

白麹菌の β -グルコシダーゼと可溶性多糖
に関する研究

岩下 和裕

目 次

序 章.....	1
第1章 白麹菌の β -グルコシダーゼの精製及び諸性質	
第1節 白麹菌の β -グルコシダーゼの精製と一般的諸性質	
第1項 緒言.....	4
第2項 材料及び方法	
(1) 供試菌株.....	4
(2) 固体培養および液体培養法.....	5
(3) 酵素活性測定.....	5
(4) タンパク質含量及び菌体量の測定.....	5
(5) 遊離型粗酵素液の調製.....	5
(6) 結合型粗酵素液の調製.....	5
(7) β -グルコシダーゼの精製.....	6
(8) 電気泳動.....	6
(9) N-結合型糖鎖の除去.....	7
(10) 精製タンパク質のN-末端およびC-末端アミノ酸配列の解析.....	7
(11) 精製タンパク質の糖組成分析.....	7
(12) 各精製 β -グルコシダーゼの酵素化学的諸性質.....	7
第3項 実験結果	
(1) 白麹菌による β -グルコシダーゼの生産.....	8
(2) 結合型 β -グルコシダーゼの可溶化.....	9
(3) 各 β -グルコシダーゼの精製.....	10
(4) 各精製 β -グルコシダーゼの分子量及び等電点.....	14
(5) 各精製 β -グルコシダーゼのN-末端およびC-末端アミノ酸配列.....	14
(6) 各精製 β -グルコシダーゼの糖組成.....	15

(7) 各精製 β -グルコシダーゼの酵素化学的性質.....	15
第4項 要約.....	18
第5項 考察.....	18
第2節 精製 β -グルコシダーゼの安定性と細胞壁多糖画分	
第1項 緒言.....	21
第2項 材料及び方法	
(1) 供試菌株.....	21
(2) 遊離型及び結合型粗酵素液の調製.....	21
(3) 精製 β -グルコシダーゼの調製および酵素活性測定.....	21
(4) 焼酎1次もろみの作成.....	22
(5) タンパク質含量及び菌体量の測定.....	22
(6) 粗細胞壁画分および細胞壁多糖画分の調製.....	22
(7) 精製 β -グルコシダーゼの安定性.....	23
(8) 精製 β -グルコシダーゼの細胞壁多糖画分への吸着.....	23
(9) β -グルコシダーゼCB-1抗血清の作成およびウエスタン解析.....	23
第3項 実験結果	
(1) もろみ中での β -グルコシダーゼ活性.....	24
(2) 粗酵素および精製 β -グルコシダーゼの安定性.....	24
(3) 細胞壁多糖画分による精製 β -グルコシダーゼの安定化.....	25
(4) 各精製 β -グルコシダーゼのpH安定性と温度安定性.....	26
(5) 精製 β -グルコシダーゼの細胞壁多糖画分への吸着.....	27
(6) 菌体細胞壁中での β -グルコシダーゼCB-1.....	28
第4項 要約.....	29
第5項 考察.....	29
第2章 β -グルコシダーゼ遺伝子 ($bglA$) のクローニングおよび遺伝子破壊	
第1節 白麹菌 β -グルコシダーゼ遺伝子 ($bglA$) のクローニングと酵母での発現	
第1項 緒言.....	32
第2項 材料及び方法	

(1) 供試菌株、プラスミド及び培地.....	33
(2) β -グルコシダーゼCB-1の内部アミノ酸配列の決定.....	33
(3) 遺伝子操作法.....	33
(4) <i>bglA</i> 染色体DNAのクローニング.....	33
(5) <i>bglAcDNA</i> のクローニング.....	34
(6) DNAシーケンス解析.....	34
(7) 酵母発現用ベクターの作成.....	34
(8) <i>S. cerevisiae</i> の形質転換.....	35
(9) <i>S. cerevisiae</i> の細胞分画.....	35
(10) β -グルコシダーゼ活性測定および検出.....	35
第3項 実験結果	
(1) β -グルコシダーゼCB-1の部分アミノ酸配列の解析.....	36
(2) β -グルコシダーゼCB-1をコードする遺伝子 <i>bglA</i> のクローニング.....	36
(3) <i>bglAcDNA</i> のクローニング.....	37
(4) <i>bglA</i> 遺伝子の構造と塩基配列.....	38
(5) アミノ酸配列の比較.....	39
(6) <i>bglA</i> cDNAの酵母での発現.....	43
(7) 組換え β -グルコシダーゼの特徴.....	43
第4項 要約	45
第5項 考察	45
第2節 <i>bglA</i>遺伝子の破壊と遺伝子破壊株の性質	
第1項 緒言	48
第2項 材料及び方法	
(1) 供試菌株、プラスミド及び培地.....	48
(2) <i>A. kawachii</i> sC遺伝子欠損変異株の作成.....	48
(3) <i>A. kawachii</i> の形質転換.....	49
(4) <i>bglA</i> 遺伝子破壊.....	49
(5) 酵素活性測定および菌体量測定.....	50

(6) DEAE クロマトグラフィーおよびウエスタン解析.....	50
(7) RT-PCR.....	50
第3項 実験結果	
(1) <i>A. kawachii sC</i> 遺伝子欠損株の作成.....	51
(2) <i>A. kawachii bglA</i> 遺伝子破壊株の作成.....	52
(3) <i>A. kawachii bglA</i> 遺伝子破壊株の β -グルコシダーゼ生産.....	53
(4) <i>A. kawachii bglA</i> 遺伝子破壊株で見られた β -グルコシダーゼ活性 の解析.....	53
(5) 培養条件の違いによる <i>bglA</i> 遺伝子の発現および酵素の局在性.....	54
第4項 要約	56
第5項 考察	56
第3章 白麹菌が生産する可溶性多糖 (ESP) の精製と β-グルコシダーゼの諸性質に対 する影響	
第1節 白麹菌が生産する可溶性多糖 (Extracellular Soluble Polysaccharide) の精製	
第1項 緒言	59
第2項 材料及び方法	
(1) 供試菌株および培養方法.....	59
(2) 細胞壁多糖画分および可溶性多糖画分の調製.....	59
(3) 酵素活性測定および糖含量、糖組成の分析.....	60
(4) 遊離型精製 β -グルコシダーゼの安定化.....	60
(5) 遊離型精製 β -グルコシダーゼの細胞壁多糖画分への吸着阻害.....	60
(6) 可溶性多糖 (Extracellular Soluble Polysaccharide: ESP) の精製...61	61
(7) レクチンカラムによる吸着実験.....	61
第3項 実験結果	
(1) 米麹 (固体培養) から調製した可溶性多糖画分の性質.....	62
(2) 白麹菌が生産する可溶性多糖 (Extracellular Soluble Polysaccharide : ESP) の精製.....	63
(3) 可溶性多糖 (ESP) の性質.....	66

第4項 要約.....	67
第5項 考察.....	67
第2節 白麹菌 β -グルコシダーゼの諸性質に対する精製可溶性多糖(ESP)の影響	
第1項 緒言.....	69
第2項 材料及び方法	
(1) 精製酵素、細胞壁多糖画分、ESP.....	69
(2) 精製 β -グルコシダーゼの安定性.....	69
(3) 精製 β -グルコシダーゼの細胞壁多糖画分吸への着阻害と細胞壁 多糖画分からの可溶化.....	70
(4) ESP添加による酵素化学的性質への影響.....	70
(5) ESPのビオチン化および精製 β -グルコシダーゼへの吸着.....	70
第3項 実験結果	
(1) 精製 β -グルコシダーゼのESPによる安定化.....	71
(2) 精製 β -グルコシダーゼの吸着阻害活性.....	73
(3) ESPと精製 β -グルコシダーゼの相互作用.....	74
(4) ESPが精製 β -グルコシダーゼの酵素化学的性質に与える影響.....	75
第4項 要約.....	76
第5項 考察.....	76
第4章 ESPに影響を受ける他の白麹菌酵素	
第1項 緒言.....	79
第2項 材料及び方法	
(1) 供試菌株および培養方法.....	79
(2) 酵素活性およびタンパク質量の測定.....	80
(3) DEAEクロマトグラフィー.....	80
(4) 遊離型 α -グルコシダーゼの精製.....	80
(5) 電気泳動および逆相クロマトグラフィー.....	81
(6) 各ペプチド断片のN-末端アミノ酸解析.....	81
(7) 精製 α -グルコシダーゼの酵素化学的諸性質.....	82

(8) 精製 α -グルコシダーゼの安定性.....	82
(9) 精製 α -グルコシダーゼの細胞壁多糖画分への吸着.....	82
第3項 実験結果	
(1) 培養条件により局在性に影響を受ける白麹菌酵素.....	83
(2) DEAEクロマトグラフィーによる検討.....	83
(3) 白麹菌 α -グルコシダーゼの精製.....	85
(4) 精製 α -グルコシダーゼの電気泳動および逆相クロマトグラフィー....	87
(5) 白麹菌 α -グルコシダーゼの基質特異性.....	88
(6) 精製 α -グルコシダーゼのESPによる安定化.....	89
(7) 精製 α -グルコシダーゼの細胞壁多糖画分への吸着.....	90
第4項 要約.....	90
第5項 考察.....	91
総括.....	94
発表論文.....	98
引用文献.....	99

序 章

清酒、焼酎、味噌、醤油など、我が国の伝統的醸造産業を特徴づけているものは麹菌である。これらの醸造産業の中で、麹菌は様々な酵素やビタミン等の供給源としての役割を果たしている。とくに、アミラーゼ類による澱粉の糖化に代表されるように、原料の溶解に関わる酵素の供給源としての役割は重要である。故に、酒類産業においては、アミラーゼ等の糖化酵素に加えて、プロテアーゼなどの蛋白質分解酵素、原料利用率の向上を目指としたセルラーゼ、ヘミセルラーゼなどの酵素を中心として多大な研究が進められてきた¹⁻⁴⁾。しかしながら、約15年ほど前から製品の多様化が叫ばれるようになり、酒類の個性、機能性など、酒類の多様化につながる研究にも重点が置かれるようになった。このような流れの中で、本格焼酎に関しては、原料特性の制御という点に着目され、多くの成果が上げられている⁵⁻¹¹⁾。

甘諸焼酎、麦焼酎などの本格焼酎（酒税法上、しょうちゅう乙類に分類される）は、我が国独自の代表的な蒸留酒であり、主生産地かつ主要消費地でもある南九州および沖縄県のみならず、日本全体においても重要な位置を占める酒類である¹²⁾。平成10年のしょうちゅう乙類課税移出数量は33.1万klで、昭和51年の6.9万klと比較すると4.8倍もの差がある。とりわけ、昭和59～60年は焼酎ブームにより飛躍的な消費量の増加が見られ、全国的にもさらに広く親しまれるようになった。しかし、このような焼酎ブームでの飛躍的な消費の増加を担っていたのは麦焼酎であった。これに対して、焼酎ブーム以前に最も消費量が多かった甘諸焼酎では、ブーム中に消費量は増加したもののその割合は低く、ブーム後、その位置を麦焼酎に取って代わられた。平成10年度の甘諸焼酎課税移出数量は6.4万klで、昭和51年の課税移出数量4.8万klに比較して、その伸びはわずか30%程度に留まっている。

この原因としては、減圧蒸留や、イオン交換等の新技術により、麦焼酎が消費者のニーズに合致する軽いタイプの製品に移行していくのにに対し、甘諸焼酎ではこれらの新技術がなじまず、品質改善への決め手が無かったことによるものと考えられる。最近では軽いタイプの製品を目指す一方で、より原料特性が強いタイプの甘諸焼酎も求められ¹³⁾、消費者のニーズに合わせて、甘諸焼酎の品質特性を制御する技術が必要となってきた。

甘藷焼酎の品質特性の中で、最も大きなものはその特徴的な香りである。甘藷焼酎の特徴香はネロール、ゲラニオール、リナロール、 α -テルピネオール、シトロネロールなどのモノテルペンアルコールにより構成されている⁹。しかし、このような香りは、原料となる甘藷の揮発成分中には含まれず、醸造および蒸留の過程をとおして生じる⁸。この特徴香の生成過程において、非常に重要な役割を果たしているのが白麹菌 (*Aspergillus kawachii*) の β -グルコシダーゼである^{6, 7)}。 β -グルコシダーゼは (EC 3. 2. 1. 21) 、セロビオースなどの β -グルコシド結合を持っている物質に作用し、加水分解により非還元末端のグルコース残基を遊離させる酵素である^{14, 15)}。一般にはセルロースの加水分解の最終過程に関与し、様々なセルロース資材の利用には欠かせない酵素として知られている^{16, 17)}。これに加えて、甘藷焼酎の製造においては、特徴香の前駆体であり、原料甘藷中に含まれるネリル- β -グルコシド、ゲラニル- β -グルコシドの加水分解に関与している。ネリル- β -グルコシド、ゲラニル- β -グルコシドは不揮発性の物質であるが、白麹菌 β -グルコシダーゼの作用により生じたネロール、ゲラニオールは揮発性である。これらの成分は、さらにもろみ中の酵母、あるいは、蒸留時の熱により化学反応をうけ、より閾値の低いリナロール、 α -テルピネオール、シトロネロールに変換され、最終的に甘藷焼酎の特徴香を形成する強い香気となる (図 1) ⁵⁻⁸⁾。また、ワインの香気についても原料ブドウ中の β -グルコシダーゼにより同様の反応が起こることが知られている¹⁸⁻²¹⁾。

以上のことから、甘藷焼酎醸造において、白麹菌の β -グルコシダーゼは、特徴香の生成過程の最も初期の反応をつかさどるキーエンザイムであり、本酵素の活性を制御することで、特徴香の生成を制御できるものと期待される。しかしながら、これまでに白麹菌の β -グルコシダーゼに関する詳細な検討はされていない。そこで本研究では、白麹菌が生産する主要な β -グルコシダーゼを精製し、その諸性質について検討すると共に、 β -グルコシダーゼをコードする遺伝子についても検討を行うこととした。

また、白麹菌は*Aspergillus niger*や*Aspergillus awamori*等と同様に培地中に多量のクエン酸を生産するため、白麹菌が生育する環境はきわめて低いpHとなる。このような環境下で、十分に麹菌が生育してゆくためには、分泌された酵素が耐酸性を獲得している必要がある。実際に白麹菌は、耐酸性 α -アミラーゼや耐酸性プロテアーゼなど、多くの耐酸性酵素を生産する^{2, 22-25)}。その中でも、キシラナーゼCは、至適pHがpH2.0付近であり、pH1でもほ

とんど失活しない非常に耐酸性に優れた好酸性の酵素である^{22, 23)}。このような点から、白麹菌は、*A. niger*、*A. awamori*と共に、耐酸性酵素の供給源としても注目されている。白麹菌が生産するβ-グルコシダーゼもまた耐酸性であることが報告されており⁶⁾、このような点にも着目して研究を行った。

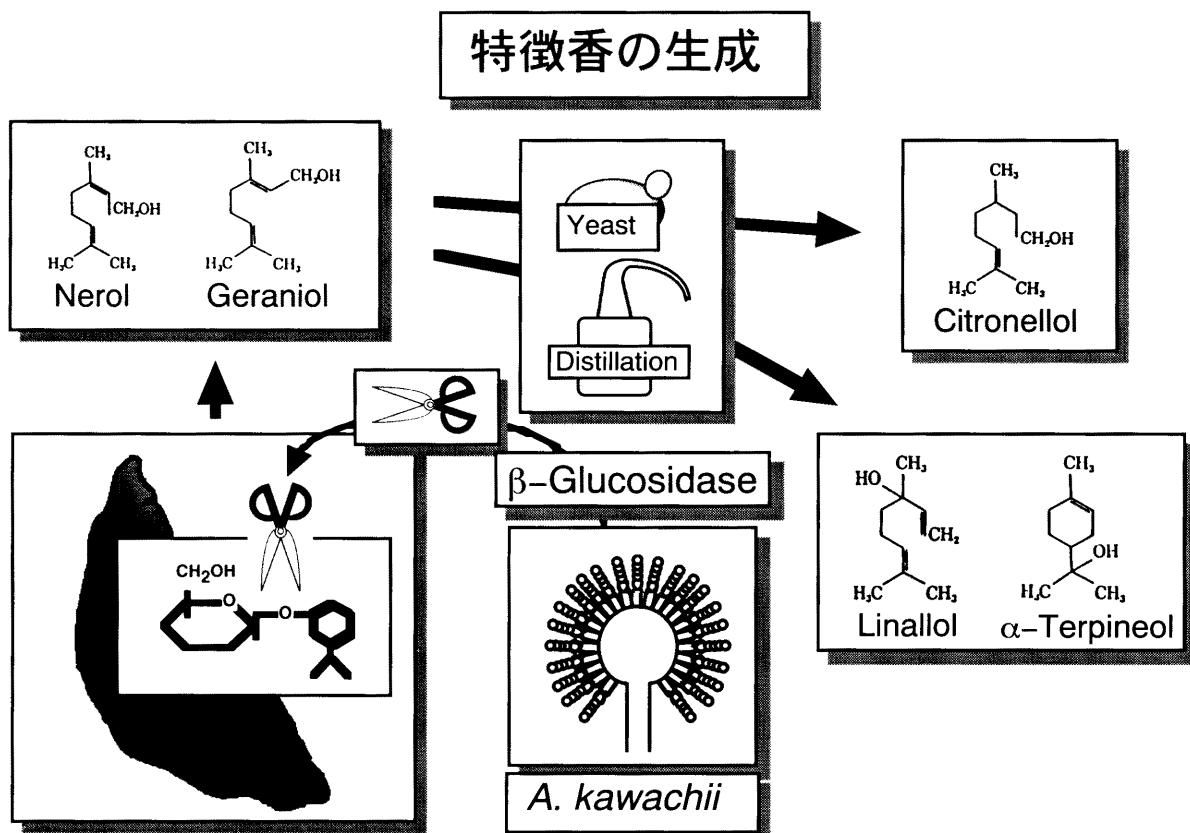


図1. 甘藷焼酎の特徴香の生成機構

甘藷焼酎の特徴香は、Nerol、Geraniol、Citronellol、Linallol、 α -Terpineol等の物質で構成されている。原料の甘藷中では、これらのモノテルペンアルコール類は、Neryl- β -glucosideやGeranyl- β -glucoside等の不揮発性の配糖体として含まれている。これらの配糖体は、もろみ中で白麹菌が生産するβ-グルコシダーゼにより加水分解され、その結果、揮発性のNerolやGeraniolが遊離する。生じたNerol、Geraniolは、もろみ中の酵母あるいは、蒸留時の熱などにより、より閾値が高いCitronerolやLinallol、 α -Terpineolに変換され、より強い香気となる。

第1章 白麹菌の β -グルコシダーゼの精製及び諸性質

第1節 白麹菌の β -グルコシダーゼの精製と一般的諸性質

第1項 緒言

β -グルコシダーゼは、一般にセロビオース等の β -1,4-グルコシド結合を持った物質を加水分解する酵素で、セルロース資材等のバイオマス利用には欠かせない酵素である^{16, 17)}。また、本酵素は β -グルコシダーゼ活性に加え、トランスクルコシダーゼ活性も持つており²⁰⁾、このトランスクルコシダーゼ活性により生成されたオリゴ糖は、糸状菌のセルラーゼ類を強く誘導することから、セルラーゼの誘導生産においても重要だと考えられている^{27, 28)}。

これに加えて、甘藷焼酎の醸造では、特徴香の生成において最も初期の段階で作用するキーエンザイムであり、甘藷焼酎の香味を制御する上では特に重要な酵素である⁵⁻⁸⁾。甘藷焼酎醸造において、ほとんどの β -グルコシダーゼ活性は、白麹菌 (*Aspergillus kawachii*) から供給され、白麹菌の粗酵素液（部分精製）は、実際に香気生成の基質となるneryl- β -glucoside、geranyl- β -glucosideなどに作用することが明らかとなっている⁶⁾。しかしながら、白麹菌 β -グルコシダーゼの酵素化学的特徴、あるいはその遺伝子構造などの詳細については明らかとなっていない。さらに、焼酎もろみ中のpHは、白麹菌が生産する多量のクエン酸のために、きわめて低pHとなっている。また、焼酎の発酵過程は、清酒醸造（10～15℃）と比べ比較的高温（20～30℃）で推移する¹³⁾。このようなことから、白麹菌の β -グルコシダーゼがもろみ中で作用するためには、酵素の耐酸性を主とした安定性も重要である。このような点について検討を行うために、白麹菌 β -グルコシダーゼの精製を行った。

第2項 材料及び方法

(1) 供試菌株

焼酎麹菌 (*Aspergillus kawachii* IFO4308) を用いた。

(2) 固体培養および液体培養法

固体培養は、破碎精米又は大麦を原料とし定法²⁹⁾により行った。ただし、培養温度は30℃一定で、48時間培養を行った。液体培養は、以下のように行った。基本培地 (0.1% Bactotryptone, 0.5% 酵母エキス, 0.1% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.001% FeSO₄ · 7H₂O, pH 5.0) に0.3%蔗糖と2%の各炭素源を添加し、30℃で3日間培養を行った。

(3) 酵素活性測定

β -グルコシダーゼ活性測定は以下の方法により行った。1mMのp-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド (PNPG) を基質とし、50mM酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中、37℃で酵素を作用させ、反応停止後、吸光度 (410nm) により、生じたp-ニトロフェニルの量を測定し酵素活性を求めた。反応停止は、反応液の2倍量の200mM炭酸ナトリウム溶液を添加する事により行った。 β -グルコシダーゼ活性1Uは、1分間に1 μ molのグルコースを遊離する活性とした。

(4) タンパク質含量及び菌体量の測定

タンパク質含量は、Bovine serum albuminを標準物質とし、dye-binding assay (Protein assay kit, Bio-Rad Co. Ltd.) により測定した。また、菌体量の測定は五味らの方法³⁰⁾に従い、グルコサミン量を測定し、菌体量に換算することにより行った。

(5) 遊離型粗酵素液の調製

遊離型粗酵素溶液の調製は以下のとおり行った。大麦麹 (200g) を、1Lの抽出緩衝液 (100mM 酢酸ナトリウム、90mM NaCl、pH 5.0) により4℃で12時間抽出を行った。その後、濾紙により濾過を行い、濾液を遊離型酵素粗酵素液として使用した³¹⁾。

(6) 結合型粗酵素液の調製

結合型粗酵素液の調製は以下のとおり行った。白麹菌 (*A. kawachii* IFO4308) を、C

源として1%グルコース、2%キシランを含んだ基本培地で30℃、4日間培養し、菌体を回収した。回収した菌体を等張液（20mM酢酸ナトリウム、0.8M NaCl、pH 5.0）で2回洗浄し、3mg / ml Yatalase（TaKaRa）を含んだ等張液により37℃、3時間処理し、細胞壁画分のタンパク質を可溶化した。その後、反応液を3,000 ×gで20分間遠心し、上清を結合型粗酵素液として使用した。

(7) β-グルコシダーゼの精製

遊離型、結合型β-グルコシダーゼとも同様の過程により精製を行った。また、精製の全工程は4℃で行った。液体クロマトグラフィーはHPLCを用い行い、カラムからの溶出液は、280nmの吸光度でモニターした。

ステップ1：それぞれの粗酵素液（1L）を7,600×gで20分遠心し上清を回収し、その上清に対し80%飽和となるよう硫酸安を加え、4℃で一晩放置した後7,600 ×gで20分間遠心した。沈殿を回収し、30mlの20mM酢酸緩衝液（pH5.0）に溶解した後NAP-25カラム（Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.）により脱塩を行った。

ステップ2：脱塩を行った試料を、20mM酢酸緩衝液（pH5.0）で平衡化した陰イオン交換カラム（TSKgel DEAE-5PW: Tosoh Co. Ltd.）に供し、0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.5M NaCl stepwise gradientにより溶出を行った。β-グルコシダーゼ活性はPNPGを基質とした(4)の方法により測定した。

ステップ3：活性がある画分を集め、限外濾過膜により脱塩、濃縮後20mM酢酸緩衝液（pH4.0）で平衡化した陽イオン交換カラム（TSKgel CM-5PW: Tosoh Co. Ltd.）に供した。カラムからの溶出は0～0.4M NaCl gradientにより行った。

ステップ4：先のステップの活性区分を限外濾過により濃縮を行った後、ゲル濾過（TSKgel G3000SW : Tosoh Co. Ltd.）に供した。カラムの平衡化及び溶出には0.2M NaClを含む20mM酢酸緩衝液（pH 5.0）を用いた。

(8) 電気泳動

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)は、Laemmli³²⁾ の方法に従い、0.1%のSDSを含む4～20%のgradient gelを用い行った。等電点

電気泳動（IEF）にはPhast system (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.) を用いた。

(9) N-結合型糖鎖の除去

N-結合型糖鎖の除去は、N-エンド- β -アセチルグルコサミニダーゼH (EndoH: TaKaRa) により行った。すなわち、各精製酵素 (20 μg) を0.2%SDS、0.2M 2-メルカプトエタノールを含む50mM リン酸緩衝液 (pH 5.5) 中で10分間煮沸し、その後、EndoH (0.5mU) を加え、37°Cで15時間反応を行った。反応終了後、適量をSDS-PAGE に供した。

(10) 精製タンパク質のN-末端およびC-末端アミノ酸配列の解析

精製タンパク質のN-末端アミノ酸配列は、Perkin Elmer社の Procise Model 491を用い、エドマン分解により決定した。C-末端アミノ酸配列については、Perkin Elmer社の Procise C Model 491C-1を用い決定した。

(11) 精製タンパク質の糖組成分析

中性糖の分析には、各精製タンパク質 (8 μg) を2M トリフルオロ酢酸中で、100°C、2 時間加水分解した試料を使用し、アミノ糖の分析には、4M HCl中で、100°C、4時間加水分解した試料を使用した。各加水分解物を、凍結乾燥後、ミリQ水に再懸濁し、分画分子量 10,000の限外濾過膜により濾過を行った後、HPLC (Dionex社 model DX-500) により解析を行った。カラムは、Carbopac PA1 (Dionex社) を使用し、16mM NaClにより平衡化、溶出を行った。溶出された糖は、電気化学検出器によりモニターした。

(12) 各精製 β -グルコシダーゼの酵素化学的諸性質

精製酵素の至適pHは、0.1M MacIlvain緩衝液にて任意のpHに調整した緩衝液中で、PNPGを基質として決定した。至適温度は、50mM 酢酸緩衝液中でPNPGを基質として各温度で15分間反応を行い決定した。基質特異性については、*p*-ニトロフェニル- α -D-グルコピラノシド、*p*-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド、*p*-ニトロフェニル- β -D-キ

シロピラノシド、*p*-ニトロフェニル- β -D-マンノピラノシド、*p*-ニトロフェニル- β -L-アラビノフラノシド、セロビオース、セロトリオースを基質として用いた。反応は、50mM酢酸緩衝液中で37°C、15分間行い、反応液の2倍量の200mM炭酸ナトリウム溶液を添加することにより反応を停止し、生じた*p*-ニトロフェニル、あるいはグルコースを吸光度、あるいはHPLC (Dionex社model DX-500) により測定し酵素活性とした。

第3項 実験結果

(1) 白麹菌による β -グルコシダーゼの生産

白麹菌の β -グルコシダーゼを精製するに当たって、まず、 β -グルコシダーゼの生産に及ぼす培養条件の影響について検討した。原料として米又は大麦を使用し固体培養を、基本培地に各炭素源を2%になるよう添加し液体培養を行った。固体培養抽出液、あるいは液体培養上清中の β -グルコシダーゼ活性を遊離型 β -グルコシダーゼ、抽出後、さらに洗浄を行った固体培養残査、あるいは液体培養により得られた菌体を洗浄後、菌体に残っている活性を結合型 β -グルコシダーゼとして測定した。

Table 1-1. The effects of culture conditions on the production of β -glucosidase.

Carbon source	CB β -glucosidase U/mg mycelia (%)	EX β -glucosidase U/mg mycelia (%)	Total U/mg mycelia (%)
Solid culture			
Rice	29.5 (12.3)	210.2 (87.7)	239.7 (100)
Barley	292.3 (30.0)	682.0 (70.0)	974.3 (100)
Liquid culture			
Cellobiose	2.92 (92.7)	0.23 (7.3)	3.15 (100)
Cellulose	0.69 (88.4)	0.09 (11.6)	0.78 (100)
Xylan	35.68 (79.6)	9.14 (20.4)	44.82 (100)
Xylose	20.34 (94.4)	1.21 (5.6)	21.55 (100)
Glycerol	7.12 (79.8)	1.80 (20.2)	8.92 (100)
Glucose	5.77 (98.1)	0.11 (1.9)	5.88 (100)

Rice and Barley were used as material for solid cultivation. Indicated carbon sources (2%) were added to each liquid broth and this was cultivated for 3 days at 30°C. EX and CB indicate extracellular and cell wall-bound respectively.

その結果をTable 1-1に示した。白麹菌の β -グルコシダーゼは、固体培養で高い生産が見られ、特に大麦を原料としたときにより多く生産された。液体培養を行った場合には、キシラン、キシロースをC源として用いた時に高い酵素生産が見られた。また、固体培養を行った場合には、遊離型の β -グルコシダーゼが多く、液体培養を行った場合には結合型の β -グルコシダーゼがより多く生産される傾向にあった。固体培養を行った場合にも、10~30%程度の結合型酵素活性が存在していたことから、遊離型 β -グルコシダーゼと共に、結合型 β -グルコシダーゼも精製することとした。遊離型酵素の精製は大麦を原料とした固体培養抽出液、結合型酵素はキシランをC源とし液体培養を行った菌体から精製することとした。

(2) 結合型 β -グルコシダーゼの可溶化

精製に先立って、結合型 β -グルコシダーゼの可溶化を試みた。キシラン培地で4日間培養した菌体を等張液（20mM 酢酸ナトリウム（pH5.0）、0.8M NaCl）で洗浄後、5mg/mlのChitinase（Sigma）、Zymolyase 100T（生化学工業株）、又はYatalase（TaKaRa）を含む等張液中で可溶化を行った（Figure 1-1）。その結果、キチナーゼ、キトビアーゼ、 β -1,3-グルカナーゼを主体とするYatalaseを用いることで、約90%の活性

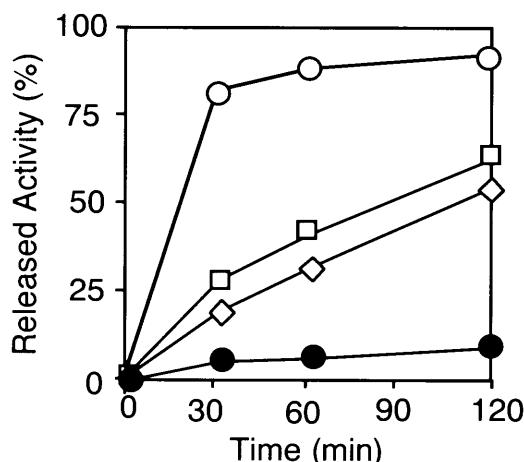


Figure 1-1 Solubilization of β -glucosidase from mycelia. *A. kawachii* IFO4308 was cultivated in liquid culture (including 1% glucose, 2% xylan as carbon sources) for 4 days and harvested, washed with 1L of isoosmotic lysis buffer (20 mM sodium acetate, pH 5.0, and 0.8 M NaCl), then it was lysed in isoosmotic lysis buffer including 5 mg/ml Chitinase (Sigma), Zymolyase 100T (Seikagaku Co., Ltd.) or Yatalase (Takara) and incubated at 37°C. The lysates were centrifuge at 3,000 x g for 5 min and supernatant were assayed against PNPG. ○, □, ◇ and ● represent Yatalase, Zymolyase, Chitinase, and control (no addition of enzyme), respectively. The 100% relative activity is equal to the whole activity of mycelia.

を可溶化することが出来た。また、キチナーゼを主体とするChitinaseや β -1,3-グルカナーゼを主体とするZymolyaseを用いた場合でも、約60%の活性は可溶化することが出来た。このことから、菌体の主な β -グルコシダーゼ活性は細胞壁中に存在し、細胞壁のキチン鎖、グルカン鎖の両方を分解することで、より効率的に可溶化できることが明らかとなった。以上のことから、結合型 β -グルコシダーゼは等張液中でYatalaseにより可溶化し粗酵素液とすることとした。

(3) 各 β -グルコシダーゼの精製

遊離型、結合型それぞれの粗酵素を、80%飽和硫酸により硫酸沈殿を行い、得られた沈殿を20mM酢酸緩衝液(pH5.0)にて懸濁し、脱塩後、同緩衝液で平衡化したDEAE陰イオン交換カラムに供した。カラムからの溶出は、0.1~1.5 M NaClのStepwise法により行ったところ、Figure 1-2に示したクロマトグラムが得られた。主な β -グルコシダーゼ活性のピークは、遊離型、結合型共にFraction 31~35に見られた。また、結合型酵素に関しては、Fraction 41~42にわずかに活性が見られた。Fraction 31~35の主な活性画分を回収し、20mM酢酸緩衝液(pH4.0)にて脱塩、濃縮後、同緩衝液で平衡化したCM陽イオン交換カラムに供した。カラムからの溶出は、0~0.4 M NaClのLinear gradientにより行ったところ、遊離型酵素では、CM-1、CM-2の2つの活性化画分を得ることが出来た(Figure 1-3)。一方結合型酵素では、CM-2の画分のみ得ることが出来た。これら3つの画分を、脱塩、濃縮し、それぞれTSKgel G3000SWを用いたゲルクロマトグラフィーに供した。カラムの平衡化及び溶出には0.2M NaClを含む20mM酢酸緩衝液(pH 5.0)を用いた。各活性画分を回収し、SDS-PAGEに供したところ、いずれも単一のバンドを与え、電気泳動的に均一であることが示された(Figure 1-4)。また、データは省略するが、等電点電気泳動及び、逆相クロマトグラフィーに供したところ、いずれも単一のバンド、単一のピークを得る事が出来た。得られた2種類の遊離型精製 β -グルコシダーゼを、CMクロマトグラフィーの溶出順に、 β -グルコシダーゼEX-1、EX-2、また、得られた1種類の結合型精製 β -グルコシダーゼを β -グルコシダーゼCB-1と名付けた。精製過程での収率、活性の変化を精製表(Table 1-2)にまとめた。精製酵素のPNPGに対する比活性はほぼ一定で、それぞれ、22.0、21.2、23.8 U/mg proteinであった。

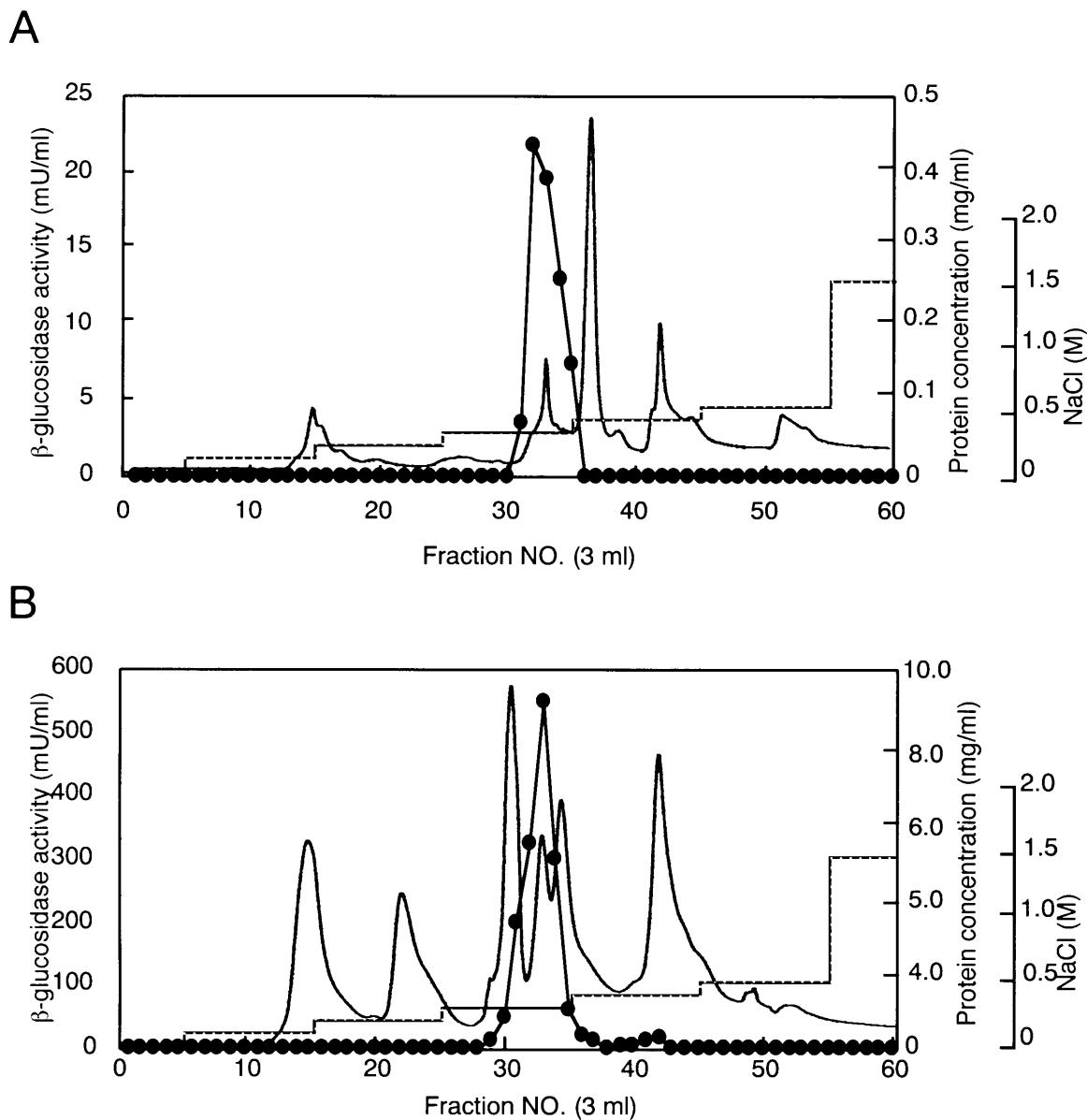
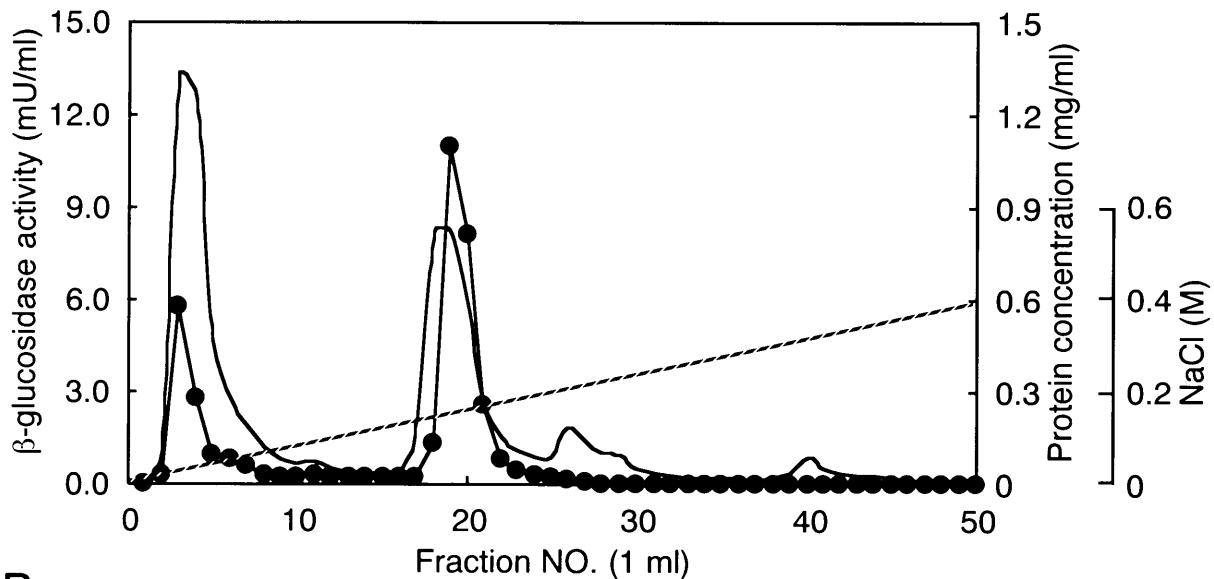


Figure 1-2. Profile of anion exchange chromatography. (A) Crude enzyme prepared from the extract of solid culture. (B) Crude enzyme prepared from the lysate of mycelial cell wall. ● indicates β -glucosidase. Black line and dotted line indicate protein and NaCl concentration respectively.

