

Corticium rolfii のグルコアミラーゼに関する研究

学位論文内容の要旨

グルコース製造工業においては、通常原料とする生デンプンの水懸濁物を加熱蒸煮し、糊化した後、 α -アミラーゼ、ついでグルコアミラーゼを作用させ、グルコースにまで分解するという工程がとられている。近年、エネルギー節約の観点より、多大なエネルギーを費やす蒸煮の工程を省略し一段階でグルコースに変換する方法が提案され、その実現のネックとなっている強力かつコストの安い酵素の探索が行われてきている。

当研究室において単離された担子菌 *Corticium rolfii* の分泌する生デンプン糖化酵素は、生デンプンの無蒸煮糖化に要求される条件—高濃度生デンプン懸濁液、酸性条件下 (pH 3.0 - 4.0)—のもとで市販の酵素に比べ強力に作用する優れた酵素である。しかし、培養の難しさからまだ実用化には至っていない。そこでこの酵素の生デンプン分解活性の要因を探ること、そしてその遺伝子の有効利用を目的として研究を行った。

本研究の結果を要約すると以下のとおりである。

1. 生デンプン糖化酵素の成分解析

C. rolfii の生デンプン糖化酵素 (粗酵素) には 3 種類の生デンプン分解性グルコアミラーゼ (G1, G2, G3)、2 種類の生デンプン非分解性グルコアミラーゼ (G4, G5)、および 1 種類の生デンプン非分解性 α -アミラーゼが含まれる。精製酵素の検討から G1 - G3 は酵素活性は同じであり、生デンプン分解活性が粗酵素にくらべ弱く、とくにジャガイモ生デンプンに対してはほとんど分解が起こらなくなることなどがわかっている。そこで精製 G2 を用いて何が原因かを調べた。その結果、極微量 (グルコアミラーゼの約 1 / 50 量) の α -アミラーゼの存在によってジャガイモ生デンプンの加水分解が劇的に進行し、粗酵素の生デンプン分解活性を再現できることなどが明らかとなった。

2. cDNA クローニングおよび酵母における発現

生デンプン分解性グルコアミラーゼ G2 の cDNA クローニングを行った。得られたクローンは 579 残基からなるポリペプチド鎖をコードする完全長の cDNA クローンであり、推定アミノ酸配列は、リジルエンドペプチダーゼ消化によって得られたペプチドの内部アミノ酸配列と完全に一致し、グルコアミラーゼの活性ドメイン、デンプン粒吸着ドメイン (SBD)、および両ドメインをつなぐリンカー領域が認められた。他の糸状菌由来のグルコアミラーゼとの相同性は 35% から 56% で *Aspergillus niger* のグルコアミラーゼと最も高い相同性を有していた。また SBD とリンカー領域にいくつかの特徴がみられた。

SBD はデンプン粒への吸着機能を持ち、生デンプンの分解に必須のドメインである。

C. rolfii グルコアミラーゼはドメイン内部のマルトース結合サイトの一つ "2b" の両側に存在している保存性の高い Ala 残基と Tyr 残基がなかった。また SBD の両端にあり、ジスルフィド結合を形成しているといわれている保存性の高い 2 つの Cys 残基も見られなかった。

リンカー領域は、活性ドメインと SBD の間にあり、両ドメインを連結している領域である。これまでに配列が報告されているグルコアミラーゼの中で *C. rolfii* はこの部分が最も短く、後半部の TS 領域 (または TS 配列とも呼ばれ、Thr、Ser 残基を多く含み、O-グリコシド鎖が豊富に連結している領域) が見られなかった。

得られた cDNA を酵母で発現させるため、アルコールデヒドロゲナーゼのプロモーターを持つ酵母発現用ベクター pAAH 5 に連結し、*Saccharomyces cerevisiae* に導入した。形質転換酵母は、糊化および生デンプン分解能を獲得したが、発現のレベルは非常に低かった (0.001 U/ml)。

