

| | |
|--------------|---|
| Title | 糸状菌グルコアミラーゼの構造と性質 |
| Author(s) | 安部, 淳一 |
| Citation | 大阪大学, 1988, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/91 |
| rights | |
| Note | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

糸状菌グルコアミラーゼの構造と性質

1 9 8 7

安 部 淳 一

目次

| | |
|--|----|
| 序論 | 1 |
| 第1編 <u>Aspergillus niger</u> と <u>Rhizopus delemar</u> のグルコアミラーゼについて | 5 |
| 第1章 <u>Aspergillus niger</u> と <u>Rhizopus delemar</u> のグルコアミラーゼの精製と作用 | 5 |
| 第1節 緒言 | 5 |
| 第2節 実験材料と方法 | 6 |
| 第3節 結果と考察 | 7 |
| 1 <u>Aspergillus niger</u> のグルコアミラーゼの精製 | 7 |
| 2 <u>Rhizopus delemar</u> のグルコアミラーゼの精製 | 9 |
| 3 精製グルコアミラーゼの純度 | 13 |
| 4 グルコアミラーゼの作用 | 19 |
| 5 粗酵素による澱粉の完全分解の原因 | 22 |
| 6 リン酸化アミロースに対する作用 | 24 |
| 7 ジャガイモ澱粉のグルコアミラーゼ限界デキストリンの構造 | 26 |
| 第4節 要約 | 30 |
| 第2章 <u>Rhizopus delemar</u> グルコアミラーゼの多型の構造と機能 | 31 |
| 第1節 緒言 | 31 |
| 第2節 実験材料と方法 | 31 |

| | | |
|-----|---|----|
| 第3節 | 結果と考察 | 33 |
| 1 | グルコアミラーゼG I、G II、G IIIの構造 | 33 |
| 2 | G I、G II、G IIIの動力学的性質 | 35 |
| 3 | グルコアミラーゼG IIIの限定分解 | 45 |
| 4 | G'の性質と作用 | 48 |
| 5 | フラグメント画分の性質 | 53 |
| 第4節 | 要約 | 55 |
| 第2編 | アミラーゼによる生澱粉の分解 | 56 |
| 第1章 | 生澱粉分解酵素生産菌の検索とその酵素の性質 | 56 |
| 第1節 | 緒言 | 56 |
| 第2節 | 実験材料と方法 | 56 |
| 第3節 | 結果と考察 | 58 |
| 1 | 菌の分離 | 58 |
| 2 | 分解菌の粗酵素標品の性質 | 58 |
| 3 | 粗酵素標品の生澱粉分解活性 | 61 |
| 4 | K-27株による酵素生産 | 63 |
| 5 | 粗酵素の成分 | 65 |
| 6 | 粗酵素の生澱粉分解作用 | 66 |
| 第4節 | 要約 | 72 |
| 第2章 | <u>Aspergillus</u> sp. K-27のグルコアミラーゼと α -アミラーゼの精製と作用 | 73 |
| 第1節 | 緒言 | 73 |
| 第2節 | 実験材料と方法 | 73 |

| | |
|---|-----|
| 第3節 結果と考察 | 74 |
| 1 グルコアミラーゼと α -アミラーゼの分離と精製 | 74 |
| 2 α -アミラーゼの性質と作用 | 81 |
| 3 グルコアミラーゼの性質と作用 | 85 |
| 4 α -アミラーゼとグルコアミラーゼの生澱粉に対する作用 | 90 |
| 5 K-27 α -アミラーゼと <u>Rhizopus</u> グルコアミラーゼの相乗作用 | 95 |
| 6 K-27グルコアミラーゼと他起源の α -アミラーゼの相乗作用 | 95 |
| 第4節 要約 | 98 |
| 総括 | 99 |
| 謝辞 | 103 |
| 参考文献 | 104 |
| 本論文に関係のある報告 | 108 |

序論

アミラーゼの研究は今から約 200年以前に始まっている。Irvineが麦芽の作用で澱粉が糖に変化することを観察したのは 1785年である。1815年に Kirchhoffは澱粉の糖化をアルコール醗酵に必要な過程であることを認めた。言うまでもなく、麦芽の作用はアミラーゼによるもので、現在も麦芽はビールとウイスキーの醸造や水飴の生産に用いられている。わが国では古くから酒造に麴菌のアミラーゼを利用していることは周知のことである。1833年に Payenと Persozは麦芽から澱粉糖化の有効成分の抽出と純化を試み、アルコール沈澱などで強力な作用を有する標品を得ている。これは酵素純化のバイオニヤ的研究である。唾液の糖化作用が発見されたのは 1831年、高峯が麴菌からタカジアスターゼを調製したのは 1892年である¹。このように、アミラーゼは古くから研究され、産業に貢献してきた酵素であり、現在でも酵素工業で最も多量に生産されている。

アミラーゼは澱粉を加水分解して、デキストリンやオリゴ糖、グルコースを生成する酵素の総称である。 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、イソアミラーゼなどがその主なものであるが、近年種々の新しい作用を示すアミラーゼが発見されている。同じ種類のアミラーゼであっても、起源が異なると性質や作用が異なり、特徴がある。特に、エンド様式で α -(1-4)-グルコシド結合を分解する α -アミラーゼの作用には、このような種特異性が顕著である。

アミラーゼは古くから研究されているにもかかわらず、個々のアミラーゼの作用の特異性は必ずしも明らかにされていない。その原因については、2つの理由をあげることができる。まず、アミラーゼは1種類だけで存在することが稀で、2種類以上共存する場合が多く、性質が類似し、これらを完全に分離す

ることが困難であることがあげられる。特に、エキソ型酵素とエンド型酵素が混在する場合は、それぞれ充分注意して精製し、高純度に精製しない限りその作用を明確に解析することはできない。 α -アミラーゼは生物界に広く分布するので、他のアミラーゼを研究対象とするときは特に注意を要する。たとえば、大豆 β -アミラーゼが精製したジャガイモアミロースを完全分解する原因として、酵素標品中に微量存在すると仮定された作用不明のZ酵素は、今日では α -アミラーゼであると理解されている。もう1つの理由は、基質である澱粉の分子構造が必ずしも明確ではないことである。たとえば、上述のZ酵素は澱粉中の実態不明の異常結合を分解すると考えられた。澱粉のような高分子の分岐多糖の分子構造の詳細な解析は、現在の知識と技術を持ってしても困難であり、基本的な構造について、今なお研究が続けられている。分子量の大きいデキストリンについても同様である。従って、基質の構造も生成物のデキストリンの構造も不明では、作用を解析できない。逆説的に言えば、これらの2つの困難を克服すれば、個々のアミラーゼの作用を明確に特徴づけることが可能である。本研究では、アミラーゼのうちグルコアミラーゼを取り上げ、酵素の純化と基質および生成物の構造の解析を基本戦略として、その作用を詳細に研究した。また、この研究を通じて、澱粉の分子構造の未知の部分の一端を解明する手がかりが得られることを期待した。

グルコアミラーゼ (1,4- α -D-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3)は、澱粉やグリコーゲンなどの α -(1-4)-グルコシド結合を非還元末端からエキソ様式で加水分解して β -グルコースを遊離し、またこれら α -グルカンの非還元末端の α -(1-6)-グルコシド結合も、反応速度は遅いが分解することができる酵素である。北原と久留島²が *Aspergillus awamori*の麴抽出液中に本酵素(γ -アミラーゼと称した)を発見して以来、多くの属および種の微生物が生産することが報告されている。たとえば、糸状菌では *Aspergillus*³, *Cladosporium*⁴, *Mucor*⁵,

Penicillium⁶, Rhizopus⁷, Trichoderma⁸など、酵母では Endomycopsis⁹, Filobasidium¹⁰, Lipomyces¹¹, Saccharomyces¹², Saccharomycopsis¹³, Schwanniomyces¹⁴などである。細菌ではグルコアミラーゼ生産菌は見いだされていなかったが、Clostridiumに属する菌が生産することが最近報告された¹⁵。これらの内、グルコアミラーゼの工業的生産に利用されているのは Aspergillus属 (特に A. niger)と Rhizopus属である。Kerrら²による Aspergillus nigerの酵素、Philipsと Caldwell⁷による Rhizopus delemarの酵素の研究以来、多くの菌のグルコアミラーゼが研究されてきたにもかかわらず、いまだに本酵素の作用の詳細について十分に理解されていない。たとえば、A. nigerの酵素は澱粉を70~75%程度しか分解できないが、R. delemarの酵素は完全分解できると報告されている¹⁶。しかし、その差異の原因は明らかでなく、澱粉の内部構造 (特定の分岐構造あるいは異常結合) に対する両酵素の作用の差、あるいはいずれかの酵素に他の酵素 (例えば、 α -アミラーゼやトランスグルコシダーゼ) が混在するのではないかと、推測されているにすぎない。本研究は、このように曖昧なグルコアミラーゼの作用を酵素の純度、基質と生成物の構造、酵素の構造の3点から詳細に検討することを目的とした。

まず、第1編第1章では、A. nigerと R. delemarのグルコアミラーゼを可能な限り精製し、 α -アミラーゼやホスファターゼなどの活性を検出できない酵素標品を調製した。これらの作用の差異を検討し、両者の作用に本質的な相違のないことを明らかにした。さらに、グルコアミラーゼの作用により、澱粉から高分子の限界デキストリンが生成することを知り、その成因の解明を試みた結果、いずれの酵素も基質中のリン酸エステルにより作用が妨げられること、リン酸エステル近傍における両者の酵素の作用特異性は同じであることを見いだした。

第1編第2章では、第1章で精製した Rhizopus delemarの3成分の酵素につ

いて、多型の成因、それら多型間の構造と作用の差異について研究した。その結果、固有の分子が粗酵素標品中のプロテアーゼやグリコシダーゼにより限定分解を受け、他の2成分を生じることを明らかにした。また、固有の分子上には、活性部位とは別のところに、高分子基質に高い親和性を示す部位「澱粉結合部位」が存在することを示唆し、限定分解の際この部位が取り除かれるか、大きく改変される結果、生じた2成分の酵素は、高分子基質に対する親和性のみが減少することを示した。また、限定分解による多型の生成、澱粉結合部位の存在をキモトリプシンを用いた実験により明らかにした。

澱粉粒は部分的に微少な結晶状の構造が発達しており、反応性に乏しいため、酵素反応の場合は水と共に加熱して糊化する必要がある。近年、省エネルギー化やプロセスを簡素化するために、糊化工程を省略する無蒸煮糖化法が注目されている。第2編第1章では、この無蒸煮糖化システムの経済性を高めるために、生澱粉を強力に糖化する酵素の生産菌の分離を試みた。生澱粉は加熱により不可逆的に変化するため、菌の分離や培養の炭素源として用いるには不適當である。そこで、本研究では目的にかなう炭素源として、穀類澱粉を細菌 α -アミラーゼで消化して得られる、水不溶性でアミラーゼ耐性の高いアミロース-脂質複合体を用いた。得られた菌のうち最も有望な菌K-27株を選び、酵素の生産性と生澱粉に対する作用を検討した。その結果、この菌の酵素の生産性は培地に α -メチルグルコシドを加えることにより倍增すること、粗酵素標品は穀類澱粉だけでなく根茎澱粉に対しても強力な分解力を持つことを見いだした。

第2編第2章では、前章で見いだした *Aspergillus* sp. K-27 の強力な生澱粉分解機構を詳細に検討するために、まず本菌の生産するグルコアミラーゼと α -アミラーゼを十分に精製した。これらの生澱粉に対する作用を調べた結果、グルコアミラーゼが生澱粉分解の主役であり、 α -アミラーゼはこの分解作用を相乗的に促進することを見いだした。

第1編 Aspergillus nigerとRhizopus delemarのグルコアミラーゼについて

第1章 Aspergillus nigerとRhizopus delemarのグルコアミラーゼの精製と作 用

第1節 緒言

Tsujisakaら¹⁶は、グルコアミラーゼには Aspergillus型と Rhizopus型が存在し、前者は澱粉を70~75%程度分解して作用が停止するが、後者は容易に完全分解することを報告し、これが広く受け入れられている。しかしながら、この理由は明らかにされていない。

OhtaとUeda¹⁷は、A. awamori var. kawachiの糖化型アミラーゼ（グルコアミラーゼ）がジャガイモ澱粉を完全分解しないのは、澱粉中に含まれるリン酸エステルが障害となる可能性を示した。澱粉やグリコーゲン中には、多かれ少なかれグルコース残基の6位と3位に結合しているリン酸エステルの存在が明らかにされている^{18, 19, 20}。一方、山本ら²¹は Rhizopus niveus のグルコアミラーゼは澱粉から含リングルコース（グルコース6-リン酸と推定された）を遊離し、結果として完全分解すると報じている。しかし、MarshallとWhelan²²は Rhizopus niveusの市販の精製グルコアミラーゼ（その後、この標品中には α -アミラーゼが微量混在していたことが示された²³）では、澱粉やグリコーゲンを完全に分解できないことを報告した。このように、グルコアミラーゼの作用については矛盾した結果が報告され、明確ではなかった。

著者は、本章においてA. niger、R. delemarより α -アミラーゼやホスファターゼが全く検出できないグルコアミラーゼ標品を調製し、この両者の澱粉に対する作用の差異を詳細に比較検討した。

第2節 実験材料と方法

酵素製剤

Aspergillus niger (XL-128)と *Rhizopus delemar* (酒造用)の粗グルコアミラーゼ製剤は、それぞれ長瀬産業、新日本化学工業より恵与された。

グルコアミラーゼの活性測定法

反応はすべて 40°Cで行い、1分間に 1 μ moleのグルコースまたはグルコースに相当する還元力を生じる酵素量を 1 Uとした。

[A法] 0.5%可溶性澱粉を含む 50 mM酢酸緩衝液 1 mlに酵素液 20 μ lを加え、15分間反応させた。反応を 1 mlの Somogyi試薬²⁴を加えて止め、生じた還元糖を、グルコースを標準として Nelsonの方法²⁵で測定した。

[B法] 2%可溶性澱粉水溶液 200 μ lに 0.05%牛血清アルブミンを含む 50 mM酢酸緩衝液 (pH 4.5)で希釈した酵素液 50 μ lを加えた。15分後、反応を 30秒間煮沸して止め、生じたグルコースをグルコースオキシダーゼ法²⁶で測定した。

ホスファターゼの活性測定法

20 mM グルコース6-リン酸を含む 0.1 M酢酸緩衝液 (pH 4.5) 450 μ lに酵素液 50 μ lを加えて 40°Cで保温した。反応を 100 μ lのドデシル硫酸ナトリウム (SDS)と 3.1%モリブデン酸アンモニウムを含む 0.32 M硫酸 4 mlを加えて止め、生じた無機リン酸を Tashimaの方法²⁷で測定した。1分間に 1 μ moleの無機リン酸を生じる酵素量を 1 Uとした。

蛋白質の測定

Lowryらの方法²⁸で牛血清アルブミンを標準として測定した。カラム流出液については 280 nmにおける吸光度であらわした。

その他の測定法

全糖量はアンスロン硫酸法²⁹で求めた。溶液中の無機リン酸は、Itayaら³⁰

の方法で測定した。また全リン酸量は、試料を 60% 過塩素酸で湿式灰化後、無機リン酸として測定した。グルコース 6-リン酸は、Hizukuriら¹⁵の方法でグルコース 6-リン酸脱水素酵素法で定量した。澱粉中のグルコース残基の 6 位に結合したリン酸量は、試料を 0.8 M 塩酸で 100°C、4 時間分解した後、グルコース 6-リン酸として測定し、加水分解による損失を補正した¹⁵。

非還元末端基はスミス分解によりグリセロールを生成するので、これをグリセロールキナーゼ、グリセロール 3-リン酸脱水素酵素を用いて定量した³¹。リン酸化した非還元末端基は、スミス分解後アルカリホスファターゼを作用させ、生じたグリセロール量として定量した³²。非還元末端基あたりの平均重合度 (CL) は、全糖量と非還元末端基量より算出した。

第 3 節 結果と考察

1 *Aspergillus niger* のグルコアミラーゼの精製

市販のグルコアミラーゼ製剤 (XL-128) を粗酵素標品とした。本品中には、グルコアミラーゼ以外に α -アミラーゼ、ホスファターゼやセルラーゼなどの活性が認められた。まず、本品 6 ml にエタノール 6 ml を加えて分画した。セルラーゼ活性の 85% は上清に、グルコアミラーゼ活性はすべて沈澱に回収された。沈澱を 6 ml の水に溶かし、これに 0.5% になるように塩化第 2 水銀を加えて 40°C、2 時間保温し α -アミラーゼを失活させた。生じた沈澱を遠心分離で除き、上清を 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に対し一夜透析した。次に透析内液を緩衝液で平衡化した DEAE-セルロースカラムにかけた。カラムを緩衝液で洗浄後、塩化ナトリウムの直線濃度勾配 (0~0.5 M) にて溶出した (Fig. 1-1)。各画分について活性と蛋白質量を測定した結果、グルコアミラーゼ活性と蛋白質 (A_{280}) の溶出曲線は一致し、ホスファターゼ活性はこれより少し遅れて溶出した。Pazur と Ando³³、Linebackら³⁴、Smileyら³⁵によると、*A. niger* のグルコ

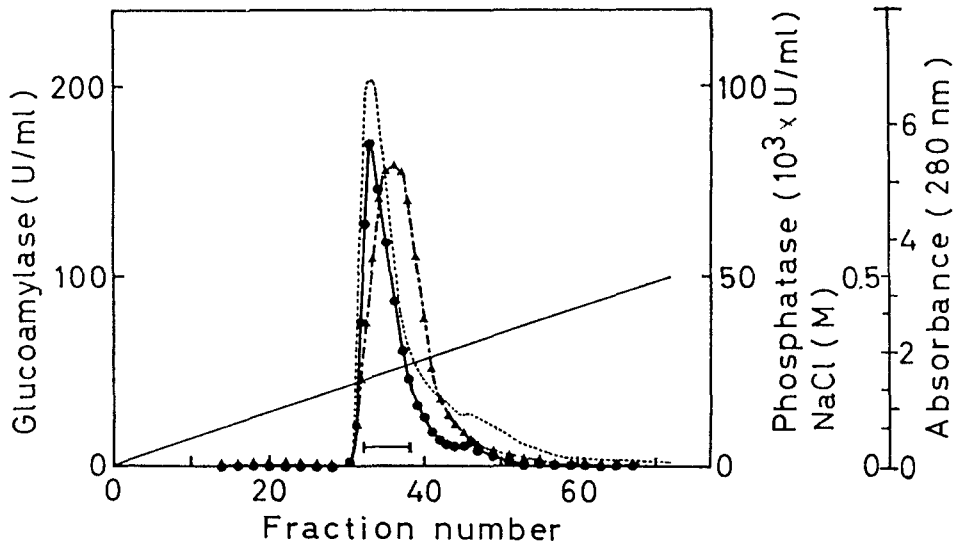


Fig. 1-1. Chromatography of glucoamylase from A. niger on DEAE-cellulose. The column size was 2.6 x 20 cm and fractions of 10 ml were collected at 33 ml/h.

Key:-----, protein (A_{280}); —●—, glucoamylase; ---▲---, phosphatase; , NaCl concentration.

アミラーゼは DEAE-セルロースカラムイオン交換クロマトグラフィーで分離できるグルコアミラーゼ I および II の 2 つの成分が存在するが、本研究で用いた製剤中には、Fig. 1-1 に示したように 1 成分のみであった。このことは、pH 5.2 と 7.0 における DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより確かめられた。水銀処理後にわずかに残った α -アミラーゼ活性は、後述するヒドロキシプロピル化トウモロコシ澱粉による高感度検出法を用いて測定し、Fr. 46~51 に存在することを見いだした。

グルコアミラーゼの主画分 (Fr. 32~38) を集め、アミコン 限外ろ過膜 PM-10 で濃縮し、20 mM グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.1) に対して透析した。内液を同じ緩衝液で平衡化したホスホセルロースカラムにかけ、カラムを洗浄後、塩化ナトリウム濃度を段階的に変えた緩衝液で溶出した。グルコアミラーゼ活性は塩化ナトリウム濃度 0.05 M で、ホスファターゼ活性は 0.5 M で溶出され、両者を完全に分離することができた (Fig. 1-2)。Fr. 22~29 を集めて濃縮し、精製グルコアミラーゼ標品とした。ホスファターゼ画分にはごく微量の α -アミラーゼ活性が検出されたが、グルコアミラーゼ標品にはまったく検出されなかった。以上の結果を Table 1-1 に要約した。

2 Rhizopus delemar のグルコアミラーゼの精製

市販の酒造用グルコアミラーゼ製剤 6 g を水 100 ml に溶かし、不溶物を遠心分離して除いた。上清の pH を 1 M 塩酸で 2.5 に調整し、4°C に 48 時間放置して α -アミラーゼを失活させた。この操作により大部分の α -アミラーゼは除けたが、グルコアミラーゼも半減した。溶液の pH を 5.8 に調整後、沈澱物を遠心分離して除いた。上清を氷水中で冷やししながら、予め -20°C に冷却したイソプロピルアルコールを 60% になるように徐々に加えた。生じた沈澱を集め、20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.8) に溶かした。この溶液を、同じ緩衝液で平衡化した DEAE

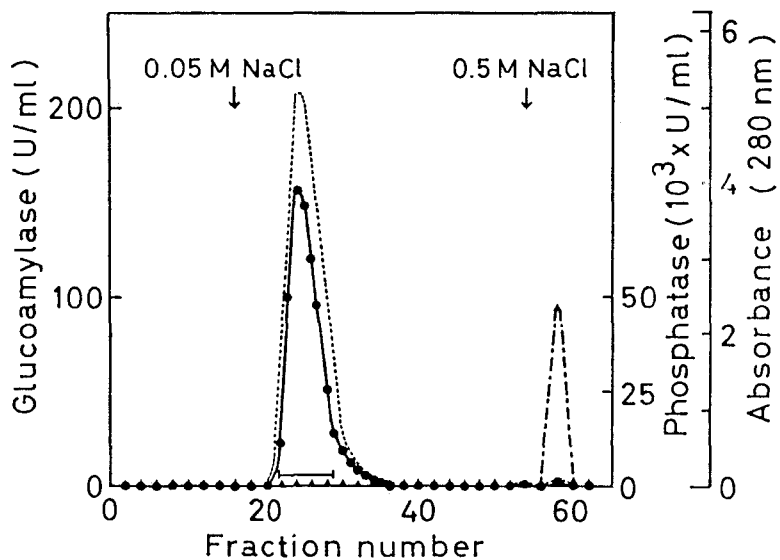


Fig. 1-2. Chromatography of glucoamylase from A. niger on phosphocellulose. The column size was 1.6 x 35 cm and 5 ml fractions were collected at 33 ml/h.

Key: -----, protein; —●—, glucoamylase; ---▲---, phosphatase.

TABLE 1-1.

Summary of glucoamylase purification from Aspergillus niger

| Step | Protein (mg) | Glucoamylase ^a (U) | Phosphatase (U) | Glucoamylase spec. act. (U/mg) |
|------------------------------------|-----------------|----------------------------------|--------------------|--------------------------------------|
| Crude enzyme | 896 | 19600 | nd ^b | 21.9 |
| Ethanol precipitation | 877 | 20200 | nd | 23.0 |
| HgCl ₂ treatment | 463 | 11400 | 254 | 24.6 |
| DEAE-cellulose chromatography | 324 | 10400 | 193 | 32.1 |
| Phosphocellulose chromatography | 152 | 5830 | 0 | 38.4 |

^a Determined by method A.^b Not determined.

