九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

“親和部位”による結晶性天然多糖の酵素分解機構

林田, 晋策
九州大学農学部発酵学教室

後藤, 正利
九州大学農学部発酵学教室

https://doi.org/10.15017/23433

出版情報：九州大學農學部學藝雑誌. 47 (1/2), pp.73-83, 1993-01. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

九大農学芸誌 (Sci. Bull. Fac. Agr., Kyushu Univ.)
第47巻 第1・2号 73-83 (1992)

“親和部位”による結晶性天然多糖の酵素分解機構

林田晋策・後藤正利
九州大学農学部発酵学教室

(1992年7月31日 受理)

The Mechanism for Digestion of the Crystalline Carbohydrates by Amylase and Cellulase on the Basis for the Theory of the Affinity Site.

Shinsaku HAYASHIDA and Masatoshi GOTO
Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-02, Fukuoka 812

I 緒 言

自然界に最も多量に存在するバイオマスである生澱粉や天然セルロースは，ともにグルコースポリマー鎖からなり，規則的な高分子内外の水素結合を有し，水に不溶の結晶構造を形成している．通常の酵素反応は液相間のイベントであるが，生澱粉分解性アミラーゼ及び天然セルロース分解性セルラーゼによるこれら結晶多糖基質の分解は液－固相間反応であるため，その機構についての知見は極めて乏しい．本報は，20年前に本研究室で呈示した結晶基質分解能の発現に必須な親和部位のモデルを基礎として（Hayashida *et al.*, 1975, 1982），これら結晶性多糖基質の分解機構に関し，新知見に基づいて総括的考察を行ったものである．

II 生澱粉分解性アミラーゼ

1．黒麹菌グルコアミラーゼの多様性

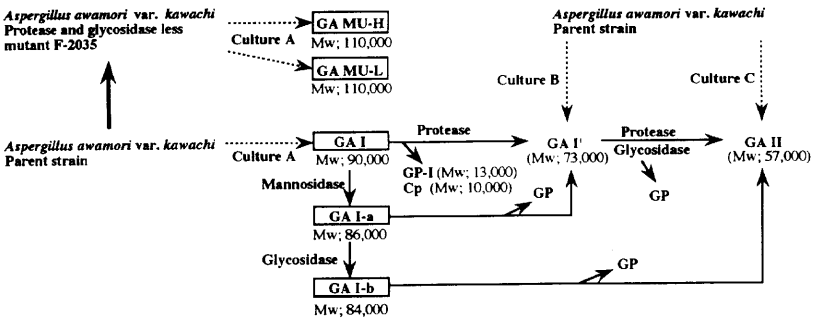
九州，沖縄特産の乙類焼酎の製造に使用されている河内黒麹菌 *Aspergillus awamori* var. *kawachi* は，単一菌株によって基質分解曲線，生澱粉分解能及び各種安定性を異にする多種類のグルコアミラーゼ（GA）を産生した（Hayashida *et al.* 1976）．この多様なGAの本体を解明するため，発酵学的手法によりintactなGA分子の生産を企図して制御培養を行った（Hayashida, 1975）．表1に示したように，Culture Aでは，分子量90,000の，糊化澱粉に対しタイプAの分解曲線を示し，生澱粉分解能と同吸着能を有するGA Iだけが，24—30時間という細菌並の速度で選択的に生産された．Culture Bでは，タイプBの水溶性基質分解曲線を示し生澱粉分解能及び同吸着能を欠失し，安定性の低下したGA I’（分子量 73,000）が，さらにCulture Cでは，タイプCの分解曲線を示し生澱粉分解能及び同吸着能を欠失し，極めて不安定なGA II（分子量 57,000）が，培養条件の相違によってそれぞれ選択的に生産された．このCulture A，B及びCを用いた制御培養の結果から，*in vivo* で黒麹菌培養の際，随伴酵素として生産されるプロテアーゼと，マンノシダーゼ，N-アセチルグルコサミニダーゼ等のグリコシダーゼにより，プロトタイプのGAのポリペプチド鎖及び結合糖鎖が段階的に限定分解され，上述のように性質を相違する多様な低分子のGAへと変換することにより，GAの多様性が発現することを見いだし確証した（Yoshino *et al.* 1978）．

2．グルコアミラーゼの多様性発現機構と親和部位

GAの多様性発現機構に関しては，上述の *in vivo* での翻訳後のプロテオリシスによるタンパク質レベルの機構とは異なり，Boel *et al.* (1984) は，*Aspergillus niger* GAをコードするmRMAのスプライシングの有無によるRNAレベルでの多様性発現調節機構を報告した．それ故，*A. awamori* var. *kawachi* から全mRNAの取得を行った後，その無細胞系翻訳産物を抗GA抗体で免疫沈降させSDS-PAGEにて翻訳産物を検した結果，分子量69,000の糖鎖のないGA Iに相当する唯一のタンパク質バンドを認めた（Hayashida *et al.* 1988a）．つまり，多様なGA群の本体は，単一のDNAの産物としてのGA Iであり，GA Iの多様

Table 1. Mechanism for the occurence of multiplicity of glucoamylase

Classification of glucoamylase		Type A	Type B	Type C
Degree of maximum hydrolysis	Glycogen	100%	80%	40%
	Gelatinized starch	90%	90%	60%



