え酵素の取得 | 48 |
| 4-2-7. 酵素活性の測定 | 48 |
| 4-2-8. 転移生成物の調製 | 49 |
| 4-2-9. 転移生成物の HPLC 分析 | 50 |
| 4-2-10. タンパク質立体構造の予測 | 50 |
| 4-3. 結果 | |
| 4-3-1. 酵素の発現 | 51 |
| 4-3-2. マルトースを基質とした転移反応 | 51 |
| 4-3-3. マルトペンタオースを基質とした転移反応 | 55 |
| 4-3-4. デキストラン加水分解活性 | 56 |
| 4-4. 考察 | 57 |
| | |
| 第 5 章 総括 | 59 |
| | |
| 参考文献 | 61 |
| | |
| 謝辞 | 66 |

略語表

| | |
|--------------|---|
| CAPS | N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid |
| DP | degree of polymerization |
| DS | dissolved substrate |
| GH | glycoside hydrolase |
| HPLC | high performance liquid chromatography |
| HSQC | heteronuclear single quantum correlation |
| LC/MS | liquid chromatography-mass spectrometry |
| MALDI-TOF MS | matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry |
| MES | 2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate |
| MOPS | 3-morpholinopropanesulfonic acid |
| NMR | nuclear magnetic resonance |
| NQAD | nano quantity analyte detector |
| PCR | polymerase chain reaction |
| RT-PCR | reverse transcription polymerase chain reaction |

要旨

糖質は、食品において栄養素、甘味等による嗜好性、健康機能・生体調整の機能を持ち、食生活において重要な役割を果たしている。澱粉液化液に各種の糖質関連酵素を作用させることで、ぶどう糖、異性化糖、オリゴ糖、水あめといった各種糖質製品が生産されている。糖質関連酵素の1つである α -グルコシダーゼは、基質の非還元末端の α -グルコシド結合を加水分解し α -グルコースを遊離する酵素である。糖質加水分解酵素 (Glycoside Hydrolase) ファミリー31に分類される α -グルコシダーゼは、マルトオリゴ糖に高い基質特異性を示し、加水分解活性とともに糖転移活性を併せ持つものが多い。糖転移反応では、 α -グルコシダーゼの種類によっては α -1,2-、 α -1,3-、 α -1,6-グルコシド結合といった、澱粉に多く含まれる α -1,4-グルコシド結合とは異なる結合様式を含む糖質が生成し、それらの糖質には生理機能や味質・物性改良機能が期待される。そのため、転移特性の異なる α -グルコシダーゼを発見することは、糖質素材の多様化につながる。

Aspergillus 属の多くの菌は、各種有用酵素を分泌し酵素の生産性も高いため、古くから醤油、味噌、日本酒などの発酵食品の製造に利用されており、また産業用の酵素製剤の製造においても多く利用される重要な微生物である。現在 *Aspergillus* 属の菌由来の α -グルコシダーゼとしては *Aspergillus niger* 由来の α -グルコシダーゼ (*A. niger* AgdA) が α -1,6-グルコシド結合を含むイソマルトオリゴ糖を製造する酵素製剤用に産業レベルで使用され、様々な面から研究もされている。一方それ以外の *Aspergillus* 属に由来する α -グルコシダーゼの転移特性についての知見は少なく、新たな糖質素材の開発につながる特徴的な転移特性を持つ α -グルコシダーゼが存在するかを検討されることは少なかった。

そこで本研究では、複数の *Aspergillus* 属の菌に由来する GH31 α -グルコシダーゼを全ゲノム情報から探索、クローニングを行い、発現させ、糖転移反応による生成物を詳細に解析した。そして特徴的な転移特性を持つ α -グルコシダーゼを見出すこと、遺伝子配列との関係性を明らかにすることを目的とした。

第2章では、*A. sojae* 由来の α -グルコシダーゼ (*AsojAgdL*) を *A. nidulans* を宿主とした発現系で発現させて精製し、酵素の基本特性および転移特性を解析した。そしてマルトースを基質とした転移反応では、 α -1,6-グルコシド結合を含む各種糖質が生成し、反応が進むと転移生成物の結合様式の大部分は α -1,6-グルコシド結合に集約していくことを確認し、その反応経路を推察した。またマルトペンタオースを基質とした転移反応では、*A. niger* AgdA ではほとんど生成しない、連続した α -1,6-グルコシド結合を含む糖質を生成する特徴的な転移特性を持つことを明らかにした。

第3章では、*A. niger* 由来の α -グルコシダーゼ (*A. niger* AgdB) を *A. nidulans* を宿主とした発現系で発現させて精製し、酵素の基本特性を解析した。また、多様な α -グルコシド結合で構成される糖質を評価するために、NMRを用いた評

価系を構築した上で、*A. niger* AgdB の転移生成物を解析し、 α -1,2・1,3-グルコシド結合と少量の α -1,1- β -グルコシド結合を含む糖質を生産する転移特性を持つことを明らかにした。

第4章では、第2章で評価した AsojAgdL と遺伝子配列の同一性が極めて高いが転移特性が異なることが示唆されていた *A. oryzae* 由来の α -グルコシダーゼ (AoryAgdS) とその変異体 (AoryAgdS_H450R)、および AsojAgdL の変異体 (AsojAgdL_R450H) を *A. nidulans* を宿主とした発現系で発現させ、各酵素の転移特性を解析した。そしてマルトースを基質とした転移反応では、AoryAgdS は α -1,3・1,4-グルコシド結合を多く生成する一方、AoryAgdS_H450R は α -1,6-グルコシド結合を多く生成すること、AsojAgdL_R450H は AsojAgdL と比較して α -1,6-グルコシド結合の生成量が減り、 α -1,3・1,4-グルコシド結合を多く生成することが分かった。またマルトペンタオースを基質とした転移反応では、AoryAgdS_H450R が変異導入によって連続した α -1,6-グルコシド結合を含む糖質の生成能を獲得した一方、AsojAgdL_R450H では逆に連続 α -1,6-グルコシド結合を生成しなくなった。これらの転移反応の結果より AoryAgdS と AsojAgdL が 450 番目のアミノ酸の種類によって転移特性が大きく変化することを明らかにした。

以上より、*Aspergillus* 属由来の GH31 に属する α -グルコシダーゼに関する新たな知見が得られた。*Aspergillus* 属由来の GH31 酵素で構築した遺伝子系統樹では、 α -グルコシダーゼのグループは3つのサブグループに分けられ、1つは *A. niger* AgdA、1つは第3章の *A. niger* AgdB、そしてもう1つは第2章の AsojAgdL と第4章の AoryAgdS を含む。各サブグループには転移特性の上でも大きく異なる α -グルコシダーゼが属すること、3番目のサブグループには配列上の1か所のアミノ酸の種類の違いによって2種の転移特性の α -グルコシダーゼが属することが明らかになった。

従来は *A. niger* AgdA のように、短い α -1,6-グルコシド結合から成るイソマルトオリゴ糖を生産する α -グルコシダーゼのみが知られていたが、それ以外の様々な結合様式を含む糖質を生産する α -グルコシダーゼが複数種存在し、*Aspergillus* 属由来の α -グルコシダーゼが転移特性の面で多様であることを明らかにした。

第 1 章 緒論

糖質は、食品において栄養素、甘味等による嗜好性、健康機能・生体調整の機能を持ち、食生活において重要な役割を果たしている。グルコースで構成される澱粉由来の糖質は、その資源としての量から特に重要である。澱粉を液化してさらに加水分解や異性化等を行うことで、ぶどう糖、異性化糖、オリゴ糖、水あめといった性質の異なる各種糖質に変換され、幅広い食品に利用されている。澱粉液化後の処理方法によって様々な糖質が生産可能であるが、糖質関連酵素による加水分解反応、糖転移反応は特に重要である。主要な澱粉糖質関連酵素としては α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、プルラナーゼ、イソアミラーゼ、そして α -グルコシダーゼがあり[1]、酵素によって加水分解する位置や結合の種類、分解産物が異なる (Fig. 1-1)。

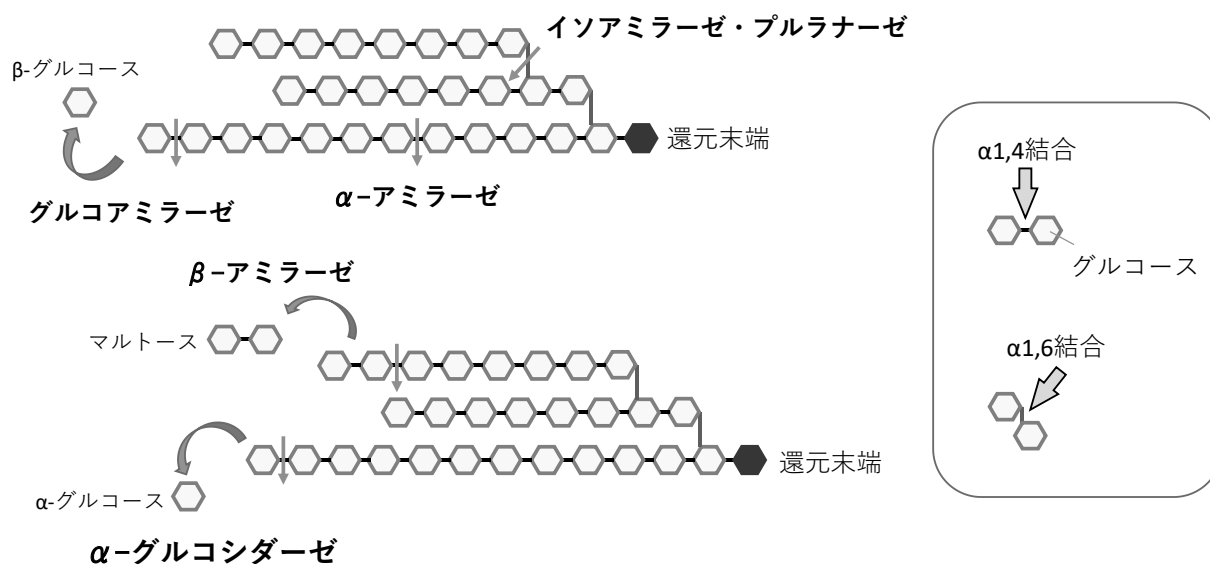


Fig. 1-1. 澱粉関連酵素の種類と酵素反応の例

【 α -グルコシダーゼおよび GH31 に属する酵素について】

α -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.20) は、基質の非還元末端の α -グルコシド結合を加水分解し α -グルコースを遊離する酵素である。糖質に作用する酵素は、糖質に作用する酵素のデータベースである CAZy (<http://www.cazy.org/>) によって、一次構造の相同性を元に 170 種類の糖質加水分解酵素 (Glycoside Hydrolase) ファミリーに分類されており[2]、主要な α -グルコシダーゼは GH13 または 31 に属している。GH31 は α -キシロシダーゼ、 α -グルカンリアーゼなど多様な反応を触媒する酵素が含まれる酵素群であるが、植物、哺乳動物、微生物といった様々な生物に由来する α -グルコシダーゼも GH31 の中に多く含まれている[3, 4]。2021 年末において GH31 には 2 万ほどの酵素が分類されているが、酵素の活性が調べられているものは 100 ほど、立体構造が判明しているの

は 30 ほどとなっている [2]。GH31 の構造は酵素によって差異があるものの、典型的な構造は N 末端側の β -シートから成るドメイン、 $(\beta/\alpha)_8$ バレルから成る触媒ドメイン、C 末端側の β -シートから成るドメインが 2 つという 4 つのドメインより構成されている (Fig. 1-2)。GH31 の多くは 900 アミノ酸残基前後から成る。これは、澱粉分解酵素として最もよく研究されている GH13 酵素である麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来の α -アミラーゼ (タカアミラーゼ A、GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>) accession no. 0901305A) が 478 アミノ酸残基であるのと比較し、糖質加水分解酵素としてはかなり大きい。GH31 の触媒機構はアノマー保持型であることが知られており、この機構では、水の代わりにアクセプターとして糖が反応に関与すれば、後述する糖転移反応となる [5]。

α -グルコシダーゼにはフェニル- α -グルコシドやスクロースといったヘテロ多糖に対する特異性が高いもの、ホモ多糖に対する特異性が高いものがあることが知られているが [6]、多くの GH31 の α -グルコシダーゼは、グルコースが重合したホモ多糖であるマルトオリゴ糖に高い基質特異性を示す [7]。 α -グルコシダーゼは加水分解とともに糖転移も触媒し、転移反応で生成する糖質の結合様式は α -グルコシダーゼの種類によって異なる [5] (加水分解活性だけでなく、糖転移活性が高い酵素を含めこの論文中では α -グルコシダーゼと記述する)。澱粉を加水分解して得られる糖質はほとんどが α -1,4-グルコシド結合で構成されているが、こういった澱粉由来の α -グルカン を基質に α -グルコシダーゼを作用させ、転移反応を起こすことによって、 α -1,2-、 α -1,3-、 α -1,6-グルコシド結合など、 α -1,4-グルコシド結合以外の様々な結合様式を含む糖質を生産することができる [5, 8, 9, 10, 11]。また、それらの特殊な結合様式を含む糖質は、難消化性 [12]、抗う蝕性 [13]、免疫賦活 [14, 15]、プレバイオティクス [16] といった機能を持つことが知られている。 α -グルコシダーゼの転移反応によって生成する糖質は産業レベルでも生産されていて、イソマルトオリゴ糖 (α -1,6-グルコシド結合を含むオリゴ糖) やニゲロオリゴ糖 (α -1,3-グルコシド結合を含むオリゴ糖) は味質調製や整腸作用といった、 α -1,4-グルコシド結合を主体とする澱粉分解物とは異なる特徴や機能を持つため、食品産業等で広く利用されている [17, 18, 19]。したがって、転移特性の異なる新規の α -グルコシダーゼを発見することは、糖質素材の多様化につながる。

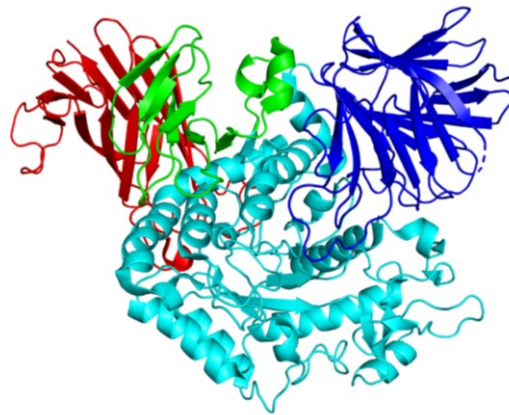


Fig. 1-2. 細菌*Cellvibrio japonicus* α -グルコシダーゼ CjAgd31Bの立体構造

青, N末端側ドメイン; 水色, 触媒ドメイン; 緑, Proximal C末端側ドメイン;
赤, Distal C末端側ドメイン 図はProtein Data Bank 4B9Yをもとに作製した。

【*Aspergillus* 属が生産する α -グルコシダーゼについて】

Aspergillus 属の多くの菌は、各種有用酵素を分泌し、酵素の生産性も高いため、古くから醤油、味噌、日本酒などの発酵食品の製造に利用されており、また産業用の酵素製剤の製造においても多く利用される重要な微生物である。 α -グルコシダーゼに関しても、*A. niger*由来の α -グルコシダーゼ (*A. niger* AgdA) がイソマルトオリゴ糖を製造する酵素製剤用に産業レベルで使用されている。そして *A. niger* AgdA は様々な面から研究がなされてきており、遺伝子配列の解析 [20] から GH31 に属することが分かっており、転移特性についての詳細な解析もされている [21]。

一方、*A. niger* AgdA 以外の *Aspergillus* 属に由来する α -グルコシダーゼに関しては、研究例が少なく、特に転移特性については詳細な解析がされてこなかった。*A. oryzae* 由来の α -グルコシダーゼ (*A. oryzae* AgdA) や *A. nidulans* 由来の α -グルコシダーゼ (*A. nidulans* AgdB) は、遺伝子配列が解析されて GH31 に属することが分かっており、また転移反応で α -1,6-グルコシド結合を含む糖質を生成することも報告されている [22, 23, 24]。*A. nidulans* においては、2つの GH31 α -グルコシダーゼ AgdA および AgdB の両方の遺伝子を破壊した株では、マルトースによるアミラーゼ産生の誘導が 1/2 ほどになることから、澱粉分解酵素の発現調節に関与することが判明しており [25]、遺伝子レベルでの研究が多数報告されている。しかし酵素化学的な研究は本論文の研究の開始時にはあまり進んでおらず、転移反応の試験で同定されたのはイソマルトース、パノース、イソマルトトリオースなど短い α -1,6-グルコシド結合で構成される糖質に限られ、*A. niger* AgdA で製造可能なこれらの糖質以外を生成する特徴的な転移特性を持つ *Aspergillus* 属由来の α -グルコシダーゼが存在するかについては分かっていなかった。

そして近年は様々な生物で全ゲノム情報の解読がなされ、ゲノム情報からアプローチするポストゲノム研究が可能となってきた。 *Aspergillus* 属のい

くつかの菌種でも全ゲノム情報の解読が完了し、機能未知の GH31 酵素と推測される遺伝子配列も多く見出されている。全ゲノム情報から GH31 の α -グルコシダーゼと推測される遺伝子配列を探索し、クローニング、評価するという、従来技術とは異なるアプローチ法が可能となり、新たな転移特性をもつ *Aspergillus* 属由来の GH31 の α -グルコシダーゼを見出せる可能性が高まっていた。

Aspergillus 属に由来する転移特性の異なる α -グルコシダーゼは、新たな糖質素材の開発の可能性を広げるのにとどまらず、発酵食品の改質にもつながる可能性がある。例えば、*A. oryzae* や *A. sojae* を使用して製造される代表的な発酵食品である味噌と醤油には、オリゴ糖が含まれていると報告されている [26, 27]。グルコオリゴ糖は、味噌 [28] や酒 [29] など、食品の品質に良い影響を与えることが知られている。また、 α -グルコシダーゼ活性の高い *A. oryzae* が生産するイソマルトオリゴ糖含有量の高い味噌の風味が良くなることが報告されている [28]。*Aspergillus* 属が持つ α -グルコシダーゼを活用することで、品質が向上した発酵食品が生産可能になることも考えられた。さらには、*A. nidulans* の α -グルコシダーゼの転移反応によって生成したイソマルトースは澱粉分解酵素の転写制御に関わっていることが知られており [25]、*Aspergillus* 属由来の GH31 の α -グルコシダーゼの転移特性を解析することは、*Aspergillus* 属の菌自身が澱粉糖を資化するメカニズムの解明にもつながると考えられた。

【本論文について】

本論文は、緒言の第 1 章を含め 5 章から構成させる。本研究では、*Aspergillus* 属の菌に由来する特徴的な転移特性を持つ GH31 α -グルコシダーゼを探索、解析することを目的とした。そして、複数の *Aspergillus* 属の菌の全ゲノム情報から、特徴的な転移特性を持つ可能性のある α -グルコシダーゼ遺伝子をクローニングし、発現させて精製し、転移特性を解析した。また α -グルコシダーゼの転移特性の違いをもたらすタンパク質アミノ酸配列上の特定のアミノ酸についても検討した。第 2 章では、*A. sojae* 由来の連続 α -1,6 転移能を持つ α -グルコシダーゼ (*AsojAgdL*) の解析、第 3 章では、*A. niger* 由来の α -1,2・1,3 転移能を持つ α -グルコシダーゼ (*A. niger AgdB*) の解析について述べる。第 4 章では、*A. oryzae* 由来で *AsojAgdL* と配列の同一性が極めて高い α -グルコシダーゼ (*AoryAgdS*) と *AsojAgdL* に関し、野生型と点変異を導入した変異型 α -グルコシダーゼの転移特性を比較し、特定のアミノ酸が転移特性に影響を与えていることを示したことについて述べる。第 5 章では、これまでの章の総括を、*Aspergillus* 属の菌の GH31 酵素の系統解析の観点から述べる。

第2章 *Aspergillus sojae* 由来の連続 α -1,6 転移 α -グルコシダーゼの解析

2-1. 序論

本章では、新たに発見した *A. sojae* 由来の α -グルコシダーゼ、AsojAgdL の基本特性および転移特性の解析について述べる。*A. sojae* は醤油や味噌といった発酵食品の製造に利用されてきた菌であり、発酵の過程で様々な酵素を分泌するが、*A. sojae* に由来する α -グルコシダーゼについては、これまでに詳細な解析がなされたことがなかった。近縁種である *A. oryzae* は α -1,6 転移活性を持つ α -グルコシダーゼ [23, 24] を始め GH31 に属するタンパク質は 10 種あり [2]、*A. sojae* にも未知の転移特性を持つ α -グルコシダーゼが存在する可能性があった。そこで近年解読がなされた *A. sojae* の全ゲノム配列 [30] から、 α -グルコシダーゼと推定される遺伝子配列を探索、クローニングした。さらに *A. nidulans* を宿主に発現させ、精製酵素を取得し、基本特性および転移特性を解析した。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 実験材料と試薬

試薬類は後述のものを除いて富士フィルム和光純薬製のものを用いた。イソマルトテトラオース、イソマルトペンタオースとイソマルトヘキサオースは生化学工業製のものを用いた。ニゲロースはコスモバイオ製のものを用いた。イソマルトトリオースはシグマアルドリッチ製のものを用いた。

3^2 -*O*- α -D-glucosyl-maltose とイソマルトトリオシルグルコースは既報の手法 [31, 32] に従って調製した。

2-2-2. 使用した微生物株

A. sojae NBRC4239 および *A. niger* NBRC4066 は、製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンターから入手した。*A. oryzae* RIB40 は、酒類総合研究所から入手した。*A. nidulans* ATCC38163 は、American Type Culture Collection から入手した。

2-2-3. クローニング、発現ベクターの構築と形質転換

A. sojae NBRC4239 の全ゲノム配列 (GenBank accession no. BACA00000000) から *A. oryzae* 由来の α -グルコシダーゼ (以下、AoryAgdS) の遺伝子配列 (GenBank accession no. XP_001825390) と同一性の高い (98%) 配列を抽出し、AsojAgdL の遺伝子配列とした。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) には、Phusion Hot Start II DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) を用いた。使用した PCR プライマーの一覧を Table 2-1 に示した。*A. oryzae tef1* 遺伝子 (GenBank accession no. Q9Y713) プロモーター [33] の制御下で AsojAgdL 遺伝子を発現させるために、発現ベクターを以下のように構築した。*tef1* 遺伝子のプロモーター領域を含む 0.8 kbp の DNA 断片は、promoter 1/promoter 2 のプライマーを使用し、*A. oryzae* RIB40 のゲノム DNA を鋳型に増幅した。終止コドンのない AsojAgdL 遺伝子は、AgdSL1 / AgdSL2 のプライマーを使用し、*A. sojae* NBRC4239 のゲノム DNA を鋳型に増幅した。10×His タグと終止コドンを含む AsojAgdL のターミネーター領域 0.3 kbp の DNA 断片を、terminatorSL1 / terminatorSL2 のプライマーを使用し、*A. sojae* NBRC 4239 のゲノム DNA を鋳型に増幅した。In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ) を使用して、3つの PCR 産物と HindIII/KpnI で処理した pPTRII (タカラバイオ) を結合し発現ベクターとした。*A. niger* 由来の α -グルコシダーゼ (*A. niger* AgdA, GenBank accession no. CAK44692) の発現ベクターの構築は、AgdSL1 / AgdSL2 の代わりに AgdNA1 / AgdNA2、terminatorSL1 / terminatorSL2 の代わりに terminatorNA1 / terminatorNA2 をプライマーとして用い、*A. niger* NBRC4066 のゲノム DNA を鋳型に増幅したことを除いて、AsojAgdL と同様に実施した。得られた AsojAgdL、*A. niger* AgdA の発現ベクターを用い、Gomi *et al* [34] によって報告された方法で *A. nidulans* ATCC38163 を形質転換した。

AsojAgdL の cDNA は、Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) で取得した。AsojAgdL の形質転換体の RNA は、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使用して抽出、精製した。First-strand cDNA はオリゴ (dT) プライマーを使用して合成し、プライマー AgdSL3 / AgdSL2 を使用して PCR 増幅した。PCR 産物を PCR2.1 TOPO (Invitrogen) にクローニング後、配列解析を実施し、AsojAgdL のアミノ酸配列を確認した (GenBank accession no. DM849390)。