セファデックス A-50カラム (3.1 x 21.5 cm)にかけた。このカラムはグルコアミラーゼを吸着せず、 α -アミラーゼ、ホスファターゼと色素の大部分を吸着し、これらを除去するのに非常に有効であった。再度このカラムを通した通過液を集め、前述の方法でイソプロピルアルコールを加えて生じた沈澱を集め、20 mlの 20 mM酢酸緩衝液 (pH 4.5)に溶解した。この溶液を同緩衝液で平衡化したCM-セファロースCL-6Bカラム (3.1 x 30.5 cm)にかけ、吸着した蛋白質を塩化ナトリウムの直線濃度勾配 (0~0.3 M)で溶出した。グルコアミラーゼは塩化ナトリウム濃度が 0.1~0.15 Mの画分に溶出し、大部分のホスファターゼ活性は 0.25 M以上の画分に存在した。前者をアミコン限外ろ過膜 PM-10を使って濃縮した。

この標品をディスク電気泳動で調べたところ、3本の蛋白質バンド (Fig. 1-3) が存在し、いずれにもグルコアミラーゼ活性が認められた。電気泳動距離の長いものから順に G I、G II、G III と名付けた。なお、この画分中には微量の α -アミラーゼとホスファターゼが認められ、これらは CM-セファロース CL-6B による再クロマトグラフによっても除去することができなかった。そこで、グルコアミラーゼのインヒビターとして知られている³⁶ α -サイクロデキストリンを Sundberg と Porath の方法³⁷ でセファロース 6B に結合させた担体を調製し、これを用いたアフィニティークロマトグラフィーで分離を試みた。

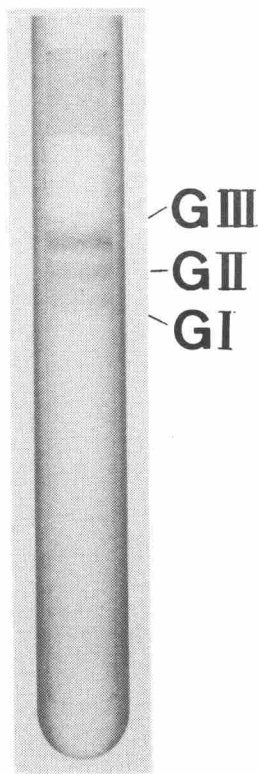


Fig. 1-3. Disc gel electrophoresis of *R. delemar* glucoamylase after 1st CM-Sepharose CL-6B column chromatography. The protein was electrophoresed at pH 4.3 on a 5% polyacrylamide gel.

CM-セファロース CL-6Bカラムからの画分を、20 mM酢酸緩衝液で平衡化したアフィニティカラムにかけ、カラムを同緩衝液で蛋白質の溶出がみられなくなるまで洗浄後、吸着した蛋白質を 0.5% α -サイクロデキストリンを含む緩衝液で溶出した (Fig. 1-4)。グルコアミラーゼ活性は、緩衝液による洗液と α -サイクロデキストリンによる溶出画分に分かれて溶出した。ディスク電気泳動により、後者は単一成分 (G III) であるが前者は 2 成分 (G I、G II) の混合物であることが認められた。後者 (Fr. 189~194) を集めコロジオンバック上で濃縮すると同時に充分透析した。これを精製グルコアミラーゼ G III 標品とした。

前者は各画分をディスク電気泳動で調べたところ、前半は G II 成分が多く後半には G I 成分が多いことが認められたため、Fr. 52~82 と Fr. 83~160 にわけて集めた。まずこの Fr. 83~160 を濃縮し CM-セファロース CL-6Bカラムにかけた。吸着した蛋白質を 20 mMの酢酸・酢酸ナトリウムによる pH 5.2~7.4 の勾配で溶出した (Fig. 1-5)。pH 5.78~5.85 付近に大きなピークが得られ、他にいくつかの小ピークが得られたが、これらのすべてにグルコアミラーゼ活性が認められた。ディスク電気泳動で調べたところ、G II 成分は Fr. 70~76 (pH 5.63~5.70, Fig. 1-5の —— 部) に、少量の G I 成分は Fr. 90~96 (pH 6.30~6.57, Fig. 1-5の ----- 部) に現れ、それぞれを集めた。 α -サイクロデキストリンカラムからのもう一方の画分 Fr. 52~82 も同様に処理したところ、同様の溶出曲線を与えたが、G I に相当するピークが大であった。それぞれを集め、精製 G I 画分、G II 画分とした。以上の操作を Table 1-2 に要約した。

3 精製グルコアミラーゼの純度

A. nigerグルコアミラーゼおよび R. delemarグルコアミラーゼ G I、G II、G III は、ディスク電気泳動的にそれぞれ均一であった (Fig. 1-6)。また、過剰

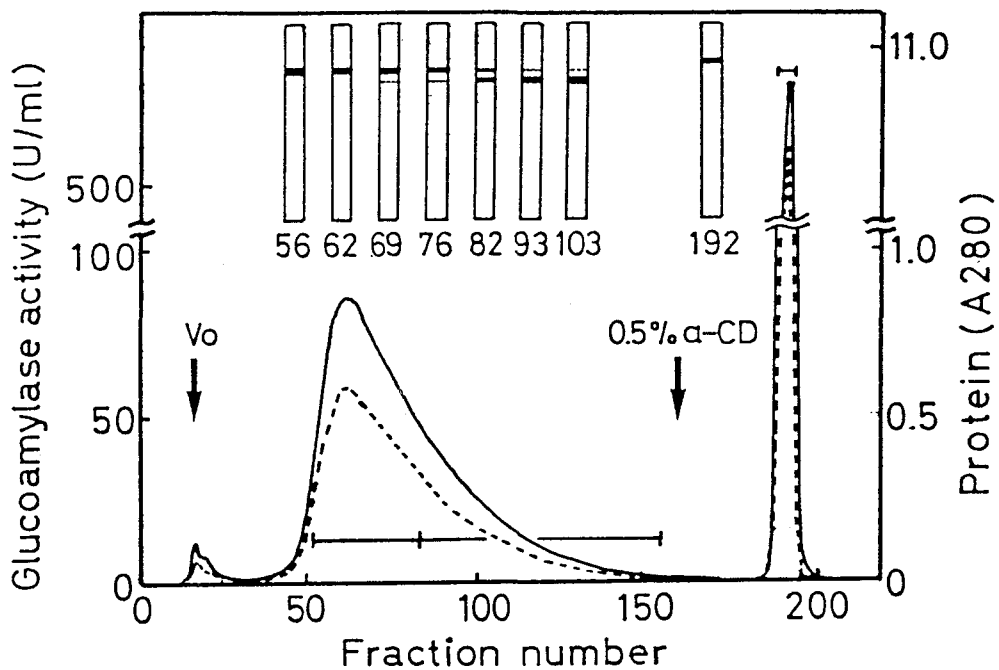


Fig. 1-4. Chromatography of glucoamylase from R. delemar on α -cyclodextrin-Sepharose 6B. The column size was 1.8 x 40 cm, and 5.6 ml fractions were collected at a flow rate of 33.5 ml/h. The patterns on disc-gel electrophoresis of some fractions are also shown. Fractions indicated by ————— were pooled separately.

Key: ————— , protein (A_{280}); ----- , activity ; V_o , void volume.

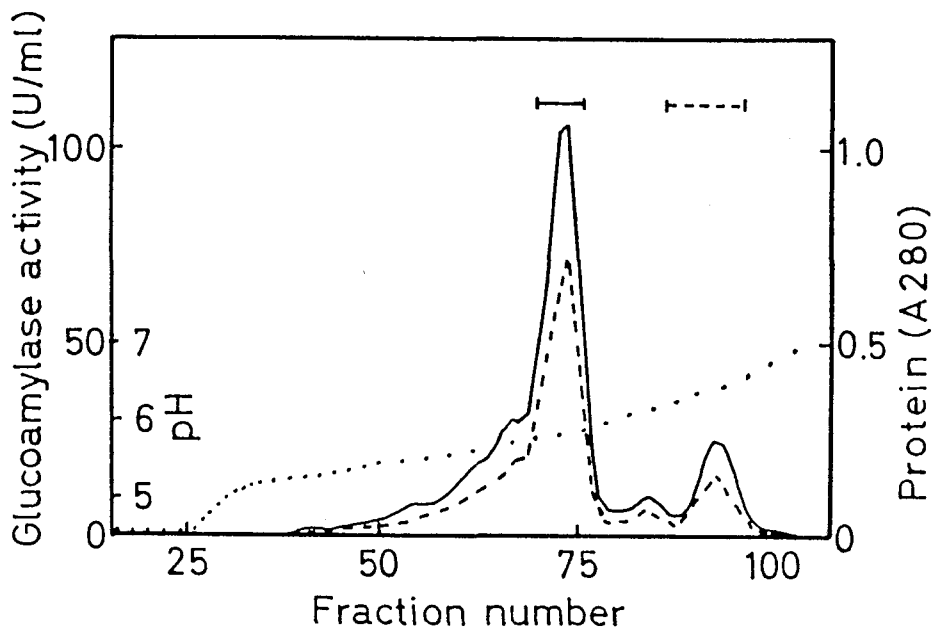


Fig. 1-5. Chromatography of glucoamylase from *R. delemar* on CM-Sepharose CL-6B. The column size was 0.9 x 27 cm, and 5 ml fractions were collected at a flow rate of 19 ml/h. Fractions indicated by ---|--- were pooled.

Key: --- , protein (A_{280}); --- , activity; , pH.

Table 1-2.

Summary of glucoamylase purification from Rhizopus delemar

| Step | Protein (mg) | Glucoamylase ^a | | | Phosphatase α -amylase | | |
|---|-----------------|---------------------------|--------------------------|--------------|-------------------------------|----------------------|---|
| | | Total activity (U) | Specific activity (U/mg) | Recovery (%) | Total activity (mU) | Total activity (%) | |
| Crude enzyme | 3610 | 131000 | 36 | 100 | 43600 ^b | 100 | |
| Acid treatment | 3520 | 82900 | 24 | 63 | 13700 ^b | 5.6x10 ⁻² | |
| Isopropanol precipitation | 2330 | 72600 | 31 | 55 | 12500 ^b | 3.1x10 ⁻² | |
| DEAE-Sephadex A-50 column (1) | 1860 | 74100 | 40 | 57 | 337 ^b | 2.7x10 ⁻³ | |
| DEAE-Sephadex A-50 column (2) | 1730 | 68600 | 40 | 52 | 51.5 | 9.1x10 ⁻⁵ | |
| CM-Sephadex CL-6B column | 1010 | 56700 | 56 | 43 | 2.7 | 2.0x10 ⁻⁶ | |
| α -CD ^c -Sephadex 6B column | I ^d | 116 | 8120 | 70 | 6 | 0 | 0 |
| | II ^e | 243 | 16700 | 69 | 13 | 0 | 0 |
| | GIII | 474 | 24100 | 51 | 18 | 0 | 0 |
| CM-Sephadex CL-6B column | GI | 52 | 3650 | 70 | 3 | 0 | 0 |
| | GII | 100 | 6760 | 68 | 5 | 0 | 0 |

^a Determined by Method B.^b Determined after dialysis.^c α -cyclodextrin.^d Fractions 52-82.^e Fractions 83-160.

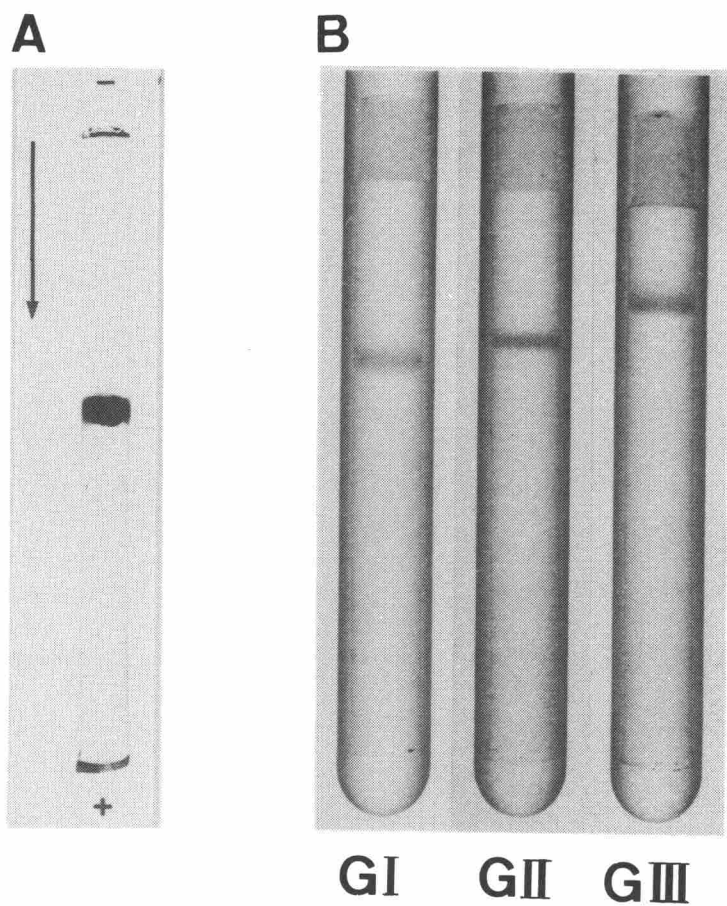


Fig. 1-6. Disc-gel electrophoresis of (A) *Aspergillus niger* and (B) *Rhizopus delemar* glucoamylases. The enzymes (10~16 μ g) were electrophoresed at (A) pH 9.5 on 5% gel and (B) at pH 4.3 on 5% gels. The proteins were stained with Coomassie brilliant blue R-250.

量の酵素をグルコース 6-リン酸に作用させても無機リン酸を遊離しないことより、グルコース 6-リン酸ホスファターゼ活性を含まないことが認められた。

α -アミラーゼの有無は以下の方法で検定した。部分的にヒドロキシプロピル化されたトウモロコシ澱粉 5 mgに、グルコアミラーゼ 25 Uを 50 mM酢酸緩衝液 (pH 4.5) 2 ml中で 40°Cで反応させた。一定時間ごとに反応混液を取り出し、その分解率を求めた。 α -アミラーゼを含む標品では、明確な分解限度を示さなかったが、 α -アミラーゼを含まないものは一定の分解率を示した。これは、ヒドロキシプロピル化された残基の部分で反応が停止し、グルコアミラーゼのみでは作用が分子の内部まで進行しないことによる。例えば、A. nigerグルコアミラーゼの精製における塩化第2水銀処理後の酵素標品では、30分で 53%、7時間で 66%分解した。また、DEAEセルロースカラムクロマトグラフ後の標品では、7時間で 36%、24時間では 39%の分解率を示したことより、これらの標品中には α -アミラーゼが混在することが認められた。一方、精製グルコアミラーゼ標品では 1時間で 35%の分解率に達し、24時間後も一定であった。さらに、この反応液に同量の酵素を追加してもまったく分解は進行しなかった。これに微量の Bacillus subtilis 液化型 α -アミラーゼ (グルコアミラーゼ 1 U に対し 5×10^{-6} U) を加えると直ちに分解率が上昇し、8時間に 10%分解率が上昇した。これらのことより、ヒドロキシプロピル化トウモロコシ澱粉に酵素標品を作用させ、その分解の様子を追うことにより α -アミラーゼの有無を検定でき、最終的に調製した A. niger、R. delemar のグルコアミラーゼには、いずれにも α -アミラーゼ活性が検出できないことが認められた。以後の α -アミラーゼ検定法として次の方法をとることにした。

5 mg のヒドロキシプロピル化トウモロコシ澱粉を精製グルコアミラーゼ 25 U を含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 1.9 ml に懸濁し、40°C で反応させる。分解率 35% に達した時 (1 時間後) 100 μ l の供試酵素液を加え、一定時間ごとに反

応液中のグルコース量を定量し、生成グルコース量の増加の初速度で α -アミラーゼの含量を評価した。この方法ではグルコアミラーゼ活性の 1×10^{-6} の α -アミラーゼを充分検出することが可能であった。

4 グルコアミラーゼの作用

A. nigerと R. delemar (G I、G II、G III) の精製グルコアミラーゼをジャガイモアミロペクチンに作用させると、従来の説¹⁶と異なり、すべて同じ分解率 (81%) で反応が停止した (Fig. 1-7)。さらに同量のグルコアミラーゼを添加しても反応はまったく進行せず、一定の分解限度を示した。R. delemar の各成分については、これら3成分の混合物を作用させても分解限度は変わらなかった。従って、ジャガイモアミロペクチンを完全に分解し得ないことは、供試酵素すべてに共通の性質である。一方、モチ米澱粉やウサギ肝臓グリコーゲンを基質とすると、すべての酵素が 96~97% の分解限度を示した。故に、この不完全分解は明らかに基質の構造に帰因する。

前述のように、澱粉やグリコーゲンにはグルコース残基の6位あるいは3位に結合したリン酸エステルが存在する。そこで、このリン酸エステルがグルコアミラーゼの作用を阻止することが予想されるので、リン酸エステル含量の異なる基質にグルコアミラーゼを作用させて、分解限度とリン酸含量の関係を調べた (Table 1-3)。その結果、リン酸含量の高い基質ほど低い分解率を示した。また、A. nigerとR. delemarのグルコアミラーゼ間に分解限度の差がないことが認められた。以上のことより、A. niger、R. delemarのいずれのグルコアミラーゼ作用も、基質中のリン酸エステルにより妨げられることが示唆された。馬鈴薯アミロースは、低リン酸含量にもかかわらず、グリコーゲンなどより低い分解率を与えた。アミロースは、重合度 4,850のわずかに側鎖を持つ分子であり³⁸、このリン酸含量からアミロース約5分子に1分子のリン酸エステルが

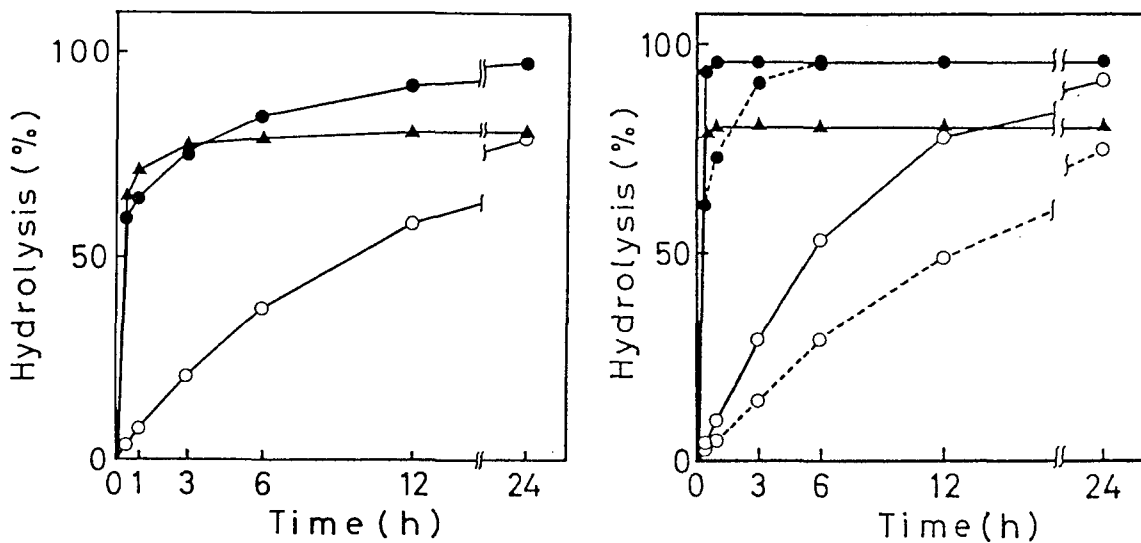


Fig. 1-7. Hydrolysis of rabbit liver glycogen, potato amylopectin, and pullulan by purified glucoamylases of (A) *A.niger* and (B) *R. delemar*. The reaction mixture contained 0.25% substrate, 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5), and 5 U of glucoamylase in a final volume of 2 ml and was incubated at 40°C.

Key: ● , glycogen; ▲ , amylopectin; ○ , pullulan; (B) solid line, GIII; broken line, both GI and GII.

Table 1-3

Extent of hydrolysis of starches and components with varied phosphorus contents with purified glucoamylase

| Substrate | Hydrolysis (%) | Organic phosphorus (ppm) |
|----------------------------------|----------------|--------------------------|
| Potato starch I | 83 | 915 |
| II | 86 | 642 |
| III | 88 | 359 |
| Waxy rice starch | 96 | 16 |
| Amylopectin from potato starch I | 81 | 1067 |
| Amylose from potato starch I | 89 | 8 |

存在すると計算される。ほぼ直鎖状の分子であるため、リン酸エステルによる酵素作用の停止は、多岐に分岐したグリコーゲンとは異なり、分解率に大きな影響を与える。リン酸エステルは、存在する分子のほぼ中間に位置すると考えれば、分解率は合理的に理解することができる。

上述のように分解率に関してはいずれの酵素も同じであったが、高分子基質に対する活性にはそれぞれ特徴が見いだされた。すなわち、Fig. 1-7に示したように、ウサギ肝臓グリコーゲンに対して *R. delemar* G III成分は 1時間以内に限度まで分解するが、*R. delemar* G I、G IIでは 6時間、*A. niger*の酵素では 24時間を要した。また、プルランに対してはいずれの酵素も 24時間では完全分解しなかったが、G III成分が最も速やかに分解し、G I、G II、*A. niger*の酵

素はほぼ同じであった。これら個々の酵素の作用特異性については、次章で述べる。

5 粗酵素による澱粉の完全分解の原因

いずれの粗酵素標品もジャガイモ澱粉をほぼ完全に分解するので、この原因について検討した。

リン酸含量 915 ppmのジャガイモ澱粉を *A. niger*の精製グルコアミラーゼと塩化第2水銀処理後の酵素標品のそれぞれ 5 Uで分解したときの様子を Fig. 1-8に示す。精製グルコアミラーゼの場合は、30分で 60%の分解率に達した後、分解速度は緩やかになり、反応 12時間で 83%の分解限度に達した。この間グルコース6-リン酸と無機リン酸の遊離は認められなかった。

一方、 α -アミラーゼやホスファターゼが混在している後者の酵素標品では、3時間で 98%以上分解されたが、この間に遊離した無機リン酸量は、澱粉中に存在するリン酸エステルのわずか 10%であった。この後わずかの分解率の増加(1-2%)と共に無機リン酸の遊離は急激に増大し、24時間後に 53%に達した。同じ澱粉に精製グルコアミラーゼ 5 Uと *Bacillus subtilis*液化型 α -アミラーゼ 0.03 Uを同時に作用させた場合、24時間後に分解率は 89%に達し、あたかも分解限度に達したかのように見えた。 α -アミラーゼ量を 0.3 Uとした時は、速やかに 98%まで分解された。これらの場合には、無機リン酸の遊離は認められなかった。

以上の実験結果より、グルコアミラーゼの澱粉に対する作用は前述のようにリン酸エステルにより妨げられるが、粗酵素標品中に混在する少量の α -アミラーゼがこのリン酸エステルをリン酸化オリゴ糖として取り除き、次にこのリン酸エステルがホスファターゼにより加水分解され、最終的に完全分解に至ることが示唆される。混在する α -アミラーゼが微量の場合は、おそらく澱粉中のリ

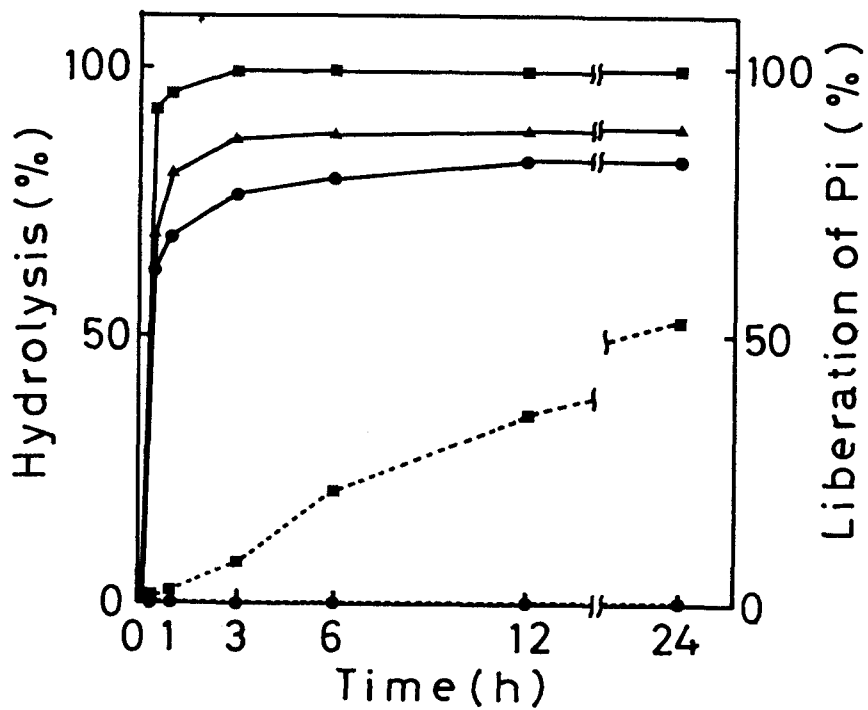


Fig. 1-8. Hydrolysis of potato starch with purified and adulterated glucoamylase from *A. niger*. The reaction mixture contained 0.25% substrate, 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5), and 5 U of glucoamylase in a final volume of 2 ml, and was incubated at 40°C.