▭ ; Raw starch-adsorbable and - digestible glucoamylase

GP; Glycopeptide generated from the limited proteolysis of glucoamylase

性はBoelらのmRNAスプライシング過程に起因するのではなく，翻訳後のプロテオリシスに起因することを確証し，現在では彼らもこれを是認している．

原型GA Iの *in vivo* プロテオリシスによる“ある領域”の欠失が，GA I'あるいはGA IIへと変換させ，同時に生澱粉分解能を特異的に欠失することから，生澱粉分解時におけるこの欠失領域の重要性が示唆され，その取得に努めた．GA Iに，細菌アルカリプロテアーゼ，サブチリシンを加えて *in vitro* プロテオリシスを行った結果（Hayashida *et al.* 1978: Fukuda *et al.* 1992b), GA Iは，分子量73,000のGA I'，分子量13,200の糖ペプチド(GP-I)，並びに分子量10,000のCpへと変換した．GA I'は，GA Iと同様，糊化澱粉分解能を示したが，生澱粉吸着能及び同分解能を特異的に欠失した．一方，GP-I並びにCpは，酵素活性を示さなかったが，ともに生澱粉吸着能を有しており，特に，後者の方で顕著であった．つまり，GA Iの活性部位はGA I'領域に保持されたが，生澱粉吸着能はそれとは離れて独立したGP-I並びにCp領域において発現することを認めた．触媒機能をもつGA I'以外の領域，すなわち生澱粉吸着に関与するGP-I及びCpの領域を“生澱粉親和部位”と名づけ，生澱粉分解はこの親和部位と，糊化澱粉分解を触媒する活性部位との共同作用によって進行するものと考察した．

3．生澱粉親和部位としてのGP-I並びにCpの構造

A. awamori var. *kawachi* GA I遺伝子を取得し，その塩基配列解析によってGA Iの一次構造を推定した（Hayashida *et al.* 1989c). *A.niger* GAとの間に35アミノ酸残基の置換と1残基の欠失が認められ，本株GA I分子のうち，GP-IはAla[470]からVal[514]に，CpはC末端のAla[515]からArg[615]に位置することを明らかにした．図1で示したように，GP-Iを構成する45アミノ酸残基のうち，30残基はThr及びSerつまりヒドロキシアミノ酸によって構成され，両アミノ酸残基に56個のマンノース残基が平均2個の割合で結合するという特異構造を見いだした（Hayashida *et al.* 1989a)．一方，101個のアミノ酸残基からなるC末端ペプチドのCp領域は，ハイドロパシープロットから，3つの疎水性領域を有していた（Fukuda *et al.* 1992b)．

4．生澱粉分解能の発現に必須な親和部位GP-I並びにCpの機能

GA Iは，α-，β-及びγ-シクロデキストン(CD)と特異的に結合することによって，糊化澱粉分解能にはほとんど影響を与えていないが，生澱粉吸着能及び同分解能を特異的に阻害した（図2，Fukuda *et al.* 1992b)．さらに，図3の様にGA I，GA I'，GP-I及びCpをα-CD-Sepharose 6Bカラムへ供与すると，GA I'及びGP-Iはゲルに吸着されず素通りしたが，

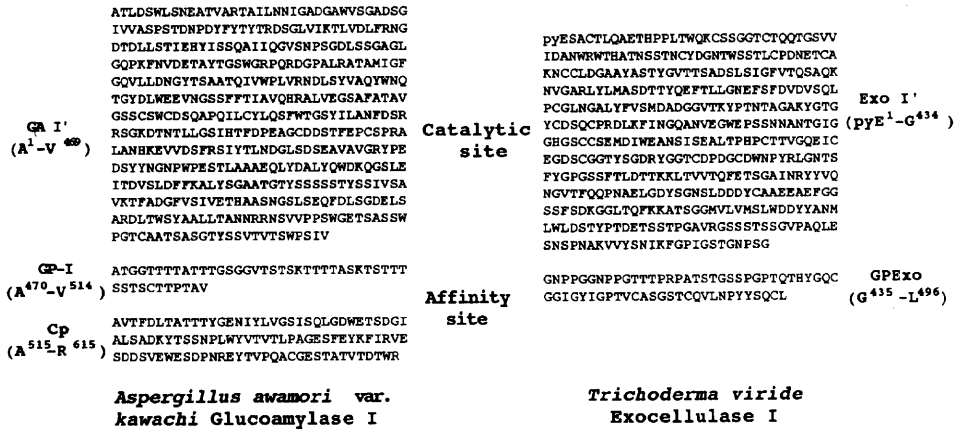


Fig.1. Deduced amino acid sequence of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* glucoamylase I and *Trichoderma viride* exocellulase I.

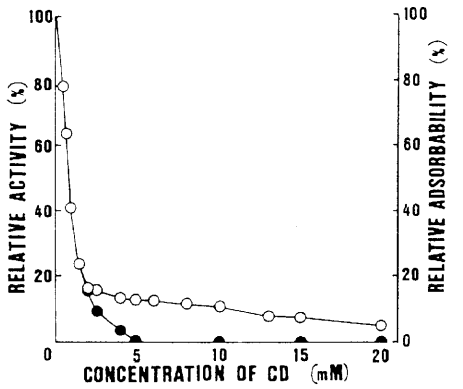


Fig.2. Effects of α-cyclodextrin(CD) on raw starch-digestibility and raw starch-adsorbability by GA I.
Symbols; Relative activity of raw corn-starch-digestibility(●)and relative adsorbability of GA I on raw corn-starch-adsorbability(○)in the presence of α-CD.