Table 2-1. AsojAgdL、*A. niger* AgdA のクローニングに用いた PCR プライマー

| Primer | Sequence |
|---------------|--|
| promoter1 | 5'-TGATTACGCCAAGCTTGATTTTCACTGTGGACCAGACA-3' |
| promoter2 | 5'-TTTGAAGGTGGTGC GAACT-3' |
| AgdSL1 | 5'-CGCACCACCTTCAAAAATGTATCTTAAGAAGCTGCTCACTTC-3' |
| AgdSL2 | 5'-CAGAATCGTAATCTCATTCTCGC-3' |
| terminatorSL1 | 5'-GAGATTACGATTCTGCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCCTGAATGATTTGGTTGGTGAGATAG-3' |
| terminatorSL2 | 5'-GTGAATTCGAGCTCGGTACCAGGTGATGAACGGAGCTTTAA-3' |
| AgdSL3 | 5'-ATGTATCTTAAGAAGCTGCTCAC-3' |
| AgdNA1 | 5'-CGCACCACCTTCAAAAATGGTGAAGTTGACGCATCTC-3' |
| AgdNA2 | 5'-CCATTCCAATACCCAGTTTC-3' |
| terminatorNA1 | 5'-TGGGTATTGGAATGGCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCCTAGTGTCAGCCACAAGCCAGGTG-3' |
| terminatorNA2 | 5'-GTGAATTCGAGCTCGGTACCGCGGGTGTGTTCGACTG-3' |

2-2-4. 酵素の精製

発現した AsojAgdL の精製酵素を得るために、形質転換した *A. nidulans* を、2 L の三角フラスコ、180 rpm の回転速度で 37°C、4 d、好氣的に振盪培養した。培地は 0.1 μ g / mL のピリチアミンを含む 1 L の Czapek-Dox 培地を用いた。菌体は、ミラクロス (Merck) を通して培養液と分離し回収した。100 g の菌体を 20 mM イミダゾールを含む 1 L の Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し、ヒスコトロン (ニチオン) で破碎し、遠心分離 (15,700×G、20min) により得られた上清を細胞抽出液とした。細胞抽出物を His-Trap HP カラム (GE ヘルスケア) にアプライし、0.5 M NaCl と 500 mM イミダゾールを含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で溶出した。溶出液を Hiload 16/60 Superdex 200 Preprgrade カラム (GE ヘルスケア) にアプライし、20 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate (MES) -NaOH 緩衝液 (pH 6.0) で溶出した。活性画分を集め、精製酵素とした。*A. niger* AgdA の精製は、His-Trap HP カラムへのアプライ、溶出までを AsojAgdL と同じ手順で実施し、溶出液の緩衝液を、限外ろ過膜を用いて 20 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 6.0) に置換し、得られた溶液を精製酵素とした。

2-2-5. 酵素活性の測定

α -グルコシダーゼ活性は、20 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 6.0) 中の 20 mM マルトースと酵素液を 40°C、30 min インキュベートすることで測定した。反応は 10% (w / v) シュウ酸を 1% (w / w) 加えて 10 min 煮沸して停止した。遊離したグルコースは、グルコース CII テストワコー (富士フィルム和光純薬) を用いて測定した。 α -グルコシダーゼ活性の 1 U は、上記条件下で 1 min あたり 1 μ mol のマルトースの加水分解を触媒する酵素の量として定義した。 α -グルコシダーゼ活性に対する温度の影響は、反応温度を 40~70°C の各温度に設定した以外は α -グルコシダーゼ活性測定と同じ条件で測定した。 α -グルコシダーゼ活性に対する pH の影響は、pH の調整でフタル酸-HCl (pH 2.0-3.0)、フタル酸-NaOH (pH 4.0~5.5)、MES-NaOH (pH 5.5~7.0)、3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS)-NaOH (pH 7.0~8.5)、N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid (CAPS)-NaOH (pH 9.0~11.0) の各緩衝液を用いた以外は α -グルコシダーゼ活性測定と同じ条件で分析した。温度および pH 安定性は、各温度 (40~70°C) で 1 hr、または各 pH (2.0~12.0) で 4°C、24 hr インキュベートした後の残存した α -グルコシダーゼ活性を分析することで決定した。pH の調整には、pH 2.0~3.5 はフタル酸-HCl 緩衝液、pH 4.0~5.5 はフタル酸-NaOH 緩衝液、pH 5.5~7.0 は MES-NaOH 緩衝液、pH 7.0~9.0 は MOPS-NaOH 緩衝液、pH 9.0~12.0 は CAPS-NaOH 緩衝液を使用した。反応速度論的解析では、AsojAgdL では 20 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 6.0)、*A. niger* AgdA では 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中で、各基質と 40°C、60 min インキュベーションし、反応は 10% (w / v) シュウ酸を 1% (w / w) 加えて 10 min 煮沸して停止し、遊離したグルコースをグルコース CII テストワコーで分析し、反応速度を求めた。そして KaleidaGraph ver. 4.5.3 (Synergy Software) を用い非線形回帰分析にて反応速度論パラメーター (k_{cat} 、 K_m 、 k_{cat} / K_m) を求めた。基質阻害については、次の式を使用して K_i 値を算出することで求めた： $v = V_{max} [S] / (K_m + [S] + [S]^2 / K_i)$ [35]。

2-2-6. タンパク質分析

タンパク質濃度は、Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad) を用いて測定した。SDS-PAGE は、Laemmli によって報告された手法 [36] に従い、10~15% の勾配のポリアクリルアミドゲルを用いて実施した。Benchmark Ladder (Invitrogen) をマーカーとして使用した。Native-PAGE は、Davis によって報告された手法 [37] に従い、8~25% グラジエントポリアクリルアミドゲルを使用して行った。HMW Marker Kit (GE ヘルスケア) をマーカーとして使用した。マーカーに含まれる thyroglobulin (669 kDa)、ferritin (440 kDa)、catalase (232 kDa)、lactate dehydrogenase (140 kDa)、albumin (66 kDa) の各 pI 値は、4.5、4.5、5.4、5.0、4.9 である。 pI は、Phastsystem (GE ヘルスケア) で Phastgel IEF 3-9 を使用し、等電点電気泳動することで分析した。各試験におけるタンパク質染色は Rapid CBB KANTO (関東化学) を使用した。

2-2-7. 転移生成物の調製

AsojAgdL の転移生成物は、精製酵素を使用して調製した。マルトースを基質として使用した場合は、30% (w / w) のマルトース、0.6 U / g の酵素 (1 g の基質固形分あたり 2 U の酵素、すなわち 2 U / g DS (dissolved substrate) の酵素を作用) で、pH 6.0、40°C で 1、2、6、12、24、48、72 hr 反応した。基質としてマルトペンタオースを使用した場合は、30% (w / w) のマルトペンタオース、2.4 U / g の酵素 (基質あたりでは 8 U / g DS) で、pH 6.0、40°C で 72 hr 反応した。反応は 10 min 煮沸して停止した。A. niger AgdA の転移生成物は、市販酵素であるトランスグルコシダーゼ L「アマノ」(天野エンザイム) を用いて調製した。30% (w / w) のマルトペンタオース、2.4 U / g の酵素 (基質あたりでは 8 U / g DS) で、pH 6.0、40°C で 72 hr 反応した。反応は 10 min 煮沸して停止した。

2-2-8. 転移生成物の HPLC 分析および分画

転移生成物は、以下の条件下で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を使用して分析した。重合度 (degree of polymerization、DP) 分析では、MCI GEL CK04S カラム (三菱化学) を使用し、カラム温度 65°C、流速 0.35 mL / min で、蒸留水で溶出し、屈折率検出器 RID-10A (島津製作所) で検出した。また液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS) を用いてクロマトグラフ上の各ピークの重合度を同定した。構造異性体分析では、Unison UK-Amino (Intact) カラムを使用し、カラム温度 50°C、流速 0.4 mL / min でアセトニトリルと水とのグラジエント溶出で溶出し、エアロゾルベース検出器 (NQAD、旭テクネイオン) で検出した。グラジエント溶出の条件は、アセトニトリル/水の初期比率が 88%、次に 30 min かけて 81% に低減し、その後 81% で 35 min 維持し、その後 60% に即時低減し、その後 60% で 10 min 維持し、88% に即時増加した。転移生成物の分画は、以下の条件で HPLC を用いて行った。Bio-Gel P2 (Bio-Rad) カラムを使用し、カラム温度 60°C、流速 9 mL / min で、蒸留水で溶出し、屈折率検出器 RI704P (GLサイエンス) で検出しフラクションコレクターで分画した。

2-2-9. NMR 分析

核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance、NMR) 分析は、UNITY INOVA 500 (Varian) にて 500 MHz で ¹H-スペクトルを測定した。サンプルは重水に溶解して 30°C で測定し、水のシグナルを基準とした。

2-2-10. MALDI-TOF MS 分析

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) は、2,5-ジヒドロキシ安息香酸をマトリックスとして使用し、Autoflex Speed IC TOF / TOF (Bruker BioSpin) にてスペクトルを測定した。1 μL のサンプルのアリコートに 1 μL の 2,5-dihydroxybenzoic

acid と TA30 (30:70 [v / v]アセトニトリル : TFA、0.1%水溶液中) で混合し、室温で乾燥して分析した。モル質量は正のリフレクトロンモードで分析した。

2-2-11. 転移生成物のデキストラナーゼ加水分解による評価

デキストラナーゼ加水分解による転移生成物の評価は、以下の方法で行った。5% (w / w) の転移生成物に対し、1% (w / w) の 1000 倍に希釈したデキストラナーゼ L「アマノ」(天野エンザイム)、pH 6.0、50℃で 16 hr 反応し、10 min 煮沸して反応を停止した。加水分解物の分析は、前記 HPLC による重合度分析と同じ方法で行った。

2-2-12. メチル化分析

転移生成物に含まれるグルコシド結合様式の比率を決定するために、Cicanu、Kerek によって報告された手法 [38] でメチル化分析を実施した。ガスクロマトグラフ分析は、GC 7890A (Agilent Technologies) と水素炎イオン化検出器を使用して、以下の条件下で実行した。カラム : HP-5MS フューズドシリカキャピラリー (ID 30 m × 0.25 mm; Agilent Technologies) ; 温度 : 100℃で 1 min、その後 280℃で 30 min、1 min 放置。注入温度 : 280℃; キャリアガス : ヘリウム。

2-3. 結果

2-3-1. AsojAgdL の発現、精製と生化学的特性

発現した AsojAgdL を、His-Trap アフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した (Table 2-2)。精製された AsojAgdL は、SDS-PAGE で分子量が 65 kDa と 76 kDa の 2 本のバンドとして得られた (Fig. 2-1 A)。等電点電気泳動の結果、バンドは不鮮明であったが、AsojAgdL の pI は約 5.2 であり (Fig. 2-1 C)、native-PAGE のマーカートンパク質の pI に近かった。このことから native-PAGE を行い、未変性酵素のおよその分子量を調べたところ、110 kDa の単一バンドとして得られた (Fig. 2-1 B)。一方、*A. niger* AgdA は、His-Trap アフィニティークロマトグラフィーを使用して精製した。精製された *A. niger* AgdA は、SDS-PAGE で 2 本のバンドとして得られた (Fig. 2-2 A)。等電点電気泳動では、バンドは不鮮明であったが、 pI 5.20 と 6.55 の間で 2 本のバンドが検出され (Fig. 2-2 C)、native-PAGE のマーカートンパク質の pI に近かった。そして native-PAGE を行い、未変性酵素のおよその分子量を調べたところ、140 kDa の単一バンドとして得られた (Fig. 2-2 B)。

次に、AsojAgdL の活性と安定性に対する pH と温度の影響を調べた (Fig. 2-3)。AsojAgdL の最適 pH は 5.5 で、pH 6.0~10.0 で 90% 以上の活性が残存した。最適温度は 55°C で、50°C 以下では 1 hr のインキュベーションで活性が 90% 以上残存し、70°C では 95% の活性が失われた。

Table 2-2. AsojAgdL の精製過程

| Procedure | Total protein (mg) | Total activity (U) | Specific activity (U/mg) | Yield (%) |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------|
| Cell extract | 124.1 | 15.6 | 0.13 | 100 |
| His-Trap HP | 13.3 | 12.6 | 0.95 | 81 |
| Hiload 16/60 Superdex 200 Prepgrade | 0.4 | 1.9 | 5.38 | 12 |

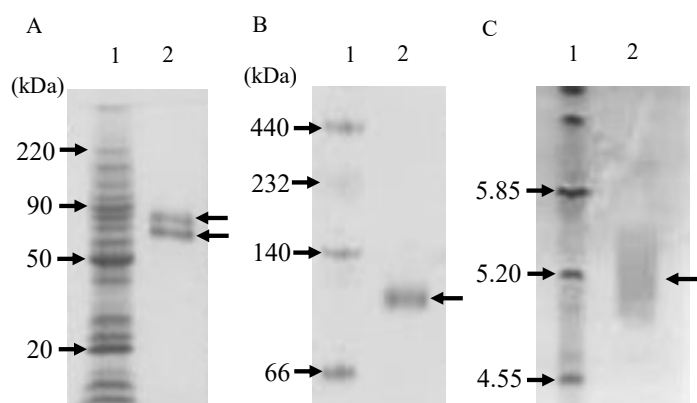


Fig. 2-1. AsojAgdLの分子量と等電点

(A) SDS-PAGE。レーン1, Bench mark Ladder; レーン2, AsojAgdL。
 (B) native-PAGE。レーン1; HMW marker kit; レーン2, AsojAgdL。
 (C) 等電点電気泳動。レーン1, Broad pI kit; レーン2, AsojAgdL。

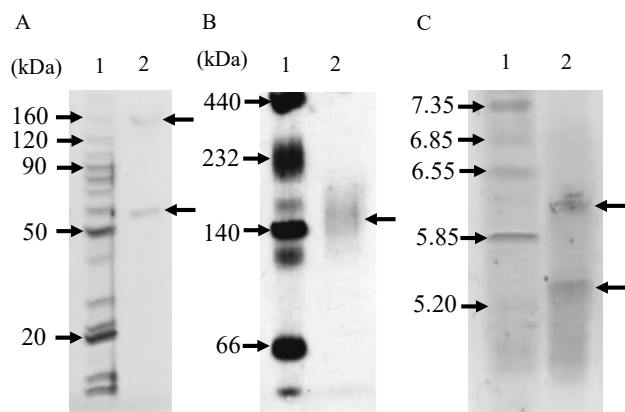


Fig. 2-2. *A. niger* AgdAの分子量と等電点

(A) SDS-PAGE。レーン1, Bench mark Ladder; レーン2, *A. niger* AgdA。
 (B) native-PAGE。レーン1; HMW marker kit; レーン2, *A. niger* AgdA。
 (C) 等電点電気泳動。レーン1, Broad pI kit; レーン2, *A. niger* AgdA。

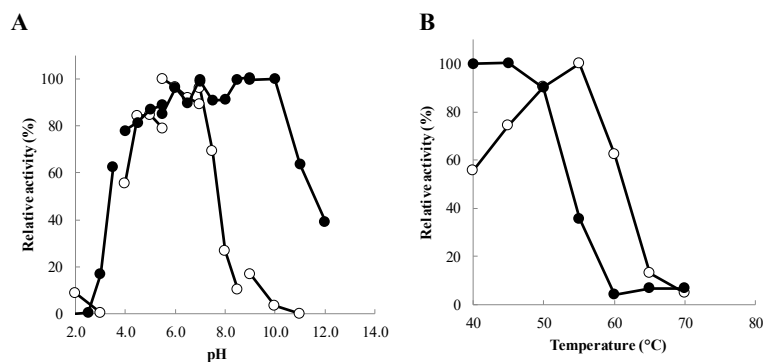


Fig. 2-3. pH、温度がAsojAgdLの α -グルコシダーゼ活性に与える影響。

(A) 各pHにおける活性 (○) とpH安定性 (●)。 (B) 各温度における活性 (○) と温度安定性 (●)。

2-3-2. AsojAgdL の反応速度論的解析

AsojAgdL の基質特異性を評価するため、様々な糖質に対する反応速度論パラメーターを決定し、*A. niger* AgdA と比較した。トレハロースの加水分解活性は AsojAgdL、*A. niger* AgdA とともに検出されなかった。マルトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、コージビオース、ニゲロース、可溶性澱粉、およびデキストランを基質とした反応速度論パラメーターを Table 2-3 に示した。

マルトオリゴ糖を基質とした場合、AsojAgdL と *A. niger* AgdA の加水分解活性は、高基質濃度（約 2 mM 以上）下で阻害された。基質濃度が低い場合、酵素反応はミカエリス-メンテン速度論モデルによく適合したが（Fig. 2-4 A）、基質濃度が高い範囲まで含めると、基質阻害の速度論に従った曲線となった（Fig. 2-4 B）。そこで k_{cat} と K_m の値は低基質濃度の範囲で決定し、 K_i 値を測定した基質濃度の範囲全体から計算した（Table 2-4）。一方、イソマルトオリゴ糖、コージビオース、ニゲロースに関しては、AsojAgdL と *A. niger* AgdA のいずれも基質阻害は観察されなかった（Fig. 2-4 C）。

AsojAgdL、*A. niger* AgdA とともに幅広い糖質基質に対して作用したが、基質特異性は異なった。AsojAgdL はマルトオリゴ糖に対する作用性が高く、マルトトリオースからマルトヘキサオースのマルトオリゴ糖の k_{cat} / K_m 値は 11.0 ~ 17.7 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。そしてイソマルトオリゴ糖に対しても重合度に関わらず作用し、イソマルトースからイソマルトヘキサオースの k_{cat} / K_m 値はいずれも 3 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 程度であった。一方、*A. niger* AgdA はマルトオリゴ糖に対する作用性が非常に高く、マルトトリオースからマルトヘキサオースのマルトオリゴ糖の k_{cat} / K_m 値は約 30 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ だった。しかし、イソマルトオリゴ糖に対しては低い活性を示し、重合度の大きいイソマルトペンタオースおよびイソマルトヘキサオースは 0.6 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、0.5 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ と特に低い作用性であった。マルトオリゴ糖を基質とした場合、AsojAgdL と *A. niger* AgdA の両方で基質阻害が観察されたが、AsojAgdL は阻害のなかったマルトースを除いて *A. niger* AgdA よりも K_i が明らかに低かった。AsojAgdL と *A. niger* AgdA の両方が可溶性澱粉に作用した。一方、AsojAgdL はデキストランに作用したが、*A. niger* AgdA はほぼ作用しなかった。

Table 2-3. AsojAgdL、*A. niger* AgdAの反応速度論的解析

| substrates | AsojAgdL | | | <i>A. niger</i> AgdA | | |
|-----------------------------|---------------|---------------------------------|--|----------------------|---------------------------------|--|
| | K_m (mM) | k_{cat} (s ⁻¹) | k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹) | K_m (mM) | k_{cat} (s ⁻¹) | k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹) |
| Maltose | 2.2 ± 0.3 | 8.5 ± 0.4 | 3.9 | 3.2 ± 0.8 | 52.3 ± 6.1 | 16.5 |
| Kojibiose | 2.1 ± 0.3 | 2.9 ± 0.1 | 1.4 | 5.2 ± 0.1 | 16.8 ± 0.1 | 3.2 |
| Nigerose | 2.5 ± 0.4 | 5.1 ± 0.2 | 2.1 | 13.0 ± 0.3 | 34.0 ± 0.4 | 2.6 |
| Isomaltose | 2.0 ± 0.3 | 4.9 ± 0.3 | 2.4 | 5.0 ± 0.1 | 20.6 ± 0.2 | 4.1 |
| Maltotriose | 2.0 ± 0.0 | 22.1 ± 0.3 | 11.0 | 2.0 ± 0.4 | 62.8 ± 5.8 | 31.7 |
| Maltotetraose | 1.6 ± 0.1 | 22.1 ± 1.3 | 14.1 | 1.2 ± 0.2 | 47.4 ± 3.3 | 39.4 |
| Maltopentaose | 0.9 ± 0.1 | 15.3 ± 1.5 | 17.0 | 1.1 ± 0.1 | 40.4 ± 1.3 | 36.3 |
| Maltohexaose | 0.9 ± 0.1 | 15.9 ± 1.1 | 17.7 | 1.1 ± 0.1 | 43.1 ± 2.0 | 38.7 |
| Soluble starch ^c | 0.4 ± 0.1 | 9.3 ± 1.1 | 24.4 | 3.0 ± 0.5 | 184.3 ± 16.5 | 62.0 |
| Isomaltotriose | 0.5 ± 0.1 | 3.6 ± 0.1 | 7.0 | 11.2 ± 0.4 | 38.3 ± 0.7 | 3.4 |
| Isomaltotetraose | 2.4 ± 0.8 | 5.9 ± 0.6 | 2.4 | 32.8 ± 3.5 | 43.2 ± 3.0 | 1.3 |
| Isomaltopentaose | 0.9 ± 0.1 | 3.6 ± 0.1 | 4.1 | ND ^a | ND ^a | 0.6 ^b |
| Isomaltohexaose | 1.1 ± 0.2 | 3.5 ± 0.1 | 3.1 | ND ^a | ND ^a | 0.5 ^b |
| Dextran ^c | 0.9 ± 0.2 | 2.7 ± 0.2 | 3.1 | ND ^a | ND ^a | 0.4 ^b |

K_m and k_{cat} values are shown with standard errors.

^a Not determined because the enzyme was not saturated with the substrate.

^b The k_{cat}/K_m value was determined from initial velocities (v) at sufficiently low substrate ([S]) based on the relationship $k_{cat}/K_m = v/[S][E]$

^c Weight average molecular weight of soluble starch and dextran were 8800 and 11000, respectively, determined by gel permeation chromatography.

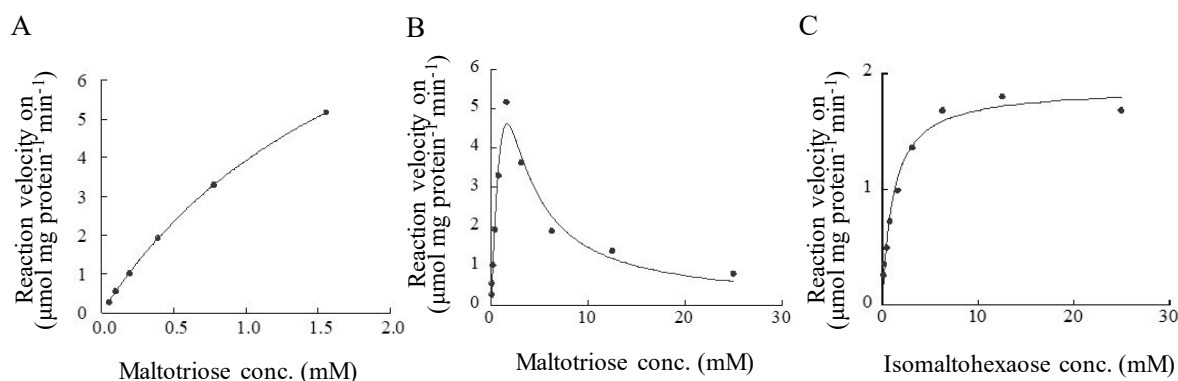


Fig. 2-4. AsojAgdLの反応速度論的解析の例

(A) マルトトリオース (0-1.6 mM) に対する反応速度と基質濃度のプロット。

(B) マルトトリオース (0-25mM) に対する反応速度と基質濃度のプロット。

(C) イソマルトヘキサオース (0-25mM) に対する反応速度と基質濃度のプロット。

Table 2-4. AsojAgdL、*A. niger* AgdAの阻害定数

| substrates | K_i (mM) | |
|---------------|----------------|----------------------|
| | AsojAgdL | <i>A. niger</i> AgdA |
| Maltose | - ^a | 12.0 ± 3.6 |
| Maltotriose | 0.0083 ± 0.59 | 3.8 ± 0.7 |
| Maltotetraose | 0.0029 ± 0.34 | 7.2 ± 5.0 |
| Maltopentaose | 0.29 ± 0.37 | 19.6 ± 2.2 |
| Maltohexaose | 0.14 ± 0.29 | 30.8 ± 7.0 |

Values are shown with standard errors (SE).

^a Not determined because the activity was not inhibited.