Key: ———, liberation of glucose; - - - - -, liberation of inorganic phosphate; ■, enzyme of HgCl₂-treatment step; ●, purified enzyme; ▲, purified enzyme + 0.03 U of *B. subtilis* α-amylase.

ン酸エステル近傍に十分に作用しがたいために分解が限度に達しているように見え、あたかもグルコアミラーゼが純粋であるかのように誤解させる可能性があると考えられる。

6 リン酸化アミロースに対する作用

上に述べたように、グルコアミラーゼは澱粉を完全には分解できないことが明らかになった。この作用がリン酸化部位で停止することを証明するために、ジャガイモアミロペクチンから竹田ら³²の方法で直鎖のリン酸化アミロースを調製し、これのグルコアミラーゼ限界デキストリンの非還元末端基近傍の構造を調べた。

ジャガイモアミロペクチンをイソアミラーゼで枝切りし、リン酸基を有する単位鎖を集め、短鎖のリン酸化アミロースを得た。このものは直鎖であり、重合度は 37、1分子に 1分子のリン酸エステルを有した (Table 1-4)。リン酸エステルのうち、84%はグルコース残基の 6 位に、残りは 3 位¹⁹に結合していた。このリン酸化アミロース 1 mgあたり 1 Uの *A. niger*の精製グルコアミラーゼを作用させ、経時的に分解率を調べた (Fig. 1-9)。4時間反応後に分解率は50%に達し、以後 10時間後も変化しなかった。また、同量の酵素をさらに添加しても分解率は変わらないことを認めた。10時間後に煮沸して反応を止め、DEAEセファデックス A-50を用いて限界デキストリンを集めた。この限界デキストリンの構造は、平均重合度が 17、1分子に 1分子のリン酸エステルを有し、その 67%は非還元末端のグルコース残基の 6 位に存在した (Table 1-4)。これらの結果は、もとのリン酸化アミロース分子中の 6 位に結合したリン酸エステルの 80%が限界デキストリンの非還元末端基に存在することを示す。この限界デキストリンを再度グルコアミラーゼ処理してもこれらの数値は変わらなかった。

Table 1-4

Properties of phosphorylated amylose (PA)
and its glucoamylase-limit dextrin (g-LD)

| Properties | PA | g-LD |
|--|------|------|
| Degree of polymerization | 37 | 17 |
| Organic phosphate (Po) content (mole/mole) | 1.02 | 1.04 |
| Phosphate positioned at C-6/Po | 0.84 | 0.83 |
| Non-reducing, terminal residue phosphorylated at C-6 (mole/mole) | 0 | 0.67 |

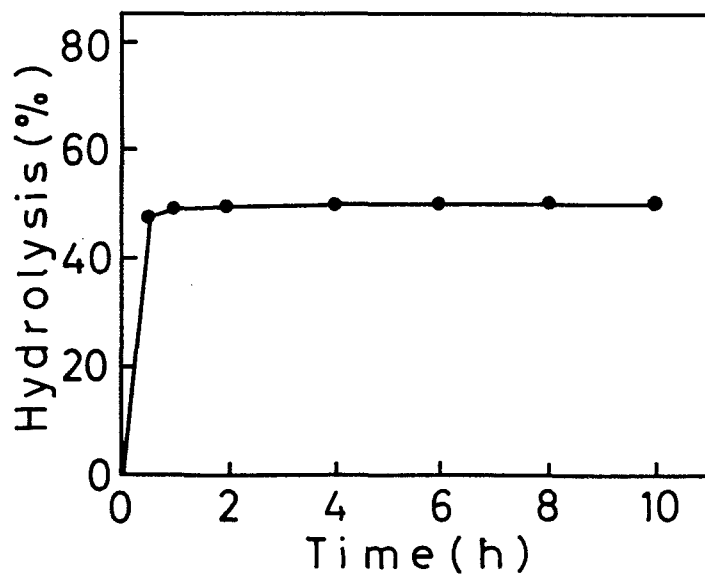


Fig. 1-9. Hydrolysis of phosphorylated amylose with purified glucoamylase from *A. niger*. Conditions, see Fig. 1-8.

以上の結果は、6位のリン酸エステルに対して *A. niger* のグルコアミラーゼは Fig. 1-10(A) に示す A の結合は加水分解できるが、A は分解できないことを示す。最近、竹田ら²⁹ は、3位のリン酸エステルに対して、*A. niger* のグルコアミラーゼがリン酸基の1残基手前の結合 B (Fig. 1-10(B)) まで分解し、反応が停止することを明らかにした。これが、限界デキストリン中のすべてのリン酸エステルが非還元末端に露出しない主な理由である。

7 ジャガイモ澱粉のグルコアミラーゼ限界デキストリンの構造

ジャガイモ澱粉のグルコアミラーゼ限界デキストリンの構造を明らかにするとともに、基質のリン酸化部位に対するグルコアミラーゼの作用について検討した。

ジャガイモ澱粉(リン含量 915 ppm) 2 g に *R. delemar* グルコアミラーゼ G III 20 U を 40°C、48 時間作用させた。反応を煮沸して止め、同量のエタノールを加えデキストリンを沈澱させた。このデキストリンに再度グルコアミラーゼを基

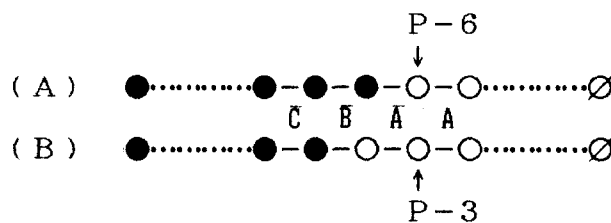


Fig. 1-10. Action of glucoamylase on phosphorylated substrates.

Key: ● , hydrolyzed glucosyl residue; $\frac{P-6}{\circ}$, 6-phosphorylglucosyl residue; $\frac{P-3}{\circ}$, 3-phosphorylglucosyl residue; Ø , reducing end.

質 1 mgあたり 1 Uの酵素量を用いて限界まで分解した。反応を煮沸して止め、48時間水に対して透析してグルコースを除いた後、エタノールで限界デキストリンを沈澱させた。反応液中には無機リン酸やグルコース 6-リン酸の遊離は認められず、澱粉中のリン酸エステルは限界デキストリン中にほぼ定量的に回収された。限界デキストリンのリン含量は 4440 ppm (リン 1分子あたりグルコース 43残基)、平均鎖長は 16、イソアミラーゼ分解により生成した単位鎖は平均 1.5個の分岐結合したグルコース基を有することが見いだされた。また、非還元末端グルコース残基の 21% (約 5 残基に 1つ) が 6 位にリン酸エステルを持ち、限界デキストリン中の 6 位のリンは、全リンの 82%であった。これらのことから、全リン酸の 56%、6 位に結合したリンについては 68%が限界デキストリンの非還元性末端基に存在していることがわかった。A. nigerの酵素を用いて調製した限界デキストリンも同じ構造であった。従って、R. delemarのグルコアミラーゼの 6 位のリン酸エステルに対する作用は、A. nigerの酵素と同じであると結論できる。R. delemarのグルコアミラーゼ G III を 3rd-ホスホリルマルトテトラオースに作用させたところ、1分子のグルコースを遊離した。従って、R. delemarのグルコアミラーゼの 3 位のリン酸エステルに対する作用は A. nigerのものと同じで、3 位のリン酸残基の 1 個手前の残基で反応が停止することが証明された。

以上述べた限界デキストリンの分析結果とグルコアミラーゼの作用より、推察される限界デキストリンのモデルを Fig. 1-11に示す。ここで、リン酸エステルを持たない A鎖は、グルコシル基にまで分解されると考えられる。その根拠は、サイクロデキストリンに直鎖および分岐オリゴ糖が α -(1-6)-結合した分岐サイクロデキストリンを酵素的に合成し、これにグルコアミラーゼを作用させたところ、いずれの酵素もグルコシルサイクロデキストリンを残したことである⁴⁰。

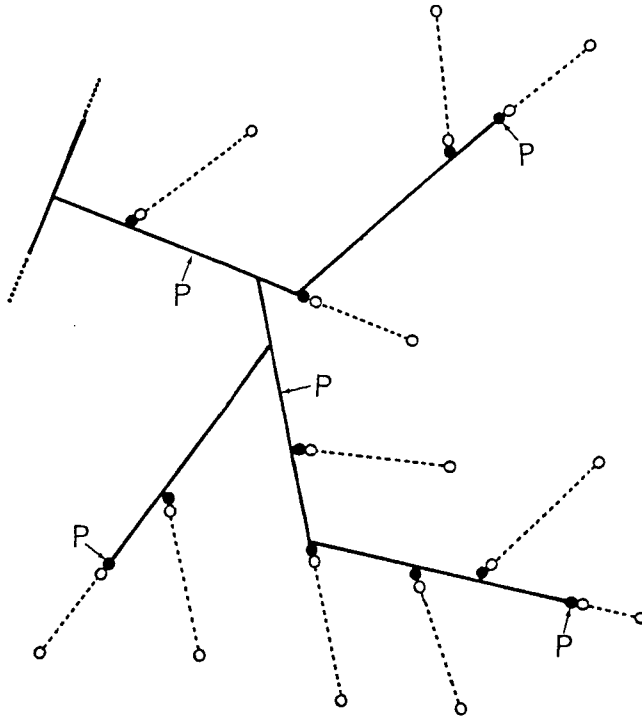


Fig. 1-11. A model for glucoamylase-limit dextrin of potato amylopectin.

Key: — , 40 glucosyl residues; ○--○, removed glucosyl residues; ● , glucosyl residue; P, phosphate.

澱粉中のリン酸エステルがもとの約 20%の限界デキストリンに濃縮されることは、リン酸エステルが澱粉分子の内部に多いか、もしくは特定の分子または澱粉粒に偏在していることを示す。Takedaと Hizukuri⁴¹は、ジャガイモアミロペクチン中のリン酸エステルが主に B鎖に結合していることを明らかにしている。この事実は前者の可能性を支持する。澱粉は α -(1-4)-結合と少量の α -(1-4,6)-結合したグルコースのみからなる巨大分子であり、従来の構造解析は α -(1-4,6)-結合を指標に行われてきた。グルコアミラーゼ限界デキストリンは分子内部の分岐構造を保持しており、構造解析にリン酸エステルを指標とすることができるため、今後の澱粉の分子構造の解析に興味ある材料であると考えられる。

R. delemarのグルコアミラーゼは澱粉を完全分解すると理解されていたが、 α -アミラーゼとホスファターゼをまったく含まない酵素標品では、上述のように A. nigerの酵素と同じく完全分解できないことが明らかになった。さらに基質中の 6 位と 3 位のリン酸基は、それぞれ A. nigerと R. delemarのグルコアミラーゼに対してまったく同じ障害効果を示すことを立証することができた。R. delemarのグルコアミラーゼから α -アミラーゼとホスファターゼを完全に除くことは非常に困難であり、アフィニティークロマトグラフィーにより初めて除去できた。従って、従来の研究における酵素標品（市販品も含めて）に、これらの酵素が混在していたことが誤解を招いた原因であると考えられる。

第4節 要約

市販の *Aspergillus niger*、*Rhizopus delemar* のグルコアミラーゼ製剤より、各種イオン交換クロマトグラフィーやアフィニティークロマトグラフィーを組み合わせて前者から1成分、後者から3成分の精製グルコアミラーゼを得た。

これらを各種澱粉に作用させたところ、従来の理解とは異なりいずれの酵素を用いても完全分解されず、同じ分解限度を示した。*A. niger* と *R. delemar* G III を作用させて生じたリン酸化アミロースとジャガイモ澱粉のグルコアミラーゼ限界デキストリンの構造、特に非還元末端付近の構造を調べた結果、いずれの酵素も6位のリン酸エステルを持ったグルコース基の手前まで分解できるがそれ以上は反応が進まないことを明らかにした。3位のリン酸エステルに対しては非還元末端側に1残基残して作用が停止した。このように、両者のリン酸エステル基近傍に対する作用は、分解限度に関してはまったく同じであった。粗酵素標品が澱粉をほぼ完全に分解できるのは、 α -アミラーゼがグルコアミラーゼ作用の障害となるリン酸エステルをリン酸化オリゴ糖として除き、さらにホスファターゼがこれらのオリゴ糖からリン酸エステルを分解し、最終的にグルコアミラーゼにより分解されるためであると理解される。

第2章 Rhizopus delemarグルコアミラーゼの多型の構造と機能

第1節 緒言

微生物の生産するグルコアミラーゼの多くは、多型で存在することが知られている。例えば、A. niger³³では2成分、A. oryzae⁴²やRhizopus sp.⁴³では3成分のグルコアミラーゼが存在する。これらの成分間では、分子量⁴³、動力学的定数³⁵、分岐結合分解活性や生澱粉吸着能⁴²などいくつかの点で異なることが報告されている。YoshinoとHayashida⁴⁴は A. awamori var. kawachiの酵素で、Takahashiら⁴³は Rhizopus sp.の酵素で、粗酵素標品中に含まれるプロテアーゼやグリコシダーゼにより一種のグルコアミラーゼが部分分解される結果、多型が生じることを報告している。

前章で述べたように、著者の使用した A. nigerのグルコアミラーゼ製剤中には1成分しか存在しなかったが、R. delemarの酵素は多型を示し、3成分が得られた。本章ではこれら3成分の性質を詳細に調べ、構造と機能との関係を明らかにすることを試みた。

第2節 実験材料と方法

酵素

前章で述べた方法で精製した A. nigerと R. delemar (G I、G II、G III)グルコアミラーゼを用いた。

グルコアミラーゼの活性測定法

前章のB法を用いた。

動力学的性質

動力学的定数 (Km、Vmax値)はB法に準じて求めた。ただし、高分子基質に対しては高感度の測定が必要で、以下に述べる方法を用いた。すなわち、8 mM酢

酸緩衝液 (pH 4.5) に溶かした各濃度の基質溶液 1 ml に、0.05% 牛血清アルブミンを含む酢酸緩衝液で希釈した酵素液 50 μ l を加え 15 分間反応後、1 分煮沸して反応を止め、遊離したグルコースを Park-Johnson 法⁴⁵ で定量した。

アミノ酸分析

試料を水に対し透析し、その一部を塩酸で 105°C、24、48、72 時間分解した。塩酸を減圧下で除去した後、アミノ酸自動分析計 SLC-5N (柳本) で分析した。セリン・スレオニン量は分解時間を 0 時間に外挿して求め、またバリン・イソロイシン量は 72 時間の値を採用した。他のアミノ酸量は各分解時間の値を平均した。加水分解により分解されるトリプトファンとシステインおよびシスチンはそれぞれ Edelhoch の方法⁴⁶ と Moore の方法⁴⁷ で定量した。

アミノ糖の定量

試料を塩酸で 100°C、8 時間加水分解し、アミノ酸自動分析計で定量した。

中性糖の定量

分解に先立ち、酵素標品中の持込みの糖を除くため以下の操作を行った。酵素液を氷冷し、これに 5% になるようにトリクロル酢酸を加え蛋白質を沈澱させた。遠心分離して上清を除き、沈澱を 5% トリクロル酢酸で洗浄した。この沈澱を少量の 2 M 水酸化ナトリウムに溶解し、再度トリクロル酢酸で沈澱させた。さらに 2 回 5% トリクロル酢酸で洗浄後、2 M 水酸化ナトリウムに溶かし 1 M 塩酸で中和した。この試料を 2 M トリフルオロ酢酸で 100°C、3 時間加水分解し、遊離した糖をそれぞれの糖のアルジトールアセテートとした⁴⁸ 後、ガスクロマトグラフ 663-30 (日立) を用い、以下の条件で分析した。

カラム : 3% ECNSS-M、3 x 2000 mm

キャリアーガス: 窒素 (40 ml/min)

カラム温度 : 180°C

検出器 : 水素炎イオン化検出器

その他の測定法

全糖量、グルコース量は、それぞれアンスロン硫酸法²⁹、グルコースオキシダーゼ法²⁶で測定した。外部平均鎖長(ECL)は、前章で述べた方法による平均鎖長(CL)と、Takedaと Hizukuriの方法⁴⁹で求めた β -アミラーゼ分解限度から次式により求めた。

$$ECL = CL \times (\beta\text{-アミラーゼ分解限度}) + 2$$

第3節 結果と考察

1 グルコアミラーゼG I、G II、G IIIの構造

純化したG I、G II、G IIIを SDSディスク電気泳動で調べたところ、各々1本のポリペプチド鎖よりなり、分子量はそれぞれ 61,000、70,000、78,000の値が得られた。これら3成分とも温度は 45°Cまで (pH 4.5、30分処理)、pHは 4.0~8.5 (40°C、30分処理)の間で安定であった。ディスク電気泳動後、ゲルを蛋白質と糖⁵⁰について染色を行ったところ、3成分とも糖蛋白質であった。

3成分の amino 酸と糖の分析結果を Table 1-5に示す。G IIとG IIIを比べると、アスパラギンとアスパラギン酸、セリン、グルタミンとグルタミン酸、グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、チロシン、リジン、トリプトファンの10成分以外の組成は同じであった。G IとG IIでは、スレオニン、セリン、プロリン、アラニンおよびマンノースに大きな差がみられる以外はよく似た数値を示している。また、システインとシスチン、メチオニン、ロイシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、アルギニン、グルコサミンについては3成分中の量はほぼ同じであった。これら3成分間での組成の類似性は、G I、G IIが分子量の最も大きいG IIIよりプロテアーゼやグリコシダーゼの限定分解により生じたことを示唆する。即ち、G IIはG IIIより分子量約 8,000のペプチド部分が除かれた生成物、G IはG IIまたはG IIIよりペプチド鎖と糖鎖が除かれた

Table 1-5

Amino acid and carbohydrate compositions of
Rhizopus delemar glucoamylases

| Amino acid | GI | GII | GIII |
|-------------|---|-----|------|
| | Residues per molecule (Nearest integer) | | |
| Asx | 59 | 62 | 75 |
| Thr | 53 | 62 | 62 |
| Ser | 54 | 62 | 74 |
| Glx | 26 | 26 | 30 |
| Pro | 23 | 27 | 28 |
| Gly | 43 | 45 | 49 |
| Ala | 49 | 54 | 59 |
| Cys | 3 | 3 | 3 |
| Val | 29 | 32 | 36 |
| Met | 3 | 4 | 3 |
| Ile | 22 | 23 | 30 |
| Leu | 42 | 42 | 40 |
| Tyr | 24 | 23 | 36 |
| Phe | 24 | 26 | 26 |
| Lys | 24 | 27 | 32 |
| His | 5 | 5 | 5 |
| Arg | 15 | 15 | 14 |
| Trp | 12 | 12 | 15 |
| Mannose | 30 | 63 | 64 |
| Glucosamine | 7 | 7 | 7 |

産物と考えられる。粗酵素標品を溶解直後ディスク電気泳動で調べると、Fig. 1-12(A)に示すようにG IIIが主成分であるが、この溶液を 40°C、12時間保温すると、Fig. 1-12(B)に示すようにG III成分の減少とともにG IとG IIが増加し、G IIIからG II、G Iへの変換が起こることが見いだされた。この事実は、G IIIからプロテアーゼやグリコシダーゼの作用によりG I、G IIが生成することを支持するとともに、粗酵素標品中にこれらの酵素が存在することを示唆する。

2 G I、G II、G IIIの動力学的性質

(a) 低分子基質に対する動力学的性質

前述の R. delemar グルコアミラーゼの3成分の性質の差異を明らかにするため、動力学的性質を検討した。重合度 2~7のオリゴ糖を基質として解析した結果を Table 1-6に示す。比較のために A. niger についての結果も示した。直鎖の重合度 2~7のマルトースからマルトヘプタオースに対する K_m 値にはグルコアミラーゼG I、G II、G III間に大きな差はみられなかった。それらの基質に対する V_{max} 値はG Iに比べG IIは少し高く、G IIIは少し低い値を示した。A. nigerの酵素の K_m 値は、マルトースからマルトテトラオースでは R. delemarの各成分の約半分の値であったが、さらに大きい重合度の基質に対しては差は減少した。 V_{max} 値は、すべての基質でG I、G IIIの約半分、G IIのもの1/3程度であった。これらの直鎖オリゴ糖に対する定数は、Hiromiの報告⁵¹同様に重合度に対する依存性がみられた。すなわち、基質の重合度が2から4に増大すると、 K_m 値は 1/10に減少し、 V_{max} 値は 10倍に上昇した。さらに重合度が増すと、 K_m 値は少しずつ減少するが V_{max} 値はほとんど変化しなかった。これらの数値を Hiromiらのサブサイト理論⁵²にあてはめ、サブサイトの数を7として各成分の各々のサブサイトにおける親和力を計算した。結果は Fig. 1-13に示したように、これらの酵素間でサブサイト親和力に大きな差はみられなかった。

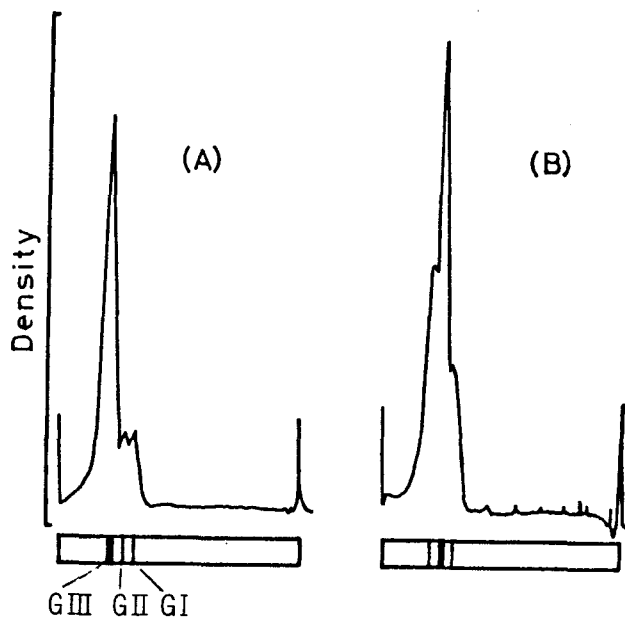


Fig. 1-12. Disc-gel electrophoresis of the crude enzyme of *R. delemar* before and after heat treatment. Gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250 and scanned with a ASUKA model OZ-802 densitometer at 610 nm.

(A) Crude enzyme and (B) the same after incubation at 40°C for 12 h.

Table 1-6.

Kinetic constants of Rhizopus delemar and Aspergillus niger glucoamylases

| Substrate | <u>R. delemar</u> | | | | | | <u>A. niger</u> | |
|---------------|-------------------|-------------|-------|-----------|-------|-----------|-----------------|-----------|
| | GI | | GII | | GIII | | K_m | V_{max} |
| | K_m^a | V_{max}^b | K_m | V_{max} | K_m | V_{max} | | |
| Maltose | 1.9 | 0.67 | 1.9 | 0.84 | 2.0 | 0.61 | 0.91 | 0.37 |
| Maltotriose | 0.59 | 2.6 | 0.57 | 3.0 | 0.64 | 2.6 | 0.30 | 1.6 |
| Maltotetraose | 0.23 | 6.3 | 0.21 | 7.5 | 0.26 | 5.8 | 0.14 | 2.7 |
| Maltopentaose | 0.16 | 6.5 | 0.14 | 7.2 | 0.17 | 5.7 | 0.12 | 2.7 |
| Maltohexaose | 0.12 | 7.1 | 0.11 | 8.8 | 0.16 | 6.0 | 0.10 | 2.6 |
| Maltoheptaose | 0.11 | 6.6 | 0.10 | 8.1 | 0.15 | 5.5 | 0.09 | 2.7 |
| Isomaltose | 47 | 0.078 | 47 | 0.11 | 40 | 0.070 | 42 | 0.059 |
| Panose | 14 | 0.43 | 13 | 0.46 | 14 | 0.45 | 13 | 0.40 |

^a mM.^b U/nmole of enzyme.