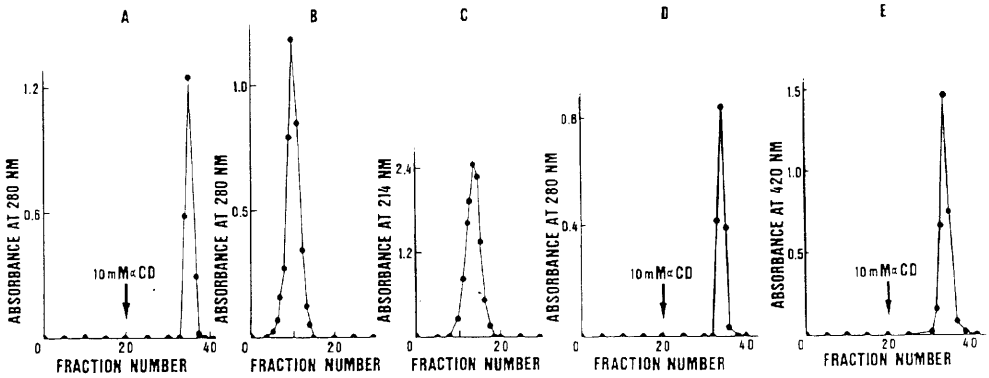


Fig.3. Affinity chromatography on α-CD-Sepharose 6B.
A,B,C,D,and E show the elution patterns of GA I,GA I',GP-I,Cp, and β-galactosidase fusion protein including GP-I and Cp regions, respectively.

GA I及びCpはゲルに吸着し，10mMのα-CD溶液で溶出された．さらに，親和部位であるGP-I及びCpを含む大腸菌β-ガラクトシダーゼ融合タンパク質も，α-CDゲルに対しGA I及びCpと同様の挙動を示した．この結果から，GA IとCDの吸着相互作用は親和部位内のGP-I領域ではなくCp領域において生起することを明示した．

X線解析データから，生澱粉のでんぷん分子構造はらせん状をなし，垂直軸の方向にCDのリング状構造に類似することが報告されており（Imberty *et al.* 1988），従って生澱粉粒とCDに対し，GA Iがともに吸着能を示すものと考察した．α-D-(1-4)-グルカンが，らせん状の生澱粉ミセル，あるいは環状のCDのような3次元構造を持つ場合，両分子におけるくぼみの内側は，ゲストの疎水基と包接化合物を形成するのに適した疎水環境となっている．GA IとCD間の吸着はpH非依存性であり（図4，Fukuda *et al.*, 1992b），CD添加による差スペクトルの変化からGA Iと生澱粉との吸着は，GA I親和部位内のCp領域のTrp残基などと，生澱粉分子のらせん構造の内孔との間に特異的に包接化合物を形成することに起因するという分子認識のメカニズムを呈示した．

一方，親和部位の一部であるGP-Iは，酵素活性及びCDゲル吸着能を全く示さないが，GP-IをGA Iの生澱粉分解系に添加することによりGA Iの生澱粉分解能を2.5倍に増加させた（図5，Hayashida *et al.* 1989b）．これに類似した結果を，ブタすい臓α-アミラーゼのトリプシン消化物由来の分子量20,000の糖ペプチドでも認めた（Hayashida *et al.* 1991）．

さらに，*A. awamori* var. *kawachi* のプロテアーゼ及びグリコシダーゼ欠損変異株F-2035を取得し，Culture Aの培養液から，糖含量が33%と親株GA Iの2倍に増加した分子量110,000のGA MU-Hを精製した（Fukuda *et al.* 1992a）．GA MU-Hのアミノ酸組成とその末端アミノ酸はGA Iのそれと完全に一致し，GA MU-HとGA Iの分子量の相違が結合糖鎖量の

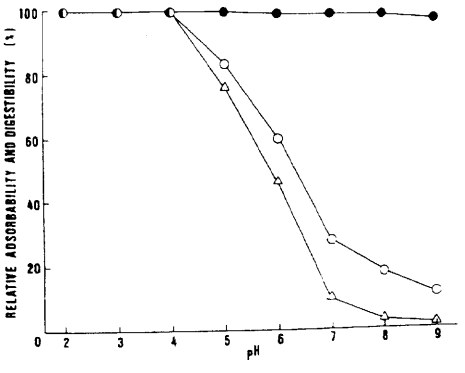


Fig.4. pH dependency on raw starch-adsorption,raw starch-digestibility and α-CD-Sepharose 6B-adsorbability of GA I.
Symbols; raw corn-starch-adsorption(○),α-CD-Sepharose 6B-adsorption(●),raw-starch-digestibility(△).

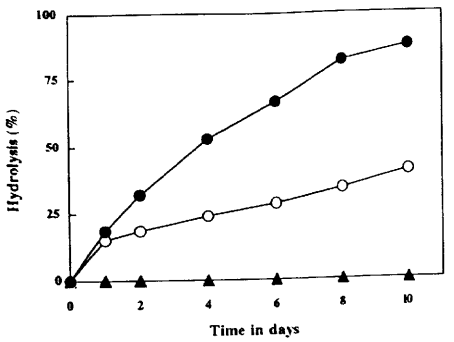


Fig.5. Effect of GP-I on raw starch-digestion by GA-I.
Symbols; GA I 0.72U/mg starch and 0.05mg/mg starch of GP-I(●), GA I(○),and GP-I(▲).

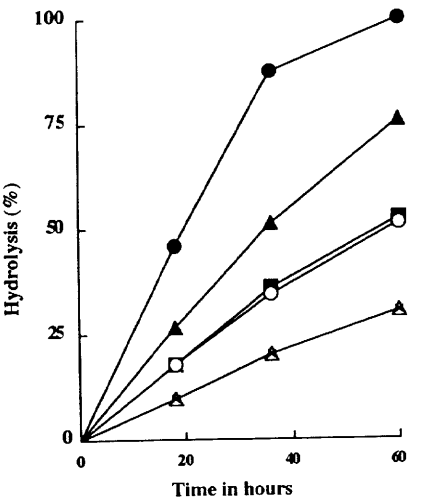


Fig.6. Effects of partial removal of carbohydrate from GA I and GA MU-H on their ability to digest raw starch.
Symbols; GA I(○),GA MU-H(●), glycosidase-digested GA I(△), glycosidase-digested GA MU-H(▲), twice glycosidase-digested GA MU-H(■),GA MU-L(×).

