

学位論文題名

Penicillium 属糸状菌の生産する
exo-inulinase および endo-inulinase

学位論文内容の要旨

inulinase はフルクトースの重合体であるイヌリンに作用してフルクトースまたはイヌロオリゴ糖を生成する加水分解酵素である。微生物および植物起源の多くの酵素が報告されてきたが、詳細な基質特異性や生成した糖の還元基のアノマー型について十分に解明されていなかった。また、endo-inulinase をコードする遺伝子を取得した例は報告されていなかった。本研究は、inulinase の反応機構の解析と機能性オリゴ糖の生産を目的に、2 種の *Penicillium* 属糸状菌の生産する exo-inulinase および endo-inulinase を精製し、これまで未解明であった酵素化学的特徴を詳細に検討した。さらに、イヌロオリゴ糖製造に有用と考えられる endo-inulinase をコードする cDNA および遺伝子をクローン化し、塩基配列および遺伝子の構造を解析した。

1. *P. trzebinskii* 由来 exo-inulinase の精製と酵素化学的解析

P. trzebinskii 由来 exo-inulinase の精製法を確立してその諸性質を明らかにした。分子量は SDS-PAGE およびゲルろ過クロマトグラフィーで 87,000 と推定され、至適 pH は 5.2、 Ag^+ イオン、 Hg^{2+} イオンおよび PCMB によって強く阻害された。本酵素はイヌリンを exo 型に加水分解してフルクトースを生成し単糖類にまで 100% 加水分解することを還元糖量および TLC で確認した。また、イヌリンから生成したフルクトースのアノマー型を ^{13}C -NMR 法を用いて解析し、生成したフルクトースのアノマー型は β 型を保持しており、 β -フルクトピラノースおよび α -フルクトフラノースは β -フルクトフラノースの変旋光の結果生じることが初めて明らかになった。

さらに、イヌリン、ショ糖、イヌロオリゴ糖、フルクトオリゴ糖およびネオケストースに関する水解の速度パラメータを算出し、詳細に基質特異性を検討した。その結果、イヌリンとショ糖の分解速度比が基質濃度によって大きく変化し、高基質濃度下ではショ糖はイヌリンとほぼ同じ速度（106%）で加水分解されるものの、低基質濃度下ではイヌリンの約 0.7% の速度で加水分解されることが明らかとなった。三糖～五糖のイヌロオリゴ糖に比べ二糖（イヌロビオース）は加水分解されにくいことおよびショ糖の水解は特殊であり他のオリゴ糖とは異なることが明らかとなった。そして、本酵素のサブサイト親和力および真の加水分解速度定数を求めたところ、サブサイト理論が exo-inulinase にも適用できることが初めて明らかとなり、それにより基質特異性を矛盾なく説明できた。一方、これまで報告のなかった触媒反応の中心残基となる必須活性解離基について、 pK_a 値、 ΔH_a 値および 20% メタノール添加反応系における pK_a 値の変動から、2 つのカルボキシル基と推定され、従来、報告されていた SH 酵素であるとの説が修正された。

2. *P. purpurogenum* 由来 endo-inulinase の精製と酵素化学的解析

P. pupurogenum 由来 *endo-inulinase* の精製法を確立してその諸性質を明らかにした。分子量は SDS-PAGE およびゲルろ過クロマトグラフィーのいずれの方法でも 54,000、中性糖含量 (1.1%)、およびアミノ糖含量 (0.7%)、さらに glycosidase 処理による糖鎖除去試験から、単糖類換算で約 6 残基のアスパラギン結合型糖鎖 (分子量 約 1,000) を持つ糖タンパク質であることを明らかにした。至適 pH は 5.1 であり、 Cu^{2+} イオン、 Hg^{2+} イオンおよび PCMB によって強く阻害された。

本酵素のイヌリンに対する分解限度は、フルクトース換算で分解率約 40% であった。一方、ショ糖を用いた場合には、反応 48 時間後での分解率は 0.81% であった。また、レバンおよびラフィノースには全く作用しなかった。イヌリンおよびフルクトオリゴ糖に対する作用を経時的に調べ、イヌリンからは三糖～五糖のイヌロオリゴ糖が蓄積し、四糖以下のオリゴ糖にはほとんど作用しないことがわかった。また、 ^{13}C -NMR 法を用いてイヌリンおよび GF₉ から生成したオリゴ糖の還元末端フルクトースのアノマー型について解析したところ、*exo-inulinase* の場合と同様に、いずれの基質を用いても生成オリゴ糖の還元末端フルクトースのアノマー型は β 型を保持していることがわかった。

