

糸状菌イヌリナーゼの構造と機能に関する研究

(Studies on Structure and Function of Fungal Inulinases)

森山 聡

(Satoshi Moriyama)

2005

目次

	page
略語表 (Abbreviations).....	vi
本研究で使用した菌株とプラスミド (Strains and plasmids used in this study).....	vii
図一覧 (List of figures).....	viii
表一覧 (List of tables).....	x
序論	1
第一章 <i>Penicillium</i> sp. TN-88 株由来エキソ型イヌリナーゼの 精製と性質	
1-1. 緒言	7
1-2. 材料と実験方法	7
1-2-1. 使用菌株と培養条件	7
1-2-2. 酵素活性測定法.....	8
1-2-3. タンパク質量測定法.....	8
1-2-4. エキソ型イヌリナーゼの精製.....	9
1-2-5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動.....	10
1-2-6. 等電点電気泳動.....	10
1-2-7. 酵素活性に及ぼす pH と温度の影響.....	11
1-2-8. 酵素活性に及ぼす金属イオンと阻害物質の影響.....	11
1-2-9. 基質特異性	12
1-2-10. 薄層クロマトグラフィー	12
1-3. 実験結果および考察	13
1-3-1. 酵素の精製	13
1-3-2. 酵素活性に及ぼす pH、温度の影響.....	13
1-3-3. 酵素活性に及ぼす金属イオン、阻害物質の影響.....	13
1-3-4. 基質特異性	13
1-3-5. 加水分解産物の経時的分析	14
1-4. 要約	21

第二章 *Penicillium* sp. TN-88 株エキソ型イヌリナーゼ 遺伝子 *inuD* のクローニングと解析

2-1. 緒言	22
2-2. 材料と実験方法	23
2-2-1. アミノ酸配列の決定	23
2-2-2. 染色体 DNA の調製	23
2-2-3. エキソ型イヌリナーゼ遺伝子に特異的なプローブの作製	24
2-2-4. 染色体 DNA のサザン・ハイブリダイゼーション	25
2-2-5. エキソ型イヌリナーゼ遺伝子を含む DNA 断片のクローニ ングと塩基配列の決定	26
2-2-6. プロモーター領域を含む DNA 断片のクローニングと塩基配列 の決定	26
2-2-7. 全 RNA の調製	27
2-2-8. mRNA の分離	27
2-2-9. First-strand cDNA の合成	28
2-2-10. RACE 法による mRNA の 5' 末端の決定	28
2-2-11. RACE 法による mRNA の 3' 末端の決定	29
2-2-12. エキソ型イヌリナーゼ cDNA の解析	29
2-2-13. <i>inuD</i> 遺伝子と <i>inuC</i> 遺伝子の転写解析	29
2-2-14. その他の方法	30
2-3. 結果および考察	33
2-3-1. 精製酵素の部分アミノ酸配列	33
2-3-2. エキソ型イヌリナーゼ遺伝子に特異的なプローブの作製	33
2-3-3. 染色体 DNA のサザン・ハイブリダイゼーション	33
2-3-4. エキソ型イヌリナーゼ遺伝子のクローニング	34
2-3-5. エキソ型イヌリナーゼ遺伝子の塩基配列	34
2-3-6. <i>inuD</i> 遺伝子 5' 近傍領域の塩基配列と <i>inuC-inuD</i> 遺伝子ク ラスターの存在	35
2-3-7. <i>inuD</i> 遺伝子産物の推定アミノ酸配列	35
2-3-8. <i>inuD</i> 遺伝子産物の推定アミノ酸配列の比較	36
2-3-9. <i>inuD</i> 遺伝子と <i>inuC</i> 遺伝子の転写に及ぼす炭素源の影響	36
2-4. 要約	46

第三章 黒麹菌 *Aspergillus niger* No. 12 株由来エキソ型 イヌリナーゼの精製と性質

3-1. 緒言	47
3-2. 材料と実験方法	47
3-2-1. 使用菌株と培養条件	47
3-2-2. 酵素活性測定法	47
3-2-3. タンパク質定量法	48
3-2-4. エキソ型イヌリナーゼの精製	48
3-2-5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動	48
3-2-6. 等電点電気泳動	48
3-2-7. 酵素活性に及ぼす pH と温度の影響	48
3-2-8. 酵素活性に及ぼす阻害剤と金属イオンの影響	49
3-2-9. 基質特異性	49
3-2-10. 薄層クロマトグラフィー	49
3-3. 実験結果	49
3-3-1. 酵素の精製	49
3-3-2. 酵素活性に及ぼす pH と温度の影響	49
3-3-3. 酵素活性に及ぼす金属イオンと阻害物質の影響	50
3-3-4. 基質特異性	50
3-3-5. 加水分解産物の経時的分析	50
3-4. 要約	58

第四章 *Aspergillus niger* No.12 株エキソ型イヌリナーゼ 遺伝子 *inuE* のクローニングと解析

4-1. 緒言	59
4-2. 実験方法	59
4-2-1. アミノ酸配列の決定	59
4-2-2. 染色体 DNA の調製	60
4-2-3. エキソ型イヌリナーゼ遺伝子に特異的なプローブの作製	60
4-2-4. 染色体 DNA のサザン・ハイブリダイゼーション	60
4-2-5. エキソ型イヌリナーゼ遺伝子を含む DNA 断片のクローニングと塩基 配列の決定	60
4-2-6. cDNA の調製によるエキソ型イヌリナーゼ遺伝子の解析	61

4-2-7.	エキソ型イヌリナーゼ mRNA の 5'末端、3'末端の決定	61
4-2-8.	<i>inuE</i> 遺伝子の転写解析	62
4-3.	結果および考察	62
4-3-1.	精製酵素の部分アミノ酸配列	62
4-3-2.	エキソ型イヌリナーゼ遺伝子に特異的なプローブの作製	62
4-3-3.	染色体 DNA のサザン・ハイブリダイゼーション	63
4-3-4.	エキソ型イヌリナーゼ遺伝子のクローニング	63
4-3-5.	エキソ型イヌリナーゼ遺伝子の塩基配列	63
4-3-6.	<i>inuE</i> 遺伝子産物のアミノ酸配列	64
4-3-7.	アミノ酸配列の比較	65
4-3-8.	糸状菌エキソ型イヌリナーゼの進化上の位置	66
4-3-9.	炭素源による <i>inuE</i> 遺伝子の転写調節	66
4-4.	要約	73

第五章 *Penicillium* sp. TN-88 株エキソ型イヌリナーゼ InuD に固有の内部アミノ酸配列の解析

5-1.	緒言	74
5-2.	材料と実験方法	74
5-2-1.	宿主とベクターDNA	74
5-2-2.	融合遺伝子の作製	75
5-2-3.	酵母 <i>Pichia pastoris</i> での発現	76
5-2-4.	組換え酵素の精製	79
5-2-5.	基質親和性	79
5-3.	結果および考察	79
5-3-1.	エキソ型イヌリナーゼの分泌発現および精製	79
5-3-2.	挿入配列が酵素活性に及ぼす影響	80
5-3-3.	挿入配列が酵素の基質親和性に及ぼす影響	80
5-3-4.	挿入配列のアミノ酸配列の比較	80
5-3-5.	属を超えて保存されているアミノ酸配列	81
5-4.	要約	91

第六章 エンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuB* の機能解析

6-1. 緒言	92
6-2. 材料と実験方法	92
6-2-1. 使用菌株とプラスミド	92
6-2-2. 大腸菌 <i>Escherichia coli</i> BMH71-18 <i>mutS</i> 細胞の調製	92
6-2-3. <i>inuB</i> 遺伝子からの E43D と V236C 変異体の作製	93
6-2-4. <i>inuB</i> 遺伝子の E43D/V236C 二重変異体の作製	94
6-2-5. 酵母 <i>Pichia pastoris</i> GS115 株のコンピテント細胞の調製	94
6-2-6. 酵母 <i>P. pastoris</i> の形質転換	94
6-2-7. 酵素精製法	95
6-2-8. 組換え酵素の性質	95
6-3. 結果および考察	96
6-3-1. エンド型イヌリナーゼの分泌発現および精製	96
6-3-2. アミノ酸置換がイヌリン分解活性へ及ぼす影響	97
6-3-3. アミノ酸置換が基質特異性へ及ぼす影響	97
6-3-4. アミノ酸置換が pH、温度感受性へ及ぼす影響	97
6-4. 要約	105
総括	106
謝辞	112
要約 (Summary)	113
参考文献	115

