

報文

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) グルコアミラーゼ高生産株の取得と酵素学的特性

永吉恵美*、和久田智子、平田麻依子、瀧井幸男
 武庫川女子大学 生活環境学部 食物栄養学科 遺伝子制御利用学研究室

*著者連絡先 〒663-8558 兵庫県西宮市池開町 6-46

(受取日：2006年2月28日、受理日：2006年4月3日)

要旨： 麹菌 *Aspergillus oryzae* MIBA316 株（研究室保有株）から、PCR 法によりグルコアミラーゼ B 遺伝子 (*glaB*) をクローニングした。麹菌用発現ベクター pNAN8142（大関株式会社より）に *glaB* を挿入したのち、宿主 *A. oryzae niaD* 欠損株へ導入し、*niaD* 選択性を用い高発現形質転換株（ET3-6 株）を得た。サザンハイブリダイゼーション解析の結果、ET3-6 株には *glaB* 遺伝子が多コピー挿入されていることがわかった。ET3-6 株培養上清のグルコアミラーゼ活性は、親株に比べ約 55 倍に増加していたのに対し、 α アミラーゼ活性は約 20 分の 1 に低減していた。ET3-6 株由来グルコアミラーゼの等電点は 4.3 であった。本酵素の至適 pH は 4.6 であり、pH3.1~pH5.1 で安定であった。また、本酵素は、55°C まで安定であり、至適温度も 55°C あった。活性に及ぼす金属イオンの影響を検討したところ、カルシウムイオン、銀イオン及び鉛イオンで 30~40% の阻害が認められた。

キーワード： 麹菌、*Aspergillus oryzae*、グルコアミラーゼ、*glaB*

はじめに

黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は清酒、醤油、味噌など、わが国の伝統的醗酵産業に広く利用されている糸状菌である。また、様々な加水分解酵素を生産することから「酵素の宝庫」と呼ばれている。遺伝子操作技術の発展とともに、糸状菌の有用遺伝子が多数クローニングされ、近年、麹菌においても解析が進んでいる[1]。一方、地球の温暖化対策やエネルギーの安定供給の確保といった観点から、再生可能でクリーンなバイオマスエネルギーの開発が望まれているとともに、健康食品への利用に役立つオリゴ糖の開発など、様々な分野でグルコースが多く利用されているのが現状である。

グルコアミラーゼ (1,4- α -D-glucan

glucohydrolase ; EC3.2.1.3) はデンプンやマルトオリゴ糖などの非還元末端からエキソ型で α -1,4-グルコシド結合に作用し、 β -グルコースを生成する。さらにデンプンの枝分かれ部位である α -1,6-グルコシド結合にも作用し、理論的にデンプンを完全に加水分解するため、デンプンの糖化に最も重要な酵素と考えられている。しかし、プロテアーゼによる生デンプン吸着部位の脱落やグルコシダーゼによる酵素の修飾によりデンプンの分解率が 70~80% で停止するものがある[2]。

Aspergillus 属のグルコアミラーゼについては 1984 年に *A. awamori* のグルコアミラーゼ遺伝子がクローニングされて以来、多くの *Aspergillus* 属でクローニングされてきた。菌体外酵素であるグルコアミラーゼは、グルコアミ

ラーゼ A (*glaA*) と B (*glaB*) の2つの遺伝子によってコードされており、それらの発現形式は使用する培地の形態によって異なることが知られている[3]。*glaA* は液体培養条件下で、*glaB* は固体培養条件下において特異的に発現するが、液体培養でのグルコアミラーゼの生産は固体培養時の 1/20 程度である。このことから麹菌は、醸造産業において、制御しやすい液体培地系では利用されてこなかった[4, 5]。近年、麹菌発現ベクターが多く開発されている。シャトルベクターの一つ pNAN8142 は、高発現ベクターで強力なプロモーターを有する[6, 7]。プロモーター領域にはアミラーゼ系遺伝子共通のデンプン誘導に関する *cis* 因子が多数存在することが知られている[8, 9, 10]。したがって、本ベクターを麹由来の宿主 (*A. oryzae niaD* 欠損株 (*niaD*⁻) に導入し、形質転換[11]を行うことにより、形質転換株 (*niaD*⁺) は窒素源選択培地でも生育可能となる[12]。

本研究においては、麹菌 *Aspergillus oryzae* MIBA316 株 (研究室保有株) から *glaB* 遺伝子をクローニングするとともに、麹宿主・ベクター系において発現させ、セルフクローニングによるグルコアミラーゼの高生産株の取得を目的とした。

実験方法

1. 麹菌グルコアミラーゼ遺伝子(*glaB*)の単離

glaB は常法により調製したゲノム DNA より PCR 法で取得した。まず、当研究室保有の *A. oryzae* MIBA316 株より、Plant mini Kit (Qiagen) を使用し、ゲノム DNA を調整した。ゲノム DNA を鋳型に次の条件で PCR を行った。Sense primer 配列は 5'-GGGTCGACCC ATGCGGAACAACCTTCTT-3' で、5'末端側には *Sal*I 認識部位を、またアンダーライン部分にはスタートコドンを含み、ベクターとインサー

