

Aspergillus oryzae MIBA316 糖質分解酵素の精製と性質

仮屋麻紀子¹⁾, 矢野めぐむ²⁾, 瀧井 幸男^{2,3)}

1) 武庫川女子大学大学院家政学研究科食物栄養学専攻

2) 武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科

3) バイオサイエンス研究所

Purification and properties of amylolytic enzyme from *Aspergillus oryzae* MIBA316

Makiko Kariya¹⁾, Megumu Yano²⁾ and Yukio Takii^{2,3)}

¹⁾ Graduate School of Home Economics,

Food Science and Nutrition Major,

²⁾ Department of Food Science and Nutrition,

School of Human Environmental Sciences,

Mukogawa Women's University

and ³⁾ Institute for Bioscience.

Amylolytic enzyme was purified to electrophoretically homogeneous state from culture broth of *Aspergillus oryzae* MIBA316. This enzyme hydrolyzed preferentially amylopectin, starch and glycogen. Approaches to complete breakdown of starch to its components and their utilization in food processing were discussed.

緒 言

麹菌は古くからしょうゆ、みそ、日本酒醸造などの醗酵食品の製造に用いられ¹⁾安全性が確かめられており、現在ヒトと環境に優しい遺伝子組換えシステムの新しい宿主として注目されている。また *Aspergillus oryzae* MIBA316 は強いアミロペクチン分解活性を持つことが知られている。

アミロースは約 300 個の D- グルコースが α -1, 4- グルコシド結合で直鎖状に結合した高分子であり、水溶性に乏しく、老化しやすい性質を持っている。アミロペクチンは D- グルコースの α -1, 4- グルコシド結合のほか約 4% の α -1, 6- グルコシド結合で枝分かれした部分を持ち、安定性が良いため老化しにくい。デンプンは α -D- グルコースが脱水重合した多糖類で、アミロースとアミロース分子の所々で枝分かれしたアミロペクチンから構成されている。アミロース、アミロペクチンの含有量はデンプンの種類によって異なる。

デンプンの種類によって異なる。

デンプンを加水分解する酵素はアミラーゼと総称され、動物、植物、微生物界にまで広く分布しており、非常に多くの種類がこれまで研究されてきた。アミラーゼはその分解様式により細かく分類されているが、基質の非還元性末端から特定数のグルコース単位を切り離すエキソ型のグルコアミラーゼ型、ほぼランダムに近い分解様式をもつエンド型の α -アミラーゼとに大別することができる。

本研究では、*Aspergillus oryzae* MIBA316 が産生する糖質分解酵素を抽出、精製し、酵素化学的諸性質及び分子学的特性を調べ、当該遺伝子 DNA を宿主に導入するための基礎的知見を得ることを目的とした。

実験方法

1. 培地の調製

デンプン 5g, ペプトン 10g, KH_2PO_4 5g,

NaNO₃ 1g, MgSO₄·7H₂O 1g の成分を超純水に溶かし、pH5.5 に調製後、1000ml に fill up した。この培地を 0.5% デンプン入りデキストリンペプトン基本培地 (pH5.5) とした。

2. 液体培養

500ml 容坂口フラスコに 50ml の 0.5% デンプン入りデキストリンペプトン基本培地 (pH5.5) を入れ、オートクレーブ滅菌 (120℃, 15min) した。オートクレーブ済み 0.85% NaCl 溶液 30ml に *A. oryzae* MIBA316 をミニシャーレから白金耳でかきとり懸濁した。この菌体懸濁液 1ml をオートクレーブ滅菌済みの坂口フラスコに接種し 30℃ で 6 日間振とう (100rpm) 培養を行った。

3. 酵素の精製

a. 濃縮

ガラスフィルター G1 をビーカーにセットし、培養液と菌体に分け、得られた培養液 (1,000ml) が 100ml になるまでクーリングアスピレーターで濃縮をした。濃縮した菌体外酵素抽出液を透析膜 (size 30/32) に入れ、10mM リン酸緩衝液 (PPB, pH6.8) 3L に対し、3 回透析を行った後、遠心分離 (10,000rpm, 4℃, 30min) し、上清を集めた。

b. イオン交換クロマトグラフィー

10mM PPB (pH6.8) で平衡化させた DEAE-Sephacel (カラムサイズ直径 1.5cm×長さ 36.2cm) に透析後の試料をアプライし、500drops/tube ずつ分画した。10mM PPB (pH6.8) で十分に washing を行い、0~1.0M NaCl の Gradient (Gradient 溶液: Mixing chamber 10mM PPB (pH6.8) 350ml, Reservoir chamber 1.0M NaCl in 10mM PPB (pH6.8) 350ml) により酵素タンパクを溶出した。1.0M NaCl in 10mM PPB (pH6.8) で押し出した後、紫外吸収法 (O.D. 280nm) でタンパク量を測定し、またジニトロサリチル酸法により活性の見られた画分を回収した。

c. 透析・濃縮・硫酸沈殿²⁾

酵素液を 10mM PPB (pH6.8) 3L に対し、3 回透析を行った後、遠心分離 (10,000rpm, 4℃, 30min) し上清を集めた。得られた酵素液をアミコン PM-10 で濃縮した。その後 75% (NH₄)₂SO₄ で沈殿させて沈殿物を回収した。

d. ゲル濾過クロマトグラフィー

硫酸沈殿を最少量で溶かした試料を 0.5M NaCl in 10mM PPB・0.02% NaN₃ (pH6.8) で平衡化させた Sephacryl S-200 (直径 2.5cm×長さ 93.4cm) にアプ