Abbreviations

- A₆₀₀**, absorbance at 600 nm of wave length
- AP**, alkaline phosphatase
- BCIP**, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, toluidinium
- CAPS**, 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid
- DIG**, digoxigenin
- DMF**, dimethylformamide
- DNS**, 3,5-dinitrosalicylic acid
- DTT**, dithiothreitol
- EDTA**, ethylenediaminetetraacetic acid
- IEF**, isoelectric focusing
- IPTG**, isopropylthio- β -D-galactoside
- Lys-C**, lysylendopeptidase
- ORF**, open reading frame
- NBT**, nitroblue tetrazolium
- pCMB**, *p*-chloromercuribenzoate
- pI**, isoelectric point
- PVDF**, polyvinylidene difluoride
- RACE**, rapid amplification of cDNA ends
- RT-PCR**, reverse transcription-PCR
- SDS-PAGE**, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
- 1-SST**, sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase
- TAE**, Tris-acetate, EDTA buffer
- TE**, tris-HCl/EDTA
- TEMED**, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
- TLC**, thin-layer chromatography
- TSR**, template suppression reagent
- TSS**, transformation and strage solution for chemical transformation
- X-gal**, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant genotype or characteristics	Reference or source
<i>Escherichia coli</i>		
INV α F'	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , λ -, <i>thin-1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i> , ϕ 80 <i>lacZ</i> M15 (<i>lacZYA-argF</i>), <i>deoR</i> ⁺ , F'	Invitrogen
JM109	<i>recA1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>thi</i> (<i>lac-proAB</i>)/ F' [<i>traD36 proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> M15]	Takara
BMH 71-18 <i>mutS</i>	(<i>lac-proAB</i>), [<i>mutS</i> ::Tn10][F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> M15]	Clontech
<i>Pichia pastoris</i> GS115	<i>his4</i> , Mut ⁺	Invitrogen
Plasmids		
pCR TM 2.1	Amp ^r , Km ^r , P _{<i>lac</i>} , TA cloning vector	Invitrogen
pUC18	Amp ^r , P _{<i>lac</i>} , cloning vector	Takara
pHIL-S1	<i>HIS4</i> , Amp ^r , P _{<i>AOX1</i>} , <i>PHO1</i> secretion signal, Vector for secreted expression in <i>Pichia</i>	Invitrogen
pPIC3.5	<i>HIS4</i> , Amp ^r , P _{<i>AOX1</i>} , Vector for intracellular expression in <i>Pichia</i>	Invitrogen
pINU501	1375 bp fragment derived from <i>Penicillium</i> sp. strain TN-88 exoinulinase gene in pCR TM 2.1	This study
pINU502	4.6 kbp <i>Xba</i> I fragment containing <i>Penicillium</i> sp. strain TN-88 exoinulinase gene in pUC18	This study
pINU503	2.9 kbp <i>Xba</i> I- <i>Sac</i> I fragment from pINU502 in pUC18	This study
pINU508	2.8 kbp <i>Bam</i> HI fragment containing 5' portion of the <i>Penicillium</i> sp. strain TN-88 exoinulinase gene <i>inuD</i> ORF and the upstream region in pUC18	This study
pINU514	Mature protein coding region of <i>inuD</i> cDNA under <i>PHO1</i> signal peptide coding region in pHIL-S1	This study
pINU601	942 bp fragment derived from <i>A. niger</i> strain 12 exoinulinase gene in pCR TM 2.1	This study
pINU602	3.7 kbp <i>Bam</i> HI fragment containing <i>A. niger</i> strain 12 exoinulinase gene <i>inuE</i> in pUC18	This study
pINU605	Precursor protein coding region of <i>inuE</i> cDNA under P _{<i>AOX1</i>} in pPIC3.5	This study
pINU607	Fusion gene under P _{<i>AOX1</i>} in pPIC3.5	This study
pINU107	2.5 kbp <i>Eco</i> RI- <i>Hinc</i> II fragment containing ORF of <i>inuB</i> , and its 3'-noncoding region under P _{<i>lac</i>} in pUC18	37
pINU130	E43D mutant of <i>inuB</i> derived from pINU107	This study
pINU131	V236C mutant of <i>inuB</i> derived from pINU107	This study
pINU132	E43D/V236C mutant of <i>inuB</i> derived from pINU107	This study
pINU133	The mature protein coding region of <i>inuB</i> under <i>PHO1</i> signal sequence in pHIL-S1	This study
pINU134	The mature protein coding region of E43D mutant of <i>inuB</i> under <i>PHO1</i> signal sequence in pHIL-S1	This study
pINU135	The mature protein coding region of V236C mutant of <i>inuB</i> under <i>PHO1</i> signal sequence in pHIL-S1	This study
pINU136	The mature protein coding region of E43D/V236C mutant of <i>inuB</i> under <i>PHO1</i> signal sequence in pHIL-S1	This study

List of figures

Fig. 1-1.	Elution pattern of extracellular inulinase from <i>Penicillium</i> sp. strain TN-88 on DEAE-Cellulofine A-500.....	15
Fig. 1-2.	Gradient elution pattern of extracellular inulinase from <i>Penicillium</i> sp. strain TN-88 on Q-Sepharose HP.	16
Fig. 1-3.	Elution pattern of extracellular inulinase from <i>Penicillium</i> sp. strain TN-88 on Superdex 200 pg.	17
Fig. 1-4.	SDS-PAGE of exoinulinase from <i>Penicillium</i> sp. strain TN-88.	18
Fig. 1-5.	TLC of inulin hydrolyzate with inulinase from <i>Penicillium</i> sp. strain TN-88.	20
Fig. 2-1.	Southern blot analysis of genomic DNA from <i>Penicillium</i> sp. strain TN-88.	38
Fig. 2-2.	Schematic representation and partial restriction map of the <i>inuC-inuD</i> gene cluster on the <i>Penicillium</i> sp. TN-88 genome.	39
Fig. 2-3.	Nucleotide and deduced amino acid sequences of <i>inuD</i> gene encoding exoinulinase from <i>Penicillium</i> sp. strain TN-88.	40
Fig. 2-4.	Alignment of amino acid sequences of exoinulinase (InuD) from <i>Penicillium</i> sp. strain TN-88, sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from <i>Aspergillus foetidus</i> (accession no. AJ000493) (A), internal amino acid sequences of exoinulinase (InuD) from <i>Penicillium</i> sp. strain TN-88 and levanase (LevJ) from <i>Actinomyces naeslundii</i> (accession no. U12274) (B).	41
Fig. 2-5.	Nucleotide sequence and putative <i>cis</i> -elements of intergenic region between <i>inuC</i> and <i>inuD</i> gene.	45
Fig. 3-1.	Stepwise elution pattern of extracellular inulinase from <i>A. niger</i> strain No.12 on DEAE-Cellulofine A-500.	51
Fig. 3-2.	Gradient elution pattern of extracellular inulinase from <i>A. niger</i> strain 12 on Q-Sepharose HP.	52
Fig. 3-3.	Elution pattern of extracellular inulinase from <i>A. niger</i> strain 12 on Superdex 200 pg.	53
Fig. 3-4.	SDS-polyacrylamide gel (12.5 %) electrophoresis of exoinulinase from <i>Aspergillus niger</i> strain 12.	54
Fig. 3-5.	TLC of inulin hydrolyzate with inulinase from <i>Aspergillus niger</i> strain 12.	56
Fig. 4-1.	Southern blot analysis of genomic DNA from <i>Aspergillus niger</i> strain 12.	67

Fig. 4-2	(A) Restriction map of cloned DNA fragment containing the <i>inuE</i> gene from <i>A. niger</i> strain 12. (B) Nucleotide and deduced amino acid sequences of <i>Hinc</i> II- <i>Bam</i> H I region.	68
Fig. 4-3.	Alignment of amino acid sequences of <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> exoinulinases, and <i>A. foetidus</i> 1-SST.	69
Fig. 4-4.	Unrooted phylogenic tree showing evolutionary distances among fungal exoinulinases and other homologous β -fructofuranosidases.	70
Fig. 4-5.	RT-PCR products showing the expression pattern of the <i>inuE</i> gene in <i>Aspergillus niger</i> strain 12 grown on different carbon sources.	71
Fig. 4-6.	Schematic drawing showing putative <i>cis</i> -elements loci in <i>inuE</i> or <i>inuB</i> promoter region, respectively.	72
Fig. 5-1.	Schematic drawing showing fusion gene construction.	77
Fig. 5-2.	Growth and extracellular inulinase production in shake-flask cultures of <i>P. pastoris</i> transformants. The pINU514 transformant carrying <i>inuD</i> (a) and the control transformant lacking <i>inuD</i> (b)	82
Fig. 5-3.	Growth and extracellular inulinase production in shake-flask cultures of <i>P. pastoris</i> transformants. The pINU607 transformant carrying fusion gene (a), the pINU605 transformant carrying <i>inuE</i> gene (b) and the control transformant lacking fusion gene or <i>inuE</i> (c)	83
Fig. 5-4.	SDS-PAGE of purified recombinant exoinulinases.	84
Fig. 5-5.	Lineweaver-Burk plot of inulinase activity of recombinant exoinulinases.	86
Fig. 5-6.	Lineweaver-Burk plot of invertase activity of recombinant exoinulinases.	87
Fig. 5-7.	BLAST search of 157-amino acid internal region in InuD.	89
Fig. 5-8.	Alignment of amino acid sequences of homologous regions.	90
Fig. 6-1.	Growth and extracellular inulinase production in shake-flask cultures of <i>Pichia pastoris</i> transformants.	101
Fig. 6-2.	SDS-PAGE of purified recombinant enzyme from <i>inuB</i> gene.	102

List of tables

Table 1-1.	Summary of purification of exoinulinase from <i>Penicillium</i> sp. strain TN-88.	19
Table 2-1.	Oligonucleotide primers for real-time PCR.....	42
Table 2-2.	Comparison of <i>inuC</i> mRNA level in various carbon sources by comparative C _T method.	43
Table 2-3.	Comparison of <i>inuD</i> mRNA level in various carbon sources by comparative C _T method.	44
Table 3-1.	Summary of purification of exoinulinase from <i>Aspergillus niger</i> strain 12.....	55
Table 3-2.	Comparison of properties of fungal exoinulinases.....	57
Table 5-1.	Primers for exoinulinase gene construction.....	78
Table 5-2.	Summary of purification procedure of recombinant exoinulinase (InuE).....	85
Table 5-3.	Summary of purification procedure of recombinant exoinulinase (InuD).	85
Table 5-4.	Summary of purification procedure of recombinant exoinulinase (fusion protein).....	85
Table 5-5.	Kinetic properties of recombinant exoinulinases.....	88
Table 6-1.	Comparison of conserved amino acid sequences of endoinulinases and other β -fructofuranosidases.	99
Table 6-2.	Primers for site-directed mutagenesis of endoinulinase gene <i>inuB</i>	100
Table 6-3.	Summary of purification procedure of recombinant endoinulinase (WT).	103
Table 6-4.	Summary of purification procedure of recombinant endoinulinase E43D mutant.	103
Table 6-5.	Summary of purification procedure of recombinant endoinulinase V236C mutant.....	103
Table 6-6.	Summary of purification procedure of recombinant endoinulinase E43D/V235C mutant.....	103
Table 6-7.	Kinetic properties of recombinant endoinulinases.....	104

序論

多糖イヌリンは、キクイモ (*Helianthus tuberosus* L.) の塊茎、チコリ (*Cichorium intybus* L.) の根茎、ダリヤ (*Dahlia variabilis* Dest.) の球根などのキク科植物に貯蔵多糖として多量存在しており、有効利用が期待される未利用資源である。¹⁾ その分子構造は 30~40 個の D-フルクトフラノースが β -2,1 結合で直鎖状に重合し、還元末端に D-グルコース 1 分子が α -1, β -2 結合したフルクタン的一种である。²⁾ イヌリンは冷水に溶けにくく、温水によく溶ける。このようなフルクタンは植物の耐寒性に寄与していることが示唆されている。²⁾ イヌリン分子はフルクトースで構成されているため、フルクトース供給源として有望である。イヌリン資源はフルクトース・シロップの生産、イヌリナーゼ生産菌によるエタノール、アセトン・ブタノールおよびコハク酸などの化学物質の直接発酵のための原料として注目され、^{1, 3)} 微生物のイヌリナーゼは学理的にも産業への応用上からも非常に興味深い。