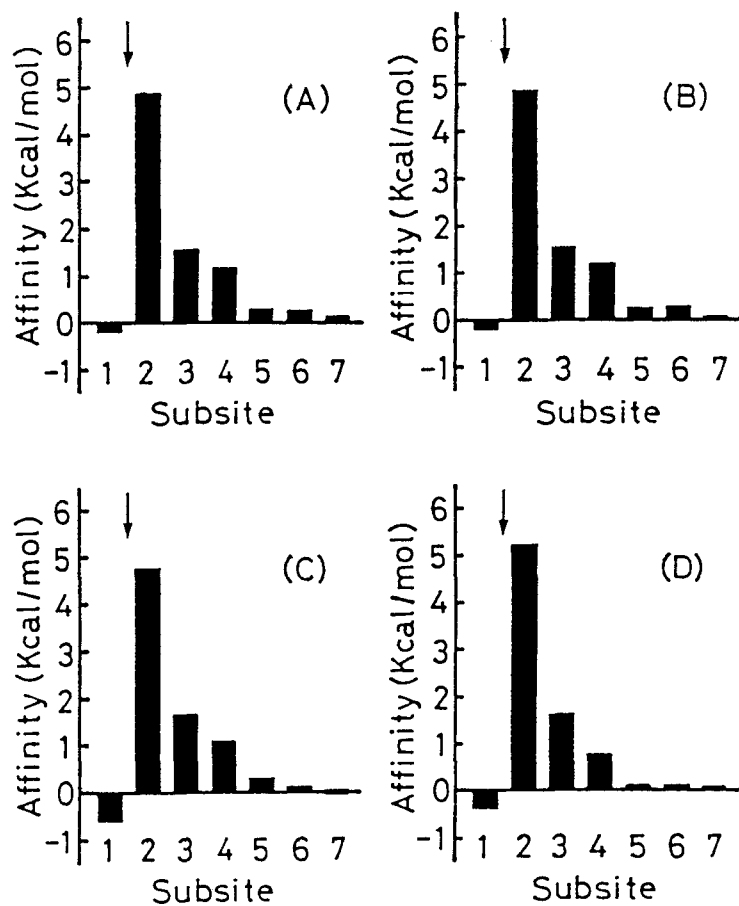


Fig. 1-13. Histograms of the subsite affinities of glucoamylases. (A), GI; (B), GII; (C), GIII of *R. delemar*; (D), glucoamylase from *A. niger*. The arrow shows the position of the catalytic site.

イソマルトースやパノースに対する K_m と V_{max} 値は、すべての酵素間でほとんど同じ数値を示したことより、4つの酵素標品の α -(1-6)-グルコシド結合分解能には差がないと考えられる。

(b) 高分子基質に対する動力学的性質

前章で述べたように、3成分のグリコーゲンの分解過程には相違がみられた。すなわち、R. delemarの酵素をグリコーゲンに作用させた時、G IIIでは1時間以内に限度に達したが、G I、G IIでは6時間を要した。A. nigerの酵素では24時間を要した。プルランに対してもG IIIのみが速やかに分解した(Fig. 1-7参照)。また、G I、G IIに比べ、G IIIは生澱粉分解力が極めて強いことが見いだされた(Fig. 1-14)。以上述べた差異は、G IIIがG I、G IIよりこれらの基質に対して強力に作用することを示唆する。この原因を明確にするために、高分子基質に対する動力学的定数を測定した。Fig. 1-15は、ジャガイモアミロペクチンを基質として R. delemarグルコアミラーゼ3成分の基質濃度依存性を示したものである。G IIIは低濃度のアミロペクチン ($1 \mu\text{M}$ 非還元末端基、約 $5 \mu\text{g/ml}$)でほぼ飽和しており、明らかにG I、G IIより低濃度で高活性を示し、この基質に対して高い親和性を持つことが示唆された。Table 1-7に、A. nigerと R. delemarの3型のグルコアミラーゼの高分子基質に対する動力学的定数をまとめた。通常、アミラーゼの高分子基質に対する K_m 値は、基質の重量濃度(たとえば %、 mg/ml)で表される。しかし、この数値では基質の構造と作用の関係が明確ではなく、他の値と比較することが不可能である。そこで、著者はグルコアミラーゼの作用を正確に評価できるように、 K_m 値を基質の非還元末端濃度に基づいて測定することにした。プルランに対しては、G III以外の3酵素標品は活性が弱く、解析が不可能であった。これらの結果より、以下のことが明らかになった。

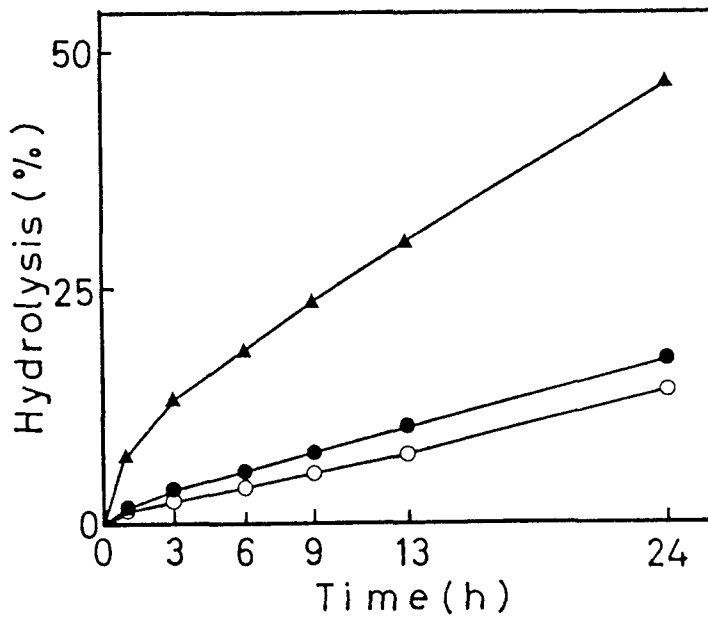


Fig. 1-14. Hydrolysis of raw corn starch by purified glucoamylases GI, GII, and GIII. The reaction mixture contained 250 mg (dry weight) of corn starch, 5 ml of 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5), and 25 U of enzyme.

Key: ● , GI; ○ , GII; ▲ , GIII.

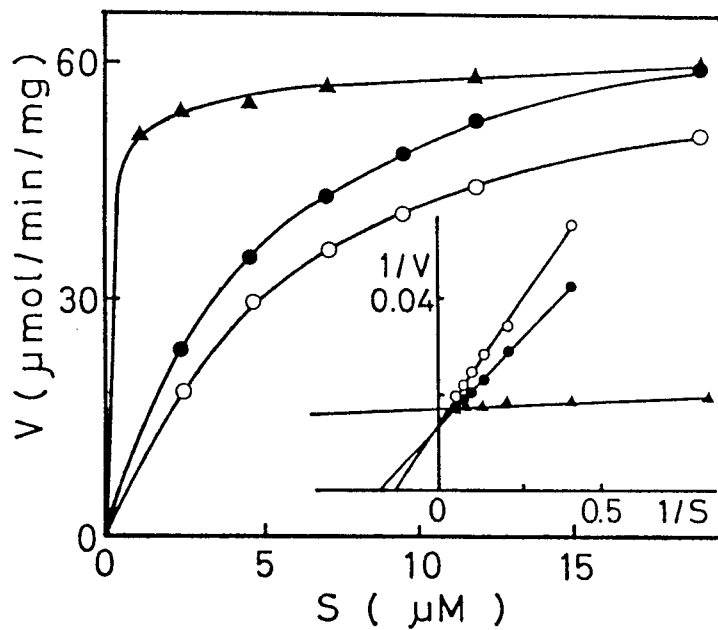


Fig. 1-15. Effect of amylopectin concentration on activities of glucoamylases of *R. delemar*.

Key: ● , GI; ○ , GII; ▲ , GIII.

Table 1-7

Kinetic constants of *Rhizopus delemar* and *Aspergillus niger* glucoamylases

| Substrate | ($\overline{\text{ECL}}$) ^a | <i>R. delemar</i> | | | | | | <i>A. niger</i> | |
|----------------------------|--|--------------------|------------------------|-------|-----------|-------|-----------|-----------------|-----------|
| | | GI | | GII | | GIII | | K_m | V_{max} |
| | | K_m ^b | V_{max} ^c | K_m | V_{max} | K_m | V_{max} | | |
| Amylopectin | (15) | 6.1 | 4.8 | 7.4 | 5.2 | 0.3 | 4.8 | 59 | 1.6 |
| Glycogen (Rabbit liver) | (10) | 240 | 4.2 | 300 | 4.8 | 0.8 | 3.9 | 820 | 2.1 |
| Glycogen (Oyster) | (7.3) | 210 | 4.0 | 250 | 5.0 | 1.8 | 4.1 | 1100 | 2.8 |
| Pullulan | | >100 ^d | — | >100 | — | 18 | 0.42 | >100 | — |

^a, Average external chain length.^b, μM of non-reducing, terminal residues.^c, U/nmole of enzyme.^d, mg/ml.

- (1) 全ての酵素の V_{max} 値は、Table 1-6に示したマルトテトラオースからマルトヘプタオースに対する値より小さい。
- (2) G IIIの高分子基質に対する K_m 値は、他のものの値よりはるかに小さい。
- (3) *R. delemar* G I、G IIおよび *A. niger*の酵素では、アミロペクチンに対する K_m 値は重合度 5~7のオリゴ糖に対する値より小さいにもかかわらず、グリコーゲンに対する K_m 値は大きい。
- (4) すべての *R. delemar*の酵素標品は *A. niger*のものより高分子基質に対して大きな親和力を有する。

(1)については、Hiromiらの結果⁵²と同じであり、彼らはサブサイトと基質の Fig. 1-16に示したような複合体 (overhedge type)が増す結果としている。

(2)と(3)はグルコアミラーゼと基質との結合に関する新知見である。これらの点についてさらに詳しく検討するために、Table 1-7の K_m と V_{max} 値を Hiromi らのサブサイト親和力の評価式 (文献 52の式 [20]) を用いて各基質に対する

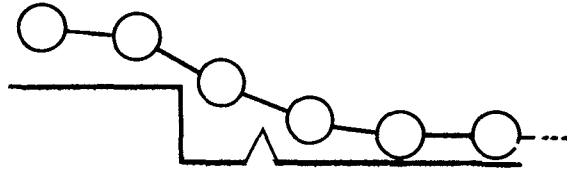


Fig. 1-16. A model for an overhedge-type complex.

Keys: ○ , glucosyl residue; △ , catalytic site.

親和力を求め、これらの値から Fig. 1-13の各サブサイト親和力の総和を差し引いて高分子基質のみに由来する親和力を求めた (Table 1-8)。

R. delemarG I、G II、A. nigerの酵素では、アミロペクチンに対する上記のサブサイト外の親和力は 0~1.6 kcal/mol、グリコーゲンに対しては -0.7~-1.5kcal/molの値であった。グリコーゲンはアミロペクチンより平均外部鎖長がかなり短いために分岐結合による立体障害効果をもたらし、この結果酵素のグリコーゲンに対する親和力が低下するのではないかと考えられる。一方、R. delemarG IIIの高分子基質への親和力は、アミロペクチンで 3.8 kcal/mol、グリコーゲンに対しては 2.6~3.0 kcal/molと非常に大きい。これらのことより、G IIIには活性部位とは異なった場所に、これら高分子基質に強い親和性を有する部位が存在することが示唆された。著者はこの部位を「澱粉結合部位」と名付けた。糖質関連酵素では、グリコーゲンホスホリラーゼ⁵³やグリコーゲン合成酵素⁵⁴に同様の部位が存在することが示されている。G III(分子量78,000)から、G II(分子量 70,000)への変換は分子量 8,000の低下を伴うが、この部分分解により澱粉結合部位を失うか、あるいは大きな損傷を受けるものと考えられる。

Table 1-5に示したアミノ酸組成に基づいて、G II、G IIIの組成の差がこの部位に由来すると仮定したときの澱粉結合部位のアミノ酸組成を Table 1-9に示

Table 1-8.

The affinity values (kcal/mol) of glucoamylases for polysaccharides

| | GI | GII | GIII | <u>A. niger</u> |
|----------------------------|------|------|------|-----------------|
| Amylopectin | 1.6 | 1.3 | 3.8 | 0 |
| Glycogen (Rabbit liver) | -0.8 | -1.0 | 3.0 | -1.5 |
| Glycogen (Oyster) | -0.7 | -0.9 | 2.6 | -1.5 |

Table 1-9.

Amino acid composition of the starch-binding site of R. delemar glucoamylases GIII

| Amino acid | Residues | Amino acid | Residues |
|------------|----------|------------|----------|
| Asx | 13 | Val | 5 |
| Ser | 14 | Ile | 7 |
| Glx | 3 | Tyr | 12 |
| Gly | 5 | Lys | 2 |
| Ara | 5 | Trp | 2 |

す。すなわち、チロシン、セリン、アスパラギン酸（アスパラギンを含む）といった水素結合を形成しやすいアミノ酸が全体の 50%以上を占めていることが注目される。高分子基質との親和力が大きいことと、上記のアミノ酸が多いことは、澱粉結合部位と基質との相互作用は水素結合によることを示唆している。また、G IIIからG IIへの変化にともない、オリゴ糖への作用には大きな変化がないにもかかわらず生澱粉の分解力が低下することより、この澱粉結合部位は水溶性の高分子基質のみならず水不溶性の基質（生澱粉）への作用にも大きく関与していると結論される。

3 グルコアミラーゼ G IIIの限定分解

前述のように、R. delemarグルコアミラーゼ G IIIは、粗酵素中に混在するプロテアーゼおよびグリコシダーゼにより澱粉結合部位を失ってG Iおよび G IIに変化することが示唆された。そこでこの変化を立証するために、G IIIを各種プロテアーゼで処理することにより、澱粉結合部位を失った酵素とその部位を含むペプチドを得ることを試み、またこれらの性質について調べた。

R. delemar G IIIに、市販の Rhizopus sp.、A. saitoi、A. oryzae由来のプロテアーゼ、キモトリプシン、トリプシンを作用させ、SDS電気泳動法で分子量の変化を調べるところ、キモトリプシンと A. oryzaeのプロテアーゼが有効に作用することを知った。前者はアミラーゼ活性が認められなかったが、後者には著量存在したため、以後の実験にはキモトリプシンを用いた。

R. delemar G IIIにその 1/5重量のキモトリプシンを加えて、その経過をディスクおよび SDS電気泳動で追跡した (Fig. 1-17, 18)。ディスク電気泳動では、G IIIの単一バンドは反応の進行とともにより移動度の大きい分子（G' と名付ける）が出現し、24時間後には完全にG' に変化した。キモトリプシンを加えずにG IIIを保温しても、この変化は認められなかった。SDS電気泳動では、分子

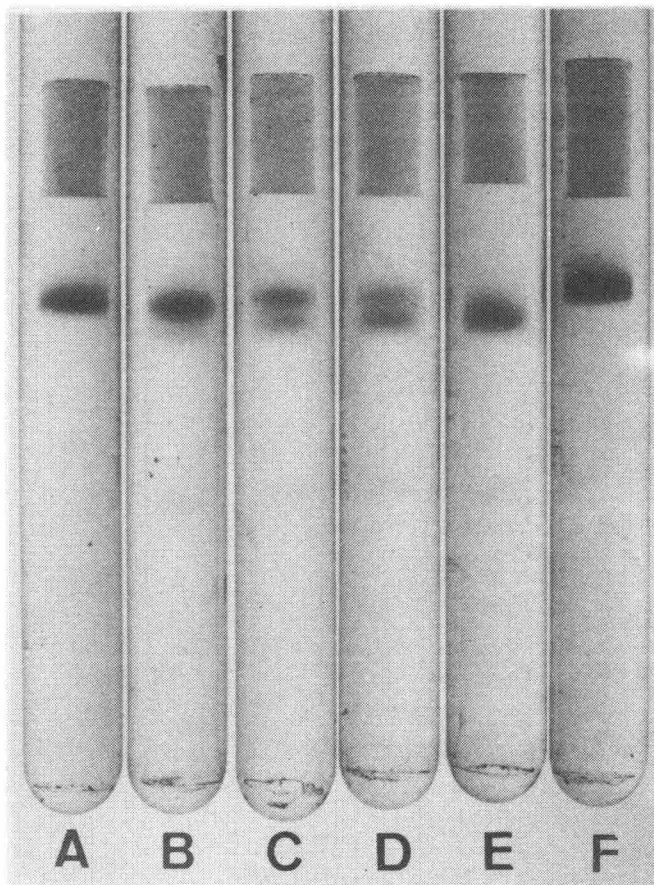


Fig. 1-17. Changes in the disc-gel electrophoresis patterns for glucoamylase (GIII) during limited proteolysis. The reaction mixture was electrophoresed in 5% polyacrylamide gels. The proteins were stained with Coomassie brilliant blue R-250. A, B, C, D and E, incubation for 0 h, 3 h, 6 h, 9 h and 24 h, respectively; F, incubation for 24 h without addition of chymotrypsin.

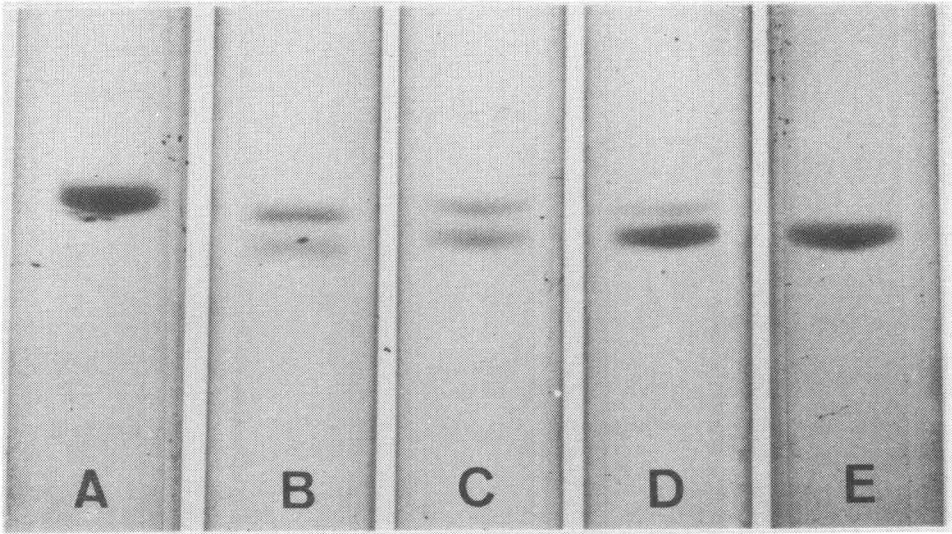


Fig. 1-18. Changes in the SDS-gel electrophoresis patterns for glucoamylase (GIII) during limited proteolysis. The reaction mixture was electrophoresed in 7.5% polyacrylamide gels. For symbols, see Fig. 1-17.

量 78,000の分子が減少し、次第に分子量 72,000の分子が増大することが観察された。これらの結果は、G IIIがキモトリプシンにより限定分解を受け、分子量 72,000のG'に変化することを示している。なお、この処理期間中、可溶性澱粉を用いる通常の活性測定法では、活性にはまったく変化が認められなかった。

24時間反応させたG IIIとキモトリプシンの反応混液をバイオゲルカラムにかけ、G'、キモトリプシンおよびフラグメントの分離を行った。Fig. 1-19のクロマトグラムでは、グルコアミラーゼとプロテアーゼ活性はそれぞれ Fr. 19~40と Fr. 50~80に見られた。Fr. 19~40を集めG'画分とした。これはディスクおよび SDS電気泳動で均一であった。いずれの活性もみられない Fr. 83~120を遊離したフラグメントとして集め、さらにトヨパール HW-40カラムで分画した (Fig. 1-20)。いくつかの蛋白質のピークがみられたが、このうち主成分でありかつ最も高分子量の画分 Fr. 75~93を集め、フラグメント画分とした。この画分は Fig. 1-20のゲルろ過クロマトグラフの結果からいくつかのペプチドの混合物であると考えられる。

4 G'の性質と作用

G'の温度安定性は 45°Cまで (pH 4.5、30分処理)と、もとのG IIIと同じであった。G'の各種基質に対する Kmと Vmax値を、Table 1-10に示した。G'はオリゴ糖に対してはG IIIとほぼ同じ Km値とわずかに大きな Vmax値を示した。一方、グリコーゲンに対しては 300倍、アミロペクチンに対しては 33倍の大きな Km値と、1.1~1.5倍の大きな Vmax値を示した。G'のこれらの値はG IIの値に類似する。以上の結果は、キモトリプシンによる限定分解はオリゴ糖に対する作用にはほとんど影響を与えずに、高分子基質に対する親和性のみを大きく減少させることを意味している。同時に、生澱粉に対する作用も大きく変化し

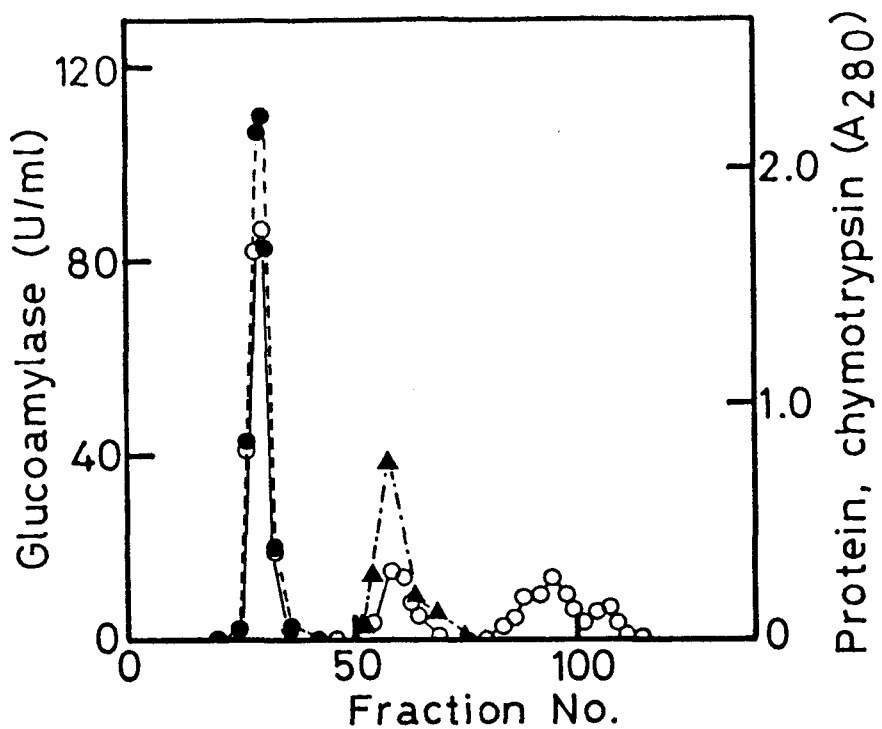


Fig. 1-19. Chromatography of a reaction mixture after proteolysis on Bio-Gel P-30. The column size was 2.6 x 95 cm and 5 ml fractions were collected at a flow rate of 19 ml/h.

Keys: -----, Glucoamylase; --▲--, protease; —○—, protein (A₂₈₀).

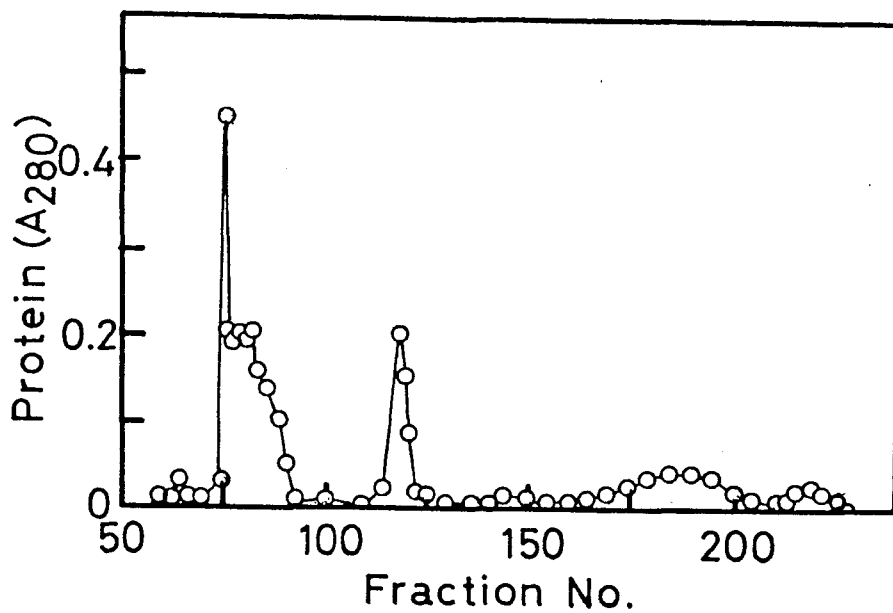


Fig. 1-20. Chromatography of the released peptide fraction on Toyopearl HW-40S. The column size was 2.6 x 95 cm and 5 ml fractions were collected at a flow rate of 19 ml/h.