ライシ、260drops/tube ずつ分画した。紫外吸収法 (O.D. 280nm) でタンパク量を測定し、ジニトロサリチル酸法により活性の見られた画分を回収した。この操作を繰り返した。

e. 透析

得られた酵素は、10mM PPB (pH6.8) を 2L 用いて 3 回透析し遠心分離 (3,420 rpm, 4℃, 30min) したのち、上清液を精製酵素として回収した。

4. 酵素活性測定法

ジニトロサリチル酸法 (DNS 法)³⁾ で還元糖量を測定した。酵素の 1 ユニット (U) は 1 分間に 1μmol の還元糖を生成させる酵素量とした。

5. タンパク質の測定

得られた酵素のタンパク量を Lowry 法⁴⁾ により求めた。標準曲線は BSA を用いて、0~100μg/ml の範囲で作成した。タンパク質の濃度は溶液の O.D. 280nm における吸光度を測定して求めた。

6. 精製タンパク質の均一性

得られた精製タンパク質の均一性の検討は SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS-PAGE)²⁾、Native-ポリアクリルアミド電気泳動 (Native-PAGE) を用いて行った。泳動は 12% 平板ゲルを用いて行った

結果及び考察

1. タンパク質の精製

ツアベックドックス培地で継代培養した麹菌 *Aspergillus oryzae* MIBA316 を 0.5% デンプン入りデキストリンペプトン基本培地 (pH5.5) に接種し、30℃ で 6 日間振とう培養を行った後、得られた培養上清 (1000ml) を透析後、DEAE-Sephacel イオン交換のカラムクロマトグラフィー、Sephacryl-S200

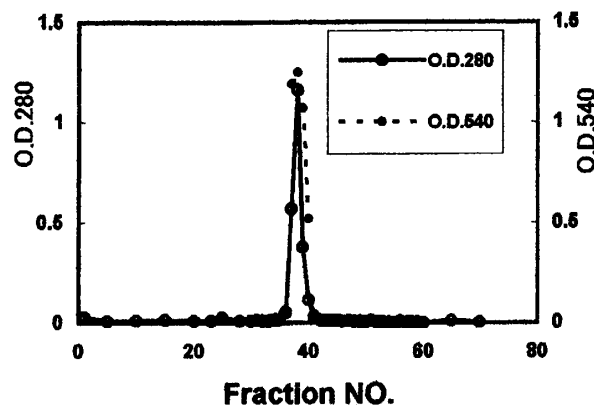


Fig. 1. *A. oryzae* 酵素の Sephacryl S-200 カラムによるゲル濾過

Table 1. *A. oryzae* MIBA316 糖質酵素の精製

	液量 (ml)	総タンパク (mg)	総活性 (U)	回収率 (%)	比活性 (U/mg)	精製率
培養上清	870.0	817.2	4437	100.0	5.1	1.0
DEAE -Sephacel	139.0	250.2	4878	110.0	19.5	3.6
Sephacryl S-200 ①	28.1	73.3	2276	51.3	31.1	5.8
Sephacryl S-200 ②	21.0	17.4	1124	25.3	64.5	12.6

ゲルろ過 (Fig. 1.) を供する三段階の操作にかけることにより, 25.3% の回収率, 12.6 倍に精製され, 比活性 64.5U/mg protein を示す標品 17.4 mg を得た (Table 1.).

2. タンパク質の均一性

精製タンパク質の均一性を SDS-PAGE により検討した (Fig. 2.). 精製タンパク質は単一のバンドとして観察され, 均一であることが示された. また, 精製タンパク質の分子量は約 50,000 であることが分かった.

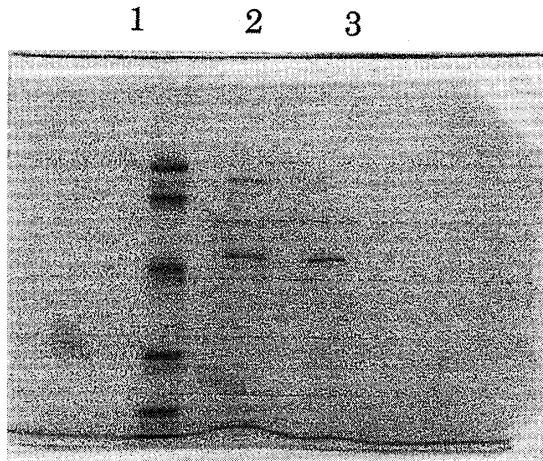


Fig. 2. *A. oryzae* 酵素の SDS-ゲル電気泳動

25mA, 200V で約 90 分間泳動した. 分子量は, Prestained SDS-PAGE Standards Low Range (BIO-RAD) により決定した.