2-3-3. マルトースを基質とした AsojAgdL の転移反応

マルトースを基質とした場合の AsojAgdL の転移生成物を HPLC で分析し (Fig. 2-5)、主要なイソマルトオリゴ糖の組成の経時変化を Fig. 2-6 に示した。3糖のパノース (Glc- α -1,6-Glc- α -1,4-Glc) がまず生成し、6 hr で全糖質中の割合が 22.5% にまで増加した。次に、4糖のイソマルトトリオシルグルコース (Glc- α -1,6-Glc- α -1,6-Glc- α -1,4-Glc) が増加し、12 hr で最大量の 8.7% に達した。その後、パノースとイソマルトトリオシルグルコースのいずれも減少に転じた。 α -1,4-グルコシド結合を含まないイソマルトース、イソマルトトリオース、およびイソマルトテトラオースはこの順に増加し、24 hr 後に平衡に達した。72 hr 後の含有比率はそれぞれ 17.8%、10.8%、3.7% であった。

AsojAgdL の転移生成物全体の組成の経時変化を Table 2-5 にまとめた。前述の通りイソマルトオリゴ糖が主要な生成物だったが、他の糖質も生成した。3糖の 3²-O- α -D-グルコシル-マルトースが反応初期に最大 5.4%、ニゲロースが反応後期に最大 2.3% 生成した。反応の後期には最大 2.4% のコージビオースが生成し、マルトトリオースは反応 2 hr で 5.6% まで増加したが、その後減少した。マルトテトラオースは、最大 0.6% と反応時間全体を通して少なかった。

また異性体組成分析では成分の同定が困難である 5 糖類に含まれる糖質の結合様式を分析するために、72 hr 反応後の転移生成物中の 5 糖類を分画し ¹H-NMR で分析したところ、 α -1,6-グルコシド結合の比率が 81% であった。

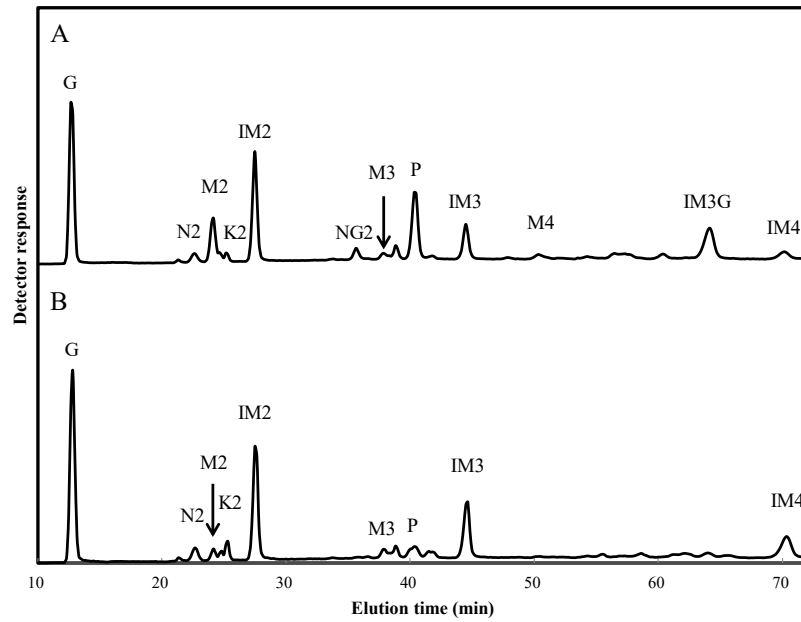


Fig. 2-5. AsojAgdLのマルトースを基質とした転移生成物のHPLCクロマトグラム

(A) 反応12 hr. (B) 反応72 hr. G, グルコース; N2, ニゲロース; M2, マルトース; K2, コジビオース; IM2, イソマルトース; NG2, 3²-O- α -D-グルコシル-マルトース; M3, マルトトリオース; P, パノース; IM3, イソマルトトリオース; M4, マルトテトラオース; IM3G, イソマルトトリオシルグルコース; IM4, イソマルトテトラオース。

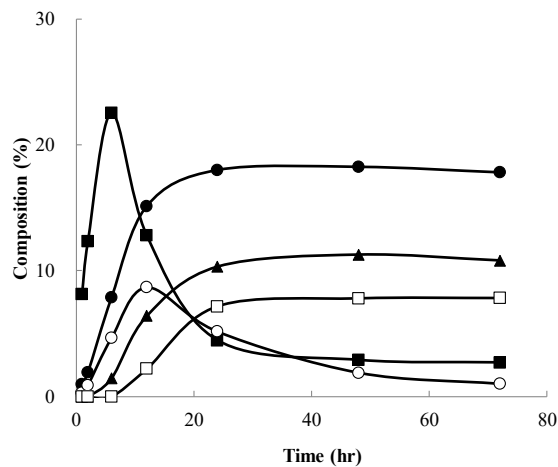


Fig. 2-6. AsojAgdLのマルトースを基質とした転移生成物中のイソマルトオリゴ糖組成の経時変化
 ●, イソマルトース; ■, パノース; ▲, イソマルトトリオース; ○, イソマルトトリオシルグルコース;
 □, イソマルトテトラオース。

Table 2-5. AsojAgdLのマルトースを基質とした転移生成物の糖組成の経時変化

| Composition (%) | | Time course (hr) | | | | | | |
|-----------------|---|------------------|------|------|------|------|------|------|
| | | 1 | 2 | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 |
| DP1 | Glucose | 5.3 | 8.3 | 18.3 | 23.4 | 25.4 | 26.7 | 27.9 |
| DP2 | Nigerose | 0.0 | 0.0 | 0.6 | 1.5 | 2.1 | 2.2 | 2.3 |
| | Maltose | 76.8 | 65.4 | 25.2 | 7.6 | 3.7 | 3.0 | 2.7 |
| | Kojibiose | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.1 | 1.9 | 2.2 | 2.4 |
| | Isomaltose | 1.0 | 1.9 | 7.9 | 15.1 | 18.0 | 18.2 | 17.8 |
| | Others | 1.1 | 0.9 | 0.7 | 0.3 | 0.0 | 0.0 | 0.4 |
| DP3 | 3 ² -O- α -D-glucosyl-maltose | 2.1 | 3.3 | 5.4 | 1.8 | 0.3 | 0.0 | 0.0 |
| | Maltotriose | 4.4 | 5.6 | 5.0 | 1.4 | 1.1 | 1.5 | 1.9 |
| | Panose | 8.1 | 12.3 | 22.5 | 12.8 | 4.5 | 2.9 | 2.7 |
| | Isomaltotriose | 0.0 | 0.0 | 1.4 | 6.4 | 10.3 | 11.3 | 10.8 |
| | Others | 0.6 | 0.9 | 1.8 | 2.2 | 2.8 | 3.0 | 3.0 |
| DP4 | Maltotetraose | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.0 |
| | Isomaltotriosyl-glucose | 0.3 | 0.9 | 4.6 | 8.7 | 5.2 | 1.9 | 1.0 |
| | Isomaltotetraose | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.2 | 7.2 | 7.8 | 7.8 |
| | Others | 0.0 | 0.0 | 4.2 | 5.4 | 2.2 | 3.2 | 3.7 |
| DP5+ | | 0.0 | 0.0 | 1.8 | 9.7 | 14.9 | 15.7 | 15.5 |

2-3-4. マルトペンタオースを基質とした AsojAgdL による転移反応

マルトペンタオースを基質とした場合の AsojAgdL の転移生成物の重合度分析では、基質よりも重合度の大きい糖質が検出された。72 hr 反応後の HPLC チャートを Fig. 2-7 A に示す。各ピークの重合度を同定するために、LC/MS 分析を行った。保持時間 29、24、21、19、17、15 分のピークは、DP 1、DP 2、DP 3、DP 4、DP 5、DP 6 にそれぞれ対応した。一方 DP 6 以上はピークが重複するため、同定が困難であった。転移生成物の内 50% は DP 6 以上の糖質であった。MALDI-TOF MS 分析では最大で DP18 の糖質が検出された (Fig. 2-8)。転移生成物はデキストラナーゼによる加水分解を受け、DP6 以上の糖質は 50% から 37% に減少した (Fig. 2-7 B)。

転移生成物中の DP6 以上の成分を分画し、メチル化分析に供した。その結果、転移生成物を構成するグルコースの内 51.8% (複数の結合様式を持つものも含む) と半分以上が α -1,6-グルコシド結合を含んでおり、 α -1,4-グルコシド結合を含むグルコースが 30.2% と次に多かった。 α -1,2-および α -1,3-グルコシド結合を含むグルコースはそれぞれ 2.3% と 9.2% であった (Table 2-6)。

主要な活性が *A. niger* AgdA に由来する [20, 39] トランスグルコシダーゼ L「アマノ」に関する同様にマルトペンタオースに作用し、転移反応物を分析した。DP6 以上の転移生成物の割合は、72 hr の反応後は 16% であり、デキストラナーゼ加水分解後は 12% に減少した (Fig. 2-7 C, D)。減少幅は 4% で、AsojAgdL の減少幅の 3 分の 1 程度であった。

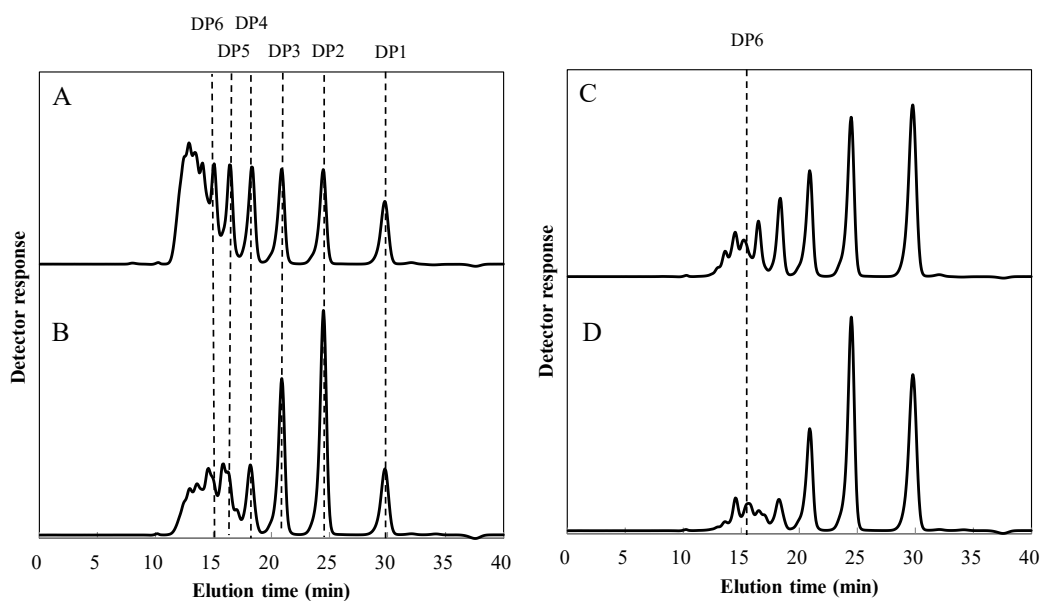


Fig. 2-7. AsojAgdLとトランスグルコシダーゼLのマルトペンタオースを基質とした転移生成物およびそのデキストラナーゼ加水分解物のHPLCクロマトグラム

(A) AsojAgdLの転移生成物。(B) Aのデキストラナーゼ加水分解物。(C) トランスグルコシダーゼLの転移生成物。(D) Cのデキストラナーゼ加水分解物。

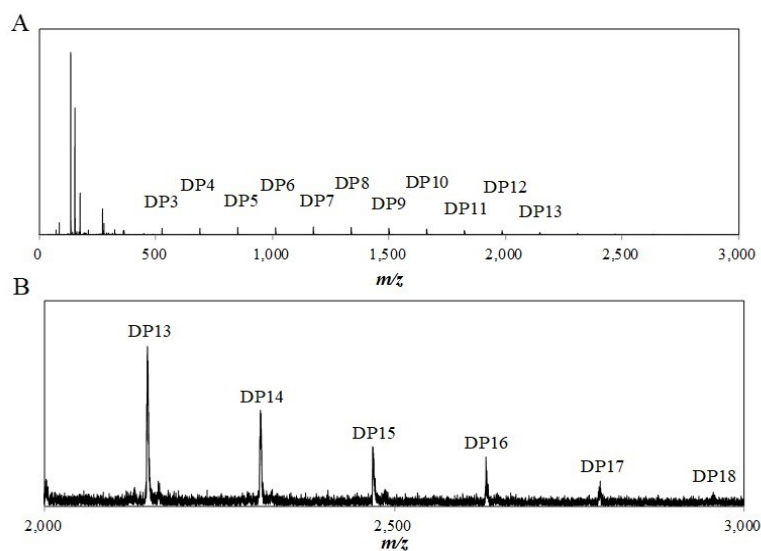


Fig. 2-8. AsojAgdLのマルトペンタオースを基質とした転移生成物のMALDI-TOF MS分析

(A) m/z : 0-3,000 Da、(B) m/z : 2,000-3,000 Da。

Table 2-6. AsojAgdLのマルトペンタオースを基質とした
転移生成物の6糖以上の成分のメチル化分析結果

| Type of glucosidic linkage | Composition (%) |
|----------------------------|-----------------|
| terminal | 16.1 |
| 1-3 | 4.8 |
| 1-4 | 25.0 |
| 1-6 | 44.5 |
| 1-2, 1-4 | 2.3 |
| 1-4, 1-6 | 2.9 |
| 1-3, 1-6 | 4.4 |
| others | - |

2-4. 考察

*A. nidulans*を宿主とした発現、His-Trapアフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーを用いた精製で得られたタンパク質は、 α -グルコシダーゼ活性を有し、native-PAGEで1本のバンドとなったことから (Fig. 2-1 B)、活性のあるAsojAgdLの精製酵素が得られたと考えられた。SDS-PAGEでは2本のバンドが観察されたことから (Fig. 2-1 A)、AsojAgdLはヘテロダイマーであり、*A. nidulans*における異種発現においてもポリペプチド鎖が分解を受け、2分割されたことが示唆された。アミノ酸配列上に分泌シグナルと推測される配列を有していることも併せて考えると、AsojAgdLはプロセッシングを受けて菌体外に分泌される酵素であることが推測された。比較対象とした*A. niger* AgdAに関して、native-PAGEで1本のバンドとなり (Fig. 2-2 B)、 α -グルコシダーゼ活性を持つ精製酵素が得られた。*A. niger* AgdAもまたヘテロダイマーであることが知られており、SDS ディスクゲル電気泳動では分離できないという報告もあったが[39]、本研究においてはSDS-PAGEで2本のポリペプチド鎖に分離した (Fig. 2-2 A)。

各種糖質基質に対する反応速度論的解析の結果 (Table 2-3, 2-4)、AsojAgdLは高濃度では基質阻害が働くもののマルトオリゴ糖に対する高い作用性があり、イソマルトオリゴ糖に対しては重合度に関わらず作用し、さらに高分子の α -1,6-グルコシド結合糖質であるデキストランにも作用した。比較した*A. niger* AgdAは、AsojAgdLと同様にマルトオリゴ糖に高い作用性があるが基質阻害はAsojAgdLほど強くなく、重合度の大きいイソマルトオリゴ糖やデキストランにはほとんど作用せず、明らかに異なる基質特異性を示した。AsojAgdLと今回比較した*A. niger* AgdAのアミノ酸配列の同一性は31%であるが、*A. nidulans* AgdBに対する同一性は82%とより高い。*A. nidulans* AgdBの基質特異性はKato *et al*によって反応速度論的解析がなされており、最も特異性が高い基質はマルトトリオースで、マルトテトラオースとマルトペンタオースの k_{cat}/K_m 値はこの順に減少し、可溶性澱粉が最も特異性が低かったと報告された[22]。AsojAgdLの場合、より重合度の大きいマルトオリゴ糖が優先され、可溶性澱粉にも作用した。したがって、AsojAgdLと*A. nidulans* AgdBは基質特異性の点では性質の異なる α -グルコシダーゼであると考えられた。

マルトースを基質とした転移生成物の分析結果から、AsojAgdLは α -1,6-グルコシド結合を含むイソマルトオリゴ糖を多く生成することが分かった (Fig. 2-6)。各種イソマルトオリゴ糖生成量の経時変化から、それぞれのイソマルトオリゴ糖が生成する推測された経路を Fig. 2-9 に示した。AsojAgdLはマルトースに作用して、糖転移と加水分解の両方を触媒し、パノースとグルコースを生成する。反応の初期段階では、主にルートAを介して糖の生産が行われ、パノースとイソマルトトリオシルグルコースが蓄積する。やがてマルトースが完全に消費されると、パノースとイソマルトトリオシルグルコースは生産される以上に加水分解を受けて減少し、ルートBが主要な糖生産経路になる。あらゆる糖質の加水分解生成物であるグルコースの量は反応後期に高レベルに達し、主に

イソマルトース、イソマルトトリオース、イソマルトテトラオースを含む全体の糖組成がほぼ平衡状態に達する。反応 72 hr 後には、¹H-NMR による分析結果より 5 糖類の 81%が α -1,6-グルコシド結合で、4 糖以下も HPLC 分析結果より多くが α -1,6-グルコシド結合で構成されていたことを考えると、マルトースからの転移生成物の結合様式の大部分は最終的に α -1,6-グルコシド結合に集約していくと考えられた。

AsojAgdL は α -1,2-、 α -1,3-グルコシド結合を含む糖質も生成したが、イソマルトオリゴ糖と比較すると少量であった (Table 2-5)。またマルトトリオースやマルトテトラオースも生成したため、 α -1,4-転移もすると考えられたが、生成した α -1,4-グルコシド結合を含む糖質はやがて転移反応のドナーとして使用され、転移生成物中からは最終的にほぼなくなると考えられた。

マルトペンタオースを基質とした反応では、マルトースを基質とした推定イソマルトオリゴ糖生成経路を考慮すると、転移生成物は還元末端側が α -1,4-グルコシド結合、非還元末端側が α -1,6-グルコシド結合からなることが推測された。得られた転移生成物はデキストラナーゼによる分解を受けた (Fig 2-7)。本研究で使用した糸状菌由来のデキストラナーゼ (EC 3.2.1.11) は、イソマルトトリオースよりも長い α -1,6-グルコシド結合を持つデキストランとイソマルトオリゴ糖を加水分解し、主にイソマルトース、イソマルトトリオース、および少量のグルコースを生成することが知られている [40, 41, 42]。したがって、AsojAgdL は 3 つ以上の連続した α -1,6-グルコシド結合を生成すると考えられた。*A. niger* AgdA が主活性であるトランスグルコシダーゼ L「アマノ」を用いると、6 糖以上の糖質の生成量が少なく、かつデキストラナーゼによる分解もほとんど受けなかった。同じ α -1,6 転移の α -グルコシダーゼであっても、AsojAgdL は重合度が大きく、連続した α -1,6-グルコシド結合を含む糖質を生成するという点で、*A. niger* AgdA とは明らかに異なる転移特性を持つ酵素であると考えられた。

A. niger、*A. nidulans*、*A. oryzae* の α -グルコシダーゼは、イソマルトース、イソマルトトリオース、パノースなどの α -1,6-グルコシド結合の短い鎖を持つイソマルトオリゴ糖を生成することが報告されていた [22, 24, 43] が、連続した α -1,6-グルコシド結合を多く生成する *Aspergillus* 属由来の α -グルコシダーゼは未だ報告されていない。イソマルトオリゴ糖はヒトの腸内ビフィズス菌数を増加させる働きがあること、3 糖のイソマルトオリゴ糖は 2 糖のイソマルトオリゴ糖よりもヒトの腸内ビフィズス菌をより増殖させることが報告されている [44]。AsojAgdL を利用することで、高いプレバイオティクス効果を持つ新しい糖質素材の開発につながることを期待される。

また、AsojAgdL のオルソログである *A. nidulans* AgdB は、イソマルトースに誘導される AmyR によって遺伝子発現を促進される、 α -アミラーゼをはじめとした澱粉分解系の酵素の内の 1 つであることが分かっており [45]、AsojAgdL も α -アミラーゼなどと連携して澱粉質を分解・資化する役割を持っていると推

測される。AsojAgdLの澱粉の資化において果たす役割についても説明が望まれる。

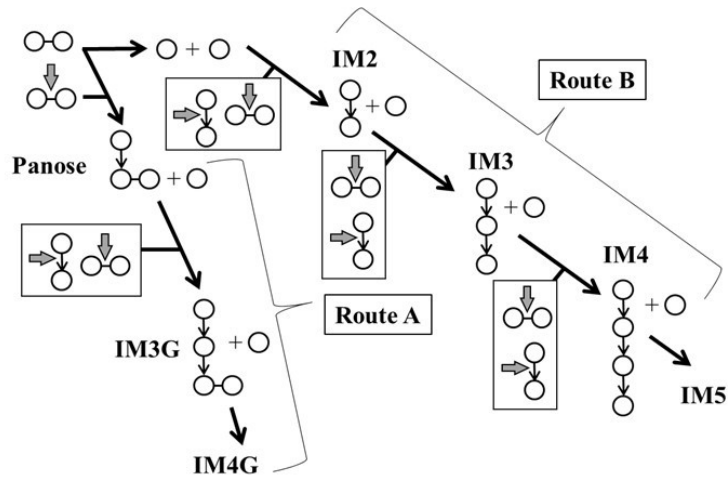


Fig. 2-9. AsojAgdLの転移反応によるイソマルトオリゴ糖生成の予測経路

図中の記号：○, グルコース; -, α-1,4-グルコシド結合; ↓, α-1,6-グルコシド結合; 太矢印 (灰色), 加水分解の位置。糖質の略称：IM2, イソマルトース; IM3, イソマルトトリオース; IM3G, イソマルトトリオシルグルコース; IM4, イソマルトテトラオース; IM4G, イソマルトテトラオシルグルコース; IM5, イソマルトペンタオース。

第3章 *Aspergillus niger* 由来の α -1,2・1,3 転移 α -グルコシダーゼの解析

3-1. 序論

本章では近年発見された *A. niger* 由来の α -グルコシダーゼ、*A. niger* AgdB の基本特性および NMR を用いた転移特性の詳細な解析について述べる。*A. niger* 由来の α -グルコシダーゼは、 α -1,6 転移活性を持つもの (*A. niger* AgdA) が古くから知られていた [43, 46]。近年、それとは別に α -1,2-グルコシド結合を含むコージビオースや α -1,3-グルコシド結合を含むニゲロースを転移反応によって生産する α -グルコシダーゼ (*A. niger* AgdB) が報告されたが [47, 48]、その転移生成物の構成が複雑であり、生成物全体における詳細な解析はなされていなかった。

NMR 分析は、タンパク質、核酸や糖質の構造の解析に利用される。糖質の分析に関しては、酵素反応によって生成した糖質混合物中のグルコシド結合組成の定量にも NMR が使用可能であることが報告されている [21]。しかし、その分析は α -1,4-、 α -1,6-グルコシド結合の定量に限定されていた。したがって、NMR を用いて α -1,1- α 、 α -1,1- β 、 α -1,2、 α -1,3 など様々なグルコシド結合様式を含む糖質混合物を分析する方法は未だ確立されていなかった。

そこで、*A. niger* のゲノム配列から *A. niger* AgdB 遺伝子をクローニングし、*A. nidulans* を宿主に発現させ、精製し、基本特性を分析するとともに、NMR を用いた多様な結合様式の分析法を確立し、*A. niger* AgdB による転移生成物の詳細な解析を実施した。

3-2. 材料と方法

3-2-1. 実験材料と試薬

試薬類は後述のものを除いて富士フイルム和光純薬製のものをを用いた。ニゲロースはコスモバイオ製のものをを用いた。イソマルトトリオースおよびネオトレハロースはシグマアルドリッチ製のものをを用いた。

3²-*O*- α -D-glucosyl-maltose とイソマルトトリオシルグルコースは既報の手法 [31, 32] に従って調製した。

3-2-2. 使用した微生物株

A. niger NBRC4066 は、製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンターから入手した。*A. oryzae* RIB40 は、酒類総合研究所から入手した。*A. nidulans* ATCC38163 は、American Type Culture Collection から入手した。

3-2-3. クローニング、発現ベクターの構築と形質転換

A. niger *AgdB* 遺伝子 (GenBank accession no. LX063802) は、*A. niger* NBRC4066 からクローニングし、発現ベクターの構築に使用した。PCR には、Phusion Hot Start II DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) を使用した。使用した PCR プライマーを Table 3-1 に示した。*A. oryzae* *tef1* 遺伝子 (GenBank accession no. Q9Y713) プロモーター [33] の制御下で *A. niger* *AgdB* を発現させるために、発現ベクターを以下のように構築した。*tef1* 遺伝子のプロモーター領域を含む 0.8 kbp の DNA 断片は、プライマー promoter1 / promoter2 を使用して *A. oryzae* RIB40 のゲノム DNA から増幅した。終止コドンのない *A. niger* *AgdB* 遺伝子は、*A. niger* NBRC4066 のゲノム DNA からプライマー AgdNB1 / AgdNB2 を用いて増幅した。10×His タグおよび終止コドンを含む *A. niger* *AgdB* のターミネーター領域の 0.3 kbp の DNA 断片を、プライマー terminatorNB1 / terminatorNB2 を使用して *A. niger* NBRC4066 のゲノム DNA から増幅した。3 つの PCR 産物と HindIII / KpnI で処理した pPTRII (タカラバイオ) を、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ) を使用して結合し発現ベクターとした。そして得られた発現ベクターを用い、Gomi *et al* に報告された方法 [34] に従って *A. nidulans* ATCC38163 を形質転換した。

