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雜誌. 47 (1/2), pp.73-83, 1993-01. 九州大學農學部 バージョン: 権利関係:

"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ー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 河内黒麴菌 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* で黒麴菌培養の 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

; 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GAI'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Ala⁴⁷⁰から Val⁵¹⁴に, CpはC末端のAla⁵¹⁵からArg⁶¹⁵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.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(\bigcirc)and relative adsorbability of GA I on raw corn-starch-adsorbability(\bigcirc)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、生穀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),従って生穀粉粒と CD に対し、GA I がともに 吸着能を示すものと考察した.*a*-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



Fig.4. pH dependency on raw starchadsorption, raw starch-digestibility and α -CD-Sepharose 6B-adsorbability of GA I.

Symbols; raw corn-starchadsorption(\bigcirc), α -CD-Sepharose 6Badsorption(\bigcirc), raw-starchdigestibility(\triangle).



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

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.GAI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GAIと生澱 粉との吸着は,GAI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,ブタすい臟 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.6. Effects of partial removal of carbohydrate from GA I and GA MU-H on their ability to digest raw starch.

Symbols; GA I (\bigcirc),GA MU-H(\bigcirc), glycosidase-digested GA I (\triangle), glycosidase-digested GA MU-H(\blacktriangle), twice glycosidase-digested GA MU-H(\blacksquare),GA MU-L(\times). 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

Table 2.	Carbohydrate composition of parental an	nd
	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- <i>β</i> -D- glucosaminide	1	1	1
Xylose	2	2	2

シダーゼ処理によりGAI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GAI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.*



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、H₂O 及び H₂O 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 D₂O 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、D₂O 及び H₂O 中で、いずれも同 一であったが、生澱粉分解力のみが D₂O 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 D₂O 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 D₂O 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。GAI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 C₁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

I.C ₁ type(Avicel-adsorbable, Avicel-hyd	Irolyzing, Affinity site-carrying)				
I 1 a Reducing sugar non-forming	(Humicola grisea)				
The requering ought non forming	(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	(Aspergillus ficum CBH I)				
(Cellobiohydrolase)					
I.2.b Random exo-type	(T. viride Exo I)				
I .3. <i>β</i> -glucosidase	(A.ficum)				
II.Cx type(Avicel-unadsorbable, Avicel-	non-hydrolyzing,Affinity site-deficient)				

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

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

ーな 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 Gly⁴³⁴-Gly⁴³⁵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).

ー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 (G₂)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 C₁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(G₃)からセ ロヘキサオース(G₆)に至る各セロオリゴ糖を厳密に G₂単位で分解し、還元セロトリオースをG₂とソルビト ールに、つまり非還元性末端から厳密にG₂単位で分解 した。

これに対し、図8に示したように、Exo IはG₃から G₅のセロオリゴ糖を厳密にG₂単位で分解したが、G₆ を基質とした場合はG₂だけではなくG₃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、G₆をG₂,G₃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 G₄を厳密に G₂だけに分解し、ア ビセルから反応初期段階で G₂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 G₆から特異的に G₂のほか G₃をも生成する点で は、厳密に非還元末端から G₂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、C₁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,C₁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、C₁-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. C1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C₁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C₁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C₁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 C₁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、C₁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 C₁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 C₁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、C₁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、 黒麴菌培養の際,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GAI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 C₁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 Gly⁴³⁴-Gly⁴³⁵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 rawstarch-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 αamylase 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-starchdigesting 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 starchadsorbable 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 starchaffinity site. The well-hydrated part of starch molecule lost the affinity toward raw starchaffinity 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; C₁(Avicel-adsorbable, Avicel-digesting, and Avicel-affinity site-carrying) and Cx(Avicel-unadsorbable, Avicel-nondigesting and Avicel-affinity site-deficient). *Trichoderma viride* Exo I(E¹-L⁴⁹⁶,MW,65,000) was limitedly proteolyzed into the two fragments, Exo I'(E¹-G⁴³⁴;MW,56,000) and GPExo(G⁴³⁵-L⁴⁹⁶;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.