トの接合部位がストップコドン配列になっていないことを確認した。Anti-sense primer 配列は 5'-AGCGGCCGCTCTACCACGACCCAA CAGT-3' で、5'末端側に *Not*I 認識部位、またアンダーライン部分にはストップコドンを含んでいる。PCR 反応は 94°C で 2 分間プレヒートを行った後、94°C 15 秒の変性、54°C で 30 秒のアニーリング、68°C で 1 分 30 秒の伸張反応を 1 サイクルとし、35 サイクル行った。その後 4°C で保存した。DNA polymerase は KOD Plus-DNA polymerase (TOYOBO) を使用した。

2. 宿主 *Escherichia coli* (JM109) への導入とシーケンスによる確認

得られた PCR フラグメントの塩基配列を確認するため、シーケンスを行った。まず、PCR フラグメントの *Sal*I-*Not*I 断片を、ベクター pBluscript II の同じ制限酵素部位に結合し、*E. coli* JM109 に形質転換した (pB*glaB*)。形質転換体よりプラスミド DNA を調製し、ジーンウォーキングにより塩基配列を決定した。シーケンス反応には ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、start primer は T3 primer (5'-AATTAACCCTCACTAAAGG GAAC-3'), T7 primer (5'-GTAATACGACTC ACTATAGGGCGA-3') を用いた。

3. 麹菌宿主・ベクター系による麹菌の形質転換

glaB の高発現系の構築を目指して、麹菌宿主ベクター系を用いて形質転換を行った。pB*glaB* プラスミドより *glaB* を含むフラグメントを *Sal*I-*Not*I で切り出した。このフラグメントをシャトルベクターである pNAN8142 の *Sal*I-*Not*I 部位に組み込んだキメラプラスミドを得た。Yatalase (TAKARA) を用いてプロトプラストを調製し、プロトプラスト-PEG 法[11]により上記プラスミドを用いて形

質転換を行った。麴菌宿主としては *Aoryzae niaD* 欠損株 (*niaD⁻*) を用いた。形質転換株 (*niaD⁺*) を窒素源選択培地である CDC 培地 (2% デキストリン、0.3% NaNO₃、0.2% KCl、0.1% KH₂PO₄、0.05% MgSO₄ · 7H₂O、0.002% FeSO₄、0.8M NaCl、3.0% 寒天) により選抜し、4 回植え継ぎにより純化し、ET 系株を取得した。

4. 培養条件と酵素抽出

固体培養麴としては、100ml の三角フラスコに α 化米 5g と、蒸留水 1.5ml を加えた後、胞子を散布し 30°C で 2 日間、静置培養したものを用いた。酵素液の抽出は国税庁所定法[13] に準じて調整した。液体培養酵素液としては、500ml の坂口フラスコ内の DP 培地 (2% デキストリン、1% ペプトン、0.5% KH₂PO₄、0.1% NaNO₃、0.05% MgSO₄ · 7H₂O) 100ml に胞子懸濁液を入れ、30°C で振盪培養したものを用いた。培養液を G1 グラスフィルターでろ過した上清を、酢酸 buffer (pH5.0) にて一晩透析した試料を酵素液として用いた。

5. 酵素活性の測定方法

糖化力は糖化力測定キット[14]を用いて測定し、国税庁所定分析法による分析値に換算して表した。酵素の活性は標準条件として、酢酸 buffer (pH5.0)、37°C、10 分反応で行い求めた。1 U は 1 分間に 1 μ mol の基質を分解する力価と定義した。糖化力測定キットが適さない酵素試料については、グルコース C-テスト (Wako) を使用し、生じるグルコース量を測定した。1 U は 1 分間に 1 μ mol の基質を分解する力価と定義した。 α -アミラーゼ活性は、国税庁所定分析法[15]に準じて測定した。

6. サザンブロット解析

調製したゲノム DNA を *Pst* I で分解し、

1.0% のアガロースゲルで電気泳動を行った後、ナイロンメンブレン (Hybond - N⁺) に転写、固定した。検出には AlkPhos Direct Kit (Amersham Biosciences) を使用した。*glaB* は親株のゲノムにも存在することから、プローブとしてはベクター pNAN8142 のプロモーター内に存在する約 1kbp のフラグメントを使用した。ネガティブコントロールとして親株由来ゲノム DNA を、また、ポジティブコントロールとして pNAN8142 を使用した。55°C で一晩ハイブリダイズさせた後、20×SSC で 55°C にて 10 分間を 2 回洗浄した。検出は non-RI CDP-Star による化学発光を用いて行った。