A



B

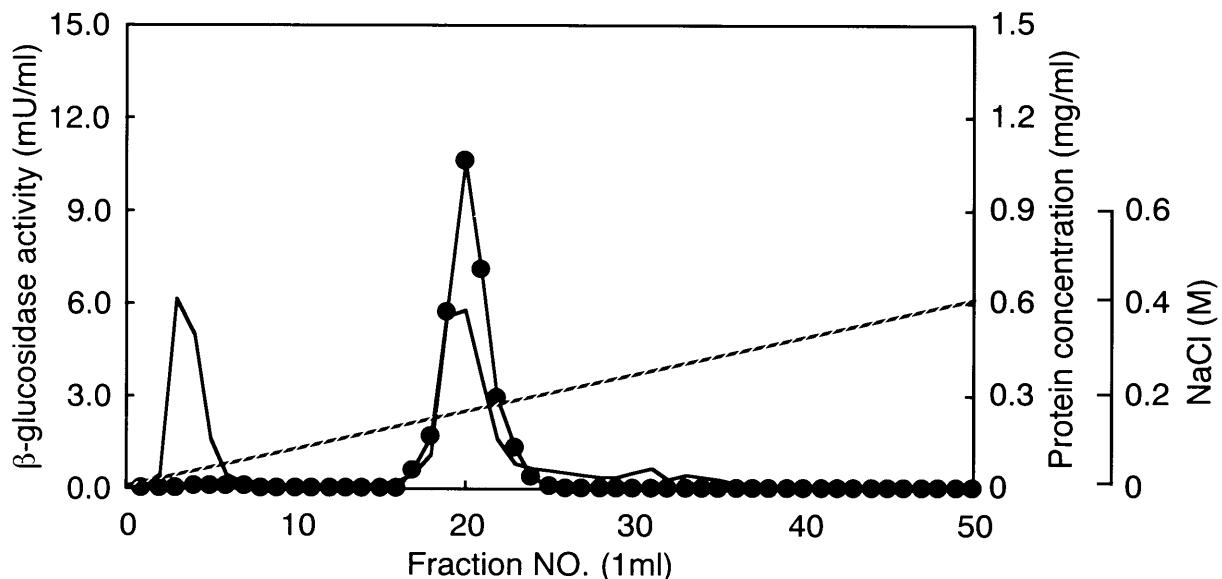


Figure 1-3. Profile of cation exchange chromatography. (A) Extracellular enzymes. (B) Cell wall-bound enzymes. ● indicates β -glucosidase. Black line and dotted line indicate protein and NaCl concentration respectively.

Table 1-2. Purification of β -glucosidases from *A. kawachii*

	Total protein (mg)	Total activity (Ub)	Specific activity (U/mg protein)	Purification -fold	Recovery (%)
EX β-glucosidase					
Crude enzyme ^a	62,488	3,507	0.06	1.00	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50,464	2,910	0.06	1.03	83.0
DEAE-5PW	10,770	1,985	1.84	32.8	56.6
CM-5PW					
EX-1	2,322	382	1.64	29.3	10.9
EX-2	123	1,092	8.84	158	31.1
G3000-SW					
EX-1	10	231	22.0	327	5.5
EX-2	28	598	21.2	300	13.6
CB β-glucosidase					
Crude enzyme ^a	263,130	12,643	0.05	1.00	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	47,900	11,393	0.24	4.95	91.1
DEAE-5PW	2,380	5,150	2.16	45.0	40.7
CM-5PW	316	3,530	11.2	233	27.9
G3000-SW	41	974	23.8	494	7.7

a The volume of crude enzyme was about 1 liter.

b Activity was measured against PNPG under standard conditions and converted to the value of units using a calibration curve.

(4) 各精製 β -グルコシダーゼの分子量及び等電点

各精製 β -グルコシダーゼを SDS-PAGE に供し、 β -グルコシダーゼ EX-1、EX-2、CB-1 の分子量を測定したところ、それぞれ約 145kDa、130kDa、120kDa であった (Figure 1-4)。また、データは示していないが、各酵素の等電点はすべて 4.5 であった。一般に、麹菌の分泌タンパク質は糖蛋白質であることから、N-結合型糖鎖の付加について検討を行った。各酵素を N-エンド- β -アセチルグルコサミニダーゼ H (EndoH) で処理し、N-結合型糖鎖を切除した後 SDS-PAGE に供したところ、すべての精製酵素の分子量は低分子量側にシフトし、しかも同一の分子量、約 100kDa となった (Figure 1-4)。

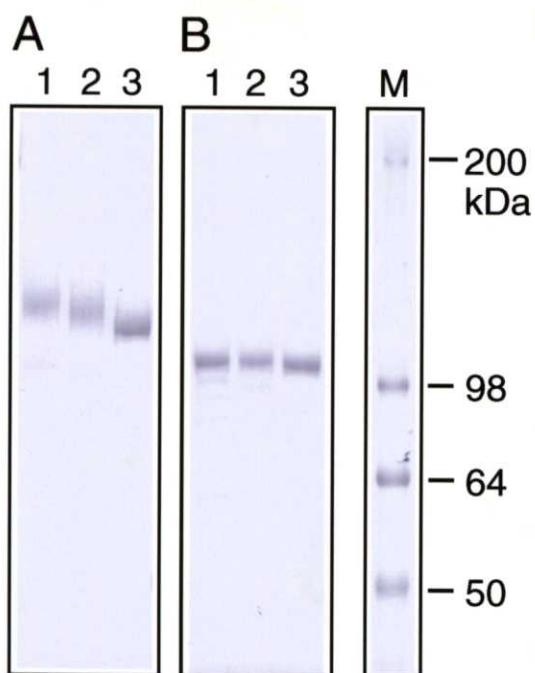


Figure 1-4 SDS-PAGE of the purified β -glucosidases. (A) SDS-PAGE of the purified β -glucosidases. (B) SDS-PAGE of the purified β -glucosidase after Endo H treatment. Lane 1, EX-1; Lane 2, EX-2, Lane 3, CB-1; Lane M, standard protein markers.

(5) 各精製 β -グルコシダーゼの N-末端および C-末端アミノ酸配列

得られた各精製 β -グルコシダーゼの N-末端アミノ酸配列、C-末端アミノ酸配列解析結果を Table 1-3 に示す。エドマン法にて各精製 β -グルコシダーゼの N-末端アミノ酸配列を決定したところ、いずれも 11 残基まで明瞭なチャートが得られ、すべての精製酵素で同一のアミノ酸配列を持っていた。また、C-末端アミノ酸配列についても 3 残基まで明瞭なチャートが得られ、すべての酵素で同一の C-末端アミノ酸配列であった。

Table 1-3. N-terminal and C-terminal amino acid sequence of purified β -glucosidases.

Enzyme	N-terminal sequence	C-terminal sequence
EX-1	DELAYSPPYYP	TVH
EX-2	DELAYSPPYYP	TVH
CB-1	DELAYSPPYYP	TVH

(6) 各精製 β -グルコシダーゼの糖組成

得られた 3 種類の精製 β -グルコシダーゼの糖組成について検討を行った結果を Table 1-4 に示す。中性糖の測定には、各精製 β -グルコシダーゼを 2M トリフルオロ酢酸中で、100 °C、6 時間加水分解したもの、アミノ糖の測定には、各精製 β -グルコシダーゼを 4M HCl 中で、100°C、4 時間加水分解したものを試料として使用した。その結果、各精製酵素の糖含量は、分子量に従う形で、EX-1 > EX-2 > CB-1 の順で増加していた。また、すべての精製酵素で、マンノース、ガラクトース、グルコサミンを含んでおり、また、79.9~81.5% と高いマンノース含量を有していた。

Table 1-4. The sugar composition of the purified β -glucosidases.

	EX-1		EX-2		CB-1	
	mol/mol Protein	%	mol/mol Protein	%	mol/mol Protein	%
Galactosamine	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Glucosamine	13.7	13.2	14.3	15.9	7.9	13.4
Galactose	9.6	9.2	6.4	7.1	3.0	5.1
Mannose	80.7	77.6	69.0	76.9	48.0	81.5
Total	104.0	100	89.7	100	58.9	100

(7) 各精製 β -グルコシダーゼの酵素化学的性質

各精製酵素の至適 pH、至適温度、基質特異性、及び各種阻害剤の影響について検討を行った。至適 pH については、pH 2.2~8.0 の範囲において、0.1M MacIlvain 緩衝液により任意の pH に調整し検討を行った。その結果、いずれの酵素でも pH 5.0 付近で最も高い酵素活性を示した (Figure 1-5 (A))。また、至適温度については、10~90°C の範囲で検討を行い、いずれの酵素でも、60°C で最高となった (Figure 1-5 (B))。続いて、基質特異性について検討を行った結果を Table 1-5 に示す。いずれの精製酵素についても、ほぼ同様の

傾向を示し、*p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranosideを基質として使用したときと比較して、Celllobiose、Cellotrioseに対して、若干高い基質特異性を示した。さらに、様々な阻害剤の影響について検討を行った結果をTable 1-6に示す。この場合にも、他の物と同様、3種類の精製酵素間で大きな違いは見られなかった。すべての酵素で、グルコースあるいはマルトースの添加によって酵素活性は阻害された。また、イオン類について検討を行った結果では、 AgNO_3 及び HgCl の添加により阻害を受けた。キレート剤であるEDTAや、界面活性剤であるSDSを添加したときにはあまり大きな阻害は見られなかった。

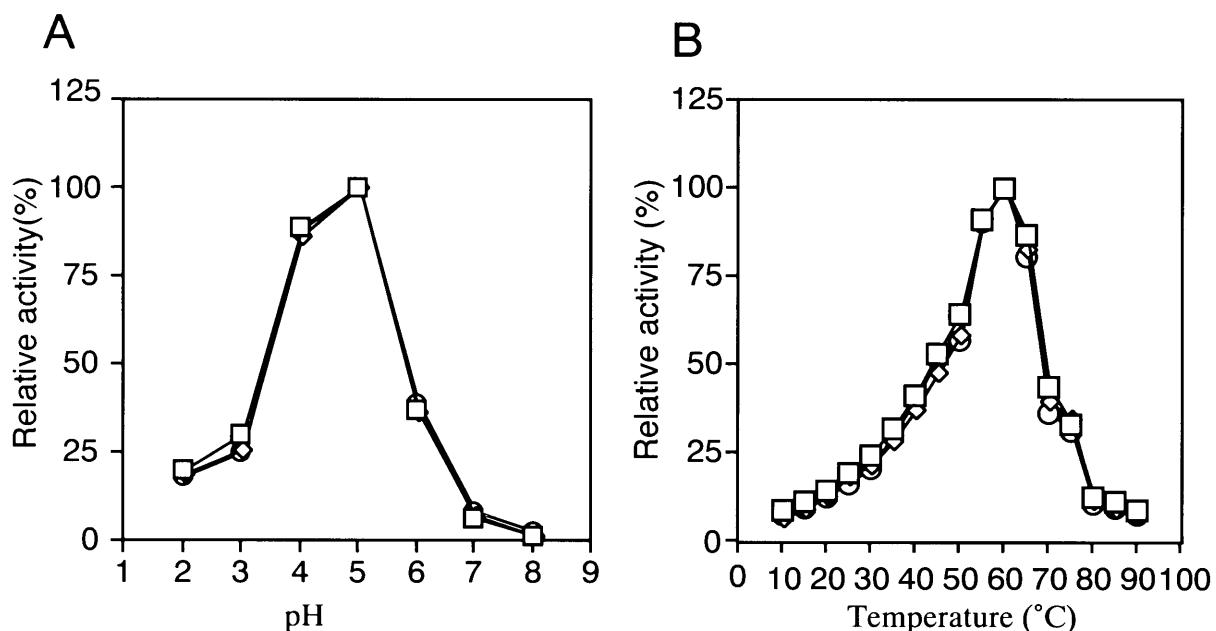


Figure 1-5. Effects of pH and temperature on *A. kawachii* β -glucosidases. (A) Effect of pH on purified β -glucosidases activity. The effect of pH on β -glucosidases activity were measured at 37°C for 15 min using PNPG as substrate in the series of McIlvaine buffer system. (B) Optimum temperature of purified β -glucosidases activity. The substrate is 1 mM PNPG in 50 mM acetate buffer (pH 5.0) and incubated for 15 min at indicated temperature. Symbols: -□-: EX-1, -◇-: EX-2, -○-: CB-1

Table 1-5. Relative activity of the purified β -glucosidases against different substrates.

Substrate	Relative activity(%)		
	EX-1	EX-2	CB-1
<i>p</i> -nitrophenyl- α -D-glucopyranoside	1.7	2.7	1.6
<i>p</i> -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside	100	100	100
<i>p</i> -nitrophenyl- β -D-galactopyranoside	0.7	2.4	0.8
<i>p</i> -nitrophenyl- β -D-xylopyranoside	1.1	1.7	0.7
<i>p</i> -nitrophenyl- β -D-mannopyranoside	0.3	0.9	0.3
<i>p</i> -nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside	1.1	2.6	1.3
Cellobiose	108.8	112.2	116.4
Cellotriose	158.3	145.4	171.2

All substrate were tested at a concentration of 1 mM in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)

Table 1-6. Inhibition of β -glucosidase activity in the presence of different sugars and ions and organic solvents.

Inhibitor	Final concentration (mM)	Relative activity (%)		
		EX-1	EX-2	CM-1
Glucose	100	8.8	10.2	8.2
Galactose	100	100.9	104.9	101.5
Mannose	100	113.1	105.5	107.3
Lamnose	100	110.0	120.6	120.8
Xylose	100	115.2	124.4	124.1
Arabinose	100	92.9	91.5	82.6
Fructose	100	109.9	111.8	98.4
Maltose	100	45.9	46.4	37.1
AgNO_3	4	17.0	22.3	18.2
MnCl_2	4	100.4	104.3	93.8
CaCl_2	4	97.0	103.1	117.2
FeCl_3	4	114.2	115.0	132.5
HgCl_2	4	25.6	23.5	34.3
MgCl_2	4	99.3	101.2	103.8
ZnCl_2	4	102.9	100.7	98.3
NaN_3	4	85.4	80.4	93.7
EDTA	4	103.5	79.0	87.1
SDS	4	86.9	85.2	100.6
KF	4	88.3	83.8	80.9
KI	4	84.4	85.9	80.9

β -glucosidase activity was determined against PNPG in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing suitable amounts of inhibitors.

第4項 要約

- (1) 白麹菌 (*A. kawachii* IFO4308) の β -グルコシダーゼ生産について検討を行ったところ、遊離型、および菌体結合型の β -グルコシダーゼを生産していた。これらの酵素は、固体培養では遊離型が多く、液体培養では結合型が多く生産されていた。また、結合型の β -グルコシダーゼは、細胞壁消化酵素によって可溶化された。
- (2) 白麹菌が生産する β -グルコシダーゼの精製を行ったところ、遊離型のものを2種類 (EX-1、EX-2) 、結合型ものを1種類 (CB-1) を得ることが出来た。
- (3) これらの各精製酵素分子量は、EX-1 : 145 kDa、EX-2 : 130 kDa、CB-1 : 120 kDa と異なっていたが、EndoHによるN-結合型糖鎖の消化により同一の分子量100 kDaへとシフトした。また、これらの酵素の糖組成、糖含量について検討を行ったところ、全ての精製酵素で、ガラクトース、グルコサミン、マンノースを含んでおり、分子量の増加に従い糖含量も増加していた。
- (4) 精製した3種類の β -グルコシダーゼのN-末端およびC-末端アミノ酸配列は完全に一致した。
- (5) 精製した3種類の β -グルコシダーゼの酵素化学的性質について検討を行ったところ、至適pH、至適温度、基質特異性、阻害剤の影響すべてにおいて、同様の傾向を示した。

第5項 考察

白麹菌が生産する主な β -グルコシダーゼには、遊離型のものが2種類 (EX-1、EX-2) 、結合型のものが1種類 (CB-1) 存在することが明らかとなった。これらの精製酵素は、分子量、局在性が異なるにも関わらず、全く同一のN末端、およびC末端アミノ酸配列を持っていた。さらに、各精製酵素の酵素化学的諸性質（比活性、至適pH、至適温度、基質特異性等）についても同様の傾向を示したことから、これらの酵素は同一遺伝子によってコードされているのではないかと考えられる。さらに、これらの酵素の分子量は異なっていたが、EndoH処理によりN-結合型の糖鎖を切除する事で、ほぼ同じ分子量100 kDaの位置にシフトすること、および、各精製酵素の糖含量が分子量に従って増加してゆくことから、本酵素は同一遺伝子によりコードされ、培養条件の違いにより、酵素の局在性と共にN-結合型糖鎖の修飾量が制御されているものと思われる。

これまでに、同一タンパク質の糖鎖の修飾が異なる例として、*A. nidulans* のインベルターゼに関する報告が挙げられる³³⁾。*A. nidulans* のインベルターゼには、S-form: 76 kDaと、F-form: 110 kDaがあり、これらは同一のタンパク質のコアを持ち、N-結合型糖鎖の修飾量が異なることで分子量が異なっていると考えられている。S-form、F-formの生産は、培養のフェーズで制御されており、培養の初期（18時間）ではS-formが主に生産され（80%）、培養20時間を超えたあたりからF-formが増加し始め、培養31時間では、50%以上がF-formとなることが報告されている。白麹菌のβ-グルコシダーゼでも、糖差の修飾量が異なる3種類のformがあることが明らかとなつたが、これらの糖鎖修飾量についても、同様に培養時間の影響により変動することが考えられる。しかし、これに加えて、固体培養および液体培養という培養環境、および培地の組成などが大きく異なるなど、培養時間以外の因子が、糖鎖修飾量の変動に関与している可能性も考えられる。

また、各精製酵素の糖組成について検討したところ、いずれの精製酵素でも、その約80%程度が、マンノースであり、13~15%程度のグルコサミンを含んでいた。このことから、本酵素はMinobeらにより報告されている Taka-amylase Aの糖鎖と同様、ハイマンノース型糖鎖を多く含んでいることが示唆される³⁴⁾。また、各酵素で5~10%程度のガラクトースが含まれていたことから、おそらくは、α-ガラクトシダーゼやα-グルコシダーゼで報告されているような、ガラクトフラノース構造を含む糖鎖も含まれているのではないかと考えられた^{35, 36)}。

今回、固体培養を行った場合には、約80%程度が遊離型、液体培養を行った場合には、逆に約80%程度が結合型となることが明らかとなつたが、このことは、同一遺伝子産物の局在性が培養条件により制御されていることを示唆している。一般に、米麹などの固体培養では水分活性が低く、特に製麹が進むにつれ、乾燥およびグルコースの増加により、培地中の水分活性はさらに低下する^{37, 38)}。このような環境では、麹菌の栄養となる物質の拡散速度は低下し、麹菌は、より多く栄養源を摂取するため多量の酵素を分泌する必要があるものと考えられる。一方、液体培養では物質の拡散速度が非常に早い。このような環境で、酵素を菌体外に分泌した場合には、酵素自体がすみやかに拡散してしまうため、酵素は菌体外には分泌せず、細胞壁中にとどめておいた方が生育に有利であると考えられる。以上のことから、糸状菌が環境条件に合わせて酵素の局在性を制御している事は、き

わめて合目的であると考えられ、その制御機構に興味が持たれる。

また、焼酎醸造において、 β -グルコシダーゼが作用する場である「もろみ」という環境を考えた場合には、細胞壁結合型の酵素より、遊離型の酵素の方がより効率的に作用するのではないかと推察される。白麹菌の β -グルコシダーゼ生産を見てみると、固体培養を行った場合に、多くの β -グルコシダーゼが遊離型となる。このことは、実際の焼酎もろみ中では、遊離型のものが主となって作用する事を示している。つまり、我々は製麹という固体培養を行うことにより、遊離型の酵素をより多く取得し、結果的に、効率よく β -グルコシダーゼを利用しているものと考えられる。また、酵素の至適pHを検討した結果、精製酵素は、もろみのpHであるpH3~4.0の範囲でも25~80%程度の活性を保持していたことから、十分に機能しているものと思われた。

また、本酵素は、グルコースやマルトースにより阻害を受ける。しかし、清酒が平行複発酵であるのに対し、焼酎もろみでは溶解律速の状態にあることが知られている。実際に麦焼酎の場合では、もろみ中のグルコース濃度は0.018% (1 mM) であると報告されている。よって、本酵素は、焼酎もろみ中でもグルコース糖により阻害されず、十分に作用し得るものと考えられた。

第2節 精製 β -グルコシダーゼの安定性と細胞壁多糖画分

第1項 緒言

先述したように、焼酎もろみは、白麹菌が生産するクエン酸により低pH(3.0付近)となっている。また、もろみの発酵は、清酒醸造(10~15°C)と比べて、比較的高温(25~30°C)で推移する。白麹菌の酵素がもろみ中で作用するためには、このような過酷な条件下で、酵素の活性が失われないことが非常に重要である。実際に、白麹菌は α -アミラーゼやプロテアーゼ、キシラナーゼなど、耐酸性に優れた様々な酵素を生産している。これらの酵素は焼酎醸造上重要な役割を果たしており、また、様々な耐酸性酵素の供給源としても注目されている^{2, 22-25)}。

以上のことから、白麹菌 β -グルコシダーゼに関しても、もろみ中で十分に機能するためには、その安定性、特に耐酸性である事が非常に重要である。そこで、今回精製した β -グルコシダーゼの耐酸性および熱安定性について検討を行った。

第2項 材料及び方法

(1) 供試菌株

焼酎麹菌(*Aspergillus kawachii* IFO4308)及び焼酎用S-2酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)を用いた。

(2) 遊離型及び結合型粗酵素液の調製

各粗酵素液の調製は、前節の2-(5), (6)に従い行った。

(3) 精製 β -グルコシダーゼの調製および酵素活性測定

遊離型 β -グルコシダーゼEX-1、EX-2、結合型 β -グルコシダーゼCB-1は、前節の2-(7)に従い調製した。 β -グルコシダーゼ活性は、前節の2-(3)に従い、PNPGを基質として測定した。

(4) 焼酎1次もろみの作成

白麹は破碎精米（50g）を原料として、恒温恒湿器を用い岡崎らの方法³⁷⁾に従い作成した。これに汲水（60 ml）を加え、クエン酸により酸度を6.0に調製した後、酵母を添加し、30℃で7日間培養を行った。もろみは2本作成し、一つはβ-グルコシダーゼ活性測定、もう一つは、炭酸減量測定に使用した。もろみ中のβ-グルコシダーゼ活性は、約3 mlのもろみを12,000×gで4℃、5分間遠心し、得られた上清をNAP-25（Amersham Pharmacia Biothech）で透析後測定した。

(5) タンパク質含量及び菌体量の測定

タンパク質含量および菌体量は、前節2-(4)の方法に従って測定した。

(6) 粗細胞壁画分および細胞壁多糖画分の調製

細胞壁多糖画分は、*A. kawachii* IFO4308株を、基本培地（前節2-(2)）に1%グルコース、2%キシランを添加した液体培地で、30℃、3日間振とう培養した菌体から以下の方法で調製した。まず、ペーパータオルにて水分を吸収した菌体（3g）を、1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride（PMSF）を含んだ50 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）30 mlで3回洗浄した。この菌体を、再び1 mM PMSFを含んだ50 mM 酢酸緩衝液30 mlに懸濁し、これに20 mlのガラスビーズ（直径0.45～0.5 mm）を加え、ブラウンのホモジナイザー（B.ブラウン社）で1分間激しく振とうし、1分間氷水中で冷却するという操作を計5回繰り返し菌体を破碎した。さらに、ガラスビーズをデカンテーションで除いた後、菌体破碎液を4℃、3,000×gで5分間遠心し、沈殿を回収した。この沈殿を、30 mlの1 mM PMSFを含んだ50 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）で5回洗浄し、粗細胞壁画分とした。粗細胞壁画分は、細胞壁多糖画分の調製、及び細胞壁結合型β-グルコシダーゼのウエスタン解析に使用した。つづいて、細胞壁多糖画分を調製するために、この細胞壁画分を1 mM PMSFを含んだ5 M LiCl 30 mlで2回洗浄し、さらに1 mM PMSFを含んだ50 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）30 mlにて3回洗浄を行った。その後、3% SDS溶液（3% SDS、0.1 M EDTA、40 mM ジチオスレイトール、50 mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.0））に懸濁し、湯煎により100℃、10分間加熱した。その後、室温で3,000×gで5分間遠心し、沈殿を回収した。沈殿はさらにミリQ

水30 mlで10回洗浄し、さらに凍結乾燥した後、可溶性多糖画分として使用した。

(7) 精製 β -グルコシダーゼの安定性

pH安定性は、以下のとおり測定した。各酵素液を0.1 M MacIlvain緩衝液 (pH 2.0～8.0)、0.1 M グリシン-NaOH緩衝液 (pH 9.0～10.0) により任意のpHに調整し、37°Cで1時間放置した。その後、酢酸緩衝液にてpHを5.0とした後、 β -グルコシダーゼ活性を測定し、残存活性として示した。また、温度安定性については、50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中で、各温度で1時間放置後、37°Cにおいて活性を測定し、残存活性として示した。各酵素活性は、PNPGを基質とし測定した。

(8) 精製 β -グルコシダーゼの細胞壁多糖画分への吸着

1 mlの各精製酵素 (60 mU/ml) を細胞壁多糖画分 (2 mg/ml) および様々な糖 (2 mg/ml) とともに、50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中でよく攪拌し、室温で10分間保持した。その後、4°C、12,000 ×gで10分間遠心をおこない上清と沈殿を分離し、PNPGを基質として β -グルコシダーゼ活性を測定した。沈殿画分については、50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を1mlとなるよう加え、良く懸濁したあと活性を測定した。

(9) β -グルコシダーゼCB-1抗血清の作成およびウエスタン解析

β -グルコシダーゼCB-1抗血清は、(株)免疫生物研究所に委託し、ウサギを用い、以下の方法で行った。まず、ウサギに精製 β -グルコシダーゼCB-1 (100 μ g) をFreundのアジュバントとともに接種し、続いてFreudの不完全アジュバントと共に精製 β -グルコシダーゼCB-1 (100 μ g) をブースターとして接種を行い免疫化を行った³⁹⁾。その後、血清を回収し、 β -グルコシダーゼCB-1抗血清として使用した。ウエスタン解析は以下の方法で行った。すなわち、各試料をSDS-PAGEにより電気泳動後、25 mM トリス、192 mM グリシン、20% メタノール、0.05% SDS中で、ニトロセルロース膜にプロッティングを行った。その後プロット膜を1%の牛血清アルブミン (BSA) を含むTBS緩衝液 (10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)、150 mM NaCl) 中で、室温、30分間処理しブロッキングを行った。さらにプロット膜をTBST緩衝液 (0.05% Tween 20を含むTBS緩衝液) で2,000

倍に希釈した抗 β -グルコシダーゼ血清と室温で30分間反応させ、これをProtoBlot II AP system (Promega, USA) により検出した。

第3項 実験結果

(1) もろみ中での β -グルコシダーゼ活性

精製酵素のpH安定性、温度安定性について検討するに先立って、まず、実際の焼酎もろみを作成し、もろみ中の β -グルコシダーゼ活性について検討を行った。原料には破碎精米を用いて、*A. kawachii* IFO4308株により製麹を行い、総米50gの規模で、1次もろみを作成した。このもろみから順次サンプリングを行い、 β -グルコシダーゼ活性を測定した。その結果、 β -グルコシダーゼ活性は1次もろみ全期間を通して、ほぼ一定の値で推移した (Figure 1-6)。

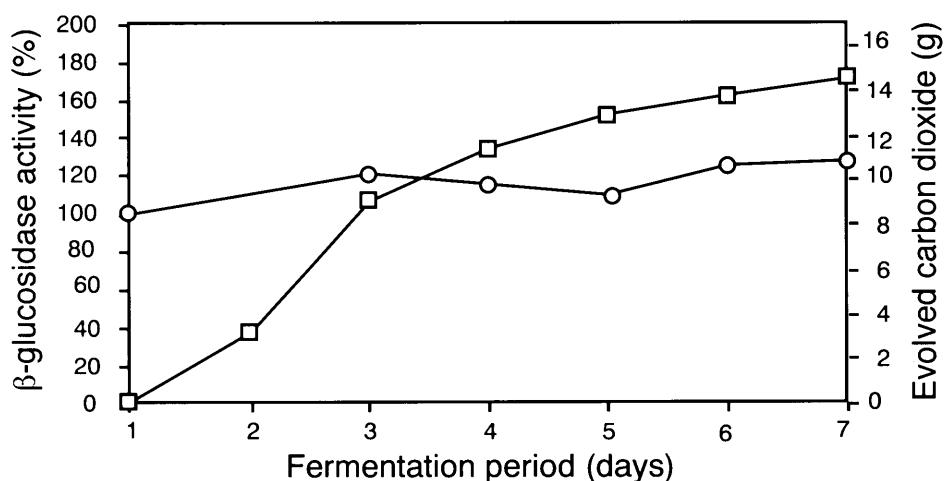


Figure 1-6. Change of β -glucosidase activity in *shochu* mash. *Shochu* mash (3 ml) was centrifuged at 8,000 rpm for 5 min. The supernatant was recovered and dialysed using a NAP-25 column. β -Glucosidase activity of samples was measured using PNPG as a substrate. β -Glucosidase activity of 1 day mash was calculated from the extracellular β -glucosidase activity of *shochu* koji. Symbols; ○, β -glucoamylase activity in the *shochu* mash; □, evolved carbon dioxide.

(2) 粗酵素および精製 β -グルコシダーゼの安定性

実際の焼酎もろみ中で、 β -グルコシダーゼ活性がほぼ一定の値を示したことから、白麹菌の β -グルコシダーゼが酸や温度に対して安定である可能性が示された。そこで、各粗酵素中の β -グルコシダーゼ活性及び精製 β -グルコシダーゼの安定性について検討を行った。各酵素液を比較的穏和であると考えられる条件 (pH 5.0、37°C) に放置して、経時的

に活性測定を行った。ところが、意外なことに精製 β -グルコシダーゼを用いた場合には、いずれの精製酵素も急速にその活性を失ってゆくことが明らかとなった（Figure 1-7 (B)）。そこで、各粗酵素中の酵素活性についても検討を行ったところ、遊離型、結合型とともに β -グルコシダーゼ活性は安定に保たれていた（Figure 1-7 (A)）。

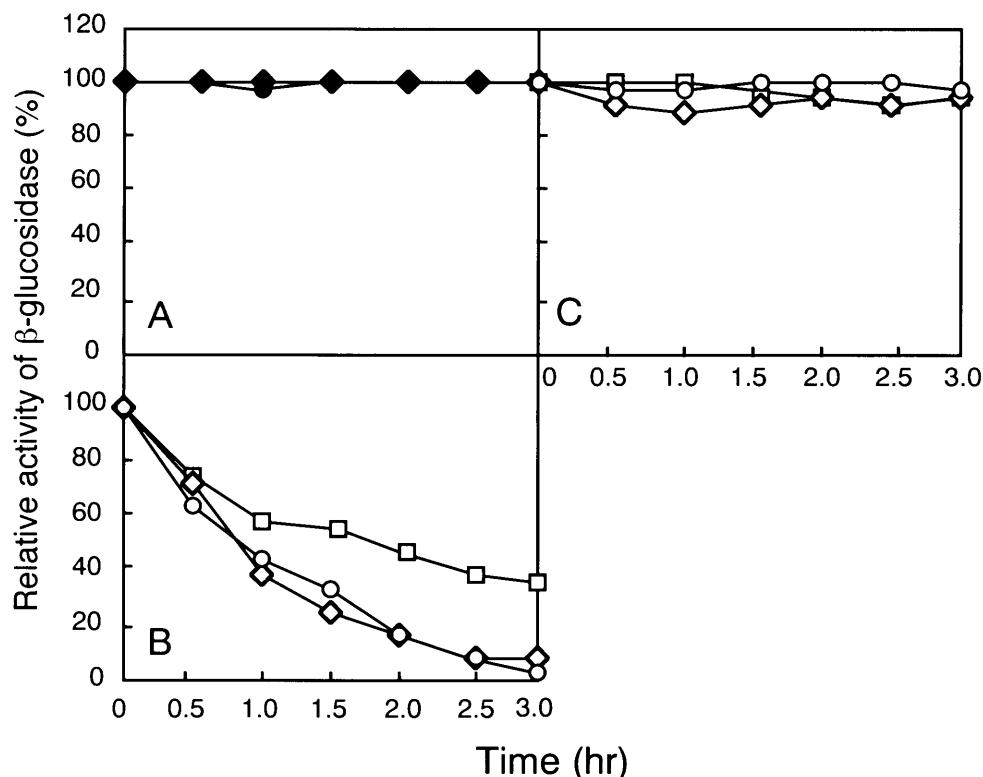


Figure 1-7. Stability of β -glucosidase activity. (A) Stability of crude extracellular and cell wall-bound β -glucosidases. These crude β -glucosidases were kept at 37°C in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0). ◆ and ● represent extracellular crude β -glucosidase and cell wall-bound crude β -glucosidase. (B) Stability of the purified β -glucosidase. All purified β -glucosidases were kept at 37°C in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0). ○, □ and ◇ represent β -glucosidase EX-1, EX-2 and CB-1. (C) Stabilization of the purified β -glucosidases by the purified cell wall fraction. The purified cell wall fraction (2 mg/ml) was added to each enzyme solution (in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)) and kept at 37°C. Each symbol is same in (B). The β -glucosidase activity was measured using PNPG as a substrate.