Table 1-10

Kinetic constants of Rhizopus
delemar glucoamylase G'.

| Substrate | K_m^a (mM) | V_{max} (U/nmol) |
|---------------|-----------------|-----------------------|
| Maltose | 1.8 | 0.69 |
| Maltotriose | 0.56 | 3.2 |
| Maltotetraose | 0.26 | 7.1 |
| Maltopentaose | 0.16 | 7.1 |
| Maltohexaose | 0.15 | 8.6 |
| Maltoheptaose | 0.14 | 8.0 |
| Glycogen | 0.24 | 4.5 |
| Amylopectin | 0.01 | 5.1 |

^a On the basis of the
non-reducing, terminal
residues.

た。すなわち、Fig. 1-21に示すようにG'の生澱粉への吸着力と分解力はそれぞれG IIIの約 1/9と約 1/4に減少した。

以上の結果は、キモトリプシンによる限定分解によりG IIIは、触媒部位は損傷を受けずに、G IIに類似の水溶性ならびに水不溶性の高分子基質に対する親和性が著しく減少した修飾酵素G'に変化したことを意味し、G IIIに澱粉結合部位が存在することを支持する。

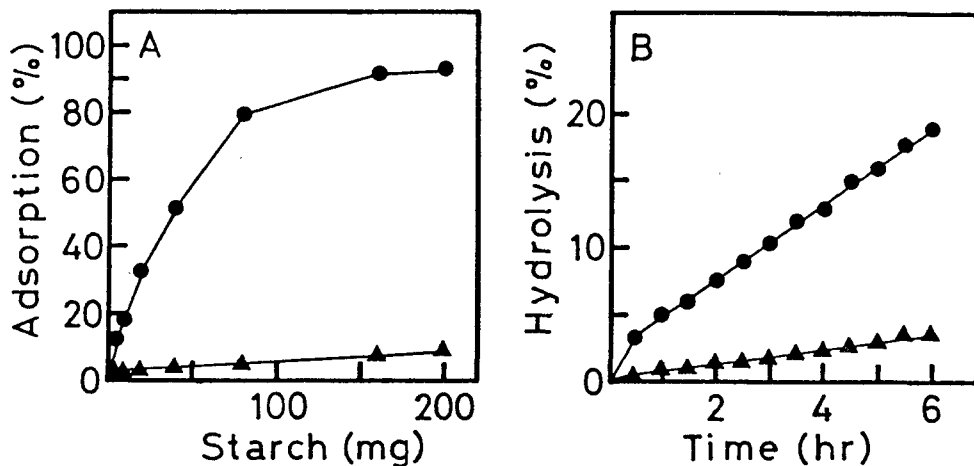


Fig. 1-21. Actions of the (●) native and (▲) and modified glucoamylase on raw starch.

(A) Adsorption on raw starch: various amounts of raw wheat starch and 10 U of the enzymes in 2 ml of 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) were incubated at 4°C for 20 min. The adsorption (%) was calculated from the residual activity in the supernatant.

(B) Hydrolysis of raw starch: the reaction mixtures, containing 250 mg (dry weight basis) of starch and 25 U of the enzymes in 5 ml of 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5), were incubated at 40°C under mild stirring.

5 フラグメント画分の性質

フラグメント画分は、*R. delemar*G IIIの生澱粉への吸着を阻害した。たとえば、*R. delemar*G IIIのグルコアミラーゼ 10 Uと澱粉 80 mgまたは 200 mgの存在下に、このフラグメントを添加すると、それぞれ 41%または 24%の吸着阻害が認められた (Fig. 1-22(A))。同時にフラグメント画分自身の 15%が 200 mgの澱粉に吸着した。また、フラグメント画分はG IIIとG' のグリコーゲン分解を阻害した。Fig. 1-22(B)に示すように、分解系にフラグメントを加えると、9時間後の分解率はG IIIの系で 19%、G' の系で 48%低下した。G IIIよりG' の分解率の低下が大きいのは、G' がG IIIよりもグリコーゲンに対して親和性が低いことが原因であろう。以上の結果から、*R. delemar*グルコアミラーゼG III上には、触媒部位とは別の高分子基質に対する強い親和性を示す澱粉結合部位が存在し、G IIIをキモトリプシンで限定分解して生じたフラグメントはその一部分であると考えられる。

Hayashidaら⁵⁵は、*A. awamori* var. *kawachi*のグルコアミラーゼには生澱粉に親和性のある部位が存在し、サブチリシンの作用で除かれることを報告している。また、SahaとUeda⁵⁶やTakahashiら⁵⁷は、それぞれ *A. niger*、*Rhizopus* sp.の市販酵素製剤中よりグリコペプチドを単離し、それらがグルコアミラーゼの生澱粉への作用を妨げることを見いだした。著者が本研究で得たフラグメント画分同様、彼らの得たペプチドは、生産されたグルコアミラーゼが混在するプロテアーゼにより培養中に遊離された澱粉結合部位であろうと推測している。最近、Svenssonら⁵⁸は *A. niger*グルコアミラーゼの全一次構造を明らかにし、C末端から 112番めの中の部位が生澱粉への吸着に関与することを報告している。この澱粉結合部位と高分子基質の相互作用は、今後の興味ある問題である。

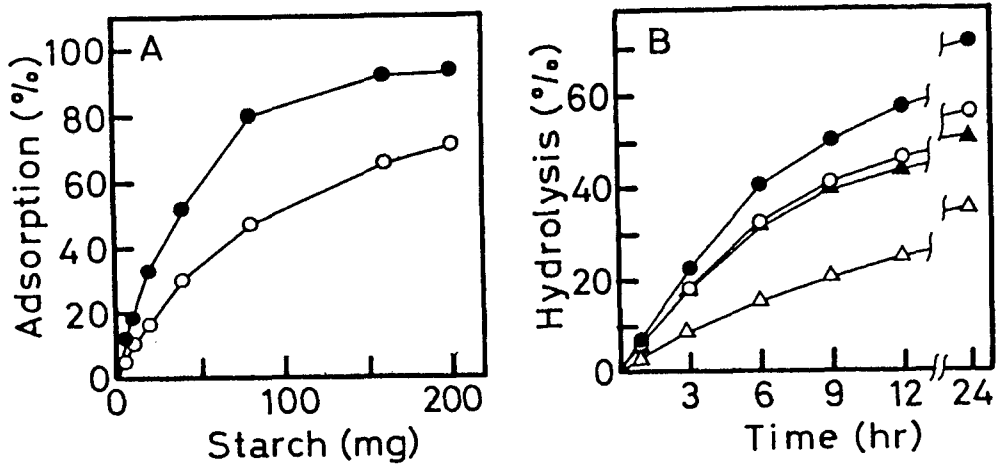


Fig. 1-22. Effect of the fragment(s) on the catalytic and adsorbing actions of glucoamylases.

(A) Adsorption on raw starch: for conditions, see Fig. 1-21.

(B) Hydrolysis of glycogen: the reaction mixture contained 0.25% rabbit liver glycogen and 0.05 U of enzyme with or without 200 μ g of the large-molecular fragment(s) in 2 ml of 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) at 40°C.

Key: ● , GIII; ▲ , G'; ○ , GIII+fragment(s); Δ , G'+fragment(s).

第4節 要約

Rhizopus delemarのグルコアミラーゼの多型が生じるのは、アミノ酸と糖分析およびディスク電気泳動の結果、生産されたG IIIがプロテアーゼやグリコシダーゼにより限定分解を受けて、G I、G IIを生成することが原因であると結論した。

A. nigerのグルコアミラーゼを含めた4種の酵素について動力学的性質を調べたところ低分子基質に関しては A. nigerの V_{max} 値が他のものの1/2程度であったこと以外は極端な差はなかった。すべての酵素で活性部位付近に存在するサブサイトの親和力に差はないことが認められた。また α -(1-6)-結合の加水分解能にも差はなかった。一方、高分子基質に対しては、G IIIのみが異常に低い K_m 値を示した。以上のことより、R. delemarG IIIには、活性部位とは異なった部位に高分子基質に対する親和性部位「澱粉結合部位」が存在することを示唆し、サブサイト理論が高分子基質に対しても適用できることを示した。また、澱粉結合部位と基質の相互作用の本質は水素結合であることを示唆した。G IIIからG IIへの変化にともない、生澱粉に対する分解能も大きく低下することより、澱粉結合部位は水溶性高分子基質だけでなく水不溶性の生澱粉との相互作用にも関与していると考えられる。

G IIIをキモトリプシンで限定分解して得たG' は、その性質と作用がG IIのものと同様で、遊離したペプチドはグルコアミラーゼのグリコーゲン分解や生澱粉への吸着を阻害した。これらの結果は、R. delemarグルコアミラーゼG III上に澱粉結合部位が存在することを示し、このペプチドが澱粉結合部位そのもの、あるいはその一部であること、多型の存在はプロテアーゼの限定分解によることを強く示唆する。

第2編 アミラーゼによる生澱粉の分解

第1章 生澱粉分解酵素生産菌の検索とその酵素の性質

第1節 緒言

澱粉粒は部分的に微少な結晶状の構造が発達しており、反応性に乏しい。従って、酵素反応の場合は水と共に加熱して糊化する必要がある。近年、省エネルギー化やプロセスの簡素化のために無蒸煮糖化法が注目されている。生澱粉の糖化力の強い微生物起源の酵素として、Aspergillus awamori⁵⁹、Rhizopus sp.⁶⁰における Uedaの先駆的な研究以来、A. cinnamomeus⁶¹、A. niger⁶²、Bacillus circulans⁶³、Chalara paradoxa⁶⁴などの酵素が報告されている。しかし、実用化にはさらに優れた酵素の開発が望まれる。

檜作ら⁶⁵は、細菌糖化型 α -アミラーゼを小麦澱粉粒に作用させると、脂質とアミロースがラセン状複合体を生成している部分が分解されにくく、選択的に残ることを見いだした。この脂質-アミロースの複合体は、糊化澱粉に α -アミラーゼを作用させると容易に水不溶性残渣(α -アミラーゼ難液化性澱粉、 α -RS)として得られる。そこで、 α -RSを容易に分解できる菌を選択すれば、生澱粉、特に穀類澱粉を強力に分解する酵素を生産するのではないかと考えた。本章では、このようにして得られた菌の酵素の生産性と諸性質について述べる。

第2節 実験材料と方法

α -RSの調製

200 gの小麦澱粉を 1,000 Uの Bacillus amyloliquefaciens α -アミラーゼを用い、2 mM塩化カルシウム中で 80°Cで糊化と液化を同時に行った。反応液を 55°Cまで冷却し、さらに 1,000 Uの α -アミラーゼを加え 55°C 3時間反応させ

た。生じた不溶性の沈澱を集め、水で十分に洗浄後凍結乾燥した。収率は約 5%であった。この α -RSは、平均重合度 84の直鎖のアミロースと主としてリン脂質であるリゾレシチンとの複合体であり、X線回折によりラセン状構造であることが確かめられている⁶⁶。

菌の分離法

基本培地の組成を次に示す。

| | |
|--------------|--------|
| α -RS | 0.5% |
| 硝酸アンモニウム | 0.1% |
| リン酸2水素カリウム | 0.14% |
| 塩化カルシウム | 0.05% |
| 硫酸マグネシウム | 0.02% |
| 酵母エキス | 0.01% |
| | pH 6.5 |

なお、真菌類の分離のためには 0.005%クロラムフェニコールを加えた。

温室や堆肥などから集めた土壌を無菌水に懸濁し、上清を上記培地に加え30℃、45℃および60℃で1～3日培養した。さらに、この培地1滴を新しい培地を含む試験管に移し、培養を継続した。これから1滴を2%寒天で固めた上記培地のプレート上に広げ、1～3日後、生じたコロニーのうち周辺部に α -RSの分解により生じた透明部分の大きなものを釣菌し、マルトエキス寒天培地上で単一コロニーになるまで純粋分離を繰り返した。得られた菌はマルトエキス寒天培地に8℃で保存した。

酵素活性測定法

第1編第1章で述べたA法とB法を用いた。ただし、A法において可溶性澱粉の最終濃度は1%、Somogyi試薬との加熱時間は30分¹⁸とした。また、反応温度は、細菌、糸状菌、酵母の酵素でそれぞれ60℃、45℃、40℃とした。

その他の測定法

還元糖、全糖、グルコースの定量はそれぞれSomogyi-Nelson法^{18, 24, 25}、アンスロン硫酸法²⁹、グルコースオキシダーゼ法²⁶を用いた。

ペーパークロマトグラフィーは東洋ろ紙 No. 50を用い、試料を 70% n-プロピルアルコールを展開剤として 60°Cで 3回上昇法で行った。乾燥後、グルコアミラーゼ処理-硝酸銀法⁶⁷で糖を検出した。

第3節 結果と考察

1 菌の分離

前述の方法で α -RSを分解する菌の分離を行い、35株を得た。そのうち 31株は細菌、3株が糸状菌、1株が酵母であった。液体培地に各菌を接種し、細菌は 60°C、2日間、糸状菌は 45°C、5日間、酵母は 30°C、2日間培養した。培養後、遠心分離して得た上清をさらにガラスフィルター GF/Fでろ過して粗酵素液とし、アミラーゼ活性を測定した。いずれの菌も各温度でよく生育したが、アミラーゼ活性を測定した結果、細菌K-2株、糸状菌K-27株、酵母K-28株を選び、以後の実験に用いた。形態観察および生理学的試験の結果、K-2株は Bacillus 属、K-27株は Aspergillus 属、K-28株は Hansenula 属であると考えられた。

2 分解菌の粗酵素標品の性質

各菌の生産するアミラーゼの種類を判定するために、各菌の粗酵素標品をジャガイモアミロースに作用させた (Fig. 2-1)。いずれの酵素標品も、分解率が約 20%の時点でヨウ素反応が消失し、また 24時間後の分解率は、K-2株で 32%、K-27とK-28株で 100%であった。このことはK-2株の酵素はアミロースを平均重合度約3のマルトオリゴ糖に、K-27とK-28株の酵

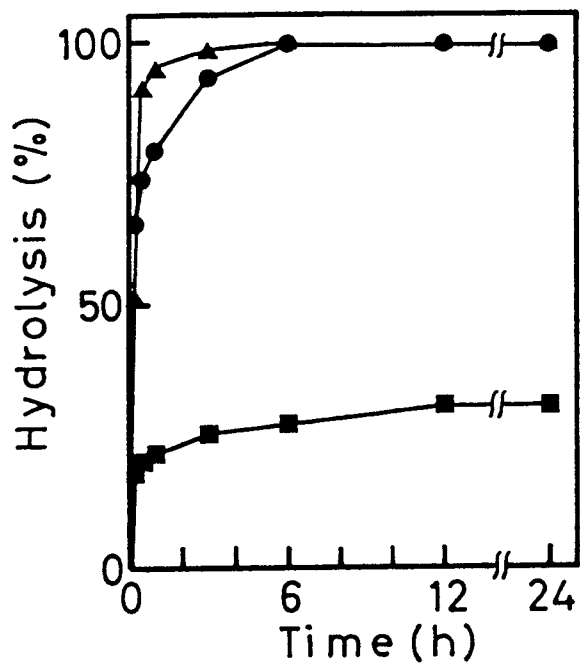


Fig. 2-1. Hydrolyses of potato amylose with the crude enzymes. The reaction mixtures (2 ml) contained 0.25% substrate, 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5) and 2 U of enzyme.

Key: ■ , K-2; ● , K-27; ▲ , K-28 enzymes.

素はグルコースに分解したことを示す。各分解過程における分解産物をペーパークロマトグラフィーで調べると、K-2株の酵素による生成物はグルコースやマルトースなどのオリゴ糖であった (Fig. 2-2(A))。分解初期にはマルトース、マルトトリオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオースなどが生成したが、後期にはグルコース、マルトース、マルトトリオース、マルトペンタオースが主生成物であった。マルトテトラオースは常に少量であった。このアミロースの分解様式は、Robytと French^{6,8}が報告している *B. subtilis* の α -アミラーゼに似ている。一方、K-27株 (データ省略) と K-28株 (Fig. 2-2(B)) では、反応のごく初期には少量のオリゴ糖を生じるものの、以後はグルコースのみを生成した。

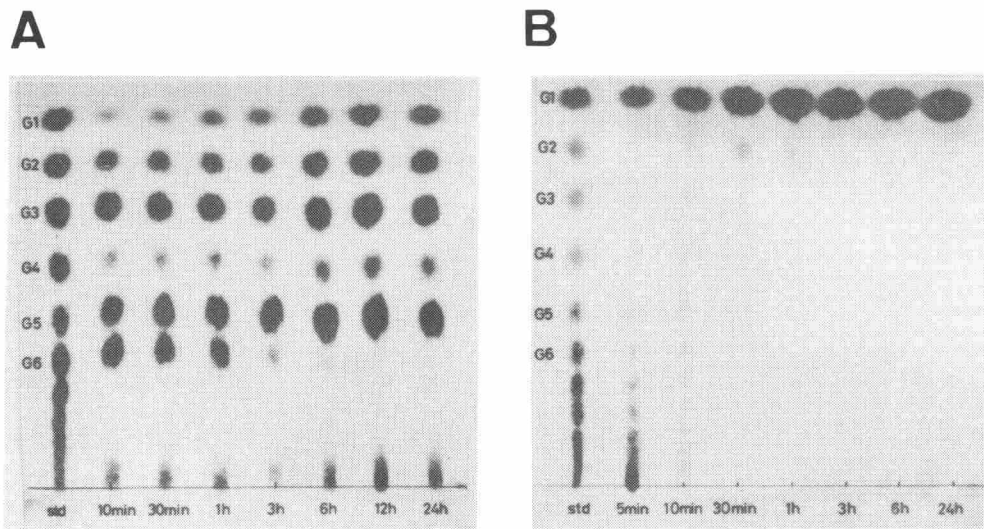


Fig. 2-2. Chromatograms of the amylose hydrolysates with the K-2 (left) and K-28 (right) enzymes. Conditions, see Fig. 2-1.

以上の結果は、K-2株の酵素は α -アミラーゼであり、K-27とK-28株のものは主成分がグルコアミラーゼで、これに α -アミラーゼが混在していることを示唆している。なお、K-27とK-28株の酵素により生じるグルコースは、ムタローテースを用いて β 型であることを確認した。従って、これら酵素はグルコアミラーゼである。澱粉の糖化の際に問題となる α -グルコシダーゼは含まれないか、含まれていても少量である。

K-2、K-27、K-28株の酵素は、pH 5.5、30分処理では、それぞれ60°C、45°C、40°Cまで安定であった。

3 粗酵素標品の生澱粉分解活性

K-2、K-27、K-28株の粗酵素は、澱粉 1 mgあたり 0.1 Uで生トウモロコシ澱粉を完全に消失させた。この分解過程をFig. 2-3に示す。最終的なグルコースとしての分解率は、それぞれ 34%、100%、100%であった。つまり、アミロースと同様に、生澱粉をK-2株の酵素は平均重合度3のマルトオリゴ糖に、K-27とK-28株の酵素は完全にグルコースに分解した。このことは、アミロース-脂質複合体をよく分解できる酵素は生穀類澱粉を期待どおりによく分解できることを示す。澱粉は熱をかけると不可逆的に糊化するため、生のまま菌の分離、培養の炭素源として用いるには、ガス殺菌などの特別の手段を必要とする。 α -RSは加熱により複合体が解離するが、冷却中に再び複合体を形成し、水不溶性の沈澱となるため取り扱いが容易なことが利点である。

一方、根茎澱粉に対してはこれらの酵素標品は異なった作用を示した。すなわち、K-27、K-28株の酵素は生ジャガイモ澱粉をほぼ完全に分解したが、K-2株の酵素は60°Cでさえまったく作用しなかった。このことは、生トウモロコシ澱粉のような穀類澱粉ではアミラーゼ作用に対する障壁はアミロース-脂質複合体であるが、ジャガイモ澱粉ではまったく異なる構造が障壁であ

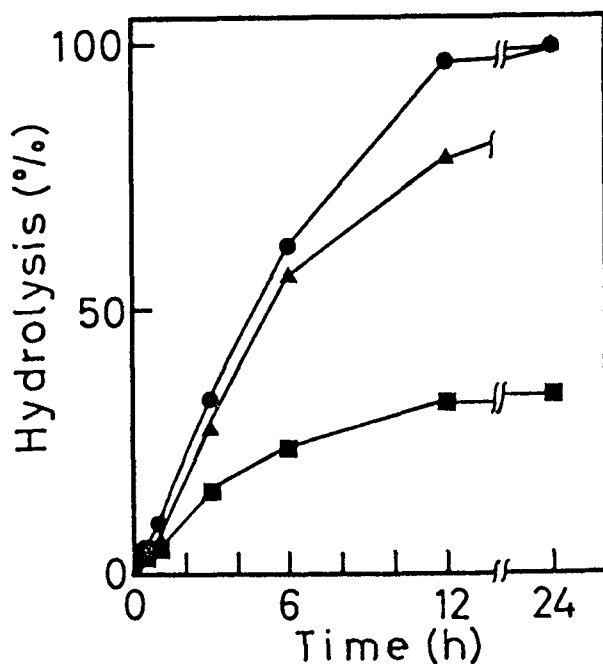


Fig. 2-3. Hydrolyses of raw corn starch granules by the crude enzymes of K-2, K-27 and K-28. The reaction mixtures (5 ml), containing 25 mg (dry basis) starch granules, 50 mM sodium acetate buffer and 2.5 U of enzyme, were incubated at 60°C (K-2), 45°C (K-27), and 40°C (K-28) with mild stirring that was just enough to prevent settling of the starch.

Key: ■ , K-2; ● , K-27; ▲ , K-28 enzymes.

ることを示唆している。

以後、酵素の作用、生産性の点からK-27株を選び、この菌の酵素生産、粗酵素の性質について詳細に検討した。

4 K-27株による酵素生産

酵素生産のための炭素源、窒素源、そのほかの成分の最適組成、濃度を予備的に検討した結果、Table 2-1に示す培地を用いることにした。

Aspergillus sp. K-27を α -メチル-グルコシドを含む培地と含まない培地を用いて培養し、経時的に培地中の酵素活性、全糖量、pHを測定した結果をFig. 2-4に示す。いずれの場合も培地中の糖は3日で消費され、pHは2日目に一度低下し、その後上昇した。酵素の生産は、培地中の糖がほとんど消費され、

Table 2-1.

Composition of the culture medium

| Component | % |
|--------------------------------------|--------|
| Wheat starch | 2 |
| Ammonium nitrate | 0.14 |
| Potassium phosphate monobasic | 0.14 |
| Corn steep-liquor | 0.08 |
| Magnesium sulfate | 0.05 |
| Potassium chloride | 0.05 |
| Yeast extract | 0.01 |
| Iron (II) sulfate | 0.001 |
| (α -methyl-D-glucoside 0.2%) | |
| | pH 6.2 |

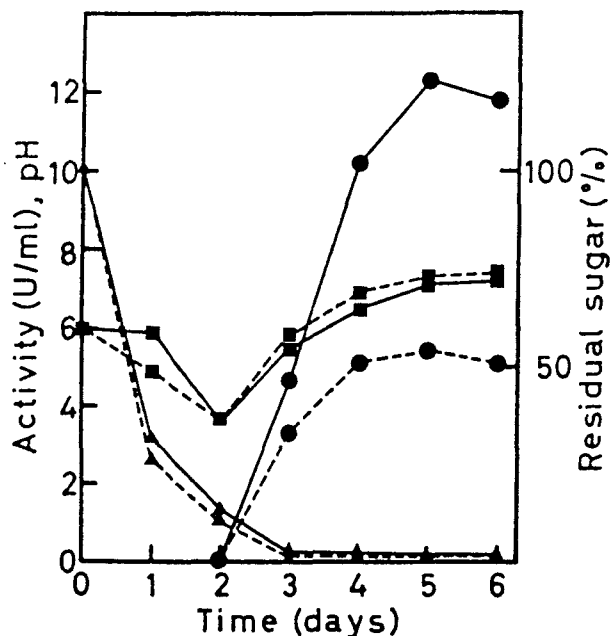


Fig. 2-4. Production of the amylase of *Aspergillus* sp. K-27 in the presence (—) and absence (----) of α -MG.