7. 酵素学的特性の決定

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) は Laemmli 法[15]を用いた。また、等電点電気泳動法[16]により酵素の等電点を求めた。pH 測定用と酵素活性測定用の 2 本のゲル (agarGEL ミニサイズ 75mm、pH レンジ 3-8) で行い、pH 測定用は酵素をアプライせずゲルのみで行った。電気泳動後、それぞれのゲルを 2mm 間隔に切断し、pH 測定用はゲル断片を 500 μ l の H₂O で抽出し pH を測定した。酵素活性測定用はゲル断片を 500 μ l の酢酸 Buffer (pH5.0) / 0.85% NaCl で抽出し、酵素活性を測定した。酵素の安定性、至適 pH や至適温度の検討においては、酢酸 buffer (pH5.0)、37°C、10min の反応を基本に、温度や pH (McIlvain buffer) を変えて酵素活性を測定した

結果と考察

1. グルコアミラーゼ高生産株の取得

本研究室保有の麴菌 *A.oryzae* MIBA316 株の染色体ゲノムより、PCR で得た産物を大腸菌にクローニングし、シーケンスを行った結

果、2つのイントロン領域を含む 1586bp の構造遺伝子 (ORF) が存在し、アミノ酸 493 残基であることを確認した。(図 1)。日本データベース (DDBJ) に登録されている *A. oryzae* *agdB*[5] と比較したところ、AAC→AAG、GAG→CAG、CCG→CGC、と 4 塩基の違い

が見つかり、これによるアミノ酸置換は、N(アスパラギン)→K(リジン)、V(バリン)→Q(グルタミン)、P(プロリン)→R(アργニン)であった。これらの変異は非触媒残基のみあり、以下の結果で示すように酵素活性には影響を及ぼしていないものと考えられた。

```

ggglegacc ATG CGG AAC AAC CTT CTT TTT TCC CTC AAT GCC
M R N N L F S N A
ATT GCT GGC GCT GTC GCG CAT CCG TCC TTC CCT ATC CAT AAG AGG CAG TCG GAT CTC
I A G A V A H P S F P I H K R Q S D L
AAC GCC TTC TAA GAG GCA CAG ACA CCC ATC GCC AAA CAG GGC GTC CTC AAT AAT ATC
N A F I E A Q T P I A K Q G V L N N I
GGC GCT GAT GGC AAG CTT GTT GAG GGG GCT GCC GCT GGT ATC GTT GTA GCC TCC CCA
G A D G K L V E G A A A G I V V A S P
TCC AAG AGT AAT CCC GAC TggttcgtacaatcctaccctcaagaccgatgatattaccacagagetAac
S K S N P D
tatatatagAC TTC TAC ACC TGG ACG CGC GAC GCT GGC CTC ACC ATG GAA GAA GTG ATA
Y F Y T W T R D A G T M E E V I
GAG CAA TTC ATC GGG GGA GAT GCG ACT CTC GAG TCC ACA ATC CAG AAT TAT GTT GAC
E Q F I G G D A T L E S T I Q N Y V D
TCT CAA GCG AAG CAG CAG GCA GTC TCC AAC CCA TCA GGC GGC CTG TCG GAT GGC TCG
S Q A K Q Q A V S N P S G G L S D G S
GGT CTT GCT GAA CCC AAA TTT TAC GTC AAT ATC TCT CAA TTC ACC GAT TCT TGG GGC
G L A E P K F Y V N I S Q F T D S W G
CGA CCC CAG CGC GAC GGG CCA GCC TTA CGT GCT TCC GCT TTG ATC GCA TAT GGC AAC
R P Q R D G P A L R A S A L I A Y G N
TCT CTG ATT TCC AGC GAC AAA CAA TCT GTT GTC AAA GCT AAC ATC TGG CCA ATT GTC
S L I S S D K Q S V V K A N I W P I V
CAG AAT GAC TTG TCT TAT GTG GGT CAA TAC TGG AAC CAG ACC GGG TTT GAT CTT TGG
Q N D L S Y V G Q Y W N Q T G F D L W
GAA GAG GTT CAG GGC AGC TCC TTC TTC ACT GTT GCT GTG CAG CAC AAA GCC TTG GTG
E E V Q G S S F F T V A V Q H K A L V
GAG GGC GAT GCG TTT GCA AAG GCA CTC GGA GAG GAA TGC CAG GCA TGC TCC GTG GCG
E G D A F A K A L G E E C Q A C S V A
CCT CAA ATC CTC TGC CAT CTT CAG GAC TTC TGG AAT GGG TCT GCT GTT CTT TCT AAC
P Q I L C H L Q D F W N G S A V S N
TTA CCA ACC AAT GGG CGC AGT GGA CTG GAT ACC AAC TCT CIT TTG GGC TCC ATT CAC
L P T N G R S G L D T N S L L G S I H
ACT TTT GAT CCA GCC GCC GCT TGT GAT GAT ACA ACA TTC CAG CCC TGC TCC TCT CGC
T F D P A A A C D D T T F Q P C S S R
GCC CTG TCG AAC CAT AAG CTT GTG GTT GAC TCT TTC CGG TCG GTC TAC GGT ATC AAC
A L S N H K L V V D S F R S V Y G I N
AAT GGA CGT GGA GCA GGA AAG GCC GCG GCA GTG GGC CGC TAC GCA GAG GAC ACC TAT
N G R G A G K A A A V G R Y A E D T Y
CAG GGA GGC AAT CCA TGgttggtaactctgtctentatccaangcttmaactaatgaatatagG TAT
Q G G N P W Y
CTT ACC ACC CTG GTC GCT GCG GAA TTG CTC TAC GAC GCC TTG TAT CAG TGG GAC AAA
L T T L V A A E L L Y D A L Y Q W D K
CAA GGT CAA GTG AAC GTC ACT GAA ACT TCC CTT CCC TTC TTC AAG GAC CTC TCC AGC
Q G Q V N V T E T S L P F F K D L S S
AAT GTC ACC ACC GGA TCC TAC GCC AAG TCT TCC TCA GCC TAT GAG TCG CTT ACG AGC
N V T T G S Y A K S S S A V E S L T S
GCT GTC AAG ACC TAC GCA GAC GGC TTC ATC TCC GTT GTC CAG GAT ACT CCC GAT
A V T Y A D G F I S V V Q E Y T P D
GGC GGT GCT TTG GCT GAG CAG TAC AGT CGG GAC CAG GGC ACC CCA GTT TCG GCA TCC
G G A L A E Q Y S R D Q G T P V S A S
GAT CTG ACT TGG TCT TAT GCA GCT TTC TTG AGT GCT GTT GGA CGA CGA AAC GGC ACT
D L T W S Y A A F L S A V G R R N G T
GTC CCT GCT AGC TGG GGC TCT TCC ACG GCC AAC GCA GTT CCA AGC CAA TGT TCG GGG
V P A S W G S S T A N A V P S Q C S G
GGT ACA GTT TCT GGA AGT TAC ACT ACC CCA ACT GTT GGG TCG TGG tag
G T V S G S Y T T P T V G S W stop