(3) 細胞壁多糖画分による精製 β -グルコシダーゼの安定化

遊離型、結合型に関わらず、すべての精製 β -グルコシダーゼ活性は非常に不安定であったのに対し、粗酵素中の β -グルコシダーゼは非常に安定に保たれていた。このことは、粗酵素液中に、 β -グルコシダーゼを安定化する何らかの因子が含まれることを示唆する。これまでの糸状菌 β -グルコシダーゼの研究で、細胞壁由来の多糖が酵素を活性化することが

報告されている⁹⁶⁾。そこで、細胞壁由来の多糖は、活性化だけでなく、白麹菌 β -グルコシダーゼの安定性にも関与するのではないかと考え検討を行った。3日間液体培養を行った菌体を破碎し、緩衝液による洗浄、高濃度の塩による洗浄、SDSによるボイリング処理を経て、細胞壁多糖画分を調製した。これを各精製酵素に2 mg / ml となるよう添加し、先の実験と同じ条件で、酵素の安定性について検討を行った。その結果、遊離型、結合型に関わらず、すべての精製 β -グルコシダーゼが安定化されることが明らかとなった (Figure 1-7 (C))。

(4) 各精製 β -グルコシダーゼのpH安定性と温度安定性

各精製酵素は、細胞壁多糖画分により安定化されることが明らかになったことから、各酵素のpH安定性および温度安定性についてさらに検討を行った。pH安定性については、37°C、各pH (2.0~10.0)で1時間、温度安定性については、pH 5.0で各温度に1時間放置し、その後の β -グルコシダーゼ活性を測定し、残存活性として示した。まず、pH安定性

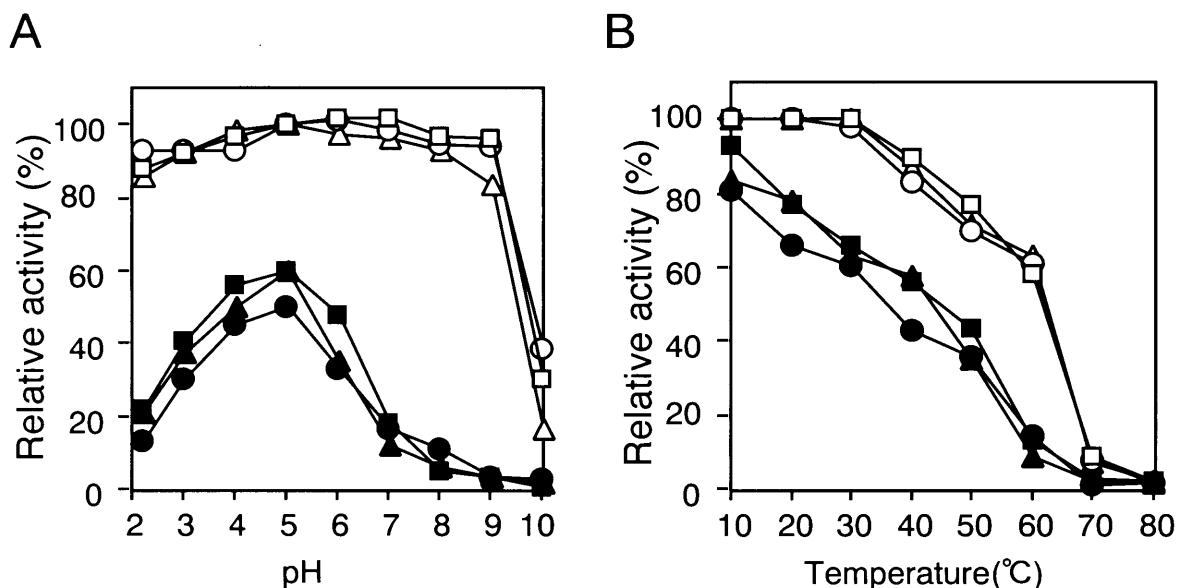


Figure 1-8. The effects of purified cell wall fraction on pH and temperature stability of the purified β -glucosidases. The purified cell wall fractions (2 mg/ ml) were added to enzyme solutions (-□- : EX-1, -◇- : EX-2, -○- : CB-1) or not (-■-, -◆-, -●-). (A) Effects of pH on the stability of β -glucosidases. The enzymes were incubated for 1 hr at 37°C in the buffer system of indicated pHs. The remaining activities were measured at pH 5.0. (B) Thermal stability of the β -glucosidases. The enzymes were maintained for 1 hr at pH 5.0 and indicated temperature. The remaining activities were measured with PNPG by the standard method.

について検討を行ったところ、細胞壁多糖画分を加えない場合には、いずれの精製酵素においても、最も安定であるpH 5.0でも約40%程度の活性が失われていた。これに対し、細胞壁多糖画分を添加したものでは、pH 2.0～9.0の範囲で、80%以上の活性を保っていた (Figure 1-8 (A))。また、温度安定性についても、精製酵素のみの場合には、温度の上昇にともなって次第に活性が失われてゆくのに対し、細胞壁多糖画分を添加した場合には、いずれの精製酵素でも30°Cまで安定となった (Figure 1-8 (B))。

(5) 精製 β -グルコシダーゼの細胞壁多糖画分への吸着

3種類の精製 β -グルコシダーゼが細胞壁多糖画分により安定化されたこと、結合型 β -グルコシダーゼCB-1は、菌体の細胞壁画分に存在し、細胞壁溶解酵素により可溶化されると等の理由から、細胞壁多糖画分と精製 β -グルコシダーゼが、何らかの相互作用をするのではないかと考え、各精製酵素の細胞壁多糖画分への吸着について検討を行った。その結果、Table 1-7に示すとおり、結合型 β -グルコシダーゼCB-1だけでなく遊離型 β -グルコシダーゼEX-1、EX-2も細胞壁吸着活性を持っていることが明らかとなった。麹菌の細胞壁多糖画分は、主にキチン、 β -1, 3-グルカン、マンナンなどの多糖から構成されているが、これらの構成糖であるグルコース、マンノース、N-アセチルグルコサミンは、精製酵素の細胞壁多糖画分への吸着をほとんど阻害しなかった。

Table 1-7. Adsorption of the purified β -glucosidases to the cell wall fraction.

Addition	EX-1 (%)		EX-2 (%)		CB-1 (%)	
	sup	ppt	sup	ppt	sup	ppt
Cell wall	1.5	98.5	5.2	94.8	1.8	98.2
Cell wall+Glu	8.5	91.5	3.2	96.8	1.9	98.1
Cell wall+Man	6.5	93.5	10.5	89.5	3.8	96.2
Cell wall+GluNac	10.6	89.4	7.8	92.2	4.9	95.1

The purified cell wall fraction (2 mg/ml) were added to a enzyme solution, containing 40 mU/ml of a β -glucosidase and 2 mg/ml of a sugar and incubated for 30 min at room temperature. Then, the mixtures were centrifuged for 10 min at 12,000 x g and the β -glucosidase activities of supernatants and sediments were measured with PNPG by the standard method. The sediments were resuspend in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) before the measurement of β -glucosidase activity.

(6) 菌体細胞壁中での β -グルコシダーゼCB-1

菌体結合型の酵素である β -グルコシダーゼCB-1が細胞壁吸着活性を持っていることが明らかとなった。このことから、液体培養を行った菌体においては、酵素自身の活性により細胞壁多糖画分に吸着する事で、細胞壁中に局在しているものと考えられる。そこで、液体培養を行った菌体から粗細胞壁画分を調製し、様々な試薬で処理することにより、 β -グルコシダーゼCB-1の細胞壁結合への結合状態について検討を行った。 β -グルコシダーゼCB-1の検出は、 β -グルコシダーゼCB-1抗血清を用いたウエスタン解析によって行った。その結果、室温で、1% β -メルカプトエタノール、およびTween 20で処理をしたものは、 β -グルコシダーゼCB-1は全く遊離せず、1% SDSで処理したものでわずかに遊離しているのが認められた (Figure 1-9)。さらに、1% SDSでボイルを行うことにより、 β -グルコシダーゼCB-1を完全に細胞壁から遊離できることが明らかとなった。以上の事から、 β -グルコシダーゼCB-1は、共有結合ではないものの、かなり強く細胞壁画分に結合している事が明らかとなった (Figure 1-9)。

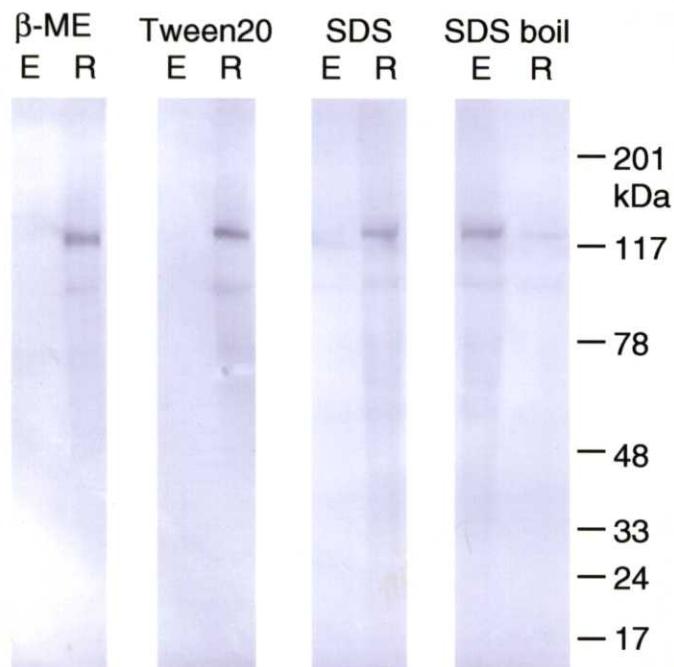


Figure 1-9. Immunoblot analysis of cell wall-bound β -glucosidase. The crude cell wall from the liquid culture was extracted with 1% 2-mercaptoethanol, Tween 20, and SDS for 30 min at room temperature and 1% SDS for 30 min in boiling water and then the mixtures were centrifuged at 12,000 $\times g$ for 10 min at 4°C. The supernatant were collected and the sediments were lysed with 3 mg/ml Yatalase in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) at 37°C for 3 hr. Immunoblot analysis was done on these extracts (E) and Yatalase lysates (R) using anti- β -glucosidase CB-1 antiserum.

第4項 要約

- (1) 焼酎1次もろみ中での β -グルコシダーゼ活性について検討を行ったところ、もろみ期間中をとおして、 β -グルコシダーゼ活性は安定に保持されていた。
- (2) 粗酵素液中での遊離型および結合型 β -グルコシダーゼの安定性について検討したところ、活性は安定に保たれていた。しかし、精製を行った3種類の β -グルコシダーゼでは、いずれも非常に不安定であった。
- (3) 白麹菌の細胞壁多糖画分を添加したところ、精製した3種類の β -グルコシダーゼは安定となり、pH安定性についてはpH 2.0~9.0の範囲で、温度安定性については30°C以下で安定となった。
- (4) 精製した3種類の β -グルコシダーゼとも細胞壁多糖画分への吸着能を有していた。細胞壁の主要な構成糖であるグルコース、マンノース、N-アセチルグルコサミンは、これらの吸着能をほとんど阻害しなかった。
- (5) β -グルコシダーゼCB-1は、共有結合ではないものの、細胞壁画分にかなり強く結合しており、細胞壁を細胞壁消化酵素で処理する他は、SDSでボイルすることによって可溶化されることが明らかとなった。

第5項 考察

もろみ中、粗酵素液中では、 β -グルコシダーゼ活性は安定に保たれていた。ところが、意外なことに、精製酵素（ β -グルコシダーゼEX-1、EX-2、CB-1）は、すべて非常に不安定であった。このことは、粗酵素中、あるいはもろみ中で、 β -グルコシダーゼは何らかの物質により安定化されている事を示す。今回、細胞壁多糖画分により、すべての精製酵素が安定化されることが明らかとなったことから、少なくとも、結合型の酵素に関しては、実際の菌体細胞壁中で、多糖画分に含まれる物質によって安定化されるものと考えられる。また、全ての精製 β -グルコシダーゼは、細胞壁多糖画分に吸着する能力を有している。これに加えて、細胞壁より結合型の β -グルコシダーゼを遊離させるには、細胞壁をSDSでボイリング処理する必要があった。これらのことから、結合型 β -グルコシダーゼは、酵素自身の吸着能で細胞壁画分に吸着し、酵素自身、あるいは細胞壁多糖画分の構造変化を伴う処理により、遊離してくるものと考えられた。

一方、遊離型 β -グルコシダーゼにおいても、精製酵素は細胞壁多糖画分により安定化された。細胞壁多糖画分は不溶性であるので、実際の粗酵素中あるいはもろみ中では、細胞壁多糖画分と似た構造の可溶性物質により安定化されているのではないかと考えられる。さらに、結合型の精製酵素だけでなく、遊離型の精製酵素も細胞壁多糖画分に吸着する活性を有している。このことから、遊離型の酵素が培地中に遊離してくるためには、細胞壁への吸着を妨げる可溶性の物質を必要とする。以上のことから、遊離型の酵素は麹菌が生産する可溶性の物質と結合することで、麹菌の細胞壁に結合することなく、培地中に分泌され、また安定化されているものと考えられる。今回、結合型粗酵素として実験に使用したものは、細胞壁消化酵素であるYatalaseにより細胞壁を可溶化したものである。つまり、粗酵素液中の結合型酵素が安定であることを考えると、細胞壁中で酵素を安定化しているものは、酵素とともに可溶化されていることを意味している。よって、遊離型酵素を安定化している可溶性の物質が細胞壁由来であったとしても、それは可溶化可能であることを示している。これらのことに関しては、第3章でより詳しく検討を行った。

これまでに、*Aspergillus* 属の β -グルコシダーゼに関しては、数多くの報告が成されている⁴⁰⁻⁴⁹⁾。これらの β -グルコシダーゼの分子量は、40~170 kDa、至適pHについては、*A. aculeatus* β -グルコシダーゼ 3を除き、いずれもpH4.5~5.0付近で、至適温度については、50~65°C付近である。これらの酵素と、今回精製した β -グルコシダーゼを比較すると大きな違いは見られたかった。ところが、pH安定性については、多くの*Aspergillus* 由来の β -グルコシダーゼがpH 4.0~7.0で安定であるのに対し、今回精製した β -グルコシダーゼは非常に不安定で、最も安定なpH5.0でも37°C、1時間で約60%程度の活性しか保てなかつた。しかし、これに細胞壁多糖画分を加えると、各 β -グルコシダーゼはpH 2.0~9.0の範囲で安定であり、これまでに*Aspergillus* 属で報告されている最も安定な酵素、*A. fumigatus* の β -グルコシダーゼ (pH 2.0~8.0)とほぼ同程度に安定となった⁴⁰⁻⁴⁹⁾。また、細胞壁多糖画分の添加により、精製した各 β -グルコシダーゼがpH2.0~9.0、30°C以下の範囲で安定であったことから、もろみ中においてもこれらの酵素は安定に作用し得ると考えられる。

一方、熱安定性についても、他の*Aspergillus* 属由来の β -グルコシダーゼが50~60°Cまで安定であるのに対し^{44, 49)}、白麹菌 β -グルコシダーゼは、細胞壁多糖画分を添加したもの

でも、30℃までしか安定ではなかった。しかし、他の*Aspergillus* 属由来の β -グルコシダーゼで安定性を検討した時の実験条件を見てみると、各温度に5~10分間放置した後の残存活性を測定している。そこで、同様の条件下で（各温度で10分保持）、再度実験を行ったところ、3種類の精製 β -グルコシダーゼは、細胞壁多糖画分を添加していないもので50℃、添加したものでは、60℃まで安定となり、他の*Aspergillus* 属由来の β -グルコシダーゼとほぼ同等の値となった（data not shown）。これらのことから、本酵素は、*Aspergillus* 属が生産する標準的な β -グルコシダーゼであることが明らかとなった。

第2章 β -グルコシダーゼ遺伝子 (*bglA*) のクローニングおよび遺伝子破壊

第1節 白麹菌 β -グルコシダーゼ遺伝子 (*bglA*) のクローニングと酵母での発現

第1項 緒言

白麹菌は、少なくとも遊離型の β -グルコシダーゼを2種類、結合型の β -グルコシダーゼを1種類生産する。これらの酵素は、すべて同じN-末端、C-末端アミノ酸配列を持ち、同一の遺伝子によりコードされている可能性が示唆された。このことから、単一遺伝子の発現量を制御するだけで、白麹菌 β -グルコシダーゼの生産量、ひいては甘藷焼酎の特徴香の生成を制御することが可能であるものと考えられる。

また、本酵素は、耐酸性 α -アミラーゼや、キシラナーゼCなど、これまでに知られている他の耐酸性酵素と異なり、精製酵素自身は不安定であるが、細胞壁多糖画分の添加により安定化される。さらに、遊離型、結合型いずれの酵素も細胞壁多糖画分に吸着する活性を有しており、本酵素は、細胞壁多糖画分と相互作用することで、安定化されているものと思われる。これまでに、細胞壁マンナンを認識して吸着するプロテアーゼ⁵⁰⁾や、キチン結合タンパク質⁵¹⁾、グルカン結合タンパク質⁵²⁻⁵⁴⁾など、真菌類の細胞壁に吸着するタンパク質はその遺伝子や、3次元構造も含めて、多数報告されているものの、白麹菌 β -グルコシダーゼのように、細胞壁多糖画分への吸着と酵素の安定性とが密接に関わっているようなものは報告されていない。さらに、本酵素は、培養条件により局在性が異なっており、その局在性にも本酵素の細胞壁多糖画分への吸着能が関与していることが示唆されている。これまでに、*Aspergillus* 属の β -グルコシダーゼについては、様々な種で報告があるが⁴⁰⁻⁴⁹⁾、その遺伝子に関しては、*A. aculeatus* でcDNAのクローニングを行った報告があるのみである⁵⁵⁾。そこで、白麹菌の β -グルコシダーゼで見られた様々な現象に対して、遺伝子レベルでの検討を可能にするために、白麹菌 (*A. kawachii*) β -グルコシダーゼ遺伝子のクローニングと構造解析、および酵母での発現を行った。

第2項 材料及び方法

(1) 供試菌株、プラスミド及び培地

染色体ライブラリー及びmRNAの調製には*Aspergillus kawachii* IFO4308を使用した。*Saccharomyces cerevisiae* YPH499 (*MATA*, *ura3*, *lys2*, *ade2*, *trp1*, *his3*, *leu2*)を**bgI**A cDNAの発現に、*Escherichia coli* JM109 及びLE392を大腸菌における宿主として使用した。プラスミドベクターpUC118⁵⁶⁾を組換えプラスミドの構築に、pG-1ベクター⁵⁷⁾およびpYEX-S1ベクター (Nippon gene) を*S. cerevisiae*での遺伝子発現に用いた。第1章の基本培地または最小培地⁵⁸⁾を*A. kawachii*の培養に、YNBD培地⁵⁹⁾を*S. cerevisiae*の培養に、50 μg / ml アンピシリンを添加したLuria-Bertani培地⁶⁰⁾を*E. coli* の培養に使用した。

(2) β-グルコシダーゼCB-1の内部アミノ酸配列の決定

第1章で調製した精製β-グルコシダーゼCB-1 (200 μg) をリシリエンドペプチダーゼ (*Achromobacter protease I*; 和光純薬工業) を用いてKamei等の方法⁶¹⁾により消化後、試料をμ Bondasphere C-8カラム (Waters) を使用した逆相クロマトグラフィーに供し、0.1% トリフルオロ酢酸を含む0~100%のアセトニトリルのグラジエントにより溶出し、ペプチドを分取した。分取したペプチドのアミノ酸配列は、第1章のN-末端アミノ酸配列解析法に従い決定した。

(3) 遺伝子操作法

一般的な遺伝子操作 (大腸菌の形質転換、プラスミドの精製等) は、定法⁶⁰⁾により行った。

(4) *bgI*A染色体DNAのクローニング

基本培地に2%のグルコースを加え、1日培養を行った*A. kawachii* IFO4308の菌体を集め、洗浄後、液体窒素下で摩碎後、定法⁶²⁾に従って染色体DNAを取得した。この染色体DNAをSau3AIで部分消化し、ショ糖密度勾配超遠心によって、約20kbpのフラクションを分画した。これをBamHIで消化したλ EMBL3に連結し、Gigapack II Gold packageing extract (Stratagene) を用いてインビトロパッケージングを行い染色体ライブラリーとし

た²²⁾。続いて、 β -グルコシダーゼCB-1の内部アミノ酸配列と β -グルコシダーゼ類で保存されている配列をもとに、1組のプライマー（Primer 1; 5'- GGT ATT CAA GAC GGA GGT GTT GTC GCG ACT GCA AA -3'、Primer 2; 5'- GGC AGC CCA GTC CGA CAT AAC AAA GCC-3'）を合成した。これを用いて、*A. kawachii* IFO4308染色体DNAを錆型にPCR增幅を行い、2本のDNA断片（ProbeA, ProbeB）を得た。これらのDNA断片をプローブとし、染色体ライブラリーのスクリーニングを行い、各1種類のファージクローンを得た。これらのクローンのDNA配列解析により、最終的に β -グルコシダーゼCB-1をコードする染色体DNAを取得した。

(5) *bglA* cDNAのクローニング

基本培地に1%グルコース、2%キシランをC源として加えた基本培地で*A. kawachii* IFO4308を3日間液体培養し、Hata等の方法⁶³⁾により全RNAを調製した。その後、oligo-(dT)-celluloseカラム（Amasham Pharmacia Biothech）によりmRNAを調製した。全長cDNAは、得られたmRNAからMarathon cDNA amplification kit（Clontech）を用い取得した。先に取得した***bglA***染色体DNAの配列を基に2つのオリゴDNA（Boligo5; 5'-CAT GAG GTT CAC TTT GAT TGA -3', Boligo3; 5'- CGT AGC TA GCA TCC CCA GAA G-3'）を合成し、それぞれ5'-RACE、3'-RACEに使用した。得られた5'-及び3'-RACE産物は、TA cloning kit（Invitrogen）を用いてpCRIIにクローニングし、それぞれ15クローンずつ単離しDNAシーケンスの解析を行った。これらの中から、PCRによるエラーがなく、最も長い5'-RACE、3'-RACE断片をEcoRVサイトで連結し全長cDNAとした。

(6) DNAシーケンス解析

DNAシーケンスの解析は、DNA シーケンサー（model 371A; Applied Biosystems）を用い、Dideoxy chain termination法により行った。センス鎖、アンチセンス鎖両方のDNAシーケンスを解析し、全長のDNAシーケンスを得た。

(7) 酵母発現用ベクターの作成

*bgmA*発現ベクターpGBGA1は、全長*bgmA*cDNAをpG-1のSacIサイトに連結する事により作成した。シグナルシーケンス部分を置換したpYBGA1ベクターは、全長cDNAを鑄型とし、1組のプライマー（Upper : 5'-CCG GAG CTC GGA TGA ATT GGC TTA CTC CCC A-3' and lower: 5'-CCG GAG TCT AAT TCA TAT ACC ACG GCC ATC A-3'）を用いPCR増幅により得られたDNA断片をSacIで消化後、pYEX-S1 (Nippon gene)のSacIサイトに連結することにより作成した。得られたプラスミドについては、シーケンスを行い、正しく連結されていることと、PCRで増幅した部分に誤りがないことを確認し使用した。

(8) *S. cerevisiae*の形質転換

*S. cerevisiae*の形質転換は、Becker とGuarenteの方法⁵⁹⁾に従って行った。

(9) *S. cerevisiae*の細胞分画

*S. cerevisiae*の細胞分画はPinesとLondonの方法⁶⁴⁾を改変し行った。すなわち、培養液100ml (6×10^7 cell / ml) を遠心分離し、上清と沈殿とに分画し、さらに沈殿画分から、PinesとLondonの方法⁶⁴⁾により、ペリプラズム画分とプロトプラストを得た。プロトプラストは、15mlのB緩衝液⁶⁴⁾に再懸濁した後、5mlのガラスビーズ（直径 0.4~0.5 mm）を加え、5分間ポルテックスにより破碎を行った。この破碎液を膜-細胞質画分として使用した。

(10) β -グルコシダーゼ活性測定および検出

β -グルコシダーゼの活性はPNPGを基質とし、第1章1-2-(3)の方法に準じて行った。プレートアッセイは、4-methylumbelliferyl β -D-glucosideにより以下の方法で行った。*S. cerevisiae*の形質転換体を最小培地寒天プレート上で30°C、72時間培養し、その後10mMの4-methylumbelliferyl β -D-glucosideを含んだ0.75%寒天を重層し、室温で5分間反応を行った。その後、酵素反応により遊離したmethylumbelliferolをUV (350nm) 照射による蛍光で観察した。ウエスタン解析については、酵母培養液および菌体を試料として、第1章のウエスタン解析法により行った。

第3項 実験結果

(1) β -グルコシダーゼCB-1の部分アミノ酸配列の解析

第1章で精製を行った β -グルコシダーゼCB-1をリシリエンドペプチダーゼで消化し、逆相クロマトグラフィーに供したところ、3つのペプチド断片（P1、P2、P3）を得ることが出来た。これらのペプチド断片のN-末端アミノ酸配列について解析を行ったところ、それぞれP1, GIQDAGVVATAK; P2, NDGALPLTGK; P3, TREAYQDYLVLEPNNGと決定された。そこで、これらのアミノ酸シーケンスをSwissProtデータベースに照会したところ、P2、P3断片については高いホモロジーを示すものは得られなかったが、P1については、*Candida pelliculosa*の β -グルコシダーゼ前駆体⁶⁶⁾と非常に高い相同性（75%）を示すことが明らかとなった。

(2) β -グルコシダーゼCB-1をコードする遺伝子**bglA**のクローニング

*Aspergillus wentti*の β -グルコシダーゼで、活性中心であろうと推定されている付近のアミノ酸配列は、*Trichoderma reesei bgl1*、*Saccharomyces cerevisiae bgl1*、*bgl2*、および*C. pelliculosa*の β -グルコシダーゼなど、他の真菌類の β -グルコシダーゼでも非常に良く保存されている⁶⁷⁾。そこで、真菌類の β -グルコシダーゼ類で相同性の高い部分（GFVMTDWGA）と、*C. pelliculosa*の β -グルコシダーゼと高い相同性が見られたP1断片のアミノ酸配列を基にプライマーを合成し、*A. kawachii*染色体DNAを錫型にPCR増幅を行ったところ、2種類のDNA断片（Probe1、Probe2）が得られた。そこで、これらのDNAをプローブとし、さらに染色体ライブラリーのスクリーニングを行い、各プローブにつき、それぞれ1種類のファージクローンを得た。Probe1を用い得られたものを**bglA**、Probe2を用い得られたものを**bglB**と命名した。

それぞれのDNAシーケンスを行い、得られたDNAシーケンスからアミノ酸配列を推定したところ、*bglA*ではP2、P3断片に相同的なアミノ酸配列が確認されたが（後述）、*bglB*では確認されなかった。また、1%グルコース、2%キシランをC源とした基本培地で、30℃、3日間培養した菌体からRNAを調製し、ノーザンプロットハイブリダイゼーションを

行ったところ、*bglA*をプローブとした場合にはシグナルが確認できたが (Figure 2-2) 、*bglB*をプローブとした場合にはシグナルが確認できなかった (Data not shown) 。これらのことから、*bglA*がβ-グルコシダーゼCB-1をコードするものと考えられた。続いて、*bglA*遺伝子のコピー数を確認するために、*A. kawachii*染色体DNAを*Bam*HI、*Eco*RI、*Hind*IIIにより消化し、約3kbpsの*bglA*染色体DNASacI-SacI断片をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行った (Figure 2-1) 。その結果、いずれの制限酵素で消化した場合にも、明瞭な単一バンドが確認され、本遺伝子はゲノム中にシングルコピーで存在するものと思われた。

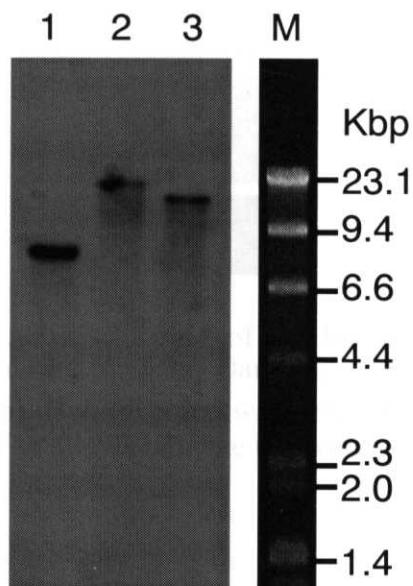


Figure 2-1. Southern blot analysis of *A. kawachii* genomic DNA. Genomic DNA was digested with *Bam*HI (lane 1), *Eco*RI (lane 2) or *Hind*III (lane 3). Hybridization was performed overnight at 65°C using a ³²P-labeled *Sal*I-*Sal*I fragment of genomic *bglA* as a probe, and the membrane was washed three times for 30 min in 2×SSC/ 1% SDS at 65°C.

(3) *bglA* cDNAのクローニング

染色体DNAのクローニングに続き、*bglA*遺伝子の発現解析を行った。1%グルコース、2%キシランを含む基本培地で、30°Cで1~4日間液体培養を行い、得られた菌体から全RNAを抽出し、*bglA*をプローブとしてノーザンプロットハイブリダイゼーションを行った (Figure 2-2) 。その結果、培養1日目では*bglA*の発現は観察されなかったが、培養2日目から4日の菌体で*bglA*の発現が観察された。培養3日目のシグナルが一番強かったことから、3日目の試料からmRNAを調製し、Marathon cDNA amplification kitによりcDNAの

クローニングを行うこととした。それぞれ15クローンの5'-、3'-RACE産物を単離し、これらについてDNAシーケンスを行った。その結果、いずれのDNA断片中にもPCRによるものと思われるエラーは見られなかった。5'-、3'-RACE産物、それぞれの中から一番長かったもの選択し、EcoRVの制限酵素サイトで連結する事により全長のcDNAを得た。

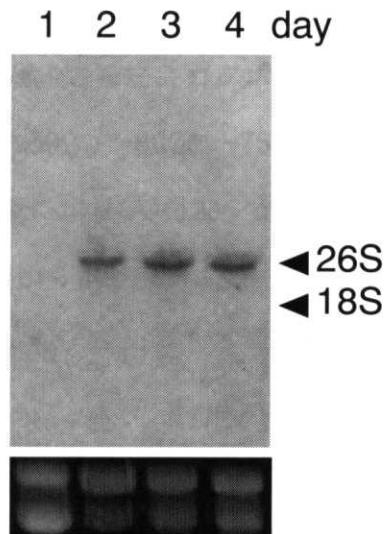


Figure 2-2. Northern blot analysis of *bglA* of *A. kawachii* IFO4308. Total RNA was isolated from mycelia after culture for 1 day (lane 1), 2 days (lane 2), 3 days (lane 3) and 4 days (lane 4) (5 µg per lane). Hybridization was performed using a ³²P-labeled *SalI-SalI* fragment of genomic *bglA*. The arrows indicate the position of ribosomal RNAs.

(4) *bglA*遺伝子の構造と塩基配列

本遺伝子の構造解析を行うために、*bglA*遺伝子を含む約4kbの*BamHI-KpnI*断片について、DNAシーケンス解析を行った。DNA断片中の制限酵素サイトを利用してサブクローニングを行うほかに、適当なオリゴDNAを合成し、プライマーとして利用することにより、センス鎖、アンチセンス鎖両方のDNAシーケンスを解析し、*bglA*遺伝子のDNA配列を決定した（Figure 2-3）。cDNAシーケンスとの比較から、*A. kawachii bglA*遺伝子は、6つのイントロンを持っており、2,933bpのopen reading frame (ORF) から成り、860アミノ酸をコードすることが明らかとなった。コードされる熟成タンパク質の推定分子量は91kDaであり、14箇所のN-結合型糖鎖修飾可能部位が存在していた。β-グルコシダーゼCB-1の部分アミノ酸配列（P1、P2、P3）は、それぞれGly-178からLys-189、Asn-405からLys-414、Thr-603からGly-618に認められた。また、N-末端アミノ酸配列はAsp-20からPro-32に認められ、このことからMet-1からAla-19までが分泌シグナルペプチドである。

るものと思われた。また、*bglA*遺伝子中に見いだされたイントロンはすべてGTで始まり、AGで終了しており、典型的なイントロンの構造をしていた。

ORFの5'上流領域については、-137bpの位置に、TATAA様配列が、-341、-655、-668bpの位置にCCAAT配列が存在していた。また、得られた15クローンの5'-RACE産物のうち、最も長いものが3クローン得られ、これらは-85bpの位置から始まっており、転写開始地点であることが予想された。さらに、カタボライトリプレッションに関与するCREA認識配列⁶⁷⁻⁷⁰が-226、-526、-609、-687、-752 bpの位置に確認された。一方3'下流領域については、2,978bpの位置にポリ(A)付加シグナルであるAATAAA 様配列が確認され、このシグナルの11bp下流からポリアデニレーションが起こってた。

(5) アミノ酸配列の比較

塩基配列から推定された*A. kawachii* BglAのアミノ酸配列をSwissProt データベースに照会したところ、*Aspergillus aculeatus*⁵⁵⁾、*Saccharomyces fibuligera* (*bgl1*, *bgl2*)⁷¹⁾、*Candida pelliculosa*⁶⁵⁾、*Kluyveromyces fragilis*⁷²⁾、*Agrobacterium tumefaciens*⁷³⁾、*Clostridum thermocellum*⁷⁴⁾、および*Trichoderma reesei*⁶⁶⁾のβ-グルコシダーゼと高い相同性を示した。特に、*Aspergillus aculeatus* *bgl1*と非常に高い相同性(81%)を示した。これらのβ-グルコシダーゼはすべてRojas等⁷⁵⁾によってファミリーBGサブファミリーBに分類されている。

A. kawachii、*A. aculeatus*、*C. pelliculosa*、*S. fibuligera* (*bgl1*)、*T. reesei*のβ-グルコシダーゼについてアラインを行ったものをFigure 2-4に示す。サブファミリーBに属するβ-グルコシダーゼで保存されている配列(DGP、GRNFE、DPYPL、KHF、SDW、GLD、VLLKN配列)⁷⁵⁾は、すべて*A. kawachii* BglAの推定アミノ酸配列中に確認された。さらに、染色体遺伝子のクローニングの際に使用した、β-グルコシダーゼ間で高度に保存されている配列もGly-275からAla-283の位置に確認された。この領域中のSDWモチーフは、*A. wentii* β-グルコシダーゼの活性中心であると予想されており、このSDWモチーフおよびその周辺の配列は、PROSITEデータバンク⁷⁶⁾においてグリコシルハイドローゼファミリー3のSignature region (accesion no. PS00775) とされている領域である。これらのことから、*A. kawachii* BglAも同ファミリーに分類されるものと思われる。

Figure 2-3. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the *bglA* gene of *A. kawachii*. Introns and 5' and 3' flanking regions are shown by small letters. The TATA box and three CAAT boxes are underlined with wavy lines. The five CREA binding regions are boxed. The arrow indicates the starting point of the longest 5'-RACE product. A putative signal sequence is underlined and the N-terminal amino acid sequence and the identified partial amino acid sequences (P1: 179, P2: 399, P3: 600) are underlined with wavy lines. The conserved region around the active site is shaded gray and the putative active site residue is circled. The glycosyl hydrolase family 3 active site is underlined by a dotted line. Possible N-glycosylation sites are shaded black. The putative polyadenylation signal is underlined and the poly (A) tail starting position is underlined with a double line. This nucleotide sequence appears in the DDBJ/EMBL/Genbank database with accession number AB003470.