Table 3-1. *A. niger* *AgdB* のクローニングに用いた PCR プライマー

| Primer name | Sequence |
|---------------|---|
| promoter1 | 5'-TGATTACGCCAAGCTTGATTTTCACTGTGGACCAGACA-3' |
| promoter2 | 5'-TTTGAAGGTGGTGCGAACT-3' |
| AgdNB1 | 5'-CGCACCACCTTCAAATGTTGGGGTCTTTGCTTTTACT-3' |
| AgdNB2 | 5'-CTTCAGCTTAAAGTTCACCGG-3' |
| terminatorNB1 | 5'-AACTTTAAGCTGAAGCACCACCACCACCACCACCACCACCACCAGTTGGCATATCGAGTTGGAGT-3' |
| terminatorNB2 | 5'-GTGAATTCGAGCTCGGTACCATGCGTATTATGCGGTCATTTTC-3' |

3-2-4. 酵素の精製

発現した *A. niger* AgdB の精製酵素は、第 2 章の *A. niger* AgdA と同様の手法で取得した。

3-2-5. 酵素活性の測定

α -グルコシダーゼ活性は、第 2 章と同じ方法で分析した。 α -グルコシダーゼ活性に対する温度の影響は、反応温度を 40~80°C とした以外は同じ条件で分析した。 α -グルコシダーゼ活性に対する pH の影響は、pH の調整でフタル酸-HCl (pH 3.5)、フタル酸-NaOH (pH 4.0~5.5)、MES-NaOH (pH 6.0~7.0)、MOPS-NaOH (pH 7.5~10.0)、CAPS-NaOH (pH 11.0~12.0) の各緩衝液を用いた以外は同じ条件で分析した。温度および pH 安定性は、各温度 (40~80°C) で 1 hr、または各 pH (3.5~12.0) で 4°C、24 hr インキュベートした後の残存した α -グルコシダーゼ活性を分析することで評価した。pH の調整には、pH 4.0~5.5 はフタル酸-NaOH 緩衝液、pH 6.1~7.1 は MES-NaOH 緩衝液、pH 7.6~10.1 は MOPS-NaOH 緩衝液を使用した。反応速度論的解析では、*A. niger* AgdB を 20 mM MES-NaOH 緩衝液 (pH 6.0) 中で各基質と 40°C、60 min インキュベートし、10% (w / v) シュウ酸を 1% (w / w) 添加後 10 min 煮沸して反応を停止し、遊離したグルコースをグルコース CII テストワコーで分析し、反応速度を求めた。そして KaleidaGraph ver. 4.5.3 (Synergy Software) を用いた非線形回帰分析にて反応速度論パラメーター (k_{cat} 、 K_m 、および k_{cat} / K_m) を求めた。

3-2-6. タンパク質分析

タンパク質濃度の分析、SDS-PAGE、native-PAGE、等電点電気泳動は、第 2 章記載の方法で行った。

3-2-7. 転移生成物の調製

A. niger AgdB の転移生成物は、精製酵素を使用して調製した。マルトースを基質として使用した場合は、30% (w / w) のマルトース、0.3 U / g の酵素 (基質あたりでは 1 U / g DS の酵素を作用) で、pH 6.0、60°C で 1、3、6、10、15、24、48 hr 反応した。マルトペンタオースを基質として使用した場合は、30% (w / w) のマルトペンタオース、2.4 U / g の酵素 (基質あたりでは 8 U / g DS の酵素を作用) で、pH 6.0、50°C で 24 hr 反応した。反応は 10 min 煮沸することによって停止した。

3-2-8. 転移生成物の HPLC 分析および分画

転移生成物の重合度、構造異性体の分析および転移生成物の分画は、第 2 章に記載の方法で実施した。

3-2-9. NMR 分析

転移生成物に含まれるグルコシド結合様式を ^1H - ^{13}C Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC) で分析した。各サンプルを重水に溶解し、 4°C で 48 hr 以上インキュベートし、糖質の還元末端の α アノマーと β アノマーを平衡化した。NMR 分析は、Bruker Advance III (Bruker BioSpin) を使用して行った。HSQC は、400 MHz、 25°C で ^1H - ^{13}C スペクトルを測定した。スタンダードとしてトリメチルシリルプロパン酸を用いた。Topspin ver. 3.2 (Bruker BioSpin) を使用してデータの解析を実施した。

3-2-10. MALDI-TOF MS 分析

MALDI-TOF MS 分析は第 2 章に記載の方法で実施した。

3-3. 結果

3-3-1. *A. niger* AgdB の発現、精製と生化学的特性

A. niger CBS513.88 由来のタンパク質 (GenBank accession no. CAK37273) の遺伝子に相当する配列を *A. niger* NBRC4066 のゲノム DNA からクローニングしたところ、23 アミノ酸のシグナルペプチド (Signal-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)) を使用して推測) を持つ 865 アミノ酸のタンパク質であった。CAK37273 のタンパク質と比較すると 1 アミノ酸が異なった (Thr676→Ser676)。一方、rAgdB (*A. niger* K1 からクローニングした *A. niger* AgdB を *Pichia pastoris* を宿主に発現) と 100% 同一であり [47]、*A. niger* AgdA と 35% の同一性を示した。

発現した *A. niger* AgdB を、His-Trap アフィニティークロマトグラフィーを使用して精製した。SDS-PAGE では、分子量が 64 kDa と 77 kDa の 2 本のバンドとして得られた (Fig. 3-1 A)。等電点電気泳動中では、バンドの幅は広がったが、*A. niger* AgdB の *pI* は約 5.2 であり (Fig. 3-1 C)、native-PAGE のマーカータンパク質の *pI* に近かった。このことから native-PAGE を行い、未変性酵素のおよその分子量を調べたところ 124 kDa の単一のバンドとして得られた (Fig. 3-1 B)。

次に、*A. niger* AgdB の活性と安定性に対する pH と温度の影響を調べた (Fig. 3-2)。 *A. niger* AgdB の最適 pH は 6.0~7.0 で、pH 6.5~7.5 の間で 80% 以上の活性が残存した。最適温度は 65°C で、60°C 以下では 1 hr のインキュベートで活性が 80% 以上残存し、75°C で 1 hr インキュベートすると活性が 95% 失われた。

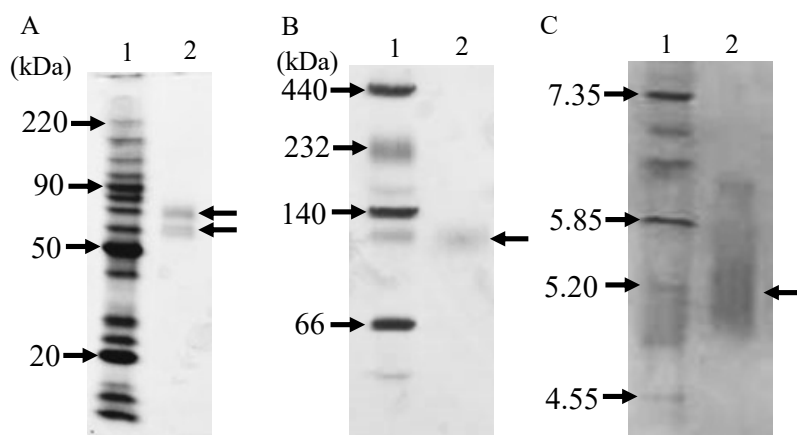


Fig. 3-1. *A. niger* AgdB の分子量と等電点

- (A) SDS-PAGE。レーン1, Bench mark Ladder; レーン2, *A. niger* AgdB。
(B) native-PAGE。レーン1; HMW marker kit; レーン2, *A. niger* AgdB。
(C) 等電点電気泳動。レーン1, Broad pI kit; レーン2, *A. niger* AgdB。

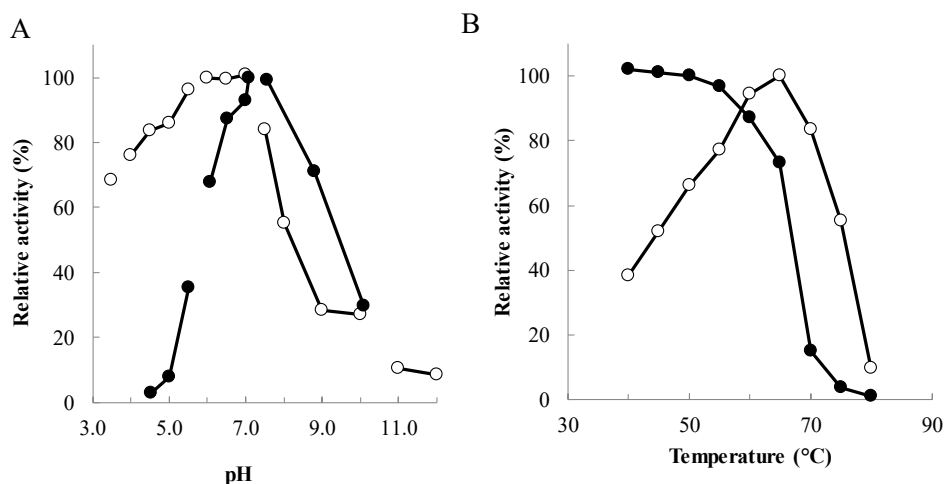


Fig. 3-2. pH、温度が*A. niger* AgdBの α -グルコシダーゼ活性に与える影響

(A) 各pHにおける活性 (○) とpH安定性 (●)。 (B) 各温度における活性 (○) と温度安定性 (●)。

3-3-2. *A. niger* AgdB の反応速度論的解析

A. niger AgdB の基質特異性を評価するため、様々な糖質に対する反応速度論パラメーターを決定し、*A. niger* AgdA と比較した。トレハロース加水分解活性はいずれの酵素でも検出されなかった。マルトオリゴ糖、コージビオース、ニゲロース、イソマルトース、および可溶性澱粉の酵素活性を Table 3-2 に示す。試験した基質濃度では、酵素反応はミカエリス-メンテン速度論モデルにしたがった (Fig. 3-3)。

A. niger AgdB と *A. niger* AgdA のいずれも各種糖質に対して幅広く分解活性を示したが、基質特異性は異なった。*A. niger* AgdB では、マルトース、コージビオース、ニゲロースの k_{cat} / K_m 値は、約 $10 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。一方イソマルトースは k_{cat} / K_m 値が $1.3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。*A. niger* AgdA では、マルトースの k_{cat} / K_m 値が $16.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった一方で、コージビオース、ニゲロース、イソマルトースは k_{cat} / K_m 値が $3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 程度と低い酵素活性を示した。*A. niger* AgdB と *A. niger* AgdA はいずれもマルトオリゴ糖に対する作用性が高く、マルトトリオースからマルトヘキサオースの各マルトオリゴ糖の k_{cat} / K_m 値は約 $30 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。*A. niger* AgdA、*A. niger* AgdB とともに可溶性澱粉にも作用した。

Table 3-2. *A. niger* AgdB、*A. niger* AgdAの反応速度論的解析

| substrates | <i>A. niger</i> AgdB | | | <i>A. niger</i> AgdA ^a | | |
|-----------------------------|----------------------|---------------------------------|--|-----------------------------------|---------------------------------|--|
| | K_m (mM) | k_{cat} (s ⁻¹) | k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹) | K_m (mM) | k_{cat} (s ⁻¹) | k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹) |
| Maltose | 4.3 ± 1.0 | 46.5 ± 5.9 | 10.8 | 3.2 ± 0.8 | 52.3 ± 6.1 | 16.5 |
| Kojibiose | 3.7 ± 0.5 | 34.7 ± 1.9 | 9.3 | 5.2 ± 0.1 | 16.8 ± 0.1 | 3.2 |
| Nigerose | 4.6 ± 0.6 | 45.6 ± 2.0 | 9.9 | 13.0 ± 0.3 | 34.0 ± 0.4 | 2.6 |
| Isomaltose | 2.1 ± 0.9 | 2.7 ± 0.3 | 1.3 | 5.0 ± 0.1 | 20.6 ± 0.2 | 4.1 |
| Maltotriose | 4.0 ± 0.8 | 98.5 ± 12.1 | 24.4 | 2.0 ± 0.4 | 62.8 ± 5.8 | 31.7 |
| Maltotetraose | 2.5 ± 0.6 | 85.9 ± 11.9 | 34.7 | 1.2 ± 0.2 | 47.4 ± 3.3 | 39.4 |
| Maltopentaose | 2.5 ± 0.5 | 96.1 ± 12.9 | 38.4 | 1.1 ± 0.1 | 40.4 ± 1.3 | 36.3 |
| Maltohexaose | 1.5 ± 0.3 | 71.3 ± 8.8 | 47.3 | 1.1 ± 0.1 | 43.1 ± 2.0 | 38.7 |
| Soluble starch ^b | 0.7 ± 0.1 | 47.4 ± 3.1 | 67.7 | 3.0 ± 0.5 | 184.3 ± 16.5 | 62.0 |

K_m and k_{cat} values are shown with standard errors.

^a Kinetic parameter of *A. niger* AgdA are sited from chapter 2.

^b Weight average molecular weight of soluble starch was 8800, determined by gel permeation chromatography.

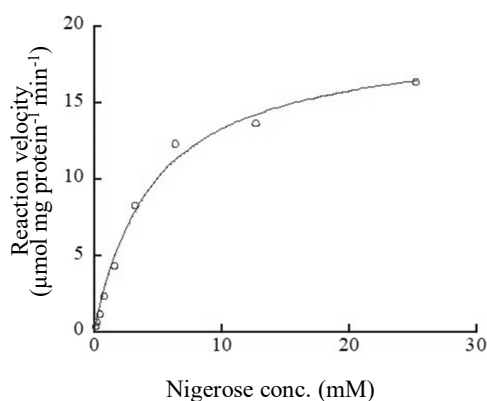


Fig. 3-3. *A. niger* AgdBの反応速度論的解析の例

ニゲロースに対する反応速度と基質濃度のプロット。

3-3-3. NMRによるグルコシド結合様式の検出

A. niger AgdBの転移生成物は、 α -1,1-、 α -1,2-、 α -1,3-、 α -1,4-、 α -1,6-といった多様な結合様式のグルコシド結合を含む可能性があり、HPLC等では転移生成物の糖質の構造を同定できない可能性があった。そこで、まず2次元NMRを用いたグルコシド結合様式の解析方法を確立し、それを活用することで転移生成物を評価した。はじめに、転移生成物に存在すると予想されるアノメリックプロトンおよびカーボンの化学シフトの理論値をまとめた。アノメリックプロトンとカーボンの化学シフトは、自身および隣接するグルコースのアノマーの種別とグルコシド結合の種類に大きく依存している。ここでは、アノマーとグルコシド結合の組み合わせの構造を「sugar unit」と称する[21]。

Sugar unit の具体例を Fig. 3-4 に示す。54 種の sugar unit (g1~54) のアノメリックプロトンとカーボンの化学シフトの理論値は、CASPER データベース (<http://www.casper.organ.su.se/casper/>)、一部データベース未記載の sugar unit に関しては Roslund *et al* により報告された値 [49] を参照した (Table 3-3)。化学シフト (^1H - ^{13}C HSQC シグナルの位置) の理論値をプロットしたところ (Fig. 3-5 A)、 ^1H -シグナルが 4.4-5.6 ppm、 ^{13}C -シグナルが 85~110 ppm の範囲に分布した。 ^1H - ^{13}C シグナルは主に 12 の領域 (S1~S12) に集合した。結合様式が同じであったり、還元末端のアノマーが同じであったりする sugar unit は同じ領域に集合する傾向があった。Sugar unit g1~g54 と領域 S1~S12 の関係を Table 3-3 に示す。Sugar unit の g4、g23、g24、g25、g26、g27、g28、g29、g30 のシグナルは、S1~S12 の領域内に含まれなかったが、これらの sugar unit の ^1H - ^{13}C シグナルは、後述の 10 種の標準糖質または転移生成物の NMR スペクトルでは検出されなかった。

^1H - ^{13}C HSQC シグナルの実験値が前述の化学シフトの理論値と同じ位置で検出されるかを確認するために、グルコース、トレハロース、ネオトレハロース、コージビオース、ニゲロース、マルトース、イソマルトース、マルトトリオース、イソマルトトリオース、パノースの ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルを分析した。各糖質の分析で検出されたシグナルの位置 (Table 3-4) を全てプロットしたところ (Fig. 3-5 B)、S9 を除いて、検出された実験値は理論値とほぼ同じだった。S9 に関しては、 ^1H -シグナルが理論値から約 0.1 ppm ずれていた。

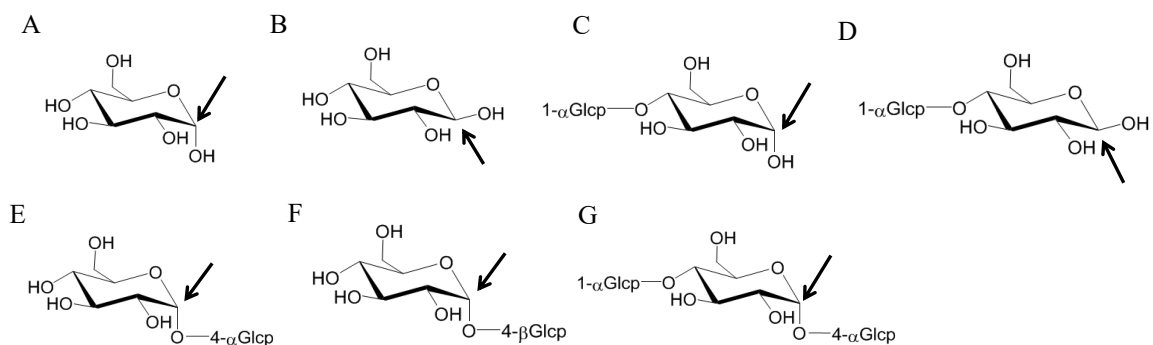


Fig. 3-4. Sugar unitの例

Sugar unit 上のアノメリックカーボンの位置は矢印で示した。(A) α Glcp、(B) β Glcp、(C) α Glcp- (1,4) - α Glcp、(D) α Glcp- (1,4) - β Glcp、(E) α Glcp- (1,4) - α Glcp、(F) α Glcp- (1,4) - β Glcp、(G) α Glcp- (1,4) - α Glcp- (1,4) - α Glcp。下線は、着目するアノメリックカーボンを持つグルコースを示す。

Table 3-3. 各sugar unitのアノメリックカーボン、プロトンの化学シフトの理論値

| Abbreviation | Sugar unit | ¹ H | ¹³ C | Group |
|--------------|--|-------------------|--------------------|-------|
| g1 | <u>αGlc</u> p | 5.23 | 93.0 | S1 |
| g2 | <u>βGlc</u> p | 4.64 | 96.8 | S2 |
| g3 | αGlc-p-(1-1)- <u>αGlc</u> p | 5.18 ^a | 93.9 ^a | S3 |
| g4 | βGlc-p-(1-1)- <u>βGlc</u> p | 4.81 ^a | 99.9 ^a | - |
| g5 | βGlc-p-(1-1)- <u>αGlc</u> p | 5.22 ^a | 100.9 ^a | S4 |
| g6 | αGlc-p-(1-1)- <u>βGlc</u> p | 4.63 ^a | 103.6 ^a | S5 |
| g7 | αGlc-p-(1-2)- <u>αGlc</u> p | 5.43 | 90.2 | S6 |
| g8 | αGlc-p-(1-2)- <u>βGlc</u> p | 4.78 | 97.4 | S7 |
| g9 | αGlc-p-(1-3)- <u>αGlc</u> p | 5.24 | 93.1 | S1 |
| g10 | αGlc-p-(1-3)- <u>βGlc</u> p | 4.67 | 96.9 | S2 |
| g11 | αGlc-p-(1-4)- <u>αGlc</u> p | 5.24 | 92.8 | S1 |
| g12 | αGlc-p-(1-4)- <u>βGlc</u> p | 4.65 | 96.7 | S2 |
| g13 | αGlc-p-(1-6)- <u>αGlc</u> p | 5.24 | 93.0 | S1 |
| g14 | αGlc-p-(1-6)- <u>βGlc</u> p | 4.66 | 96.9 | S2 |
| g15 | <u>αGlc</u> p-(1-2)-αGlc-p | 5.07 | 97.6 | S8 |
| g16 | <u>αGlc</u> p-(1-2)-βGlc-p | 5.28 | 98.6 | S9 |
| g17 | <u>αGlc</u> p-(1-3)-αGlc-p | 5.32 | 100.0 | S10 |
| g18 | <u>αGlc</u> p-(1-3)-βGlc-p | 5.32 | 99.9 | S10 |
| g19 | <u>αGlc</u> p-(1-4)-αGlc-p | 5.35 | 100.7 | S11 |
| g20 | <u>αGlc</u> p-(1-4)-βGlc-p | 5.35 | 100.6 | S11 |
| g21 | <u>αGlc</u> p-(1-6)-αGlc-p | 4.96 | 98.9 | S12 |
| g22 | <u>αGlc</u> p-(1-6)-βGlc-p | 4.96 | 98.8 | S12 |
| g23 | αGlc-p-(1-2)- <u>αGlc</u> p-(1-2)-αGlc-p | 5.27 | 94.8 | - |
| g24 | αGlc-p-(1-2)- <u>αGlc</u> p-(1-2)-βGlc-p | 5.48 | 95.9 | - |
| g25 | αGlc-p-(1-2)- <u>αGlc</u> p-(1-3)-αGlc-p | 5.51 | 97.3 | - |
| g26 | αGlc-p-(1-2)- <u>αGlc</u> p-(1-3)-βGlc-p | 5.51 | 97.2 | - |
| g27 | αGlc-p-(1-2)- <u>αGlc</u> p-(1-4)-αGlc-p | 5.55 | 97.9 | - |
| g28 | αGlc-p-(1-2)- <u>αGlc</u> p-(1-4)-βGlc-p | 5.55 | 97.8 | - |
| g29 | αGlc-p-(1-2)- <u>αGlc</u> p-(1-6)-αGlc-p | 5.16 | 96.1 | - |
| g30 | αGlc-p-(1-2)- <u>αGlc</u> p-(1-6)-βGlc-p | 5.16 | 96.1 | - |
| g31 | αGlc-p-(1-3)- <u>αGlc</u> p-(1-2)-αGlc-p | 5.08 | 97.7 | S8 |
| g32 | αGlc-p-(1-3)- <u>αGlc</u> p-(1-2)-βGlc-p | 5.29 | 98.8 | S9 |
| g33 | αGlc-p-(1-3)- <u>αGlc</u> p-(1-3)-αGlc-p | 5.33 | 100.1 | S10 |
| g34 | αGlc-p-(1-3)- <u>αGlc</u> p-(1-3)-βGlc-p | 5.33 | 100.1 | S10 |
| g35 | αGlc-p-(1-3)- <u>αGlc</u> p-(1-4)-αGlc-p | 5.36 | 100.8 | S11 |
| g36 | αGlc-p-(1-3)- <u>αGlc</u> p-(1-4)-βGlc-p | 5.36 | 100.7 | S11 |
| g37 | αGlc-p-(1-3)- <u>αGlc</u> p-(1-6)-αGlc-p | 4.97 | 99.0 | S12 |
| g38 | αGlc-p-(1-3)- <u>αGlc</u> p-(1-6)-βGlc-p | 4.97 | 99.0 | S12 |
| g39 | αGlc-p-(1-4)- <u>αGlc</u> p-(1-2)-αGlc-p | 5.08 | 97.4 | S8 |
| g40 | αGlc-p-(1-4)- <u>αGlc</u> p-(1-2)-βGlc-p | 5.29 | 98.4 | S9 |
| g41 | αGlc-p-(1-4)- <u>αGlc</u> p-(1-3)-αGlc-p | 5.33 | 99.8 | S10 |
| g42 | αGlc-p-(1-4)- <u>αGlc</u> p-(1-3)-βGlc-p | 5.33 | 99.7 | S10 |
| g43 | αGlc-p-(1-4)- <u>αGlc</u> p-(1-4)-αGlc-p | 5.36 | 100.5 | S11 |
| g44 | αGlc-p-(1-4)- <u>αGlc</u> p-(1-4)-βGlc-p | 5.36 | 100.4 | S11 |
| g45 | αGlc-p-(1-4)- <u>αGlc</u> p-(1-6)-αGlc-p | 4.97 | 98.7 | S12 |
| g46 | αGlc-p-(1-4)- <u>αGlc</u> p-(1-6)-βGlc-p | 4.97 | 98.6 | S12 |
| g47 | αGlc-p-(1-6)- <u>αGlc</u> p-(1-2)-αGlc-p | 5.08 | 97.6 | S8 |
| g48 | αGlc-p-(1-6)- <u>αGlc</u> p-(1-2)-βGlc-p | 5.29 | 98.7 | S9 |
| g49 | αGlc-p-(1-6)- <u>αGlc</u> p-(1-3)-αGlc-p | 5.33 | 100.0 | S10 |
| g50 | αGlc-p-(1-6)- <u>αGlc</u> p-(1-3)-βGlc-p | 5.33 | 100.0 | S10 |
| g51 | αGlc-p-(1-6)- <u>αGlc</u> p-(1-4)-αGlc-p | 5.36 | 100.7 | S11 |
| g52 | αGlc-p-(1-6)- <u>αGlc</u> p-(1-4)-βGlc-p | 5.36 | 100.6 | S11 |
| g53 | αGlc-p-(1-6)- <u>αGlc</u> p-(1-6)-αGlc-p | 4.97 | 98.9 | S12 |
| g54 | αGlc-p-(1-6)- <u>αGlc</u> p-(1-6)-βGlc-p | 4.97 | 98.9 | S12 |

The glucopyranoside of which the signal assignment is derived from its anomeric proton and carbon is shown underlined.