```

図 1 : *A. oryzae* MIBA316 株由来 *agdB* 遺伝子の構造

大文字で示した塩基配列はエクソン部位、アンダーラインは保存領域と予想した部位、四角で囲んだ部位内の太字は、文献(5)と相違している塩基とアミノ酸を示す。2つのイントロン領域を含む 493 残基のアミノ酸をコードする 1586bp の ORF が存在していた。

ORF 全領域を含むフラグメントを切り出し、シャトルベクターpNAN8142 と連結した後、麴由来宿主にて発現させた。固体培養にて形質転換株をスクリーニングした結果、親株（麴由来宿主）より高い糖化力を示した形質転換 4 株を取得した。その中で最も高い活性を示したものは ET3 - 6 株であり、親株に比べ 4.2 倍（1387U/g）の活性を示した（図 2）。 α -アミラーゼ活性に基づく液化力を比較すると、ET3 - 6 株では親株の 20 分の 1 に低減していた（図 3）。

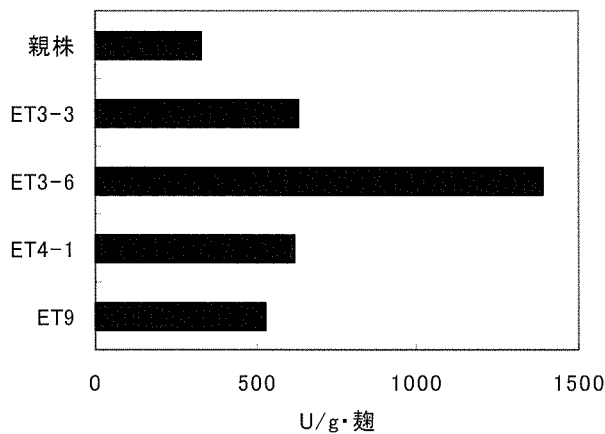


図 2：形質転換株の糖化力の比較

親株、*A.oryzae niaD* 欠損株；Et-3-3、ET3-6、ET-4-1、ET9、形質転換株
培養条件：30℃、48 時間の固体培養。

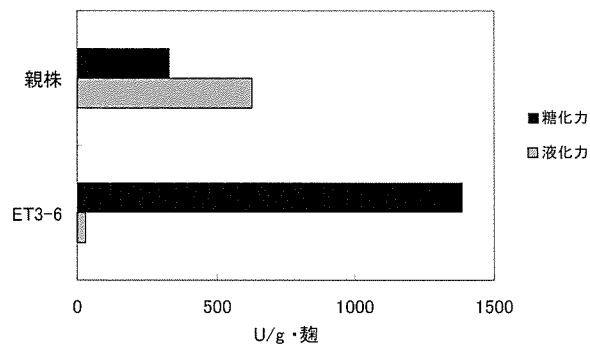


図 3：親株と形質転換株との糖化力と液化力の比較

親株、*A.oryzae niaD* 欠損株；ET3-6、形質転換株。
培養条件：30℃、48 時間の固体培養。

高発現ベクターpNAN8142 には、強力なプロモーターが付加されている。本ベクターのプロモーターには、麴菌のアミラーゼ系遺伝子のプロモーターに共通保存されているシス因子（デンプン誘導に関与する）が多コピー導入されているため、多量の転写因子がそれらに結合する。糖化力は大幅な増加が見られたのに対し、液化力は低減した原因は、転写活性化因子不足、いわゆるタイトレーションを引き起こしたためであると考えられる。