イヌリナーゼはイヌリンに対する作用様式によってエキソ型とエンド型酵素に分類される。⁴⁾ エキソ型イヌリナーゼ (β -D-fructan fructohydrolase, EC 3.2.1.80) はイヌリン分子の非還元末端からフルクトース単位で順次切断する。エキソ型イヌリナーゼによる触媒反応は Snyder と Phaff の反応動学的研究⁵⁾ により single-chain mechanism によってフルクタン分子から離脱することなく移動すると示された。エキソ型酵素はイヌリンの他にスクロース (β -D-フルクトフラノシル α -D-グルコピラノシド) とラフィノース (*O*- α -D-ガラクトピラノシル-[1 \rightarrow 6]- α -D-グルコピラノシル β -D-フルクトフラノシド) のフルクトース残基を加水分解する。微生物のエキソ型イヌリナーゼは β - (2 \rightarrow 6)フルクタンである細菌レバンの β - (2 \rightarrow 6)-フルクトフラノシド結合に対する活性の有無によって 2 種類に大別される。⁶⁾ しかし、キクイモの塊茎から精製されたフルクタン・エキソ型加水分解酵素 (EC 3.2.1.80) は β - (2 \rightarrow 1)結合に特異的であり、スクロースには作用しない。⁷⁾ 一方、エンド型イヌリナーゼ (2,1- β -D-fructan fructanohydrolase, EC 3.2.1.7) はイヌリンに特異的に作用し、内部の β - (2 \rightarrow 1)-フルクトフラノシド結合を加水分解する。主要な分解産物はイヌロトリオース、イヌロテトラオース、イヌロペンタオースなどのイヌロオリゴ糖である。イヌリナーゼは、インベルターゼ (EC 3.2.1.26) とレバナーゼ (EC 3.2.1.65) とともに β -フルクトフラノシダーゼ・ファミリーに分類され、糖質加水分解酵素のアミノ酸配列によ

る分類⁷⁴⁾でファミリー32に属する。⁸⁾

イヌリナーゼは高等植物⁶⁾や糸状菌⁹⁻¹⁸⁾、酵母^{5, 19-21)}、細菌²²⁻²⁶⁾を含む微生物で主に見られる。これらのイヌリナーゼ生産菌はイヌリンを含む植物の根圏土壌からよく分離される。^{11, 16, 18)}イヌリンを分解する糸状菌の中で、黒麹菌 (*Aspergillus niger*、^{10, 11)}*Aspergillus ficuum*¹³⁾および *Aspergillus awamori*¹⁴⁾) と *Penicillium* 属糸状菌 (*Penicillium* sp. No. 1 株、⁹⁾ *Penicillium purpurogenum*、¹⁵⁾ *Penicillium* sp. TN-88 株¹⁶⁾および *Penicillium trezebinskii*¹⁷⁾) が優れている。中村ら¹⁰⁾は炭素源の種類に拘らず著量のイヌリナーゼを生産する *A. niger* No. 12 株を分離した。最近、*A. niger* No. 817 変異株は *A. niger* No.12 株から作製され、液体培地において野性株の4倍高いイヌリナーゼ活性を示した。²⁷⁾*A. niger* No.12 株とその No. 817 変異株を除いて、これらの糸状菌はイヌリンに応答してイヌリナーゼを生産することが示されている。*A. niger* No.12 株は初めて細胞外に一種類のエンド型イヌリナーゼと2種類のエキソ型イヌリナーゼを生産することが示された。²⁸⁻³⁰⁾その後、エンド型イヌリナーゼは *A. ficuum*、³¹⁾*P. purpurogenum*、¹⁵⁾*Chrysosporium pannorum*³²⁾および *Penicillium* sp. TN-88 株¹⁶⁾の糸状菌、そして *Arthrobacter* sp. S37 株²³⁾と *Paenibacillus* sp. CDB 003 株²⁴⁾の細菌においても発見された。イヌリンを分解する酵母の *Kluyveromyces marxianus* (以前の *Kluyveromyces fragilis* もしくは *Saccharomyces fragilis*)^{5, 20, 21)}と *Candida kefyr*¹⁹⁾ はエキソ型イヌリナーゼのみを生産する。細菌のエキソ型イヌリナーゼの発見は *Streptomyces rochei*、²²⁾*Bacillus polymyxa*²⁵⁾ および *Geobacillus stearothermophilus*²⁶⁾から報告されている。

1978年に中村ら²⁸⁾は初めて *A. niger* No.12 株の培養ろ液からエタノール沈殿、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーによってエンド型イヌリナーゼ P-III を精製し、硫酸によって結晶化した。その酵素は6.7%の糖を含み、その主要な構成糖はマンノースとガラクトースであった。⁴⁾その後、他のエンド型イヌリナーゼが *A. ficuum* ATCC 16882 株由来の市販イヌリナーゼ標品(Novozyme 230; Novo A/S, Bagsvaerd, Denmark)³¹⁾や *P. purpurogenum*、¹⁵⁾*C. pannorum*、³²⁾*A. niger* No. 817 変異株 (P-IA と P-IB)²⁷⁾、*Penicillium* sp. TN-88 株¹⁶⁾の培養ろ液から精製された。それらは分子量 58~70 kDa の単量体の糖タンパク質であった。イヌリン加水分解についての K_m 値は 0.2~8.1 mM であった。また、それらの最適 pH と温度はそれぞれ 4.8~7.0 と 45~55°C であった。糸状菌エキソ型イヌリナーゼは *A. niger* No.12 株 (P-I と P-II)、^{29, 30)}*Penicillium* sp.

No.1 株 (P-I、P-II および P-III)、³³⁾*P. trzebinskii*、¹⁷⁾*C. pannorum* (F2 と F3)、³⁴⁾*A. ficuum* (ExoI と ExoII)、³⁵⁾*A. awamori*¹⁴⁾から精製されている。多くのエキソ型イヌリナーゼの I/S 比は 2.0~0.02 と多様で、糸状菌酵素の値は一般的に酵母酵素よりも高い。⁷⁾*Penicillium* sp. No. 1 株、³³⁾*C. pannorum* (F3)、³⁴⁾*A. awamori*¹⁴⁾由来のいくつかの糸状菌エキソ型イヌリナーゼは酵母のエキソ型イヌリナーゼ^{5、19-21)}と同様に β -(2→1)-と β -(2→6)-フルクトフラノシド結合の両方を加水分解する。これらの糸状菌エキソ型イヌリナーゼは分子量 59~87 kDa の単量体の糖タンパク質であり、 K_m 値は 0.003~15 mM、最適 pH と温度はそれぞれ 4.0~5.2、45~60°C の範囲であった。

D-フルクトースは低温でも水に溶解易く、スクロースの 2 倍の甘味度を示すことから、高フルクトース・シロップは低カロリーの甘味料として、食品工業において非常に注目されている。¹⁾イヌリナーゼを生産する微生物の中で、*A. niger* と *K. marxianus* は米国の食品医薬局 (FDA) により GRAS (Generally Recognized as Safe) に登録されており、⁴⁷⁾食品工業で利用されるイヌリナーゼ生産に適している。酵素の固定化は生産効率を上昇させることによりコストを削減することができる。Nakamura ら⁴⁸⁾は *A. niger* No. 817 変異株由来の固定化イヌリナーゼを用いることでイヌリンからの連続的なフルクトース・シロップ生産プロセスを開発した。固定化酵素カラムのリアクターは 45 日間以上の連続操作で 410 g/h/L の高効率で還元糖を生産した。反応産物は 95 % の D-フルクトースと 3% の D-グルコースの混合液であった。難消化性フルクトオリゴ糖 (GF_n) とイヌロオリゴ糖 (F_m) はカロリーを抑えた可溶性食物繊維として機能する (n 、 m は D-フルクトース残基の数を表す。)。Hidaka ら⁴⁹⁾は高いフルクトース転移活性をもつ β -フルクトフラノシダーゼを生産する *A. niger* ATCC 20611 株を選択した。彼らはスクロース分子のフルクトース残基を別のスクロース分子に酵素的に転移させ、1-kestose (GF_2)、nystose (GF_3) および 1^F - β -fructofuranosyl-nystose (GF_4) のフルクトオリゴ糖を工業規模で生産した。また、Nakamura ら⁵⁰⁾は、エンド型イヌリナーゼを用いた固定化酵素のカラム・リアクターによりイヌリンからイヌロオリゴ糖を連続的に安定して生産した。 GF_n と F_3 、 F_4 は *Bifidobacterium* spp. によって優先的に利用されるが、毒性物質を生産し、腸炎の原因となる大腸菌 *Escherichia coli* や *Clostridium perfringens* によって利用されない。これらのオリゴ糖の摂取は大腸におけるビフィズス菌を選択的に増殖させ、*E. coli* や *C. perfringens* のような他の好ましくない細菌を駆逐す

ることが期待される。ビフィズス菌の GF_n と F_m 型のオリゴ糖を利用した生育はおそらくこれらのオリゴ糖を加水分解できる細胞内β-フルクトフラノシダーゼを持つためであると考えられる。⁵¹⁾

1937年に Underkofler ら⁵²⁾はイヌリナーゼを生産する酵母を用いたキクイモから抽出した粗イヌリンからエタノールへの直接発酵を報告した。*K. marxianus* によるキクイモからのエタノール発酵の反応動力学は以前からよく研究されていた。¹⁾しかし *K. marxianus* は一般の *S. cerevisiae* 株よりエタノール耐性が低いようである。イヌリンに対するエキソ型とエンド型のイヌリナーゼ相乗作用は酵母エキソ型イヌリナーゼの単一の作用よりもより効率的なフルクトースへの加水分解を可能にする。最近 Ohta ら⁵³⁾によって *A. niger* No.817 変異株とエタノール耐性酵母 *S. cerevisiae* No. 1200 株を用いた並行複式発酵 (SSF) プロセスが報告され、72 時間で精製イヌリンから高濃度 (20~21%、v/v) のエタノールを生産した。続いて Nakamura ら⁵⁴⁾によりキクイモの破砕物、抽出液の濃縮物、粉末から SSF プロセスを用いて 15、72 および 120 時間後にそれぞれ 10.4、15.0 および 20% (v/v) のエタノールを得た。