イヌリンおよびフルクトオリゴ糖について詳細に基質特異性を検討したところ、各速度パラメータは基質重合度に依存して大きく変化すること、 k_0 値はフルクトース残基の重合度 7 以上でほぼ一定となることなどから、*endo-inulinase* が少なくとも 7 個のサブサイトを持っていると推定された。*endo-inulinase* についても必須活性解離基を調べ、*exo-inulinase* と同様に 2 つのカルボキシル基であることが推定された。

3. *P. pupurogenum* 由来 *endo-inulinase* のをコードする cDNA および遺伝子の単離と解析

P. pupurogenum 由来 *endo-inulinase* の部分分解ペプチドのアミノ酸配列解析を行い、N 末端アミノ酸配列を含む、全アミノ酸残基の約 35% を決定した。

endo-inulinase をコードする 4 個の cDNA クローンの単離に初めて成功した。その塩基配列を解析したところ、25 アミノ酸残基のシグナルペプチドと、490 アミノ酸残基の成熟タンパク質をコードしていることが明らかにされた。前駆体タンパク質および成熟タンパク質の分子量はそれぞれ 55,520 および 52,906 と計算され、成熟タンパクの分子量から算出された糖鎖除去後の分子量 53,000 とよく一致した。

推定アミノ酸配列の相同性検索の結果、*B. subtilis* 由来 *levanase* と 39% の相同性を示した。また、*S. cerevisiae* 由来 *invertase* および *K. marxianus* 由来 *exo-inulinase* に対してそれぞれ 29% および 27% の相同性を示した。また、*invertase* 遺伝子において触媒残基を含むとされている β -fructosidase モチーフ領域は完全に保存されていた。さらに、もう一つの触媒残基と考えられる ECP 配列は本酵素においても EVP としてほぼ完全に保存されており Glu43 と Glu233 が触媒作用に直接関与するアミノ酸残基であると考えられた。この結果は、2 つのカルボキシル基が必須活性解離基であるとする反応速度論実験の結果に一致した。さらに、高重合度フルクタンに作用する酵素にのみ存在するとされる SVEVF 配列も 100% 保存されていた。総合的に判断して、ファミリー 32 の glucosyl hydrolase では、触媒作用を持つ N 末端側部分の DNA セグメントが共通の祖先から進化したとする説を支持する結果を得られた。

また、*endo-inulinase* をコードするゲノミック DNA クローンの単離に初めて成功した。この *endo-inulinase* 遺伝子 (*INU A*) の塩基配列を解析したところ、*INU A* 遺伝子は *P. pupurogenum* のゲノム上にシングルコピーで存在すること、*INU A* 遺伝子中に介在配列は認められないこと、および TATA box やターミネーターと推定される配列が確認された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 井 博 和

副 査 教 授 木 村 淳 夫

副 査 教 授 横 田 篤

学 位 論 文 題 名

Penicillium 属糸状菌の生産する exo-inulinase および endo-inulinase

本論文は、図 44、表 15、引用文献 203 を含み、6 章からなる総頁 177 の和文論文である。別に参考論文 29 編が添えられている。

inulinase はフルクトースの重合体であるイヌリンに作用してフルクトースまたはイヌロオリゴ糖を生成する加水分解酵素である。微生物および植物起源の多くの酵素が報告されてきたが、詳細な基質特異性や生成した糖の還元基のアノマー型について十分に解明されていなかった。また、endo-inulinase をコードする遺伝子を取得した例は報告されていなかった。本研究は、inulinase の反応機構の解析と機能性オリゴ糖の生産を目的に、2 種の *Penicillium* 属糸状菌の生産する exo-inulinase および endo-inulinase を精製し、これまで未解明であった酵素化学的特徴を詳細に検討した。さらに、イヌロオリゴ糖製造に有用と考えられる endo-inulinase をコードする cDNA および遺伝子をクローン化し、塩基配列および遺伝子の構造を解析した。

1. *P. trzebinskii* 由来 exo-inulinase の精製と酵素化学的解析

P. trzebinskii 由来 exo-inulinase の精製法を確立してその諸性質を明らかにした。分子量は SDS-PAGE およびゲルろ過クロマトグラフィーで 87,000 と推定され、至適 pH は 5.2、金属イオン等より強く阻害された。イヌリンを exo 型に加水分解してフルクトースを生成し単糖類にまで 100%加水分解することを確認した。生成するフルクトースのアノマー型を ^{13}C -NMR 法を用いて解析し、アノマー保持型酵素であることを初めて明らかにした。