レーン 1: スタンダード (上より分子量 112, 000, 81, 000, 49, 900, 36, 200, 29, 900)

レーン 2: MIBA316 酵素 (ゲル濾過 1 回目)

レーン 3: MIBA316 酵素 (ゲル濾過 2 回目)

3. MIBA316 糖質酵素による糖質の分解

MIBA316 糖質酵素による糖質の分解は Table 2. の様になり基質特異性としてアミロペクチン, デンプン, グリコーゲンが有効であった.

本酵素の精製回収率は 25.3% で, 12.6 倍に精製

Table 2. MIBA316 糖質酵素による糖質の分解

基 質	相対活性 (%)
0.5% アミロペクチン	100.0
0.25% デンプン	71.8
0.25% グリコーゲン	22.6
0.25% プルラン	0
10mM パノース	2.0
10mM パラチノース	0
10mM イソマルトテトラオース	0
10mM イソマルトトリオース	0
10mM イソマルトース	2.0
10mM マルトース	0

され比活性 64.5U/mg タンパク質を示す標品 17.4mg を得ることが可能であった. 得られた酵素を SDS- ポリアクリルアミド電気泳動にかけたところ, 本酵素標品は均一に精製されていた. またスタンダードマーカールによりこの酵素の分子量は 50,000 と推定された. 酵素反応至適温度は 55℃, 至適 pH は 4.5 であった. これらの結果は文献情報の *Aspergillus oryzae* の α -アミラーゼの分子量 53,000, 至適 pH4.9~5.2²⁾ に近似していると思われる. 基質特異性としては, アミロペクチン, デンプン, グリコーゲンが有効であった. アミラーゼはデンプンを加水分解する酵素の総称であり⁵⁾, 非還元末端から特定数のグルコース単位を切り離していくエキソ型の分解様式をもつものと, ほぼランダムに近い分解様式をもつエンド型のものとに大別される.

前者としてはデンプンまたはアミロースなどの非還元性末端から 1) グルコース, 2) マルトース, 3) マルトトリオース, 4) マルトテトラオース, 5) マルトヘキサオースの各単位でそれぞれ切断していく酵素が知られており, それぞれ 1) エキソ -1, 4- α -D-グルコシターゼ (通常グルコアミラーゼとよばれる), 2) β -アミラーゼ, 3) エキソマルトトリオヒドラーゼ, 4) エキソマルトテトラオヒドラーゼ, 5)

エキソマルトヘキサオヒドロラーゼとよばれる。エンド型の分解様式をもつものには、 α -1, 4 グルコシド結合のみを分解する α -アミラーゼ、そのほかに α -1, 6 グルコシド結合のみを選択的に加水分解するプルラーゼやイソアミラーゼなどの枝切り酵素がある。枝切り酵素を除く大多数のアミラーゼは、 α -1, 4 グルコシド結合のみを加水分解し、 α -1, 6 グルコシド結合は加水分解しないとされているが、グルコアミラーゼは例外で両結合ともに加水分解し、デンプンをほぼ完全にグルコースにまで分解する。アミラーゼは一般に直鎖状の基質に対する加水分解速度は重合度の低いものほど小さく、マルトースはグルコアミラーゼ以外のアミラーゼでは通常、加水分解されない。 α -アミラーゼは動物、植物、微生物に広く分布する普遍的な酵素である。

種々の微生物、特にカビと細菌は緑色植物が光合成で作った生デンプンを消化し、エネルギーを獲得するために強力な α -アミラーゼを産生し菌体外に多量に分泌する性質がある。

本酵素は糖質の非還元性末端から α -1, 4 グルコシド結合をランダムに切断していくエンド型の分解様式をもつ α -アミラーゼであることが示唆された。現在その作用様式を検討中である。既に本研究室で取得済みの α -グルコシダーゼ、オリゴ-1, 6-グルコシダーゼなどと適宜組み合わせることにより、デンプンを始めとする多糖類を分解し、食品加工原材料としての利用をはかっていきたい。

参考文献

- 1) 一島英治, 発酵食品への招待, 裳華房, 東京, pp128-131(1989)
- 2) 岡田雅人, 宮崎 香, 無敵のバイオテクニカルシリーズ 改訂 タンパク質実験ノート①② 第2版 羊土社, 東京, ① pp73-74, pp78-80, ② pp15-25(2001)
- 3) 中村道徳, 貝沼圭二, 生物化学実験法 25 澱粉・関連糖質酵素実験法 第1版, 学会出版センター, 東京, pp13(1998)
- 4) Lowry O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L and Randall, R.J., *J. Biol. Chem.*, 193, 265(1951)
- 5) Matsuura, Y. Kusunoki, M. Harada, W. and Kakudo, M., *J Biochem.*, 95, 697-702(1984)