

学 位 論 文 題 名

Nigerosyl-oligosaccharide 生産型 *Acremonium* 属

α -Glucosidase の構造と機能ならびに

工業的利用に関する研究

学位論文内容の要旨

食生活が多様化した現代社会では、食品や食品素材の高機能化が求められている。食品の高機能化には、栄養学的機能（一次機能）のほか、物理化学的機能（二次機能）の改善と有用な生体調節機能（三次機能）を兼ね備えた食品素材を開発する必要がある。

ニゲロシル-オリゴ糖は、グルコースを構成糖とし α -1,3-グルコシド結合を有する少糖類である。2 糖のニゲロースは、1953 年に *Aspergillus niger* 由来の微生物多糖であるニゲランの酸加水分解物や清酒中から単離され、発酵食品など飲食物の芳醇なコク味を形成する重要な糖質として古くから知られている。近年になりニゲロシル-オリゴ糖は、味質改善効果やアントシアニン系色素の退色抑制効果(二次機能)、そして抗う蝕性や免疫賦活・調節作用(三次機能)をもつ優れた食品素材であることが明らかとなってきた。しかしながら、ニゲロシル-オリゴ糖の効率的な工業的生産方法の確立はなされていなかった。

最近、*Acremonium* に属す α -グルコシダーゼに本オリゴ糖の高い生成能を見出した。本研究では *Acremonium implicatum* α -グルコシダーゼ（以下 AiG と略称）の構造と機能を明らかにし、ニゲロシル-オリゴ糖の効率的な生産法とその応用を目的とする。

(1) *A. implicatum* α -グルコシダーゼの性質

澱粉分解物を炭素源に培養した *A. implicatum* の培養上清から、ニゲロシル-オリゴ糖生成能を有する α -グルコシダーゼを電気泳動的に単一に精製した。精製酵素は、分子量 60,000 と 51,000 の 2 つのポリペプチド鎖をモノマーとし、総計の分子量 440,000 を有する 4 量体であると考えられた。本酵素の至適 pH は 7.0、至適温度は 50 °C 付近であり、pH と温度安定性はそれぞれ pH 6.0-10.0、40 °C 以下であった。AiG の基質特異性を調べた。 α -1,3-グルコシド結合を有するニゲロースを α -グルコ 2 糖類の中で最も効率よく加水分解し、コージビオース (α -1,2-グルコシド結合)、イソマルトース(α -1,6-グルコシド結合)、そしてトレハロース (α -1,1-グルコシド結合) に対して、活性が低いもしくはほとんど活性が見られなかった。マルト-トリオースや-テトラオースに対し通常の α -グルコシダーゼの約 1/10 ~1/100 の K_m 値を示した。AiG がこれらの 2 基質に対し高い親和力を有し、通常の α -グルコシダーゼが加水分解を行う濃度で基質阻害の現象を与えた。高分子基質（可溶性デンプン）にも高い活性を示した。一方、ショ糖や合成配糖体などのヘテロ基質を加水分解することができなかった。これまで、このような α -1,3-グルコシド結合に対して特異性の高い α -グルコシダーゼは知られておらず、新規な酵素であった。AiG は、その基質特異性から

α -グルコシダーゼ タイプIII（活性部位のサブサイト+1に α -グルコシル基を要求し、高分子基質に作用できる）に分類され、結合様式に対する選択性が高い特異的な α -グルコシダーゼであると考えられた。