pNAN8142 の内部配列をプローブとして親株及び ET3 - 6 株のサザンブロット解析を行った（図 4）。ET3 - 6 株には複数のバンドが検出されたが（図 4、レーン 4）親株ではシグナルが検出されなかった（図 4、レーン 3）。

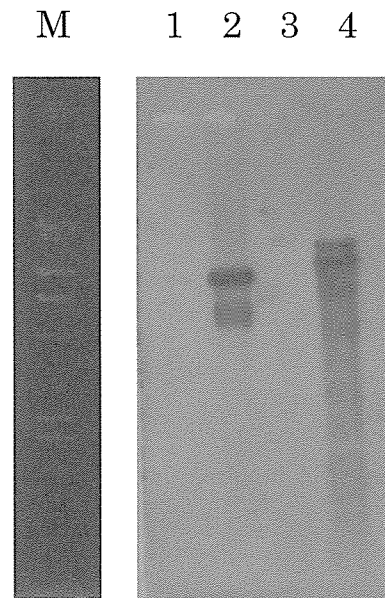


図 4：サザンブロット解析

レーン M は、 λ -HindIII マーカーの臭化エチジウム染色（23130、9416、6557、4361、2322、2027bp）で、レーン 1 - 4 はサザンブロット解析の結果を示した。レーン 1、 λ -Hind III マーカー；レーン 2、pNAN8142/*Pst I*；レーン 3、親株/*Pst I*；レーン 4、pNANET3-6/*Pst I*。

また、pNAN8142 では、強いシグナルを示す高分子側のバンドと弱いシグナルを示す低分子側のバンドの2本のバンドが検出された(図4、レーン2)。低分子側のバンドは非切断プラスミド由来と考えられた。以上の結果は、相同的組換えにより、遺伝子が多コピー導入されている事を示している。

ET3-6株の糖化酵素生産曲線を図5に示した。ET3-6株の酵素生産は8日目まで増加し続け、8日目で182U/mlであり、親株の約55倍の増加がみられた(図5)。親株の液体培養ではほとんど生産されなかった酵素が、形質転換体を用いることで、液体培養でも効率良く生産されることが示された。

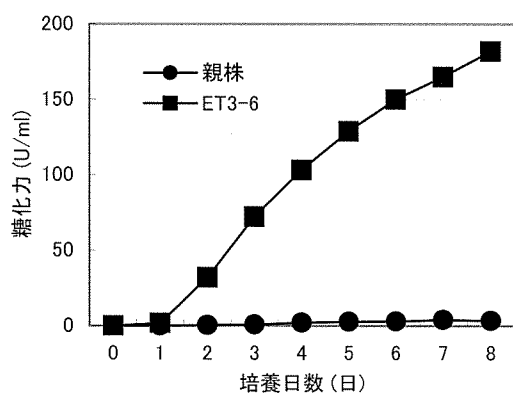


図5：形質転換株の糖化酵素生産曲線

親株、*A.oryzae niaD* 欠損株；ET3-6、形質転換株。
培養条件：30℃での液体培養。

2. 酵素学的特性

酵素の大量生産を目的として、ET3-6株の液体培養条件を検討した。親株及びET3-6株について2日目、6日目の培養液中のタンパク質挙動をSDS-PAGEで検討した(図6)。CBB染色で見える限り、培地中に分泌された大部分のタンパク質がグルコアミラーゼと考えられ、培養液そのものであるにも関わらず酵素純度の高いことが推察される(図6、レーン4)。分泌酵素の等電点は、pI4.3の酸性タンパク質

であった(図7)。至適pHは、4.6で(図8)、pH4~5付近で安定であった(図9)。至適温度は、55℃で(図10)、55℃までは比較的安定であった。(図11)。酵素活性に及ぼす金属イオン及び化合物の影響を図12に示した。酵素活性は、亜鉛イオン、マグネシウムイオン、鉄イオン、ナトリウムイオン、カリウムイオンやマンガンイオンでは影響を受けなかったが、カルシウムイオン、銀イオン、鉛イオン存在下で30-40%の活性低下が認められた。また、SDSで顕著に阻害を受けた(図12)。