最近、*Aspergillus* 属と *Penicillium* 属糸状菌のエンド型イヌリナーゼ遺伝子はクローニングされ塩基配列が決定された。^{14, 37-42)} *A. niger* No.12 株はその染色体上に 2 コピーのエンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuA* と *inuB* を持つ。*inuA* と *inuB* 遺伝子はともに 23 残基のアミノ酸配列からなるシグナル・ペプチドと 493 残基のアミノ酸配列からなる推定分子量 53 kDa の成熟タンパク質をコードしていた。液体培地において炭素源に拘らず、*inuB* 遺伝子は構成的に転写されており、*inuA* 遺伝子は転写されていなかった。³⁸⁾しかし、*inuA* と *inuB* 両エンド型イヌリナーゼ遺伝子は大腸菌 *E. coli*³⁷⁾と酵母 *S. cerevisiae* (未発表データ) で機能を保持して発現した。興味深いことに Uhm⁴¹⁾らによってクローニングされた *A. ficcum* エンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inu2* の塩基配列は *A. niger* の *inuA* 遺伝子に一致した。しかし、その *A. ficcum* の株が *A. niger* の *inuB* 遺伝子に相当するエンド型イヌリナーゼ遺伝子のコピーを持つかどうかは明らかではない。一方、*Penicillium* sp. TN-88 株のエンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuC* は染色体上に 1 コピー存在する。³⁹⁾その遺伝子はアミノ酸 25 残基からなるシグナル・ペプチドとアミノ酸 490 残基からなる推定分子量 53 kDa の成熟タンパク質をコードしていた。^{39, 40)}また、Reddy と Maley⁴³⁾は酵母 *S. cerevisiae* のインベルターゼをモデルとした部位特異的変異実験により、β-フルクトフラノシダーゼ・ファミリー酵

素の機能残基を同定した。保存された MNDPNG モチーフ内の Asp 残基と配列 ECP 内の Glu 残基はそれぞれ求核分子 (nucleophile) とプロトン供与体 (proton donor) として触媒反応に関与している。

微生物の産生する加水分解酵素の多くは、一般に生育のための基質により誘導とカタボライト抑制の二重の調節を受けている。*Aspergillus* 属と *Penicillium* 属糸状菌のエンド型イヌリナーゼ遺伝子はプロモーター領域に黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の α -アミラーゼとグルコアミラーゼの澱粉による誘導に関与している塩基配列 5'-GGAAATT-3'⁴⁴⁾を持つ。^{38, 39, 42)}このシスエレメントは糸状菌イヌリナーゼ遺伝子のイヌリンによる誘導にも関係していると示唆された。

Laloux ら⁴⁶⁾は *K. marxianus* のエキソ型イヌリナーゼと *S. cerevisiae* のインベルターゼのアミノ酸配列が高い相同性 (69%) を示すことから両酵素は同一起源であると提唱している。実際に *S. cerevisiae* のインベルターゼは酵母のエキソ型イヌリナーゼより低い活性ではあるがイヌリンも加水分解する。¹⁾一方、エンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuA* と *inuB* はそれらの祖先遺伝子が *Aspergillus* 属と *Penicillium* 属の共通の祖先に細菌から水平伝播で伝わり、*Aspergillus* 属と *Penicillium* 属に分岐した後、*A. niger* で最近起こった遺伝子重複により生じた可能性がある。³⁹⁾

以上のように糸状菌エンド型イヌリナーゼの一次構造と進化上の位置が明らかとなり、*A. niger* No.12 株のエンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuB* は、構成的に転写されていることが示された。³⁸⁾しかしながら、糸状菌エキソ型イヌリナーゼ遺伝子のクローニングは報告されていない。エキソ型イヌリナーゼとエンド型イヌリナーゼの構造と機能の関係を明らかにすることによって、イヌリナーゼの機能改変や未知遺伝子からの機能予測が可能となり、有用酵素の発見につながると考えられる。また、これらの遺伝子の転写解析は、新たな発現調節機構の発見に発展する可能性がある。本研究では、*A. niger* No.12 株と *Penicillium* sp. TN-88 株の糸状菌エキソ型イヌリナーゼに着目し、イヌリナーゼの構造と機能の関係を明らかにすることを目的とした。まず第一章にて *Penicillium* sp. TN-88 株の培養ろ液より分子量 81 kDa の新規の細胞外エキソ型イヌリナーゼを精製した。本酵素のイヌリン分解活性は 743 units/mg とこれまで報告されている同酵素の中で最も高く、レバンには作用しない型のエキソ型イヌリナーゼであった。第二章で本酵素の遺伝子クローニングと解析を行った。これは、糸状菌エキソ型イヌリナーゼ遺伝子として初めての報告となった。その遺伝子 *inuD* は同菌

株のエンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuC* と 859 bp の遺伝子間領域を隔てて互いに逆向きに存在していた。しかも、エキソ型イヌリナーゼ遺伝子 *inuD* はエンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuC* と共にイヌリンによって誘導され、フルクトースとグルコースで抑制された。第三章では *A. niger* No. 12 株の培養ろ液から分子量 81 kDa の新規のエキソ型イヌリナーゼを精製した。精製酵素は第一章で記述した糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88 株の同酵素と同じくレバンに作用しない型のエキソ型イヌリナーゼであった。第四章でその遺伝子のクローニングをし、転写レベルの解析を行った。その遺伝子 *inuE* は、*Penicillium* sp. TN-88 株のエンド型イヌリナーゼ遺伝子とエキソ型イヌリナーゼ遺伝子のようにエンド型イヌリナーゼ遺伝子と隣接して存在していなかった。また、*A. niger* No. 12 株のエンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuB* は炭素源の種類に拘らず、構成的に転写されているのに対し、エキソ型イヌリナーゼ遺伝子の転写はイヌリンまたはスクロースによって誘導され、グルコースまたはフルクトースの存在によって抑制された。第五章では *Penicillium* sp. TN-88 株エキソ型イヌリナーゼに特徴的な内部アミノ酸配列を *A. niger* No. 12 株同酵素内部に挿入した融合酵素の機能解析を行うことにより、そのイヌリン分解活性における機能を検した。第六章ではエンド型イヌリナーゼのアミノ酸残基の置換から、基質特異性の相異に関与するアミノ酸残基を推定し、部位特異的変異実験によってその機能を推察した。本論文は以上の研究成果について詳述したものである。

第一章 *Penicillium* sp. TN-88 株由来エキソ型イヌリナーゼの精製と性質

1-1. 緒言

糸状菌エキソ型イヌリナーゼは黒麹菌 *Aspergillus niger* No. 12 株 (P-I と P-II)、^{29, 30)}*Penicillium* sp. No. 1 株 (P-I、P-II および P-III)、³³⁾*Penicillium trzebinskii*、¹⁷⁾*Chrysosporium pannorum* (F2 と F3)、³⁴⁾*Aspergillus ficuum* (ExoI と ExoII)、³⁵⁾*Aspergillus awamori*¹⁴⁾ から精製されている (第三章 Table 3-2 参照)。それらは分子量 59~87 kDa の単量体の糖タンパク質であり、至適 pH と温度はそれぞれ 4.0~5.2、45~60°C の範囲であった。また、エキソ型イヌリナーゼの性質の指標となるスクロース分解活性 (S) に対するイヌリン分解活性 (I) の比 (I/S) は、微生物起源により 2.0~0.02 と多様で、一般的に糸状菌由来のものが酵母由来のものよりも高い。⁷⁾微生物のエキソ型イヌリナーゼは細菌レバンの β -(2→6)-フルクトフラノシド結合に対する分解活性の有無によって 2 種類に大別される。*Penicillium* sp. No.1 株、*C. pannorum* (F3)、*A. awamori* 由来のいくつかの糸状菌エキソ型イヌリナーゼと酵母の同酵素^{5, 19-21)}は β -(2→1)-と β -(2→6)-フルクトフラノシド結合の両方を加水分解する。

Nakamura ら¹⁶⁾により分離された糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88 株はイヌリンより誘導的に著量の細胞外イヌリナーゼを生産し、そのエンド型イヌリナーゼは精製され、酵素化学的性質が明らかにされた。¹⁶⁾また、そのコードする遺伝子 *inuC* はクローニングされ、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で発現されている。³⁹⁾本章では、本菌株より分子量 81 kDa の非常にイヌリン分解活性が高い (I/S、7.9) 新規細胞外エキソ型イヌリナーゼを精製し、酵素化学的諸性質について明らかにした結果を記述する。

1-2. 材料と実験方法

1-2-1. 使用菌株と培養条件

Nakamura ら¹⁶⁾によりイヌリン含有植物の根圏の土壌から分離された糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88 株をイヌリナーゼ生産に使用した。本菌株のイヌリナーゼ

生産用液体培地として 1.5% (w/v) イヌリン (ダリア起源、Sigma)、2.0% (w/v) 酵母エキス、0.5% (w/v) 塩化アンモニウム、0.05% (w/v) 塩化カリウム、0.05% (w/v) 硫酸マグネシウム七水和物、0.001% (w/v) 硫酸第一鉄七水和物を含む培地 (pH 5.5) を 100 ml ずつ 500 ml 容三角フラスコ 50 本に分注した。本菌株の胞子を一白金耳量植菌し、恒温振とう培養機 (イワシヤ) で 30°C、5 日間、140 rpm で回転振とう培養した。