3. 麹菌における発現

異種遺伝子の発現と酵素分泌に優れた麹菌 *A. oryzae* を宿主とし、ホスホグリセレートキナーゼのプロモーターを持つ *A. oryzae* 発現用ベクター pBPT に cDNA を連結し、発現を試みた。その結果、培地の最適化を経て、1 ℓ あたり約 140 mg (3.5 U/ml) の生産に成功した。発現した *C. rolfii* グルコアミラーゼ (G2AO) を精製し、その性質を解析したところ、生デンプン分解活性、糊化デンプン分解活性ともに *C. rolfii* 培養上清由来の G2 (天然型 G2) とほぼ同じであったが、分子量の増加と安定性の低下がみられた。エンドグリコシダーゼ H によって N-グリコシド鎖を除去したところ、両酵素の分子量は共に減少し 64 kDa に一致したので、分子量とおそらく安定性の差は、N-グリカンの差に起因すると推察された。

4. キメラ酵素の作製

C. rolfii グルコアミラーゼの各ドメインを他菌株由来のグルコアミラーゼと組換えたキメラ酵素を設計し、*A. oryzae* で発現させ、精製後解析を行った。組換えの相手として、グルコアミラーゼの中でも生デンプン分解活性が強く、TS 領域を持ち、解析の進んでいる *A. awamori* var. *kawachi* のグルコアミラーゼ GAI を選び、ドメインを組換えたキメラ酵素を 2 種類作製し、オリジナルの酵素とともに諸性質を解析した。比活性に関しては、ほとんど差は見られなかった。活性安定性に関して、各キメラ酵素はその活性ドメインの由来するオリジナルの酵素に似た結果を示し、基質を糊化デンプンとした場合と生デンプンとした場合とで全く同じ結果であったため、生デンプン分解性グルコアミラーゼの安定性は、ほぼその活性ドメインに由来すると推察された。 α -アミラーゼの存在下、ジャガイモ生デンプンの長時間にわたる加水分解実験を行ったところ、天然型 G2、*A. oryzae* にて生産された GAI、および 2 つのキメラ酵素は、ほぼ同程度の優良な結果を示したが、*A. oryzae* にて生産された G2 (G2AO) は低い分解率にとどまった。これより、安定性の低下した *C. rolfii* グルコアミラーゼへの TS 領域の付加が、安定性の向上効果ではなく、実際に生デンプンの加水分解を促進していることが示唆された。

今までに生デンプン分解性グルコアミラーゼの機能を解析するために、部位特異的変異や、同一酵素内でのドメインの組換え (欠失や重複) などの手法が行われてきている

が、他菌株の酵素とドメインを組換えた手法はとられていない。キメラ酵素の諸性質については現在さらに解析をすすめており、SBD の生デンプンに対する吸着様式に違いのあることがわかってきている。今後さらに、酵素分子における各ドメインの関連や機能をより明らかにするとともに、他菌株由来の酵素とのドメインごとの機能を比較することで、生デンプン分解活性、安定性、さらに生産性に優れた新しい酵素の設計が可能になると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男

副 査 教 授 千 葉 誠 哉

副 査 助 教 授 横 田 篤

学 位 論 文 題 名

Corticium rolfsii のグルコアミラーゼに関する研究

本論文は、和文 111 頁、図 40、表 20、引用文献 85、6 章からなり、ほかに参考文献 4 編が付されている。

グルコース製造工業においては、通常原料とする生デンプンを加熱蒸煮し、糊化した後、 α -アミラーゼ、ついでグルコアミラーゼを作用させ、グルコースにまで分解するという工程がとられている。近年、エネルギー節約の観点より、多大なエネルギーを費やす蒸煮の工程を省略し一段階でグルコースに変換する方法が提案され、その実現のネックとなっている強力かつコストの安い酵素の探索が行われてきている。