M 1 2 3 4

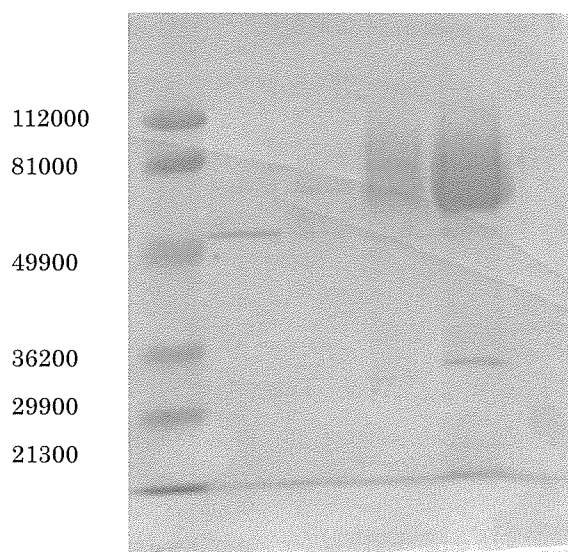


図6：液体培養液のSDS-PAGE

レーンM、分子量マーカー；レーン1、親株2日目の培養液；レーン2、親株6日目の培養液；レーン3、ET3-6株2日目の培養液；レーン4、ET3-6株6日目の培養液。培養液をそれぞれ10倍濃縮したものを10μlずつ試料として用い、電気泳動後、ゲルをCoomassie Brilliant Blue R-250にて染色した。培養条件：30℃での液体培養

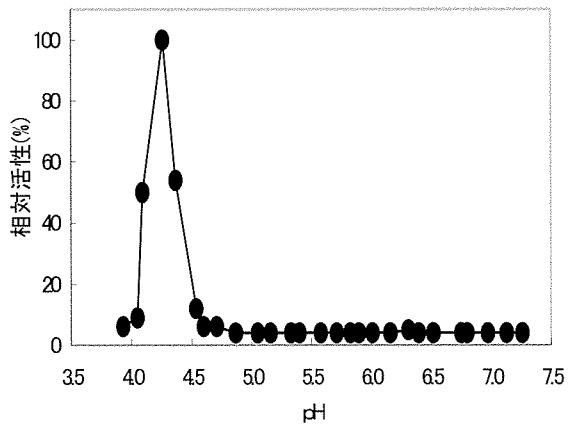


図 7 : 等電点電気泳動

pH 勾配 3~8 の既成ゲル (agarGEL ミニサイズ 75mm、pH レンジ 3-8) 7.5cm を使用し、300V で 4hr 電気泳動した。泳動後ゲルを 2mm 間隔に切り、それぞれのゲル断片の、pH と活性を測定した。

