

イヌリン分解酵素遺伝子の 分子進化と高効率発現

(研究課題番号 12660297)

平成12年度～平成13年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))
研究成果報告書

平成14年3月

研究代表者 太田 一良
(宮崎大学農学部助教授)

は し が き

イヌリン (inulin) は、 β -2,1結合によるD-フルクトースの重合度30~40の直鎖状ポリマーで、還元末端にグルコース1分子がスクロース型の結合をしている。天然には、チコリの根茎やダリア、キクイモなどの塊茎に貯蔵性多糖として存在し、それらの乾燥重量の約80%を占めている。特にキクイモ (*Helianthus tuberosus* L.) は、気候に対する適応性が極めて大であり、寒冷な地方にも適し、また病害に対しても強いため、至る所に栽培できる未利用生物資源である。微生物由来のイヌリン分解酵素イヌリナーゼは、通常誘導的に産生されるエキソ型イヌリナーゼ (EC 3.2.1.80) である。エキソ型イヌリナーゼは、イヌリン分子の非還元末端から順次フルクトース単位で切断し、スクロース分解活性も併せて示す。研究分担者は、イヌリンに特異的に作用するエンド型イヌリナーゼ (EC 3.2.1.7) を菌体外に構成的に産生する新規な黒麹菌 *Aspergillus niger* No. 12 株を世界に先駆けて発見した。さらに、本菌の培養条件を確立し、細胞外エンド型イヌリナーゼを初めて結晶化し、その酵素化学的諸性質と作用様式を明らかにした。以来、エンド型イヌリナーゼの存在は糸状菌 *Chrysosporium pannorum*、*Penicillium purpurogenum* および *Aspergillus ficuum* に報告されているのみである。最近、当研究室では、エンド型イヌリナーゼ生産菌として新たに *Penicillium* sp. TN-88 株を分離し、その精製酵素について酵素化学的諸性質を明らかにした。これらのエンド型イヌリナーゼは、共通してイヌリン内部のフルクトフラノシド結合を切断し、重合度3~5のイヌロオリゴ糖を生成した。

応用的見地から、*A. niger* No. 12 株からエンド型イヌリナーゼ活性が一層増強された変異株 *A. niger* No. 817 を取得した。この *A. niger* No. 817 とアルコール耐性酵母 *Saccharomyces cerevisiae* No.1200 株を用いた平行複発酵によりイヌリンか

ら高濃度の燃料エタノールを生産した。また、*A. niger* No. 817 のイヌリナーゼ標品を多孔性セルロース・ビーズに固定化し、固定化酵素を充填したバイオリアクターによりイヌリンから低カロリー甘味料としてのフルクトース・シロップの連続生産に応用し、高い生産性を得た。次いで、エンド型イヌリナーゼの構造解析を目的として、*A. niger* No.12 株のゲノムDNAから2個の重複したエンド型イヌリナーゼ遺伝子 (*inuA*と*inuB*) をクローニングし、塩基配列を決定した。その2コピーの重複遺伝子の内、*inuB*のみに転写が認められ、*inuA*は偽遺伝子であると考察した。

これまでの研究成果を踏まえて、本研究では、次の研究成果を得た。

1) 糸状菌*Penicillium* sp. TN-88株のエンド型イヌリナーゼ遺伝子 (*inuC*) およびそのcDNAをクローニングし、塩基配列を決定した。本遺伝子のORF (1,545 bp) は介在配列を含まず、N末端アミノ酸25残基からなるシグナルペプチドと490残基の成熟タンパク質をコードした。成熟タンパク質には3個のシステイン残基、10ヶ所のN-グリコシル化部位が存在した。本遺伝子の推定アミノ酸配列は、糸状菌 *A. niger*と*P. purpurogenum* 起源の同酵素とそれぞれ72%と85%が同一であった。アミノ酸配列に基づき作成した β -フルクトフラノシダーゼ・スーパーファミリーの分子系統樹から、糸状菌エンド型イヌリナーゼは細菌レバナーゼに近縁であると推定した。

2) 近年、イヌリンは、成人病予防のための機能性イヌロオリゴ糖生産の安価な原料として注目を集めている。*A. niger* 変異株817の培養ろ液からエンド型イヌリナーゼを部分精製し、アミノセルロファイブに共有結合により固定化した。固定化酵素をカラムに充填し、5% (w/v) イヌリン溶液から重合度3~5のイヌロオリゴ糖を連続生産するため、カラム温度、流速およびイヌリナーゼ標品の基質イヌリンとスクロースに対する活性比の影響について検討した。これらのイヌロオリゴ糖を高速