1-2-2. 酵素活性測定法

Miller ら⁵⁵⁾の 3,5 - ジニトロサリチル酸 (DNS) 法に従って酵素活性を測定した。A 液 (1% [w/v] DNS 水溶液 1760 ml に 4.5% [w/v] 水酸化ナトリウム水溶液 600 ml、ロッシェル塩 [酒石酸カリウムナトリウム四水和物、和光純薬] 510 g を加え、溶解) に B 液 (10% [w/v] 水酸化ナトリウム水溶液 30.4 ml に結晶フェノール 13.8 g を溶解し、蒸留水で 138 ml とした後、炭酸水素ナトリウム 13.8 g を加え、溶解) を混合し、暗所に 2 日間放置後、澱を除去し、DNS 試薬を調製した。0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で適宜希釈した供試酵素液 0.5 ml に、脱イオン水に溶解した 0.5% (w/v) イヌリンまたはスクロース溶液 0.5 ml を加え、40°C で 30 分間反応させた。DNS 試薬 3 ml を加えて反応を停止させた後、沸騰水中で 5 分間加熱し発色反応させ、直ちに氷冷した。脱イオン水で 25 ml に定容し、分光光度計 (UV-1200、島津) を用いて 500 nm の波長で吸光度を測定し、生成した還元糖量を標準曲線より求めた。盲検は、供試酵素液 0.5 ml に DNS 試薬 3 ml を加えた後、0.5% イヌリンまたはスクロース溶液を 0.5 ml を加え、同様に操作した。標準曲線作製のために 0、100、200、300、400、600、800、1000 $\mu\text{g/ml}$ のフルクトース (イヌリン分解活性測定用) もしくはフルクトースとグルコースを等量含む (スクロース分解活性測定用) 溶液を作製し、それぞれ DNS 法により吸光度を測定した。各還元糖濃度に対して吸光度をプロットし標準曲線をそれぞれ作製した。イヌリナーゼ活性はイヌリン分子から 1 分間に 1 μmol の還元糖 (フルクトース) を生成する酵素量を 1 unit とした。インベルターゼ活性は 1 μmol のスクロースを分解する酵素量を 1 unit とした。

1-2-3. タンパク質定量法

タンパク質量は下記の紫外線吸収スペクトル法または Lowry 法 (Cu-Folin 法)⁵⁶⁾ により求めた。

① 紫外線吸収スペクトル法

ウシ血清アルブミン (Sigma) 0、200、400、600、800 及び 1000 $\mu\text{g/ml}$ を含む溶液を調製し、未知試料共に波長 280 nm におけるの吸光度を分光光度計 (UV-1600、島津) で測定した。タンパク質濃度に対する吸光度をプロットし、標準曲線より未知試料のタンパク質濃度を求めた。この定量法は精製過程のフラクション内のタンパク質濃度を測定する際に使用した。

② Cu-Folin (Lowry) 法⁵⁶⁾

A 液 (硫酸銅・五水和物 0.5 g とクエン酸・二水和物 1.14 g を蒸留水 100 ml に溶解した) と B 液 (炭酸水素ナトリウム 20 g と水酸化ナトリウム 4 g を蒸留水 1000 ml に溶解した) を 1 : 50 (v/v) の比で混合し、C 液を作製した。ウシ血清アルブミン (Sigma) の 0、20、40、60、80、100、200、400、600、800 および 1000 $\mu\text{g/ml}$ を含む溶液と未知試料それぞれ 0.5 ml に C 液 2.5 ml を加え暗所で 10 分間作用させた。D 液 (Folin-Ciocalteu 試薬、[和光純薬] と蒸留水を 1 : 1 [v/v] の比で混合) を 0.25 ml ずつ加え混和し、暗所で 30 分間置いた後、波長 650 nm における吸光度をそれぞれ測定した。タンパク質濃度に対する吸光度をプロットし、標準曲線より未知試料のタンパク質濃度を求めた。この定量法は精製過程にて比活性を算出する際に使用した。

1-2-4. エキソ型イヌリナーゼの精製

1-2-1 項の培養液を吸引ろ過し、培養ろ液と菌体を分離した。培養ろ液 4,450 ml をセルロース・チューブ (C-65、三光純薬) に分注し、4℃低温室内でポリエチレングリコール 20,000 (和光純薬) を振りかけ 1/10 倍量まで濃縮した。メンブレンフィルター (Diaflo YM-3、分画分子量 3,000、アミコン) をセットした限外ろ過器 (アミコン) に酵素液を入れ、窒素ガスで加圧 (約 4 kg/cm^2) し、約 90 ml に濃縮した。これをセルロース・チューブに入れ、脱イオン水中で 2 日間透析した。以下のカラム操作は FPLC システム (Amersham) を用いて行った。20 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した DEAE-Cellulofine A-500 (生化学工業) カラム (2.6×45 cm) に濃縮した酵素液を供し、未吸着部分を流速 1.0 ml/min で流出した。0.1 M の NaCl を含む同緩衝液で吸着した酵素を溶出し、フラクション・コレクター (RediFrac、Amersham) で 10 ml ずつ分取した (Fig. 1-1)。イヌリナーゼ活性とインベルターゼ活性を示すピーク画分 (Fraction No. 14~32) を減圧条

件下コロジオン膜 (Sartorius) に入れ、同緩衝液中で減圧条件にて透析、濃縮した。酵素液を同緩衝液で平衡化した Q-Sepharose HP カラム (2.0×30 cm) にロードし、未吸着部分を流出した。0~0.5 M の NaCl を含む同緩衝液で吸着した酵素を溶出 (Linear gradient elution) し、6 ml ずつ分取した (Fig. 1-2)。イヌリナーゼ活性とインペルターゼ活性を共に示すピーク画分 (Fraction No. 49~57) を濃縮した。濃縮酵素液を 0.15 M NaCl を含む 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した Superdex 200 pg (Amersham) カラム (2.6×70 cm) に供し、同緩衝液を流して 3 ml ずつ分取した (Fig. 1-3)。

1-2-5. SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli⁵⁷⁾ の方法で行った。30%アクリルアミド/0.8% N,N'-メチレン-ビス-アクリルアミド溶液 2.25 ml、0.4% (w/v) SDS/1.5 M トリス緩衝液 (pH 8.8) 2.25 ml、蒸留水 4.5 ml、10%過酸化アンモニウム 40 μ l、および TEMED (和光純薬) 5 μ l を加え、7.5%ポリアクリルアミド分離ゲルを作製した。この上に 30%アクリルアミド/0.8% N,N'-メチレン-ビス-アクリルアミド溶液 0.45 ml、0.4% (w/v) SDS/0.5 M トリス緩衝液 (pH 6.8) 0.75 ml および蒸留水 1.8 ml に 10%過酸化アンモニウム 10 μ l、TEMED 5 μ l を加え濃縮ゲルを作製した。MINI-PROTEAN II (BIO-RAD)の泳動槽にゲルをセットし、泳動緩衝液 (25 mM トリス、19.2 mM グリシンおよび 0.1% SDS、pH 8.3)を注ぎ入れた。1 M トリス緩衝液 (pH 6.8) 0.625 ml、グリセロール 1 ml、10% (w/v) SDS 2 ml、0.1% (w/v) ブロモフェノール・ブルー 0.5 ml、蒸留水 0.375 ml に 2-メルカプトエタノール 0.5 ml 加え、試料緩衝液を作製した。凍結乾燥した酵素タンパク質 約 10 μ g を試料用緩衝液 10 μ l に溶解し、100°Cで 2 分間加熱し変性させた。この試料をゲル溝に注ぎ入れ、25 mA 定電流で電気泳動した。泳動後のゲルを染色液 (後述する脱色液 1 L に 1 g のクーマシー・ブリリアント・ブルー R-250 を溶解した) で染色し、脱色液 (300 ml のメタノール、100 ml の酢酸に蒸留水を加え 1 L とした。) で脱色した。最後に脱色したゲルをゲル乾燥機 (RAPIDRY-MINI、ATTO) で乾燥させた。

1-2-6. 等電点電気泳動

等電点電気泳動は Multiphor II 電気泳動システム (Amersham) により行った。加熱を防ぐため冷却水循環装置 (endocal RTE-5B、Neslab) で 10°Cに保った冷却

板に絶縁液（パラフィン油）を塗布し、その上に気泡を生じさせないように Ampholine PAGplate (pH 3.5-9.5、Amersham) を載せた。この両端に電極ストリップを電極線に対して平行に載せた。陰極のストリップには 1 M H_3PO_4 溶液を、陽極のストリップには 1 M NaOH 溶液を浸みこませた。サンプル・ストリップを陽極に向かって陰極から 2 cm の所に電極に対して平行に載せた。透析、減圧乾燥した試料を超純水 10 μl に溶かし、サンプル・ストリップの溝に注入した。広域標準タンパク質を同様に注入し、泳動後、試料の等電点測定に利用した。電極線をそれぞれ電極ストリップの上にセットし、1,500 V、50 mA、30 W で 90 分間通電し、両性担体アンフォラインの pH 勾配を形成させ、試料をその等電点の位置に濃縮した。泳動後の Ampholine PAGplate を固定液 (29 g のトリクロロ酢酸、8.5 g の硫化サリチル酸を蒸留水に溶かし 250 ml にした) に 30 分間浸漬した。次に脱色液 (500 ml のエタノール、160 ml の酢酸に蒸留水を加え、2 L にした) に 5 分間置き洗浄した後、染色液 (脱色液 1 L に 1 g クーマシー・ブリリアント・ブルー-R-250 を溶解) に 10 分間浸漬して染色した。最後に、前述した脱色液で背景が澄むまで脱色し、ゲル乾燥機で乾燥させた。

1-2-7. 酵素活性に及ぼす pH と温度の影響

酵素活性の最適 pH は 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 3.5~6.0)、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5~7.5)、ホウ酸緩衝液 (pH 8.0~10.0) でそれぞれ希釈した酵素液 0.5 ml を作製し 1-2-2 項に従って酵素活性を求め、最大活性に対する相対活性を算出した。各 pH における酵素の安定性は、pH 4.0~9.0 の各 pH の緩衝液で希釈した酵素液を 24 時間 30°C で保温した後の残存活性を 1-2-2 に従って求め、最大活性に対する残存活性を算出した。酵素活性の最適温度は反応液を 10~70°C で保温する以外は 1-2-2 に従って酵素活性を求め、最大活性に対する相対活性を算出した。酵素の熱安定性は 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で希釈した酵素液を 20~80°C で 30 分間それぞれ保温した後、1-2-2 に従って酵素活性を求め、最大活性に対する残存活性を算出した。

1-2-8. 酵素活性に及ぼす金属イオンと阻害物質の影響

AgCl 、 ZnCl_2 、 NiCl_2 、 MnCl_2 、 MgCl_2 、 HgCl_2 、 FeCl_3 、 CdCl_2 、 CoCl_2 、 CaCl_2 、EDTA、SDS、*p*CMB、*N*-bromosuccinimide の金属イオンもしくは阻害物質を 1 mM 含む酵素液を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) でそれぞれ調製した。この酵素液