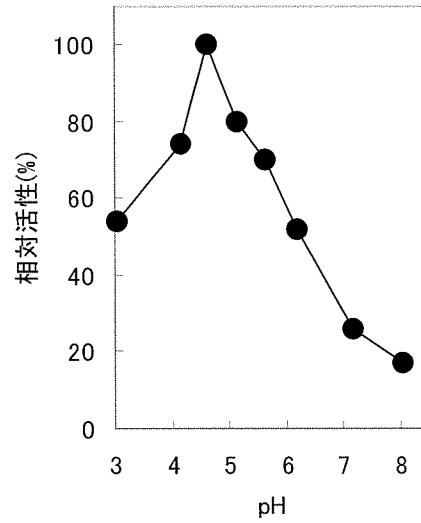


図 9 : pH 安定性

Mcllvain buffer で pH3.0~8.0 で酵素を 15min 保持した後、糖化力測定キットにて残存活性を測定した。

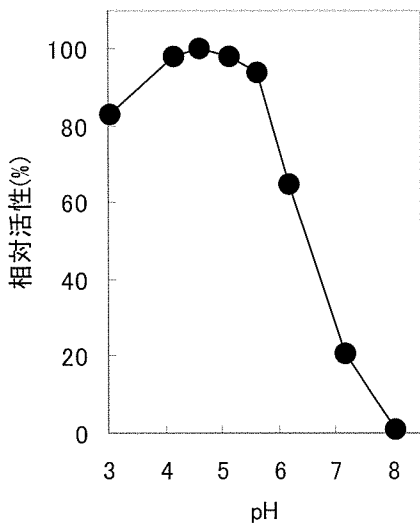


図 8 : 至適 pH

Mcllvain buffer を用い pH3.0~8.0 で検討した。活性測定にはグルコース C テストを使用した。

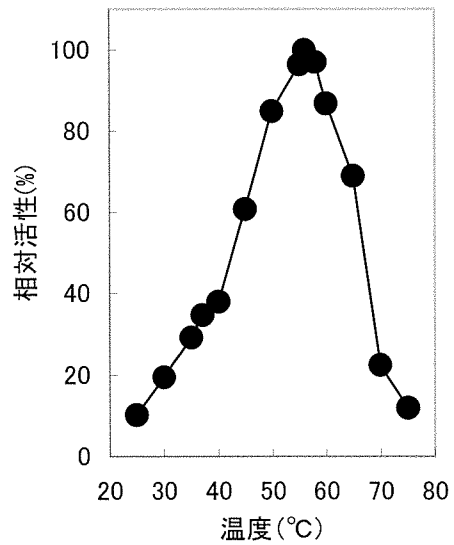


図 10 : 至適温度

pH5.0、25~70°C の条件で、糖化力測定キットを用いて測定した。

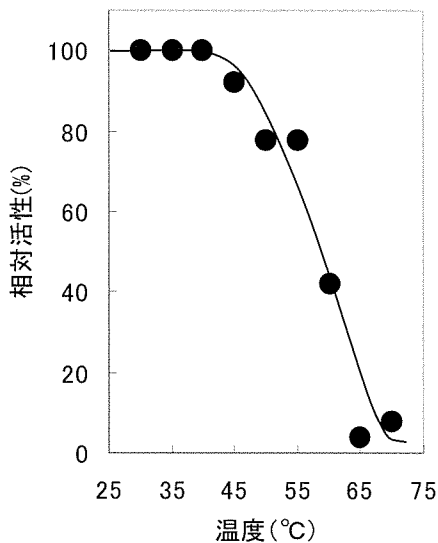


図 11：温度安定性

酵素を 30~70°C で 15min 保持後、残存活性を、糖化力測定キットにて測定した。

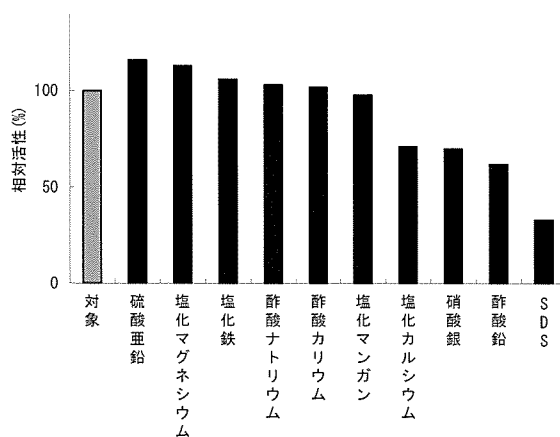


図 12：金属イオンや化合物による影響

最終濃度 5mM の影響物質、0.2% 可溶性デンプン、37°C で反応させ、グルコース C テストにて残存活性を測定した。

表 1 に本酵素の基質特異性を示した。本酵素は、 α -1, 4 結合のマルトオリゴ糖に最もよく作用した。また、 α -1, 6 結合を持つイソマルトースやデキストランや β -1, 4 結合やその他の結合を持つ基質には、まったく作用しなかった。

生デンプンに対する作用について検討したところ、いずれも極めて緩慢に切断しており、バレイショ由来のデンプンが一番高い活性を示した。デンプンの種類によって活性が違うのは、粒の大きさや表面構造の違い、アミロペクチン含量の違いなどによって生ずるものと考えられる (表 1)。

基質名	最終濃度	活性(U/ml)	結合様式
マルトース	2mM	3.34	α -1,4 グルコシド結合及び α -1,6 グルコシド結合
マルトトリオース	2mM	11.38	
マルトペンタオース	1mM	20.96	
マルトヘキサオース	2mM	21.24	
デキストリン	0.2%	18.22	
アミロース	0.2%	0.98	
アミロペクチン	0.2%	12.34	
可溶性デンプン	0.2%	8.20	
シクロデキストリン	2mM	0	
イソマルトース	2mM	0	α -1,6 グルコシド結合のみ
イソイソテトラオース	1mM	0	
イソペンタオース	2mM	0	
デキストラン	0.2%	0	
サリシン	2mM	0	グルコース以外の化合物 が結合
セロビオース	2mM	0	
ラクトース	2mM	0	
イヌリン	2mM	0	
ゲンチオビオース	2mM	0	
メリビオース	2mM	0	
トレハロース	2mM	0	
スクロース	2mM	0	
アミグダリン	2mM	0	
CMC	0.2%	0	
アビセル	0.2%	0	
バレイショ由来	0.2%	0.076	生デンプン
コムギ由来	0.2%	0.044	
トウモロコシ由来	0.2%	0.035	
サツマイモ由来	0.2%	0.034	

表 1：基質特異性

最終基質濃度 2mM を、標準条件で反応させた。デキストリン、アミロース、アミロペクチン、可溶性デンプン、デキストラン、CMC、アビセルは 0.2% 溶液を用いた。生デンプンの場合、振盪しながら 37°C、24hr 反応させた。グルコース C テストにて活性を測定した。