AK BGLA	1	MRFT---LIE	AVALTAVSLA	SADELA-----	-----YSPP	YPSPWAN--	GQGDWAQAYQ	60
AA BGL1	1	MKLS---WLE	AAAATAASVW	SADELA-----	-----FSPP	FYPSPWAN--	GQGEWAEAYQ	60
CP BGL	1	MLLPLYGLAS	FLVLISQAALV	NTSAPQASND	DPFNH--SPS	FYPTPOGGRI	NDGKWAQAFY	60
SF BGL1	1	MLMIVQLLVF	ALGLAVAVPI	QNYTQSPSQR	DESSQWVSPH	YYPPTPQGGRL	QDV-WQEAYA	60
TR BGL1	1	MRYR---TAA	ALALATGPFA	RADSHS-----	-----TSGA	SAEAVVPP--	AGTPWGTAYD	60
AK BGLA	61	RAVDIVSOMT	LAEKVNLLTG	TGWELELCVG	OTGGVPRLGV	PGMCLQDSPL	GVRSDSDYNSA	120
AA BGL1	61	RAVAIVSOMT	LDEKVNLTTG	TGWELEKCVG	OTGGVPRLN	GGMCLQDSPL	GIRDSDYNSA	120
CP BGL	61	RARELVQDM	IAEKVNLLTG	VGSASGPCSG	NTGSPVRLNI	SSICVQDGPL	SVRAADLTDV	120
SF BGL1	61	RAKAIVGQMT	IVEKVNLTTG	TGWQLDPCVG	NTGSPVRFGI	PNLCLQDGPL	GVRFADFVTG	120
TR BGL1	61	KAKAALAKLN	LQDKVGIVSG	VGWNGGPCVG	NTSPASKISY	PSLCLQDGPL	GVRYSTGSTA	120
AK BGLA	121	FPSGMNVAAT	WDKNLAYLRG	KAMGQEFSKD	GADIQLGPAA	GPLGRSPDGG	RNWEFGSPDP	180
AA BGL1	121	FPAGVNVAAT	WDKNLAYLRG	QAMGQEFSKD	GIDVQLGPAA	GPLGRSPDGG	RNWEFGSPDP	180
CP BGL	121	FPCGMAASSS	FNKQLIYDRA	VAIGSEFKKG	GADAILGPVY	GPMGVKAAGG	RGWEGHGPDP	180
SF BGL1	121	YPSGLATGAT	FNKDLFLQRG	OALGHEFNSK	GVHALGPAV	GPLGVKARGG	RNFEAFGSDP	180
TR BGL1	121	FTPVGQAAT	WDVNLIRERG	QFIGEEVKAS	GIHVILGPVA	GPLGKTPQGG	RNWEFGFVDP	180
AK BGLA	181	ALSGVLFAET	IKGIQDAGVV	ATAKHYIAYE	QEHR-----	-QAPEAQGYG	FNIS-ESGSA	240
AA BGL1	181	ALTGVLF	IKGIQDAGVV	ATAKHYIILNE	QEHR-----	-QVAEAAGYG	FNIS-DTISS	240
CP BGL	181	YLEGVIAYLQ	TIGIOSQGVV	STAKHLIGNE	QEHRFAKKD	KHAGKIDPGM	FNTSS-SLSS	240
SF BGL1	181	YLQGTAAT	IKGLQENNVM	ACVKHFIGNE	QEKYR-----	-QPDDINPAT	NQTKEAISA	240
TR BGL1	181	YLTGIAQMGT	INGIQSVGQ	ATAKHYIILNE	QELNR-----	-----	-----ETISS	240
AK BGLA	241	NLDDKTMHEL	YLWPFAADIR	AGAGAVMCY	NQINNSYGC	NSYTLNKLKK	AELGFQGFV	300
AA BGL1	241	NVDDKTIHEM	YLWPFAADAVR	AGVGAIMCSY	NQINNSYGC	NSYTLNKLKK	AELGFQGFV	300
CP BGL	241	EIDDRAMHEI	YLWPFAEAVR	GGVSSIMCSY	NKLNGSHACQ	NSYLLNYLLK	EELGFQGFV	300
SF BGL1	241	NIPDRAMHAL	YLWPFADSVR	AGVGSVMCSY	NRVNNTYACE	NSYMMNLLK	EELGFQGFVV	300
TR BGL1	241	NPDDRTLHEL	YTWPFAADAVQ	ANVASVMCSY	NKVNTTWACE	DQYTLQTVLK	DQLGFPGYVM	300
AK BGLA	301	SDWAHHAGV	SGALAGLDM	MPGDV--DYD	SGTSYWGTLN	TVSVLNGTVP	QWRVDDMAVR	360
AA BGL1	301	SDWGAHHSGV	GSALAGLDM	MPGDI--TFD	SATSFWGTLN	TIAVLNGTVP	QWRVDDMAVR	360
CP BGL	301	TDWGALYSGI	DAANAGLMD	MPCE-----	--AOYFGGNL	TTAVLNGTLP	QDRLDDMATR	360
SF BGL1	301	SDWGAQLSGV	YSAISGLDMS	MPGEVYGGWN	TGTSFWGQNL	TKAIYNETVP	IERLDDMATR	360
TR BGL1	301	TDWNAQHTTV	QSANSGLDMS	MPGT---DFN	GNNRLWGPAL	TNAVNSNOVP	TSRVDDMVTR	360
AK BGLA	361	IMAAYYKVGR	DRLWTP--PN	FSSWTRDEY	YKYYYYVSEGP	YEKVNHYVNV	QRN-HSELIR	420
AA BGL1	361	IMAAYYKVGR	DRLYQP--PN	FSSWTRDEY	FKYFYPQEGP	YEKVNHFVNV	QRN-HSEVIR	420
CP BGL	361	ILSALIYSGV	HNPDG---PN	YNAQTFLTEG	HEYFKQQEGD	IVVLNKHVDV	RSDINRAVAL	420
SF BGL1	361	ILAAL-YATN	SFPTEDHLPN	FSSWTTKEYG	NKYYADNTTE	IVKVNYNVDP	SNDFTEDTAL	420
TR BGL1	361	ILAAWYLTQQ	DQA-----	-----G	YPSFNISR--	-----NV	QGN-HKTNVR	420
AK BGLA	421	RIGADSTVLL	KNDGA-LPLT	-GKERLVALI	GEDA--GSNP	YGANGCSDRG	CDNGTLAMGW	480
AA BGL1	421	KLGADSTVLL	KNNNA-LPLT	-GKERKVAIL	GEDA--GSNS	YGANGCSDRG	CDNGTLAMAW	480
CP BGL	421	RSAVEGVVLL	KNEHETLPLG	REVKKRISII	QAA--GDDS	KGTS-CSLRG	CGSGAIGTGY	480
SF BGL1	421	KVAEESIVLL	KNENNTLPI	PEKAKRLLLS	GIAA--GPDP	IGYQ-CEDQS	CTNGALFOQW	480
TR BGL1	421	ATARDGIVLL	KNDANILPLK	--KPASIAVV	GSAAITIGNHA	RNSPSCNDKG	CDDGALGMGW	480
AK BGLA	481	GSGTA-NFPY	LVTPEQAI	EVLKNKNGVF	TATDNWAIDQ	IEALAKTASV	SLVFVNADSG	540
AA BGL1	481	GSGTA-EFPY	LVTPEQAI	EVLKHKGSY	AITDNWALSQ	VETLAKQASV	SLVFVNSDAG	540
CP BGL	481	GSGA-GTFSY	FVTPADGIGA	RAQQEKISYE	FIGDSWNOAA	AMDSALYADA	AIEVANSVAG	540
SF BGL1	481	GGSVGSPKY	QVTPFEEISY	LARKNMQFD	YIRESYDLAQ	VTKVASDAHL	SIVVVAASAG	540
TR BGL1	481	GSGAV-NPY	FVAPYDAINT	RA-SSQGTQV	TLSNTDNTSS	GASAARGKDV	AIVFITADSG	540

AK BGLA	541	EGYINV DGNL	GDRKNL TLWR	NGDNVI KAAA	SNCNN TIVII	HSGVPV LVNE	WYDNP NVTAI	600
AA BGL1	541	EGYIS VDGNE	GDRNNL TLWK	NGDNLI KAAA	NNC NNTIV VI	HSGVPV LVDE	WYDHP NVTAI	600
CP BGL	541	EEIGDV DGNY	GDLNNL TLWH	NAVPLI KNIS	SINNNTIV IV	TSGQQID LEP	FIDNEN VTAV	600
SF BGL1	541	EGYITV DGNQ	GDRKNL TLWN	NGDKLI ETVA	ENCANTVV VV	TSTGQINF EG	FADHP NVTAI	600
TR BGL1	541	EGYITV EGN	GDRNNL DPWH	NGNALV QAVA	GANSNV IVVV	HSGVAT ILEQ	ILALPQVK AV	600
AK BGLA	601	LWGGLPGQES	GNSLADV LYG	RVNPGAKSPF	TWGKTREAYQ	DYLVT EPNN	NGAPQED FVE	660
AA BGL1	601	LWA GLPGQES	GNSLADV LYG	RVNPGAKSPF	TWGKTREAYG	DYLVR ELNN	NGAPQDDF SE	660
CP BGL	601	IYSSYLGQDF	GTVLAKV LFG	DENPSGKLPF	TIAKDV NDYI	PVIE --- KVD	VPDPV DKFTE	660
SF BGL1	601	VWAGPL GDRS	GTATAANIL FG	KANPSGHL PF	TIAKTDDDYI	PIETYSP SSG	EPEDNH LVEN	660
TR BGL1	601	VWAGLPSQES	GNALVD VLWG	DVSPSGKL VY	TIAKSPND YN	TRIVSGGS --	----- DSFSE	660
AK BGLA	661	GVFIDYRGFD	KRNETPIY EF	GYGLSY TTFN	YSNLEV QVLS	APAYEPAS GE	TEAAPTFG --	720
AA BGL1	661	GVFIDYRGFD	KRNETPIY EF	GHGLSY TTFN	YSGLHI QVLN	ASSNAQVATE	TGAAPTFQ --	720
CP BGL	661	SIYVDYRYFD	KYNKPV RYEF	GYGLSY SNES	LSDIEIQTLQ	PFSENAEPAA	NYSE-TYQYK	720
SF BGL1	661	DLLVDYRYFE	EKNIEPRY AF	GYGLSY NEYE	VSNAKVSA AK	KVDEELPEPA	TYLS-EFSYQ	720
TR BGL1	661	GLFIDYKH FD	DANITPRY EF	GYGLSY TKFN	YSRLSV -- LS	TAKSGPAT GA	VV -----	720
AK BGLA	721	---EVGN ASN	YLYPDGLQ KI	TKFIYP PWLN S	TDLLEASS GDA	SYGQDSSD YL	PEG-ATD GSA	780
AA BGL1	721	---QVGN ASD	YVYPEGLTR I	SKFIYP PWLN S	TDLKASSG DP	YYGVDTAEHV	PEG-ATD GSP	780
CP BGL	721	QSN--MDPSE	YTVPEG FKEL	ANYTYPYI HD	ASSIKAN SSY	DY -----	PEGYST EQLD	780
SF BGL1	721	NAKDSKN PSD	AFAPADL NRV	NEYLYPYL DS	NVTLK-DG NY	EY -----	PDGYST EQRT	780
TR BGL1	721	-----	-----	-----	-----	-----	-----	780
AK BGLA	781	QPILPAGGGP	GGNPRLYDEL	IRVS VTIK NT	GKVAGD EVPO	LYVSL -- GGP	NEPKIV LRQF	840
AA BGL1	781	QPVL PAGG GS	GGNPRLYDEL	IRVS VTVK NT	GRVAGDA VPQ	LYVSL -- GGP	NEPKV VLRF	840
CP BGL	781	GPKSLAAGGL	GGN-----	-----	-HTCGML VTL	SLLKS-----	----- QIKVL	840
SF BGL1	781	TPNQ-PGGGL	GGND ALWE VA	YNSTDKF VPQ	GNSTDKF VPQ	LYLKH PEDG K	FETPIOL RGF	840
TR BGL1	781	-----P	GGPSD LFQNV	ATVTV DIANS	GQV TGAEVA Q	LYITYPSS AP	RTPPKQL RGF	840
AK BGLA	841	ERITLQ PSEE	TKWSTTL TRR	D LANW -- NVE	KQDW EITS YP	KMVFGSS SR	KPPLRASL PT	900
AA BGL1	841	DRLTLK PSEE	TWTTTLL TRR	DLSNW -- DVA	AQDWVITS YP	KKVHVGSS SR	QLPLHA ALPK	900
CP BGL	841	MLVGLHL NCM	LDIQIMM NSQ	HLOC NYV DLK	RCFWI-----	-----	KIILKLFL --	900
SF BGL1	841	EKVELSPG EK	KTVDLRL RRR	DLSWV -- DTT	RQS WIVES GT	YEALIGV AVN	DIKTSVLF --	900
TR BGL1	841	AKLNLT PGQS	GTAT FNIRR R	DLSWV -- DTA	SQKIVV PPSG S	FGISVGASS R	DIRLTSTS L	900
AK BGLA	901	VH.....	960
AA BGL1	901	VQ.....	960
CP BGL	901	LN.....	960
SF BGL1	901	TI.....	960
TR BGL1	901	VA.....	960

Figure 2-4. Alignment of the amino acid sequence of *A. kawachii* β -glucosidase with the amino acid sequences of other fungal β -glucosidases. Amino acid residues are given in single-letter code. Alignment was maximized by introducing gaps, denoted by a bar (-). Numbers indicate the multiple alignment position from the N-terminus. Conserved residues are shaded gray. Solid bars indicate the conserved patterns in β -glucosidase subfamily B and the open bar indicates an SDW motif. Stars indicate the putative active site (Asp) and proton donor (His). AK BGKA, *Aspergillus kawachii* bglA; AA BGL1, *Aspergillus aculeatus* bgl1 (DDBJ/ EMBL/ Genbank: D64088); CP BGL, *Candida pelliculosa* β -glucosidase; SF BGL1, *Saccharomyces fibuligera* bgl1 (SwissProt/ Genbank/ PIR: P22506/ M22475), TR BGL1; TR BGL1, *Trichoderma reesei* bgl1 (DDBJ/ EMBL/ Genbank: U09580).

(6) *bglA* cDNAの酵母での発現

β -グルコシダーゼをコードしていると思われる遺伝子を取得できたことから、その確認を行うために、*bglAcDNA*の酵母*S. cerevisiae* YPH499での発現について試みた。まず、*bglA*全長cDNAをマルチコピータイプのプラスミドpG-1に挿入したものを作成し(pGBGA1)、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモータの制御下で発現させたところ、 β -グルコシダーゼの発現は全く見られなかった (Figure 2-5)。その原因として、85bpと比較的長い5'-非翻訳領域により翻訳が抑制されたか、オリジナルの分泌シグナルシーケンスが機能しなかった可能性が考えられた。そこで、マルチコピータイプのプラスミドpYEX-S1を使用して、5'-非翻訳領域とオリジナルの分泌シグナルシーケンスを*K. lactis*キラートキシンのシグナルシーケンス⁷⁷⁾に置換したものを作成し(pYBGA1)、ホスホグリセレートキナーゼプロモータ制御下で発現させた。その結果、シグナルシーケンス等を置換したものでは、 β -グルコシダーゼ生産による鮮やかなmethylumbelliferylの蛍光が観察された (Figure 2-5)。これらのことから、*A. kawachii* *bglA*遺伝子は、実際に機能のある β -グルコシダーゼをコードしていることが明らかとなった。

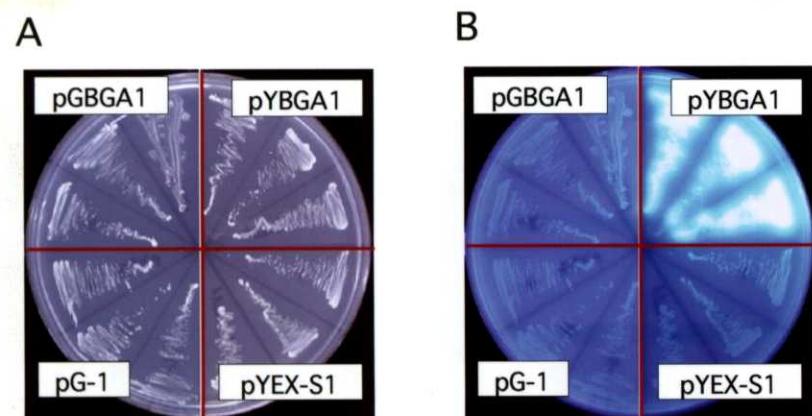


Figure 2-5. Expression of *bglA* in yeast. *S. cerevisiae* YPH499 was transformed with pG-1, pGBGA1, pYEX-S1, and pYBGA1. Three independent cultures transformed with each plasmid were streaked onto YNBD agar plates and incubated at 30°C for 2 days (A). These plates were overlaid with 0.75 % agarose containing 10 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside and were incubated for 5 min at room temperature. The β -glucosidase activity was detected by UV-stimulated fluorescence of cleaved substrates (B).

(7) 組換え β -グルコシダーゼの特徴

pYBGA1を保持する組換え酵母の増殖、形状は、pYEX-S1を保持する酵母と比較して明らかな違いは見られなかった。このことから*A. kawachii* *bglA*遺伝子の発現は、酵母の増

殖等には影響を与えないことが明らかとなった。さらに、 β -グルコシダーゼの局在性について、酵母の細胞分画により検討を行った。その結果、Table 2-1に示すとおり、75%の活性はペリプラズム画分に存在しており、5%程度の活性しか培地中に分泌されないことが明らかとなった。このことに関して、さらに β -グルコシダーゼ抗血清によるウエスタン解析を行ったところ、培養液中にはシグナルが確認されず、酵母の菌体画分にのみ確認された（Figure 2-6）。ウエスタン解析により明らかとなった組換え β -グルコシダーゼの分子量は120kDaであり、 β -グルコシダーゼCB-1の分子量とは良く一致したが、推定分子量91kDaとは異なっていた。これは、N-結合型糖鎖の付加によるものと推定された。また、*bgla*組換え酵母の生菌体を、pH2.2～9.0で37°C一時間放置し、組換酵素の安定性について検討たところ、 β -グルコシダーゼの活性は安定に保持されていた（data not shown）。

Table 2-1. Localization of recombinant β -glucosidase in yeast.

Fraction	β -glucosidase activity (U/fraction)	Standard error of mean	Percentage
Total	920	17.6	100
Growth medium	44	2.5	4.8
Periplasm	701	15.5	76.2
Cytoplasm and membrane	175	6.7	19.0

The β -glucosidase activity of each fraction was measured using PNPG as a substrate.

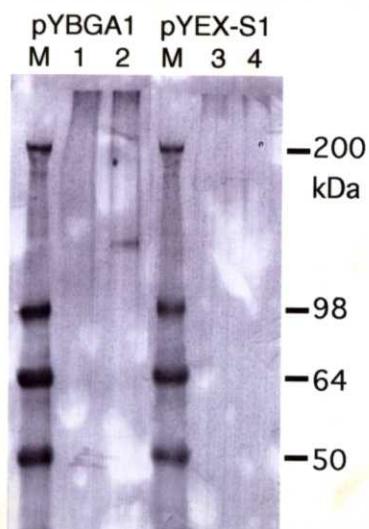


Figure 2-6. Western blot analysis of recombinant β -glucosidase produced by a yeast transformant. The transformant was incubated in YNBD medium at 30°C for 1 day. The protein in the culture medium (lanes 1,3) and cell lysate (lanes 2,4) was detected by western blotting analysis using anti- β -glucosidase antiserum. Lane M, high-molecular-mass markers.

第4項 要約

- (1) 白麹菌 (*A. kawachii* IFO4308) の β -グルコシダーゼをコードする遺伝子 (*bglA*) の染色体DNAおよびcDNAを単離し、塩基配列を決定した。
- (2) 染色体DNAおよびcDNA、アミノ酸配列との比較から、本遺伝子のORFは 2,933 bpで 6つのイントロンを持っており、860アミノ酸からなる推定分子量91 kDaのタンパク質をコードしていることが明らかとなった。
- (3) 本遺伝子がコードするアミノ酸配列をSwissPlotデータベースに照会したところ、ファミリーBGサブファミリーBに属する β -グルコシダーゼと非常に高い相同意を示した。また、グリコシルハイドラーーゼファミリー3の活性中心モチーフを持っていた。
- (4) 本遺伝子のcDNAを酵母に形質転換したところ、*K. lactis*由来の分泌シグナルシーケンスを使用することで、 β -グルコシダーゼ生産を検出することが出来た。また、本組換え酵母での β -グルコシダーゼの局在性について検討を行ったところ、約 75 %の活性がペリプラズム画分に存在していた。

第5項 考察

β -グルコシダーゼファミリー（ファミリーBG）は、そのアミノ酸配列から、細菌由来の β -グルコシダーゼが多く含まれるサブファミリーAと、真核微生物および植物由来の β -グルコシダーゼが数多く含まれるサブファミリーBに分類されてる⁷⁵⁾。白麹菌 (*A. kawachii*) の β -グルコシダーゼ遺伝子 *bglA* は、ファミリーBGサブファミリーBに属する β -グルコシダーゼ、特に真核微生物由来の微生物と高いホモロジーを有し、これらサブファミリーBの β -グルコシダーゼに共通なアミノ酸配列をすべて含んでいたことから、ファミリーBGサブファミリーBに分類されるものと考えられる。本遺伝子は、グリコシルハイドラーーゼファミリー3のsignature patternであるSDWモチーフを持っていた⁷⁶⁾。SDWモチーフ中のアスパラギン酸は、*A. wentii* β -グルコシダーゼの研究で、conduritol B-epoxide inhibitorの結合部位であることが明らかとなっており、 β -グルコシダーゼの活性中心であると考えられている⁷⁸⁾。このことから、白麹菌 β -グルコシダーゼにおいても、このSDWモチーフが活性に重要な役割を持つものと考えられた。

A. kawachii *bglA* は6つのイントロンを含み、最初のイントロンは、分泌シグナルシー

ケンスと成熟タンパク質とを分断するように挿入されていた。これまでに、サブファミリーBに含まれる真菌類の β -グルコシダーゼでイントロンについて報告されているものは、*T. reesei* の β -グルコシダーゼ遺伝子 (*bgl1*) のみであり、2つのイントロンを含むことが報告⁶⁶⁾されている。しかし、その場所は、*A. kawachii bglA*と*T. reesei bgl1*間では保存されていなかった。

本遺伝子によりコードされるBglA成熟タンパク質は、842アミノ酸からなり、分子量は91 kDaであると予想されるが、これは、 β -グルコシダーゼCB-1の分子量 120 kDaと大きく異なる。しかし、アミノ酸配列の解析から、14箇所のN-結合型糖鎖修飾可能部位が存在することが明らかであり、この分子量の違いは糖鎖の修飾によるものと考えられた。実際に、 β -グルコシダーゼCB-1のN-結合型糖鎖をEndoH処理により切除したものでは、分子量が約100 kDaとなり、推定分子量と大きな差が見られなかった。

今回、*A. kawachii bglA* cDNAを酵母で発現させたところ、オリジナルの5'-非翻訳領域、および分泌シグナルを含むものでは上手く生産されなかった。このことから、白麹菌の β -グルコシダーゼの翻訳、分泌生産は酵母と異なるメカニズムにより制御されている可能性が示唆された。また、*K. lactis*の分泌シグナルを用い*A. kawachii bglA*を発現させたところ、ほとんどの活性がペリプラズム画分に検出された。これまでにサブファミリーBに含まれる糸状菌の β -グルコシダーゼの中で、酵母での発現について検討した例として、*T. reesei* の***bgl1*** cDNAを発現させものが報告されているが、そのほとんどの活性は培地中に検出されている⁷⁹⁾。*A. kawachii BglA*と*T. reesei Bgl1*とのアミノ酸配列を比較したところ、*T. reesei Bgl1*において713～788アミノ酸の位置で (Figure 2-4) 大きな欠失が見られる。このことから、この領域が β -グルコシダーゼの細胞壁多糖画分への吸着に関与している可能性が示された。しかしながら、この部分のアミノ酸配列をSwissProt Databaseに対して照会したところ、レクチンやセルロース結合ドメインなど、糖鎖と結合するもののホモロジーは見られなかった。

前章で、本酵素は細胞壁多糖画分に吸着し、かつ、安定化されることが示されており、白麹菌 β -グルコシダーゼでは、タンパク質全体の構造が細胞壁多糖画分により影響を受けるものと考えられる。これまでに研究が行われているセルロース結合ドメイン等の糖鎖結合タンパク質は、糖鎖への吸着部位をドメインとして分離可能なものが多い。これに対し

て、白麹菌 β -グルコシダーゼでは、タンパク質全体の構造が吸着活性にも関与していると考えられ、非常に興味がもたれる。

本遺伝子のプロモーター部位について検討を行ったところ、典型的なTATAA様配列と、それに続くCTリッチ配列が確認された、また、5'-RACE法の結果から、転写開始点の一つは翻訳開始点の-87bpであるものと考えられる。さらに、5'-非翻訳領域には、5つのCreA結合配列が存在し、このことから本遺伝子の発現は、グルコースにより抑制されるものと思われた。実際に、第1章で様々なC源による β -グルコシダーゼ生産について検討を行った結果では、グルコースでの β -グルコシダーゼ生産量は低い。また、*A. nidulans*の β -グルコシダーゼについては、グルコースにより酵素の生産が抑制されることが明らかとなっている⁸⁰⁾。さらに、*A. nidulans*のcreA変異株を用いた実験では、creAの変異により培地中にグルコースが含まれるうちから β -グルコシダーゼ生産が見られる、つまり、グルコースリプレッションが解除される⁸⁰⁾。これらのことから、白麹菌においても $bgIA$ 遺伝子の発現は、CreAによって制御されているものと考えられた。太田らの報告にもあるように、白麹菌の β -グルコシダーゼ活性は、培養後期に増加していくことから、これらの現象と、CreAまたは、CreA結合領域との関係については非常に興味が持たれる。

第2節 *bglA*遺伝子の破壊と遺伝子破壊株の性質

第1項 緒言

第1章において、白麹菌が生産する遊離型 β -グルコシダーゼ（EX-1、EX-2）と、結合型の β -グルコシダーゼ（CB-1）が同一の遺伝子産物である可能性が示唆された。また、前節において、白麹菌の β -グルコシダーゼCB-1をコードする遺伝子**bglA**を取得した。しかししながら、**bglA**が β -グルコシダーゼCB-1をコードしていることは明らかとなったものの、遊離型の β -グルコシダーゼEX-1、EX-2をもコードしているのかどうかについては確認を行う必要がある。また、本遺伝子は、白麹菌の主な β -グルコシダーゼをコードしているものと考えられるが、果たして本遺伝子により、どの程度の β -グルコシダーゼ活性が制御できるのか不明である。これらのこととを確認するために、*bglA*遺伝子の破壊を試みた。また、白麹菌（*A. kawachii*）においては、これまで*amdS*遺伝子を用いた形質転換系しか利用できなかったため、遺伝子破壊等、様々な分子遺伝学的手法を利用した研究を行うことが困難であった。そこで、白麹菌を用いた新たな形質転換系を作成することも目的として研究を行った。

第2項 材料及び方法

(1) 供試菌株、プラスミド及び培地

焼酎麹菌（*Aspergillus kawachii* IFO4308）を使用した。*Escherichia coli* JM109およびプラスミドベクターpUC118⁵⁶⁾、pYUM201（Nippon gene）を組換えプラスミドの構築等の遺伝子操作に使用した。pUSCを*A. kawachii*の組換え及び*Aspergillus nidulans sC*遺伝子の供給源として用いた^{58, 81)}。培地は前節2-(1)のものを同様に使用した。米麹（固体培養）の作成は、破碎精米を使用し、第1章の方法により作成した。小麦フスマ抽出培地は30gの小麦フスマに対し1Lの水道水を加え、10分間オートクレーブを行った後、ミラクロス（Gibco BRL）により濾過を行い、そのろ液を小麦フスマ抽出培地として使用した。

(2) *A. kawachii sC*遺伝子欠損変異株の作成

A. kawachii の変異処理およびsC欠損変異株の作成は、Buxton等の方法⁵⁸⁾に従った。すなわち、死滅率が90%となるようにUV照射の条件を検討し、*A. kawachii* の胞子懸濁液に対してUV照射により変異処理を行った。これらの胞子をSe/Met培地（3% ショ糖、0.3% NaNO₃、0.1% K₂HPO₄、0.05% KCl、0.018% MgCl₂、0.001% FeSO₄ · 7H₂O、50 μM Na₂SeO₄、30 μg/ml D-メチオニン）に塗布し、Se耐性株を取得した。続いて、得られたSe耐性株についてCr/Met培地（3% ショ糖、0.3% NaNO₃、0.1% K₂HPO₄、0.05% KCl、0.018% MgCl₂、0.001% FeSO₄ · 7H₂O、0.004% Na₂CrO₄、15 μg/ml L-メチオニン）での生育試験を行い、生育できなかった株を選抜した。これらの株について、さらにCzapec-Doxでの増殖、酵素生産を確認しsC欠損候補株とした。これらの候補株について、pUSCにより形質転換を行い、実際に*A. nidulans* sC遺伝子により変異が相補されること、および形質転換が可能であることを確認し、*A. kawachii* sC遺伝子欠損変異株とした。

(3) *A. kawachii* の形質転換

A. kawachii の形質転換は、プロトプラスト法を基本としたPuntとvan den Hondelの方法⁵⁹⁾により行った。形質転換体のスクリーニングには1.2Mソルビトールを添加したCzapec-Dox培地により行った。

(4) *bglA*遺伝子破壊

*A. kawachii bglA*染色体DNAのSacI-SacI領域（約3kb）を*A. nidulans* sC遺伝子に置き換える事により、*bglA*遺伝子破壊を行った。まず、*bglA*を含む染色体DNAをBamHI、KpnIサイトを利用してpYUM201に連結した。続いて、SacI消化および、プラスミドのセルフライゲーションにより、SacI-SacI領域を欠損させた。その後、pUSCからBamHI-SphI消化により単離した*A. nidulans* のsC遺伝子を含むDNA断片をこのSacIサイトに挿入することで、遺伝子破壊用のプラスミドを作成した。続いて、本遺伝子破壊用プラスミドをBamHI、KpnI消化することにより、SacI-SacI領域が*A. nidulans* のsC遺伝子に置換された**bgla**DNA断片を調製し、*A. kawachii* sC遺伝子欠損変異株の形質転換を行った。形質転換体はCzapec-Dox培地により選択し、さらに得られた形質転換体から染色体DNAを抽

出し、サザン解析により遺伝子破壊株を同定した。染色体DNAは、形質転換体を3 %のグルコースを含む基本培地で培養を行い、得られた菌体から定法⁶²⁾により抽出精製した。

(5) 酵素活性測定および菌体量測定

β -グルコシダーゼ活性の測定は、基質としてPNPGを用い、第1章1-2-(3)の方法により行った。 α -アミラーゼ活性、グルコアミラーゼ活性、酸性プロテアーゼ活性、酸性カルボキシペプチダーゼ活性の測定は国税庁所定分析法³¹⁾により行った。菌体量の測定は、Gomiらの方法³⁰⁾に従い行った。

(6) DEAEクロマトグラフィーおよびウエスタン解析

各菌株を1%グルコース、2%キシランをC源とした基本培地で30℃、3日間培養し、得られた菌体を第1章の結合型粗酵素の調製法に従って処理し、得られた粗酵素液をDEAEクロマトグラフィーおよびウエスタン解析に使用した。DEAEクロマトグラフィーについては、まず、得られた結合型粗酵素液を脱塩し、20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で平衡化したTSK gel DEAE-5PWに供し、0~0.4 M NaClのgradientにより溶出する事により行った。カラムからの流出液は280nmの吸光度によりモニターし、各フラクションの β -グルコシダーゼ活性はPNPGを基質として第1章1-2-(3)の方法により測定した。ウエスタン解析については、 β -グルコシダーゼCB-1抗血清を使用し、第1章のウエスタン解析法に従い行った。

(7) RT-PCR

A. kawachii IFO4308株を、小麦フスマ抽出液（液体培養）および小麦フスマ（固体培養）により30℃、48時間培養を行い、Hata等の方法⁶³⁾により全RNAの抽出を行った。さらに、oligo-(dT)-celluloseカラム (Amasham Pharmacia Biothech) によりmRNAを調製した。RT-PCRは、*bglA* ORF全長を増幅できるように設計した1組のプライマー (BGLAORF+: 5'-TAG GGT ACC ATG AGG TTC ACT TTG ATT GAG-3', BGLAORF-; 5'-TAG GGA TCC GTC GTT ATC GTG GTG TAT GTA-3') により、RT-PCR hight (TOYOBO) を用いて行った。得られた産物については、TA cloning kit

(Invitrogen) を用いてpCRIIにクローニングし、それぞれ5クローンについて、DNAシーケンスの決定を行った。

第3項 実験結果

(1) *A. kawachii sC*遺伝子欠損株の作成

これまでに、*A. kawachi* の宿主ベクター系は、*A. nidulans* の*amdS*遺伝子をマーカーとし、アセトアミド資化性により選択を行うという方法のみであった。しかしながら、*amdS*をマーカーとした場合には、タンデムに、しかも多コピーの遺伝子が導入された形質転換体が多く得られる事が知られており、遺伝子破壊には向かない事が予想された^{84, 85)}。そこで、*bgmA*遺伝子を破壊するに先立って、新たな宿主ベクター系を作成することとした。宿主ベクター系は、2回のポジティブスクリーニングによって容易に宿主株が取得でき、しかも形質転換により、ランダムに、シングルコピーでゲノムに挿入され易いとされている*sC*遺伝子をマーカーとして構築することとした⁵⁸⁾。

宿主となる*sC*遺伝子欠損株は次のようにして取得した。*A. kawachii* IFO4308株の胞子懸濁液に対し、UV照謝により変異処理を行い、Se/Met培地により1次スクリーニングを行い、200株のSe耐性株を得た。続いて、これらの株をCr/Met培地により2次スクリーニングを行ったところ、112株のCr感受性株が得られた。さらに、Czapec-Dox培地で生育しないことを確認した後、得られた株を2%の可溶性デンプンをC源とし、30 μg/LのD-メチオニンを添加したCzapec-Dox培地に植菌し増殖速度および形態を観察した。その結果、特に異常がなかったものの中から11株を選抜した。これらの菌株のβ-グルコシダーゼ、およびα-アミラーゼ生産について検討を行い、親株と大きな違いが見られなかつたものの中から、さらに3株を選択した。これらを宿主とし、*A. nidulans* *sC*遺伝子を含むプラスミドpUSCで形質転換を行ったところ、すべての株において形質転換体が得られた。また、ネガティブコントロールとして、サケ精子DNAを加えたものでは、選択培地で増殖できる株は得られなかった。これらの株の中から最終的に1株選抜し、*A. kawachii* SC60と命名して以降の実験に使用した。また、SC60株の形質転換効率は23コロニー/μgDNAであった。

(2) *A. kawachii* *bglA*遺伝子破壊株の作成

*bglA*遺伝子破壊は、*SacI-SacI*領域が*A. nidulans*の*sC*遺伝子に置換された*bglA*DNA断片を形質転換することにより行った。十数回の形質転換により、合計732株の形質転換体を得た。増殖および形態に異常があるものを除き、残った株について液体培養を行い菌体から染色体DNAを調製し、サザンハイブリダイゼーションによるスクリーニングにより遺伝子破壊株を取得した。サザンハイブリダイゼーションによる破壊株の選抜は次の通り行った。各菌株の染色体DNAを*PstI*により完全に消化し、Figure 2-7中に示す約800bpの*PstI-SacI*断片をプローブとしてサザン解析を行った。親株では2.3kbの位置に、*bglA*遺伝子破壊株では3.8kbの位置に、また、非相同的に組換えが起こったものでは、2.3kbと3.8kbの両方の位置にバンドが見られると予想されるが、選抜した形質転換体のうち、1株で*bglA*遺伝子が破壊されていることが明らかとなった（Figure 2-7）。これを*A. kawachii* BAD574と命名し以降の実験に使用した。

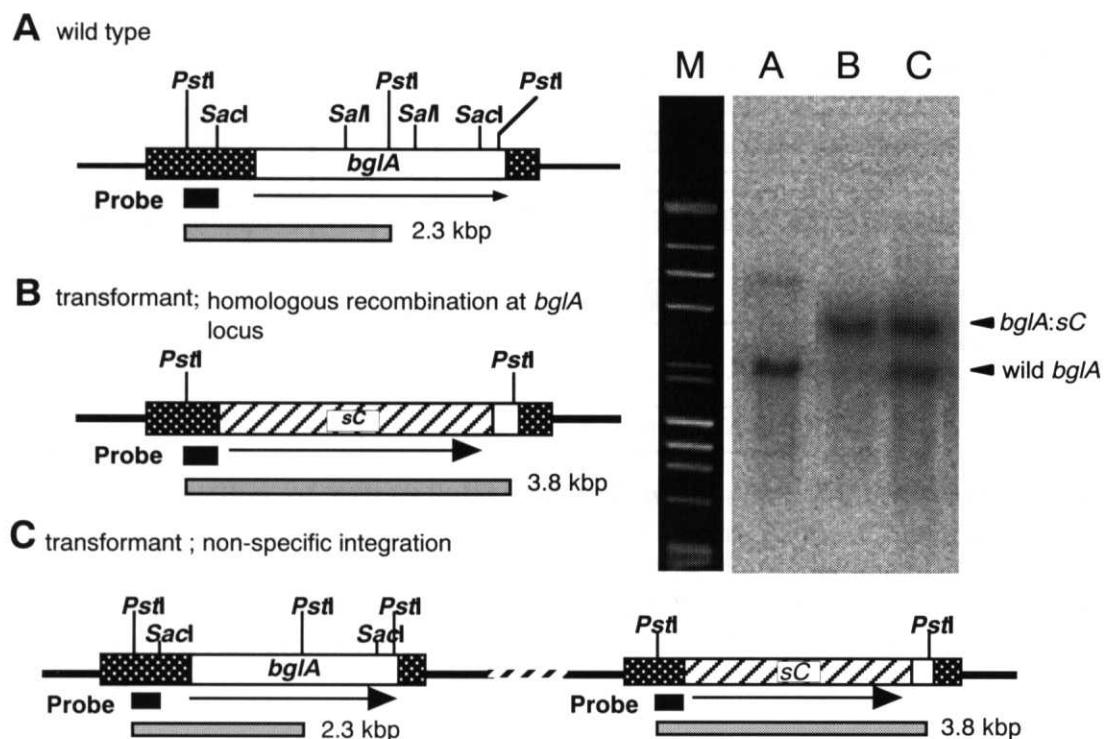


Figure 2-7. Gene structure and Southern blot analysis of *A. kawachii* IFO4308 (wild type) *bglA* (A), *bglA* disruptant (B) and non-homologous recombinant (C). Isolated genomic DNA was digested by *PstI* and then a Southern blot analysis was performed using a 368-bp *PstI-SacI* *bglA* fragment as a probe. Lane M show DNA molecular marker (λ /Hind III digest- ϕ 174/Hae III digest). The open box indicates the *bglA* ORF. Stippled solid boxes indicate 5'- and 3'-flanking regions. The slashed boxes indicate the *sC* gene from *A. nidulans*. The dark shaded boxes indicate the regions where the probe bound.

(3) *A. kawachii* *bgIA*遺伝子破壊株の β -グルコシダーゼ生産

得られた*bgIA*遺伝子破壊株 (BAD574) 、親株 (IFO4308) 、*sC*遺伝子欠損株 (SC60) 、SC60に*A. nidulans* *sC*遺伝子のみを形質転換したもの (NASC1) を液体培養および固体培養し、 β -グルコシダーゼの生産について検討を行った。液体培養は1%グルコース、2%キシランをC源とした基本培地で30°C、3日間、固体培養は破碎精米を用い定法に従い2日間行った。その後、遊離型および結合型酵素の β -グルコシダーゼ活性を測定した。その結果、結合型の β -グルコシダーゼ活性だけでなく、遊離型の β -グルコシダーゼ活性も大幅に減少していた (Figure 2-8)。固体培養、液体培養共に、遊離型 β -グルコシダーゼ活性は親株の1%以下に、結合型 β -グルコシダーゼ活性は親株の10~20%程度に減少していた。

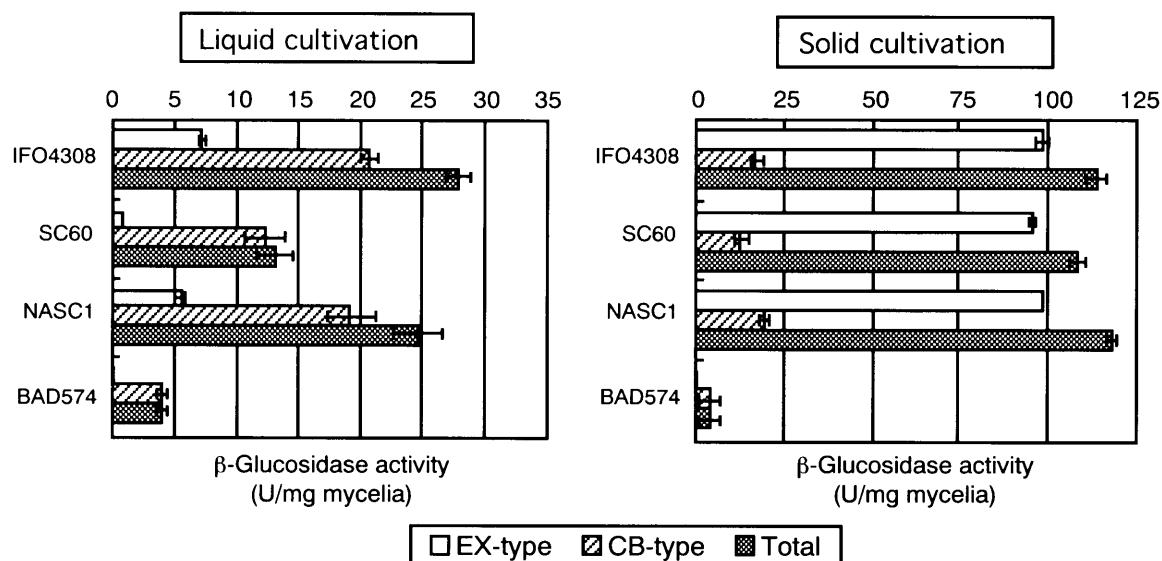


Figure 2-8. Production of extracellular and cell wall-bound β -glucosidase by the *bgIA* disruptant in liquid and solid media. IFO4308, wild strain; SC60, *sC*⁻ strain; NASC, SC60 strain transformed with *A. nidulans* *sC* gene; BAD574, *bgIA* disruptant. Each strain was incubated in basic medium containing 1% glucose and 2% xylan (liquid culture) at 30°C for 3 days or on steamed rice grains for 2 days. β -glucosidase activity was measured using PNPG as the substrate.