の酵素活性を 1-2-2 に従って求め、金属イオンや阻害物質を入れないものの酵素活性に対する相対活性を算出した。

1-2-9. 基質特異性

スクロース (β -D-フルクトフラノシル α -D-グルコピラノシド)、イヌリン (β -2,1-フルクタン)、メレチトース (α -D-グルコピラノシル-[1 \rightarrow 3]- β -D-フルクトシル-[2 \rightarrow 1]- α -D-グルコピラノシド)、ライノース (*O*- α -D-ガラクトピラノシル-[1 \rightarrow 6]- α -D-グルコピラノシル β -D-フルクトフラノシド)、レバン (β -2,6-フルクタン) を脱イオン水に溶解し、0.5% (w/v) 溶液をそれぞれ作製した。各基質溶液に 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で適宜希釈した供試酵素液 0.5 ml を加え、30 分間保温した後、DNS 法 (1-2-1 項) にて還元糖量を測定し、酵素活性を算出した。

1-2-10. 薄層クロマトグラフィー

3% (w/v) イヌリン溶液 0.1 ml に 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で適宜希釈した供試酵素液を加え 40 °C で反応させた。0、3、6、12、24、48、72 および 96 時間後に反応液を分取し、直ちに 5 分間煮沸し、反応を停止させた。各分析試料を薄層プレート (HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60、Merck) の下端から約 1 cm のところに、毛細管で等間隔に約 2~3 μ g ずつ添加した。展開槽 (100-7D、YAZAWA) に展開溶媒 (クロロホルム: 酢酸: 蒸留水=3:10:1 [v/v/v]) を入れ、十分に蒸気で飽和させた。試料添加後の薄層プレートを水平な所に置いた展開槽内に入れ、溶媒の先端が適当な位置まできたら展開槽から出し、ドラフト内でドライヤーを用いて十分に乾燥させた。この操作を溶媒の先端が前回よりも上にくるように展開して三回行った。展開後の薄層プレートを乾燥し、発色剤 (2 g のジフェニルアミンと 2 ml のアニリンを 100 ml のアセトンに溶解し、15 ml の濃リン酸と混和) を噴霧し乾燥後、120 °C で約 5 分間の加熱により発色させた。

1-3. 実験結果および考察

1-3-1. 酵素の精製

本酵素は培養ろ液から 4.4%の回収率で、329 倍に精製された (Table 1-1)。活性ピーク画分のタンパク質は SDS-PAGE で 81 kDa の単一のバンドを示し (Fig. 1-4)、等電点電気泳動により pI は 4.6 と推定された。既報の糸状菌由来同酵素^{14, 17, 30, 33-35)}の分子量の範囲は 59~87 kDa であり、本酵素の分子量もその範囲内であった。本酵素のイヌリン分解活性は 743 units/mg で既報の同酵素で最も高い *Penicillium trzebinskii* 由来のもの¹⁷⁾より更に 7 倍高く、スクロース分解活性は 93.8 units/mg であった。その I/S は 7.9 であり、既報の同酵素の 0.02~2 に比べて非常に高いものであった。

1-3-2. 酵素活性に及ぼす pH、温度の影響

本酵素のイヌリナーゼ活性の最適 pH は 4.0、pH 5~7 で安定であった。最適温度は 55°C、50°Cまで安定で 70°Cで完全に失活した。既報の同酵素の最適 pH、温度はそれぞれ pH 4~5.2、45~60°C、安定性は pH 3~9.0、60°C以下の範囲であり、本酵素も同程度であった。

1-3-3. 酵素活性に及ぼす金属イオン、阻害物質の影響

本酵素は Mn^{2+} と Co^{2+} でそれぞれ 127、117%賦活化され、 Ag^+ 、 Hg^{2+} 、*N*-bromosuccinimide で完全に失活した。また、*p*CMB (35%)、EDTA (88%)、 Cu^{2+} (74%) および Fe^{3+} (38%)で酵素活性が阻害された。本酵素は既報のイヌリナーゼ同様¹⁾ Hg^{2+} 、*p*CMB で阻害されることから活性発現に SH 基が関与しているものと推察される。

1-3-4. 基質特異性

本酵素はイヌリン (100%)、スクロース (12.6%)、ラフィノース (18%) に作用し、細菌レバンの β -2,6 結合とメレチトースには作用しなかった (括弧内にイヌリン分解活性に対する相対活性を示す)。同属の糸状菌 *Penicillium trzebinskii* 由来エキソ型イヌリナーゼ¹⁷⁾もレバンに作用しないが、*Penicillium* sp. No.1 株由来のエキソ型イヌリナーゼ P-I、P-II、P-III³³⁾は β -2,1 と β -2,6 フルクトフラノシド結合を加水分解する。このことから、*Penicillium* 属糸状菌のエキ

ソ型イヌリナーゼは2種類に分けられると考えられる。

1-3-5. 加水分解産物の経時的分析

反応初期からイヌリンからフルクトースのみが生成されており、本酵素がエキソ型イヌリナーゼであることが確認された (Fig. 1-5)。

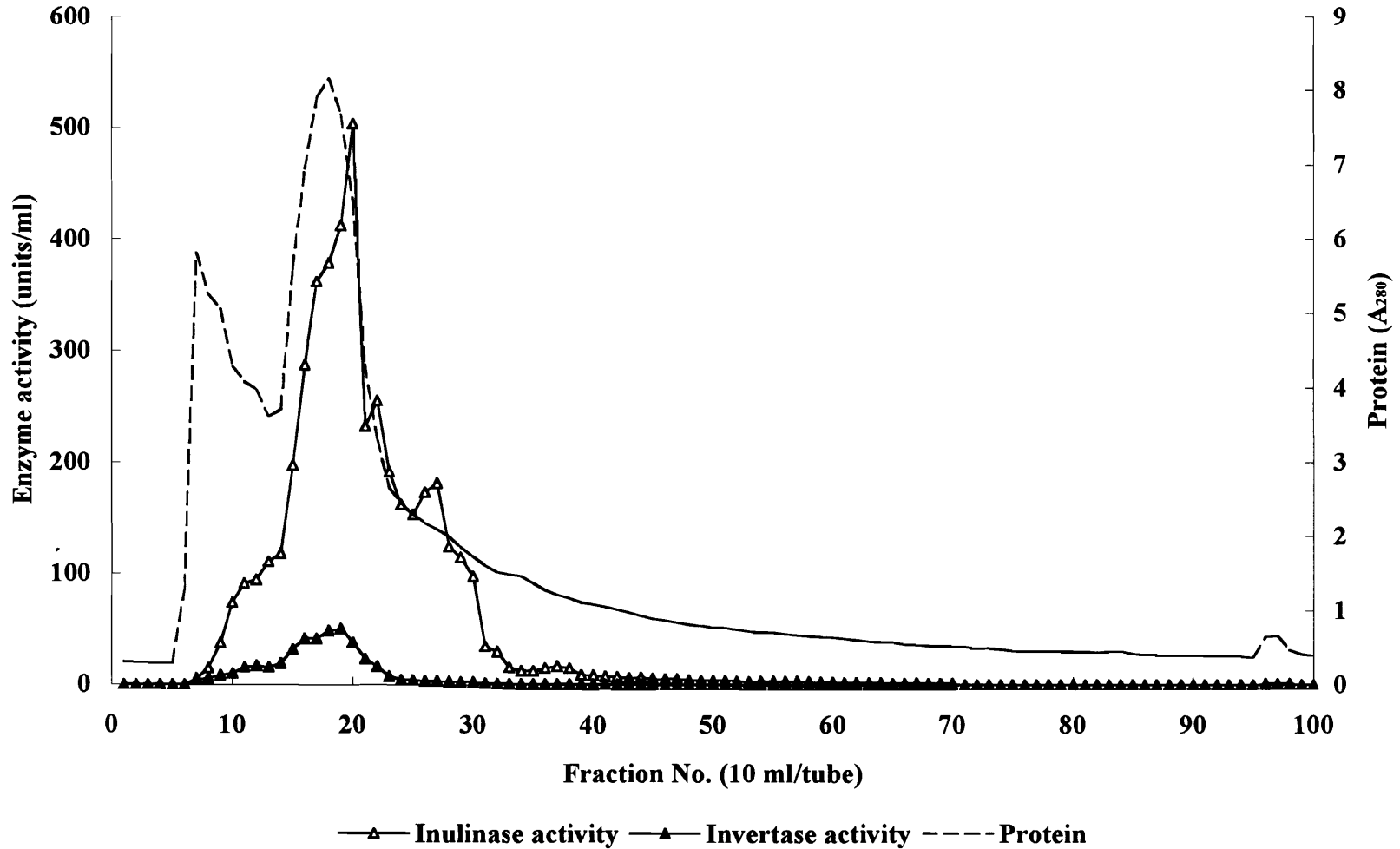


Fig. 1-1. Elution pattern of extracellular inulinase from *Penicillium* sp. strain TN-88 on DEAE-Cellulofine A-500. The column (26.4×450 mm) was equilibrated with 20 mM acetate buffer, pH 6.0. The adsorbed enzyme was eluted with the same buffer containing 0.1 M NaCl. Protein was estimated by absorbance at 280 nm and the enzyme activity was determined by DNS method.