まとめ

近年、地球の温暖化対策やエネルギーの安定供給の確保といった観点から、バイオマスエネルギーといった再生可能でクリーンな新エネルギーの開発、また高齢化社会に伴う健康食品への利用価値などからみたオリゴ糖の開発など、様々な分野でグルコースが多く利用されているのが現状である。グルコアミラーゼは、*Aspergillus* 属[17]、*Rhizopus* 属[18]、*Mucor* 属などの多種類の菌類（不完全菌、担子菌、糸菌など）から見出されている。これらグルコアミラーゼの分子量は 60,000 から 90,000 で、 α -アミラーゼの分子量（40,000~50,000）より大きい、一般には一本鎖のポリペプチドである。至適 pH は 4.0~5.0 で、 α -アミラーゼの至適 pH 5.0~6.0 に近い。

今回の結果より、本酵素の特性は、これらの酵素の特性と大きな差は無く、アミラーゼの中でも、 α -アミラーゼとともにデンプンをグルコースにまで分解するためには必須な酵素として利用が期待される。今回、細かい条件制御が可能な液体培養で、なおかつ酵素を菌体外に生産することが可能なグルコアミラーゼ高生産株を得る事ができ、糖質加工への活用の幅が広がった。今後も新たな可能性に向け、さらなる検討を重ね、本研究室ですでに保有している様々な特性をもつ菌株と組み合わせることにより、応用されることが望まれる。

参考文献

1. Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D.W., Galagan, J.E., Nierman, W.C., Yu, J., Archer, D.B., Bennett, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Fedorova, N.D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P.R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J.R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N., Kikuchi, H.: Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438, 1157-1161 (2005)
2. 不破英次, 小巻利章, 檜作進, 貝沼圭二編: 澱粉科学の辞典, 266-270 (2003) 株式会社朝倉書店、東京
3. Hata, Y., Ishida, H., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K., Imayasu, S.: Nucleotide sequence of an alternative glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*, *Gene*, 207, 127-134 (1998)
4. Ishida, H., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., Suginami, K., Imayasu, S.: Identification of functional elements that regulate the glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*, *Curr Genet.*, 37, 373-379 (2000)
5. Tada, S., Gomi, K., Kitamoto, K., Takahashi, K., Tamura, G., Hara, S.: Construction of a fusion gene comprising

- the Taka-amylase A promoter and the *Escherichia coli* beta-glucuronidase gene and analysis of its expression in *Aspergillus oryzae*., *Mol Gen Genet*, **229**, 301-306 (1991)
6. Hata, Y., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C., Tamura, G.: Functional elements of the promoter region of the *Aspergillus oryzae* *glaA* gene encoding glucoamylase., *Curr Genet*. **22**, 85-91 (1992)
 7. Minetoki, T., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., Tamura, G.: Characteristic expression of three amylase-encoding genes, *agdA*, *amyB*, and *glaA* in *Aspergillus oryzae* transformants containing multiple copies of the *agdA* gene., *Biosci Biotechnol Biochem*. **2251-2254** (1995)
 8. Gomi, K., Akeno, T., Minetoki, T., Ozeki, K., Kumagai, C., Okazaki, N., Iimura, Y.: Molecular cloning and characterization of a transcriptional activator gene, *amyR*, involved in the amylolytic gene expression in *Aspergillus oryzae*., *Biosci Biotechnol Biochem*. **64**, 816-827 (2000)
 9. Petersen, K.L., Lehmebeck, J., Christensen, T.: A new transcriptional activator for amylase genes in *Aspergillus*, *Mol Gen Genet*, **262**, 668-676 (1999)
 10. Tanaka, A., Kato, M., Hashimoto, H., Kamei, K., Naruse, F., Papagiannopoulos, P., Davis, M.A., Hynes, M.J., Kobayashi, T., Tsukagoshi, N.: An *Aspergillus oryzae* CCAAT-binding protein, AoCP, is involved in the high-level expression of the Taka-amylase A gene., *Curr Genet*. **37**, 380-387 (2000)
 11. 五味勝也, 原昌道,: 蛋白質・核酸・酵素, **35**, 2552-2566 (1990)
 12. 醸造 第95巻 第7号 494-502 (2000)
 13. 江解編集委員会編: 第4回改正国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会, 211 (1993)
 14. Yasuhiro, I., Shoichi, T., Nobuyuki, Y., Masaru, S.: An Improved Method for Measuring of α -Glucosidase Activity in Rice *Koji*., *J. Brew. Soc. Japan*. **92**, 296-302 (1997)
 15. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature*, **227**, 680-695 (1970)
 16. Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis., *J. Mol. Biol.*, **98**: 503-517 (1975)
 17. Pazur, J.H., Knull, H.R., Cepure, A.: Glycoenzymes: structure and properties of the two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*., *Carbohydr Res.*, **20**, 83-96 (1971).
 18. Takahashi, T., Tsuchida, Y., Irie, M.: Isolation of two inactive fragments of a *Rhizopus* sp. glucoamylase: relationship among three forms of the enzyme and the isolated fragments., *J Biochem* , **92**, 1623-1633 (1982)

責任編集者：小城 勝相