(4) *A. kawachii* *bgIA*遺伝子破壊株で見られた β -グルコシダーゼ活性の解析

*bgIA*遺伝子破壊株の結合型酵素画分に10~20%程度の活性が見られたことから、本活性について、DEAEクロマトグラフィー、およびウエスタン解析によって検討を行った。先の実験と同様の条件で液体培養を行い、菌体を回収後、等張液中でYatalase処理により結

合型粗酵素を調製し、さらに脱塩を行いDEAEクロマトグラフィーに供した (Figure 2-9 (A))。0~0.4 M NaCl のgradientで溶出を行ったところ、親株の β -グルコシダーゼ活性は、24~26分の位置に溶出されたのに対し、*bglA*遺伝子破壊株では、この位置のピークは消失し、約20分の位置にわずかに活性が見られるだけであった。さらに、同粗酵素液をSDS-PAGEに供した後、ウエスタン解析を行った。その結果、親株 (IFO4308) には見られたバンドが遺伝子破壊株では消失していた (Figure 2-9 (B))。以上のことから、*bglA*遺伝子破壊株で見られた活性は、*bglA*以外の遺伝子産物によるものであることが明らかとなった。

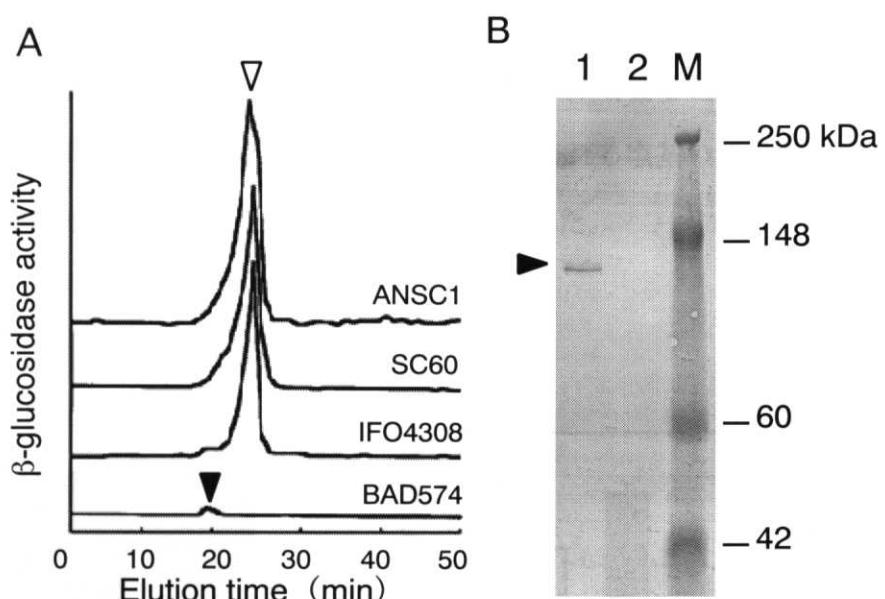


Figure 2-9. Analysis of cell wall-bound β -glucosidase in the *bglA* disruptant. Each strain was incubated in basic medium containing 1 % glucose and 2 % xylan (liquid culture) at 30°C for 3 days. The mycelia were washed and lysed by Yatalase (TaKaRa) in isoosmotic buffer for 3 hr and then centrifuged. The supernatant was isolated and used as a sample. (A) Elution profile of cell wall-bound β -glucosidase activity by a DEAE-5PW column. The open triangle indicates the main peak at 25 min elution time and the closed triangle indicates a minor peak at 20 min elution time. (B) Western blot analysis of cell wall-bound β -glucosidase. Cell wall lysates were detected with anti- β -glucosidase antiserum. Lane 1, *A. kawachii* IFO4308; lane 2, BAD574; lane M, molecular markers. Closed triangle indicates the band corresponding to β -glucosidase CB-1.

(5) 培養条件の違いによる***bglA***遺伝子の発現および酵素の局在性

培養条件（固体培養、液体培養）の違いによる***bglA***遺伝子の発現および β -グルコシダーゼ活性の局在性について検討を行った。出来るだけ条件をそろえるために、固体培養には小麦フスマを、液体培養には小麦フスマの熱水抽出液を培地として使用し、30°C、48お

より72時間培養を行った。これらの菌体から全RNAを調製してノーザン解析により *bglA* 遺伝子の発現量について検討を行ったところ、培養72時間では差がみられたが、培養48時間の試料では、大きな差がみられなかった (Figure 2-10 (A))。そこで、液体培養、固体培養間で *bglA* の発現量に差が少なかった培養48時間の試料を用いて、遊離型および結合型 β -グルコシダーゼ活性を測定を測定した。その結果、総活性については液体培養、固体培養でほぼ同じであるのに対し、 β -グルコシダーゼ活性の局在性については、液体培養では結合型酵素の割合が多く、固体培養では遊離型酵素の割合が多いことが明らかとなった (Figure 2-10 (B))。培養48時間の全RNAから、それぞれmRNAを調製し、さらに全長の *bglA* ORFを增幅できるプライマーを使用して、RT-PCRにより *bglA* cDNAを増幅した。得られたPCR増幅断片をクローニングし、固体培養、液体培養それぞれ5クローンのcDNAのシーケンスを解析した。その結果、PCRによると思われる塩基の置換が確認されたものの、両cDNA間で大きな欠失および挿入は見られなかった。

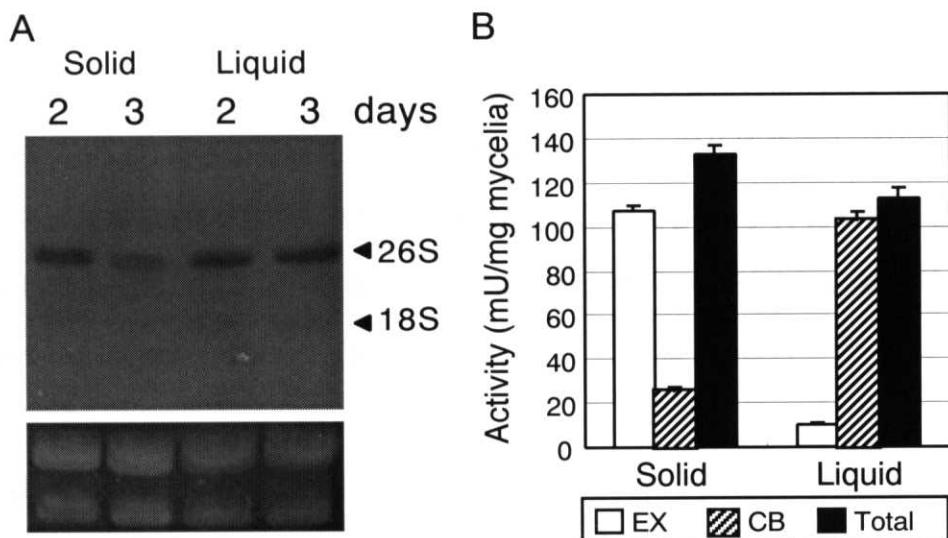


Figure 2-10. (A) The expression of *bglA* gene in solid and liquid media. Total RNA (10 $\mu\text{g}/\text{lane}$) was isolated from 2 days and 3 days mycelia, which grew on steamed wheat bran (Solid) or grew in wheat bran extract medium (Liquid). Hybridization was performed using a ^{32}P -labeled *SalI-SalI* fragment of genomic *bglA* DNA fragment. (B) Production of extracellular and cell wall-bound β -glucosidases by *A. kawachii* in solid and liquid media. Both extracellular and cell wall-bound β -glucosidase activity of 2 days culture was measured using PNPG as a substrate.

第4項 要約

- (1) *bglA*遺伝子破壊を行うために、白麹菌の宿主ベクター系を構築した。マーカー遺伝子として、*A. nidulans* sC遺伝子を使用するために、*A. kawachii* IFO4308から突然変異処理によりsC遺伝子欠損変異株 (*A. kawachii* SC60) を単離した。*A. nidulans* sC遺伝子含むプラスミドpUSCでの形質転換効率は、23コロニー/ μg DNAであった。
- (2) *bglA*遺伝子のSacI-SacI領域を*A. nidulans* sC遺伝子に置換したDNA断片を用いて、*bglA*遺伝子の破壊を試みたところ、732株の形質転換体の中から、1株の遺伝子破壊株 (BAD574) を単離した。
- (3) *bglA*遺伝子破壊株の β -グルコシダーゼ生産について検討を行ったところ、遊離型 β -グルコシダーゼの酵素活性は、固体培養、液体培養共に1%以下となっていたことから、本遺伝子が結合型酵素だけでなく、遊離型酵素もコードしていることが明らかとなつた。
- (4) *bglA*遺伝子破壊株において、結合型として約10~20%の酵素活性が残存していた。DEAEクロマトグラフィー、およびウエスタン解析の結果から、これらの β -グルコシダーゼ活性は*bglA*遺伝子以外の遺伝子産物によるものであることが明らかとなった。
- (5) 小麦フスマ、および小麦フスマ熱水抽出液を用いて、固体培養および液体培養を行つたところ、培養2日目では、*bglA*遺伝子の発現量、および β -グルコシダーゼの総活性はほぼ同じであった。しかし、固体培養では遊離型が多く（約80%）、液体培養では結合型が多く（約80%）生産されていた。

第5項 考察

白麹菌の*bglA*遺伝子を破壊することで、局在性および分子量の異なる3種類の β -グルコシダーゼEX-1 (145 kDa)、EX-2 (130 kDa)、CB-1 (120 kDa) が全て同一の遺伝子によってコードされていることが明らかとなった。第1章で示したとおり、これら3種類の精製酵素は、EndoH処理によりN-結合糖鎖を切除すると同一の分子量約100kDaの位置にシフトする。さらに、各精製酵素のN-末端およびC-末端アミノ酸配列は同一であり、液体培養および固体培養下で調製した*bglA* cDNAの配列に挿入や欠損等は見られなかつた。これらの結果から、 β -グルコシダーゼEX-1、EX-2、CB-1のコアタンパク質部分は

同一であり、N-結合型糖鎖による修飾量の違いにより分子量が異なっていると考えられる。また、小麦フスマを用いた液体培養および固体培養の結果 (Figure2-10) から、*bglA* 遺伝子産物の局在性は、培養条件により影響を受けていることが明らかとなった。これまで、糸状菌酵素の中で、遺伝子破壊により白麹菌 β -グルコシダーゼと同様、同一遺伝子産物の局在性、およびN-結合糖鎖の修飾量が培養条件により影響を受けることを明示した報告はない。特に、固体培養では多くの遺伝子産物が遊離型となり、液体培養では結合型として細胞壁にトラップされる現象は、固体麹の有用性、あるいは麹菌を宿主とした有用タンパク質の高生産を考える上でも非常に興味が持たれる。一方、固体培養による糖鎖修飾の増加についても、固体培養下での水分活性の低下等を考慮に入れると、酵素の溶解性という観点から興味が持たれる。

第1章で、遊離型の精製酵素も細胞壁多糖成分への吸着活性を持っていること、精製酵素は不安定であるが、細胞壁多糖画分により安定化されることを示した。このことから、固体培養条件で β -グルコシダーゼEX-1、EX-2が細胞壁を離れ、培地中に遊離の状態で存在するためには、細胞壁への吸着を妨げるような可溶性の物質が必要である。さらに、遊離型の精製酵素は不安定であるが、粗酵素中の β -グルコシダーゼ活性は安定であることから、粗酵素中には酵素を安定化している物質が存在しているのではないかと予想される。従って、遊離型 β -グルコシダーゼは、固体培養時に生産される可溶性の成分に吸着することで、培地中に遊離の状態で、しかも安定に存在しているのではないかと考えられた。また、その可溶性の成分は、細胞壁多糖画分中に含まれるような構造を持っているのではないかと推察された。

さらに、*bglA*遺伝子破壊株では、固体および液体培養の両条件下で、親株に対して90%以上の β -グルコシダーゼ活性が失われていた。このことから、白麹菌の β -グルコシダーゼ活性のほとんどは、*bglA*遺伝子に由来することが明らかであり、*bglA*遺伝子の発現を制御する事で、白麹菌の β -グルコシダーゼ活性を制御することが十分可能であると考えられた。

また、今回 *A. nidulans sC* 遺伝子をマーカー遺伝子、*A. kawachii sC* 遺伝子欠損株を宿主株として用いることで、白麹菌においても遺伝子破壊等の分子生物学的手法が使用できることが明らかとなった。Figure 2-8で、*sC* 遺伝子欠損株 (SC60) の β -グルコシダーゼ

活性が親株 (IFO4308) に比べ低下しているが、これはsC遺伝子が、S源の取り込みや、アミノ酸の合成に直接関与しているAdenosin triphoshatase sulfurylase (ATPsase) をコードしている事によるものと思われる。これに *A. nidulans* sC遺伝子を形質転換すると、 β -グルコシダーゼ活性は、ほぼ親株並みに活性が回復する。また、データは示していないが、他の酵素活性についても同様に、変異株での活性は低下するが、sC遺伝子の変異を相補することにより活性を回復する。故に、変異株で β -グルコシダーゼ活性、および他の酵素活性が低いのは、sC遺伝子の変異によるものと考えられた。このことから、本sC遺伝子欠損株 (SC60) は酵素生産等、様々な白麹菌の性質について検討を行う上で、宿主として十分使用できるものと考えられた。

最後に、本章までの結果をまとめた図をFigure 2-11に示した。

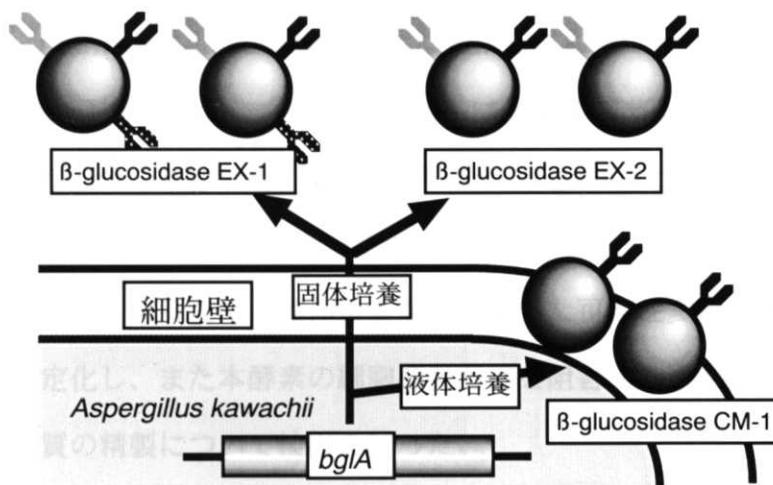


Figure 2-11 白麹菌 β -グルコシダーゼとその遺伝子 (*bgIA*)

白麹菌は菌体外に遊離の状態で2種類 (EX-1,2) 、細胞壁中に1種類 (CB-1) の β -グルコシダーゼを生産する。これらはすべて一つの遺伝子 *bgIA* によってコードされている。本遺伝子産物は、固体培養を行うと遊離型酵素 (EX-1,2) として菌体外に分泌され、液体培養を行うと結合型酵素 (CB-1) として細胞壁に保持される。

■ : N-結合糖鎖

第3章 白麹菌が生産する可溶性多糖 (ESP) の精製と β -グルコシダーゼの諸性質に対する影響

第1節 白麹菌が生産する可溶性多糖 (Extracellular Soluble Polysaccharide: ESP) の精製

第1項 緒言

白麹菌の遊離型 β -グルコシダーゼは、何らかの可溶性の物質により培地中に遊離の状態で、しかも安定に存在することが示唆された。また、この物質は細胞壁多糖画分中に含まれるものと類似の構造を持っているものと考えられる。*Aspergillus*属の細胞壁は、主にchitin、 β -1,3-glucan、 β -1,6-glucan、nigeranなどの多糖により構成され⁸⁵⁾、さらに、mannanやgalactomannanなどが含まれることが報告されている^{86, 87)}。chitinや高分子の β -1,3-glucan、およびnigeranは不溶性であることを考えると、低分子の β -1,3-glucan、nigeran、mannanやmannogalactan、galactanなどの可溶性多糖類が、遊離型 β -グルコシダーゼの安定性、および局在性に関与しているのではないかと考えられる。そこで、本章では、固体培養から調製した可溶性多糖画分が、 β -グルコシダーゼEX-2を安定化し、また本酵素の細胞壁吸着能を阻害する事を確認した後、このような機能を持つ物質の精製について検討を行った。

第2項 材料及び方法

(1) 供試菌株および培養方法

焼酎麹菌 (*Aspergillus kawachii* IFO4308) を用いた。固体培養は破碎精米を原料とした定法²⁹⁾により行った。ただし、培養温度は30℃一定で、48時間培養を行った。

(2) 細胞壁多糖画分および可溶性多糖画分の調製

細胞壁多糖画分は、第1章の方法に準じて行った。可溶性多糖画分の調製は、以下の通り行った。米麹（固体培養）または蒸し米を、5倍量の5% NaClを含む100 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で4℃、12時間抽出した。その後、ミラクロス (Gibco BRL) により濾過

を行った後、 $8,000 \times g$ で 4°C 、10分間遠心し、その上清をさらに、 $12,000 \times g$ で 4°C 、20分間遠心した。上清を回収した後に、さらに1/2量の水飽和フェノールを加え、激しく攪拌した後に1/2量のクロロフォルムを加え、再び激しく攪拌し、 $8,000 \times g$ で室温、10分間遠心した。水層を回収した後に、余分のフェノールを除くため、さらに2回、クロロフォルムで同様の処理を行い洗浄した。洗浄を行った水層に対して、2.5倍量の99.5 %エタノールを加え、 -20°C に1時間放置した後、 $8,000 \times g$ で 4°C 、20分遠心した。その後沈殿を回収し、減圧乾燥機により、室温、15分間乾燥を行った後、ミリQ水に懸濁し可溶性多糖画分とした。

(3) 酵素活性測定および糖含量、糖組成の分析

β -グルコシダーゼの測定はPNPGを基質として、第1章1-2-(3)の方法により行った。また、糖含量の測定はフェノール・硫酸法によりグルコースを標準物質として行った。糖組成の分析に関しては、 $2 \mu\text{g}$ の試料を用い、第1章のタンパク質の糖組成分析と同様の方法により行った。

(4) 遊離型精製 β -グルコシダーゼの安定化

精製した遊離型 β -グルコシダーゼEX-2（終濃度 60 mU/ml ）に糖含量で $100 \mu\text{g/ml}$ となるように各可溶性多糖画分を添加し、 50 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）中で 37°C 、3時間保持した。 β -グルコシダーゼ活性は、酵素液を 37°C で保持する前、および保持後に、PNPGを基質とし測定した。

(5) 遊離型精製 β -グルコシダーゼの細胞壁多糖画分への吸着阻害

精製した遊離型 β -グルコシダーゼEX-2（終濃度 60 mU/ml ）に糖含量で 1 mg/ml となるように各可溶性多糖画分を添加し、その後、 1 mg/ml となるように細胞壁多糖画分を添加し、激しく攪拌後、 4°C で30分間保持した（ 50 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0））。その後、 $15,000 \text{ rpm}$ で5分間遠心し、上清と沈殿に分画した。沈殿にはさらに上清と等量の 50 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）を添加しよく懸濁後、上清画分および沈殿画分の β -グルコシダーゼ活性を測定した。

(6) 可溶性多糖 (Extracellular soluble polysaccharide: ESP) の精製

可溶性多糖の精製は、米麹から調製した可溶性多糖画分を試料として行った。また、精製の全工程は4°Cで行った。液体クロマトグラフィーはHPLCを用い、カラムからの溶出液は、Reflective indexおよび280nmの吸光度でモニターした。また、各フラクションの糖含量についてもフェノール・硫酸法⁸⁸⁾にて測定した。

ステップ1：ミリQ水に懸濁した可溶性多糖画分を、同じくミリQ水で平衡化したTSK gel G2500-PW (Tosoh Co. Ltd.) に供し、流速0.5 ml/mlで溶出を行い、1分ごとに各フラクションを分取した。活性画分を回収した後、凍結乾燥を行った。

ステップ2：凍結乾燥を行った試料を50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) に懸濁し、同緩衝液で平衡化した陰イオン交換カラム (TSKgel DEAE-5PW: Tosoh Co. Ltd.) に供した。続いて、10分間同緩衝液にて溶出を行った後、0.1~1.0 M NaClを含んだ50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で溶出を行った。得られた活性画分を回収し凍結乾燥を行った。

ステップ3：凍結乾燥を行った試料を20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解し、NAP-25カラムにより脱塩を行った後、同緩衝液で平衡化した陽イオン交換カラム (TSKgel CM-5PW: Tosoh Co. Ltd.) に供した。カラムからの溶出は、20 mM酢酸緩衝液 (pH 5.0) を用いステップ2と同様に行った。活性画分はさらにH₂Oで平衡化したTSK gel G3000SWにより精製および脱塩を行った後、水溶液の状態あるいは凍結乾燥した状態で、-70°Cで保存した。

(7) レクチンカラムによる吸着実験

精製したESP (1 mg) を20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、その後各レクチンカラムに供した。容量が1 mlのConAおよびRCA120レクチンカラム (ホーネンコーポレーション) を20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した後、ESPを供した。レクチンカラムからの溶出は、ConAは α -methyl-D-glucopyranoside、RCA120はガラクトースにより行った。各溶出フラクションは、限外濾過により脱塩後、フェノール・硫酸法により糖含量を測定した。また、精製 β -グルコシダーゼ安定化活性および吸着阻害活性についても検討した。

第3項 実験結果

(1) 米麹（固体培養）から調製した可溶性多糖画分の性質

A. *kawachii* IFO4308を使用し作成した米麹、および対照として蒸米を5 % NaClを含む100 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で抽出し、それをフェノール/クロロフォルム処理し、エタノール沈殿することにより、それぞれ可溶性多糖画分を調製した。続いて、これらの画分中に遊離型の精製 β -グルコシダーゼを安定化する活性が存在するかどうか検討した。その結果、米麹から調製した可溶性多糖画分を添加したときのみ、 β -グルコシダーゼ活性は安定に保持され、蒸し米から調製した可溶性多糖画分では安定化されなかった (Figure 3-1 (A))。続いて、遊離型の精製 β -グルコシダーゼの細胞壁多糖画分吸着活性を阻害する

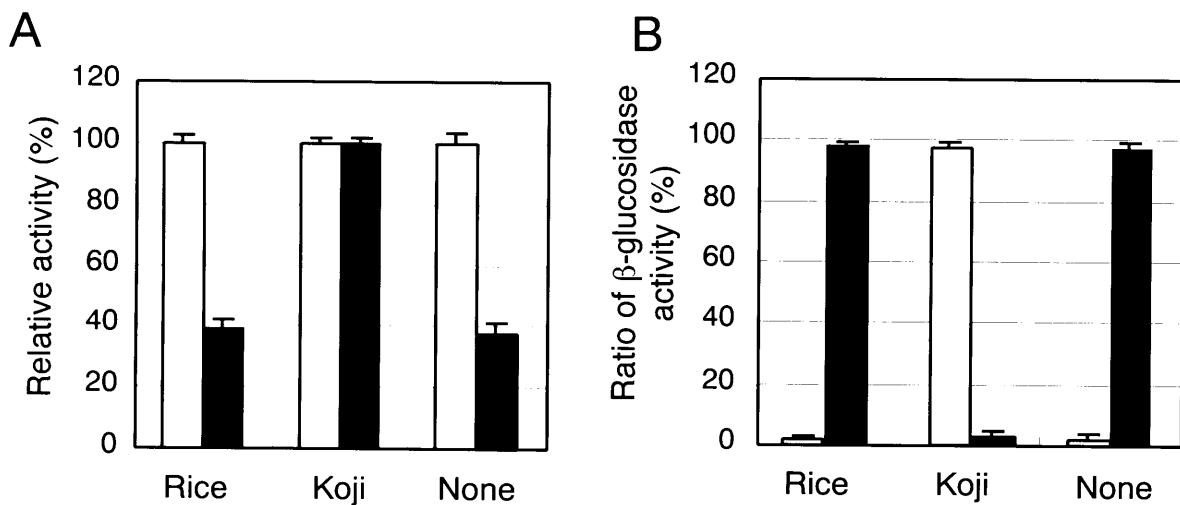


Figure 3-1. (A) Effect of soluble polysaccharide on the stability of β -glucosidase EX-2. The soluble polysaccharides from steamed rice (Rice) and rice *koji* (Koji) (100 μ g/ml) was added to the purified β -glucosidase EX-2 (60mU/ml) and the mixtures were incubated at 37°C for 3 hr. The β -glucosidase activity was measured using PNPG as the substrate. H_2O was added instead of the soluble polysaccharide, as a negative control (None). Symbols; □, β -glucosidase activities on 0hr incubation; ■, β -glucosidase activities on 3hr incubation. (B) Effect of soluble polysaccharide on the adsorption of β -glucosidase EX-2 to the cell wall fraction from *A. kawachii*. The soluble polysaccharides from rice (Rice), rice *koji* (Koji) (1 mg/ml) were added to purified β -glucosidase EX-2 (60mU/ml) and then the cell wall fraction (1mg/ml) from *A. kawachii* was added to each solution. The mixture was incubated at 4°C for 30 min and after mixing well and it was centrifuged at 15,000 rpm for 5 min. After separating supernatant from the pellet, an equal volume of buffer (20mM sodium acetate, pH 5.0) was added to resuspend the pellet. Both the β -glucosidase activities in the supernatant and the cell wall suspension were measured using PNPG as a substrate and were indicated by ratio (%) of these two fraction. Symbols; □, β -glucosidase activities in the supernatant; ■ β -glucosidase activities in the precipitate.

かどうか検討を行った。その結果、 β -グルコシダーゼの吸着活性は、安定化活性と同様に、米麹由来の可溶性多糖画分を添加したときのみ阻害され、蒸し米由来の可溶性多糖画分では阻害されなかった（Figure 3-1 (B)）。

- (2) 白麹菌が生産する可溶性多糖（Extracellular Soluble Polysaccharide : ESP）の精製
米麹から調製した可溶性多糖画分に、 β -グルコシダーゼを安定化し細胞壁への吸着を阻害する活性が存在したことから、さらに可溶性多糖（ESP）の精製を行うこととした。
ESPの精製は、精製酵素（EX-2）の安定化活性および細胞壁吸着阻害活性を指標に行つた。指標とした両活性は、精製過程を通して分割されることはない。まず、米麹（20g）から、可溶性多糖画分（189 mg）を調製し、ミリQ水に懸濁後、TSK gel G2500PWを用いたゲル濾過に供した。その結果、Figure 3-2 に示すように、Fraction13～15にReflective indexでピークが見られ、さらに β -グルコシダーゼを安定化する活性も見られた。また、吸着阻害活性についても確認したところ、同様に本画分に見られた。そこで、本画分を回収、凍結乾燥し、50 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.5）に懸濁した後に、陰イオンクロマトグラフィーに供した。陰イオンクロマトグラフィーには、同緩衝液で平衡化したTSK gel DEAE-5PWを使用し、溶出は0～1.0 M NaClにより行った。まず、安定化活性について検討を行ったところ、主な活性は、糖含量が高く、280nm吸光度が低い非吸着画分に検出された。また、わずかに吸着画分にも活性が認められた（Figure 3-3）。つづいて、結合阻害活性について確認を行ったところ、非吸着画分には明らかな阻害活性が見られたが、吸着画分では、EX-2の吸着活性はほとんど阻害されなかった。そこで、両活性の高い非吸着画分を回収し、20 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）により脱塩、バッファー交換を行った後、同緩衝液で平衡化した陽イオン交換カラム（TSK gel CM-5PW）に供した。カラムからの溶出は、陰イオンクロマトグラフィー同様、0～1.0 M NaClのgradientにより行った。その結果、両活性は、本クロマトグラフィーにおいても非吸着画分に検出された。得られた非吸着画分を、ミリQ水により平衡化したTSK gel G3000SWにより、さらに精製、脱塩を行い、最終的に乾燥重量で5.9 mgの精製産物を得た。これを可溶性多糖（ESP）として以降の実験に用いた。

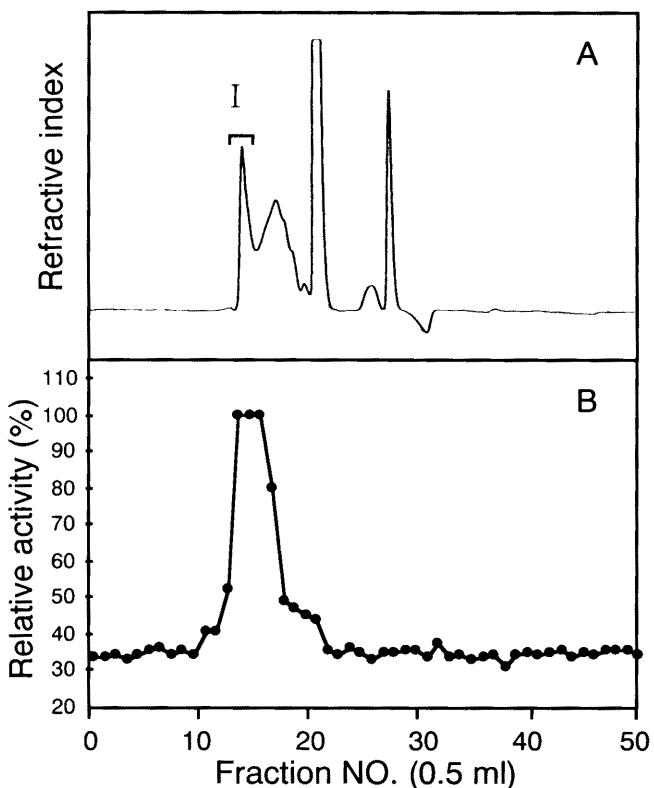


Figure 3-2. The elution profile of the soluble polysaccharide using TSKgel G2500PW chromatography. The crude soluble polysaccharide ($100\mu\text{l}$) was applied onto the TSKgel G2500PW column (7.5 mm I.D. \times 300 mm) and eluted with 0.5 ml/min of H_2O . The eluted fraction (0.5 ml/ fraction) was monitored using a refractive index detector (Panel A) and the activity to stabilize EX-2 (Panel B). Each eluted fraction ($10\mu\text{l}$) was added to the 1 ml of β -glucosidase solution (60mU/ml) and incubated at 37°C , pH 5.0. After 3hr incubation, the β -glucosidase activities were measured using PNPG as a substrate. The letter I (13-15min) indicates the active fraction.

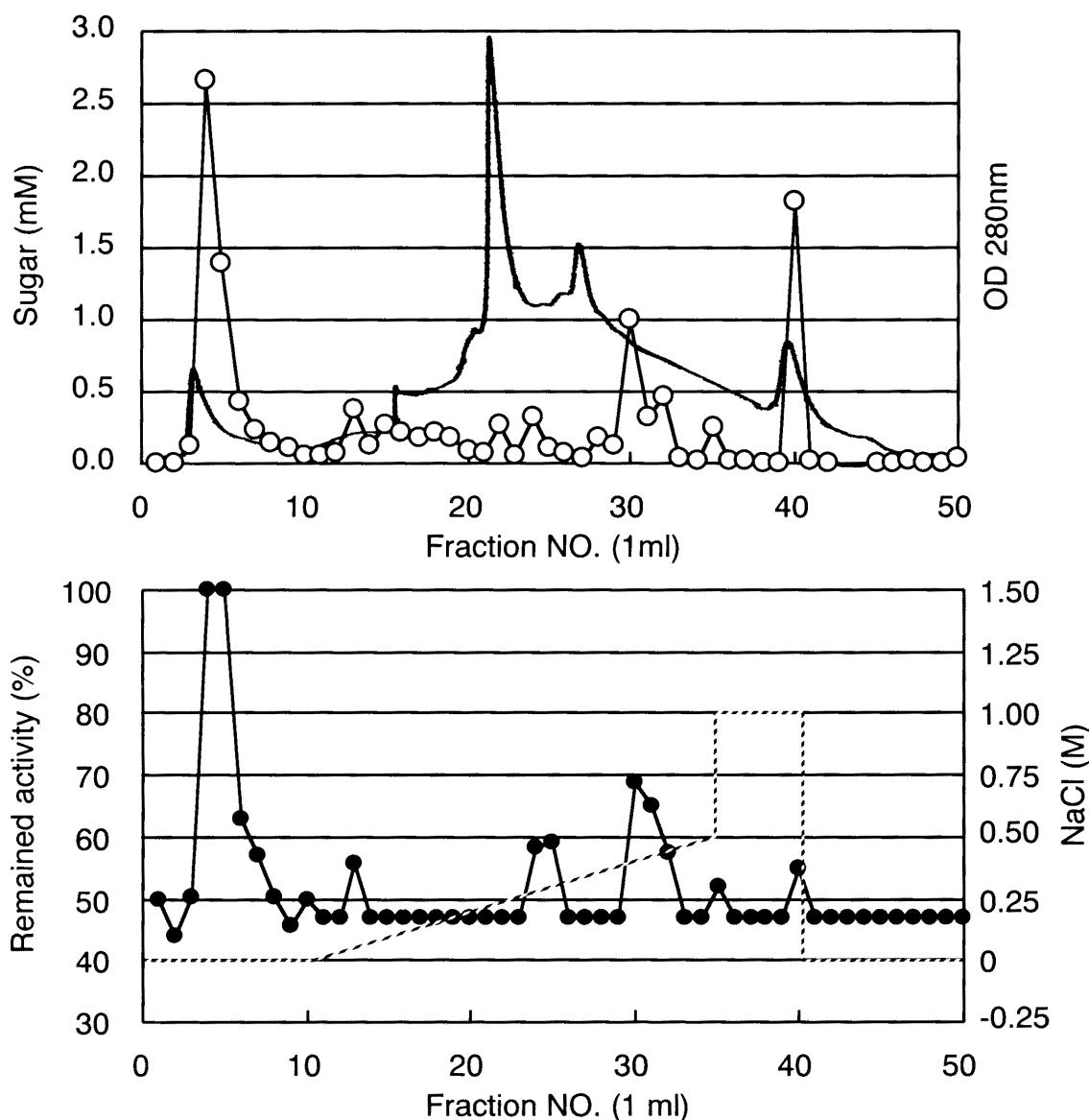


Figure 3-3. The elution profile of the soluble polysaccharide using TSKgel DEAE-5PW chromatography. The active fraction of gel chromatography was applied onto the TSKgel DEAE column (7.5 mm I.D. \times 75 mm). Amount of sugar (○) and OD 280 nm (-) in the eluted fraction (1 ml/ fraction) was measured. Each eluted fraction (10 μ l) was added to the 1 ml of β -glucosidase solution (60 mU/ml) and incubated at 37°C, pH 5.0. After 3hr incubation, the β -glucosidase activities (●) were measured using PNPG as a substrate. The dotted line indicates NaCl concentration.

(3) 可溶性多糖 (ESP) の性質

精製の結果、得られた可溶性多糖 (ESP) を再度ミリQ水に懸濁後、フェノール・硫酸法により糖含量の測定を行ったところ、5.9mgと乾燥重量と一致した。また、 $10\mu\text{g}$ のESPを用いて、アミノ酸分析を行ったところ、いずれのアミノ酸も認められなかった。また、TSKgel G3000SWによるゲルクロマトグラフィーの結果から、およそその分子量が10,000～20,000と高分子であり、得られた精製産物が可溶性の多糖であることが確認された。続いて、精製ESPの糖組成について検討を行った結果、Table 3-1に示すとおり、ガラクトース、グルコース、マンノースにより構成されていることが明らかとなった。続いて、レクチンカラムへの吸着について検討を行った。構成糖として、ガラクトース、グルコース、マンノースを含んでいたことから、コンカナバニンA (ConA) 、および*Ricinus communis*アグルチニン (RCA120) カラムへの吸着について検討を行った。ConAは、グルコースおよびマンノースに対して親和性を持ち、特にハイマンノースタイプのN-結合型糖鎖に高い特異性を示す^{89, 90)}。RCA120は、ガラクトースに対して親和性を持ち、特にN-アセチルガラクトサミンの4位または6位の位置、あるいは、ガラクトースの6位の位置に結合した末端のガラクトースを持つ糖鎖に高い特異性をしめす^{91, 92)}。ESPをこれらのカラムに供し、非吸着画分の溶出を行った後、ハプテン等を加えることにより、吸着画分の溶出を行った。各溶出画分を透析後、フェノール・硫酸法によって、糖含量の測定を行った。まず、ConAに供した結果では、ESPはすべて吸着され、ConAに吸着されたESPは α -

Table 3-1. Sugar composition of the purified ESP.