Key: ● , activity determined by method A; ■ , pH; ▲ , residual sugar.

pHが上昇する頃より始まり 5日目で最大値に達した。酵素の生産は α -メチル-グルコシドを加えた場合は 12.5 U/mlと、加えない場合 5.5 U/mlの2倍の生産量を示した。この時点で培地中の糖はほぼ完全に消失していることより、 α -メチル-グルコシドも資化されていると考えられる。 α -メチル-グルコシドの代わりに同量のグルコース、マルチトール、小麦澱粉を加えても効果がなく、 α -メチル-グルコシドの効果は誘導と理解された。反対のアノマー型の β -メチル-グルコシドを培地に加えた場合には、酵素活性は 1.1 U/mlと大幅に減少した。こ

これらのことは、*Streptomyces*による β -キシラナーゼ生産が β -メチル-キシロシドで誘導され、 α -メチル-キシロシドで阻害される⁷⁰ことと同じ現象である。しかし、これらキシロース誘導体は菌に資化されないと報告されている。

5 粗酵素の成分

Aspergillus sp. K-27の粗酵素標品の活性をA、B両法で測定すると、B法による値はA法の値の80%であった。このことは、反応生成物としてグルコース以外にオリゴ糖が生成することを示している。粗酵素標品をpH 3.5、45°Cで保温し、経時的にA、B両法で活性測定した結果をFig. 2-5に示す。初期には両法による値はいずれも減少し、2時間後両法の値は一致したが、この値はA法による初めの値の70%で、6時間後も変化しなかった。これらの結果は、初期の活性の70%はグルコアミラーゼであり、グルコアミラーゼはこの処理にも安定であることを示唆している。

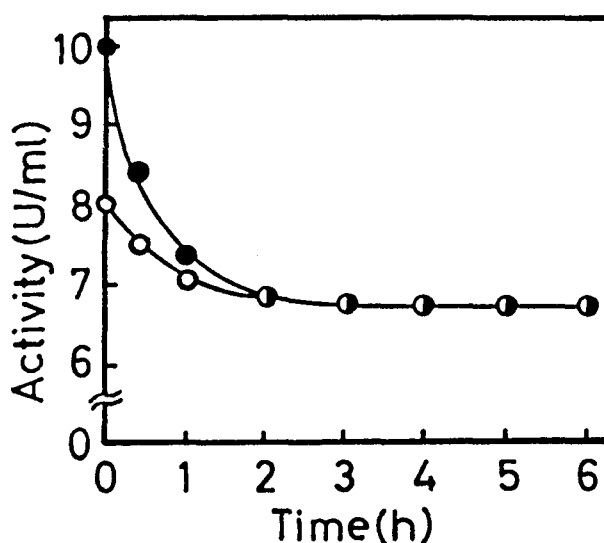


Fig. 2-5. Effect of acid treatment on the activity of the crude enzyme preparation. Conditions, see the text.

Key: ●, activity determined by method A and ○, by method B.

未処理の酵素と上記の条件下で 5時間処理した酵素をジャガイモアミロースに作用させたところ、未処理酵素では分解率の増加に対し急激にヨウ素反応が減少したが、処理した酵素ではヨウ素反応は直線的に減少し、分解率 80%においてもヨウ素反応は消失しなかった (Fig. 2-6)。これらの事実は、粗酵素標品中に pH 3.5、45°Cの処理に安定なグルコアミラーゼと不安定な α -アミラーゼが約 7:3の活性比で存在することを意味している。なお、この比は培養液への α -メチル-グルコシドの添加の有無によらず一定であった。従って、 α -メチル-グルコシドはグルコアミラーゼと α -アミラーゼの両者の生産を同じような機構で促進するものと考えられる。

6 粗酵素の生澱粉分解作用

本酵素標品の生澱粉に対する作用の最適 pHは、4.6~5.5であった。また、pH 4.5~6.5の範囲で安定であり、pH 5.5が最も安定であった。

粗酵素液の pHを 5.5に調整し、密栓したうえで 30°Cに放置し保存性を調べたところ、4週間後でさえ生澱粉分解力、糊化澱粉分解力の低下はほとんど見られなかった。これは、粗酵素液中にプロテアーゼ活性がほとんど検出されず、第1編第2章で述べた *Rhizopus delemar*のグルコアミラーゼのように限定分解が起こらないためである。

本酵素を 5%生トウモロコシ澱粉懸濁液に pH 5.5、55°Cで作用させた時の酵素量と分解率の関係を経時的に調べた (Fig. 2-7)。澱粉 1 mgあたり 0.1 Uと 1 Uを用いたときは、それぞれ 5時間と 7時間でほぼ完全に分解した。24時間で完全分解するには、澱粉 1 mgあたり 0.05 Uの酵素量で充分であった。より少量の酵素を用いた場合には、分解率約 50%まで直線的に増加した。この実験では反応が円滑に進むように反応液中に攪拌子を入れ、澱粉が沈降しない程度に、また澱粉を損傷しないように穏やかに攪拌して行った。しかし、攪拌により澱

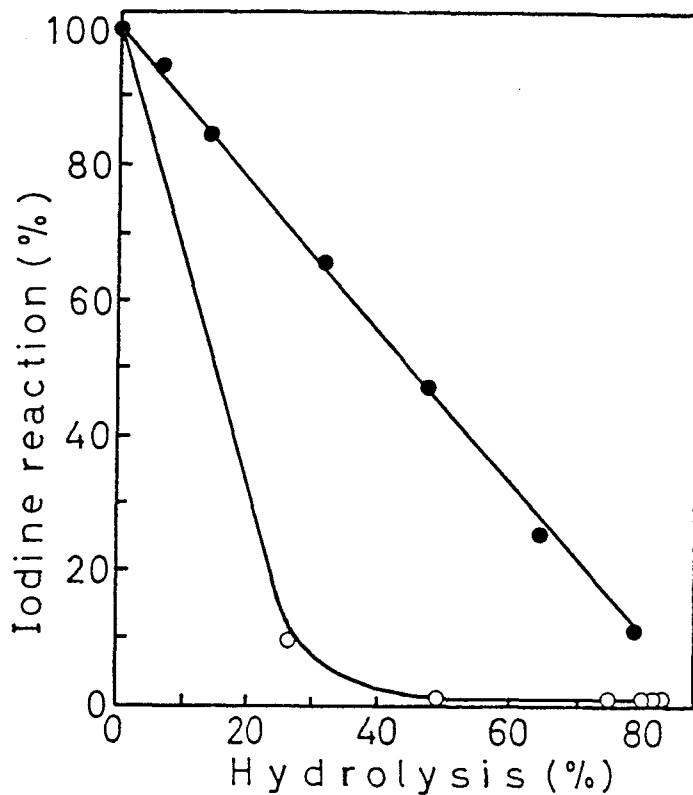


Fig. 2-6. Actions of crude (○) and purified (●) glucoamylase preparations on potato amylose. The reaction mixture containing 2 ml of 1% potato amylose, 1.8 ml of 50 mM sodium acetate buffer, and 0.2 ml of enzyme solution was incubated at 45°C.

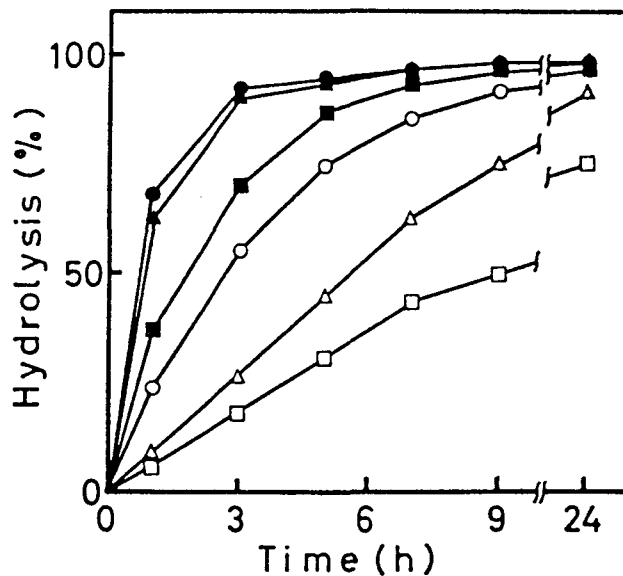


Fig. 2-7. Hydrolysis of raw corn starch with the crude enzyme preparation. Corn starch (250 mg, dry basis) was suspended in 5 ml of 50 mM acetate buffer (pH 5.5) containing various amounts of the crude enzyme, followed by incubation at 55°C with gentle stirring. Glucose released was measured by the glucose oxidase-peroxidase method.

Key: ● , 250 U; ▲ , 125 U; ■ , 25 U; ○ , 12.5 U; △ , 5 U; □ , 2.5 U.

粉粒が損傷を受けたり、あるいは 55°Cにおいて澱粉が糊化することにより分解速度が促進される可能性を排除するために、以下の実験を行った。

まず反応混液（澱粉 250 mg、酵素 250 U）を 45°Cで静置し、ときどき手で攪拌するにとどめた。反応速度は少し低下したが、24時間で 83%分解した。次に反応温度を 30°C、35°Cとしたが、250 Uの酵素は 250 mgの澱粉を 24時間でそれぞれ 83%、86%分解した。また、酵素を加えずに 55°C、24時間放置した澱粉粒は、偏光顕微鏡下で完全な複屈折が観察され、部分的にも糊化していないことが確認された。以上のことより、生トウモロコシ澱粉の速やかな糖化は、本酵素の本来の作用の結果であると結論することができる。

Fig. 2-8は、5%生ジャガイモ澱粉にK-27株の粗酵素標品を作用させたときの分解過程を示したものである。澱粉 1 mgあたり 0.1 Uと 1 Uの酵素量では、それぞれ 24時間と 7時間でほとんど完全に分解した。ジャガイモ澱粉の糊化開始温度は生トウモロコシ澱粉のそれより低いため、部分的な糊化の可能性を考え 45°Cにおいても作用させたが、55°Cに比べ速度の低下はあるものの 24時間後にはやはりほぼ完全に分解した。従来より、根茎澱粉、特にジャガイモ澱粉はアミラーゼ作用を受けにくいことが知られているが、本酵素はジャガイモ澱粉にもよく作用することが見いだされた。Table 2-2は、本酵素標品の各種生澱粉に対する初速度を比較したものである。生トウモロコシ澱粉の分解初速度を 100とすると、サツマイモ、ジャガイモでそれぞれ 75、72であり、澱粉の種類にかかわらず強力な分解活性を示した。むろんこれらの澱粉を糊化して作用させたときの初速度に差はなかった。糊化澱粉と生澱粉分解の初速度の比は、トウモロコシ澱粉の 8.8が最小で、ジャガイモ澱粉の 12.2が最大であった。種々の生澱粉分解酵素では、トウモロコシ澱粉に対して 10~33の値が報告されている⁷¹。これらの値から、本菌の酵素の生澱粉分解力が強いことが認められる。

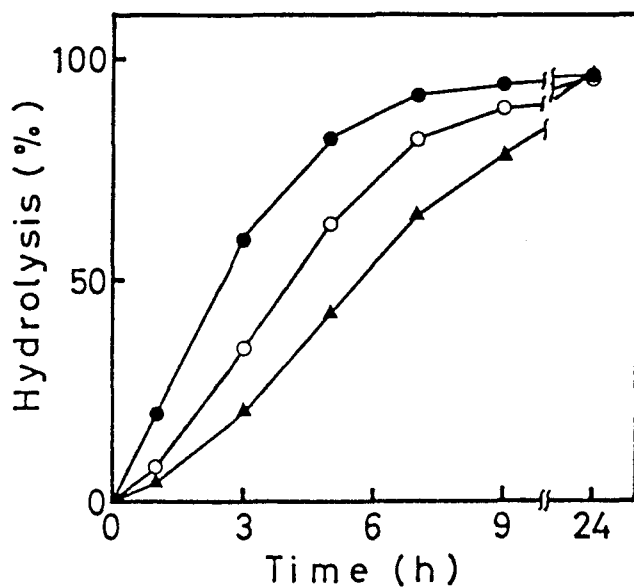


Fig. 2-8. Hydrolysis of raw potato starch with the crude enzyme preparation. For the conditions, see Fig. 2-7.

Key: ● , 250 U at 55°C; ○ , 25 U at 55°C; ▲ , 25 U at 45°C.

Table 2-2.

Digestibilities of various kinds of raw starches with the crude enzyme preparation.

| Source | Initial velocity ^a (U/mg) | Activity ratio ^b (%) |
|--------------|---|------------------------------------|
| Potato | 0.867 (72 ^c) | 8.2 |
| Sweet potato | 0.903 (76) | 8.6 |
| Wheat | 1.01 (83) | 9.5 |
| Tapioca | 1.10 (91) | 10.4 |
| Corn | 1.21 (100) | 11.4 |

^a Substrate concentration, 1%.

^b The ratio of the activity for raw starch to that for the gelatinized starch.

^c The relative value.

第4節 要約

糊化した小麦澱粉を細菌液化型 α -アミラーゼで分解した結果得られる水不溶性の短鎖アミロース-脂質複合体(α -RS)を唯一の炭素源とし、生澱粉分解酵素を生産する細菌 31株、糸状菌 3株、酵母 1株を得た。このうち有望な菌株として、K-2株(細菌)、K-27株(糸状菌)、K-28株(酵母)を選定した。K-2株は α -アミラーゼ、K-27株とK-28株はグルコアミラーゼと α -アミラーゼの両者を生産し、これらの酵素はいずれも生トウモロコシ澱粉をよく分解した。従って、 α -RSを強力に分解する酵素は、生澱粉によく作用することが確かめられた。しかし、K-2株の酵素は他の2菌のものと異なり、生ジャガイモ澱粉に対してはまったく作用しなかった。

酵素の生産性、得られた酵素の生澱粉分解力の強さから最終的にK-27株を選び、酵素の生産条件とその酵素の生澱粉分解力について詳細に検討した。K-27株の酵素の生産性は、培地中に α -メチル-グルコシドを加えることにより2倍に上昇した。この粗酵素標品中には、グルコアミラーゼと α -アミラーゼが活性比で約7:3の割合で混在していた。粗酵素標品の生トウモロコシ澱粉に対する分解初速度を100とすると、ジャガイモ澱粉に対する初速度は72で、穀類澱粉だけでなく分解されにくい根茎澱粉にもよく作用することが認められた。

第2章 Aspergillus sp. K-27のグルコアミラーゼと α -アミラーゼの精製と作用

第1節 緒論

前章で述べた生澱粉分解力の強い Aspergillus sp. K-27の粗酵素標品からグルコアミラーゼと α -アミラーゼを精製し、両者の性質と作用、ならびに生澱粉分解に対する機能について検討した。

第2節 実験材料と方法

酵素

前章で述べた培地を用い、Aspergillus sp. K-27を45°C、5日間培養し、菌体をガーゼ、東洋ろ紙 No. 131、続いてガラスフィルターGF/Fで除いたろ液を粗酵素液とした。

酵素活性測定法

前章で述べたA、B両法を用いた。また、動力学的性質の解析には、第1編第2章で述べた高感度のPark-Jonson法⁴⁵も採用した。

高速液体クロマトグラフ

HLC-803D（東洋曹達）を用い、以下の条件で分析した。

カラム：TSK gel NH₂-60、4.6 x 300 mm

溶媒：50% アセトニトリル

流速：0.8 ml/min

検出器：示差屈折計（東洋曹達 RI-8）

試料は0.45 μ mのフィルターでろ過後、分析に供した。

第3節 結果と考察

1 グルコアミラーゼと α -アミラーゼの分離と精製

第1章で述べたように、本菌の粗酵素標品中にはグルコアミラーゼと α -アミラーゼが活性比で約 7:3の割合で存在する。この標品を pH 3.5、45°Cで 5時間処理すると、電気泳動的にほぼ均一なグルコアミラーゼ標品を得られるが α -アミラーゼは失活するため、以下に述べるように各種クロマトグラフにより両者を分離することにした。

粗酵素液の pHを 5.5に調整し、ロータリーエバポレーターで 1/5量まで濃縮し、氷水中で冷却しながら硫酸アンモニウムを 60%飽和になるように加えた。生じた沈澱を集め、50 mM酢酸緩衝液 (pH 5.5)に溶解し、あらかじめ-20°Cに冷却したイソプロピルアルコールを徐々に加えて 50%濃度とした。生じた沈澱をすばやく集め、50 mM酢酸緩衝液 (pH 5.5)に溶解し、同じ緩衝液で平衡化した α -サイクロデキストリン-セファロース 6Bカラムにかけた。カラムを充分に緩衝液で洗浄後、吸着成分を順次高濃度の α -サイクロデキストリンを含む緩衝液で溶出した。Fig. 2-9は、そのクロマトグラムを示したものである。2つの蛋白質のピークがカラム洗液区分に、また2つの小さなピークと1つの大きなピークが α -サイクロデキストリンを含む緩衝液による溶出区分に現れた。前者では前のピークにはA、B両法で活性が検出されず、後ろのピークはA法でのみ活性が検出された。従って、この画分 (Fr. 24~49)は α -アミラーゼであり、このカラムに弱い親和性を持つために、ボイドボリュームより少し遅れて溶出したものと思われる。また、後者の区分では Fr. 122~137、Fr. 147~163に顕著な活性があり、かつA、B両法による測定値が一致したので、グルコアミラーゼであった。このように、グルコアミラーゼは本カラムに強い親和性を有する。ここでは、Fr. 24~49、Fr. 151~166をそれぞれ α -アミラーゼ、グルコアミラーゼとして集め、アミコン限外ろ過膜 PM-10で濃縮した。

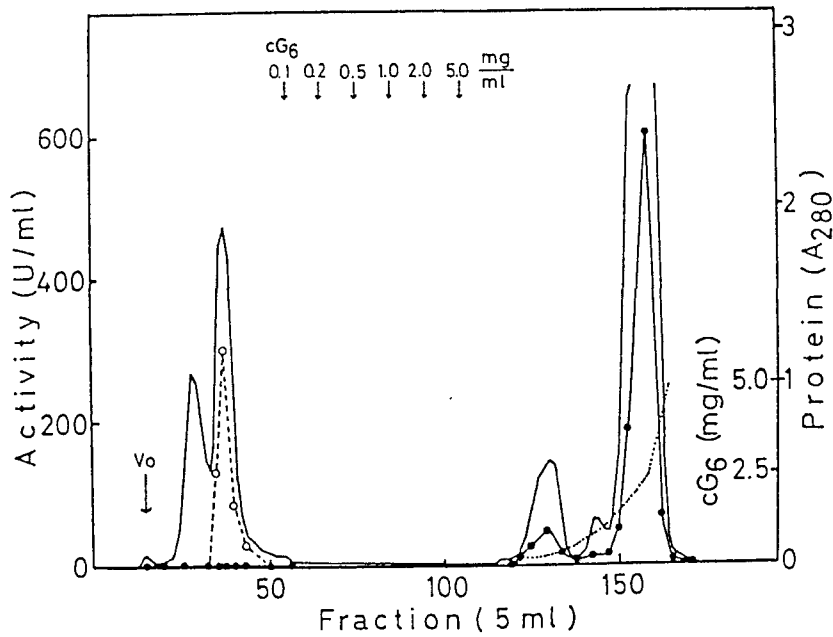


Fig. 2-9. Chromatography (5.6 ml fractions at 34 ml/h) of the crude enzyme preparation of *Aspergillus* sp. K-27 on a column (1.8 x 40 cm) of α -cyclodextrin-coupled Sepharose 6B.

Keys: ———, protein (A₂₈₀); --O--, activity determined by method A; —●—, activity determined by method B; , cyclodextrin concentration.

α -アミラーゼ画分を 50 mM酢酸緩衝液 (pH 5.5)で平衡化したセファデックス G-100カラムにかけると、蛋白質と活性が一致した対称的な1つのピークを得た。これを集めてアミコン PM-10フィルターで濃縮し、緩衝液を 10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.5)に置換した。これを同緩衝液で平衡化した DEAE-トヨパール 650Sカラムにかけた。カラムを同緩衝液で洗浄した洗液中には蛋白質、活性ともに見られなかった。吸着した物質は塩化ナトリウムの直線濃度勾配 (0~0.5 M)で溶出した。酵素の失活を防ぐため、溶出したフラクションはただちにpHを 5.5に調整した。各フラクションの蛋白質と活性を Fig. 2-10に示す。Fr. 54~59と Fr.60~70に、 A_{280} と活性が一致した2つのピークが得られた。最初のピークはディスク電気泳動で単一バンドを示した。一方、後ろのピークは前者の成分と他の成分の混合物であり、同一カラムによる再クロマトグラフィーによっても2成分を分離できなかった。前のピークをK-27精製 α -アミラーゼ画分として集め、以後の実験に用いた。以上の精製結果を Table 2-3にまとめた。この精製標品は、ディスク電気泳動的に均一で (Fig. 2-11 (A))、またマルトースやグルコース6-リン酸にまったく作用せず、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、およびグルコース6-リン酸ホスファターゼ活性は残存していないことが確かめられた。

α -サイクロデキストリンセファロース 6Bカラム溶出液の主成分 (Fr. 151~166、Fig. 2-9)の緩衝液濃度を 10 mMとしたのち、10 mM酢酸緩衝液(pH 5.5)で平衡化した DEAE-トヨパール 650Mカラムにかけた。カラム溶出液中に糖が検出されなくなるまで洗浄した後、塩化ナトリウムの直線濃度勾配 (0~0.5 M)で溶出した (Fig. 2-12)。主成分である Fr.44~51を集めて濃縮し、精製グルコアミラーゼ画分とした。以上の精製過程を Table 2-4にまとめた。精製酵素標品はディスク電気泳動法で均一であり (Fig. 2-11(B))、第1編第1章に述べた α -アミラーゼ検出法を用いても同活性は見いだせず、またグルコース6-リン

酸に対する活性も検出できなかった。

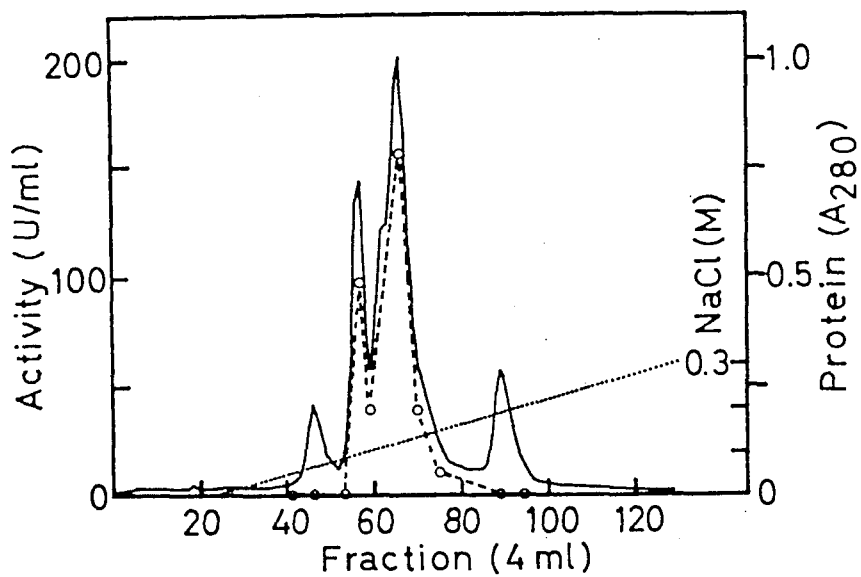


Fig. 2-10. Chromatography (5 ml fractions at 34 ml/h) of the α -amylase fraction on a column (0.9 x 27 cm) of DEAE-Toyopearl 650S.

Keys: —, protein (A₂₈₀); --O--, activity determined by method A; , NaCl concentration.

Table 2-3

Purification of the α -amylase of Aspergillus sp. K-27

| | Protein (mg) | Activity ^a (U) | Specific activity (U/mg) | Recovery (%) |
|--|-----------------|------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| Culture filtrate | 1570 | 24000 | 15.3 | 100 |
| Ammonium sulfate precipitation | 393 | 20100 | 51.1 | 83.8 |
| 2-Propanol precipitation | 251 | 18500 | 73.7 | 77.1 |
| α -CD ^b -Sephadex 6B column | 18.8 | 2780 | 149 | 11.6 (100) ^c |
| Sephadex G-100 column | 15.4 | 2310 | 150 | 9.6 (83.1) |
| DEAE-Toyopearl 650S column (1) | 5.2 | 855 | 163 | 3.6 (30.8) |
| DEAE-Toyopearl 650S column (2) | 4.7 | 770 | 164 | 3.2 (27.7) |

^a Determined by method A (see Experimental).