相違によるものであることが明確となった．GA MU-H の酵素化学的性質を検したところ，GA MU-H の糊化澱粉分解能及び生澱粉，α-CD 吸着能は GA I と同一であったが，図 6 に示したように生澱粉分解能は GA I の 2.5 倍に増加した．また GA MU-H はグリコシダーゼ処理により GA I と同一の糖含量を持った GA へと変換すると同時に，生澱粉分解能も GA I と同レベルまで低下した（図 6）．

一方，F-2035 株は，Culture A に 0.5%の酵母エキス及びカザミノ酸を添加した培地では，GA MU-H と分子量，アミノ酸組成そして糖含量を同一とするが，その結合糖鎖であるマンノースのうち約 4 分の 1 がグルコースに置換した GA MU-L を産生した（表 2）．GA MU-L は，結合糖鎖の一部が置換しただけであるにも関わらず，図 6 に示した通り GA MU-H とは対照的に生澱粉分解能だけが GA I に比して，2 分の 1 と低下した．この結果から，GA I による生澱粉分解において結合糖鎖の量及び組成（特にマンノース）が重要であることが示唆された．さらに，GP-I の生澱粉分解促進能及び GA MU-H で認められた生澱粉分解能の特異的増大といった結果を踏まえて，Hayashida *et al.*

Table 2. Carbohydrate composition of parental and mutant glucoamylases.

Carbohydrate	GA I	GA MU-H	GA MU-L
Mannose	79	196	143
Glucose	2	2	54
Galactose	1	1	4
N-Acetyl-β-D-glucosaminide	1	1	1
Xylose	2	2	2

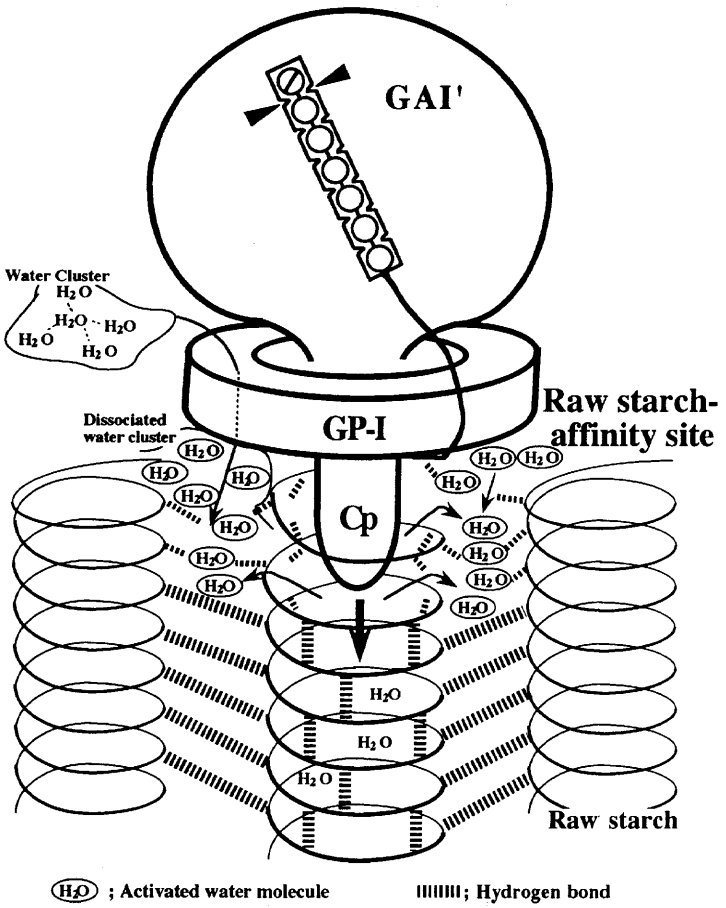


Fig.7. A hypothetical model for raw starch-digestion by GA I.

(1989b) はGP-I領域の機能を説明するものとして“水分子クラスター構造の破壊モデル”を呈示した.

D-マンノースは,水分子同士の結合を破壊し,D-グルコースは,逆にそれを安定化させるという知見を基礎として,GP-Iの高密度なマンノシド鎖の分極した水酸基と,安定なクラスター構造をとっている双極子としての水分子との相互作用によって,活性化されたエンタルピーに富む単分子状態の水分子が生成し,その活性水分子が澱粉分子間の水素結合を攻撃して局部的な水和(糊化)が促進される.GA MU-HとGA MU-Lにおける生澱粉分解能の違いも,このモデルから理解される.

このモデルをさらに立証するため,GA MU-Hを用い,H_2O及びH_2Oよりも強力な水素結合(より安定なクラスター構造)を形成するD_2O中での基質との相互作用の検討を行った.GA MU-Hの糊化澱粉に対するKm値及びVmax値,β-CDの結合数及び解離定数,及び生澱粉吸着能は,D_2O及びH_2O中で,いずれも同一であったが,生澱粉分解力のみがD_2O中において20%低下した.つまり,活性部位及び親和部位による触媒能及び生澱粉吸着能はD_2O中では影響されていないことから,生澱粉分解力の低下がGP-I領域によるD_2O分子のクラスター構造の破壊機能の阻害に起因するものと考察した.