液体クロマトグラフィーに供し、重合度により分別精製した。各種腸内細菌による試験管内資化性試験の結果、イヌロトリオース、イヌロテトラオースは大腸菌、クロストリジウム属細菌では資化されず、ビフィズス菌により選択的に利用された。

3) *A. niger* No.12株の培養菌体を石英砂で破碎し、その抽出液から細胞内エキソおよびエンド型イヌリナーゼをDEAE-セルロファイン A-500、続いてセファデックス G-100 および G-200 クロマトグラフィーによりそれぞれ電気泳動的に単一に精製した。エキソ型イヌリナーゼP-IIの比活性は、イヌリンに対して6.6 U/mg、ショ糖に対して22 U/mgであった。エンド型イヌリナーゼP-IIIはイヌリンのみに作用し、比活性は108 U/mgであった。ゲルろ過で測定した分子量は、エキソ型イヌリナーゼP-IIが47 kDa、エンド型イヌリナーゼP-IIIが56 kDaであった。エキソ型イヌリナーゼP-IIとエンド型イヌリナーゼP-IIIの最適pHはそれぞれpH 5.0とpH 5.3、最適温度はそれぞれ55℃と45℃であった。両酵素とも Mn^{2+} で賦活化され、 Ag^+ 、 Hg^{2+} 、p-クロロメルクリ安息香酸で失活した。エキソ型イヌリナーゼP-IIとエンド型イヌリナーゼP-IIIのイヌリンに対するMichaelis定数(K_m)は、それぞれ5.8 mMと0.80 mMであった。

研究組織

研究代表者： 太 田 一 良 (宮崎大学農学部助教授)

研究分担者： 中 村 豊 彦 (宮崎大学農学部教授)

交付決定額

平成12年度 2、700千円

平成13年度 900千円

計 3、600千円

研究発表

(1) 学会誌等

Akimoto, H., Kiyota, N., Kushima, T., Nakamura, T., and Ohta, K.,
Molecular cloning and sequence analysis of an endoinulinase gene from
Penicillium sp. strain TN-88,
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 64 (11), 2328-2335 (2000).

Nakamura, T., Ogata, Y., Kamo, Y., Hirayama, M., and Ohta, K.,
Inulo-oligosaccharides: continuous production from inulin by
immobilized inulinase from *Aspergillus niger*, and *in vitro* utilization by
bifidobacteria,
Food Science and Technology Research, 7 (2), 145-148 (2001).

Nakamura, T., Kuramori, K., Zaita, N., Akimoto, H., and Ohta, K.,
Purification and properties of intracellular exo- and endoinulinases from
Aspergillus niger,
Bulletin of the Faculty of Agriculture, Miyazaki University, 48 (1/2), 49-58
(2001).

(2) 口頭発表

秋元秀俊、清田直幸、中村豊彦、太田一良、糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88株
由来エキソ型イヌリナーゼ遺伝子のクローニング、日本生物工学会大会（平
成12年8月4日、札幌）

Ohta, K., Akimoto, H., and Nakamura, T., Molecular cloning, characterization, and phylogenetic analysis of an endoinulinase gene from *Penicillium* sp. strain TN-88, Fructan 2000 (August 17, 2000, Allora, Switzerland)

Ohta, K., Akimoto, H., and Nakamura, T., Characterization of two copies of endoinulinase gene from *Aspergillus niger*, International Symposium on Molecular Biology of Filamentous Fungi, Aspergilli (October 20, 2000, Tokyo)

秋元秀俊、中村豊彦、太田一良、糸状菌エンド型イヌリナーゼ遺伝子の大腸菌および酵母における発現、日本農芸化学会、日本栄養・食糧学会、日本食品科学工学会西日本支部合同大会（平成12年10月29日、沖縄）

森山 聡、秋元秀俊、末次教雄、中村豊彦、太田一良、糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88株由来エキソ型イヌリナーゼの精製、性質および遺伝子クローニング、日本農芸化学会関西・西日本・中四国支部合同大会（平成13年10月13日、岡山）

秋元秀俊、森山 聡、中村豊彦、太田一良、*Penicillium* sp. TN-88株由来エンドおよびエキソ型イヌリナーゼ遺伝子の解析と分子進化、第1回糸状菌分子生物学コンファレンス（平成13年11月8日、東京）

森山 聡、秋元秀俊、川崎荘志、中村豊彦、太田一良、糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88株由来のイヌリン高親和性エキソ型イヌリナーゼをコードする遺伝子の解析、日本生物工学会九州支部大会（第8回（平成13年12月8日、福岡）

秋元秀俊、中村豊彦、太田一良、*Aspergillus niger* エンド型イヌリナーゼ遺伝子の酵母 *Pichia pastoris* による発現と部位特異的突然変異体の機能解析、日本農芸化学会大会（平成14年3月27日、仙台）