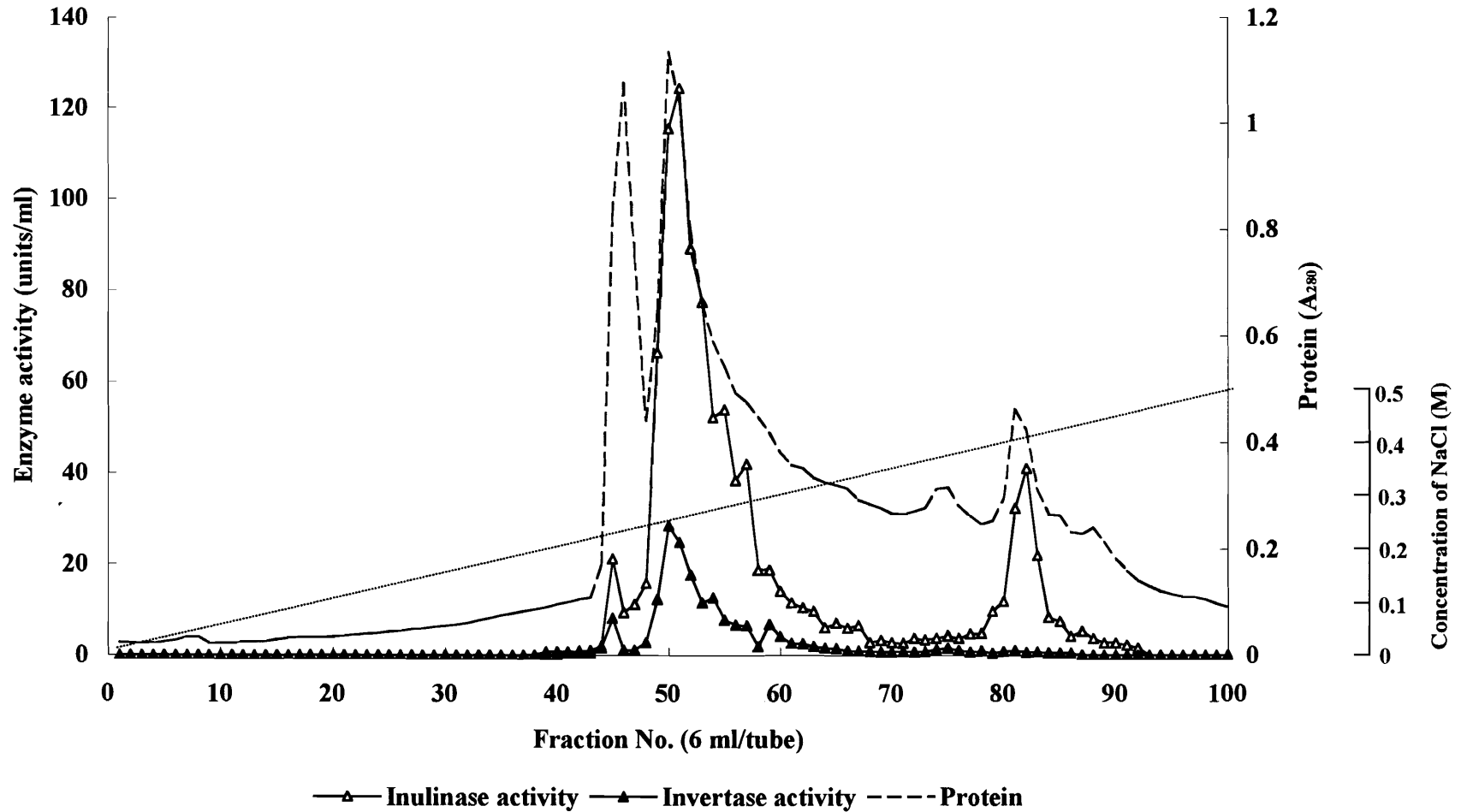


Fig. 1-2. Gradient elution pattern of extracellular inulinase from *Penicillium* sp. strain TN-88 on Q-Sepharose HP. The column (20.0×300 mm) was equilibrated with 20 mM acetate buffer, pH 6.0. The adsorbed enzyme was eluted with a linear gradient of 0 to 0.5 M NaCl in the same buffer. Protein was estimated by absorbance at 280 nm and the enzyme activity was determined by DNS method.

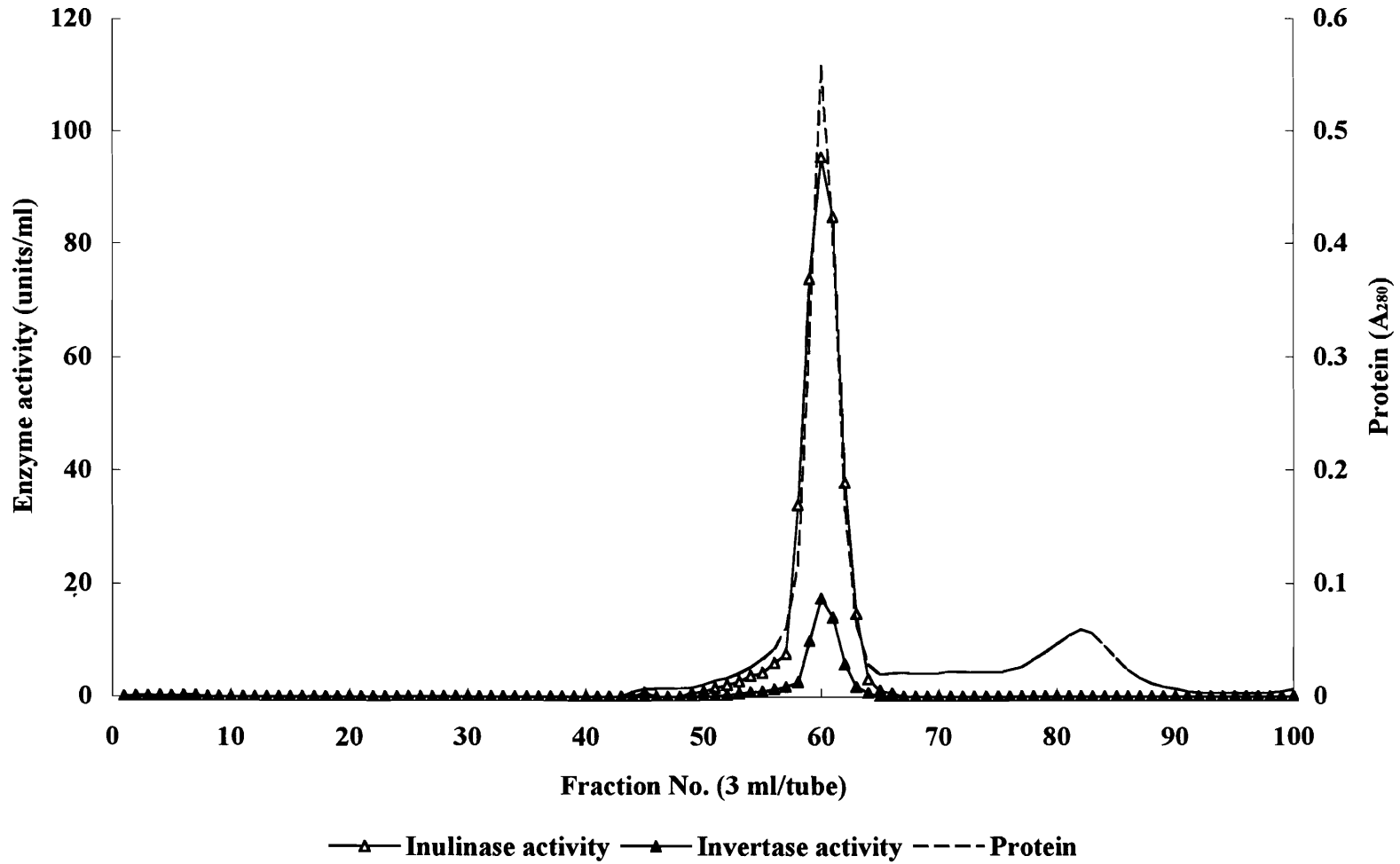


Fig. 1-3. Elution pattern of extracellular inulinase from *Penicillium* sp. strain TN-88 on Superdex 200 pg.
The enzyme solution was eluted by 10 mM acetate buffer, pH 6.0 with 0.15 M NaCl. Protein was estimated by absorbance at 280 nm and the enzyme activity was determined by DNS method.

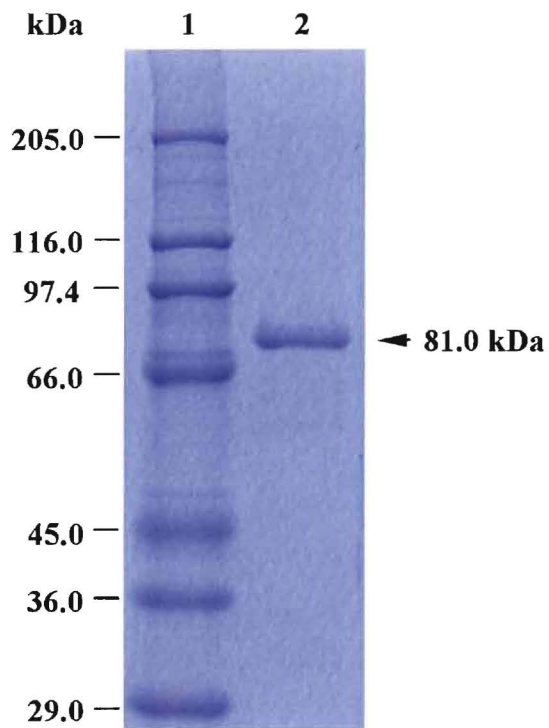


Fig. 1-4. SDS-PAGE of exoinulinase from *Penicillium* sp. strain TN-88. The enzyme was run on SDS-PAGE using 12.5 % (w/v) polyacrylamide slab gel at pH 8.3. Protein was stained by Coomassie brilliant blue R-250. Lanes: 1, standard proteins; 2, purified inulinase.

Table 1-1. Summary of purification of exoinulinase from *Penicillium* sp. strain TN-88.

Step	Total protein (mg)	Total activity (units) toward:		Specific activity (units/mg) toward:		I/S	Yield (%) ^a	Purification (fold) ^b
		inulin	sucrose	Inulin (I)	Sucrose (S)			
Culture filtrate	107,000	242,000	40,400	2.3	0.4	5.9	100	1.0
Concentration	5,450	202,000	28,900	37.1	5.3	7.0	83.5	16.4
DEAE-Cellulofine A-500	1,130	167,000	21,900	148	19.4	7.6	69.0	65.5
Q-Sepharose HP	25.1	13,500	1,610	538	64.1	8.4	5.6	238
Superdex 200 pg	14.4	10,700	1,350	743	93.8	7.9	4.4	329

^a I/S, Inulinase activity/invertase activity.

^b These values were based on the inulinase activity.

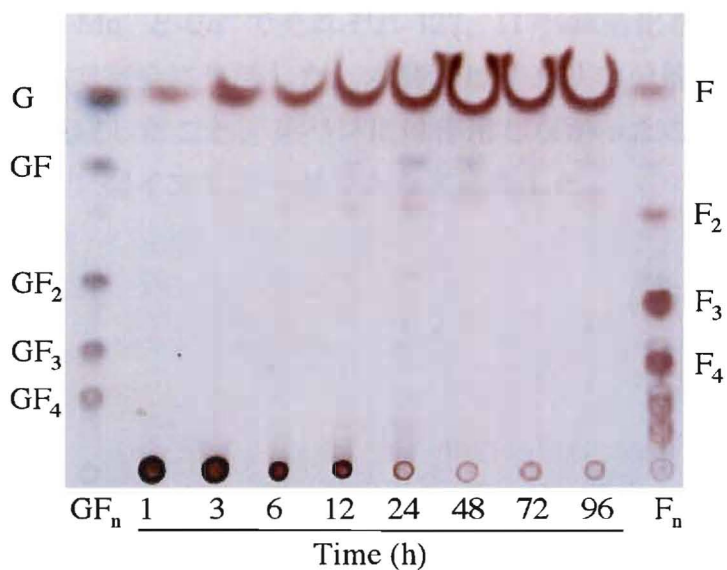


Fig. 1-5. TLC of inulin hydrolyzate with inulinase from *Penicillium* sp. strain TN-88. The enzyme reaction was done as described in the text. Standards: glucose (G), sucrose (GF), 1-kestose (GF₂), nystose (GF₃), 1^F-β-fructofuranosylnystose (GF₄), fructose (F), inulobiose (F₂), inulotriose (F₃) and inulotetraose (F₄).