以上の知見に基づきGA Iによる生澱粉分解メカニズムを図7にまとめた.GA Iによる生澱粉の分解は吸着,糊化促進及び水解といった3つの過程を経る.まず,Cp領域で立体的に生澱粉分子を認識し,同領域内の疎水性あるいは芳香族アミノ酸残基(Trp, Tyr)が,疎水的環境にあるラセン構造の内孔で包接複合体を形成することによりGA Iが生澱粉に吸着する.吸着反応と同時にラセン内包接水の活性化が起こり,次いでその活性水分子が生澱粉分子内水素結合を破壊する.瞬時に隣接したGP-I領域で,生澱粉の表面を覆っている水分子の活性化に伴う澱粉分子間の水素結合が切断され,直ちに生澱粉ミセルは水和される.澱粉分子の十分に水和された部分は,親和部位との親和力を失うと同時に触媒ドメインであるGA I'との間に親和力を生じ,活性中心のサブサイトに取り込まれ,グルコースを生成するように非還元末端から水解が行われる.

5.親和部位に基づくアミラーゼの新分類系の構築

上述のGAと同様,α-アミラーゼも親和部位の有無により二大別されるものと推考し,従来は生澱粉分解能を有していないとされている糸状菌,細菌及び酵母のα-アミラーゼについて同分解能を検索した.

Aspergillus ficum 4320のプロテアーゼ低産生変異株は生澱粉分解能,同吸着能を有した分子量88,000の耐酸性α-アミラーゼを産生し,プロテアーゼ高産生変異株は,タカアミラーゼと同様の分子量54,000の生澱粉非分解,非吸着性,非耐酸性のα-アミラーゼを産生した(Hayashida *et al.* 1986a).

次いで細菌の液化型及び糖化型α-アミラーゼにも生澱粉分解能を有する酵素を見いだした.特に*Bacillus subtilis* 65糖化型α-アミラーゼは生澱粉非吸着性であるのに,難分解性のバレイショ澱粉粒に対しても強力な分解能を示す特異な酵素であった(Teramoto *et al.* 1989).

さらに,*Lipomyces starkeyi* HN-606は新規な生澱粉分解性糖化型α-アミラーゼを産生した.GA Iと同様に生澱粉分解能は,いずれのα-アミラーゼでもプロテアーゼによって特異的に失活し,糊化澱粉分解能は保持された.さらに,α-CDによって生澱粉吸着能及び同分解能を特異的に阻害された(Punpeng *et al.* 1992).以上の結果から,全てのアミラーゼが親和部位の有無によって二大別されるという確証を得た.

III 天然セルロース分解性セルラーゼ

1.親和部位の有無によるC_1及びC_x型セルラーゼの定義とセルラーゼ新分類系の構築

GA Iの知見を基礎として,各種糸状菌セルラーゼにおける天然セルロース分解能の有無は,翻訳後のプロテオリシスによる親和部位の欠失に起因することを明らかにした.

まず,*Humicola grisea* var. *thermoidea* YH-78のプロテアーゼ低産生変異株No.140並びに同高産生株No. 191が取得され,No.140株エンドセルラーゼ(分子量128,000)は,天然セルロース類似の微結晶セルロースであるアビセル吸着能及び同崩壊能を示したのに対し,No.191株エンドセルラーゼ(分子量63,000)は,アビセル吸着能及び同崩壊能を欠失した(Hayashida *et al.* 1986b).

Geotrichum candidum HM-11アビセル吸着・崩壊性エンドセルラーゼ(分子量130,000)は,サブチリシン処理により,分子量8万のアビセル非吸着,非崩壊性エンドグルカナーゼに変換した(Mo *et al.* 1988).

さらに,*Trichoderma viride* プロテアーゼ低産生変異株HK-75アビセル吸着・分解性エンドセルラーゼEndo III(分子量61,000)は,パパイン処理によりアビセル吸着能及び分解能だけを特異的に低下した

Table 3. Classification of fungal cellulases on the basis for the theory of affinity site.

I .C_1 type(Avicel-adsorbable, Avicel-hydrolyzing, Affinity site-carrying)	
I .1 Endo-cellulase	
I .1.a Reducing sugar non-forming	(*Humicola grisea*)
	(*Geotrichum candidum*)
I .1.b Reducing sugar forming	
I .1.b.1 More random endo-type	(*Geotrichum sp.* ECI,III)
	(*Trichoderma viride* Endo III,IV)
I .1.b.1 Less random endo-type	(*Geotrichum* sp. EC II)
	(*T.viride* Endo I ,II)
I .2 Exo-cellulase	
I .2.a Strictly exo-type (Cellobiohydrolase)	(*Aspergillus ficum* CBH I)
I .2.b Random exo-type	(*T. viride* Exo I)
I .3.β-glucosidase	(*A.ficum*)
II.Cx type(Avicel-unadsorbable, Avicel-non-hydrolyzing,Affinity site-deficient)	
II.1 Endo-cellulase	(*Humicola insolens, T.viride* Endo III')
II.2 Exo-cellulase	(*A.ficum* CBH II, *T.viride* Exo I')
II.3 β-glucosidase	(*A.ficum*)

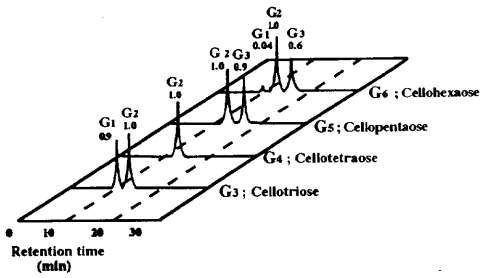


Fig.8. Hydrolysis patterns of celloligosaccharides by Exo I.