(2) *A. implicatum* α -グルコシダーゼの一次構造解析

AiG の cDNA を RT-PCR および RACE 法によりクローニングした。cDNA は全長 2,959 bp であり、開始コドン ATG より 2,751 bp の ORF がひとつ存在し、916 アミノ酸残基をコードしていた。このアミノ酸配列から予想される分子量は、102958.4 であった。翻訳領域の上流には 103 塩基の 5'-UTR が、下流には 105 塩基の 3'-UTR が存在した。予想されたアミノ酸配列には、分子量 60,000 と 51,000 の 2 つのポリペプチドの N 末端配列が認められた。AiG は、25 アミノ酸残基のシグナル配列をもち、1 本のポリペプチド鎖として翻訳された後、プロテアーゼなどによる翻訳後修飾を受けていると考えられた。また、 α -グルコシダーゼ ファミリーII に分類される酵素と有意な相同性を示し、*Aspergillus nidulans* α -グルコシダーゼ B と最も高い保存性(49.8%)を示した。この他、グルコシド ハイドラーゼ(GH) ファミリー 31 に分類される α -キシロシダーゼとも相同性を示した。したがって AiG は、一次構造から α -グルコシダーゼ ファミリーII に分類されることが考えられた。GH ファミリー 31 に属す真核生物 α -グルコシダーゼは、進化系統樹において真菌類、植物そして哺乳類起源の 3 つのクラスターに大別された。他のクラスターより広い分布を示す真菌類 α -グルコシダーゼは、進化系統樹より 3 つのグループ（分泌型酵素、一次配列上で同じ位置に切断を受ける分泌型酵素、非分泌型酵素）に分類されることが考えられた。AiG は、第 2 グループに属していた。

(3) 糖転移産物の構造解析

AiG の糖転移反応を解析した。10% マルトースを基質とした場合、経時的にグルコースの蓄積にともないニゲロースと 3 糖類を、3 糖類の蓄積にともない 4 糖類を順次生成した。糖転移産物の精製を 4 糖類まで行い、8 種の構造を NMR、FAB-MS、メチル化分析、そして部分分解解析で決定した。いずれも α -1,3-および α -1,4-グルコシド結合からなるオリゴ糖であり、 3^2 -O- α -ニゲロシル-マルトースおよび 3^2 -O- α -マルトシル-マルトースは、新規な構造をもつオリゴ糖であった。AiG は、 α -1,1-、 α -1,2-および α -1,6-グルコシド結合を有する糖転移産物を生成しなかった。 α -1,3-グルコシド結合の生産能が α -1,4-グルコシド結合の 2 ～ 3 倍大きく、 α -1,3-グルコシド結合に対して高い位置選択性と糖転移活性を示すユニークな酵素であった。これらの結果から、特徴的な構造のニゲロシル-オリゴ糖が、AiG を利用することにより、澱粉から効率的に生産できる可能性が示唆された。

(4) ニゲロシル-オリゴ糖含有シロップの工業的生産とその諸性質

ハイマルトースシロップを原料に、40 %以上のニゲロシル-オリゴ糖含有シロップの工業的生産方法を AiG より酵素生産性に優れる *Acremonium* の酵素製剤（本酵素製剤は、AiG と同じ糖転移生成物を与える）を用いて確立した。そのシロップは、甘味の立ち上がりが遅く、芳醇な深み、コク味を有する優れた味質を有していた。砂糖に対して、粘度、水分活性などは類似しており、吸・保湿性や過熱安定性は優れていたため、ニゲロシル-オリゴ糖含有シロップは、食品加工に幅広く利用可能な食品素材であることが示唆された。また、ラット小腸刷子縁膜により、ほぼ完全にグルコースまで分解されたため、そのエネルギー値は、砂糖や乳糖と同様に 4 kcal/g であると考えられた。現在、このシロップは市販され、飲料などの食品へ幅広く利用されている。

学位論文審査の要旨

主査	教授	木村 淳 夫
副査	教授	松井 博 和
副査	教授	横田 篤
副査	助教授	森 春 英

学 位 論 文 題 名

Nigerosyl-oligosaccharide 生産型 *Acremonium* 属

α -Glucosidase の構造と機能ならびに

工業的利用に関する研究

本論文は、和文 141 頁、図 40、表 15、6 章からなり、参考論文 9 編が添えられている。

食生活が多様化した現代社会では、食品や食品素材の高機能化が求められている。食品の高機能化には、栄養学的機能（一次機能）のほか、物理化学的機能（二次機能）の改善と有用な生体調節機能（三次機能）を兼ね備えた食品素材を開発する必要がある。ニゲロシル-オリゴ糖は、グルコースを構成糖とし α -1,3-グルコシド結合を有する少糖類である。本オリゴ糖は、味質改善効果やアントシアニン系色素の退色抑制効果(二次機能)や抗う蝕性や免疫賦活・調節作用(三次機能)をもつ優れた食品素材であることが明らかとなった。しかしながら、ニゲロシル-オリゴ糖の効率的な工業的生産法は確立されていない。最近、*Acremonium* に属す α -グルコシダーゼに本オリゴ糖の高い生成能を見出した。本研究は *Acremonium implicatum* α -グルコシダーゼ（以下 AiG と略）の構造と機能の解明、ニゲロシル-オリゴ糖の効率的な生産法とその応用を目的とする。