Sugars	Ratio (%)
Galactosamine	0.0
Glucosamine	0.0
Galactose	22.3
Glucose	20.2
Mannose	57.6
Total	100

Neutral monosaccharides were released from $2\mu\text{g}$ of the purified ESP by heating at 100°C with 2 M trifluoroacetic acid for 4 hr. Amino saccharides were released by heating at 100°C with 4 N HCl for 6 hr. Duplicate hydrolyses were done on each sample. The solution was lyophilized and resuspended with nanopure water and analyzed by high-pH anion-exchange chromatography with electrochemical detector (Dionex Co., model DX-500) using Carbopac PA1 column (Dionex Co., Ltd., 4 x 250 mm)

methyl-D-glucopyranosideにより溶出された (Figure 3-4 (A))。しかしながら、RCA120を用いた場合では、ESPはすべて非吸着画分に見いだされ、galactoseによる溶出画分には、何も見いだされなかった (Figure 3-4(B))。

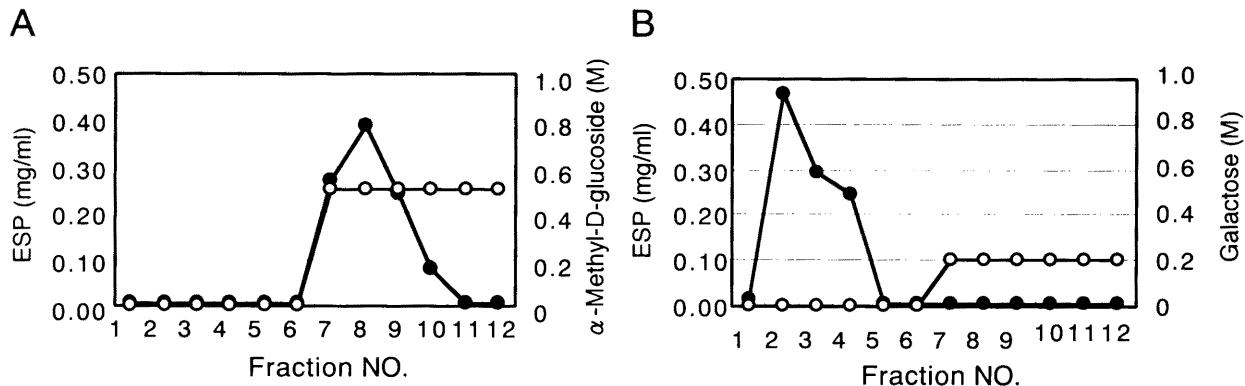


Figure 3-4. Adsorption of the purified ESP to lectin columns. The purified ESP (1mg) was applied onto both ConA (A) and RCA120 (B) lectin columns (Honon) which were equilibrated with 20mM Phosphate buffer (pH 7.0). These columns were eluted with 6 ml of 20mM Phosphate buffer (pH 7.0) followed by 6 ml of 20mM Phosphate buffer (pH 7.0) containing a suitable concentration of the hapten sugar (ConA, α -methyl-D-glucopyranoside; RCA120, galactose). The sugar concentration was measured by Dubois's method after dialysis of each fraction using ULTRAFREE-MC (MW 10,000: Millipore) to remove the hapten sugar. Symbols; ●, Concentration of ESP; ○, Concentration of the hapten sugar.

第4項 要約

- (1) 米麹から調製した可溶性多糖画分は精製 β -グルコシダーゼを安定化した。さらに、精製 β -グルコシダーゼの細胞壁多糖画分への吸着も阻害することが明らかとなった。しかし蒸し米から調製した可溶性多糖画分にはこのような活性は見られなかった。
- (2) 米麹由来の可溶性多糖画分 (189 mg) から、ゲルfiltration、陰イオン交換、陽イオン交換クロマトグラフィーにより、5.9 mg のESPを精製した。
- (3) 精製したESPの分子量は、およそ10,000 ~ 20,000程度で、マンノース、ガラクトース、グルコースにより構成されていた。また、精製ESPはConAカラムにより完全にトラップされたが、RCA120カラムではトラップされなかった。

第5項 考察

白麹菌 (*A. kawachii*) の米麹 (固体培養) から調製した可溶性多糖画分中には、精製 β -グルコシダーゼを安定化し、細胞壁多糖画分への吸着を阻害する活性が存在していた。こ

これらの活性は蒸し米から調製した可溶性画分中には見られなかったことから、白麹菌により生産されることが示唆された。これらの活性をメルクマールとし、精製を行った結果、予想されたとおり可溶性の多糖、ESPを精製することが出来た。糖組成分析を行った結果、ESPは、ガラクトース、グルコース、マンノースから構成され、特にマンノースが約60%と多量に含まれていた。さらに、ConAカラムに供したところ、すべてのESPが本カラムにトラップされた事から、ESPは3種類の糖から構成されるヘテログリカンであるものと思われる。

Lealらにより *A. fulavipes*、および *A. ochraceus* の細胞壁アルカリ可溶画分について糖鎖の構造解析がなされており、主にガラクトース、グルコース、マンノースにより構成され、わずかにキシロースが含まれることが報告されている⁸⁶⁾。最近、Fontainらにより、*A. fumigatus*の細胞壁アルカリ不溶画分についても、構造解析が行われており、chitinおよびgalactomannan、 β -1,3/1,4-glucanが、 β -1,3-glucanの非還元末端に共有結合により結合していることが示されている⁸⁷⁾。さらに、Rathらにより、*T. reesei*の細胞壁からヘテログリカンが単離されており、そのコア部分は α -1,6-結合を持ったマンナンであることが報告されている⁹³⁾。また、第1章の第2節において、遊離型 β -グルコシダーゼが細胞壁多糖画分に吸着し、安定化されることが明らかとなっている。このことは、ESPと同様の機能を持ったものが細胞壁多糖画分中にも含まれることを示しており、先の報告と、ESPの糖組成を考え合わせると、今回精製されたESPは細胞壁由来である可能性が強く示唆される。

第2節 白麹菌 β -グルコシダーゼの諸性質に対する精製可溶性多糖(ESP)の影響

第1項 緒言

白麹菌により作成した麹(固体培養)から調製した可溶性多糖画分には、精製 β -グルコシダーゼを安定化し、また、細胞壁多糖画分への吸着を阻害する活性が存在していた。これらの活性を頼りに精製を行ったところ、可溶性多糖(ESP)を得ることが出来た。白麹菌の遊離型 β -グルコシダーゼは、実際の粗酵素液あるいはもろみ中ではこのESPにより安定化されているものと考えられる。また、本酵素は、ESPと直接結合することで細胞壁多糖画分に吸着することなく培地中に遊離の状態で存在するものと考えられる。以上のことから、ESPによる精製 β -グルコシダーゼの安定化、精製 β -グルコシダーゼの細胞壁多糖画分への吸着阻害、ESPと精製 β -グルコシダーゼとの相互作用に関して詳細に検討を行った。また、精製 β -グルコシダーゼの酵素科学的諸性質に対するESPの影響についても合わせて解析を行った。

第2項 材料及び方法

(1) 精製酵素、細胞壁多糖画分、ESP

遊離型の精製 β -グルコシダーゼおよび可溶性多糖画分は第1章に示した方法、ESPは前節2-(6)に示した方法に従い調製した。

(2) 精製 β -グルコシダーゼの安定性

精製酵素の安定性に対する時間的影響については、各遊離型の精製 β -グルコシダーゼ(60 mU/ml終濃度)に100 μ g/mlとなるようにESP、あるいは、各单糖、オリゴ糖、可溶性の多糖を加え、50 mM酢酸緩衝液(pH 5.0) 37°Cで保持し、経時的にサンプリングを行い、 β -グルコシダーゼ活性を測定した。pH安定性については、各遊離型の精製 β -グルコシダーゼに100 μ g/mlとなるようにESPを加え、第1章に示した精製 β -グルコシダーゼの安定性と同様の方法により、pH2.2~10の範囲で行った。また、温度安定性についても、100 μ g/mlになるようにESPを加え、第1章に示した方法に従って行った。 β -グルコ

シダーゼ活性の測定は、PNPGを基質として第1章1-2-(3)の方法により行った。

(3) 精製 β -グルコシダーゼの細胞壁多糖画分への吸着阻害と細胞壁多糖画分からの可溶化

精製酵素の細胞壁多糖成分への吸着阻害は、各遊離型の精製 β -グルコシダーゼ (60 mU / ml終濃度) に1 mg / mlとなるようにESPを加え、前節 (2-(5)) と同様に行った。精製 β -グルコシダーゼの細胞壁多糖成分からの可溶化については以下のように行った。まず、各遊離型の精製 β -グルコシダーゼ (60 mU / ml) を、ESP等の添加無しに細胞壁多糖成分に吸着させた。その後、50 mM酢酸緩衝液 (pH 5.0) にて、2回洗浄した後に、1 mg / mlのESPを含む50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を添加して、激しく攪拌した。その後、4°Cで30分間放置し、15,000 rpmで5分間遠心を行い、上清と沈殿の β -グルコシダーゼ活性をPNPGを用いて第1章1-2-(3)の方法により測定した。沈殿の活性は、上清と等量の50 mM酢酸緩衝液 (pH5.0) を加え、よく懸濁したあと測定した。

(4) ESP添加による酵素科学的性質への影響

各濃度 (終濃度0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mM) のPNPGを基質として含む溶液に各濃度 (終濃度50、100、200 μ g/ml) のESPを加えた反応液に遊離型の各精製酵素 (20 mU / ml) となるよう加え、50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中で、37°C、5分間反応を行った。以下、第1章で示した1-2-(3)の方法に基づき反応を停止し、吸光度 (410nm) により生じたp-ニトロフェニルの量を測定した。

(5) ESPのビオチン化および精製 β -グルコシダーゼへの吸着

ESP (2 mg) のビオチン化、および検出は、ECL glycoprotein detecton system (Amasham Pharmacia Biothech) を利用し行った。すなわち、2 mg ESPを含む100 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 400 μ lに200 μ lの30 mM sodium metaperiodateを添加し、暗所にて室温で20分反応を行った。さらに、200 μ lの20 mM sodium metabisulphiteを含んだ 200 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) を添加して、室温で5分間反応を行った。その後、100 μ lの5 mM Biotin hydrazideを添加して、室温で1時間反応を行った。本反応液は、この後、ミリQ水で平衡化したTSK gel G2500PWにて脱塩を行い、その後凍結乾燥しビオチン

化ESPを得た。ビオチン化ESPと、各精製酵素の相互作用の解析は次のように行った。各精製 β -グルコシダーゼ $1\mu\text{g}$ をHybond-P membrane (Amersham Pharmacia Biothech UK Ltd.) にスポットプロッティングし、その後、各濃度 (0, 0.1, 1.0, 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) のビオチン化ESPを含む20 mM 酢酸緩衝液中で、4°C 12時間反応を行った。その後、phosphate buffered saline (PBS) により10分間、3回洗浄を行い、5%のblocking agent を含むPBS中で、室温で60分間ブロッキングを行った。さらに、PBSで3回洗浄を行った後、PBSで1,000倍に希釈したstreptavidin-horseradish peroxidase (HRP) 溶液中でにて室温で30分間反応を行った。これをPBSにより10分間、3回洗浄を行い、ECLにより検出を行った。

第3項 実験結果

(1) 精製 β -グルコシダーゼのESPによる安定化

まず、精製 β -グルコシダーゼの安定性に及ぼす時間的影響について検討を行った。各遊離型の精製酵素を37°C, pH 5.0で保持し、経時的に β -グルコシダーゼ活性を測定した。その結果、精製 β -グルコシダーゼのみでは、これまで同様、時間の経過と共に活性がざん減したのに対し、ESPを加えたところその活性は安定に保持された (Figure 3-5 (A))。続いて、精製 β -グルコシダーゼのpH安定性について検討を行ったところ、ESPの添加により、活性はpH 3.0~7.0の範囲で安定に保たれた (Figure 3-5 (B))。一方、精製 β -グルコシダーゼの温度安定性について検討したところ、ESPの添加により、活性は50°Cまで安定に保たれた (Figure 3-5 (C))。また、遊離型 β -グルコシダーゼEX-1に対してESPを加えたものでは、40~50°C付近で酵素の活性がわずかに上昇しているのが観察された。この現象は、EX-1ほど顕著ではないが、EX-2でも観察された (Figure 3-4 (C))。

また、ESPの構成糖である、ガラクトース、グルコース、マンノース、およびこれらの糖で構成されるオリゴ糖 (Cellobiose, laminaribiose, laminaritetraose, α -1,2-mannoside, α -1,3-mannoside, α -1,4-mannoside, α -1,6-mannoside)、さらに主にマンノースから構成されるYeast mannan、主に β -1,6-glucan、 β -1,3-glucanからなるlaminarin、laminarinと同様グルコースで構成される可溶性デンプンを加え、同様の実

験を行った (Table 3-2)。その結果、各精製酵素は、いずれの単糖やオリゴ糖でも安定化されなかったが、Yeast mannanや、Laminarinなどの高分子多糖を用いた場合には安定化された。しかしながら、Laminarinと同じグルコースから構成される可溶性デンプンでは安定化されなかった (Table 3-2)。

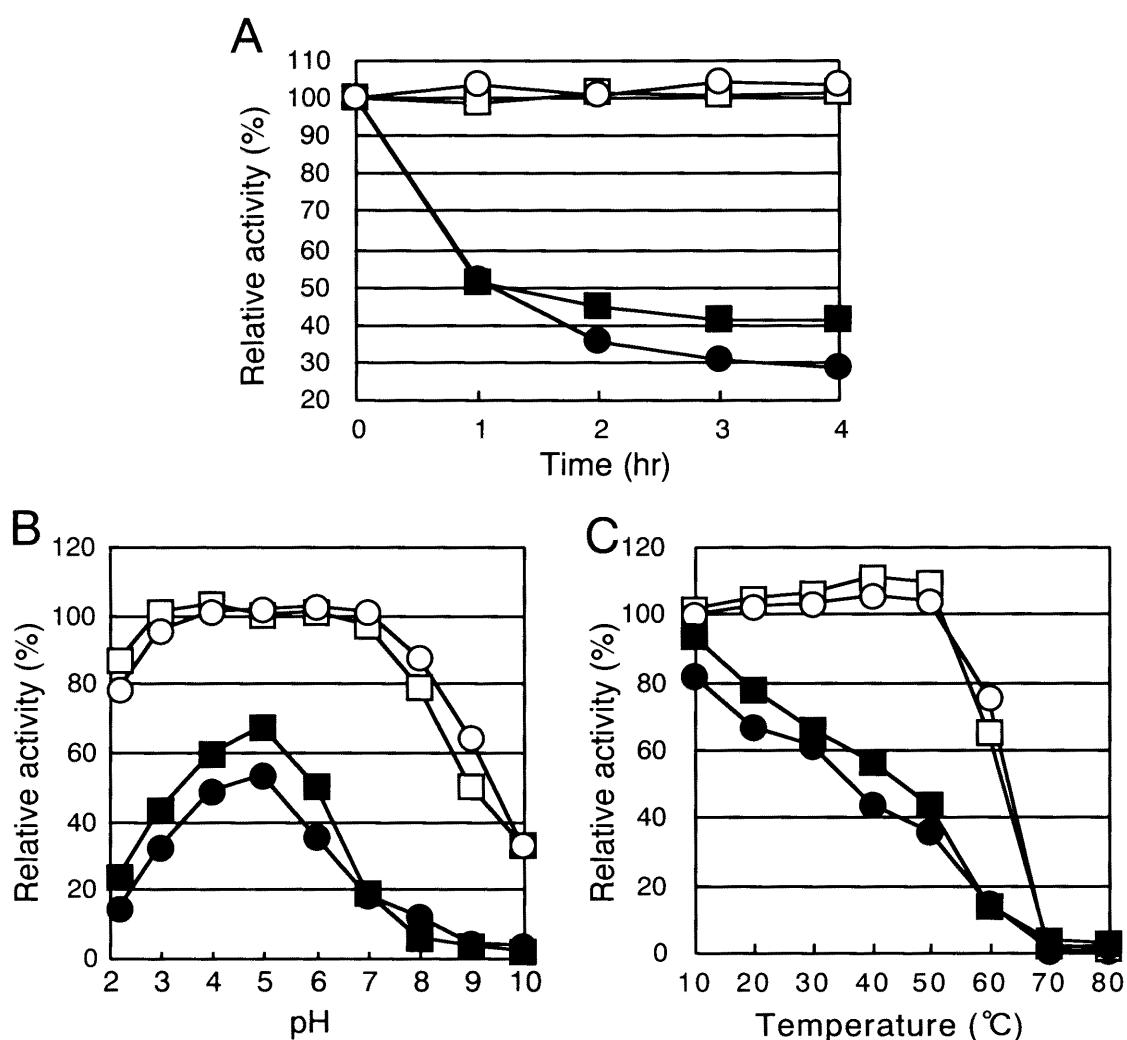


Figure 3-5. The effect of the purified ESP on the stability of the purified extracellular β -glucosidases. (A) The stabilization of the purified extracellular β -glucosidases by the purified ESP. The purified ESP (100 μ g/ml) was added or not to the purified β -glucosidase EX-1 and EX-2 (60 mU/ml) and incubate at 37°C, pH 5.0. (B) Effect of the purified ESP on the pH stability of the purified extracellular β -glucosidases. Purified ESP (100 μ g/ml) was added to each of the enzymes and incubated for 1hr at each pH (at 37°C). (C) Effect of the purified ESP on the temperature stability of the purified extracellular β -glucosidases. Purified ESP (100 μ g/ml) was added to each of the enzymes and incubated for 1hr at each temperature (at pH 5.0). The β -glucosidase activity was measured using PNPG as a substrate. Symbols; ■, β -glucosidase EX-1; ●, β -glucosidase EX-2; □, β -glucosidase EX-1 with the purified ESP; ○, β -glucosidase EX-1 with the purified ESP.

Table 3-2. Effect of monosaccharides on the stability of the extracellular β -glucosidases.

Sugars	Relative activity (%)	
	EX-1	EX-2
Galactose	47.1	28.8
Mannose	43.8	27.0
Glucose	50.4	31.3
Cellobiose	42.9	31.7
Laminaribiose	38.5	30.6
Laminaritetraose	41.3	25.4
α -1,2-mannoside	41.5	30.2
α -1,3-mannoside	40.5	31.4
α -1,4-mannoside	38.1	31.1
α -1,6-mannoside	40.0	28.9
Yeast mannan	99.4	100.2
Laminarin	102.5	100.6
Soluble starch	40.1	28.3
ESP	100.3	104.6
Nome	43.5	28.6

Each saccharide (100 μ g/ml) was added to each of the enzymes and incubated for 3 hr at 37°C and pH 5.0. The relative activity (%) was calculated against the β -glucosidase activity before the incubation.

(2) 精製 β -グルコシダーゼの吸着阻害活性

各精製 β -グルコシダーゼ (EX-1、EX-2) に精製したESPを加えて、 β -グルコシダーゼの細胞壁多糖画分への吸着について検討を行った。その結果、ESPを加えなかつたものでは、ほとんどの活性が細胞壁多糖画分に吸着したのに対し、ESPを加えたものでは、逆に80%以上の活性が未吸着となった (Figure 3-6 (A))。さらに、あらかじめ精製 β -グルコシダーゼを細胞壁多糖画分に吸着させておき、ESPによる溶出実験を行ったところ、ESPを加えなかつたものでは、ほとんどすべての活性が細胞壁多糖画分に検出されたのに対し、ESPを加えたものでは、80%以上の活性が溶出画分に見られた (Figure 3-6 (B))。

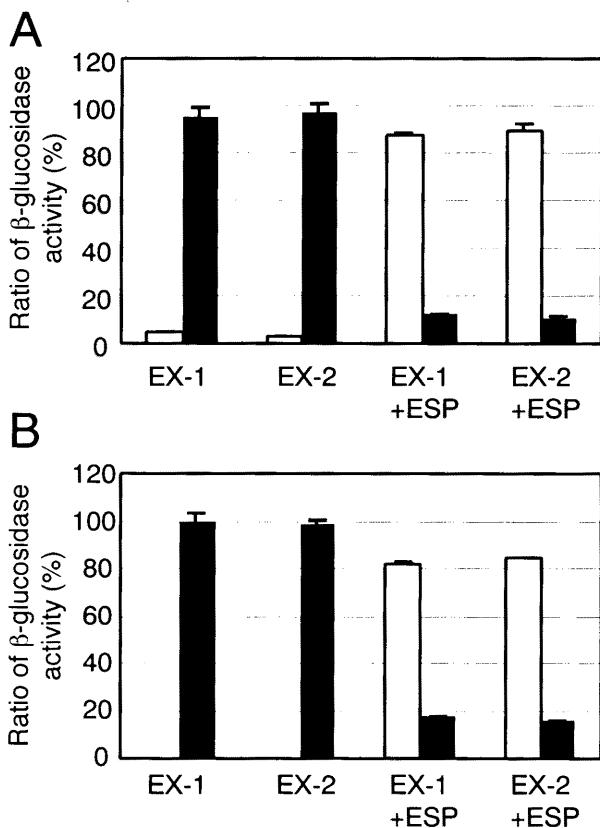


Figure 3-6. (A) The purified ESP inhibited the adsorption of the purified EX β -glucosidases to the cell wall fraction derived from *A. kawachii*. The purified ESP (1 mg/ml) was added to the purified β -glucosidase EX-1 and EX-2 (60 mU/ml) then the cell wall fraction (1 mg/ml) was added to the mixture. The experiment was performed as described in figure 3-1B. Symbols; □, β -glucosidase activity of supernatant; ■, β -glucosidase activity of precipitate. (B) Extraction of EX β -glucosidases from the cell wall fraction of *A. kawachii*. The cell wall fraction (1 mg/ml) of *A. kawachii* was added to purified β -glucosidase EX-1 and EX-2 (60 mU/ml, 1 ml) then incubated at 4°C for 30 min after mixing well. The mixture was centrifuged at 15,000 rpm for 5 min and supernatant was removed. Purified ESP solution (1 mg/ml in 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)) or 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) was added to the precipitate and incubated at 4°C for 30 min after mixed well. The mixture was further centrifuged at 15,000 rpm for 5 min. The β -glucosidase activity of the extract (□) and that of residue (■) was measured using PNPG as a substrate and was indicated by ratio (%). A 20mM sodium acetate (pH 5.0) buffer was used as a negative control.

(3) ESPと精製 β -グルコシダーゼの相互作用

ESPと β -グルコシダーゼが直接相互作用しているかどうか検討を行うために、まずESPのビオチン化を行った。ビオチン化は、メタ過ヨウ素酸によりESPに含まれる糖を酸化し、その後ビオチンヒドラジドを作用させることにより行った。ESPをビオチン化後、過剰の試薬をゲル濾過により取り除き、さらにビオチン化ESPの β -グルコシダーゼの安定化活性および吸着阻害活性を確認した後に相互作用の解析を行った。相互作用の検出はESP

に結合しているビオチンをタグとしてECLによる化学発光によりおこなった。その結果、ESPを添加したときにのみシグナルが検出され、シグナルの強度は、添加したESPの量に従って増加した (Figure 3-7)。また、精製 β -グルコシダーゼEX-1にESPを作用させたときの方が、EX-2に作用させたときより若干シグナル強度が増加する傾向にあった。

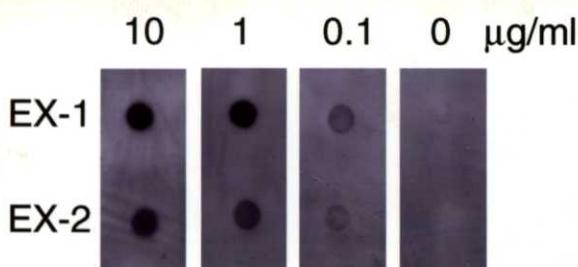


Figure 3-7. The purified ESP bound to purified EX β -glucosidases. The purified β -glucosidase EX-1 and EX-2 (1.0 μ g) were blotted onto PVDF membrane. The membrane was hybridized with biotin-ESP (0, 1, 10, 100 μ g/ml) and detected using the ECL glycoprotein detection system.

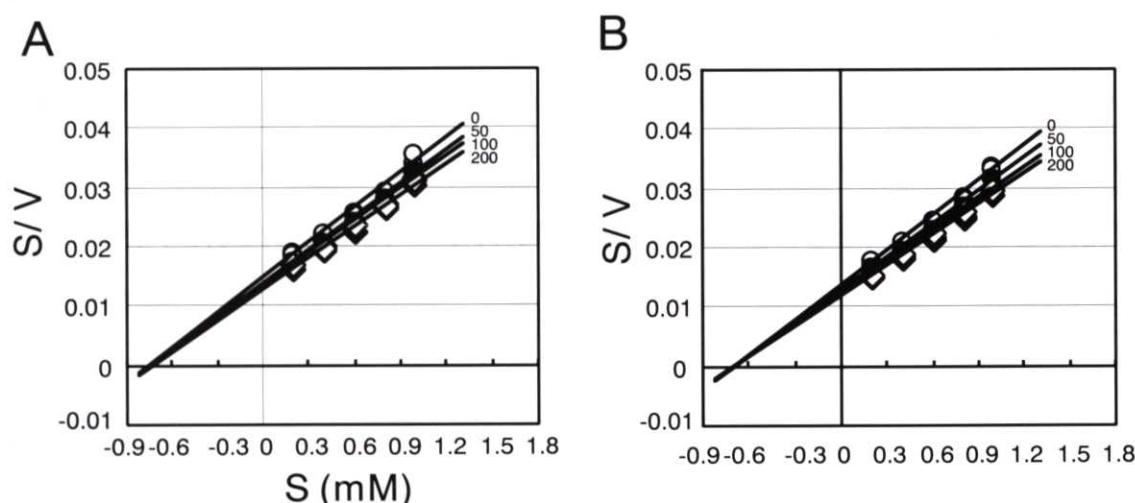


Figure 3-8. Hanes-Woolf plot for the purified extracellular β -glucosidases against PNPG. The purified ESP (\circ , 0; \bullet , 50; \diamond , 100; \blacklozenge , 200 μ g/ml) was added or not added to the purified β -glucosidase EX-1(A) and EX-2(B). Numbers in graphs indicate the concentration of ESP (μ g/ml).

(4) ESPが精製 β -グルコシダーゼの酵素化学的性質に与える影響

各濃度のESPを各精製 β -グルコシダーゼ (EX-1, EX-2) の反応系に添加し、酵素反応へのESPの影響について検討を行った。酵素活性の測定は、酵素の安定性の影響が出ない範囲、つまり5分間の反応時間で行った。得られた結果をHanes-Woolfのプロットによりグラフ化し、漸近線を記入したものをFigure 3-8に示した。その結果、いずれのESP濃度においても、両精製酵素の K_m 値には大きな影響は見られなかった。しかしながら、ESPの

濃度が増加するに従って、 V_{max} 値は増加しており、ESPの添加により各酵素が活性化されていることが明らかとなった。

第4項 要約

- (1) ESPの添加により精製 β -グルコシダーゼ (EX-1、EX-2) はいずれも安定化された。pH安定性については、pH 3.0～7.0の範囲、温度安定性については、50℃以下の温度で安定となった。
- (2) グルコースやマルトースなどの单糖、Laminaribioseや α -1,2-maltosideなどのオリゴ糖、可溶性デンプンでは精製 β -グルコシダーゼ (EX-1、EX-2) は安定化されなかつた。しかし、Yeast mannanやLaminarinではこれらの精製酵素は安定化された。
- (3) ESPにより精製 β -グルコシダーゼ (EX-1、EX-2) の細胞壁吸着能は阻害された。また、あらかじめ精製酵素 (EX-1、EX-2) を細胞壁に吸着させたものに対し、ESPを作用させたところ、約80%の活性が溶出された。
- (4) ビオチン化ESPを用い、ESPと精製 β -グルコシダーゼ (EX-1、EX-2) の相互作用について検討を行ったところ、いずれの精製酵素においてもビオチン化ESPとの相互作用が見られた。

第5項 考察

精製ESPの添加により、各遊離型 β -グルコシダーゼの精製酵素は、pH 3.0～7.0の範囲、50℃以下の温度で安定となった。これまでに、白麹菌では、耐酸性 α -アミラーゼや、キシラナーゼCなどの耐酸性酵素が精製され、その酵素の性質と共に、遺伝子の構造について検討されている。それらのcDNAを酵母で発現させ、組換えタンパク質の性質について検討を行った結果から、遺伝子によりコードされているタンパク質自身が、耐酸性を有しているものと考えられている^{22, 23)}。特に、キシラナーゼCについては、3次元構造が明らかとなっており、より詳細に検討されている。キシラナーゼCは、その立体表面上に位置した多くの酸性残基により耐酸性となっていると考えられており、その構造は”Ser/ Thr surface”と呼ばれている。これに対して、 β -グルコシダーゼでは、精製酵素自身は不安定であるが、ESPあるいは細胞壁多糖画分により安定化される。このことから、白麹菌

は、酵素の構造遺伝子の分子進化だけでなく、ESPを利用することでも耐酸性を獲得してきたのではないかと考えられる。

ビオチン化ESPの結果から、ESPは直接精製酵素と相互作用することが明らかとなつた。さらに、酵素活性に対する影響について検討を行ったところ、酵素の活性を阻害せず、その K_m 値には大きな変化を与えたかった。以上のことから、ESPは酵素の活性中心以外の部位に結合し、酵素を安定化しているのではないかと考えられる。 β -グルコシダーゼEX-1は、 β -グルコシダーゼEX-2に比べて、ESPに対する特異性が高い可能性が示唆されている(Figure 3-7)。第1章および第2章の結果から、EX-1とEX-2では、N-結合型糖鎖の修飾量が異なるのみであり、コアのペプチド鎖には違いがないものと考えられる。このことから、各タンパク質のN-結合型糖鎖もESPとのアフィニティーに関与していると予想される。しかしながら、第2章において、*T. reesei*のBgl1で欠損が見られる部位が白麹菌 β -グルコシダーゼの吸着能に関与している可能性が示唆されている。これらのことから、ESPあるいは可溶性多糖画分と β -グルコシダーゼとの相互作用、およびそのアフィニティーには、N-結合型糖鎖とコアタンパク部分の両方が関与している事が推察される。

单糖や、低分子のオリゴ糖は、精製 β -グルコシダーゼEX-1、EX-2を安定化しなかつた。また、第1章に示したとおり、グルコース、マンノース、N-アセチルグルコサミンは、精製 β -グルコシダーゼの細胞壁多糖画分吸着能を阻害しなかつた。これらのことから、ESP中のポリメリックな構造が、酵素の安定化および相互作用に重要であると考えられる。Rathらにより、*T. reesei*の β -グルコシダーゼおよび、N-アセチルグルコサミニダーゼを活性化する細胞壁ヘテログルカンが単離され、コア部分の構造は β -1,6-mannanと決定されている^{93, 96)}。白麹菌が生産するESPも精製 β -グルコシダーゼEX-1、EX-2を活性化する機能があること(Figure 3-8)、さらに、ConAカラムの結果から、ESPも β -1,6-mannanを有している可能性が示唆されており、少なくとも酵素の活性化に関しては、*T. reesei*のヘテログリカンと同様の作用機作によるものではないかと考えられる。また、精製 β -グルコシダーゼは、 β -1,6-mannanを含んでいるYeast mannanによっても安定化されたことから、 β -1,6-mannan構造は、酵素の活性化だけでなく、安定化についても重要な役割を果たしているのではないかと推定される。しかし、主に β -1,6-glucan、 β -1,3-glucanからなるlaminarinが酵素を安定化するなど、mannan以外の糖鎖によっても

安定化されている可能性が示唆されている。また、laminarinと同じく、グルコースによって構成される可溶性デンプンでは安定化されないことが示されている。これらのことから、ESPによる β -グルコシダーゼの安定化機構について明らかにするには、構成糖の結合様式も含んだ高次構造についても考慮する必要があり、ESPの構造解析も含めたより詳細な研究が必要であるものと思われる。

また、ESPは精製 β -グルコシダーゼEX-1、EX-2の細胞壁多糖画分吸着を阻害するだけでなく、一度細胞壁多糖画分に吸着させた β -グルコシダーゼEX-1、EX-2を遊離させる活性を有していた。固体培養で遊離型の β -グルコシダーゼがより多く生産されることを考え合わせると、固体培養では、液体培養時に比較してより多くのESPが生産され、その結果、多くの β -グルコシダーゼが遊離型の酵素となっている可能性が示唆された。このようにESPは β -グルコシダーゼの局在性制御機構を明らかにする上でも重要であるものと思われる。

今回、明らかとなったように、白麹菌が生産するESPは白麹菌 β -グルコシダーゼの安定性や局在性に対して非常に重要な役割を果たしている。このような現象はこれまで知られておらず、麹菌酵素の研究を、ESPと言う観点から見直す必要があるのかもしれない。また、 β -グルコシダーゼだけでなく、ESPにより安定化される酵素が他にもあるのであれば、醸造産業だけでなく、酵素産業全体においても重要な意味を持つものとなる。次章では、これらの可能性について検討を行った。

第4章 ESPに影響を受ける他の白麹菌酵素

第1項 緒言

麹菌の酵素で、固体培養により多量に分泌されるが、液体培養では分泌されなくなるものが数多くあることについては、経験的によく知られている。固体培養と液体培養を比較した場合では、培地の浸透圧、栄養源の拡散速度、酸素の供給量、界面の存在、物理的障害など様々な点で異なり、麹菌の生理状態にはかなりの違いがあるものと思われる³⁷。

^{38,97,98}。実際に、麹菌を固体培養した場合には、気菌糸、基底菌糸の形成や胞子形成などの分化が見られるのに対し、液体培養を行った場合には、これらの分化は見られない⁹⁹。このように、液体培養と固体培養では、その遺伝子発現においても大きな隔たりがある事が予想されており、現在様々な研究が進められている。

白麹菌 (*A. kawachii*) *bglA*遺伝子の発現量は、液体培養、固体培養間で大きな違いはみられなかったが、その遺伝子産物の局在性は大きく影響を受けた。前章において、この局在性の変動には、白麹菌が生産する可溶性多糖 (ESP) が重要な役割を担っていることが明らかとなった。また、本ESPは、遊離型β-グルコシダーゼの安定性においても重要な役割を果たしていた。焼酎醸造においては、酸に対して酵素が安定であることが特に重要であり、この点から、他の酵素におけるESPの影響についても興味が持たれる。

また、ESPが関与するこのような現象はこれまでに知られておらず、固体培養における麹菌の生理を理解する上で、また、清酒や焼酎、味噌や醤油などの麹菌を利用した食品の品質を考える上でも興味が持たれる。そこで、ESPが影響を及ぼす他の麹菌酵素について検討することとした。

第2項 材料及び方法

(1) 供試菌株および培養方法

焼酎麹菌 (*Aspergillus kawachii* IFO4308) を用い、液体培養は小麦フスマ熱水抽出液、固体培養は小麦フスマを用い、第1章および第2章の方法に従って行った。菌体量に

については、麹菌量測定キット（キッコーマン）を用い測定した。ただし、小麦フスマ麹（固体培養）では麹菌の菌体量が多くなるため、測定に使用する小麦フスマ麹の量は、通常の1/10量とし、以下キットの方法に従い測定を行った。

(2) 酵素活性およびタンパク質量の測定

糖化力については、*p*-ニトロフェニル- α -D-マンノシドを基質とし、糖化力測定キット（キッコーマン）を用い測定をした。以降、糖化力とは同方法で測定した活性のことを使う。また、グルコアミラーゼ活性については、国税庁所定分析法³¹⁾に基づいて測定した。その他の酵素活性については、第1章1-2-(3)に示した β -グルコシダーゼ活性測定法の基質を、 α -グルコシダーゼについては*p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside、 α -ガラクトシダーゼについては*p*-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside、 β -ガラクトシダーゼについては、*p*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside、 β -マンノシダーゼについては*p*-nitrophenyl- β -D-mannosideにそれぞれ置き換えて行った。タンパク質含量は、Bovine serum albuminを標準物質とし、dye-binding assay (protein assay kit, Bio-Rad Co. Ltd.) により測定した。

(3) DEAEクロマトグラフィー

小麦フスマ麹（固体培養）から国税庁所定分析法³¹⁾に従い粗酵素液を調製した。20 mM酢酸緩衝液（pH 5.0）で平衡化したNAP-25 (Amarsham Pharmacia Biothech) を用いて脱塩を行った後、20 mM酢酸緩衝液（pH 5.0）により平衡化したTSK gel DEAE-5PWカラムに供した。同緩衝液で10分間溶出を行い、続いて、0~0.3 M NaClを含んだ20 mM酢酸緩衝液（pH 5.0）にて溶出を行った。溶出液は、280 nmの吸光度でモニターを行い、各フラクションの α -グルコシダーゼ活性、糖化力、グルコアミラーゼ活性を測定した。

(4) 遊離型 α -グルコシダーゼの精製

精製の全工程は4℃で行った。液体クロマトグラフィーはHPLCを用い行い、溶出液のタンパク含量は、280nmの吸光度でモニターした。また、酵素の精製は、 α -グルコシダ

ーゼ活性、および糖化力の両方の活性を指標とし行った。まず、小麦フスマ麹（100 g）から国税庁所定分析法に従い粗酵素液を調製し、第1章の β -グルコシダーゼの精製と同様の硫安沈殿を行った。回収した沈殿は、2 M 硫安を含んだ20 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）に溶解し、以下のステップにより α -グルコシダーゼを精製した。

ステップ1：2 M 硫安を含む20 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）で平衡化した疎水カラム（TSK gel Phenyl-5PW: Tosoh Co. Ltd.）に供し、同緩衝液で10分間溶出した後、2.0~0 M 硫安のgradientにより溶出を行った。各溶出画分の糖化力および α -グルコシダーゼ活性を測定し、活性のあった画分を、ULTRAFREE-15 Biomax-10K（Millipore）を用い20 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）により脱塩、濃縮を行い次のステップに供した。

ステップ2：先のステップで得られた活性画分を、20mM酢酸緩衝液（pH5.0）で平衡化した陰イオン交換カラム（TSKgel DEAE-5PW: Tosoh Co. Ltd.）に供し、同緩衝液で10分間溶出した後、0~0.3 M NaClによるgradientにより溶出を行った。活性のあった画分を回収し、ULTRAFREE-15 Biomax-10K（Millipore）を用い濃縮を行った。

ステップ3：先のステップの活性区分を、0.2M NaClを含む20mM酢酸緩衝液（pH 5.0）により平衡化したゲル濾過（TSKgel G3000SW : Tosoh Co. Ltd.）に供した。カラムからの溶出には同緩衝液を用いた。