^a Values are cited from report⁴⁹⁾

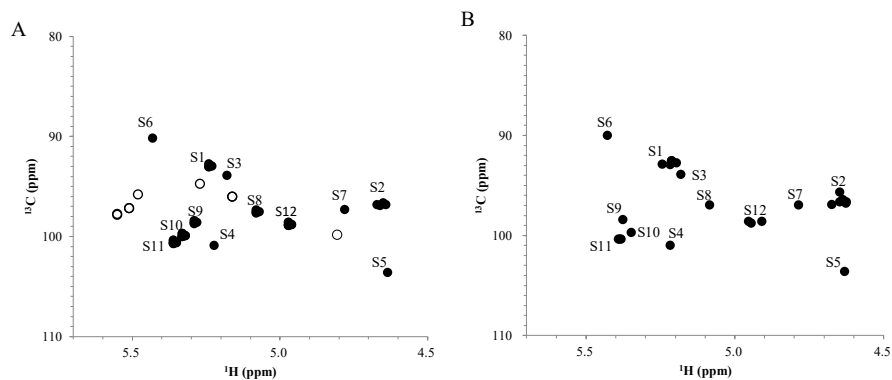


Fig. 3-5. 各sugar unitの化学シフトの理論値、実験値のプロット

(A) sugar unitの ^1H - ^{13}C HSQCでの化学シフトの理論値のプロット。●, 本試験で検出され、グルコシド結合組成の計算に使用したsugar unit; ○, 本試験では検出されなかったsugar unit
 (B) 標準糖質の ^1H - ^{13}C HSQCでの化学シフトの実験値のプロット。

Table 3-4. 各標準糖質のアノメリックカーボン、プロトンの化学シフトの実験値

| Standard substance | Signal no. | ^1H | ^{13}C | Group |
|--------------------|------------|--------------|-----------------|-------|
| Glucose | 1 | 5.21 | 92.8 | S1 |
| | 2 | 4.63 | 96.6 | S2 |
| Trehalose | 1 | 5.18 | 93.9 | S3 |
| Neotrehalose | 1 | 5.22 | 101.0 | S4 |
| | 2 | 4.63 | 103.6 | S5 |
| Kojibiose | 1 | 5.43 | 90.0 | S6 |
| | 2 | 4.78 | 97.0 | S7 |
| | 3 | 5.08 | 97.0 | S8 |
| | 4 | 5.38 | 98.4 | S9 |
| Nigerose | 1 | 5.25 | 92.2 | S1 |
| | 2 | 4.68 | 95.9 | S2 |
| | 3 | 5.35 | 99.7 | S10 |
| Maltose | 1 | 5.24 | 91.9 | S1 |
| | 2 | 4.67 | 95.9 | S2 |
| | 3 | 5.39 | 100.4 | S11 |
| Isomaltose | 1 | 5.23 | 92.2 | S1 |
| | 2 | 4.66 | 96.1 | S2 |
| | 3 | 4.91 | 98.6 | S12 |
| Maltotriose | 1 | 5.25 | 91.9 | S1 |
| | 2 | 4.67 | 95.7 | S2 |
| | 3 | 5.38 | 100.4 | S11 |
| Isomaltotriose | 1 | 5.28 | 92.2 | S1 |
| | 2 | 4.71 | 96.2 | S2 |
| | 3 | 4.95 | 98.6 | S12 |
| Panose | 1 | 5.25 | 91.8 | S1 |
| | 2 | 4.68 | 95.0 | S2 |
| | 3 | 5.39 | 100.4 | S11 |
| | 4 | 4.95 | 98.8 | S12 |

3-3-4. NMR 分析によるグルコシド結合様式の比率の算出法の確立

次に NMR スペクトルのシグナル強度を元にグルコシド結合様式の比率を算出するために、標準糖質の ^1H - ^{13}C スペクトルで検出される各ピーク領域 (S1~12) におけるシグナル強度を分析した。ここで各ピーク領域のシグナルと各 sugar unit に由来するシグナルは数式 3-1 に記載した対応になっていると推定される。標準糖質として、グルコース、トレハロース、ネオトレハロース、コージビオース、ニゲロース、マルトース、イソマルトース、マルトトリオース、イソマルトトリオース、 3^2 - O - α -D-グルコシル-マルトース、パノース、マルトテトラオース、イソマルトテトラオース、イソマルトトリオシル-グルコースの ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルを分析して得られた sugar unit (ピーク領域) の組成比を Table 3-5, 6 に記載した。分析から得られた組成比は、各糖質の構造から推定される実際の組成比とおおよそ一致した。例えばパノース (Glc β - α -1,6-Glc β - α -1,4-Glc) には、1つの α -1,6-グルコシド結合、1つの α -1,4-グルコシド結合、および1つの還元末端が含まれている。 α アノマーと β アノマーの比率は、25°C で 0.36 : 0.64 である [50]。したがって、S1 : S2 : S11 : S12 の実際の組成比は 0.36 : 0.64 : 1 : 1 となる。そして ^1H - ^{13}C HSQC 分析から算出された組成比は 0.12 : 0.22 : 0.31 : 0.36 で、誤差はあるものの予想比率とほぼ同じであった。実験から算出された組成比と実際の組成比は、試験したすべての糖質でほぼ一致した (Table 3-5, 6)。したがって、グルコシド結合の比率は NMR 分析によって分析可能であることが示された。なお、 α -1,1- α -グルコシド結合は転移生成物の分析では検出されなかった。そこで、 α -1,1- β -、 α -1,2-、 α -1,3-、 α -1,4-、 α -1,6-グルコシド結合の組成の比率を算出する式を作成し (数式 3-2)、転移生成物の分析に使用した。

数式 3-1.

NMR スペクトルの各ピーク領域 (S1~S13) がどの Sugar unit のシグナルに由来するかを以下の数式のように推定した。

$$\text{Eq.1 } S1 = g1+g9+g11+g13$$

$$\text{Eq.2 } S2 = g2+g10+g12+g14$$

$$\text{Eq.3 } S3 = g3$$

$$\text{Eq.4 } S4 = g5$$

$$\text{Eq.5 } S5 = g6$$

$$\text{Eq.6 } S6 = g7$$

$$\text{Eq.7 } S7 = g8$$

$$\text{Eq.8 } S8 = g15+g31+g39+g47$$

$$\text{Eq.9 } S9 = g16+g32+g40+g48$$

$$\text{Eq.10 } S10 = g17+g18+g33+g34+g41+g42+g49+g50$$

$$\text{Eq.11 } S11 = g19+g20+g35+g36+g43+g44+g51+g52$$

$$\text{Eq.12 } S12 = g21+g22+g37+g38+g45+g46+g53+g54$$

$$\text{Eq.13 } S13 = [\text{sum of unknown peaks}]$$

数式 3-2.

α -1,1- β -、 α -1,2-、 α -1,3-、 α -1,4-、 α -1,6-グルコシド結合および未知の結合の組成の比率は、以下の数式で計算した。

$$\text{Eq.14 [fraction of the } \alpha\text{-1,1-}\beta\text{-glucosidic linkages]} = S4/(S4+S8+S9+S10+S11+S12+S13)$$

$$\text{Eq.15 [fraction of the } \alpha\text{-1,2-glucosidic linkages]} = S8+S9/(S4+S8+S9+S10+S11+S12+S13)$$

$$\text{Eq.16 [fraction of the } \alpha\text{-1,3-glucosidic linkages]} = S10/(S4+S8+S9+S10+S11+S12+S13)$$

$$\text{Eq.17 [fraction of the } \alpha\text{-1,4-glucosidic linkages]} = S11/(S4+S8+S9+S10+S11+S12+S13)$$

$$\text{Eq.18 [fraction of the } \alpha\text{-1,6-glucosidic linkages]} = S12/(S4+S8+S9+S10+S11+S12+S13)$$

$$\text{Eq.19 [fraction of the unknown linkages]} = S13/(S4+S8+S9+S10+S11+S12+S13)$$

Table 3-5. $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQCスペクトルから計算された標準物質（単糖および2糖）のsugar unitの組成比

| | Glucose | Trehalose | Neotrehalose | Kojibiose | Nigerose | Maltose | Isomaltose |
|---|---------|-----------|--------------|-----------|----------|---------|------------|
| <u>αGlc</u> , <u>αGlc</u> -(X)- <u>αGlc</u> | 0.34 | - | - | - | 0.17 | 0.18 | 0.15 |
| <u>βGlc</u> , <u>αGlc</u> -(X)- <u>βGlc</u> | 0.66 | - | - | - | 0.33 | 0.32 | 0.35 |
| <u>αGlc</u> -(1,2)- <u>αGlc</u> | - | - | - | 0.20 | - | - | - |
| <u>αGlc</u> -(1,2)- <u>βGlc</u> | - | - | - | 0.30 | - | - | - |
| <u>αGlc</u> -(1,1)- <u>αGlc</u> | - | 1.00 | - | - | - | - | - |
| <u>βGlc</u> -(1,1)- <u>αGlc</u> | - | - | 0.47 | - | - | - | - |
| <u>αGlc</u> -(1,1)- <u>βGlc</u> | - | - | 0.53 | - | - | - | - |
| <u>αGlc</u> -(1,2)- <u>αGlc</u> , <u>αGlc</u> -(X)- <u>αGlc</u> -(1,2)- <u>αGlc</u> | - | - | - | 0.22 | - | - | - |
| <u>αGlc</u> -(1,2)- <u>βGlc</u> , <u>αGlc</u> -(X)- <u>αGlc</u> -(1,2)- <u>βGlc</u> | - | - | - | 0.28 | - | - | - |
| <u>αGlc</u> -(1,3)-Y, <u>α</u> -(X)- <u>αGlc</u> -(1,3)-Y | - | - | - | - | 0.50 | - | - |
| <u>αGlc</u> -(1,4)-Y, <u>α</u> -(X)- <u>αGlc</u> -(1,4)-Y | - | - | - | - | - | 0.50 | - |
| <u>αGlc</u> -(1,6)-Y, <u>α</u> -(X)- <u>αGlc</u> -(1,6)-Y | - | - | - | - | - | - | 0.50 |

X means 1,3, 1,4, or 1,6

Y means α Glc or β Glc

The glucopyranoside of which the signal assignment is derived from its anomeric proton and carbon is shown underlined.

Table 3-6. $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQCスペクトルから計算された標準物質（3糖および4糖）のsugar unitの組成比

| | Maltotriose | Isomalto triose | 3^2 -O-a-D- glucosyl- maltose | Panose | Maltotetraose | Isomalto tetraose | Isomaltotriosyl -glucose |
|---|-------------|--------------------|---------------------------------------|--------|---------------|----------------------|-----------------------------|
| <u>αGlc</u> , <u>αGlc</u> -(X)- <u>αGlc</u> | 0.12 | 0.11 | 0.12 | 0.12 | 0.09 | 0.08 | 0.09 |
| <u>βGlc</u> , <u>αGlc</u> -(X)- <u>βGlc</u> | 0.21 | 0.22 | 0.21 | 0.22 | 0.16 | 0.17 | 0.16 |
| <u>αGlc</u> -(1,2)- <u>αGlc</u> | - | - | - | - | - | - | - |
| <u>αGlc</u> -(1,2)- <u>βGlc</u> | - | - | - | - | - | - | - |
| <u>αGlc</u> -(1,1)- <u>αGlc</u> | - | - | - | - | - | - | - |
| <u>βGlc</u> -(1,1)- <u>αGlc</u> | - | - | - | - | - | - | - |
| <u>αGlc</u> -(1,1)- <u>βGlc</u> | - | - | - | - | - | - | - |
| <u>αGlc</u> -(1,2)- <u>αGlc</u> , <u>αGlc</u> -(X)- <u>αGlc</u> -(1,2)- <u>αGlc</u> | - | - | - | - | - | - | - |
| <u>αGlc</u> -(1,2)- <u>βGlc</u> , <u>αGlc</u> -(X)- <u>αGlc</u> -(1,2)- <u>βGlc</u> | - | - | - | - | - | - | - |
| <u>αGlc</u> -(1,3)-Y, <u>α</u> -(X)- <u>αGlc</u> -(1,3)-Y | - | - | 0.34 | - | - | - | - |
| <u>αGlc</u> -(1,4)-Y, <u>α</u> -(X)- <u>αGlc</u> -(1,4)-Y | 0.67 | - | 0.33 | 0.31 | 0.75 | - | 0.25 |
| <u>αGlc</u> -(1,6)-Y, <u>α</u> -(X)- <u>αGlc</u> -(1,6)-Y | - | 0.67 | - | 0.36 | - | 0.75 | 0.50 |

X means 1,3, 1,4, or 1,6

Y means α Glc or β Glc

The glucopyranoside of which the signal assignment is derived from its anomeric proton and carbon is shown underlined.

3-3-5. マルトースを基質とした *A. niger* AgdB の転移反応

マルトースを基質に *A. niger* AgdB を反応させた転移生成物の重合度 (DP) 組成の経時変化を、HPLC で MCI GEL CK04S カラム (三菱化学) を使用して分析した。反応初期 (0~15 hr、Fig. 3-6) では、DP 2 (主にマルトース) が急速に減少した。DP 3 は反応初期で急速に増加した後に減少に転じた。DP 1、DP 4、

DP \geq 5 は反応が進むにつれこの順に増加が始まった。反応後期（15～48 hr、Fig. 3-6）には、重合度組成はほぼ変化しなくなった。

転移生成物を HPLC で DP 2、DP 3、DP 4、DP \geq 5 画分に分画した後、DP 2 画分を HPLC で、Unison UK-Amino カラム (Imtakt) を用いて分析し (Fig. 3-7)、DP 3、DP 4、DP \geq 5 画分は HSQC で分析した (Fig. 3-8)。各 DP 画分のグルコシド結合の組成を Fig. 3-9 に示す。グルコシド結合の組成の値は以下の例のように示される。分析する糖質中に等量のニゲロース (DP 2、Glc α -1,3-Glc)、マルトース (DP 2、Glc α -1,4-Glc)、マルトトリオース (DP 3、Glc α -1,4-Glc α -1,4-Glc)、パノース (DP 3、Glc α -1,6-Glc α -1,4-Glc) が含まれた場合、[DP 2、 α -1,3-グルコシド結合] = 25% (DP 2 のグルコシド結合の半分)、[DP 2、 α -1,4-グルコシド結合] = 25% (DP 2 のグルコシド結合の半分)、[DP 3、 α -1,4-グルコシド結合] = 37.5% (DP 3 のグルコシド結合の 3/4)、[DP 3、 α -1,6-グルコシド結合] = 12.5% (DP 3 のグルコシド結合の 1/4)、全グルコシド結合の合計は 100% となる。

DP 2 では、 α -1,4-グルコシド結合が反応時間を通じて減少したのに対し、 α -1,2-、 α -1,3-、 α -1,1- β -グルコシド結合は反応後期から増加を始めた。DP 3 では、 α -1,4-グルコシド結合は初期に増加し、10 hr 以後に減少に転じた。 α -1,3-グルコシド結合と、少量の α -1,2-、 α -1,1- β -グルコシド結合は、徐々に増加した。DP 4 および DP \geq 5 の分析では、反応後期に α -1,4-、 α -1,3-グルコシド結合と、少量の α -1,2-、 α -1,1- β -グルコシド結合が増加した。

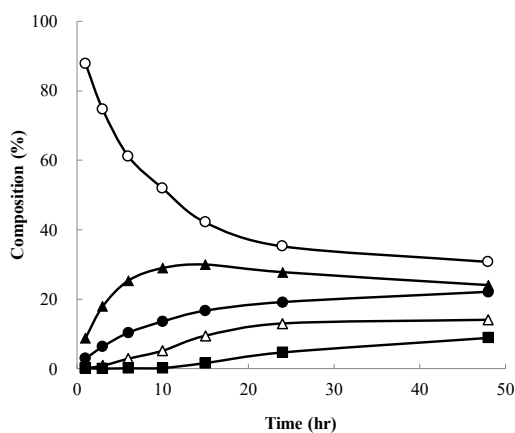


Fig. 3-6. *A. niger* AgdBのマルトースを基質とした転移生成物の重合度組成の経時変化

●, DP 1; ○, DP 2; ▲, DP 3; △, DP 4; ■, DP \geq 5。

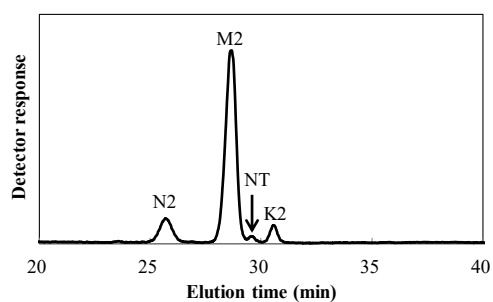


Fig. 3-7. *A. niger* AgdBのマルトースを基質とした転移生成物（反応24 hr）のDP2のHPLCクロマトグラム
N2, ニゲロース; M2, マルトース; NT, ネオトレハロース; K2, コージビオース。

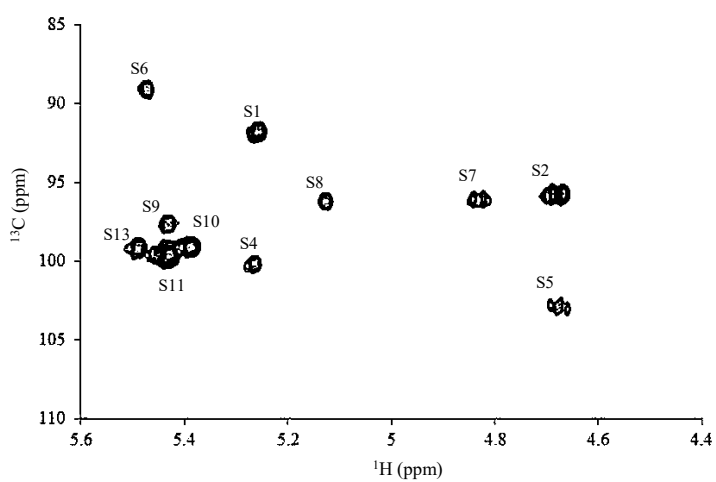


Fig. 3-8. *A. niger* AgdBのマルトースを基質とした転移生成物（反応24 hr）のDP3の¹H-¹³C-HQSCスペクトル

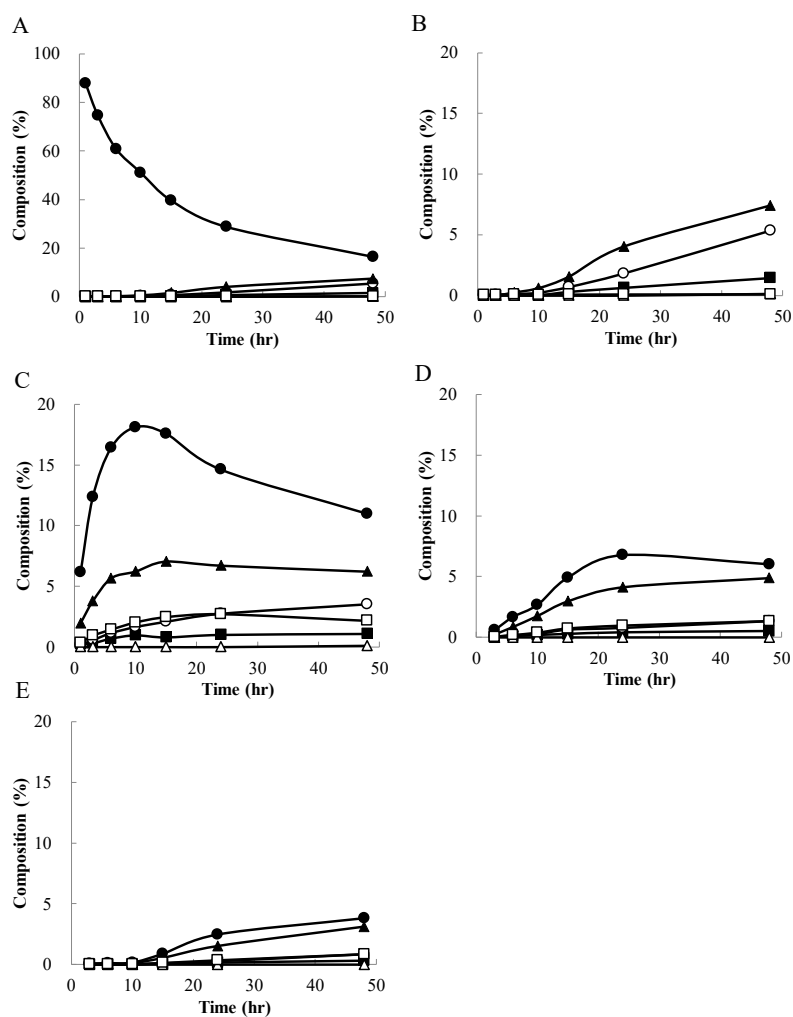


Fig. 3-9. *A. niger* AgdBのマルトースを基質とした転移生成物のグルコシド結合組成の経時変化

●, α -1,4-グルコシド結合; ○, α -1,2-グルコシド結合; ▲, α -1,3-グルコシド結合; △, α -1,6-グルコシド結合; ■, α -1,1- β -グルコシド結合; □, 未知のシグナル。(A) DP2、(B) DP2 (α -1,4-グルコシド結合を除く)、(C) DP3、(D) DP4、(E) DP \geq 5。

3-3-6. マルトペンタオースを基質とした *A. niger* AgdB の転移反応

マルトペンタオースを基質に *A. niger* AgdB を反応させた転移生成物の重合度組成を HPLC で分析した結果、基質 (DP5) よりも重合度の大きい転移生成物の生成が確認された (Fig. 3-10)。なお、各ピークの DP は LC MS 分析の結果、保持時間 29、24、21、18、16、15 min のピークは、それぞれ DP 1、DP 2、DP 3、DP 4、DP 5、および DP 6 の糖質に対応することが分かった。転移生成物の 39% は分子量が DP 5 よりも大きい糖質であった。MALDI-TOF MS 分析 (Fig. 3-11) では、最大で DP17 の転移生成物が検出された。転移生成物全体を HSQC で分析したところ、14% の α -1,2-グルコシド結合、39% の α -1,3-グルコシド結合、30% の α -1,4-グルコシド結合、5% の α -1,2-グルコシド結合で構成され、他にも 5% の α -1,6-グルコシド結合、5% の α -1,1- β -グルコシド結合、7% の未知のシグナルが検出された (Fig. 3-12)。

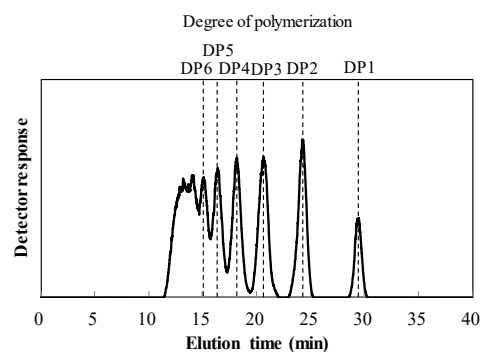


Fig. 3-10. *A. niger* AgdBのマルトペンタオースを基質とした転移生成物の重合度組成

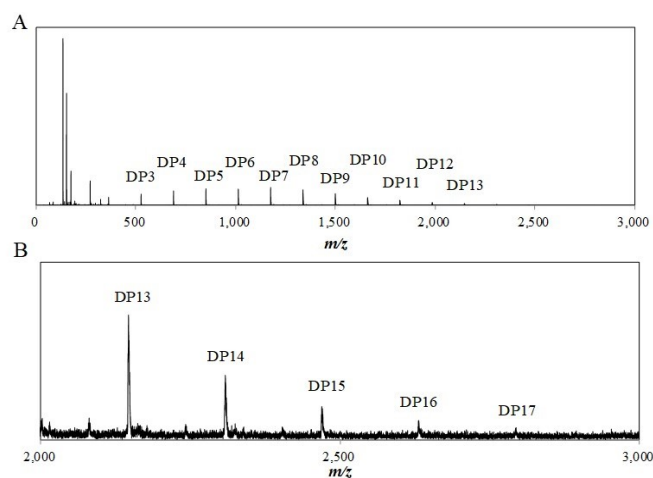


Fig. 3-11. *A. niger* AgdBのマルトペンタオースを基質とした転移生成物のMALDI-TOF MS分析
(A) m/z : 0-3,000 Da、(B) m/z : 2,000-3,000 Da。

