

学 位 論 文 要 旨

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

Kawano Atsushi

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 \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* と遺伝子配列の相同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 \cdot 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 \cdot 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。