(5) 電気泳動および逆相クロマトグラフィー

SDS-PAGEおよびIEFは第1章の方法により行った。逆相クロマトグラフィーは、HPLCに連結した μ Bondasphere 5 μ C4-300Å（ウォーターズ）を用い、0.05%トリフルオロ酢酸を含む25~75%アセトニトリル溶液により溶出を行った。溶出液は、210nmの吸光によりモニターを行った。

(6) 各ペプチド断片のN-末端アミノ酸解析

逆相クロマトグラフィーにより得られた二つのピークを回収し、それぞれのペプチド（10 μ g）について、Perkin Elmer社の Procise Model 491を用いN-末端アミノ酸配列を解析した。

(7) 精製 α -グルコシダーゼの酵素化学的諸性質

基質特異性については、*p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside、*p*-nitrophenyl- α -D-maltoside、methyl- α -glucoside、maltose、maltotriose、maltotetraose、maltopentaose、maotoheptaose、nigerose、kojibiose、isomaltoseを基質として用いた。反応は、50mM酢酸緩衝液中で37°C、5分間行い、1/4量の1N NaOHを添加することにより反応を停止した。反応の結果、生じたグルコースをCarbopac PA1カラム（Dionex社）を連結したHPLC（Dionex社model DX-500）により第1章の方法で測定し、酵素活性を計算した。ただし、カラムからの溶出は、100 mM NaOHで10分間溶出した後、0～90 mM 酢酸ナトリウムのgradientにより溶出を行った。

(8) 精製 α -グルコシダーゼの安定性

精製酵素のpH安定性については、精製 α -グルコシダーゼに100 μ g/ mlとなるようにESPを加え、第1章に示した精製 β -グルコシダーゼの安定性と同様の方法により、pH2.2～10の範囲で行った。また、温度安定性についても、100 μ g/mlになるようにESPを加え、第1章に示した方法に従って行った。 α -グルコシダーゼ活性は、各pHの酵素溶液に1 M酢酸緩衝液（pH 5.0）を加え、pH 5.0に戻した後に糖化力測定キット（キッコーマン）により測定を行った。

(9) 精製 α -グルコシダーゼの細胞壁多糖画分への吸着

精製 α -グルコシダーゼの細胞壁多糖成分への吸着およびESPによる吸着阻害は、第3章と同様に、各遊離型の精製 α -グルコシダーゼ（60 mU/ ml終濃度）に1 mg/ mlとなるようにESPを加え行った。精製 α -グルコシダーゼの細胞壁多糖成分からの可溶化についても第3章と同様に行った。すなわち、精製 α -グルコシダーゼを、細胞壁多糖成分に吸着させ、その後、1 mg/ ml ESPを含む20 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）にて処理し、抽出画分および残渣の α -グルコシダーゼ活性を測定した。 α -グルコシダーゼ活性は、糖化力測定キット（キッコーマン）により糖化力として示した。

(1) 培養条件により局在性に影響を受ける白麹菌酵素

白麹菌 (*A. kawachii* IFO4308) を小麦フスマあるいは小麦フスマ熱水抽出液を用い、30°C、48時間、固体培養および液体培養を行い、糖化力（糖化力測定キット：キッコーマン）、 α -グルコシダーゼ活性、 α -ガラクトシダーゼ活性、 β -ガラクトシダーゼ活性、 β -マンノシダーゼ活性について、遊離型および結合型の酵素活性を測定した。その結果、Table 4-1に示すように、測定を行ったすべての酵素活性において、固体培養では約80%の活性が遊離型、逆に液体培養では約80%の酵素活性が結合型となり、 β -グルコシダーゼと同様、培養条件により酵素活性の局在性が異なることが明らかとなった。特に、糖化力および α -グルコシダーゼ活性では、液体培養、固体培養間での総酵素活性量の差が少なかつた。そこで、これらの糖化力、 α -グルコシダーゼ活性を保持する酵素の精製について検討を行うこととした。

Table 4-1. 酵素活性の局在性に対する培養条件の影響

		活性 (mU/mg)			活性比 (%)		
		遊離型	結合型	合計	遊離型	結合型	合計
糖化力	液体培養	148	743	891	16.6	83.4	100
	固体培養	607	62	669	90.8	9.2	100
α -グルコシダーゼ	液体培養	2.8	10.0	12.8	21.7	78.3	100
	固体培養	8.1	1.8	9.9	81.4	18.6	100
α -ガラクトシダーゼ	液体培養	17.2	71.7	88.9	19.4	80.6	100
	固体培養	192.1	45.3	237.4	80.9	19.1	100
β -ガラクトシダーゼ	液体培養	3.3	7.2	10.5	31.6	68.4	100
	固体培養	57.8	6.3	64.1	90.2	9.8	100
β -マンノシダーゼ	液体培養	1.43	5.46	6.89	20.7	79.3	100
	固体培養	3.98	1.01	4.99	79.8	20.2	100

(2) DEAEクロマトグラフィーによる検討

酵素の精製を行うに当たって、まず、DEAEクロマトグラフィーにより、糖化力および α -グルコシダーゼの溶出プロファイルについて検討を行った。小麦フスマ麹から調製した遊離型粗酵素液を脱塩後、20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で平衡化したTSK gel DEAE-5PWに供し、0~0.3 M NaClを含む20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で溶出を行った。各フラ

クションの糖化力および α -グルコシダーゼ活性について検討を行ったところ、糖化力および α -グルコシダーゼ活性の主なピークは、共にFraction 35~37の位置に観察され、完全に一致していた (Figure 4-1)。これまでの黄麹菌 (*A. oryzae*) α -グルコシダーゼの研究から、糖化力は主にグルコアミラーゼにより保持されている事が報告されているので¹⁰⁰⁾、各フラクションのグルコアミラーゼ活性を所定法により測定した。その結果、グルコアミラーゼ活性の主なピークはFraction 50, 51の位置に観察され、糖化力、 α -グルコシダーゼ活性の位置とは全く異なっていた (Figure 4-1)。以上のことから、白麹菌における主な糖化力は、黄麹菌の場合とは異なり、 α -グルコシダーゼにより保持されているものと考え、以下、精製を行うこととした。

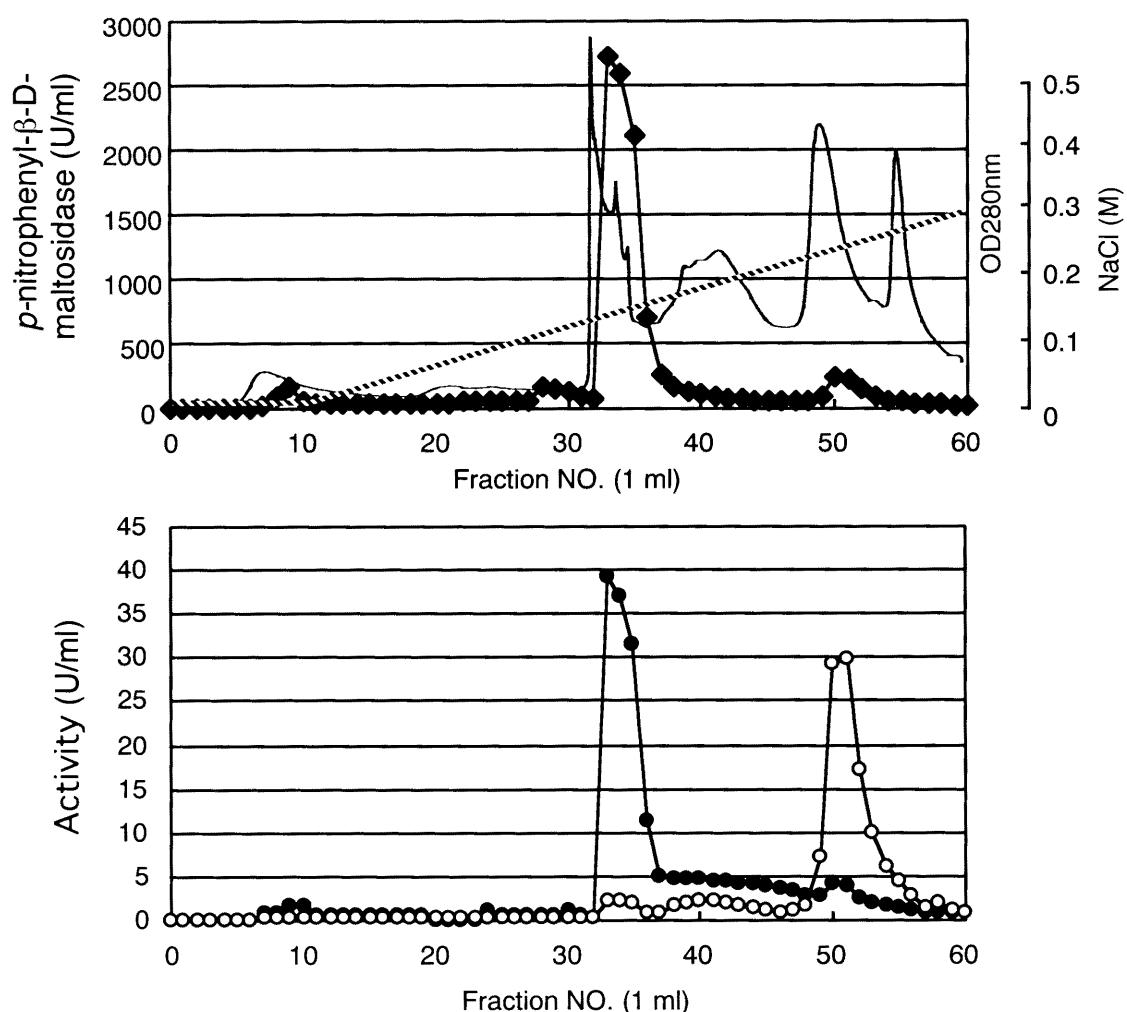


Figure 4-1. Profile of anion exchange chromatography of crude extracellular enzyme. The crude enzyme from rice *koji* was applied onto the TSK-gel DEAE column (7.5 mm I.D. \times 75 mm). ◆, ● and ○ indicate enzyme activities using *p*-nitrophenyl- β -D-maltoside, *p*-nitrophenyl- α -D-glucoside and soluble starch as substrates. Black line and dotted line indicate the absorbance at 280 nm and the NaCl concentration respectively.

(3) 白麹菌 α -グルコシダーゼの精製

小麦フスマ麹 (100g) から遊離型の粗酵素を調製し、糖化力および α -グルコシダーゼの両活性を指標として精製を行った。まず、調製した粗酵素を 80 % 飽和硫酸アンモニウムにより沈殿を行い、得られた沈殿を 2 M 硫酸アンモニウムを含む 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) にて懸濁後、疎水クロマトグラフィーに供した。カラムからの溶出は、2.0~0 M 硫酸アンモニウムによる gradient により行い、Figure 4-2 に示したクロマトグラムが得られた。主な糖化力および α -グルコシダーゼ活性のピークは、Fraction 39~42 の位置に見られ、完全に一致した。この活性画分を回収し、20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) にて脱塩、濃縮後、DEAE陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。カラムからの溶出は、0~0.3 M NaCl の gradient により行った。先の実験でも明らかなように、DEAEクロマトグラフィーによっても、糖化力および α -グルコシダーゼ活性のピークは、完全に一致した。活性の見られた Fraction 43~45 を回収、濃縮し、さらに、TSKgel G3000SW を用いたゲルfiltration に供した。カラムの平衡化及び溶出には 0.2 M NaCl を含む 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を用いた。本クロマトグラフィーにおいても、糖化力、 α -グルコシダーゼ活性のピークは完全に一致し、Fraction 21、22 の位置に検出された。この画分を回収後、20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) にて脱塩、濃縮を行い精製 α -グルコシダーゼとした。精製過程での糖化力および α -グルコシダーゼ活性の収率、活性の変化をそれぞれ精製表 (Table 4-2) にまとめた。100g のふすま麹から、最終的に約 2 mg の α -グルコシダーゼを精製することが出来た。また、白麹菌の精製 α -グルコシダーゼ

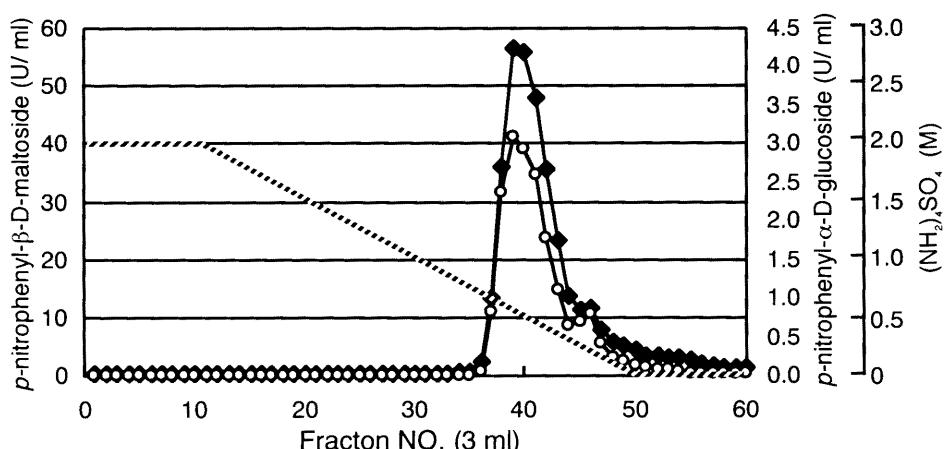


Figure 4-2. Profile of hydrophobic chromatography of crude extracellular enzyme. The crude enzyme from rice *koji* was applied onto the TSKgel Phenyl-5PW column (20 mm I.D. x 75 mm). ◆ and ○ indicates enzyme activities using p -nitrophenyl- β -D-maltoside and p -nitrophenyl- α -D-glucoside as substrates. The dotted line indicate the $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration.

Table 4-2. Purification of α -glucosidases from *A. kawachii*

	Total protein (mg)	Total activity (U)	specific activity (U/mg protein)	Purification -fold	Recovery (%)
<i>p</i> -nitrophenyl- α -D-glucoside ^a					
(NH ₄) ₂ SO ₄	1100	78	0.07	1.0	100
Phenyl-5PW	120	30	0.25	3.5	38.5
DEAE-5PW	15	11	0.71	10.0	13.6
G3000SW	2.3	3	1.42	20.0	4.2
<i>p</i> -nitrophenyl- α -D-maltoside ^b					
(NH ₄) ₂ SO ₄	1100	5,900	5.36	1.0	100
Phenyl-5PW	120	2,022	16.85	3.2	34.3
DEAE-5PW	15	729	48.60	9.2	12.4
G3000SW	2.3	259	112.61	21.2	4.4

a Activity was measured against *p*-nitrophenyl- α -D-glucoside by standard method

b Activity was measured against *p*-nitrophenyl- α -D-maltoside by standard method

ーゼは、*p*-nitrophenyl- β -D-maltoseを基質とした場合、*p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranosideを基質とした場合の約80倍の比活性を示した。

(4) 精製 α -グルコシダーゼの電気泳動および逆相クロマトグラフィー

まず、得られた精製 α -グルコシダーゼを、SDS-PAGE、およびIEFに供し、酵素の分子量、および等電点について検討を行った。その結果、SDS-PAGEでは、約120 kDaの位置に単一バンドが得られた (Figure 4-3 (A))。さらにIEFの結果も同様に、約pI 4.5の位置に単一バンドが得られた (Figure 4-3 (B))。続いて得られたタンパク質を μ Bondasphere 5 μ C4-300Åを用いた逆相クロマトグラフィーに供した結果をFigure 4-3 (C)に示す。*A. niger* の α -グルコシダーゼはP1、P2サブユニットからなる2量体で、これらのドメインは、SDS-PAGEでは分離せず、逆相クロマトグラフィーによってのみ分離することが報告されている^{101, 102}。これと同様に、白麹菌由来の精製 α -グルコシダーゼでも、大小、二つのピークが確認された。*A. niger*との類似性から、約24分のピークがP1サブユニット、約30分のピークがP2サブユニットと推定される。さらに、逆相クロマトグラフ

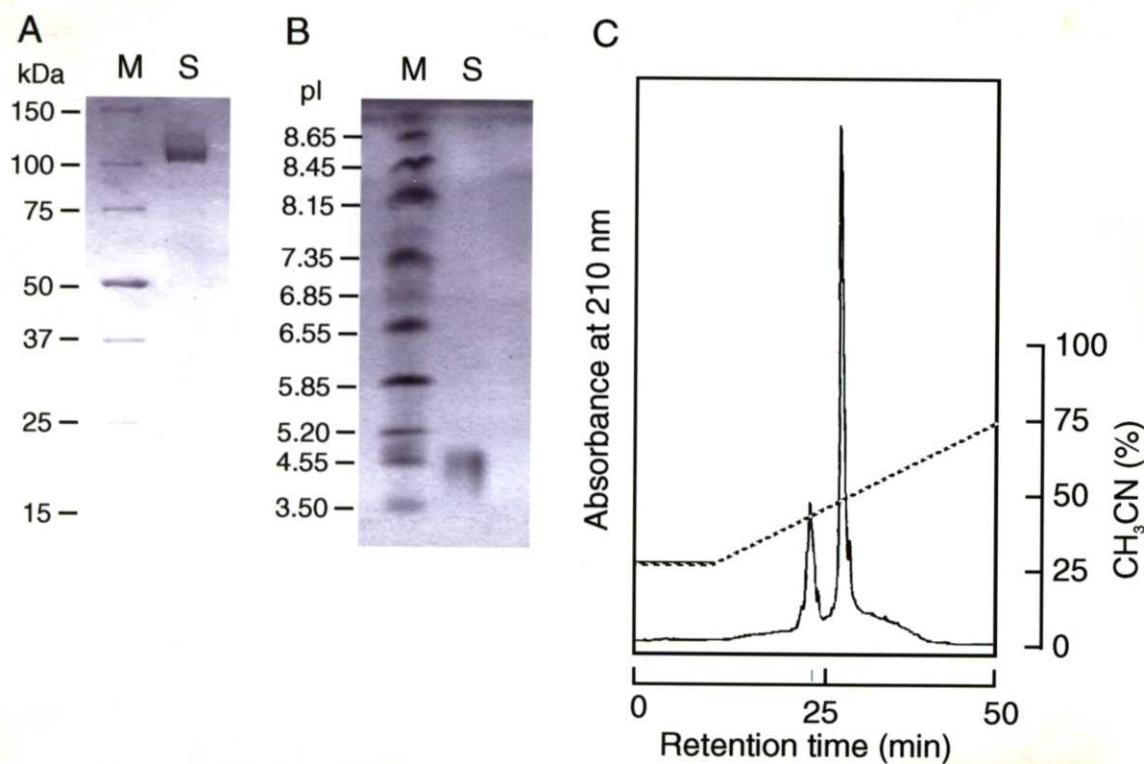


Figure 4-3. (A) SDS-PAGE of purified enzymes. (B) IEF of purified enzymes. Lane M and S indicate marker and sample respectively. (C) Reversephase chromatography of purified enzymes. Black and dotted line indicate absorbance at 210 nm and CH_3CN concentration respectively.

一で得られたこれらのピークを回収し、N-末端アミノ酸配列の解析を試みた。その結果、P2ドメインであると考えられるピークについては、明確なアミノ酸のピークが得られ、N-末端アミノ酸配列は、SQEYISLSHGVFLと決定することが出来た。しかしながら、P1ドメインと考えられるピークについては、明瞭なアミノ酸のピークが得られず解析が出来なかった。得られたアミノ酸配列を基に、SwissProtデータベースに照会したところ、*A. niger* の α -グルコシダーゼ^{103, 104)}、および黄麹菌由来の α -グルコシダーゼ¹⁰⁵⁾と高い相関を示した。以上のことから、白麹菌 α -グルコシダーゼの精製酵素が得られたと結論した。

(5) 白麹菌 α -グルコシダーゼの基質特異性

精製の過程で、白麹菌 α -グルコシダーゼは糖化力の基質である *p*-nitrophenyl- β -D-maltosideに対し非常に高い特異性を示した。このことから、黄麹菌 α -グルコシダーゼに比べて、白麹菌 α -グルコシダーゼは、マルトースなどのオリゴ糖に対しても非常に高い特異性を持っているのではないかと考えられた。そこで、様々なオリゴ糖に対する基質特異性について検討を行った (Table 4-3)。その結果、予想されたとおり maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaoseなどのオリゴ糖に対して非常に高い活性を示した。また、isomaltose (α -1,3-) や kojibiose (α -1,6-) などの、 α -1,4-以外の結合を持った糖に対しても活性を有していた。

Table 4-3. Relative activity of the purified α -glucosidases against different substrates.

Substrate	<i>A. kawachii</i> Specific activity (U/mg protein)	Relative activity	Km (mM)	<i>A. oryzae</i> ^a Relative activity
methyl- α -glucoside	0.1	1		1
maltose	91.7	1068	0.77	157
maltotriose	95.3	1110	112	
maltotetraose	85.2	993		
maltopentaose	54.9	639		
maltohexaose	29.7	346		
maltoheptaose	20.0	233		
nigerose	7.2	84		
kojibiose	12.6	147		10
isomaltose	17.1	200		
phenyl- α -D-glucoside	1.4	16		
phenyl- α -D-maltoside	34.2	398		

All substrate were tested at a concentration of 1 mM in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)

^aIwano *et al.* (1977)¹⁰⁶⁾

(6) 精製 α -グルコシダーゼのESPによる安定化

まず精製 α -グルコシダーゼのpH安定性について、pH1.0～10の範囲で検討を行った。

その結果、精製 α -グルコシダーゼは不安定で、pH 2.0～9.0の範囲で、活性は約60%まで低下しており、pH 1.0およびpH 10ではほとんど検出されなかった (Figure 4-4 (A))。

しかしながら、ESP (100 μ g/ml) を加えると、pH 2.0～8.0の範囲でほぼ100%の活性を保っており、pH1.0では、活性は検出されなくなったものの、pH 10では、80%以上の活性が残存していた。また、ESPの代わりに細胞壁多糖画分を添加したものでは、pH 6.0～8.0と、特にアルカリ側で安定となっていた (Figure 4-4 (A))。

一方、温度安定性について検討したところ、ESPを添加していないものでは、酵素の残存活性は温度の上昇と共に次第に減少してゆき、60°C以上で急激に失活するという現象が見られた (Figure 4-4 (B))。これにESPを100 μ g/mlとなるよう加えたところ、50°Cまでの範囲でほぼ100%の活性を保っており、60°Cでも90%以上の活性を保っていた。また、ESPの代わりに細胞壁多糖画分を加えたものでも、50°Cまでの範囲で90%以上の活性を保っていた (Figure 4-4 (B))。

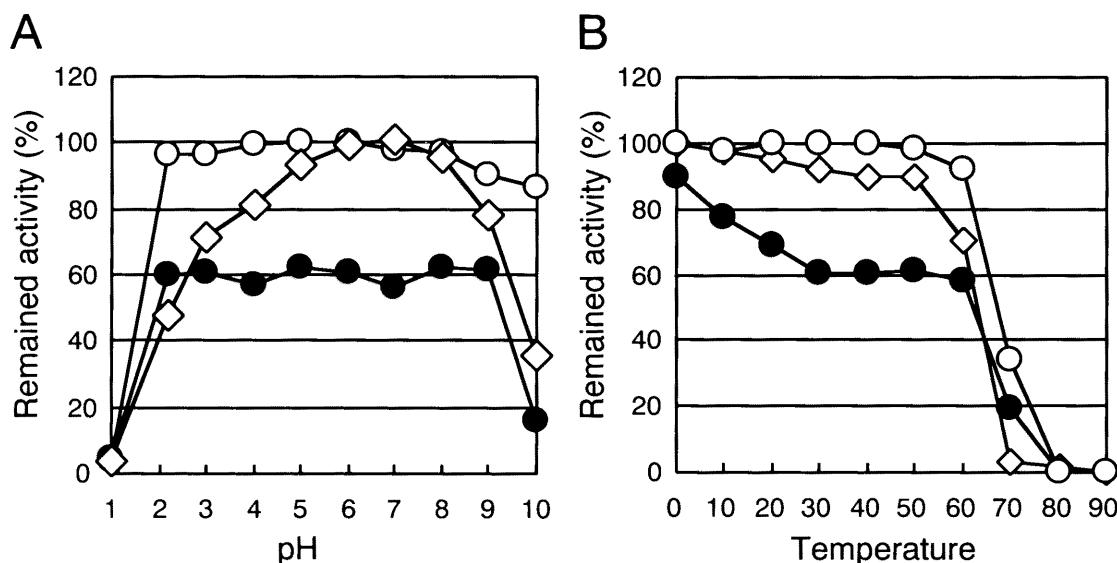


Figure 4-4. The effect of the purified ESP on pH stability (A) and thermo-stability (B) of the purified extracellular α -glucosidase. The purified α -glucosidase was incubated for 15 min at each pH (at 37 °C) or each temperature (at pH 5.0) with the addition of 100 μ g/ml purified ESP (○), cell wall fraction (◇) or nothing (●). The α -glucosidase activity was measured using *p*-nitrophenyl- β -D-maltoside as a substrate.

(7) 精製 α -グルコシダーゼの細胞壁多糖画分への吸着

精製 α -グルコシダーゼの細胞壁多糖成分への吸着について検討を行ったところ、 β -グルコシダーゼと同様、吸着活性を有することが明らかとなった (Figure 4-5 (A))。そこで、精製 α -グルコシダーゼにESP (1mg / ml) を添加して、吸着阻害について検討したところ、 β -グルコシダーゼ同様、ほとんどの活性が未吸着画分に検出された (Figure 4-5 (A))。そこで、ESPによる溶出についても検討を行った。あらかじめ精製 α -グルコシダーゼを細胞壁多糖画分に吸着させておき、ESPによる溶出を行ったところ、これも β -グルコシダーゼ同様に、90%以上の活性がESPにより溶出されることが明らかとなった (Figure 4-5 (B))。ESPを加えなかったものでは、多くの活性が細胞壁多糖画分に吸着したままであった。

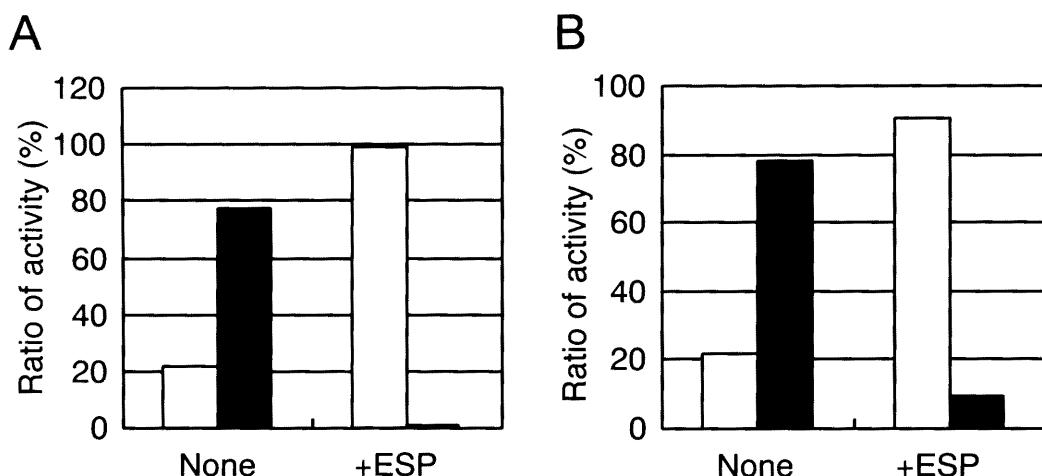


Figure 4-5. (A) The purified ESP inhibited the adsorption of the purified α -glucosidase to the cell wall fraction derived from *A. kawachii*. Open bar and closed bar indicate α -glucosidase activity of the supernatant and precipitate respectively. (B) Extraction of purified α -glucosidase from the cell wall fraction of *A. kawachii*. Open bar and closed bar indicate α -glucosidase activity of the extract and residue. All experiments were performed as described in Figure 3-6.

第4項 要約

(1) 培養条件により局在性の異なる白麹菌酵素について検討を行ったところ、糖化力（糖化力測定キット）、 α -グルコシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -マンノシダーゼいずれの酵素活性においても、 β -グルコシダーゼ同様、固体培養では遊離型が、液体培養では結合型が多く生産された。

- (2) 遊離型粗酵素液から、疎水クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルfiltrationにより精製 α -グルコシダーゼを得た。精製酵素の分子量はSDS-PAGEにより約120 kDa、等電点は、約4.5であった。また、逆相クロマトグラフィーの結果から、*A. niger* の α -グルコシダーゼで報告されているとおり、本酵素はP1、P2 サブユニットからなる2量体であるものと思われた。
- (3) 精製 α -グルコシダーゼの基質特異性について検討を行ったところ、*A. oryzae* の α -glucosidaseとは異なり、maltose、maltriose、maltotetraose、maltopentaoseなどのオリゴ糖に対して、非常に高い基質特異性を示した。さらに、isomaltoseやkojibioseに対しても活性を有していた。
- (4) 精製 α -グルコシダーゼのpH安定性および、熱安定性について検討を行ったところ、精製酵素のみでは不安定であったが、ESPを添加したものではpH2.0～9.0、60°C以下の範囲で活性を保っていた。
- (5) 精製 α -グルコシダーゼは細胞壁多糖画分への吸着能を有していた。しかし、ESPの添加により、細胞壁多糖画分への吸着は阻害された。また、ESPは細胞壁多糖画分に吸着させた α -グルコシダーゼも遊離させる機能を有していた。

第5項 考察

白麹菌の主な β -グルコシダーゼは、*bglA*遺伝子によってコードされており、その転写産物であるBglAタンパク質の局在性および安定性にはESPが大きく関与している。このような現象は、麹菌酵素の性質および固体培養での麹菌の特性を考える上で重要である。また、 β -グルコシダーゼ以外にも、同様のメカニズムで局在性及び安定性が制御されているタンパク質が存在するかどうかについても興味が持たれる。そこで、 β -グルコシダーゼと同様、培養条件によって局在性に影響を受ける酵素活性について検索を行った。 β -グルコシダーゼと分子量及び作用機作が比較的類似したグリコシダーゼ類について検討をしたところ、測定したすべての酵素活性において、液体培養では遊離型が多く、固体培養では結合型が多く生産された。このことは、白麹菌 β -グルコシダーゼで見られた現象が、麹菌の酵素全体に幅広く見られる可能性を示唆している。

さらに検討を行うために、これらの酵素のうち α -グルコシダーゼの精製を行った。精製

の過程で、白麹菌の α -グルコシダーゼは、黄麹菌の α -グルコシダーゼと比較して¹⁰⁶⁾、マルトース、マルトトリオースなどの低分子のオリゴ糖に対して、非常に高い活性を有していることが強く示唆された。また、白麹菌と近縁の *A. niger* の α -グルコシダーゼについては、基質特異性が詳しく解析されており¹⁰¹⁾、白麹菌の α -グルコシダーゼとほぼ同様の傾向を示すことが明らかとなっている。しかしながら、*A. niger* の α -グルコシダーゼでは、マルトースに対する特異性が最も高いのに対し、白麹菌の α -グルコシダーゼでは、より長鎖のオリゴ糖に対し高い特異性を示す傾向が見られた。これは、白麹菌の α -グルコシダーゼが、より焼酎醸造に適合するために進化した結果であると考えられ、非常に興味深い。このような基質認識機構の違いについては、白麹菌 α -グルコシダーゼ遺伝子と、*A. niger* や *A. oryzae* の α -グルコシダーゼ遺伝子を比較検討することで、明らかになってくるものと思われる。

得られた精製 α -グルコシダーゼの安定性について検討を行ったところ、 β -グルコシダーゼと同様不安定であり、ESPの添加によって、pH2.0～9.0、60°C以下で安定化されることが明らかとなった。さらに、精製 α -グルコシダーゼの吸着能も β -グルコシダーゼと同様、ESPの添加により阻害され、一度細胞壁多糖画分に吸着した α -グルコシダーゼも、ESPにより可溶化されることが明らかとなった。以上のことから、ESPは α -グルコシダーゼの局在性についても重要な役割を果たしているものと考えられる。白麹菌の α -グルコシダーゼは、マルトース、マルトトリオースなどのオリゴ糖に高い基質特異性を示すことから、焼酎醸造では、原料の糖化においてより重要な役割を持っているものと思われる。このように、ESPは、発酵に重要だと考えられる他の麹菌酵素の局在性、安定性にも関与していることが明らかとなった。

今回、測定を行った全ての酵素活性において、その局在性は培養条件の影響を受ける。これは、ESPが β -グルコシダーゼや α -グルコシダーゼだけでなく、さらに多様な酵素群に対して影響を与える可能性を示唆している。このように、培養条件により局在性が変動する酵素活性すべてにおいて、ESPが何らかの関与をしていることが考えられる。しかし、*A. oryzae glaB* 遺伝子^{107, 108)} のように、固体培養で特異的に発現するものも知られていることから、今後は、固体培養で特異的に分泌生産される酵素について、タンパク質レベルだけでなく、遺伝子レベルも含めて検討を行ってゆく必要があるものと思われる。

また、今回精製をしたESPは、麹菌酵素だけでなく、他の生物由来の酵素も幅広く安定化する作用を持っている可能性も考えられる。白麹菌の β -グルコシダーゼ等に対するESPの作用機作がより明らかになってくれば、他の様々な酵素に対する作用についても予想可能になるものと思われる。これらのことを考えあわせると、今回見いだされた麹菌酵素のESPによる安定化という現象は、醸造産業だけでなく、酵素産業においても重要である事が予想される。今後は、ESPの詳細な構造について解明されるとともに、その作用機作についても明らかとなることが期待される。

総 括

白麹菌 (*Aspergillus kawachii*) は、黒麹菌 (*A. awamori*) とともに、甘諸焼酎、麦焼酎をはじめ様々な焼酎醸造に使用されている。白麹菌の β -グルコシダーゼは、甘諸焼酎の特徴香の生成におけるキーエンザイムであることから、今回、白麹菌の β -グルコシダーゼ、およびその遺伝子について研究を行った。その結果、白麹菌が生産する β -グルコシダーゼ活性の90%以上が $bglA$ 遺伝子に由来するもので、特に固体培養においては、約95%以上の β -グルコシダーゼ活性が本遺伝子に由來した。したがって、白麹菌の $bglA$ 遺伝子の発現を制御することで、十分に β -グルコシダーゼ活性を制御できることが明らかとなった。

さらに、 $bglA$ 遺伝子産物には、培地中に遊離の状態で存在するものが2種類 (EX-1、EX-2) と、菌体細胞壁中に結合した状態で存在するものが1種類 (CB-1) 存在することが明らかになった。これらの酵素の分子量は、EX-1, 145 kDa; EX-2, 130 kDa; CB-1, 120 kDaと異なっており、これは各酵素のN-結合型糖鎖の修飾量が異なっていることに起因していた。また、固体培養では遊離型が（約80%）、液体培養では結合型が（約80%）より多く生産され、固体培養、液体培養間で、BglAタンパク質の局在性が制御されていることが明らかとなった。このような現象は、これまでにあまり例がなく、その制御機構に興味が持たれる。

結合型の精製酵素 (β -グルコシダーゼCB-1) だけでなく、遊離型の精製酵素 (β -グルコシダーゼEX-1、EX-2) も、白麹菌の細胞壁多糖成分に吸着した。また、 $bglA$ cDNAを酵母で発現させたところ、ほとんどの活性がペリプラズム画分に存在した。このことから、液体培養時に酵素活性が細胞壁画分に局在するのは、BglAタンパク質自身の細胞壁吸着活性によるものであると考えられた。一方、固体培養時には、ほとんどの $bglA$ 遺伝子産物は細胞壁を離れ遊離型となる。白麹菌は、固体培養時に可溶性多糖 (ESP) を生産しており、ESPは遊離型 β -グルコシダーゼの細胞壁吸着活性を阻害するだけでなく、細胞壁に吸着した酵素を可溶化する機能を持つ。また、ESPは、遊離型 β -グルコシダーゼと直接相互作用する。このことから、BglAタンパク質は、固体培養を行った場合、ESPと結合することで、細胞壁画分にトラップされることなく、培地中に遊離の状態で存在するものと考えられる。

一般的に、白麹菌酵素の多くは耐酸性を保有している^{2, 22-25)}。このことから、これらの精製 β -グルコシダーゼの安定性についても検討を行ったところ、予想に反して非常に不安定であった。しかしながら、これらの精製酵素は、ESPや細胞壁多糖画分と相互作用し、安定化されることが明らかとなった。実際の培地中、あるいはもろみ中では、遊離型 β -グルコシダーゼ（EX-1、EX-2）はESPにより、また結合型 β -グルコシダーゼ（CB-1）は細胞壁多糖画分により安定化されているものと推定される。ESPにより各遊離型酵素は、pH 3.0～7.0、50°C以下の範囲で安定となり、細胞壁多糖画分により結合型酵素はpH 2.0～9.0、30°C以下の範囲で安定となることから、もろみの環境（pH 3.0～3.5、25～30°C）でも β -グルコシダーゼは十分安定である。

また、BglAタンパク質は、ESPおよび細胞壁多糖成分に共通に含まれる構造により安定化しているものと考えられる。ESPはマンノース（57.6%）、ガラクトース（22.3%）、グルコース（22.3%）により構成されていること、および、すべてのESPがConAカラムにトラップされることから、ESPはマンナンを中心としたヘテログリカンであることが明らかである。また、遊離型 β -グルコシダーゼは、Yeast mannanにより安定化された。Yeast mannanの多くは、酵母細胞壁中のマンノプロテイン由来であり、 α -1,6-、 α -1,2-、 α -1,3-結合をしたマンノースを主体としている¹⁰⁹⁾。さらに、Rathら⁹³⁾により、*Trichoderma reesei*の細胞壁を酵素処理して得られたヘテログリカンは α -1,6-mannanをコアとして持っており、このヘテログリカンは*T. reesei*の β -グルコシダーゼを活性化する事が報告されている^{93, 96)}。*T. reesei*のヘテログリカンでは、 β -グルコシダーゼの安定化についての報告はないが、これらの結果は、ESPおよび細胞壁多糖画分中のマンナン、特に α -1,6-mannanが酵素の安定化に重要である可能性を示唆している。しかしながら、LaminarinによってもBglAタンパク質は安定化されており、 β -1,6-glucanあるいは β -1,3-glucanが、これらの機能を保持している可能性も示されている。当研究室で、Yeast mannan、およびLaminarinの糖組成分析を行ったところ、Yeast mannanで、約0.5%のグルコースと4.7%のガラクトース、Laminarinで、約0.3%のマンノースと0.3%のガラクトースを含んでいた。ゆえに、Yeast mannan中のglucan、または、Laminarin中のmannanによりBglAタンパク質が安定化されている可能性を否定出来ない。また、ガラクトースを構成糖とした成分により安定化されている可能性も考えられる。以上のことか