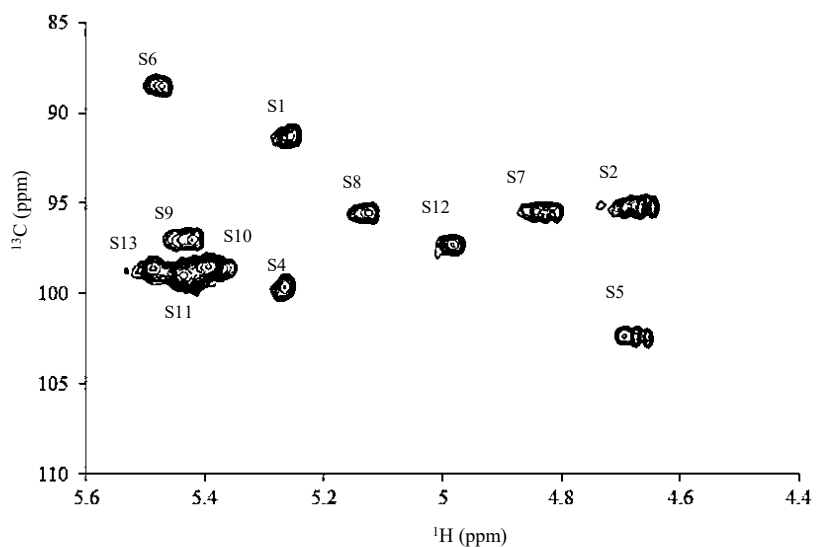


Fig. 3-12. *A. niger* AgdBのマルトペンタオースを基質とした転移生成物の ^1H - ^{13}C -HQSCスペクトル

3-4. 考察

*A. nidulans*を宿主とした発現、His-Trapアフィニティークロマトグラフィーを用いた精製で得られたタンパク質は、 α -グルコシダーゼ活性を有し、native-PAGEで1本のバンドとなったことから (Fig. 3-1 B)、活性のある *A. niger* AgdB の精製酵素が得られたと考えられた。SDS-PAGEでは2本のバンドが観察されたことから (Fig. 3-1 A)、*A. niger* AgdB は第2章で述べた AsojAgdLと同様にヘテロダイマーであると考えられた。一方、rAgdB (*A. niger* K1 からクローニングした *A. niger* AgdB を *P. pastoris* を宿主に発現)は、SDS-PAGEでは3本のバンドに分かれたが、Endo H 処理後の SDS-PAGE ではバンドが2本になることが報告されている [47]。同一の酵素ではあるが宿主である *A. nidulans* と *P. pastoris* の糖鎖修飾の違いが SDS-PAGE でのバンド数の違いの要因になると考えられた。

各種糖質基質に対する反応速度論的解析の結果 (Table 3-2)、*A. niger* AgdB は *A. niger* AgdA と同様、マルトオリゴ糖に対する作用性が高かった。一方、2糖類に対する作用性が異なり、*A. niger* AgdB はマルトース、コージビオース、ニゲロースによく作用するがイソマルトースに対する作用性が低く、*A. niger* AgdA はマルトースには良く作用するがコージビオース、ニゲロース、イソマルトースに対する作用性が低かった。*A. niger* AgdB と同様、 α -1,3-グルコシド結合を含む糖質を生成することが知られている *Acremonium implicatum* の α -グルコシダーゼは、ニゲロースおよびマルトースと比較して、コージビオースの k_{cat} / K_m 値が低いことが報告されている [32]。各 α -グルコシダーゼの2糖類への作用性に注目すると、 α -1,2-1,3 転移をする *A. niger* AgdB はコージビオースとニゲロースに作用し、 α -1,3 転移をする *A. implicatum* 由来の α -グルコシダーゼはニゲロースに作用し、 α -1,2-1,3 転移をしない *A. niger* AgdA はコージビオース、ニゲロースのいずれにも作用性が低いというように、転移活性の傾向と加水分解活性の傾向に何らかの相関があることが示唆された。なお、発現系が異なるためか速度論パラメーターの数値に違いはあったが、本研究の *A. niger* AgdB の基質特異性と、Maらによって報告された rAgdB の基質特異性 [47] は、 α -1,2-および α -1,3-グルコシド結合に対する作用性が高いという傾向は一致した。

本研究では、多様な結合様式を含むと推測される *A. niger* AgdB の転移生成物を解析するために、まずは NMR による各種グルコシド結合様式の検出、定量方法を検討した。そして、様々な結合様式を含む標準糖質を用い、アノメリックカーボン、プロトンに由来するシグナルの化学シフトから、糖質に含まれる各グルコシド結合様式を検出できること、またシグナルのピーク強度からその結合の組成比を小さい誤差で定量できることを確認し、NMR を用いた分析方法が確立されたと判断した。

次にこの方法を用いて実際に *A. niger* AgdB の転移生成物を分析した。マルトースを基質とした転移反応では、主に α -1,4-、 α -1,3-グルコシド結合、少量の α -1,2-グルコシド結合、微量の α -1,1- β -グルコシド結合が検出された

(Fig. 3-9)。 α -1,3-、 α -1,2-、 α -1,1- β -グルコシド結合は基質には含まれない結合様式であるため、*A. niger* AgdB の転移反応によって生成したと考えられた。 α -1,4-グルコシド結合は基質のマルトースに含まれる結合様式であり、基質の α -1,4-グルコシド結合が残存したか、転移によって新たに生成したかを直接判定することはできない。しかし、反応初期のDP3の糖質では、 α -1,4-グルコシド結合が他のすべての結合様式の合計よりも多かった。*A. niger* AgdB がマルトースの非還元末端に α -1,4-以外の結合様式のみで転移をした場合、DP3の糖質に含まれる α -1,4-グルコシド結合は半分以下になるはずであり、半分以上が α -1,4-グルコシド結合であるということは *A. niger* AgdB が α -1,4-グルコシド結合も生成するというを示すと考えられた。しかし、 α -1,4-グルコシド結合を含む糖質は、転移反応のグルコシルドナーとして優先的に利用されると考えられ、その結果、反応後期に α -1,4-グルコシド結合の比率が低下した。

マルトペンタオースを基質とした転移反応では、主に α -1,4-、 α -1,3-グルコシド結合、少量の α -1,2-、 α -1,6-グルコシド結合、微量の α -1,1- β -グルコシド結合が検出された。*A. niger* AgdB が α -1,2-、 α -1,3-、 α -1,1- β -グルコシド結合を生成するという、マルトース基質での実験結果と類似するものであった。なお、マルトース基質の場合と異なり、少量の α -1,6-グルコシド結合を生成したが、基質の鎖長によっては α -1,6-グルコシド結合も生成すると考えられた。

以上より、*A. niger* AgdB はマルトースやマルトペンタオースを基質に、 α -1,2-、 α -1,3-、そして少量の α -1,1- β 結合という、澱粉分解物には本来含まれない結合様式を含む糖質を生成することがわかった。Maからも異なる宿主で発現させた同じ酵素である rAgdB を、マルトースを基質に作用し、転移生成物中に α -1,2-および α -1,3-グルコシド結合を含む4つの糖質、コージビオース、ニゲロース、3²-*O*- α -D-グルコシル-マルトース、セントースを検出した[47]。しかし、これらの成分は転移反応によって生成する糖質の一部に限られている。本試験では、 α -1,2-、 α -1,3-グルコシド結合が特定の糖質だけでなく、転移生成物全体に存在することを、マルトースとマルトペンタオースの複数の基質の転移生成物に関して示した。また、*A. niger* AgdB が少量の α -1,1- β 結合を含む糖質を生成することも新たに確認した。*Bacillus* 属由来で α -1,1- β -グルコシド結合を生成する α -グルコシダーゼが過去に報告されたが[51]、真菌由来の α -グルコシダーゼではこれが初めての報告である。

Acremonium spp. 由来の α -グルコシダーゼによって生産するオリゴ糖は α -1,3-グルコシド結合を含み、既に工業規模で製造され、市販されている。しかし、 α -1,2-と α -1,3-グルコシド結合の両方を含む糖質は工業規模では未だ製造されていない。また、*Aspergillus* 属の菌は酵素製剤の生産菌として重要であるが、既に報告されている *A. niger*、*A. sojae*、*A. nidulans*、*A. oryzae* 由来の α -グルコシダーゼは、いずれも生成するのは主に α -1,6-グルコシド結合を含む糖質である[22, 24, 43, 52]。*A. niger* AgdB を利用することで、 α -1,2-

と α -1,3-結合を両方含む新たな糖質素材を、工業規模で生産する可能性が広がる。

第4章 *Aspergillus oryzae* および *Aspergillus sojae* に由来する α -グルコシダーゼの点変異導入による性質の変化

4-1. 序論

本章では、*A. oryzae* に由来し、第2章で解析した AsojAgdL と配列の同一性が極めて高い α -グルコシダーゼ (AoryAgdS) と AsojAgdL に関し、野生型と点変異を導入した変異型 α -グルコシダーゼの酵素の特性の違いについて述べる。第2章では、*A. sojae* から新たに見出した α -グルコシダーゼ (AsojAgdL) が α -1,6-グルコシド結合が連続した糖質を生成することにについて述べた。また、AsojAgdL のオルソログである *A. nidulans* に由来する α -グルコシダーゼ (*A. nidulans* AgdB; 配列同一性 82%) も強い α -1,6-転移活性を持つことが報告されている [22]。しかし、同様に AsojAgdL のオルソログであり、かつ極めて高い同一性を持つ *A. oryzae* に由来する α -グルコシダーゼ (AoryAgdS; 配列同一性 98%) は、20% のマルトース基質から α -1,6-転移生成物として 2.2% のイソマルトースのみが生成することが報告されている [53]。これらの結果は、AsojAgdL、*A. nidulans* AgdB および AoryAgdS がオルソログでありながら異なる転移活性を持つことを示唆すると考えられた。これら3つの酵素遺伝子は互いにアミノ酸配列の同一性が高いが、AsojAgdL と AoryAgdS との同一性は 98% で、AsojAgdL と *A. nidulans* AgdB との同一性 82% よりも極めて高く、13カ所のアミノ酸が異なるのみである。その13カ所のうちの4カ所は AsojAgdL と *A. nidulans* AgdB で共通となっており (Fig. 4-1)、そのうちの1カ所である450番目のアミノ酸は活性中心の近くに位置した (Fig. 4-2)。

そこで、この450番目のアミノ酸が転移特性に影響を与えると推測し、*A. nidulans* を宿主とする発現系で、AoryAgdS とその変異酵素である AoryAgdS_H450R、また AsojAgdL の変異酵素である AsojAgdL_R450H を発現させ、転移特性を比較した。

| | | |
|----------|---|-----|
| AoryAgdS | 1 M H L K K L L T S A A A L S G S V F A Q S K D G V E D L D G P G D D L Y V K D L S G C P G Y K A T K H W Q T R S G F Y A | 60 |
| AsojAgdL | 1 M Y L K K L L T S A A A L S G S V F A Q S K D G V E D L D G P G D D L Y V K D L S G C P G Y K A T K H W Q T R S G F Y A | 60 |
| AnidAgdB | 1 M R F Q Q L L P W A A A L T G C V V A Q S Q A G V D P L D R P G N D L Y V K D L S N C T G Y K V T K H W K T R S G F Y A | 60 |
| | * | |
| AoryAgdS | 61 D L T L A G P A C N V F G T D L P D L K L E V E Y Q T S D R L H V K I L D T N N T V Y Q V P D S V F P R P G F G E W C S | 120 |
| AsojAgdL | 61 D L T L A G P A C N V F G T D L P D L K L E V E Y Q T S D R L H V K I L D T N N T V Y Q V P D S V F P R P G F G E W C S | 120 |
| AnidAgdB | 61 D L A L A G P A C N V Y G I D L P K L K L E V E Y Q T D E R L H V K I L D T N N T V Y Q V P D S V F P R P G F G Q W C S | 120 |
| AoryAgdS | 121 P K D S K L K F D F Q A D P F S F T V S R T D T G E V L F D T T G N K L V F E S Q Y V Y L K T H L P Q N P H L Y G L G E | 180 |
| AsojAgdL | 121 P K D S K L K F D F Q A D P F S F T V S R T D T G E V L F D T T G N K L V F E S Q Y V Y L K T H L P Q N P H L Y G L G E | 180 |
| AnidAgdB | 121 P K N S K L K F D F K P D P F S F T V S R T D T G E V L F D T T G T K L V F E N Q Y L Y L K T H L P Q N P H L Y G L G E | 180 |
| AoryAgdS | 181 H S D A F M L N T T N Y T R T I Y T R D A Y G T P Q G E N L Y G A H P I Y F D H R Q T G T H G V F L L N S N G M D I F I | 240 |
| AsojAgdL | 181 H S D A F M L N T T N Y T R T I Y T R D A Y G T P Q G E N L Y G A H P I Y F D H R Q T G T H G V F L L N S N G M D I F I | 240 |
| AnidAgdB | 181 H S D S F M L N T T N Y T R T I Y T R D A Y G T P Q G E N L Y G A H P I Y F D H R Q D G T H G V F L L N S N G M D I Y I | 240 |
| AoryAgdS | 241 D N N S T Q F L E Y N I I G G V L D F Y F I A G P T P R D V A I Q Y A E I T Q T P L M T P Y W G L G Y H Q C K Y G Y Q D | 300 |
| AsojAgdL | 241 D N N A T Q Y L E Y N I I G G V L D F Y F I A G P S P R D V A I Q Y A E I T Q T P L M T P Y W G L G Y H Q C K Y G Y Q D | 300 |
| AnidAgdB | 241 D N E G G Q F L E Y N I I G G V F D F Y F I A G P S P Q D V A R Q Y A E I V Q P P L M V P Y W G L G F H Q C R Y G Y Q D | 300 |
| | * * * | |
| AoryAgdS | 301 V Y E V A A V V A N Y S T N N I P L E T I W T D I D Y M D R R R I F T I D P E R F P A D L Y K D L V D T I H A R D Q H Y | 360 |
| AsojAgdL | 301 V Y E V A A V V A N Y S T N N I P L E T I W T D I D Y M D R R R I F T I D P E R F P A N L Y K D L V D T I H A R D Q H Y | 360 |
| AnidAgdB | 301 V Y E V A A V T A N Y S V H D I P L E T I W T D I D Y M D R R R I F T L D P E R F P P E L V K D L V D T L H A R D Q H Y | 360 |
| | * | |
| AoryAgdS | 361 I V M V D P A V Y Y K E S N P A L D E G L K Y D I F M K E N N G S E Y Q G V V W A G P S H F P D W F H P D S Q Q Y W S E | 420 |
| AsojAgdL | 361 I V M V D P A V Y Y K E S N P A L D E G L R Y D I F M K E N N G S E Y Q G V V W A G P S H F P D W F H P D S Q Q Y W S E | 420 |
| AnidAgdB | 361 I V M V D P A V Y Y S E P N P A L D A G L K Y D A F M K E L N G T H Y Q G V V W A G P S Y F P D W F H P N A Q E Y W T E | 420 |
| | * | |
| AoryAgdS | 421 Q F L A F F D G T N G P D I D A L W I D M N E P A N F Y N R P Y P G N N T T P E N F A E V D G D P P A A P A V R D G P D | 480 |
| AsojAgdL | 421 Q F L A F F D G T N G P D I D A L W I D M N E P A N F Y N R P Y P G N N T T P E N F A E V D G D P P A A P A V R D G P D | 480 |
| AnidAgdB | 421 Q F L N F F D G V N G P D I D A L W I D M N E P A N F Y N R P Y P G N N T T P E E F A E A N D N P P E P P A V R D G P D | 480 |
| | * | |
| AoryAgdS | 481 A P I P G F P A S L Q P N W V Q G N A T E K R S T A A V V K R Q R S Q S R R N L G A G H W K S P K - - G K F D A R A G W | 540 |
| AsojAgdL | 481 A P I P G F P A S L Q P N W V Q G N A T E K R S T A A V V K R Q R S Q S R R N L G A G H W K S P K - - G K V D P R A G W | 540 |
| AnidAgdB | 481 A P I P G F P D S L Q P N F A S G Q T N E K R A V V T V E R R A R S Q S H R Q L G A G R W R S A V R H W P R D P K A G W | 540 |
| | * * | |
| AoryAgdS | 541 Q H G K Q T G S G C G P N E C K G L P N R H L I R P P Y M I Q N G A G P T L A D S T A D T D L V Q S G G Y V Q Y D T H N | 600 |
| AsojAgdL | 541 Q H G K Q T G S G C G P N E C K G L P N R H L I R P P Y M I Q N G A G P T L A D S T A D T D L V Q S G G Y V Q Y D T H N | 600 |
| AnidAgdB | 541 Q H G R K S G S G C G P H E C R G L P N R E L I R P P Y M I Q N G A G P T L A D N T A D T D I V Q S G G Y V Q Y D T H S | 600 |
| | * | |
| AoryAgdS | 601 L Y G A M M S S H S H N A M R A R R P D D R A L V I T R S T F A G S G K D V S H W L G D N V S G W L W Y Q L S I S Q I L | 660 |
| AsojAgdL | 601 L Y G A M M S S H S H N A M R A R R P D D R A L V I T R S T F A G S G K D V S H W L G D N V S G W L W Y Q L S I S Q I L | 660 |
| AnidAgdB | 601 L Y G A M M S T H S H N A M R A R R P D D R A L V I T R S T F A G S G K D V S H W L G D N I S D W L S Y R L S I S Q I L | 660 |
| AoryAgdS | 661 Q F A S L Y Q I P V V G P D V C G F G G N V T E T L C A R W A T L G S F Y T F F R N H A E I Y A N S Q E F Y R W P T V A | 720 |
| AsojAgdL | 661 Q F A S L Y Q I P V V G P D V C G F G G N V T E T L C A R W A T L G S F Y T F F R N H A E I Y A N P Q E F Y R W P T V A | 720 |
| AnidAgdB | 661 Q F A S L Y Q I P V V G P D V C G F G G N V T E T L C A R W A T L G S F Y T F F R N H A E I F A N P Q E F Y R W P I V A | 720 |
| | * | |
| AoryAgdS | 721 Q A A R N G I S I R Y Q L L D Y I Y T A I Y K Q N Q T G T P A L N P L F F N Y P N D P N T Y P I D L Q F F Y G D G I L V | 780 |
| AsojAgdL | 721 Q A A R N G I S I R Y Q L L D Y I Y T A I Y K Q N Q T G T P A L N P L F F N Y P N D P N T Y P I D L Q F F Y G D G I L V | 780 |
| AnidAgdB | 721 E A A R N G I A I R Y Q L L D Y I Y T A I Y K Q T Q T G T P S L N P L F F N Y P F D Q N T Y G I D L Q F F Y G P G I L V | 780 |
| AoryAgdS | 781 S P V T E E N S T S V T F Y L P D D I F Y E W G T G K P V R G Q G E Y V S L D N I D Y T D I T I H Y K G G I V Y P Q R I | 840 |
| AsojAgdL | 781 S P V T E E N S T S V T F Y L P D D I F Y E W G T G K P V R G Q G E Y V S L D N I D Y T D I T I H Y K G G I V Y P Q R I | 840 |
| AnidAgdB | 781 S P V T E E N S T S V S Y Y L P D D I F Y E W G T G K P V R G H G E Y V S A E - V D V T H I T V H Y K G G L V Y P Q R I | 839 |
| AoryAgdS | 841 E S A N T T T A L R Q K G F N I V V A P G L D G R A E G S L Y L D D G V S V V Q D T V S E I D F V Y E N G K L T M T G S | 900 |
| AsojAgdL | 841 E S A N T T T A L R Q K G F N I V V A P G L D G R A E G S L Y L D D G V S V V Q D T V S E I D F V Y E N G K L T M T G S | 900 |
| AnidAgdB | 841 E S A N T T T A L R Q K G F N I V I A P G L D G S A H G E L Y L D D G L S Q V Q D K V S E I D F S Y V D G V F E M K G S | 899 |
| AoryAgdS | 901 F E Y E A G V G I E T I T V L G V E S K - - - P E G D - D V E Y D A E N K K L V K H V D V P L T G E D E I T I L | 950 |
| AsojAgdL | 901 F E Y E A G V G I E T I T V L G V E S K - - - P E G D E D V E Y D A E N K K L V K H V D V P L T G E N E I T I L | 951 |
| AnidAgdB | 900 F E Y D P G V G I E R I T I L G V G A K P E V A A E D A E V E Y D E E N Q K L V L H V D V P L T R K S S I K I A | 955 |
| | * * | |

Fig. 4-1. AoryAgdS、AsojAgdL、および*A. nidulans* AgdBのアミノ酸配列の比較

白抜きは活性中心の位置を示す。*A. nidulans* AgdBは図中でAnidAgdBと表記した。*はAoryAgdSとAsojAgdLで異なるアミノ酸残基、四角で囲ったのはAoryAgdSとAsojAgdLで異なるがAsojAgdLと*A. nidulans* AgdBで共通であったアミノ酸残基を示す。

| | | | | | |
|----------|-----|-------------|--------------|-------------|-----|
| AoryAgdS | 430 | NGPDIDALWID | DMNEPANFYNH | PYPGNNTTPE | 460 |
| AsojAgdL | 430 | NGPDIDALWID | DMNEPANFYNR | PYPGNNTTPE | 460 |
| AnidAgdB | 430 | NGPDIDALWID | DMNEPANFYNR | PYPGNNTTPE | 460 |
| AnigAgdB | 408 | SGVDIDALWID | DMNEASNFCYP | - - - CLDPA | 434 |
| AnigAgdA | 481 | -KVAFDGVWYD | DMSEVSSFCVGS | CGTGNLTLN | 510 |
| AoryAgdA | 483 | -KLHYDGVWYD | DMAEVSSFCVGS | CGTGNLSMN | 512 |

Fig. 4-2. *Aspergillus*属に由来する各種 α -グルコシダーゼの活性中心付近のアミノ酸配列の比較

白抜きは活性中心の位置を示す。図中で*A. nidulans* AgdBはAnidAgdB、*A. niger* AgdBはAnigAgdB、*A. niger* AgdAはAnigAgdA、*A. oryzae* AgdAはAoryAgdAと表記した。450番目のアミノ酸残基を四角で囲った。

4-2. 材料と方法

4-2-1. 実験材料と試薬

試薬類は後述のものを除いて富士フィルム和光純薬工業製のものを用いた。ニゲロースはコスモバイオ製、イソマルトトリオースは、シグマアルドリッチ製のものを使用した。3²-*O*- α -D-glucosyl-maltose とイソマルトトリオシルグルコースは既報 [31, 32] の手法に従って調製した。

4-2-2. 使用した微生物株

A. oryzae RIB40 および RIB601 は、酒類総合研究所から入手した。*A. sojae* NBRC4239 は、製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンターから入手した。*A. nidulans* ATCC38163 は、American Type Culture Collection から入手した。

4-2-3. クローニング、発現ベクターの構築

使用した PCR プライマーの一覧を Table 4-1 に示した。PCR には、Phusion Hot Start II DNA ポリメラーゼ (Thermo Fisher Scientific) を使用した。AoryAgdS と AsojAgdL (GenBank accession no. BAE64257、DM849390) の発現ベクターは以下のように構築した。*A. oryzae tef1* 遺伝子 (GenBank accession no. Q9Y713) のプロモーター領域 [33] を含む 0.8 kbp フラグメントは *A. oryzae* RIB40 のゲノム DNA から、プライマー-promoter 1 /promoter 2 を使用して PCR 増幅した。AoryAgdS と AsojAgdL と遺伝子の 0.3 kbp 下流のターミネーター領域を含むフラグメントを、*A. oryzae* RIB601 と *A. sojae* NBRC4239 のゲノム DNA から、プライマー-AgdOS1 /AgdOS2 および AgdSL1 / AgdSL4 を使用して増幅した。In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ) を使用して、2 つの PCR 産物と HindIII/KpnI で処理した pPTRII (タカラバイオ) を結合し、発現ベクターとした。