Endo III'(分子量43,000)及びアビセル吸着能だけを有した糖ペプチド，GPEndo(分子量12,000)に変換した．

一方，エキソセルラーゼについては，免疫学的に同一な *Aspergillus ficum* IFO4034 の CBH I (分子量128,000) 及び CBH II (分子量50,000) が，ともにセロオリゴ糖を厳密にセロビオース単位で分解したのに対し，CBH IIは，CBH Iで認められたアビセル吸着能及び同分解能を特異的に欠失した (Hayashida *et al.* 1988b)．さらに，*T. viride* HK-75 のエキソセルラーゼ (Exo I ,分子量65,000) は，パパインにより Gly^{434}-Gly^{435}間を切断されて，水溶性基質分解能はintactなExo Iと同一パターンを示すがアビセル吸着能及び同分解能を特異的に欠失したExo I' (分子量56,000) 並びにアビセル吸着能だけを有するC-末端側の糖ペプチド，GPExo(分子量9,000)へと変換した (Goto *et al.* 1992)．

以上の結果から，生澱粉分解性アミラーゼと同様，糸状菌 *Humicola, Geotrichum, Aspergillus* そして *Trichoderma* 由来の天然セルロース分解型エンド並びにエキソセルラーゼは，いずれも通常の活性部位を持つ酵素ドメインに加えて，それとは別個の結晶セルロース吸着能を有する親和部位ドメインから構成されており，結晶セルロースの分解は，アミラーゼと同様，親和部位による天然結晶セルロースへの特異的吸着によって開始されるものと考察した．

さらに本知見から，その実体が永年不明であったReese *et al.* (1950)の C_1及び C_x酵素は，この結晶セルロース親和部位の有無に起因するものであり，C_1酵素が，親和部位を保持する天然セルロース吸着能及び同崩壊，分解能を有するセルラーゼであり，親和部位を欠失し両能力を失なったセルラーゼが C_x型酵素であることが明示された．

2．エンド並びにエキソセルラーゼのセルロース基質分解機作

C_1型エンドセルラーゼは，水溶性高分子量基質であるカルボキシメチルセルロース (CMC) を急激に粘度低下させるが，アビセル作用時に還元糖を遊離しない崩壊型 (*H. grisea* EG 並びに *G. candidum* EC I) と，グルコースとセロビオースといった還元糖を遊離する分解型 (*Geotrichum* sp. EC I～IV及び *T. viride* Endo I～IV) とに分類される (表3)．

一方エキソセルラーゼに関しては，*A. ficum* CBH I及び *T. viride* Exo I 両酵素は，いずれも反応初期でアビセルをセロビオース (G_2) 単位で分解し，ともにCMCの粘度低下が緩やかであることから，高分子

両基質に対し末端から，エキソ様式で分解するC_1型エキソセルラーゼであると考察された（Hayashida *et al.* 1988b: Goto *et al.* 1992）．

A. ficum CBH Ⅰは，セロトリオース（G_3）からセロヘキサオース（G_6）に至る各セロオリゴ糖を厳密にG_2単位で分解し，還元セロトリオースをG_2とソルビトールに，つまり非還元性末端から厳密にG_2単位で分解した．

これに対し，図8に示したように，Exo ⅠはG_3からG_5のセロオリゴ糖を厳密にG_2単位で分解したが，G_6を基質とした場合はG_2だけではなくG_3も生成した．この結果は *T. viride* Endo Ⅰのセロオリゴ糖分解パターンに類似していたが，両酵素の活性ドメイン間には免疫的相同性は認められず，アビセル分解生成糖及びCMC粘度低下の点でも明確な相違を認め，Exo Ⅰが単なるエンドタイプのセルラーゼではないことが示唆された．Exo Ⅰが，G_6をG_2,G_3単位で分解を行う要因として，Exo Ⅰの活性部位の立体構造が *Trichoderma reesei* CBH Ⅱの活性部位のようなトンネル型の立体構造（Rouvinen *et al.* 1990）を形成していることが推察された．

一方，Okada *et al.* (1988)は，*T. viride* の市販セルラーゼ製剤（メイセラーゼ）中で最もCMC液化活性が弱くエキソタイプに近いとされるCellulase Ⅲのセロオリゴ糖分解生成糖がG_1,G_2そしてG_3であることとアビセル分解生成糖が比較的著量グルコースを含むことから，*T. viride* セルラーゼ系には，エキソセルラーゼは存在せず，Cellulase Ⅲは，less random なエンドセルラーゼであると報告している．

しかし，Exo ⅠはG_4を厳密にG_2だけに分解し，アビセルから反応初期段階でG_2だけを生成することから，Cellulase Ⅲとは異なっており，さらに，上述のようにG_6から特異的にG_2のほかG_3をも生成する点では，厳密に非還元末端からG_2単位で水解を行うセロビオヒドラーゼとも異なるが，文字どおり末端からセルロース鎖の分解を行うエキソタイプのセルラーゼであると考察した．

以上のように，C_1型エキソセルラーゼは，*A. ficum* CBH Ⅰのような非還元性末端から厳密にセロビオース単位で分解を行うセロビオヒドラーゼと，セルロース鎖の末端から分解するが基質の構造によってはlooseな分解様式をとりうるものとに分類された．

従って，表3に示した様にセルラーゼに関しても，アミラーゼと同様，C_1型並びにC_x型酵素のそれぞれに，エンドタイプ並びにエキソタイプが存在することが確証され，C_1-C_xといったセルラーゼの天然セルロース分解能や，エンド及びエキソセルラーゼの基質分解パターンには複雑な多様性が存在することが見いだされた．

3．C_1型セルラーゼによる天然セルロース分解機構

天然セルロースの分解機構の特徴として，通常，結晶セルロース分解時に作用機作の異なるエンドタイプとエキソタイプの両者の存在による共同作用，いわゆる相乗効果が認められる．*Trichoderma viride* プロテアーゼ低産生変異株HK-75は，上述した1種のC_1型エキソセルラーゼExo Ⅰとセロオリゴ糖分解機作の異なる3種のC_1型エンドセルラーゼ（Endo Ⅰ, Endo Ⅲ及びEndo Ⅳ）を産生する．これらC_1型セルラーゼ間におけるアビセル分解の相乗効果を検したところ，エキソ及びエンド間で，特にExo Ⅰ及びEndo Ⅲ間において最も顕著であった．