当研究室において単離された *Corticium rolfsii* の分泌する生デンプン糖化酵素は、市販の酵素に比べ強力に作用することができる今までにない優れた酵素であり、産業的に生産を試みるところまで応用が進んだものの、培養の難しさからまだ実用化にはいたっていない。

そこでこの酵素の強力な生デンプン分解活性の要因を探ること、そしてその遺伝子の有効利用を目的として研究を行った。

1. 生デンプン糖化酵素の成分解析

C. rolfsii の生デンプン糖化酵素 (粗酵素) には 3 種類の生デンプン分解性グルコアミラーゼ (G1, G2, G3)、2 種類の生デンプン非分解性グルコアミラーゼ (G4, G5)、及び 1 種類の生デンプン非分解性 α -アミラーゼが含まれる。精製酵素の性質として、G1 - G3 は酵素活性についてはほぼ同じであること、生デンプン分解活性が粗酵素にくらべ弱く、とくにジャガイモ生デンプンに対してはほとんど分解が起こらなくなることなどがわかっている。そこで精製 G2 を用いてその差をうめるのには何が必要なのかを調べた結果、微量の α -アミラーゼの添加によって粗酵素の生デンプン分解活

性を再現できることなどが明らかとなった。

2. cDNA クローニングおよび酵母における発現

生デンプン分解性グルコアミラーゼ G2 の cDNA クローニングを行った。得られたクローンは 579 残基からなるポリペプチド鎖をコードしており、グルコアミラーゼの活性ドメイン、デンプン粒吸着ドメイン (SBD)、および両ドメインをつなぐリンカー領域が認められた。

SBD はデンプン粒への吸着機能を持ち、生デンプンの分解に必須のドメインである。*C. rolfisii* グルコアミラーゼはドメイン内部のマルトース結合サイトの一つ "2b" の両側に存在している保存性の高い Ala 残基と Tyr 残基がなかった。また SBD の両端にあり、ジスルフィド結合を形成しているといわれている保存性の高い 2 つの Cys 残基も見られなかった。

リンカー領域は、活性ドメインと SBD の間にあり、両ドメインを連結している領域である。これまでに配列が報告されているグルコアミラーゼの中で *C. rolfisii* はこの部分が最も短く、後半部の TS 領域 (Thr、Ser 残基を多く含み、O-グリコシド鎖が豊富に連結している領域) が見られなかった。

得られた cDNA を *S. cerevisiae* に導入したところ、形質転換酵母は、糊化および生デンプン分解能を獲得したが、発現のレベルは非常に低かった (0.001 U/ ml)。

3. 麹菌における発現

異種遺伝子の発現と酵素分泌に優れた麹菌 *A. oryzae* を宿主とし、発現を試みた。その結果、培地の最適化を経て、1 L あたり約 140 mg (3.5 U/ ml) の生産に成功した。発現した *C. rolfisii* グルコアミラーゼ (G2AO) を精製し、その性質を解析したところ、生デンプン分解活性、糊化デンプン分解活性ともに *C. rolfisii* 培養上清由来の G2 (native G2) とほぼ同じであったが、分子量の増加と安定性の低下が起きている。

4. キメラ酵素の作製

C. rolfisii グルコアミラーゼの各ドメインを *A. awamori* var. *kawachi* のグルコアミラーゼ GAI と組換えたキメラ酵素を設計し、*A. oryzae* で発現させた。キメラ酵素を 2 種類と、オリジナルの酵素の諸性質を解析したところ、比活性に関しては、ほとんど差は見られなかった。安定性に関しては、ほぼその活性ドメインに由来すると推察された。生デンプンの加水分解実験では、native G2、*A. oryzae* にて生産された GAI、および 2 つのキメラ酵素はほぼ同程度の優良な結果を示したが、*A. oryzae* にて生産された G2 (G2AO) は低い加水分解率にとどまった。

以上のように本研究は、生デンプン分解性酵素分子に関する学術的な寄与が大きいものであるとともに、応用的にも寄与するところが大きな成果である。

よって、審査員一同は、永 坂 曜 介が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。