Table 4-1. AoryAgdS、AsojAgdLのクローニングおよび変異導入に用いたPCRプライマー

| Primer | Sequence |
|-------------|--|
| promoter1 | 5'-TGATTACGCCAAGCTTGATTTTCACTGTGGACCAGACA-3' |
| promoter2 | 5'-TTTGAAGGTGGTGCCTGAACT-3' |
| AgdOS1 | 5'-CGCACCACCTTCAAAAATGCATCTTAAGAAGCTGCT-3' |
| AgdOS2 | 5'-GTGAATTCGAGCTCGGTACCGTGAGAACGGAGCTTTAATAATAC-3' |
| AgdSL1 | 5'-CGCACCACCTTCAAAAATGTATCTTAAGAAGCTGCTCACTTC-3' |
| AgdSL4 | 5'-GTGAATTCGAGCTCGGTACCGGTGATGAACGGAGCTTTAA-3' |
| OS_H450R_F | 5'-GCAAACCTTCTACAACCACCCATACCCAGGCAAC-3' |
| OS_H450R_RV | 5'-GTTGCCTGGGTATGGGTGGTTGTAGAAGTTTGC-3' |
| SL_R450H_F | 5'-GCAAACCTTCTACAACCGCCCATACCCCTGGCAAC-3' |
| SL_R450H_RV | 5'-GTTGCCAGGGTATGGGCGGTTGTAGAAGTTTGC-3' |

4-2-4. 部位特異的変異導入遺伝子発現ベクターの構築

部位特異的変異導入は、AoryAgdS、AsojAgdLの発現ベクターを使用し、QuickChange site-direct mutagenesis kit (Agilent Technologies) を用いて実施した。AoryAgdSの450番目のヒスチジンは、プライマーOS_H450R_F / OS_H450R_RVを用いてアルギニンに置き換えた (AoryAgdS_H450R)。AsojAgdLのアミノ酸配列450番目のアルギニンは、プライマーSL_R450H_F / SL_R450H_RVを用いてヒスチジンに置き換えた (AsojAgdL_R450H)。

4-2-5. 形質転換

AoryAgdS、AsojAgdL_R450H、AoryAgdS_H450R、pPTRII (遺伝子未導入) の各発現ベクターを *A. nidulans* ATCC38163 を宿主に、Gomi *et al* [34] によって報告された方法に従って形質転換した。

4-2-6. 組換え酵素の取得

組換えた α -グルコシダーゼの酵素液を調製するために、形質転換した *A. nidulans* を、2 L の三角フラスコ、180 rpm の回転速度で 37°C、4 d、好氣的に振盪培養した。培地は 0.1 μ g / mL のピリチアミンを含み、炭素源をグリセロールで置き換えた 500 mL Czapek-Dox 培地を用いた。菌体は、ミラクロス (Merck) を通して培養液と分離し回収した。100 mg の菌体を 1 mL の蒸留水に懸濁し、マルチビーズショッカー (安井機械) で破碎し、遠心分離 (10,000 \times G、10 min、4°C により得られた上清を粗酵素液とした。AsojAgdL に関しては第 2 章の手法で得られた精製酵素を用いた。

4-2-7. 酵素活性の測定

α -グルコシダーゼ活性は、20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) 中の 20 mM マルトースと酵素を 40°C で 30 min インキュベートすることで測定した。反応は 10 min 煮沸することで停止した。遊離したグルコースは、グルコース CII テストワコー

(富士フィルム和光純薬)を使用して測定した。 α -グルコシダーゼ活性の1Uは、上記条件下で1minあたり $1\mu\text{mol}$ のマルトースの加水分解を触媒する酵素の量として定義した。デキストラン加水分解活性は、20mMリン酸緩衝液(pH 6.0)中の1%(w/w)デキストランと酵素を40°Cで30minインキュベートすることにより測定した。反応は10min煮沸することで停止した。遊離したグルコースは、グルコースCIIテストワコーを用いて測定した。

4-2-8. 転移生成物の調製

転移生成物は、AoryAgdS、AoryAgdS_H450R、AsojAgdL_R450Hの粗酵素およびAsojAgdLの精製酵素を用いて調製した。各試験区の反応溶液の組成をTable 4-2に示した。マルトースを基質とした反応では、23%(w/w)のマルトース、0.14U/gのAoryAgdSおよびAoryAgdS_H450Rの酵素(基質あたりでは0.6U/gDS)、または0.07U/gのAsojAgdLおよびAsojAgdL_R450Hの酵素(基質あたりでは0.3U/gDS)で、pH 6.0、40°Cで48hrインキュベートした。pPTRIIでは、粗酵素液を反応液に加えらるる最大量添加し、23%(w/w)マルトースとpH 6.0、40°Cで48hrインキュベートした。マルトペンタオースを基質とした反応では、23%(w/w)のマルトペンタオース、0.46U/gのAoryAgdSおよびAoryAgdS_H450Rの酵素(基質あたりでは2U/gDS)、または0.23U/gのAsojAgdLおよびAsojAgdL_R450Hの酵素(基質あたりでは1U/gDS)で、pH 6.0、40°Cで48hrインキュベートした。pPTRIIの場合、反応液に加えらるる最大量添加し、23%(w/w)マルトペンタオースとpH 6.0、40°Cで72hrインキュベートした。反応は10min煮沸することで停止した。デキストラナーゼ加水分解による転移生成物における連続 α -1,6-グルコシド結合を含む糖質の含有量の評価は、第2章に記載した手法で実施した。

Table 4-2 AoryAgdS、AsojAgdLとその変異体のマルトースおよびマルトペンタオースを基質とした転移反応液の組成

| | | Enzyme solution (mg) | α -Glucosidase activity (mU) | substrate (mg) | Total amount of solution (mg) | Reaction time (hr) |
|------------------------|---------------|-------------------------|--|-------------------|----------------------------------|-----------------------|
| AoryAgdS | Maltose | 95 | 36 | 60 | 260 | 48 |
| | Maltopentaose | 63 ^b | 120 | 60 | 260 | 72 |
| AoryAgdS_H450R | Maltose | 115 | 36 | 60 | 260 | 48 |
| | Maltopentaose | 76 ^b | 120 | 60 | 260 | 72 |
| AsojAgdL_R450H | Maltose | 28 | 18 | 60 | 260 | 48 |
| | Maltopentaose | 18 ^b | 60 | 60 | 260 | 72 |
| AsojAgdL (purified) | Maltose | 5 ^a | 18 | 60 | 260 | 48 |
| | Maltopentaose | 17 ^a | 60 | 60 | 260 | 72 |
| pPTRII (Control) | Maltose | 190 | 1.5 | 60 | 260 | 48 |
| | Maltopentaose | 190 | 7.5 | 60 | 260 | 72 |

The reaction mixtures contained buffer and water in addition to the crude extract and the substrate.

^a Purified enzyme solution, diluted 10 times, was used.

^b The crude extract was concentrated 5 times by ultrafiltration before use.

4-2-9. 転移生成物の HPLC 分析

第 2 章に記載した手法で転移生成物の重合度 (DP) および糖質構造異性体を分析した。

4-2-10. タンパク質立体構造の予測

タンパク質の立体構造の予測は、AlphaFold2 (<https://colab.research.google.com/notebooks/welcome.ipynb?hl=ja>)を用い、AsojAgdL のアミノ酸配列全長について行った。

4-3. 結果

4-3-1. 酵素の発現

AoryAgdS、*AoryAgdS_H450R* および *AsojAgdL_R450H* の遺伝子をプラスミド pPTRII にクローニングし、*A. nidulans* を宿主に形質転換し、組換え酵素 *AoryAgdS*、*AoryAgdS_H450R* および *AsojAgdL_R450H* を発現させた。組換え酵素の発現を確認するために、菌体から抽出した粗酵素液に関し、 α -グルコシダーゼ活性を測定した (Table 4-3)。なお、*AsojAgdL* は第 2 章に記載した精製酵素を用いた。宿主に由来する野生型 α -グルコシダーゼ遺伝子は破壊されておらず、コントロールとして作製した遺伝子を導入していない空のベクターの形質転換体 (pPTRII) から α -グルコシダーゼ活性が検出された。コントロールは 0.008 U/mL の α -グルコシダーゼ活性であった一方、*AoryAgdS*、*AoryAgdS_H450R* および *AsojAgdL_R450H* はそれぞれ 0.38、0.31、0.65 U/mL の α -グルコシダーゼ活性があり、コントロールより 39~81 倍活性が高かった。これらの結果より、組換え α -グルコシダーゼの発現レベルが宿主に由来する α -グルコシダーゼ遺伝子発現の発現レベルよりもはるかに高いことが示された。

Table 4-3. *AoryAgdS*、*AsojAgdL* とその変異体の活性

| Substrate | <i>AoryAgdS</i> | <i>AoryAgdS_H450R</i> | <i>AsojAgdL_R450H</i> | <i>AsojAgdL</i> (purified) | pPTRII |
|--|-----------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------|---------------|
| Maltose (U/mL) | 0.38 ± 0.03 | 0.31 ± 0.02 | 0.65 ± 0.00 | 35.71 ± 2.31 | 0.008 ± 0.002 |
| Dextran ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mL}$) | ND ^a | 0.05 ± 0.01 | ND ^a | 5.97 ± 0.20 | - |

Enzyme activities are shown with standard errors (SE).

-, No analysis was performed.

^aNot detected because of very low activity.

4-3-2. マルトースを基質とした転移反応

A. nidulans で発現した α -グルコシダーゼの転移特性を評価するために、23% (w/w) のマルトース基質に作用させ、転移生成物を分析した。各精製酵素または粗酵素を、Table 4-2 に示した反応液組成で pH 6.0、40 °C で 48 hr 反応し、転移生成物を UK-Amino カラムを用いた HPLC 分析に供した。

粗酵素を用いて転移活性を解析するにあたり、各酵素を評価する前に試験系の妥当性を確認した。まずは基質のマルトースの反応後の残存量から粗酵素に含まれる夾雑活性の程度を確認した。コントロール (pPTRII) では、添加できる最大量 (190 mg) の粗酵素液を添加したが、 α -グルコシダーゼ活性は酵素を発現させた形質転換体の反応試験区よりも低く (酵素発現試験区で 36 mU または 18 mU であった一方、コントロールで 1.5 mU)、基質マルトースの 90.8% がインキュベーション 48 hr 後に残存した。一方、*AoryAgdS*、*AoryAgdS_H450R* および *AsojAgdL_R450H* では (*AsojAgdL* は精製酵素を使用)、粗酵素液の添加量はコントロールより少なかったが、マルトースの残留量ははるかに少なかった (17.2%、6.2% および 41.4%、Table 4-4。)。遺伝子組換えにより発現させ

た α -グルコシダーゼは、宿主由来の α -グルコシダーゼよりもはるかに発現量が多く、従ってマルトースの大部分は遺伝子組換え α -グルコシダーゼによって他の糖類に変換されたと考えられた。

次に、これまでの研究で既に糖転移に関する性質を明らかにしている α -グルコシダーゼの粗酵素を用いて転移生成物を分析し、本試験系で転移特性を適切に評価できるかを検討した。試験には、第2章で述べた連続 α -1,6-グルコシド結合を持つ糖質を生成するAsojAgdL、第3章で述べた α -1,2-、 α -1,3-グルコシド結合を持つ糖質を生成する*A. niger* AgdBの粗酵素を用いた。反応後の溶液には、各種のグルコシド結合を持つ転移生成物が含まれている。DP3 およびDP4に含まれる α -1,6-グルコシド結合を持つ糖類の含有量、すなわちパノース、イソマルトトリオース、イソマルトトリオシルグルコース、イソマルトテトラオースの含有量の合計は、 α -グルコシダーゼの α -1,6-転移の程度を反映すると考えられたため、 α -1,6-転移の指標とした（以下、 α -1,6-転移生成物）。同様に、 3^2 - O - α -D-グルコシル-マルトース含有量は、 α -1,3-転移の指標（以下、 α -1,3-転移生成物）、マルトトリオースとマルトテトラオースの含有量の合計は、 α -1,4-転移の指標とした（以下、 α -1,4-転移生成物）。AsojAgdL および *A. niger* AgdB の転移生成物を分析した結果、粗酵素の転移特性は精製酵素の特性を反映しており、両 α -グルコシダーゼ間の転移特性の違いも明らかだった（Table 4-5）。以上より、本試験系で粗酵素を用いて α -グルコシダーゼの転移特性を適切に評価することが可能であると考え、各 α -グルコシダーゼの転移生成物の解析を実施した。

AoryAgdS_H450R のマルトースを基質とした転移生成物（Fig. 4-3 B）では、 α -1,6-転移生成物（32.0%）は、 α -1,3-転移生成物（0.9%）や α -1,4-転移生成物（4.0%）よりも明らかに多かった（Table 4-4）。転移生成物は第2章で解析したAsojAgdL精製酵素の2 U/g DSで12~24 hr反応した転移生成物と類似した。作用させた α -グルコシダーゼの活性と反応時間（0.6 U/g DSで48 hr反応）を考えると、AoryAgdS_H450R と AsojAgdL の転移特性は類似していることが示唆された。一方、AoryAgdS の転移生成物（Fig. 4-3 A）では、 α -1,6-転移生成物（8.5%）は、 α -1,3-転移生成物（9.1%）または α -1,4-転移生成物（12.9%）よりも少なかった。さらに、第2章で経時的に解析したAsojAgdL精製酵素の転移生成物と比較すると、いずれの反応時間の転移生成物とも類似していなかった。したがって、AoryAgdS の転移特性は AoryAgdS_H450R と AsojAgdL のいずれとも異なると考えられた。

次に AsojAgdL において同じ 450 番目のアミノ酸に変異を導入した変異体（AsojAgdL_R450H）について、マルトースを基質とした転移生成物を解析した。AsojAgdL_R450H（Fig. 4-3 D）は α -1,6-転移生成物が少なく（3.7%）、 α -1,3-転移生成物（10.0%）や α -1,4-転移生成物（15.9%）の方が多く含まれた（Table 4-4）。この糖組成は同じ α -グルコシダーゼ活性、同じ反応時間で反応させたAsojAgdL粗酵素の転移生成物（Fig. 4-3 C）とは異なり、また第2章で経時的に解析したAsojAgdL精製酵素のいずれの反応時間の転移生成物とも類似して

いなかった。このことから、AsojAgdL_R450Hは変異を導入することでAsojAgdLから転移特性が変化したと考えられた。

Table 4-4. AoryAgdS、AsojAgdLとその変異酵素のマルトースを基質とした転移生成物の糖組成

| | AoryAgdS | AoryAgdS _H450R | AsojAgdL _R450H | AsojAgdL (purified) | pPTR II | |
|-----------------|---|--------------------|--------------------|------------------------|---------|------|
| Composition (%) | | | | | | |
| DP1 | Glucose | 25.4 | 24.8 | 15.9 | 24.4 | 3.0 |
| | Nigerose | 4.0 | 1.6 | 0.8 | 1.7 | 0.0 |
| | Maltose | 17.2 | 6.2 | 41.4 | 4.1 | 90.8 |
| DP2 | Kojibiose | 0.0 | 0.0 | 0.6 | 1.5 | 0.0 |
| | Isomaltose | 4.6 | 18.4 | 0.9 | 18.4 | 0.0 |
| | Others | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.1 |
| | 3 ² -O- α -D-glucosyl-maltose | 9.1 | 0.9 | 10.0 | 0.6 | 0.0 |
| | Maltotriose | 9.7 | 1.6 | 12.0 | 1.2 | 0.8 |
| DP3 | Panose | 7.6 | 9.8 | 3.7 | 7.1 | 4.3 |
| | Isomaltotriose | 0.9 | 8.6 | 0.0 | 10.0 | 0.0 |
| | Others | 1.1 | 0.9 | 3.6 | 2.9 | 0.0 |
| | Maltotetraose | 3.2 | 2.4 | 3.9 | 2.4 | 0.0 |
| DP4 | Isomaltotriose-glucose | 0.0 | 10.3 | 0.0 | 4.6 | 0.0 |
| | Isomaltotetraose | 0.0 | 3.3 | 0.0 | 1.8 | 0.0 |
| | Others | 10.7 | 0.0 | 5.7 | 7.0 | 0.0 |
| DP5+ | | 6.5 | 11.2 | 1.5 | 12.3 | 0.0 |
| | α -1,6-transglucosylon products ^a | 8.5 | 32.0 | 3.7 | 23.5 | 4.3 |
| | α -1,3-transglucosylon products ^b | 9.1 | 0.9 | 10.0 | 0.6 | 0.0 |
| | α -1,4-transglucosylon products ^c | 12.9 | 4.0 | 15.9 | 3.6 | 0.8 |

^a Sum of the products for panose, isomaltotriose, isomaltotriose-glucose, and isomaltotetraose.

^b Composition of the products for and 3²-O- α -D-glucosyl-maltose.

^c Sum of the products for maltotriose and maltotetraose.

Table 4-5.粗酵素のマルトースを基質とした転移生成物の糖組成の分析例

| | AsojAgdL | <i>A. niger</i> AgdB |
|--|----------|----------------------|
| α -Glucosidase activity (U / mL) | 0.5 | 0.5 |
| Reaction time (hr) | 24 | 24 |
| Composition (%) | | |
| DP1 Glucose | 15.7 | 15.9 |
| Nigerose | 0.0 | 3.8 |
| Maltose | 35.4 | 37.5 |
| DP2 Kojibiose | 0.0 | 2.4 |
| Isomaltose | 5.4 | 0.0 |
| Others | 0.6 | 0.0 |
| 3 ² -O- α -D-glucosyl-maltose | 5.4 | 16.0 |
| Maltotriose | 5.1 | 9.8 |
| DP3 Panose | 23.1 | 0.0 |
| Isomaltotriose | 0.7 | 0.0 |
| Others | 1.0 | 3.6 |
| Maltotetraose | 0.7 | 1.8 |
| Isomaltotrosyl-glucose | 3.2 | 0.0 |
| DP4 Isomaltotetraose | 0.0 | 0.0 |
| Others | 2.8 | 7.7 |
| DP5+ | 0.9 | 1.5 |
| α -1,6-ransglucosylon products ^a | 27.0 | 0.0 |
| α -1,3-ransglucosylon products ^b | 5.4 | 16.0 |
| α -1,4-ransglucosylon products ^c | 5.8 | 11.6 |

^a Sum of panose, isomaltotriose, isomaltosyl-glucose, and isomaltotetraose.

^b Composition of 3²-O- α -D-glucosyl-maltose.

^c Sum of maltotriose and maltotetraose.

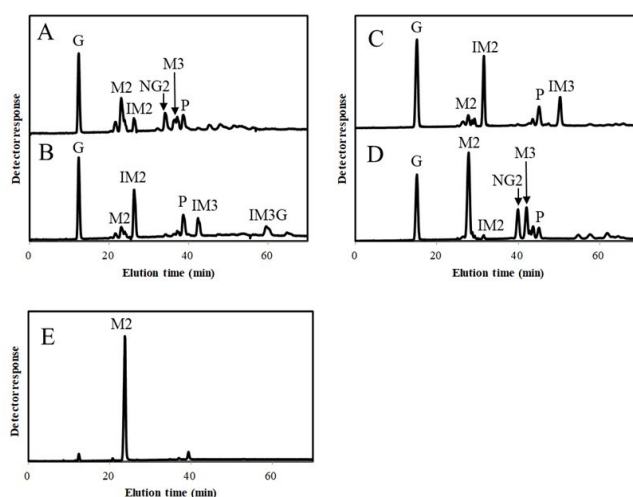


Fig. 4-3. AoryAgdS、AsojAgdLとその変異体のマルトースを基質とした転移生成物のHPLCクロマトグラム

(A) AoryAgdS (B) AoryAgdS_H450R (C) AsojAgdL (D) AsojAgdL_R450H (E) pPTR II。記号：G, グルコース; M2, マルトース; IM2, イソマルトース; NG2, 3²-O- α -D-グルコシル-マルトース; M3, マルトトリオース; P, パノース; IM3, イソマルトトリオース; IM3G, イソマルトトリオシルグルコース。

4-3-3. マルトペンタオースを基質とした転移反応

α -グルコシダーゼの転移特性を別の面から評価するために、今度は 23% (w/w) のマルトペンタオースを基質とし、AoryAgdS、AoryAgdS_H450R、AsojAgdL、AsojAgdL_R450H の転移生成物およびそのデキストラナーゼ加水分解物について、CK-04S カラムを利用し HPLC 分析に供した (Fig. 4-4)。コントロール (pPTRII) の液を最大量添加し、マルトペンタオースとともにインキュベートしたところ、基質であるマルトペンタオースを含む DP 5 の成分はほぼ変化せずに残存した (Fig. 4-4 E)。マルトース基質の場合と同様、宿主に由来する酵素活性の影響は少ないと考えられた。AoryAgdS_H450R および AsojAgdL の転移生成物のデキストラナーゼ加水分解による評価では、DP 4 以上の成分が加水分解を受けて DP 2、DP 3 の含有量が増加することが確認された (Fig. 4-4 B, C)。これは転移反応によって α -1,6-グルコシド結合が連続した糖質が生成したことを示した。一方、AoryAgdS および AsojAgdL_R450H は連続 α -1,6-グルコシド結合を生成しなかった (Fig. 4-4 A, D)。

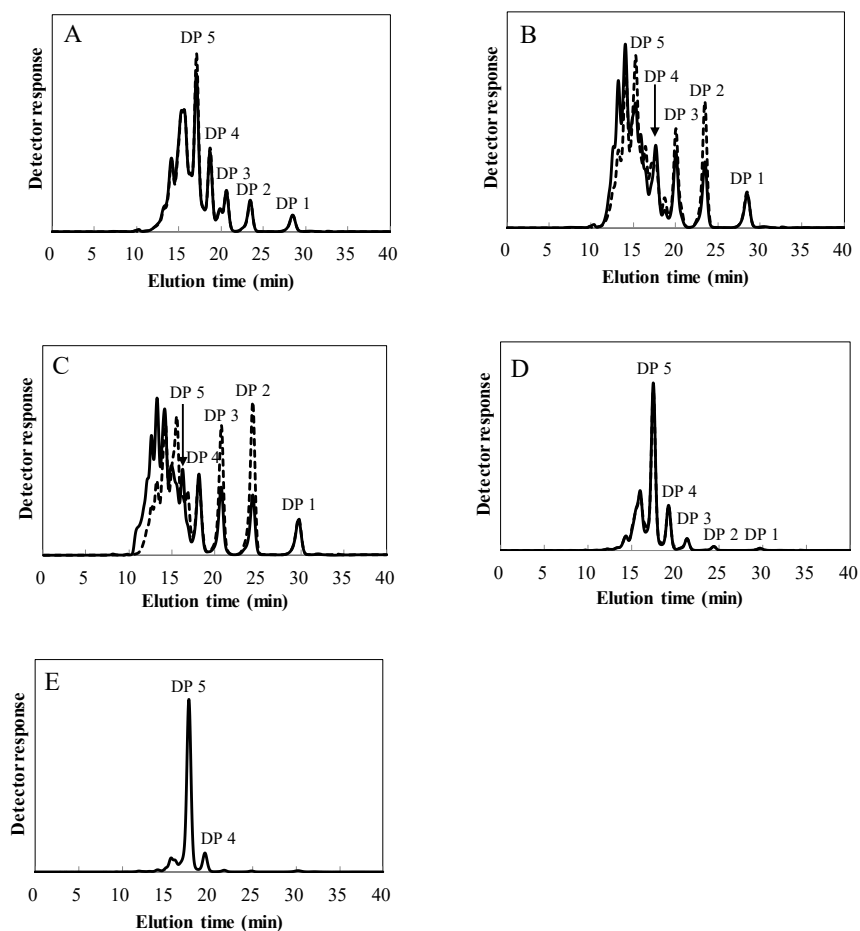


Fig. 4-4. AoryAgdS、AsojAgdLとその変異体のマルトペンタオースを基質とした転移生成物とそのデキストラナーゼ加水分解物のHPLCクロマトグラム

(A) AoryAgdS (B) AoryAgdS_H450R (C) AsojAgdL (D) AsojAgdL_R450H (E) pPTRII。実線は転移生成物、破線は転移生成物のデキストラナーゼによる加水分解物。

4-3-4. デキストラン加水分解活性

デキストランに対する作用性が α -グルコシダーゼによって異なるかを評価するため、デキストランを基質とした加水分解活性を評価した。その結果、AoryAgdS_H450R および AsojAgdL はデキストランを加水分解したが、AoryAgdS および AsojAgdL_R450H はデキストラン分解活性が検出されなかった (Table 4-3)。

4-4. 考察

各 α -グルコシダーゼの変異体の特性を分析し、野生型 α -グルコシダーゼと比較したところ、AoryAgdS と AsojAgdL の転移特性とデキストラナーゼ加水分解活性が、450 番目のアミノ酸に変異を導入することによって変化することが分かった。AoryAgdS_H450R の転移特性は、元の AoryAgdS から特性が変化し、連続 α -1,6-グルコシド結合を生成する AsojAgdL と類似した酵素になった。一方 AsojAgdL_R450H は、多くの α -1,3-、 α -1,4-転移生成物を生成し、 α -1,6-転移生成物が少ないという、第 2 章で評価した AsojAgdL とは異なる転移特性を示した。またデキストランに対する作用性も 450 番目のアミノ酸の種類に応じて変化した。本研究だけで結論を出すにはデータが不十分であるが、450 番目のアミノ酸に変異を導入すると、AoryAgdS と AsojAgdL の転移特性を含めた酵素の性質が入れ替わることが示唆された。以上より、450 番目のアミノ酸が α -グルコシダーゼの活性にとって重要であることが分かった。*A. oryzae* の他の菌株に関し、CAoGD データベース (<https://nrifb21.nrif.go.jp/CAoGD/>) で配列を確認すると、10 株のうち 3 株 (RIB915、RIB333、RIB949) は、AsojAgdL のように 450 番目がアルギニン、他の 7 株 (RIB0IS01、RIB128、RIB302、RIB331、RIB537、RIB632、RIB642) は、AoryAgdS のように 450 番目がヒスチジンであった。したがって、450 番目のアミノ酸はアルギニン、ヒスチジンの 2 種類のタイプが広く存在すると考えられ、それぞれ異なる転移特性を持つことが推測された。