(1) *A. implicatum* α -グルコシダーゼの性質

A. implicatum の培養上清から、AiG を電気泳動的に単一に精製した。AiG は、分子量 60,000 と 51,000 の 2 つのポリペプチド鎖をモノマーとする 4 量体であった。至適 pH は 7.0、至適温度は 50 °C 付近であり、pH と温度安定性はそれぞれ pH 6.0-10.0、40 °C 以下であった。ニゲロースを α -グルコ 2 糖類の中で最も高効率に加水分解し、コジビオース、イソマルトースやトレハロースに殆ど作用しなかった。マルト-トリオースや-テトラオースに対し通常の α -グルコシダーゼの約 1/10~1/100 の K_m 値を示した。AiG がこの 2 基質に対し高い親和力を有し、通常の α -グルコシダ

ーゼが分解を行う濃度で基質阻害の現象を与えた。ショ糖などのヘテロ基質に作用せず、高分子基質に活性を示した。このような α -1,3-グルコシド結合に対して特異性の高い α -グルコシダーゼは知られておらず、新規な酵素であった。基質認識から α -グルコシダーゼタイプⅢに分類された。

(2) *A. implicatum* α -グルコシダーゼの一次構造解析

AiG の cDNA を PCR 法によりクローニングした。cDNA は全長 2,959 bp であり、2,751 bp の ORF は 916 アミノ酸残基をコードしていた。予想されたアミノ酸配列（分子量：102958.4）に、分子量 60,000 と 51,000 の 2 つのポリペプチドの N 末端配列が認められた。従って、1 本のポリペプチド鎖として翻訳された後、プロテアーゼなどによる翻訳後修飾を受けると考えられた。一次構造の相同性から α -グルコシダーゼファミリーⅡに分類された。本ファミリーに属す真核生物の酵素は、進化系統樹において真菌類、植物と哺乳類起源の 3 つのクラスターに大別された。真菌類のクラスターは、さらに 3 つのグループ（分泌型酵素、切断を受ける分泌型酵素、非分泌型酵素）に分類され、AiG は第 2 グループに属す。

(3) 糖転移産物の構造解析

マルトースを基質とし、AiG の糖転移反応を行った。生成物の精製を 4 糖類まで行い、8 種の構造を決定した。いずれも α -1,3-や α -1,4-グルコシド結合からなり、3²-O- α -ニゲロシル-マルトースと 3²-O- α -マルトシル-マルトースは、新規なオリゴ糖であった。 α -1,1-、 α -1,2-、 α -1,6-グルコシド転移能がなかった。 α -1,3-グルコシド結合の生産能が α -1,4-グルコシド結合より大きく、 α -1,3-グルコシド結合に対して高い選択的形成能と糖転移活性を示すユニークな酵素であった。

(4) ニゲロシル-オリゴ糖含有シロップの工業的生産とその諸性質

40 %以上のニゲロシル-オリゴ糖を含有する糖液の工業的生産方法を確立した。本糖液は、甘味の立ち上がりが緩慢で、芳醇な深み、コク味を有する優れた味質を有していた。砂糖に対して、粘度、水分活性などは類似しており、吸・保湿性や過熱安定性は優れていたため、食品加工に幅広く利用可能な食品素材であることが示唆された。エネルギー値は、4 kcal/g であると考えられた。現在、本糖液は市販され飲料などの食品へ幅広く利用されている。

以上のように本研究は、これまで例がないユニークな基質認識と糖転移能を示す α -グルコシダーゼの単離、性質および構造の解析を行ったものである。本酵素が示す新規な基質特異性の解明、遺伝子構造から得られたアミノ酸一次配列をもとに翻訳後修飾や真核生物 α -グルコシダーゼの分子進化の究明、特に、糖転移反応については新規なオリゴ糖の取得に成功した上でニゲロシル-オリゴ糖含有糖液の工業的生産を初めて実用化させたことなど、 α -グルコシダーゼに関して学術的

に重要な基礎的知見を提供し、かつ産業利用を確立させた。

よって審査員一同は、山本 健が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。