そこで，Exo Ⅰ及びEndo ⅢといったC_1及び，それらからプロテオリシスで得られたExo Ⅰ'及びEndo Ⅲ'といったC_x型のセルラーゼを用い，結晶セルロース分解における相乗作用について検討を行った．結晶セルロースの分解は，C_1タイプ同士のExo Ⅰ及びEndo Ⅲ共存下で最も相乗的な分解が認められ，エキソあるいはエンド型酵素の一方が，C_xタイプである場合には相乗効果は低下し，C_x同士ではほとんど結晶セルロースは分解されなかった．つまり，結晶セルロース分解を効率的に行うためには，結晶セルロース親和部位を有したC_1タイプの多成分のセルラーゼの作用が必要であることが示唆された．

セルラーゼの本来の性質である天然セルロース分解能の発現は，セルラーゼ産生菌自身によるプロテオリシスに起因する親和部位の有無に依存する．天然結晶セルロース分解反応は，親和部位を有するC_1型エンド及びエキソ両酵素が，親和部位を通じて結晶セルロースに吸着することにより開始され，C_1型のエキソ並びにエンド両酵素の協同作用によって効果的に進行するものであり，生澱粉分解性アミラーゼ系と，ドメイン構造や結晶性基質分解機作に関して類似した性質を有することが明らかとなった．

摘　　要

黒麹菌 *Aspergillus awamori* var. *kawachi* は培養条件の相違により，単一菌株によって基質分解曲線，生澱粉分解能及び各種安定性を異にする多種類のグルコアミラーゼ(GA)を産生した．これらGAの多様性は，

黒麹菌培養の際，随伴酵素として生産されるプロテアーゼとグリコシダーゼによる原型GA Ⅰの翻訳後における修飾に起因するものであった．

GA Ⅰ分子は，糊化澱粉分解を触媒するGA Ⅰ'領域と生澱粉水和促進能及び同吸着能を有する生澱粉親和部位であるGP-Ⅰ及びCp領域からなり，生澱粉分解能は，触媒部位及び親和部位の協同作用によって発現した．すなわちCp領域が，生澱粉のでんぷん分子らせん構造の内孔と疎水結合的に包接複合体を形成することにより，GA Ⅰは生澱粉に吸着し，同時にGP-Ⅰ領域の結合糖鎖によって，でんぷん分子の周りの水分子クラスターが破壊され，生じた活性水分子がでんぷん分子間の水素結合を破壊することで生澱粉が糊化される．ついで，十分に糊化されたアミロース鎖が，親和部位との親和力を失うと同時にGA Ⅰ'領域のサブサイトと親和力を生じ，サブサイトへ取り込まれていき，分解反応が遂行される．

生澱粉分解能の発現に必須な生澱粉親和部位の知見を基に，糸状菌，酵母，細菌由来のアミラーゼに関して親和部位の存在の検討を行ったところ，いずれも親和部位の存在が確認され，全てのアミラーゼが親和部位の有無によって二大別されるという確証を得た．

ついで，アミラーゼの親和部位理論を基礎として，糸状菌エンド並びにエキソセルラーゼが，結晶セルロース親和部位の有無により，親和部位を有する結晶セルロース吸着能及び同分解能を持ったC_1と，親和部位を欠失し結晶セルロース吸着能及び同分解能を消失したC_xとに2大別された．

Trichoderma viride Exo Ⅰは，パパインによりGly^{434}-Gly^{435}間を切断され，水溶性基質分解能はintact Exo Ⅰと同様であったが，結晶セルロース吸着能及び同分解能を特異的に失ったExo Ⅰ'と結晶セルロース吸着能だけを有する結晶セルロース親和部位GPExoへと変換した．以上のように，結晶性天然多糖の分解を行うアミラーゼ及びセルラーゼにおいて，ドメイン構造及び分解機作の点で類似性が認められた．

文　献

Boel,E., I.Hjort, B.Svensson, F.Norris, K.E.Norris and N.P.Fiil 1984 Glucoamylases G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs. *EMBO J.*, **3**: 1097-1102

Fukuda,K., Y.Teramoto and S.Hayashida 1992a The hyperdigestion of raw starch by a carbohydrate-rich glucoamylase from a protease- and glycosidase-negative mutant of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* F-2035. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**: 8-12

Fukuda,K., Y.Teramoto, M.Goto, J.Sakamoto, S. Mituiki and S.Hayashida 1992b Specific inhibition by cyclodextrins of raw starch digestion by fungal glucoamylase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**: 556-559

Goto,M., K.Furukawa and S.Hayashida 1992 An Avicel-affinity site in an Avicel-digesting exocellulase from a *Trichoderma viride* mutant. *Biosci. Biotec. Biochem.*, **56**: 1523-1528

Hayashida,S. 1975 Selective submerged production of three types of glucoamylases by a black-koji mold. *Agric. Biol. Chem.*, **39**: 2093-2099

Hayashida,S., T.Nomura, E.Yoshino and M.Hongo 1976 The formation and properties of subtilisin-modified glucoamylase. *Agric. Biol. Chem.*, **40**: 141-146

Hayashida,S., S.Kunisaki and M.Nakao 1982 Evidence for raw starch affinity site on *Aspergillus awamori* Glucoamylase I. *Agric. Biol. Chem.*, **46**: 83-89

Hayashida,S. and Y.Teramoto 1986a Production and characteristics of raw-starch-digesting α-amylase from a protease negative *Aspergillus ficum* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**: 1068-1073