点変異を導入することによって酵素の特性を変更する試みはすでに行われており [54, 55]、糖転移特性が変化した例も報告されている [56]。しかし、1 つのアミノ酸の違いにより、ほぼ同じ配列を持つ 2 つの野生型酵素の転移特性が大きく異なるのは驚くべきことである。今回明らかになった *A. oryzae* と *A. sojae* 由来の α -グルコシダーゼの転移特性の違いを新たな糖質素材や高付加価値の発酵食品の開発に活かすことや、点変異導入によって酵素の性質を改変し、新たな酵素の開発につなげることが期待される。本研究において、各 α -グルコシダーゼおよびその変異体の活性は粗酵素を用い、特定の反応時間において実施している。将来的には精製酵素を取得し、より詳細な転移特性の確認を実施することが望まれる。また、今回検討した 450 番目のアミノ酸に関し、AsojAgdL の立体構造の予測モデルを構築し、位置を確認すると (Fig. 4-5)、活性中心の近く、基質ポケットの入口付近に位置することが示唆された。450 番目のアミノ酸が基質の認識や結合に影響し、転移特性を決定している可能性が考えられた。将来的には酵素の立体構造を解析し、転移特性が変わるメカニズムを解明することも望まれる。

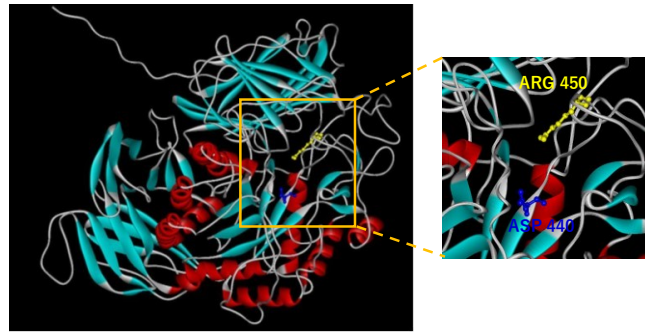


Fig. 4-5. AsojAgdLの立体構造の予測モデル

450番目のアミノ酸残基（アルギニン）を黄色、440番目の活性中心のアミノ酸残基（アスパラギン酸）を青で示した。

第 5 章 総括

本研究は、古くから発酵食品の製造に利用され、また産業用の酵素製剤の製造においても多く利用される重要な微生物である *Aspergillus* 属から転移特性に特徴を持つ新たな α -グルコシダーゼを探索することを目的に実施した。そして、これまでは短い α -1,6-グルコシド結合を生成する *A. niger* AgdA 以外の α -グルコシダーゼの知見が少なかった中で、複数種の *Aspergillus* 属由来の GH31 の α -グルコシダーゼが特徴的な転移特性を持つことを見出した。第 2 章では、*A. sojae* に由来する AsojAgdL が連続した α -1,6-グルコシド結合を含む糖質を生産する転移特性を持つこと、第 3 章では、*A. niger* に由来する *A. niger* AgdB が α -1,2 \cdot 1,3-グルコシド結合と少量の α -1,1- β -グルコシド結合を含む糖質を生産する転移特性を持つことを示した。第 4 章では、AsojAgdL とアミノ酸配列の同一性が 98% と極めて高い *A. oryzae* 由来の AoryAgdS が、 α -1,6 転移よりも α -1,3 \cdot α -1,4 転移生成物の方が多く生成するという、AsojAgdL と全く異なる転移特性を持つこと、またその転移特性の違いがアミノ酸配列上の 1 アミノ酸の違いに起因することも明らかにした。

Yuan *et al* は、*A. niger* の GH31 酵素に関して系統樹を作成し、これらの酵素が α -グルコシダーゼ、 α -グルコシダーゼ II、 α -キシロシダーゼ、および未知の酵素のグループに分類されることを示した [4]。我々も *A. niger*、*A. oryzae*、*A. nidulans*、*A. sojae* の GH31 酵素に関して系統樹を作成した結果、同様のグループに分類された (Fig. 5-1)。そして、 α -グルコシダーゼのグループには多くの酵素遺伝子が含まれるが、系統的な距離と本研究による複数の α -グルコシダーゼの解析結果とを考慮すると、 α -グルコシダーゼのグループはさらに subgroup A、B、C の 3 つのサブグループに分類されると考えられた。Subgroup A は、第 3 章で解析した *A. niger* 由来の α -1,2-および α -1,3-グルコシド結合を持つ糖質を生成する α -グルコシダーゼ (*A. niger* AgdB) が含まれ [47, 48, 57]、subgroup C は、*A. niger* (*A. niger* AgdA) と *A. oryzae* 由来の α -1,6-グルコシド結合を持つ糖質を生成する α -グルコシダーゼが含まれた [20, 23]。また subgroup B には、第 2 章および第 4 章で解析した *A. sojae* と *A. oryzae* に由来する α -グルコシダーゼ (AsojAgdL、AoryAgdS) が含まれたが、第 4 章での解析結果より転移特性は 450 番目のアミノ酸に依存して連続 α -1,6 転移か α -1,3 \cdot α -1,4 転移かの 2 種類の転移特性に分かれると考えられた。このように、*Aspergillus* 属由来の GH31 の α -グルコシダーゼが酵素の転移特性の面で多様であることが本研究によって明らかにされた。*A. oryzae*、*A. sojae*、および *A. nidulans* は、subgroup A、B、C 全てのグループの酵素を持つが、*A. niger* は subgroup B に属する酵素がない、といった菌種による α -グルコシダーゼの種類の違いも存在し、*Aspergillus* 属の各菌種が分化していく過程で、 α -グルコシダーゼの遺伝子が複数に分かれ、それぞれが異なる転移特性を持つようになったことが示唆された。

今回検討した α -グルコシダーゼはいずれも異なる種類の糖質を生成するた

め、これらの α -グルコシダーゼを活用することで、新たな糖質素材の開発が期待される。また1アミノ酸の違いで全く異なる糖質が生産されるということで、酵素遺伝子に変異を導入することによっても可能性がさらに広がると考えられる。また発酵食品の製造においても *A. sojae*、*A. niger*、*A. oryzae* は広く利用されており、本研究で明らかにされた α -グルコシダーゼの多様性が発酵食品の特徴の違いにつながり、新たな価値の付加につながる可能性がある。

今後はこれらの酵素の立体構造解析を通じて転移反応のメカニズム解析を進める。また、得られた糖質や転移反応の特徴を、食品などに活用する方法について検討していく必要がある。

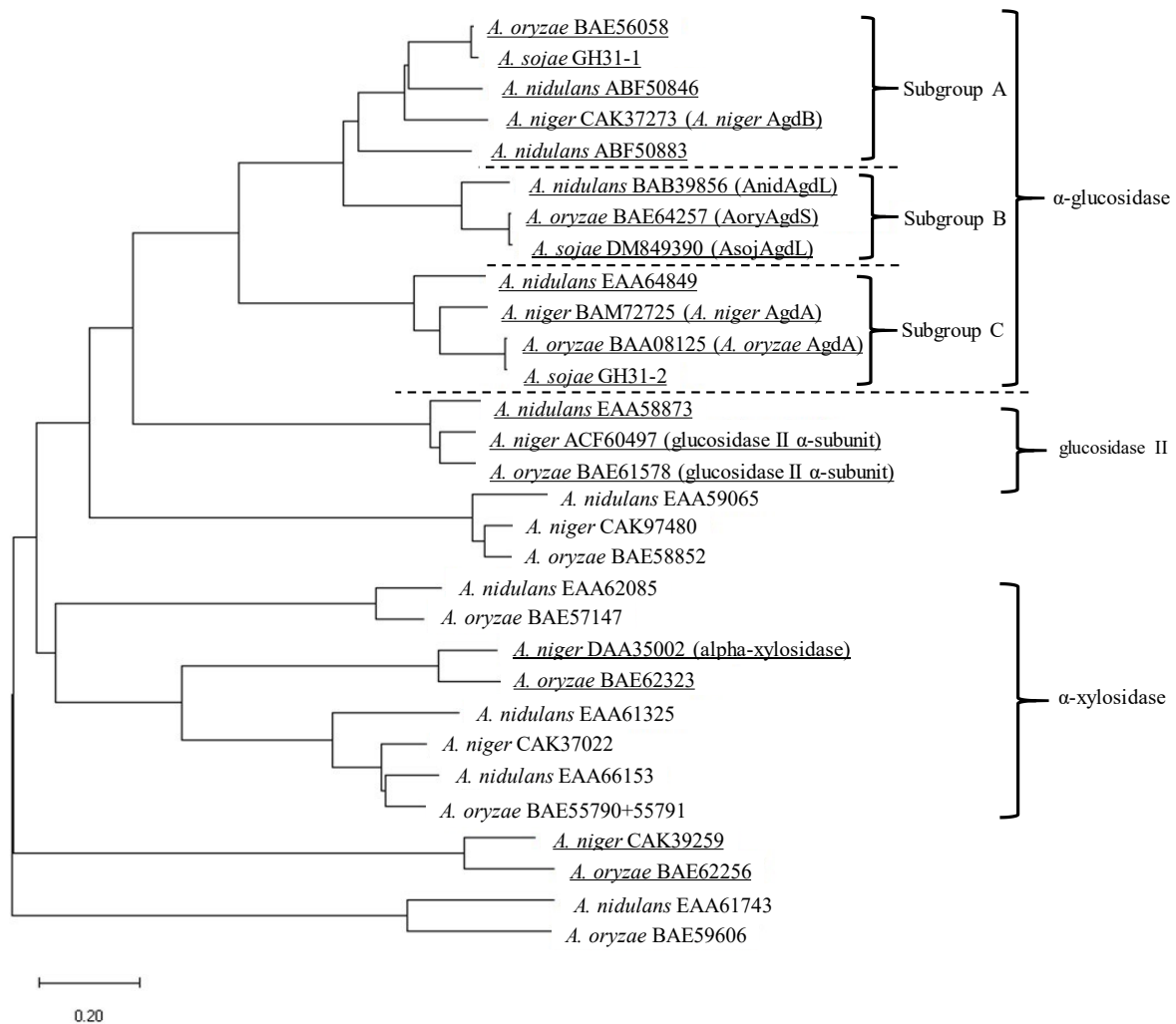


Fig. 5-1. *A. oryzae*、*A. niger*、*A. nidulans*、*A. sojae*のGH31タンパク質の系統樹

アミノ酸配列をCLUSTAL Wプログラム[58]を用いてアライメントし、近隣結合法[59]によって系統関係を計算し、MEGA X (バージョン10.0.5、<https://www.megasoftware.net/>)を用いて系統樹を作成した。各酵素の菌種名およびGenBank accession number (ない場合は整理番号)を記載した。カッコ内は本論文での慣用名またはキャラクタライズされた酵素の名称を記載した。SignalP-5.0

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)によって予測した推定シグナルペプチドを有するタンパク質に下線を引いた。

参考文献

1. 岡田茂孝、北畑寿美雄（監）、中野博文、橋本博之、栗木隆（編）（1999）「工業用糖質酵素ハンドブック」 講談社サイエンティフィック.
2. Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula E., Coutinho, P.M., and Henrissat, B. (2014) The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic. Acids. Res.*, 42, 490-495.
3. 奥山正幸（2015）糖質加水分解酵素ファミリー内の機能の保存性と多様性. *化学と生物*, 53, 120-126.
4. Yuan, X.L., van der Kaaij, R.M., van den Hondel, C.A., Punt, P.J., van der Maarel, M.J., Dijkhuizen, L., and Ram, A.F. (2008) *Aspergillus niger* genome-wide analysis reveals a large number of novel alpha-glucan acting enzymes with unexpected expression profiles. *Mol. Genet. Genomics.*, 279, 545-561.
5. 千葉誠哉（1989）糖転移反応による小糖類の合成. *日本醸造協会誌*, 84, 136-143.
6. 千葉誠哉, 下村得治（1978） α -グルコシダーゼの多様性. *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, 25, 105-112.
7. 田上貴祥（2014）GH31 α -グルコシダーゼの基質特異性と構造の多様性. *化学と生物*, 52, 205-207.
8. Kobayashi, I., Tokuda, M., Hashimoto, H., Konda, T., Nakano, H., and Kitahata, S. (2003) Purification and characterization of a new type of α -glucosidase from *Paecilomyces lilacinus* that has transglucosylation activity to produce α -1,3- and α -1,2-linked oligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 29-35.
9. Konishi, Y., and Shindo, K. (1997) Production of nigerose, nigerosylglucose, and nigerosylmaltose by *Acremonium* sp. S4G13. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 439-442.
10. Song, K.M., Okuyama, M., Nishimura, M., Tagami, T., Mori, H., and Kimura, A. (2013) Aromatic residue on $\beta \rightarrow \alpha$ loop 1 in the catalytic domain is important to the transglycosylation specificity of glycoside hydrolase family 31 α -glucosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 1759-1765.
11. Takahashi, M., Shimomura, T., and Chiba, S. (1969) Biochemical studies on buckwheat α -glucosidase part III. *Agr. Biol. Chem.*, 33, 1399-1410.
12. Chaen, H., Nishimoto, T., Nakada, T., Fukuda, S., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y. (2001) Enzymatic synthesis of kojioligosaccharides using kojibiose phosphorylase. *J. Biosci. Bioeng.*, 92, 177-182.
13. Imai, S., Takeuchi, K., Shibata, K., Yoshikawa, S., Kitahata, S., Okada, S., Araya, S., and Nisizawa, T. (1984) Screening of sugars inhibitory

- against sucrose-dependent synthesis and adherence of insoluble glucan and acid production by *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.*, 63, 1293-1297.
14. Mizubuchi, H., Yajima, T., Aoi, N., Tomita, T., and Yoshikai, Y. (2005) Isomalto-oligosaccharides polarize Th1-like responses in intestinal and systemic immunity in mice. *J. Nutr.*, 135, 2857-2861.
 15. Murosaki, S., Muroyama, K., Yamamoto, Y., Kusaka, H., Liu, T., and Yoshikai, Y. (1999) Immunopotentiating activity of nigerooligosaccharides for the T helper 1-like immune response in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 373-378.
 16. Kohmoto, T., Fukui, F., Takaku, H., Machida, Y., Arai, M., and Mitsuoka, T. (1988) Effect of isomalto-oligosaccharides on human fecal flora. *Bifidobact. Microflora*, 7, 61-69.
 17. Nakakuki, T. (2005) Present status and future prospects of functional oligosaccharide development in Japan. *J. Appl. Glycosci.*, 52, 267-271.
 18. 中西泰介 (2006) イソマルトオリゴ糖の物性改善機能と生理機能について. *食品工業*, 49, 47-56.
 19. 山本健, 海野剛裕, 菅原正義, 合田敏尚 (1999) ニゲロースおよびニゲロシルマルトオリゴ糖含有シラップの特性. *J. Appl. Glycosci.*, 46, 475-482.
 20. Kimura, A., Takata, M., Sakai, O., Matsui, H., Takai, N., Takayanagi, T., Nishimura, I., Uozumi, T., and Chiba, S. (1992) Complete amino acid sequence of crystalline alpha-glucosidase from *Aspergillus niger*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56, 1368-1370.
 21. Shimba, N., hinagawa, M., Hoshino, W., Yamaguchi, H., Yamada, N., and Suzuki, E. (2009) Monitoring the hydrolysis and transglycosylation activity of alpha-glucosidase from *Aspergillus niger* by nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 23, 23-28.
 22. Kato, N., Suyama, S., Shirokane, S., Kato, M., Kobayashi, T., and Tsukagoshi, N. (2002) Novel alpha-glucosidase from *Aspergillus nidulans* with strong transglycosylation activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1250-1256.
 23. Minetoki, T., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., and Tamura, G. (1995) Nucleotide sequence and expression of alpha-glucosidase-encoding gene (agdA) from *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 1516-1521.
 24. Wu, K.Y., Huang, S.H., Ding, S., Zhang, Y.K., Chen, G.G., and Liang, Z.Q. (2010) Expression, purification and characterization of recombinant α -glucosidase in *Pichia pastoris*. *Folia Microbiol.*, 55,

582-587.

25. Kato, N., Murakoshi, Y., Kato, M., Kobayashi, T., and Tsukagoshi, N. (2002) Isomaltose formed by α -glucosidase triggers amylase induction in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.*, 42, 43-50.
26. Hondo, S., and Mochizuki, T. (1979) Free Sugars in Miso. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Tech.*, 26, 469-474.
27. Nishino, R., Ozawa, Y., Yasuda, A., and Sakasai, T. (1981) Oligosaccharides in soy sauce. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 28, 125-131.
28. Watanabe, T., Sato, E., Sasaki, K., Fugane, M., Kikuchi, J., Sato, T., Uryu, S., and Konno, H. (2012) Increasing the effect of isomaltose amounts in kome-miso by applying a high α -glucosidase *koji* strain. *J. Brew. Soc. Japan*, 107, 191-196.
29. Nunokawa, Y. (1981) Oligosaccharides in sake. *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, 28, 109-117.
30. Sato, A., Oshima, K., Noguchi, H., Ogawa, M., Takahashi, T., Oguma, T., Koyama, Y., Itoh, T., Hattori, M., and Hanya, Y. (2011) Draft genome sequencing and comparative analysis of *Aspergillus sojae* NBRC 4239. *DNA Res.*, 18, 165-176.
31. Nakanishi, T., Nomura, S., and Takeda, Y. (2006) An improved method for the quantitative analysis of commercial isomaltooligosaccharide products using the calibration curve of standard reagents. *J. Appl. Glycosci.*, 53, 215-222.
32. Yamamoto, T., Unno, T., Watanabe, Y., Yamamoto, M., Okuyama, M., Mori, H., Chiba, S., and Kimura, A. (2004) Purification and characterization of *Acremonium implicatum* α -glucosidase having regioselectivity for α -1,3-glucosidic linkage. *Biochim. Biophys. Acta*, 1700, 189-198.
33. Kitamoto, N., Matsui, J., Kawai, Y., Kato, A., Yoshino, S., Ohmiya, K., and Tsukagoshi, N. (1998) Utilization of the TEF1-a gene (*TEF1*) promoter for expression of polygalacturonase genes, *pgaA* and *pgaB*, in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 85-92.
34. Gomi, K., Iimura, Y., and Hara, S. (1987) Integrative transformation of *Aspergillus oryzae* with a plasmid containing the *Aspergillus nidulans* argB gene. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2549-2555.
35. Liu, S. (2016) *Bioprocess Engineering*, 2nd Ed., Elsevier B.V., Netherlands, pp. 314-328.
36. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
37. Davis, B.J. (1984) Disc Electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 404-427.
38. Ciucanu, I., and Kerek, F. (1984) A simple and rapid method for the

- permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, 131, 209-217.
39. Kita, A., Matsui, H., Somoto, A., Kimura, A., Takata, M., and Chiba, S. (1991) Substrate specificity and subsite affinities of crystalline α -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2327-2335.
40. Bourne, E. J., Hutson, D. H., and Weigel, H. (1962) Studies on dextrans and dextranses. *Biochem. J.*, 85, 158-163.
41. Hattori, A., Ishibashi, K., and Minato, S. (1981) The purification and characterization of the dextransase of *Chaetomium gracile*. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2409-2416.
42. Khalikova, E., Susui, P., and Korpela, T. (2005) Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 69, 306-325.
43. Pazur, J. H., Cepure, A., Okada, S., and Forsberg, L. S. (1977) Comparison of the action of glucoamylase and glucosyltransferase on D-glucose, maltose, and maltooligosaccharides. *Carbohydr. Res.*, 58, 193-202.
44. Kaneko, T., Kohmoto, T., Kikuchi, H., Shiota, M., Iino, H., and Mitsuoka, T. (1994) Effects of isomaltooligosaccharides with different degrees of polymerization on human fecal bifidobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 2288-2290.
45. Nakamura, T., Maeda, Y., Tanoue, N., Makita, T., Kato, M., and Kobayashi, T. (2006) Expression profile of amylolytic genes in *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2363-2370.
46. McCleary, B. V., and Gibson, T. S. (1989) Purification, properties, and industrial significance of transglucosidase from *Aspergillus niger*. *Carbohydr. Res.*, 185, 147-162.
47. Ma, M., Okuyama, M., Tagami, T., Kikuchi, A., Klahan, P., and Kimura, A. (2019) Novel α -1,3/ α -1,4-glucosidase from *Aspergillus niger* exhibits unique transglucosylation to generate high levels of nigerose and kojibiose. *J. Agric. Food Chem.*, 67, 3380-3388.
48. 昭和産業株式会社, 安武望, 野村圭, 寺田敦, 中西泰介: 転移酵素, 糖質の製造方法, 配糖体の製造方法, 転移酵素の製造方法, 特許第 4830031 号, 2011-9-22.
49. Roslund, M. U., Tähtinen, P., Niemitz, M., and Sjöholm, R. (2008) Complete assignments of the ^1H and ^{13}C chemical shifts and $J_{\text{H,H}}$ coupling constants in NMR spectra of d-glucopyranose and all d-glucopyranosyl-d-glucopyranosides. *Carbohydr. Res.*, 343, 101-112 (2008).
50. Stanek, J., Kocourek, J., Cerny, M., and Pacak, J. (1963) *The*

- Monosaccharides*, Academic Press, New York and London, pp. 60-74.
51. Saburi, W., Okuyama, M., Kumagai, Y., Kimura, A., and Mori, H. (2015) Biochemical properties and substrate recognition mechanism of GH31 α -glucosidase from *Bacillus* sp. AHU 2001 with broad substrate specificity. *Biochimie.*, 108, 140-148.
 52. Kawano, A., Matsumoto, Y., Nikaido, N., Tominaga, A., Tonozuka, T., Totani, K., and Yasutake, N. (2019) A novel α -glucosidase of the glycoside hydrolase family 31 from *Aspergillus sojae*., *J. Appl. Glycosci.*, 66, 73-81.
 53. Nagayoshi, E., Ozeki, K., Hata, M., Minetoki, T., and Takii, Y. (2015) Transglycosylation activity of *Aspergillus oryzae*-derived α -glucosidase. *J. Biol. Macromol.*, 15, 13-17.
 54. Fujii, T., Tochino, T., Hirano, K., Tamura, K., and Tonozuka, T. (2018) Rapid evaluation of 1-kestose producing beta-fructofuranosidases from *Aspergillus* species and enhancement of 1-kestose production using a PgsA surface-display system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 82, 1599-1605.
 55. Hamura, K., Saburi, W., Matsui, H., and Mori, H. (2013) Modulation of acceptor specificity of *Ruminococcus albus* cellobiose phosphorylase through site-directed mutagenesis *Carbohydr. Res.*, 379, 21-25.
 56. Ma, M., Okuyama, M., Sato, M., Tagami, T., Klahan, P., Kumagai, Y., Mori, H., and Kimura, A. (2017) Effects of mutation of Asn694 in *Aspergillus niger* α -glucosidase on hydrolysis and transglucosylation *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101, 6399-6408.
 57. Kawano, A., Fukui, K., Matsumoto, Y., Terada, A., Tominaga, A., Nikaido, N., Tonozuka, T., Totani, K., and Yasutake, N. (2020) Analysis of transglucosylation products of *Aspergillus niger* α -glucosidase that catalyzes the formation of α -1,2- and α -1,3-linked oligosaccharides, *J. Appl. Glycosci.*, 67, 41-49.
 58. Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids. Res.*, 22, 4673-4680.
 59. Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406-425.

謝辞

本研究を進めるにあたり、研究全般に渡って多大なるご支援、ご指導、ご助言をいただきました昭和産業株式会社 基盤技術研究所の方々に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、多くのご指導を賜りました、東京農工大学 殿塚隆史先生に厚く御礼申し上げます。

NMR分析、MALDI-TOF MS分析を行っていただいた一関工業高等専門学校 戸谷一英先生、二階堂望氏、微生物に関する分子生物学的な実験手法、考察に関するご指導、ご助言をいただきました農研機構食品研究部門 楠本憲一先生、多田功生氏、西本完先生、新潟大学 北岡本光先生に心より御礼申し上げます。