^b α -Cyclodextrin.

^c At this step, the enzyme preparation was free from glucoamylase, therefore the recovery was taken as 100%.

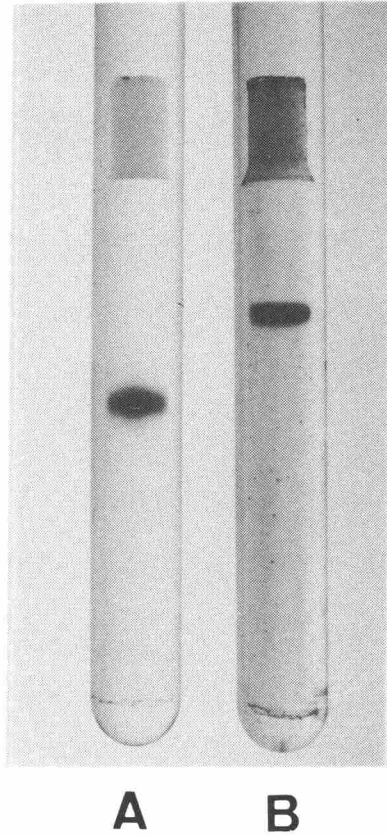


Fig. 2-11. Disc-gel electrophoresis of (A) purified α -amylase and (B) glucoamylase in 7.5% polyacrylamide gels at pH 9.5. The proteins were stained with Coomassie brilliant blue R-250.

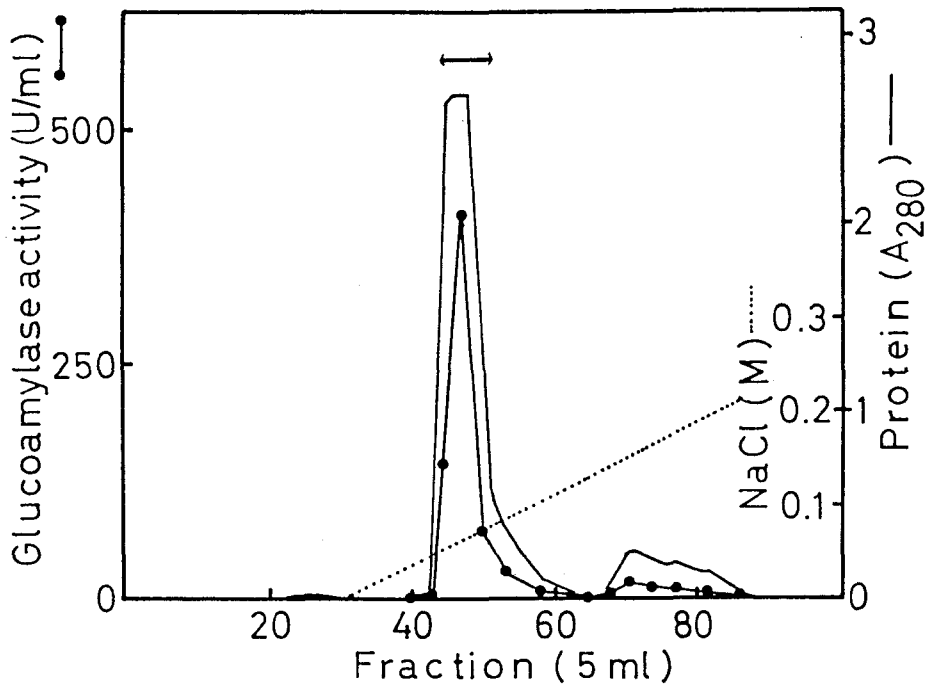


Fig. 2-12. Chromatography (5 ml fractions at 34 ml/h) of the glucoamylase fraction on a column (0.9 x 25 cm) of DEAE-Toyopearl 650M.

Keys: —, protein (A₂₈₀); ●—, activity determined by method B; , NaCl concentration.

Table 2-4

Purification of the glucoamylase of *Aspergillus* sp. K-27

| | Protein (mg) | Activity ^a (U) | Specific activity (U/mg) | Recovery (%) |
|--|-----------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| Culture filtrate | 1570 | 16700 | 10.6 | 100 |
| Ammonium sulfate precipitation | 393 | 15500 | 39.4 | 92.8 |
| Isopropanol precipitation | 251 | 14200 | 56.6 | 85.0 |
| α -CD ^b -Sephadex 6B column | 149 | 13300 | 89.3 | 79.6 |
| DEAE-Toyopearl 650M column | 112 | 10100 | 90.2 | 60.5 |

^a Determined by method B.^b α -Cyclodextrin.

Aspergillus sp. K-27 のグルコアミラーゼの主成分は、Fig. 2-9より明らかのようにFr. 147~163であるが、Fr. 122~137にかけても少量の別のグルコアミラーゼ成分が存在する。前章で述べたように、粗酵素標品中にプロテアーゼ活性はほとんど検出されない。この Fr. 122~137の成分が、*Rhizopus delemar*のグルコアミラーゼG I、G II同様にプロテアーゼやグリコシダーゼによる限定分解により生じたものかどうか今後明らかにする必要がある。

2 α -アミラーゼの性質と作用

精製標品のSDS電気泳動法による分子量は 65,000であった。またディスク電気泳動後、ゲルを蛋白質と糖⁵⁰について染色したところ、両法によるバンドは一致し、糖蛋白質であることが認められた。

可溶性澱粉に対する作用最適 pHは 5.5であり、温度 45°Cまで (pH 5.5、30分処理)、pH 5.5~6.5 (45°C、30分処理)の範囲で安定であった。

α -アミラーゼ標品を基質 1 mgあたり 0.1 Uと 1 Uの酵素量でジャガイモアミロースに作用させたときの分解過程を Fig. 2-13に示す。1 U/mgの量では 6 時間で 60%の分解限度に達し、12時間後も変化はなかった。一方、同量の *A. oryzae* α -アミラーゼ（タカアミラーゼ）⁷²では、アミロースを 1時間で 40%まで分解し、以後徐々に分解が進行した。両者の分解率の相違の原因を明らかにするために、高速液体クロマトグラフにより経時的に生成物を分析した (Fig. 2-14)。いずれの酵素においても、分解初期の主成分の 1つはマルトトリオースであったが、K-27 α -アミラーゼではこれをマルトースとグルコースに分解するのに対し、タカアミラーゼでは長時間後もほとんど分解しなかった。両酵素の作用の差異をさらに明確にするために、種々の基質に対する活性を調べた (Table 2-5)。その結果、上述のマルトトリオースに対する作用以外に次の 2 点の相違が注目される。

(1) K-27 α -アミラーゼは、可溶性澱粉やアミロペクチンよりもアミロースに対し高い相対活性を示す。一方、タカアミラーゼは、これら 3 基質に対してほぼ同じ活性を示す。

(2) K-27 α -アミラーゼは、 β -および γ -サイクロデキストリンに対してタカアミラーゼより高い相対活性を示す。

アミロースは、溶液中では部分的にラセン状構造で存在することが通説になっている⁷³。従って、*Aspergillus* sp. K-27の α -アミラーゼは、ラセン状や環状構造の基質に対する活性が高いことが特徴である。

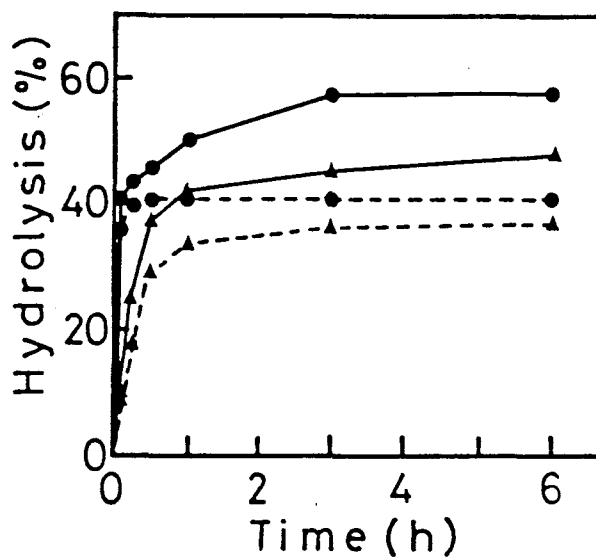


Fig. 2-13. Actions of α -amylases on potato amylose. Each reaction mixture contained 5 mg of amylose and (●) 5 U or (▲) 0.5 U of the enzymes (— K-27, - - - - *A. oryzae*) in 2 ml of 50mM acetate buffer (pH 5.5).

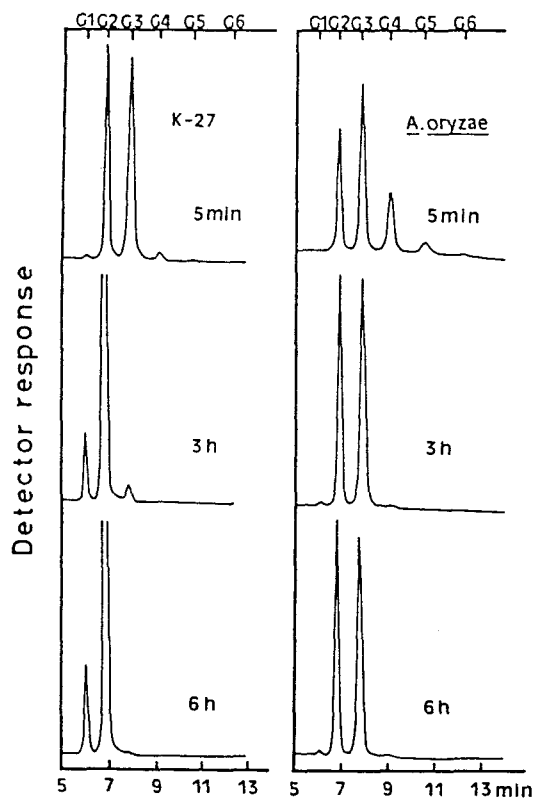


Fig. 2-14. H.p.l.c. chromatograms of the products obtained by the actions of (left) Aspergillus sp. K-27 and (right) A. oryzae α -amylases on amylose. Conditions, see Fig. 2-13.

Table 2-5

Relative activities of the α -amylases of Aspergillus sp. K-27 and Aspergillus oryzae on various substrates

| Substrate (0.5%) | K-27 | <u>A. oryzae</u> |
|------------------------|-------|------------------|
| Maltose | >0.01 | >0.01 |
| Maltotriose | 6.5 | 0.3 |
| α -Cyclodextrin | 1.9 | 1.9 |
| β -Cyclodextrin | 19 | 4.6 |
| γ -Cyclodextrin | 72 | 65 |
| Glycogen (oyster) | 57 | 68 |
| Amylopectin (potato) | 101 | 95 |
| Amylose (potato) | 121 | 102 |
| Soluble starch | 100 | 100 |

3 グルコアミラーゼの性質と作用

精製グルコアミラーゼ標品のSDS電気泳動法による分子量は 76,000であり、Zachariusらの方法⁵⁰により、本酵素も糖蛋白質であることが判明した。

本酵素の可溶性澱粉と生澱粉に対する最適 pHは、それぞれ pH 4.5~7.1と 4.2~5.9であり、生澱粉に対する最適 pHは少し酸性側にシフトすることが認められた。このグルコアミラーゼは、pH 4.0~7.1 (55°C、30分処理)で安定であった。また、55°C、4時間および 60°C、1時間の処理ではそれぞれ 100%、90%の活性を保持しており (Fig. 2-15)、グルコアミラーゼ中では比較的高い耐熱性を示した。しかし、65°C、1時間処理では 80%が失活した。

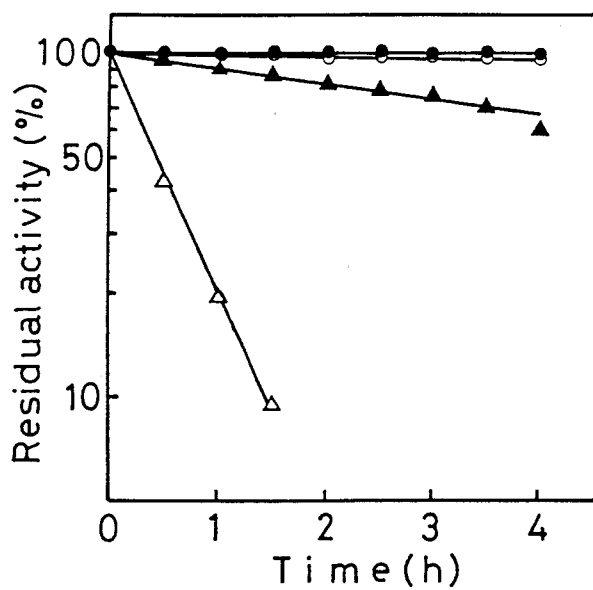


Fig. 2-15. Thermal inactivation of glucoamylase from *Aspergillus* sp K-27. Purified enzyme was incubated at (●) 50°C, (○) 55°C, (▲) 60°C, and (△) 65°C in 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5).

本酵素は 5 mMの Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} などの金属イオンではほとんど影響を受けなかったが、 Hg^{2+} で 15%失活した。 Hg^{2+} は他菌種のグルコアミラーゼでは 30~60%の失活を、 Pb^{2+} や Cu^{2+} もかなりの失活を引き起こすことが知られている。このように、本グルコアミラーゼはこれら金属イオンに対しても比較的耐性が高いことが特徴の一つである。

精製酵素標品を基質 1 mgあたり 1 Uの酵素量でウサギ肝臓グリコーゲンとジャガイモアミロペクチンに作用させると (Fig 2-16)、速やかに分解して 30分でそれぞれ 98%と 81%の分解限度に達し、以後同量の酵素を加えても分解率は変わらなかった。これらの分解率は、第1編第1章で述べた A. nigerや Rhizopus delemarのグルコアミラーゼの分解限度と同一であった。従って、K-27のグルコアミラーゼも A. nigerや R. delemarの酵素と同様に基質中のリン酸エステルによって作用が妨げられる。プルランは 24時間で 90%分解されたが、この分解過程は R. delemarG IIIの場合と類似している。

低分子基質としてマルトースとマルトトリオース、高分子基質としてウサギ肝臓グリコーゲンとジャガイモアミロペクチンを基質として動力学的定数を求め、Table 2-6にまとめた。R. delemarとA. nigerグルコアミラーゼの定数 (第1編第2章 Tables 1-5、1-6)と比較して、次のことが明らかになった。

(1) 低分子基質に対する K-27グルコアミラーゼの K_m 値は、A. nigerの酵素の数値とほぼ同じで、R. delemarのいずれのものよりも小さい。 V_{max} 値は、R. delemarG IIIのものとはほぼ同じである。

(2) 高分子に対する K_m 値はG IIIの値の約半分、G I、G II、A. nigerの酵素の数値に比べ、アミロペクチンで1/1300~1/1400、グリコーゲンでは1/1200~1/2700の小さな値である。 V_{max} 値は、A. nigerのもの約 2倍で、G I、G IIIよりわずかに大きくG IIよりはわずかに小さい。

これらの結果より、Aspergillus sp. K-27のグルコアミラーゼは、低分子

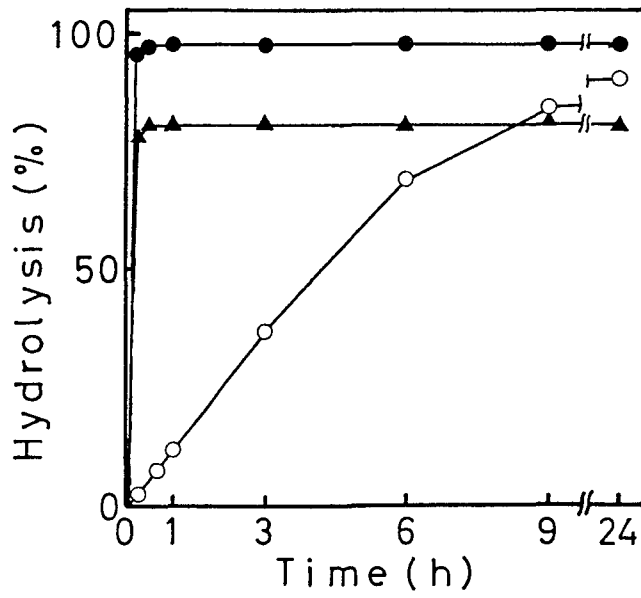


Fig. 2-16. Hydrolyses of (●) glycogen, (▲) amylopectin, and (○) pullulan with the purified glucoamylase from Aspergillus sp. K-27. Conditions, see Fig. 1-7.

Table 2-6

Kinetic constants of K-27 glucoamylase

| Substrate | K_m (μM) ^a | V_{max} (U/nmole) ^b |
|----------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Maltose | 1100 (1300) ^c | 0.60 (0.86) |
| Maltotriose | 350 (440) | 2.8 (4.6) |
| Amylopectin (Potato) | 0.2 (0.2) | 4.9 (5.3) |
| Glycogen (Rabbit liver) | 0.3 (0.3) | 4.3 (6.8) |

^a Concentration of non-reducing, terminal residues.

^b Reaction conditions; 40°C, pH 4.5.

^c The values in parentheses were obtained at 45°C.

基質にも高分子基質にも比較的高い親和性を持つことが明らかである。また、高分子基質に対する K_m 値が非常に小さく、後述するように本グルコアミラーゼは生澱粉への作用も強いことより、R. delemarG III と同様に澱粉結合部位を有することが強く示唆される。

4 α -アミラーゼとグルコアミラーゼの生澱粉に対する作用

A. niger、R. delemar (G III) および Aspergillus sp. K-27 のグルコアミラーゼを澱粉 1 mg あたり 0.1 U の酵素量を用いて 55°C で生トウモロコシ澱粉に作用させたときの反応の経過を Fig. 2-17 に示した。この条件下では K-27 の酵素は他のものより強い生澱粉分解力を示したが、前章で示した粗酵素標品の分解力よりはるかに低いことが認められた。一方、精製 α -アミラーゼの生澱粉分解活性は微弱であった。従って、粗酵素の強い生澱粉分解力は両酵素の相乗効果によるものか、あるいは粗酵素中に未知の因子（例えば枝切り酵素）が存在する可能性を示唆しており、これらを検討するために以下の実験を行った。

20 U のグルコアミラーゼと 0.2~5 U の α -アミラーゼを同時に生トウモロコシ澱粉に作用させたときの分解過程を Fig. 2-18 に示す。 α -アミラーゼの耐熱性を考慮して、反応は 45°C で行った。 α -アミラーゼを 5 U 加えた場合（粗酵素とほぼ同じ割合）では、3 時間で 42%、9 時間で 90% の分解率であり、粗酵素とほぼ同等の分解率が得られた。よって、本菌の酵素系による強力な生澱粉分解作用は、グルコアミラーゼと α -アミラーゼの相乗作用で発揮されることが判明した。さらに、グルコアミラーゼ活性の 1/100 量の α -アミラーゼを加えて作用させたときには、3 時間で 23%、9 時間で 62% の分解率を示した。これらの場合における相乗作用をより明らかにするために、Fig. 2-18 をもとに Fig. 2-19(A) を作成した。本酵素系での生澱粉分解の主役はグルコアミラーゼであり、 α -アミラーゼ自体の澱粉粒分解力は弱いにもかかわらず、グルコアミラーゼによる生澱粉分解を相乗的に高めることが明らかである。いま、相乗効果 (F) を次式で表すと、生トウモロコシ澱粉を基質としたときの F 値は Table 2-7 の

$$F = \frac{[\text{両酵素を同時に作用させたときの分解率}]}{[\text{それぞれ単独で用いたときの分解率の和}]}$$

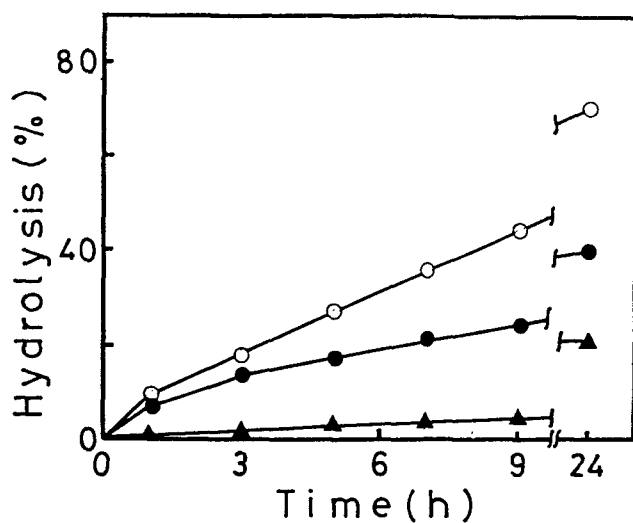


Fig. 2-17. Hydrolyses of raw corn starch with glucoamylases from (O) *Aspergillus* sp. K-27, (●) *R. delemar* GIII and (▲) *A. niger*. The reaction mixture contained 250 mg of raw corn starch, 25 U of enzyme and 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) in a final volume of 5 ml and was incubated at 55°C under mild stirring.

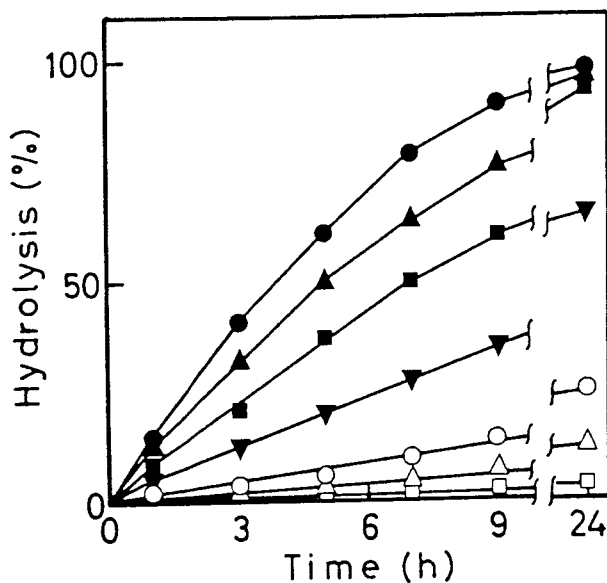


Fig. 2-18. Hydrolyses of raw corn starch with glucoamylase and α -amylase of *Aspergillus* sp. K-27. The reaction mixture containing 250 mg of corn starch, 50 mM of sodium acetate buffer, 20 U of glucoamylase and/or various amount of α -amylase in a final volume of 5 ml was incubated at pH 5.5 and 45°C with mild stirring.

Key: ▼ , glucoamylase alone (20 U); ● , glucoamylase+ α -amylase (5 U);
 ▲ , glucoamylase+ α -amylase (1 U); ■ , glucoamylase+ α -amylase (0.2 U);
 ○ , α -amylase (5 U); △ , α -amylase (1 U); □ , α -amylase (0.2 U).

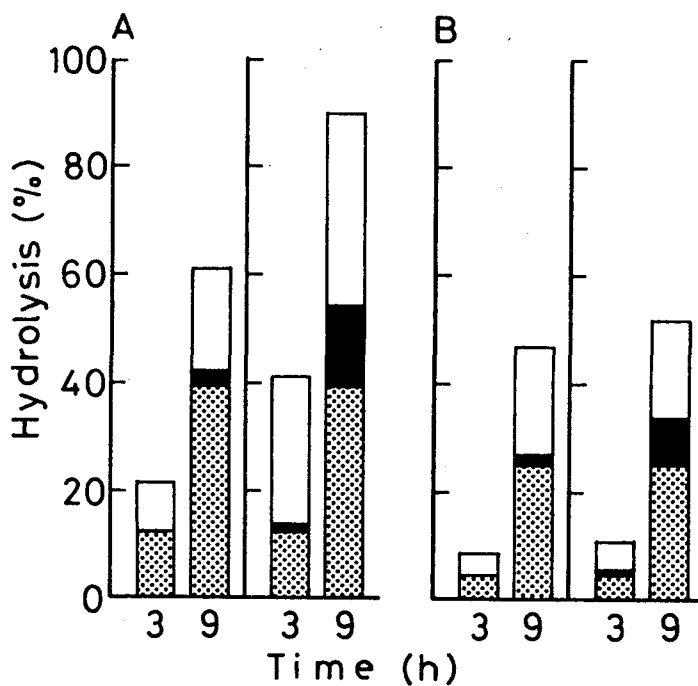


Fig. 2-19. Hydrolyses of (A) raw corn starch and (B) potato starch with 20 U of *Aspergillus* sp. K-27 glucoamylase and (left) 0.2 U and/or (right) 5 U of α -amylase. The dotted and filled, and open bars show hydrolysis with the individual actions of glucoamylase and α -amylase and the increment with the concomitant actions of the two enzymes (synergistic effect), respectively.