ら、BglAタンパク質と相互作用し、安定化している糖鎖の構造を決定するには、より詳細な研究が必要であるものと考えられる。

細胞壁多糖画分とESPが類似の機能を示すこと、およびESPの糖組成を考え合わせると、ESPが麹菌の細胞壁由来である可能性が示唆される。このことを考慮に入れ、ESPの生成機構を考えると以下の3つの機構が考えられる。

- (1) ESPは麹菌の細胞壁とは直接関係なく、固体培養時特異的に生産される。
- (2) ESPは、固体培養特異的に生産される細胞壁溶解酵素により、細胞壁画分が分解され生じる。
- (3) ESPは細胞壁多糖画分の一部であり、液体培養時にはリジッドに細胞壁の一部として固定されるが、固体培養時には固定されない。

通常、液体培養では浸透圧が低く、細胞内の膨圧に耐えるために、麹菌の細胞壁は非常にリジッドである必要がある。一方、固体培養では、環境の浸透圧が高く、物質の拡散速度も遅く、また培地成分等の物理的サポートも得られるため、細胞壁はリジッドであるより、むしろルーズであるものと考えられる。また、第1章で示したとおり、細胞壁溶解酵素により調製した結合型粗酵素中の β -グルコシダーゼ活性は安定であり、細胞壁中で酵素を安定化している物質は可溶化出来ることが示されている。以上のことから、(2)または(3)の仮説が有力ではないかと考えられる。しかし、これらのことについて検証するためには、ESPの構造を厳密に決定するとともに、液体培養、固体培養時の細胞壁の構造自体についても検討する必要がある。以上のことから、BglAタンパク質の局在性の制御は、ただ単純にESPの生産量により行われているのではなく、細胞壁の構造全体が関与する、非常にダイナミックな制御である可能性も考えられる。

これまでに示してきたように、白麹菌が生産しているESPは、BglAタンパク質の安定性、および局在性に関与していた。さらに、第4章で示したように、白麹菌の α -グルコシダーゼもESPの影響を受けていた。白麹菌の α -グルコシダーゼは、黄麹菌のものに比べて、マルトースなどの低分子のオリゴ糖に対する比活性が非常に高い可能性が示されている。ゆえに、白麹菌の α -グルコシダーゼは、黄麹菌 α -グルコシダーゼで報告されている清酒中での働きに加えて^[10]、もろみの糖化、発酵に、より重要な酵素であると思われる(Table 4-2)。このように、ESPは β -グルコシダーゼだけでなく、焼酎の品質に関わる

白麹菌の分泌酵素全般に幅広く関与している可能性が示された。実際に、固体培養および液体培養により、局在性に影響を受ける酵素活性は数多く存在しており（Table 4-1）、ESPは様々な酵素の安定性および局在性に関与するものと思われる。

これまでに報告自体はほとんどないものの、現場レベルでは、固体培養では分泌がみられた酵素活性が、液体培養を行うと分泌されなくなる例が数多く知られている。これらの酵素の中には、 β -グルコシダーゼと同様に、液体培養ではタンパク質が細胞壁にトラップされ、液体培養では培地中に分泌されないものも含まれることが示唆される。これまで、ESPに関する現象は知られておらず、麹菌による固体培養の優位性を考える上では重要である。しかしながら、黄麹菌（*A. oryzae*）の $glaB$ で知られるように^{98, 107, 108)}、固体培養特異的に発現する酵素遺伝子があることが明らかになっており、液体培養で分泌がみられなくなる酵素では、酵素が細胞壁にトラップされているのではなく、転写の段階で制御されているものも数多く存在するものと思われる。これら両方の現象は、清酒や焼酎醸造だけではなく、麹菌を利用した産業全体に取って重要であり、麹菌遺伝子のトランスクリプトーム解析や、固体培養で特異的に分泌されるタンパク質、および液体培養で細胞壁にトラップされているタンパク質等のプロテオーム解析などにより、網羅的に解析を行う必要性がある。

今回、白麹菌 β -グルコシダーゼの研究をとおして、白麹菌が持つユニークな性質が明らかとなった。白麹菌を含め麹菌は、日本の伝統的醸造産業を支える重要な微生物である。また、固体培養法も同様に、非常に多くの利点を持つ、重要な技術である。これまで実用麹菌に対しては、遺伝学的手法が使えないなど、様々な技術的な問題があり、また、固体培養においても、その取り扱いの難しさから、いろいろなことが未知の問題として残されている。しかし、ここ10数年の分子生物学的な手法の発達により、様々なことが明らかとなってきた。今後、麹菌の全遺伝情報の解明などの分子生物学的なアプローチにより、益々麹菌に対する理解が深まってゆくものと思われる。このような中で、本論文の成果が、少しでも役立てれば幸いである。

発表論文

- 1) **Iwashita, K., Todoroki, K., Kimura, H., Shimo, H., and Ito, K.**: Purification and characterization of extracellular and cell wall bound β -glucosidases from *Aspergillus kawachii*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1938-46 (1998)
- 2) **Iwashita, K., Nagahara, T., Kimura, H., Takano, M., Shimo, H., and Ito, K.**: The *bglA* gene of *Aspergillus kawachii* encodes both extracellular and cell wall-bound β -glucosidases., *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 5546-5553 (1999)
- 3) **Iwashita, K., H., Shimo, H., and Ito, K.**: The extracellular soluble polysaccharide (ESP) from *Aspergillus kawachii* improves the stability of extracellular β -glucosidases (EX-1 and EX-2) and is involved in their localization., *J. Biosci. Bioeng.*, (in press)

その他の論文

- 1) **Ito, K., Iwashita, K., and Iwano, K.**: Cloning and sequencing of the *xynC* gene encoding acid xylanase of *Aspergillus kawachii*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1338-40 (1992).
- 2) **Hashimoto, T., Morishita, M., Iwashita, K., Shimo, H., Nakata, Y., Tsuji, Y., Ito, K.**, Production and some properties of salt-tolerant b-xylosidases from a *Shoyu Koji* mold, *Aspergillus oryzae* in solid and liquid culture., *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 479-483 (1999)

引用文献

- 1) 岩野 (1979) 清酒醸造と酵素, 醸協, 74, 206-212
- 2) 岩野, 三上 (1988) 烧酎白麹の諸酵素の特徴について, 醸協, 83, 791-796
- 3) 北本, 五味, 峰時, 秦, 中台, 大西, 戸井田, 関口 (1997) 麹菌 (*A. oryzae*) の分子生物学的解析の最近の進展, 農化, 71, 1011-1035
- 4) 伊藤 (2000) 烧酎用麹菌の分子生物学的解析, 醸協, 95, 635-640
- 5) Ohta, T., Ikuya, R., Nakashima, M., Morimitsu, Y., Samuta, T., Saiki, H. (1990) Characteristic flavor of *Kansho-shochu* (Sweet Potato Spirit)., *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1353-1357
- 6) Ohta, T., Omori, T., Shimojo, H., Hashimoto, K., Samuta, T., Ohba, T. (1991) Identification of monoterpene alchol β -glucoside in sweet potatoes and purification of a *Shiro-koji* β -glucosidase., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 55: 1811-1816
- 7) Ohta, T., Shimojo, H., Hashimoto, K., Kondo, H., Samuta, T., Ohba, T. (1991) β -Glucosidase activity in *Shiro-Koji* and it contribution to sweet potato Shochu flavor., *J. Brew. Soc. Japan* (in Japanese), 86: 536-539
- 8) Ohta, T., Morimitsu, Y. Sameshima, Y., Samuta, T., Ohba, T. (1991) Transformation from Geraniol, Nerol and Their β -glucosides into linalool and α -terpineol during shochu distillation., *J. Ferment. Bioeng.* 72, 347-351
- 9) Koseki, T., Furuse, S., Iwano, K., Matsuzawa, H., (1998) Purification and characterization of a feruloylesterase from *Aspergillus awamori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62 2032-2034
- 10) Koseki, T., Furuse, S., Iwano, K., Sakai, H., Matsuzawa, H., (1997) An *Aspergillus awamori* acetylesterase: purification of the enzyme, and cloning and sequencing of the gene., *Biochem. J.*, 325, 23-27

326, 485-490

- 11) 小関、岩野 (1996) 焼酎における原料由来の香気成分と麹菌酵素の寄与, 農化, 70, 684-686
- 12) 佐伯 (1989) 焼酎クイズ 15 問, 温故知新, 26, 54-60
- 13) 濱戸口 (1999) 本格いも焼酎, 酿協, 94, 269-273
- 14) Béguin, P., (1990) Molecular biology of cellulose degradation., *Annu. Rev. Microbiol.*, 44, 219-248
- 15) Béguin, P., and Aubert, J.P. (1994) The biological degradation of cellulose., *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 25-58
- 16) Sternberg D., (1976) β -Glucosidase of *Trichoderma*: its biosynthesis and role in saccharification of cellulose., *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 164-178
- 17) Enari, T.M., Niku-Paavola, M.L. (1987) Enzymatic hydrolysis of cellulose is the current theory of the mechanisms of hydrolysis valid?, *CRC Crit. Rev. Biootechnol.* 5, 67-87
- 18) Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L., Cordonnier, R.E. (1985) The aroma of grapes : I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components., *J. Chromatogr* 331, 83-90
- 19) Lecas, M., Gunata, Z.Y., Sapis, J., Bayonove, C.L., (1991) Purification and partial characterization of β -glucosidase from grape., *Phytochemistry*, 30, 451-454
- 20) Sternberg D., (1976) β -Glucosidase of *Trichoderma*: its biosynthesis and role in saccharification of cellulose., *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 164-178
- 21) Shmiisu K., (1994) The role of monoterpenes in flavor of alcholic beverages. *J. Brew. Soc.*

Japan (in Japanese), 89, 594-600

- 22) Ito, K., Iwashita, K., Iwano, K., (1992) Cloning and sequencing of the *xynC* gene encoding acid xylanase of *Aspergillus kawachii*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56, 1338-1340
- 23) Ito, K., Ogasawara, H., Sugimoto, T., Ishikawa, T., (1992) Purification and properties of acid stable xylanases from *Aspergillus kawachii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 547-550
- 24) Mikami, S., Iwano, K., Shiinoki, S., Shimada, T., (1987) Purification and some properties of acid-stable α -amylase from *shochu-koji* (*Aspergillus kawachii*)., *Agric. Biol. Chem.* 51, 2495-2501
- 25) Sudo, S., Ishikawa, T., Takayasu-Sakamoto, Y., Sato, K., Oba, T., (1993) Characteristics of acid-stable α -amylase production by submerged culture of *Aspergillus kawachii*., *J. Ferment. Bioeng.* 76, 105-110
- 26) Cote, G. L., Tao, B. Y., (1990) Oligosaccharide synthesis by enzymatic transglycosylation., *Glycoconjugate J.*, 7, 145-162
- 27) Ryu, D. D., Mandels, M., (1980) Cellulases: Biosynthesis and applications., *Enzyme Microb. Technol.*, 2, 91-101
- 28) Wood, T.M., McCrae, S.I. (1982) Purification and some properties of the extracellular β -D-glucosidase of the cellulolytic fungus, *T. koningii*., *J. Gen. Microbiol.* 128, 2973-2982
- 29) 本格焼酎製造技術, (1991) 日本釀造協会
- 30) Gomi, K., Okazaki, N., Tanaka, T., Kumagai, C., Inoue, H., Iimura, Y., Hara, S. (1987) Estimation of mycelial weight in *rice-koji* with use of fungal cell wall lytic enzyme. *J. Brew. Soc. Japan* (in Japanese), 82, 130-133

- 31) 第4回改正 国税庁所定分析法注解, (1993) 日本醸造協会
- 32) Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature* (London), 227, 680-685.
- 33) Chen, J., Saxton, J., Hemming, F., Peberdy, J. F., (1996) Purification and partial characterization of the high and low molecular weight form (S- and F-form) of invertase secreted by *Aspergillus nidulans*., *Biochim. Biophys. Acta*, 1296, 207-218.
- 34) Minobe, S., Nakajima, H., Itoh, N., Funakoshi, I., Yamashina, I., (1979) Structure of a major oligosaccharide of Taka-amylase A., *J. Biochem.*, 86, 1851-185
- 35) Takayanagi, T., Kimura, A., Chiba, S. Ajisaka, K., (1994) Novel structures of N-linked high-mannose type oligosaccharides containing α -D-galactofuranosyl linkages in *Aspergillus niger* α -D-glucosidase, *Carbohydr. Res.*, 256, 149-158
- 36) Takayanagi, T., Kushida, K., Idonuma, K., Ajisaka, K., (1992) Novel N-linked oligo-mannose type oligosaccharides containing an α -D-galactofuranosyl linkage found in α -D-galactosidase from *Aspergillus niger*., *Glycoconjugate J.*, 9, 229-234
- 37) 岡崎, 弘中, 島崎, 菅間 (1978) 蒸し米上における麹菌の増殖 (第3報), 醸協, 73, 402-404
- 38) 奈良原 (1988) 麹の水分活性と増殖, 醸協, 83, 729-733
- 39) Sambrook, J., Fritsh, E. F., Maniatis, T., (1989) Molecular Cloning: *A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 18-3-18.10.
- 40) Rudick, M. J., Elbein, A. D., (1973) Glycoprotein enzymes secreted by *Aspergillus fumigatus* : Purification and properties of β -glucosidase., *J. Biol. Chem.*, 248, 6506-6513

- 41) Rudick, M. J., Elbein, A. D., (1975) Glycoprotein enzymes secreted by *Aspergillus fumigatus* : Purification and properties of a second β -glucosidase. *J. Bacteriol.*, 124, 534-541
- 42) Mega, T., Matsushima, Y., (1979) Comparative studies of three exo- β -glycosidases., *J. Biochem.*, 85, 335-341
- 43) Workman, W. E. Day, D. F., (1982) Purification and properties of β -glucosidase from *Aspergillus terreus*., *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 1289-1295
- 44) Sakamoto, R., Kanamoto, J., Arai, M., Murao, S., (1985) Purification and physicochemical properties of three β -glucosidases from *Aspergillus aculeatus* No. F-50., *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1275-1281
- 45) Watanabe, T., Sato, T., Yoshioka, S., Koshima, T., and Kuwahara, M., (1992) Purification and properties of *Aspergillus niger* β -glucosidase., *Eur. J. Biochem.*, 209, 651-659
- 46) Hoh, Y. K., Yeoh, H., Tan, T. K., (1992) Properties of β -glucosidase purified from *Aspergillus niger* mutants USDB0827 and USDB 0828., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 590-593
- 47) Unno, T., Ide, K., Yazaki, T., Tanaka, Y., Nakakuki, T. and Okada, G., (1993) High recovery purification and some properties of a β -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 2172-2173.
- 48) Yan, T. R., Lin, C., (1997) Purification and characterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 965-970
- 49) Kitpreechavanich, V., Hayashi, M., Nagai, S., (1986) Purification and characterization of extracellular β -xylosidase and β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus*. *Agric. Biol. Chem.*, 50, 1703-1711

- 50) Shimo, H., Tadenuma, M., (1991) Characterization of *Rarobacter faecitabidus* protease I, a yeast-litic serine protease having mannose-binding activity., *J. Biochem.*, 110 608-613
- 51) Beintema, J.J., (1994) Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins., *FEBS Lett.* 22, 350, 159-63
- 52) Duvic, B., Soderhall, K., (1992) Purification and partial characterization of a β -1,3-glucan-binding-protein membrane receptor from blood cells of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*., *Eur. J. Biochem.*, 207, 223-228
- 53) Tamura, H., Tanaka, S., Ikeda, T., Obayashi, T., Hashimoto, Y. (1997) Plasma (1-->3)- β -D-glucan assay and immunohistochemical staining of (1-->3)- β -D-glucan in the fungal cell walls using a novel horseshoe crab protein (T-GBP) that specifically binds to (1-->3)- β -D-glucan., *J. Clin. Lab. Anal.* 11, 104-109
- 54) Lee, S.Y., Wang, R., Soderhall, K. (2000) A lipopolysaccharide- and β -1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization, and cDNA cloning., *J. Biol. Chem.*, 275, 1337-1343
- 55) Kawaguchi, T., Enoki, T., Tsurumaki, S., Sumitani, J., Ueda, M., Ooi, T., Arai, M. (1996) Cloning and sequencing of the cDNA encoding β -glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus*., *Gene*, 173, 287-288
- 56) Vieira, J. Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA., *Methods Enzymol* 153, 3-11
- 57) Schena, M., Picard, D., Yamamoto, K. R., (1988) Vectors for constitutive and inducible gene expression in yeast., *Methods in Enzymol.*, 194, 389-393

- 58) Buxton, F.P., Gwynne, D.I., Davies, R.W. (1989) Cloning of a new bidirectionally selectable marker for *Aspergillus* strains., *Gene*, 84, 329-334
- 59) Becker, D.M., Guarente, L., (1991) High-efficiency transformation of yeast by electroporation., *Methods Enzymol.*, 194, 182-187
- 60) Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual., Cold Spring Harbor Labolatory, Cold Spring Harbor, New York
- 61) Kamei, K., Yamamura, Y., Hara, S., Ikenaka, T. (1989) Amino-acid sequence of chitinase from *Streptomyces erythraeus.*, *J. Biochem.*, 105, 979-985
- 62) Iimura Y., K. Gomi, K., Uzu, H., Hara, S., (1987) Transformation of *Aspergillus oryzae* through plasmid-mediated complementation of the methionine-auxotrophic mutation., *Agric. Biol. Chem.*, 51 323-328
- 63) Hata, Y., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C., Tamura, G., Hara, S., (1991) The glucoamylase cDNA from *Aspergillus oryzae*: its cloning, nucleotide sequence, and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem..* 55, 941-949
- 64) Pines, O., London, A. (1991) Expression and secretion of *Staphylococcal* nuclease in yeast: effects of amino-terminal sequences., *J. Gen. Microbiol.*, 137:, 771-778
- 65) Kohchi, C., Toh-e, A., (1985) Nucleotide sequence of *Candida pelliculosa* β -glucosidase gene. *Nucleic Acids Res.* 13, 6273-6282
- 66) Barnett, C.C., Berka, R.M., Fowler, T. (1991) Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates., *Biotechnology (N Y)* 9: 562-565

- 67) Dowzer, C.E., Kelly, J.M., (1989) Clonings of the *creA* gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression., *Curr. Genet.* 15, 457-459
- 68) Drysdale, M.R, Kolze, S.E., Kelly, J.M. (1993) The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, *creA*., *Gene*, 130, 241-245
- 69) Strauss, J., Mach, R.L., Zeilinger, S., Hartler, G., Stoffler, G., Wolschek, M., Kubicek, C.P. (1995) Cre1, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*., *FEBS Lett.* 376, 103-107
- 70) Takashima, S., Nakamura, A., Iikura, H., Masaki, H., Uozumi, T. (1996) Cloning of a gene encoding a putative carbon catabolite repressor from *Trichoderma reesei*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 173-176
- 71) Machida, M., Ohtsuki, I., Fukui, S., Yamashita, I. (1988) Nucleotide sequences of *Saccharomyces fibuligera* genes for extracellular β -glucosidases as expressed in *Saccharomyces cerevisiae*., *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 3147-3155
- 72) Raynal, A., Gerbaud, C., Francingues, M.C., Guerineau, M. (1987) Sequence and transcription of the β -glucosidase gene of *Kluyveromyces fragilis* cloned in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet* 12, 175-184
- 73) Castle, L.A., Smith, K.D., Morris, R.O. (1992) Cloning and sequencing of an *Agrobacterium tumefaciens* β -glucosidase gene involved in modifying a vir-inducing plant signal molecule. *J. Bacteriol.* 174, 1478-1486
- 74) Grabnitz, F., Rucknagel, K.P., Seiss, M. Staudenbauer, W.L. (1989) Nucleotide sequence of the *Clostridium thermocellum* *bgIB* gene encoding thermostable β -glucosidase B: homology to

fungal β -glucosidases. *Mol. Gen. Genet.* 217: 70-76

- 75) Rojas, A., Romeu, A. (1996) A sequence analysis of the β -glucosidase sub-family B. *FEBS Lett.* 378: 93-97
- 76) Swiss Institute of Bioinformatics Website. <http://www.expasy.ch/>
- 77) Castelli, L.A., Mardon, C.J., Strike, P.M., Azad, A.A., Macreadie, I.G., (1994) High-level secretion of correctly processed β -lactamase from *Saccharomyces cerevisiae* using a high-copy-number secretion vector. *Gene* 142, 113-117
- 78) Legler, G., Roeser, K.R., Illig, H.K., (1979) Reaction of β -D-glucosidase A3 from *Aspergillus wentii* with D-glucal. *Eur. J. Biochem.* 101, 85-92
- 79) Cummings, C., Fowler, T., (1996) Secretion of *Trichoderma reesei* β -glucosidase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 29 227-233
- 80) Lee, J., Kwon, K.S., Hah, Y.C. (1996) Regulation of β -glucosidase biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 135, 79-84
- 81) Yamada, O., Lee, B.R., Gomi, K. (1997) Transformation system for *Aspergillus oryzae* with double auxotrophic mutations, *niaD* and *sC*,. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1367-1369
- 82) Punt, P.J., van den Hondel, C.A. (1992) Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance markers., *Methods Enzymol.* 216, 447-457
- 83) 五味 (2000) 清酒用麹菌の遺伝子操作技術, 酿協, 95, 494-502
- 84) Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C. (1992) Transformation of the industrial strain of *Aspergillus oryzae* with the homologous *amdS* gene as a dominant selectable marker., *J. Ferment. Bioeng.*, 74, 389-391

- 85) Kuhn, P. J., Trinci, A. P. J., Jung, M. J., Goosey, M. W., Cipping, L. G. (1990) Biochemistry of cell walls and membranes in fungi., Springer-Verlag
- 86) Leal, J. A., Guerrero, C., Gómez-Miranda, B., Prieto, A., and Bernabé, M., (1992) Chemical and structural similarities in wall polysaccharides of some *Penicillium*, *Eupenicillium* and *Aspergillus* species., *FEMS Microbiol. Lett.*, 90, 165-168
- 87) Fontain, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C. E., Diaquin, M., Latge, J. P., (2000) Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall., *J. Biol. Chem.*, 275, 27594-27607
- 88) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F., (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances., *Anal. Chem.*, 28, 350-356
- 89) Kornfeld, R., Ferris, C., (1975) Interaction of Immunoglobulin glycopeptides with Concanavalin A. *J. Biol. Chem.*, 250, 2614-2619
- 90) Baenziger, J. U., Fiete, D., (1979) Structural determinations of ConcanavalinA specificity for oligosaccharides., *J. Biol. Chem.*, 254, 2400-2407
- 91) Shimoda, T., and Funatsu, G., (1985) Binding of lactose and galactose to native and iodinated ricin D., *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2125-2130
- 92) Baenziger, J. U., Fiete, D., (1979) Structural determinations of *Ricinus communis* Agglutinin and toxin specificity for oligosaccharides., *J. Biol. Chem.*, 254, 9795-9799
- 93) Rath, J., R Messner, R., Kosma, P., Altmann, F., Marz, L., Kubicek, C. P., (1995) The α -D-mannan core of a complex cell-wall heteroglycan of *Trichoderma reesei* is responsible for β -glucosidase activation., *Arch. Microbiol.*, 164, 414-419

- 94) Fushinobu, S., Ito, K., Konno, M., Wakagi, T., Matsuzawa, H., (1998) Crystallographic and mutational analyses of an extremely acidophilic and acid-stable xylanase: biased distribution of acidic residues and importance of Asp37 for catalysis at low pH., *Protein Eng.*, 11,1121-1128
- 95) Fushinobu, S., Matuzawa, H., (1999) X-ray crystallography of a xylanase from *Aspergillus kawachii* and mechanism of its extremely low pH optimum and acid stability, *J. Brew. Soc. Jpn.* (in Japanese), 94, 610-614
- 96) Messner, R., Hagspiel, K., Kubicek, C. P., (1990) Isolation of a β -glucosidase binding and activating polysaccharide from cell walls of *Trichoderma reesei*., *Arch. Microbiol.*, 154, 150-155
- 97) 奈良原、岩田 (1983) 米麹の製麹に関する研究, 味噌の科学と技術, 31, 358-363
- 98) 秦 (1999) 清酒麹菌の固体培養（麹造り）で大量に発現するグルコアミラーゼ遺伝子, 生工, 77, 80-83
- 99) Adams, T. H., Wieser, J. K., Yu, J. (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 35-54
- 100) Imai, Y., Tokutake, S., Yamaji, N., Suzuki, M., (1995) A new method of measuring glucoamylase activity., *Seibutu-kogaku*, 73 7-12.
- 101) Kita, A., Matsui, H., Somoto, A., Kimura, A., Takata, M., Chiba, S., (1991) Substrate specificity and substrate affinities of crystalline α -glucosidase from *Aspergillus niger*., 55, 2327-2335
- 102) 千葉 (1999) グリコシダーゼの分子機構に関する研究, 農化, 73, 1001-1012
- 103) Kimura, A., Takata, M., Sakai, O., Matsui, H., Takai, N., Takayanagi, T., Nishimura, I.,

- Uosumi, T., Chiba, S., (1992) complete amino acid sequence of crystalline α -glucosidase from *Aspergillus niger.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 1368-1370
- 104) Kimura, A., Takata, M., Fukushi, Y., Mori, H., Matsui, H., Chiba, S., (1997) A catalytic amino acid and primary structure of active site in *Aspergillus niger* α -glucosidase., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1091-1098
- 105) Minetoki, T., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., Tamura, G., (1995) Nucleotide sequence and expression of α -glucosidase-encoding gene (*agdA*) from *Aspergillus oryzae.*, 59, 1516-1521
- 106) 岩野、柴田、光永、布川 (1977) 清酒醸造に関する諸酵素の研究, 醸協, 72, 517-520
- 107) Hata, Y., Ishida, H., Ichikawa, E., Kwato, A., Suginami, K., Imayasu, S., (1998) Nucleotide sequence of an alternative glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae.*, *Gene.*, 207, 127-134
- 108) Ishida, H., Hata, Y., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K., Imayasu, S., (1998) Regulation of the glucoamylase-encoding gene (*glaB*), expressed in solid-state culture (Koji) of *Aspergillus oryzae.*, *J. Ferment. Bioeng.*, 86, 301-307
- 109) Klis, F. (1994) Review: Cell wall assembly in yeast., *Yeast*, 10, 851-869
- 110) Morimoto, Y., Kitamoto, K., Fujita, Y., Gomi, K., Kumagai, C., (1995) Activity of α -glucosidase in Sake Koji and its role during sake brewing., *Seibutsu-kougaku* (in Japanese), 73, 97-704

論文の要旨

1. 背景

β -グルコシダーゼは、セロビオースなどの β -1,4-グリコシド結合を持つ物質の加水分解を触媒する酵素で、セルロース分解の最終段階において重要な役割を果たす。このように、一般にはセルロース資材の有効利用という点で重要であるが、これに加えて焼酎醸造では、甘藷焼酎の特徴香形成において重要な役割を果たしている。甘藷焼酎の特徴香（ネロール、ゲラニオール、リナロール、 α -テルピネオール、シトロネロール）は、その不揮発性の前駆体である配糖体（ネリル- β -グルコシド、ゲラニル- β -グルコシド）が白麹菌の β -グルコシダーゼにより加水分解され、さらに、蒸留時の熱等により化学変化を受け、生成するものと考えられている。このように白麹菌の β -グルコシダーゼは、特徴香の精製過程の最も初期の反応をつかさどっており、本酵素の活性を制御する事で、焼酎の香氣生成をコントロールすることが可能であると考えられる。しかしながら、白麹菌が生産する β -グルコシダーゼについては詳細な研究がなされていない。そこで本研究では、白麹菌の β -グルコシダーゼの酵素化学的諸性質、遺伝子の構造等について検討を行った。また、白麹菌は多量のクエン酸を生産するため、その生育環境はきわめて低 pH となっている。このような環境に適応するために、白麹菌が生産する酵素の多くは耐酸性を獲得している。そこで、この酵素の耐酸性についても視野に入れ検討を行った。

2. 白麹菌が生産する β -グルコシダーゼの精製

まず、 β -グルコシダーゼの生産条件等について検討を行った。固体培養、液体培

養により検討を行ったところ、本菌株は培地中に分泌される「遊離型」の酵素と、菌体細胞壁に結合した状態で存在する「結合型」の酵素を生産していた。また、固体培養を行うと「遊離型」の酵素が多く生産され、液体培養を行うと「結合型」の酵素が多く生産されるということが明らかとなった。続いて、各酵素の精製を行った。「遊離型酵素」は固体培養抽出液から、「結合型酵素」は液体培養した菌体から精製を行った。その結果、2種類の遊離型 β -グルコシダーゼ（EX-1, EX-2）と1種類の結合型 β -グルコシダーゼ（CB-1）を精製する事が出来た。これらの分子量はそれぞれ、EX-1: 145 kDa、EX-2: 130 kDa、CB-1: 120 kDa と異なっていた。

3. 精製 β -グルコシダーゼの特徴

次に精製酵素の特徴について検討を行った。精製した酵素の至適 pH は 5.0、至適温度は 60°C でいずれも一致した。また、基質特異性や阻害剤の影響等についてもほとんど一致した。続いて精製酵素の N-末端および、C-末端アミノ酸配列について検討したところ、すべての精製酵素が同じアミノ酸配列を持っていることが明らかとなつた。さらに、エンドグリコシダーゼ H (EndoH : TaKaRa) を用いて N 結合糖鎖の消化を行ったところ、すべての精製酵素の分子量は、同一の分子量、約 98kDa となつた。これらの結果は、精製した酵素がすべて同一遺伝子の産物であることを強く示唆するものであった。

4. β -グルコシダーゼをコードする遺伝子 (*bglA*) のクローニング

局在性や糖鎖の修飾量が異なるにも関わらず、すべての精製 β -グルコシダーゼは

同一遺伝子産物であることが示唆された。そこで、これらのことを見やすくするために、 β -グルコシダーゼ CB-1 の内部アミノ酸配列をもとに、本遺伝子のクローニングを試み、*bglA* 遺伝子を得た。cDNA 及び染色体 DNA シーケンスの結果から、*bglA* は 860 アミノ酸からなる推定分子量約 91kDa のタンパク質をコードし、6 つのインtron を含んでいることが明らかとなった。さらに、本遺伝子が実際に β -グルコシダーゼをコードするか確認するために、*bglA* cDNA を酵母で発現させたところ、ウエスタン解析、および β -グルコシダーゼ活性測定により、 β -グルコシダーゼタンパク質が生産されていることが明らかとなった。以上のこと、および β -グルコシダーゼ CB-1 の内部アミノ酸配列との比較から、本遺伝子が β -グルコシダーゼ CB-1 をコードする事が明らかとなった。また、酵母での組換え β -グルコシダーゼは、ほとんどが細胞壁画分に検出された。

5. 3 種類の精製酵素は、すべて一つの遺伝子 *bglA* によりコードされている β -グルコシダーゼ CB-1 をコードする遺伝子をクローニングすることが出来たので、本遺伝子の破壊株の作成を行った。sC 遺伝子をマーカーに遺伝子破壊を行い、1 株の遺伝子破壊株を取得した。つづいて本破壊株の β -グルコシダーゼ生産について検討を行ったところ、液体培養、固体培養ともに、総 β -グルコシダーゼ活性は 10% 以下になっており、本遺伝子の発現を制御することで、白麹菌の β -グルコシダーゼを十分に制御できることが明らかとなった。また、*bglA* 破壊株の遊離型 β -グルコシダーゼ活性は 1% 以下となっていた。この結果から、遊離型 β -グルコシダーゼも *bglA* によってコードされることが明らかとなった。また、結合型 β -グルコシダーゼ活性

は 10%以下となっていた。わずかな活性が細胞壁画分に残っていたことから、ウエスタンブロッティングと液体クロマトグラフィーにより検討を行ったところ、 β -グルコシダーゼに相当するシグナルは検出されず、わずかに残った活性は *bglA* 遺伝子以外の産物であることが確認された。以上のことから、白麹菌が生産する主な β -グルコシダーゼは *bglA* によってコードされ、培養条件により、その遺伝子産物の局在性および糖鎖の修飾がコントロールされていることが明らかとなった。

6. 精製 β -グルコシダーゼの安定性と細胞壁多糖画分

白麹菌が生産する多くの酵素は、周りの環境に合わせるために耐酸性となっている。また、実際の焼酎もろみの中で、 β -グルコシダーゼ活性は安定に保持されている。そこで、本酵素の耐酸性について検討を行った。ところが、精製した3種類の酵素は、pH5.0、37°C という比較的穏和な条件下でも急速に失活する事が明らかとなった。これらの酵素はそれぞれの粗酵素中では安定であることから、粗酵素液中に β -グルコシダーゼを安定化している何らかの物質があると考えられる。そこで様々な検討を行った結果、本酵素は、白麹菌の細胞壁多糖画分により顕著に安定化されることが明らかとなった。また、遊離型、結合型に関わらず、すべての精製酵素は、細胞壁多糖画分に強く吸着する事が明らかとなった。

7. 白麹菌が生産する可溶性多糖 (ESP)

遊離型 β -グルコシダーゼも細胞壁多糖画分に吸着した。このことから、実際の固体培養を行った場合、遊離型 β -グルコシダーゼは、何らかの可溶性多糖類により細

胞壁への吸着を阻害され、培地中に遊離の状態でしかも安定に存在しているのではないかと考えられた。そこで、麹の抽出液中から可溶性多糖の精製を進め検討を行った。精製は、 β -グルコシダーゼの安定化活性および吸着阻害活性を指標とし、ゲルろ過、陰イオン交換、陽イオン交換クロマトグラフィーにより行った。精製した可溶性多糖 (Extracellular Soluble Polysaccharide: ESP) の分子量はおよそ 10,000~20,000 で、糖組成を検討したところ、マンノース、グルコース、ガラクトースにより構成されていることが明らかとなった。つづいて精製 ESP による遊離型精製 β -グルコシダーゼ (EX-1、EX-2) の安定化について検討したところ、pH3.0~7.0 の範囲、50°C 以下の範囲でいずれの遊離型酵素も安定化されることが明らかとなった。また精製 ESP は精製 β -グルコシダーゼの細胞壁多糖画分への吸着を阻害するだけでなく、あらかじめ吸着させておいた β -グルコシダーゼを遊離させる作用も有していた。さらに、ビオチン化 ESP を使用し、精製 β -グルコシダーゼとの相互作用について検討を行ったところ、両者は直接結合していることが明らかとなった。以上のことから、ESP は白麹菌 β -グルコシダーゼの安定性および局在性に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、この可溶性多糖は、各精製 β -グルコシダーゼの K_m 値にはほとんど影響を与えることなく、わずかに酵素を活性化した。

8. ESP に影響を受ける他の白麹菌酵素

白麹菌は、 β -グルコシダーゼの安定性および局在性に影響を与える ESP を生産していた。このような現象はこれまでに知られておらず、他の麹菌酵素への影響についても興味が持たれる。そこで、 β -グルコシダーゼ同様、固体、液体培養間で酵素の

局在性が異なる α -グルコシダーゼを精製し、検討を行った。 α -グルコシダーゼは、疎水および陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルfiltrationにより精製をおこなった。精製 α -グルコシダーゼは、 β -グルコシダーゼ同様不安定で、ESP により安定化されることが明らかになった。また、本精製酵素は細胞壁多糖画分に吸着する活性も有していたが、これも ESP の添加により阻害された。精製の段階で、本酵素は maltose 等の低分子オリゴ糖に対して非常に高い活性を持っていることが明らかとなっていることから、焼酎醸造では、清酒醸造以上に糖化に関わる役割が大きいものと思われる。このように白麹菌が生産する ESP は、 β -グルコシダーゼ以外の酵素の安定性、および局在性に関与しており、醸造一般に重要なとものと思われた。

謝　辞

本論文を作成するにあたり、終始ご指導とご高配を賜りました東京大学教授 北本勝ひ
こ博士に心より感謝いたします。

本研究は著者が平成 7 年以来、国税庁醸造研究所遺伝子工学研究室にて行いました成果
であります。その間、研究テーマの選定と研究の手ほどきを賜り、また終始丁寧なご助言
をいただきました遺伝子工学研究室長 伊藤 清博士に深く感謝いたします。また、岡崎
直人博士をはじめとする歴代の国税庁醸造研究所長のみなさまには、研究の機会を与えて
いただくとともに総括的なご指導を賜りましたことを感謝いたします。さらに、多大なご
助言、ご指導をいただきました遺伝子工学研究室主任研究員 下飯 仁博士に感謝いたし
ます。

本研究の遂行にあたり、数々のご協力をいただきました、福德長酒類株式会社 轟木康
市氏、鷹野 誠氏、木村酒造株式会社 木村 等氏、窓乃梅酒造株式会社 永原辰哉氏、
株式会社喜多屋 原田 直氏に感謝いたします。また、多大なご援助とお励ましの言葉を
いただきましたヒガシマル醤油株式会社 橋本忠明氏をはじめとする遺伝子工学研究室の
室員のみなさまに感謝申し上げます。

最後に、常に心の支えとなってくれた家族に心から感謝いたします。