さらに、イヌリン、ショ糖、イヌロオリゴ糖、フルクトオリゴ糖およびネオケストースに関する水解の速度パラメータを算出し、詳細に基質特異性を検討した。そして、本酵素のサブサイト親和力および真の加水分解速度定数を求めたところ、サブサイト理論が exo-inulinase にも適用できることが初めて明らかとなり、それにより基質特異性を矛盾なく説明できた。一方、これまで報告のなかった触媒反応の中心残基となる必須活性解離基について、 pK_a 値、 ΔH_a 値および 20%メタノール添加反応系における pK_a 値の変動が

ら、2つのカルボキシル基と推定され、従来、報告されていた SH 酵素であるとの説が修正された。

2. *P. purpurogenum* 由来 endo-inulinase の精製と酵素化学的解析

P. purpurogenum 由来 endo-inulinase の精製法を確立してその諸性質を明らかにした。分子量は SDS-PAGE およびゲルろ過クロマトグラフィーのいずれの方法でも 54,000、中性糖含量 (1.1%)、およびアミノ糖含量 (0.7%)、さらに glycosidase 処理による糖鎖除去試験から、単糖類換算で約 6 残基のアスパラギン結合型糖鎖 (分子量 約 1,000) を持つ糖タンパク質であることを明らかにした。至適 pH は 5.1 であった。

本酵素のイヌリンに対する分解限度は約 40% であった。一方、レバンおよびラフィノースには全く作用しなかった。イヌリンおよびフルクトオリゴ糖に対する作用を経時的に調べ、イヌリンからは三糖~五糖のイヌロオリゴ糖が蓄積し、四糖以下のオリゴ糖にはほとんど作用しないことがわかった。また、 ^{13}C -NMR 法を用いて遊離する還元末端フルクトースのアノマー型について解析したところ、 β 型を保持していることがわかった。

イヌリンおよびフルクトオリゴ糖について詳細に基質特異性を検討したところ、各速度パラメータは基質重合度に依存して大きく変化すること、 k_0 値はフルクトース残基の重合度 7 以上ではほぼ一定となることなどから、endo-inulinase が少なくとも 7 個のサブサイトを持っていると推定された。endo-inulinase についても必須活性解離基を調べ、exo-inulinase と同様に 2 つのカルボキシル基であることが推定された。

3. *P. purpurogenum* 由来 endo-inulinase のをコードする cDNA および遺伝子の単離と解析

P. purpurogenum 由来 endo-inulinase の部分分解ペプチドのアミノ酸配列解析を行い、N 末端アミノ酸配列を含む、全アミノ酸残基の約 35% を決定した。

endo-inulinase をコードする 4 個の cDNA クローンの単離に初めて成功した。その塩基配列を解析したところ、25 アミノ酸残基のシグナルペプチドと、490 アミノ酸残基の成熟タンパク質をコードしていることが明らかにされた。前駆体タンパク質および成熟タンパク質の分子量はそれぞれ 55,520 および 52,906 と計算され、成熟タンパクの分子量から算出された糖鎖除去後の分子量 53,000 とよく一致した。

推定アミノ酸配列の相同性検索の結果、invertase 遺伝子において触媒残基を含むとされている β -fructosidase モチーフ領域は完全に保存されていた。総合的に判断して、ファミリー 32 の glucosyl hydrolase では、触媒作用を持つ N 末端側部分の DNA セグメントが共通の祖先から進化したとする説を支持する結果を得られた。

また、endo-inulinase をコードするゲノミック DNA クローンの単離に初めて成功した。この endo-inulinase 遺伝子 (*INU A*) の塩基配列を解析したところ、*INU A* 遺伝子は *P. purpurogenum* のゲノム上にシングルコピーで存在すること、*INU A* 遺伝子中に介在配列は認められないこと、および TATA box やターミネーターと推定される配列が確認された。

以上のように本研究は、exo 型および endo 型 inulinase の各種酵素学的特性を明らかにし、また、後者に関しては初めて遺伝子配列を明らかにした。これらの成果はフラクトースからなる多糖やオリゴ糖の加水分解反応のモデルを提示するのみならず、分解物の工

業的利用への道を拓くものであり、学術的にもかつ産業的にも大いに価値あるものと判断される。

よって審査員一同は、小野寺秀一が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。