Table 2-7

Synergistic effect (F value) of
glucoamylase (20 U) and α -amylase
of Aspergillus sp. K-27

| Incubation (h) | α -Amylase (U) | | |
|-------------------|-----------------------|-----|-----|
| | 5 | 1 | 0.2 |
| 3 | 2.9 | 2.7 | 1.9 |
| 5 | 2.4 | 2.3 | 1.8 |
| 7 | 2.0 | 1.9 | 1.6 |
| 9 | 1.7 | 1.5 | 1.4 |

のようになる。微量 (1%) の α -アミラーゼでさえグルコアミラーゼの作用を大きく促進しており、 α -アミラーゼの混入はグルコアミラーゼの生澱粉分解力に誤った評価を与えることが指摘される。本菌のグルコアミラーゼと α -アミラーゼは生ジャガイモ澱粉の分解においても顕著な相乗作用を示した (Fig. 2-19 (B))。しかしながら、分解速度は生トウモロコシ澱粉の場合よりより少し遅い。

前章で述べたように、Aspergillus sp. K-27 の α -アミラーゼには2つの成分が存在するが、以上の実験は一方だけを用いた。もう1つの α -アミラーゼ画分 (Fr. 60~70、Fig. 2-10) は既述のように混合物であるが、グルコアミラーゼと共に生澱粉に作用させたところ、精製した α -アミラーゼと同様の相乗効果を示した。

5 K-27 α -アミラーゼと *Rhizopus* グルコアミラーゼの相乗作用

Uedaと Kano²⁾は、*Rhizopus* sp.のグルコアミラーゼの生澱粉分解作用が *A. oryzae* α -アミラーゼにより促進されると述べている。そこで本菌の α -アミラーゼも、*R. delemar* グルコアミラーゼの作用を促進するか否かを調べた。*R. delemar* グルコアミラーゼには澱粉結合部位を持つものと持たないものがあるので、相乗作用と澱粉結合部位の有無との関係を明らかにするためにG IIとG IIIについて検討した。

20 Uの *R. delemar* G II、G IIIは、9時間で生トウモロコシ澱粉をそれぞれ4.8%、32%分解したが、これに5 UのK-27 α -アミラーゼを加えると9時間で分解率はそれぞれ21%と75%に上昇した。 α -アミラーゼ単独では同じ条件下で15%分解するので、F値はG IIの場合1.0、G IIIの場合1.6となり、G IIIではK-27 グルコアミラーゼ同様顕著な相乗効果が現れたが、G IIでは観察されなかった。この事実は、K-27 α -アミラーゼと相乗的に作用するためには、グルコアミラーゼが澱粉結合部位を持つ必要があることを示唆する。また、K-27 α -アミラーゼは、他種のグルコアミラーゼとも相乗作用を発揮することも示す。

6 K-27 グルコアミラーゼと他起源の α -アミラーゼの相乗作用

α -アミラーゼとグルコアミラーゼの相乗作用は興味深い問題であるので、*Aspergillus* sp. K-27のグルコアミラーゼと他種の微生物起源の α -アミラーゼとの相乗効果を検討した。 α -アミラーゼは、*A. oryzae*および *Bacillus subtilis*の液化型および糖化型の酵素を用いた。

3種の α -アミラーゼ5 UをK-27 グルコアミラーゼ20 Uと同時に作用させて生トウモロコシ澱粉を分解したところ、Fig. 2-20のようにいずれも明らかな相乗効果を示した。Table 2-8にこれらの作用のF値を示した。これらの結果

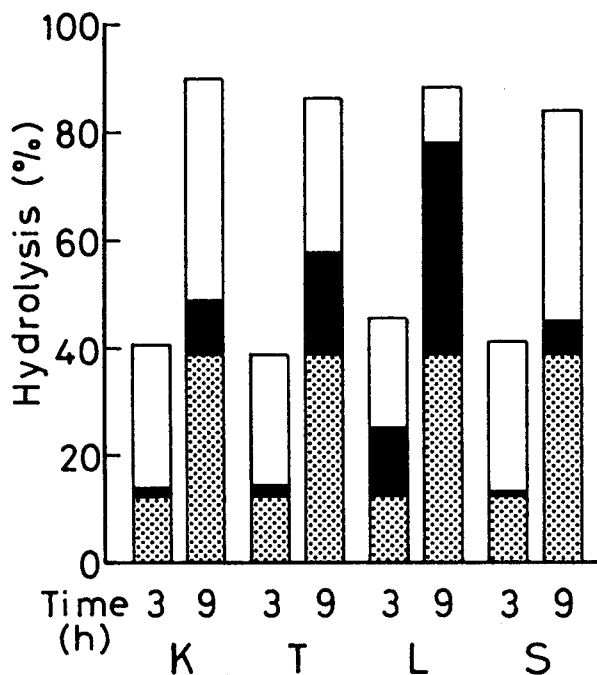


Fig. 2-20. Synergistic actions with 20 U of Aspergillus sp. K-27 glucoamylase and 5 U of α -amylases of various origins on raw corn starch. For details, see Fig. 2-18.

Keys: K, K-27 α -amylase; T, Taka-amylase; L, B. subtilis liquefying-type; S, B. subtilis saccharifying-type; for the other symbols see Fig. 2-19.

Table 2-8

Synergistic effects (F values) of K-27 glucoamylase and α -amylases of other origins on digestion of raw corn starch

| Incubation (h) | <u>A. oryzae</u> | <u>B. subtilis</u> (liquefying-type) | <u>B. subtilis</u> (saccharifying-type) |
|----------------|------------------|---|--|
| 3 | 2.7 | 1.8 | 3.1 |
| 9 | 1.5 | 1.1 | 1.8 |

から、(1) グルコアミラーゼと α -アミラーゼの生澱粉分解における相乗効果は、K-27株の酵素に特異的ではなく普遍的な現象であること、(2) α -アミラーゼ自体の生澱粉に対する作用が小さいほど大きなF値を持つこと、(3) 分解の初期ほど大きな相乗効果を示すことが見いだされた。

相乗効果の本質は、澱粉粒子内におけるアミロペクチンとアミロースの分布、配向などの組織構造に密接に関連していると思われる。Uedaと Kano⁶⁰は、 α -アミラーゼにより澱粉中のアミロースが除かれることにより粒の消化が促進されると推測している。Aspergillus sp. K-27は、アミロース-脂質複合体を炭素源として分離した菌であり、またこの α -アミラーゼはラセン状および環状の基質に強く作用する。これらのことがK-27株の α -アミラーゼとグルコアミラーゼの組合せが最もよく生澱粉に作用することの理由の1つかも知れない。澱粉粒の構造の詳細がいまだ明らかにされていない現在、この相乗効果の機構も明確でないが、分解初期に効果が大きいことは、この現象解明のための1つの鍵かも知れない。また、K-27株の酵素は澱粉粒の構造解析に有効な手段を提供することが期待される。

第4節 要約

Aspergillus sp.K-27株の α -アミラーゼとグルコアミラーゼの分離に、 α -サイクロデキストリンセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーが非常に有効であった。

α -アミラーゼは、タカアミラーゼよりマルトトリオースの分解作用が強く、またサイクロデキストリンやアミロースのようなラセン状、環状の基質に対して強力に作用した。グルコアミラーゼは、他種の酵素よりも熱や金属イオンに対して高い耐性と、低分子基質や高分子基質に高い親和性を示した。また、強力な生澱粉分解作用を示し、Rhizopus delemarグルコアミラーゼG IIIと同様澱粉結合部位を持つことが示唆された。

グルコアミラーゼと α -アミラーゼは、それぞれ単独では生澱粉に対する作用は粗酵素標品よりはるかに弱かったが、両者を同時に作用させると相乗効果により粗酵素とほぼ同等の作用を示した。K-27の精製 α -アミラーゼは、R. delemarG IIIの生澱粉分解をも相乗的に促進したが、澱粉結合部位を持たないG IIに対しては相乗効果を示さず、 α -アミラーゼが相乗作用を発揮するためには、グルコアミラーゼが澱粉結合部位を持つ必要があることが示唆された。K-27のグルコアミラーゼは、A. oryzae、Bacillus subtilisの α -アミラーゼとも生澱粉分解に相乗効果を示すので、この効果は普遍的なものである。また、 α -アミラーゼ自体の生澱粉に対する作用が小さい酵素ほど、また分解の初期ほど大きな相乗効果を示した。

総括

澱粉は自然界に豊富に産生し、エネルギー源としてまた工業原料として高度に利用されている重要な生物資源である。わが国の澱粉の生産量の約 60%は糖化用であり、グルコース、フラクトース、水飴の原料として用いられている。最近では有限の化石資源に代わって、再生産可能な生物資源が重視され、澱粉からエタノールの生産が世界的に注目されている。

澱粉は α -(1-4)-結合と少量の α -(1-4,6)-結合したグルコースのみからなるホモグルカンで、そのままでは水不溶性で酵素の作用を受けにくい。そのため、澱粉の糖化は α -アミラーゼと共に加熱して糊化と液化を同時に行い、ついでこの液化糖（オリゴ糖混合物）をグルコアミラーゼを用いてグルコースに分解する方法が採用されている。従って、澱粉からグルコースやエタノールの生産にグルコアミラーゼは必須の酵素として重要な地位を占めている。

本論文では、第1編第1章で、このグルコアミラーゼ源として代表的な *Aspergillus niger* と *Rhizopus delemar* を選び、これらのグルコアミラーゼを α -アミラーゼ、ホスファターゼがまったく検出できない状態までに純化し、両者の作用の差異を比較検討した。これらの精製酵素標品でジャガイモ澱粉を分解すると、従来の説と異なり、いずれの酵素も完全分解に至らず最終的に高分子の限界デキストリンを残した。この原因を究明するため、限界デキストリンの非還元末端基付近の構造を調べた結果、非還元末端グルコース残基の6位にリン酸基が存在することを見だし、このリン酸エステルがこれらのグルコアミラーゼの作用を妨げることを明らかにした。これらの結果から、従来報告された *Rhizopus* 属のグルコアミラーゼによる澱粉の完全分解は、酵素標品中に混在する α -アミラーゼおよびホスファターゼに起因することを指摘した。

第1編第2章では、前章でディスク電気泳動法などにより見いだした、R.

delemarのグルコアミラーゼの3成分の酵素について、それぞれの構成アミノ酸、糖を定量することにより、これらは固有の分子（G III）が粗酵素標品中に存在するプロテアーゼ、グリコシダーゼによる限定分解を受け、他の2成分（G I、G II）に変化することを示した。また、動力学的解析、生澱粉への作用の検討、キモトリプシンによる限定分解により、G III上には触媒部位とは別に、高分子基質に対し高い親和性を持つ部位が存在することを示唆し、これを「澱粉結合部位」と名付けた。粗酵素標品中のプロテアーゼやキモトリプシンは、この部位を取り除くかまたは大きく改変し、その結果修飾された酵素は高分子基質に対する作用のみが大きく減少することを見いだした。また、キモトリプシンの限定分解により、澱粉結合部位そのものあるいはその一部と考えられるペプチドを得た。

第2編第1章では、澱粉の液化工程を省略することを目的として、生澱粉に強力に作用するグルコアミラーゼを生産する菌を検索した。すなわち、短鎖アミロース-脂質複合体(α -RS)を唯一の炭素源として、生澱粉を強力に分解する酵素の生産菌を分離した。分離した菌のうち、K-2株（細菌）、K-27株（糸状菌）およびK-28株（酵母）の生産する酵素は、いずれも生トウモロコシ澱粉を強力に分解した。従って、 α -RSは生澱粉分解菌分離のための炭素源として有効であった。アミロースの分解様式から、K-2株の酵素標品は α -アミラーゼ、他の2者のものはグルコアミラーゼと α -アミラーゼの混合系であることが判明した。酵素の性質と生産性に着目して、K-27株（*Aspergillus*属）を最終的に選択し、この菌の酵素の生産条件と酵素の性質について詳細に検討した。本菌の酵素の生産は培地に α -メチル-グルコシドを加えることにより倍増し、培養液中にグルコアミラーゼと α -アミラーゼを約7:3の活性比で生産した。この粗酵素標品は、通常非常に分解されにくい生ジャガイモ澱粉も速やかに分解する優れた性質を示した。本菌はプロテアーゼをまったく、

あるいはほとんど生産せず、第1編で見いだした限定分解による生澱粉分解能の消失も認められないため、長期間の保存にも安定であった。このような本酵素の安定性と強力な生澱粉分解力は、澱粉の無蒸煮糖化システムに非常に有利である。最近、富重ら⁷⁴は本酵素をサツマイモやトウモロコシの無蒸煮糖化によるアルコール発酵に応用し、他種の酵素と比較して有利であることを認めている。今後アルコール発酵のみでなく、澱粉質からの種々の醗酵生産にも有用ではないかと期待している。

第2編第2章では、*Aspergillus* sp. K-27株の強力な生澱粉分解のメカニズムを検討した。まず、本菌の生産する粗酵素中の2成分のアミラーゼ、グルコアミラーゼと α -アミラーゼを十分に精製した。単離した α -アミラーゼは、ラセン状および環状の基質に高い活性を示した。一方、グルコアミラーゼは耐熱性、耐金属イオン性を持ち、動力学的解析結果と強力な生澱粉分解力を示すことから、*R. delemar*G IIIと同様に澱粉結合部位を有することが示唆された。両者の生澱粉に対する作用を検討した結果、本酵素系による生澱粉分解の主役はグルコアミラーゼであるが、 α -アミラーゼはこの分解作用を相乗的に促進することを見いだした。この相乗効果は、他起源のグルコアミラーゼと本菌 α -アミラーゼ、および本菌のグルコアミラーゼと他起源の α -アミラーゼ間でも発揮されたが、この相乗作用にはグルコアミラーゼの澱粉結合部位が関与している可能性を示唆した。

本研究により、曖昧であったグルコアミラーゼの澱粉分解限度の問題を、基質中のリン酸エステルによる障害効果を立証することにより解決することができた。これは、酵素を極度に純化したことと、基質と生成物の分子構造の関係を明らかにした結果である。現在、多様な作用を示すアミラーゼが種々発見されているが、古くから知られている α -アミラーゼなどを含めて、これらの作用の特異性については、酵素の純度と関連して慎重に検討することが望まれる。

生澱粉分解力の強弱についても、それぞれの酵素の本来の作用として評価するには、純度の裏付けが必要である。著者の研究は、上記の観点から、今後のアミラーゼの研究に対する1つの指針となれば幸いである。生澱粉の分解に対するグルコアミラーゼと α -アミラーゼの相乗効果は、今後の糖化工業の発展と生澱粉糖化の機構の解明に対する重要な知見である。また、本研究で明らかにされたグルコアミラーゼの構造と機能の関係は、蛋白質と糖の相互作用の研究、グルコアミラーゼそのものや生産菌の遺伝子工学的な手法を用いる改良に対して、興味深い知見であろう。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始ご懇切に御指導下さいました鹿児島大学農学部 檜作進教授に深く感謝します。また、本研究の御指導、御協力下さいました同大学竹田靖史助教授、御協力下さいました同研究室の皆様にお礼申し上げます。

同時に、本論分のご校閲をいただきました大阪大学工学部醗酵工学科岡田弘輔教授、高野光男教授、山田靖宙教授に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1 檜作 進, 化学と生物, 12, 829 (1974).
- 2 北原覚雄, 久島留通俊, 醗工誌, 27, 254 (1949).
- 3 R. W. Kerr, F. C. Cleveland, and W. J. Katzback, J. Am. Chem. Soc., 73, 3916 (1951).
- 4 B. V. MacCleary and M. A. Anderson, Carbohydr. Res., 86, 77 (1980).
- 5 Y. Yamasaki, A. Tsuboi, and Y. Suzuki, Agric. Biol. Chem., 41, 2139 (1977).
- 6 Y. Yamasaki, A. Suzuki, and J. Ozawa, Agric. Biol. Chem., 41, 755 (1980).
- 7 L. L. Philips and M. L. Caldwell, J. Am. Chem. Soc., 73, 3559 (1951).
- 8 G. Okada, J. Jpn. Soc. Starch Sci., 21, 283 (1974).
- 9 J. Sukhumavasi, K. Kato, and T. Harada, J. Ferment. Technol., 53, 559 (1975).
- 10 R. De Mot and H. Verchtert, Appl. Environ. Microbiol., 50, 1474 (1985).
- 11 I. Spencer-Martin, Appl. Environ. Microbiol., 44, 1253 (1982).
- 12 R. H. Hopkins and D. Kuluka, Arch. Biochem. Biophys., 69, 45 (1957).
- 13 H. Ebertoba, Folia Microbiol., 8, 333 (1963).
- 14 B. Simoes-Mendes, Can. J. Microbiol., 30, 1163 (1984).
- 15 H. H. Hyun and J. G. Zeikus, Appl. Environ. Microbiol., 49, 1168 (1981).
- 16 Y. Tsujisaka, J. Fukumoto, and Y. Yamamoto, Nature, 181, 770 (1958).
- 17 Y. Ohta and S. Ueda, Stärke, 19, 363, (1967).
- 18 S. Hizukuri, S. Tabata, and Z. Nikuni, Stärke, 22, 338 (1970).

- 19 S. Tabata and S. Hizukuri, *Stärke*, 23, 267 (1971).
- 20 J. D. Fontana, *FEBS Lett.*, 109, 85 (1980).
- 21 山本武彦, 鶴川増文, 福本寿一郎, アミラーゼシンポジウム・プロシーディング, 4, 11 (1969).
- 22 J. J. Marshall and W. J. Whelan, *FEBS Lett.*, 9, 85 (1970).
- 23 J. J. Marshall, *Anal. Biochem.*, 85, 541 (1978).
- 24 M. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, 195, 19 (1952).
- 25 N. Nelson, *J. Biol. Chem.*, 153, 375 (1944).
- 26 D. M. Kilburne and P. M. Taylor, *Anal. Biochem.*, 22, 555 (1969).
- 27 T. Tashima, *Anal. Biochem.*, 69, 410 (1975).
- 28 O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
- 29 L. H. Koehler, *Anal. Biochem.*, 24, 1576 (1952).
- 30 K. Itaya and M. Ui, *Clin. Chim. Acta*, 14, 361 (1966).
- 31 S. Hizukuri and S. Osaki, *Carbohydr. Res.*, 63, 261 (1978).
- 32 Y. Takeda and S. Hizukuri, *Carbohydr. Res.*, 89, 174 (1981).
- 33 J. H. Pazur and T. Ando., *J. Biol. Chem.*, 234, 1966 (1959).
- 34 D. R. Lineback, J. J. Russel, and C. Rasmussen, *Arch. Biochem. Biophys.*, 134, 539 (1969).
- 35 K. L. Smiley, D. E. Hensley, M. J. Smiley, and H. J. Gasdorf, *Arch. Biochem. Biophys.*, 144, 694 (1971).
- 36 J. Hollo, E. Laszlo, and A. Hoschke, *Stärke*, 25, 1 (1973).
- 37 L. Sundberg and J. Porath, *J. Chromatogr.*, 90, 87 (1974).
- 38 S. Hizukuri, Y. Takeda, M. Yasuda, and A. Suzuki, *Carbohydr. Res.*, 94, 205 (1981).

- 39 Y. Takeda, S. Hizukuri, Y. Ozono, and M. Suetake, *Biochim. Biophys. Acta*, 302, 362 (1983).
- 40 J. Abe, S. Hizukuri, K. Koizumi, and T. Utamura, *Carbohydr. Res.*, 154, 81 (1986).
- 41 Y. Takeda and S. Hizukuri, *Carbohydr. Res.*, 102, 321 (1982).
- 42 T. Mitsue, B. C. Saha, and S. Ueda, *J. Appl. Biochem.*, 1, 410 (1979).
- 43 T. Takahashi, Y. Tsuchida, and M. Irie, *J. Biochem.*, 92, 1623 (1982).
- 44 E. Yoshino and S. Hayashida, *J. Ferment. Technol.*, 56, 289 (1978).
- 45 J. Park and M. J. Johnson, *J. Biol. Chem.*, 181, 149 (1949).
- 46 H. Edelhoich, *Biochemistry*, 6, 1948 (1967).
- 47 S. Moore, *J. Biol. Chem.*, 238, 235 (1963).
- 48 J. H. Sloneker, *Methods Carbohyd. Chem.*, 6, 20 (1972).
- 49 Y. Takeda and S. Hizukuri, *Biochim. Biophys. Acta*, 185, 469 (1969).
- 50 R. M. Zacharius, T. E. Zell, J. H. Morrison, and J. J. Woodlock, *Anal. Biochem.*, 30, 148 (1969).
- 51 K. Hiromi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40, 1 (1970).
- 52 K. Hiromi, Y. Nitta, C. Numata, and S. Ono, *Biochim. Biophys. Acta*, 302, 362 (1973).
- 53 R. J. Fletterick, J. Sygusch, H. Semple, and N. B. Madsen, *J. Biol. Chem.*, 251, 6142 (1976).
- 54 J. Larner, Y. Takeda, and S. Hizukuri, *Mol. Cell. Biochem.*, 12, 131 (1976).
- 55 S. Hayashida, S. Kunisaki, M. Nakao, and P. Q. Flor, *Agric. Biol. Chem.*, 46, 83 (1982).
- 56 B. C. Saha and S. Ueda, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 341 (1984).

- 57 T. Takahashi, Y. Tsuchida, and M. Irie, *J. Biochem.*, 98, 663 (1985).
- 58 B. Svensson, K. Larsen, and A. Grnmarsson, *Eur. J. Biochem.*, 154, 497 (1986).
- 59 上田誠之助, 農化, 31, 898 (1957).
- 60 S. Ueda and K. Kano, *Stärke*, 27, 123 (1975).
- 61 久留島通俊, 佐藤淳司, 北原覚雄, 農化, 48, 48 (1974).
- 62 S. Smith and D. R. Lineback, *Stärke*, 28, 243 (1976).
- 63 H. Taniguchi, G. M. Lae, N. Yoshigi, and Y. Maruyama, *Agric. Biol. Chem.*, 47, 511 (1983).
- 64 H. Ishigami, H. Hashimoto, and K. Kainuma, *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 32, 189 (1985).
- 65 檜作 進, 竹田靖史, 松林卓哉, 澱粉科学, 26, 112 (1979).
- 66 檜作 進, 澱粉科学, 34, 98 (1987).
- 67 K. Kainuma and D. French, *FEBS Lett.*, 5, 257 (1969).
- 68 J. Robyt and D. French, *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 451, (1963).
- 69 J. Okuda, I. Miwa, K. Maeda, and T. Tokui, *Carbohydr. Res.*, 58, 267 (1977).
- 70 T. Yasui, K. Nakanichi, and T. Kobayashi, *J. Ferment. Technol.*, 58, 79 (1980).
- 71 K. Kainuma, *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 32, 136 (1985).
- 72 Y. Takeda and S. Hizukuri, *Carbohydr. Res.*, 153, 295 (1986).
- 73 J. Szejtli, M. Richter, and S. Augstat, *Biopolymers*, 5, 5 (1967).
- 74 富重敏郎, 長谷川敏行, 渡辺仁, 斉木隆, 唐木功, 小幡和哲, 檜作進, 日農化大会講演要旨集, pp. 471 (1986).

本論文に関係のある報告

- 1 Action of glucoamylase from Aspergillus niger on phosphorylated substrate
Biochimica et Biophysica Acta, 703, 26 (1982).
- 2 Kinetic and structural properties of three forms of glucoamylase from Rhizopus delemar
Journal of Applied Biochemistry, 7, 235 (1985).
- 3 Selection of microorganisms which produce raw-starch degrading enzyme(s)
Applied Microbiology and Biotechnology, in press.
- 4 Production of the raw-starch digesting amylase of Aspergillus sp. K-27
Applied Microbiology and Biotechnology, in press.
- 5 Properties of the raw-starch digesting amylase of Aspergillus sp. K-27: A synergistic action of glucoamylase and α -amylase
Carbohydrate Research, in press.
- 6 Removal of the starch-binding site of Rhizopus delemar glucoamylase by limited proteolysis
J. Jpn. Soc. Starch Sci, in press.