Hayashida,S. and K. Mo 1986b Production and characteristics of Avicel-disintegrating endoglucanase from a protease-negative *Humicola grisea* var. *thermoidea* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**: 1041-1046

Hayashida,S., K.Nakahara, K.Ohta, S.Iwanaga, T. Miyata and Y.Sakaki 1988a Evidence for post-translational generation of multiple forms of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* glucoamylase. *Agric. Biol. Chem.*, **52**: 273-275

Hayashida,S., K. Mo and A. Hosoda 1988b Production and characteristics of Aviceldigesting and non-Avicel-digesting cellobiohydrolases from *Aspergillus ficum*. Appl. Environ. Microbiol., **54**: 1523-1529

Hayashida,S., K.Nakahara., K.Kuroda, T.Miyata and S.Iwanaga, 1989a Structure of the raw-starch-affinity site on the *Aspergillus awamori* var. *kawachi* glucoamylase I molecule. *Agric. Biol. Chem.*, **53**: 135-141

Hayashida,S., K.Nakahara, W.Kanlayakrit, T. Hara and Y.Teramoto 1989b Characterisitcs and function of raw-starch-affinity site on *Aspergillus awamori* var. *kawachi glucoamylase I molecule. Agric. Biol. Chem.*, **53**: 143-149

Hayashida,S., K.Kuroda, K.Ohta, S.Kuhara, K.Fukuda and Y.Sakaki 1989c Molecular cloning of the glucoamylase I gene of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* for localization of the raw-starch-affinity site. *Agric. Biol. Chem.*, **53**: 923-929

Hayashida,S., Y.Teramoto and I.Kira 1991 Promotive and inhibitory effects of raw starch adsorbable fragments from pancreatic α-amylase on enzymatic digestions of raw starch. *Agric. Biol. Chem.*, **55**: 1-6

Imberty,A., H.Chanzy and S.Perez 1988 The double-helical nature of the crystalline part of A-starch. *J. Mol. Biol.*, **201**: 365-375

Mo,K. and S.Hayashida 1988 Conversion of *Geotrichum candidum* endocellulase I to endocellulase II by limited proteolysis. *Agric. Biol. Chem.*, **52**: 1683-1688

Okada,G. and Y.Tanaka 1988 Nonexistence of Exocellobiohydrolase(CBH) in the cellulase system of *Trichoderma viride*. *Agric. Biol. Chem.*, **52**: 2981-2984

Punpeng,B., Y.Nakata, M.Goto, Y.Teramoto and S. Hayashida 1992 A novel raw-starch-digesting yeast α-amylase from Lipomyces starkeyi HN-606. *J.Ferment. Bioeng.*, **73**: 108-111

Reese,E.T., R.G.H.Siu and H.S.Levinson 1950 The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis *J.Bacteriol.*, **59**: 485-497

Rouvinen,J., T.Bergfors, T.Teeri, J.K.C.Knowles and T.A.Jones 1990 Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science* **249**: 380-386

Teramoto,Y., I.Kira and S.Hayashida 1989 Multiplicity and preferential inactivation by proteolysis as to raw starch-digestibility of bacterial α-amylases. *Agric. Biol. Chem.*, **53**: 601-605

Yoshino,E. and S.Hayashida 1978 Enzymatic modification of glucoamylase of *Aspergillus awamori* var. *kawachi*.*J. Ferment. Technol.*, **56**: 289-295

Summary

Aspergillus awamori var.*kawachi* produces three type of glucoamylase: raw starch-adsorbable and -digesting GA I (MW,90,000; type A),raw starch-nonadsorbable and -nondigesting GA I '(MW,73,000; type B),and GA II(MW,57,000; type C). The multiplicity of these glucoamylases and the specific conversion of the ability to digest raw starch were brought by the stepwise degradation of original GA I by protease and glycosidases. A raw starch-affinity site which is composed of GP- I (A^{470}-V^{514})and Cp(A^{515}-R^{615})regions on the GA I molecule, was essential for raw starch-adsorption and raw starch-digestion. The GP- I region promoted to digest raw starch and thus concluded to have the ability to hydrate raw starch. On the other hand, the Cp region has the ability to adsorb onto raw starch and cyclodextrins which were analogous to raw starch in terms of three dimensional structure. Adsorption onto raw starch of GA I mediated by Cp region occurred in the formation of inclusion complex through the hydrophobic interaction. Therefore raw starch-digestion of GA I was initiated by adsorbing onto and hydration of raw starch through the raw starch-affinity site. The well-hydrated part of starch molecule lost the affinity toward raw starch-affinity site, and hence starch molecule was captured by the active site located in GAI' region. All raw starch-digesting amylases derived from other microorganism, bacteria, fungi, and yeast had the raw starch-affinity site and thus all amylases could be classified into two types whether the presence of raw starch-affinity site or not.

On the basis of the affinity site theory, fungal endo-, and exocellulases were also classified into two types; C_1(Avicel-adsorbable, Avicel-digesting, and Avicel-affinity site-carrying) and Cx(Avicel-unadsorbable, Avicel-nondigesting and Avicel-affinity site-deficient). *Trichoderma viride* Exo I(E^1-L^{496},MW,65,000) was limitedly proteolyzed into the two fragments, Exo I'(E^1-G^{434};MW,56,000) and GPExo(G^{435}-L^{496};MW,9,000). The GPExo designated as Avicel-affinity site had intensive adsorbability onto Avicel but no catalytic activity toward

cellulosic substrates. The Exo I' showed identical activity to that of intact Exo I toward cellooligosaccharides but was almost inert to Avicel in terms of digestibility and adsorbability. Thus domain structure and mode of digesting action of Exo I and glucoamylase were surprisingly similar for these microcrystalline carbohydrate substrates.