1-4. 要約

本章では、糸状菌 *Penicillium sp.* TN-88 株のイヌリンを炭素源とした培養ろ液より分子量 81 kDa、*pI* 4.6 のエキソ型イヌリナーゼを 4.4 %の回収率で、329 倍に電気泳動的に単一に精製した。本酵素のイヌリン分解活性は 743 units/mg と非常に高く、スクロース分解活性は 93.8 units/mg であった。I/S の値は 7.9 で既報の同酵素に比べて高い値を示した。本酵素の最適 pH は 4.0、pH 5~7 で安定であった。最適温度は 55°C、温度安定性は 50°Cまで認められ、70°Cで完全に失活した。本酵素は Mn^{2+} と Co^{2+} でそれぞれ 127、117%賦活化され、 Ag^+ 、 Hg^{2+} 、*N*-bromosuccinimide で完全に失活した。本酵素はイヌリン分解反応初期より専らフルクトースを生成したこと、レバンには作用しなかったことからレバンに作用しない型のエキソ型イヌリナーゼであると推察した。

第二章 *Penicillium* sp. TN-88 株エキソ型イヌリナーゼ遺伝子のクローニングと解析

2-1. 緒言

糸状菌エンド型イヌリナーゼ遺伝子は、黒麹菌 *Aspergillus niger* No. 12 株、³⁷⁾ 同じく近縁の黒麹菌 *A. ficuum*、⁴¹⁾ *Penicillium purpurogenum*、⁴⁰⁾ *Penicillium* sp. TN-88 株 ³⁶⁾ などからクローニングされている。その推定アミノ酸配列からエンド型イヌリナーゼは糖質加水分解酵素ファミリー32 に属する。アミノ酸配列を基にしたβ-フルクトフラノシダーゼの分子系統樹より酵母 *Kluyveromyces marxianus*⁴⁶⁾ のエキソ型イヌリナーゼは *S. cerevisiae*⁵⁸⁾ と *Pichia anomala*⁵⁹⁾ のインベルターゼとクラスターを形成し、共通の祖先に由来することが示唆された。*Aspergillus* 属^{37, 41)} と *Penicillium* 属糸状菌^{39, 40)} のエンド型イヌリナーゼは別のクラスターを形成し、放線菌 *Actinomyces naeslundii* のレバナナーゼ⁶⁰⁾ と系統樹の枝を共有していた。このことからイントロンのないエンド型イヌリナーゼ遺伝子は細菌起源で、*Aspergillus* 属と *Penicillium* 属糸状菌の共通の祖先に水平伝播したことが示唆された。³⁹⁾ 一方、糸状菌エキソ型イヌリナーゼをコードする遺伝子のクローニングは報告されておらず、その構造と機能の関係やβ-フルクトフラノシダーゼ・ファミリー内における進化上の位置については不明であった。

エンド型イヌリナーゼはイヌリンに特異的に作用し、内部のβ-2,1 結合を切断するのに対し、エキソ型イヌリナーゼはイヌリンの非還元末端のフルクトースを順次切断し、最終的にスクロース分子も分解する。したがってエキソ型イヌリナーゼはイヌリン分解活性と共にスクロース分解活性を示す。このようにエキソ型イヌリナーゼとエンド型イヌリナーゼは共にイヌリンに作用する酵素であるが、その基質特異性と作用機作を異にしている。このことから両酵素の構造と反応機構の関係は大変興味深く思われる。また、エキソ型イヌリナーゼはレバンに対する作用によって2種類に分けられることから、それらの構造と特異性の関係を明らかにする必要がある。第一章で述べたように糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88 株由来のエキソ型イヌリナーゼはレバンに作用しない。本章で記述するように、糸状菌エキソ型イヌリナーゼとして初めて *Penicillium* sp. TN-88 株より遺伝子 *inuD* をクローニングし、その構造を明らかにした。その後 *A. awamori*¹⁴⁾ と *A. niger* No.12 株 (第4章で記述) 由来のエキソ型イヌリナーゼ

遺伝子が報告された。また、一般的に誘導酵素の発現は転写レベルで誘導と抑制の二重の調節を受けている。本章では、さらに本菌株のエンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuC*³⁹⁾ とエキソ型イヌリナーゼ遺伝子 *inuD* の転写に及ぼす炭素源の影響について得られた知見を記述する。

2-2. 材料と実験方法

2-2-1. アミノ酸配列の決定

第一章で精製したエキソ型イヌリナーゼ 500 µg を 10%グリセロール (v/v) /0.1% (w/v) SDS/125 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8) 100 µl に溶解し、7.5% (w/v) ポリアクリルアミド・ゲルの試料溝に添加した。その後、Kamei らの方法⁶¹⁾ に従い、リシルエンドペプチダーゼ (Lys-C、*Achromobacter lyticus* 起源、和光純薬) または V8 プロテアーゼ (*Streptomyces erythraeus* 起源、和光純薬) 2 µg を含む 5%グリセロール (v/v) /0.1% (w/v) SDS/125 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) 100 µl をそれぞれ重層した。SDS-PAGE を行う際に、濃縮ゲル中で 2 時間泳動を停止し、酵素を作用させた後、ペプチド断片をそれぞれ分離した。泳動後のゲル中のペプチド断片を PVDF 膜 (Immobilon-PSQ、Millipore) にブロッティングした。ブロッティングは 10%メタノールを含む 10 mM CAPS 緩衝液 (pH 11.0) 中で Mini Trans-blot cell (Bio-Rad) を用いて行った (4°C、定電流 60 mA、90 分間)。ブロッティング後の PVDF 膜をクーマシー・ブリリアント・ブルー R-250 で染色し、Lys-C ペプチド断片 (45 kDa)、V8 ペプチド断片 (29 kDa) および精製酵素 (81 kDa) のバンドをそれぞれ切り出し、その N 末端アミノ酸配列を自動フェニルチオヒダントイン誘導体分析装置を備えた気相タンパク質シーケンサー 476A Protein Sequencer (Applied Biosystems) と同アナライザー用試薬キット (Applied Biosystems) を用いてエドマン分解法によりそれぞれ決定した。

2-2-2. 染色体 DNA の調製

1-2-1 項で記述した糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88 株のイヌリナーゼ生産液体培地に、本菌株を 1 白金耳量植菌し、30°C、150 rpm で 72 時間回転振とう培養した。その培養液 100 ml をブフナー・ロートで吸引ろ過し、集菌した。ロート上の菌体を 2 L の滅菌水で洗浄後、ろ紙で菌体に含まれる水分をとり、1.5 ml 容

エッペンドルフ・チューブに菌体約 100 mg を採取した。以後の操作は DNA 抽出キット (ISOPLANT、ニッポンジーン) の操作法に従った。抽出液中の核酸をエタノール沈殿し、50 μ l TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl [pH 8.0]/1 mM EDTA) に溶かした。核酸溶液に RNA 分解酵素 (1 mg/ml RNaseA、和光純薬) 1 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させ、RNA を分解した。次に CIA (クロロホルム : イソアミルアルコール [24 : 1, v/v]) を等量加え混合しタンパク質を変性させ、遠心分離 (室温、9000 rpm、5 分間) により水相、有機溶媒相および中間層に分離した。水相をエタノール沈殿、減圧乾燥後、TE 緩衝液に溶解した。この核酸溶液に等量のポリエチレン・グリコール溶液 (13% [w/v] PEG/0.8 M NaCl) を加え混合し、氷上に 60 分間静置した後、遠心分離 (4 $^{\circ}$ C、15,000 rpm、20 分間) した。上清を除き、ペレットを 70% エタノールでリンスし、減圧乾燥後、超純水に溶解した。これを染色体 DNA 溶液とした。

2-2-3. エキソ型イヌリナーゼ遺伝子に特異的なプローブの作製

エキソ型イヌリナーゼの N 末端のアミノ酸配列 KESYTELY をコードしているセンス・プライマー 5'-AAR GAR TCW TAY ACM GAR CTK TAY-3' (Fig. 2-3、P1) と V8 ペプチド断片のアミノ酸配列 ISFANTPA をコードしている塩基配列のアンチセンス・プライマー 5'-KGC WGG YGT RTT RGC RAA WGA RAT-3' (Fig. 2-3、P2) を設計し、合成した。10 \times PCR 緩衝液 (Ampli*Taq* Gold 付属) 5 μ l、25 mM MgCl₂ 溶液 4 μ l、各 10 mM dNTP 溶液 4 μ l、2-2-2 項で調製した染色体 DNA 溶液 1 μ l、10 μ M のプライマー各 1 μ l、*Taq* DNA ポリメラーゼ (Ampli*Taq* Gold、Applied Biosystems) 0.5 μ l を加え超純水で 50 μ l とした反応液を、サーマル・サイクラー (GeneAmp PCR System 2400、Applied Biosystems) にセットした。94 $^{\circ}$ C に 10 分間保持し DNA ポリメラーゼの活性化した後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、55 $^{\circ}$ C で 30 秒間、72 $^{\circ}$ C で 1 分間の反応を 25 回し、最後に 72 $^{\circ}$ C で 7 分間反応させた。増幅 DNA 断片を 2%アガロース・ゲルを用いた電気泳動で分離し、1375 bp の DNA 断片を Wizard PCR preps DNA purification system (Promega) を用いて抽出した。この 1375 bp の DNA 断片を 2-2-14 項①⑤に従って pCR2.1 (Invitrogen) に TA クローニングし、塩基配列を決定した。また、この DNA 断片を DIG DNA labeling and detection kit (Roshe) を用いて以下に示すようにランダム・プライマー法で DIG 標識した。10 μ l の DNA 溶液 (0.1 μ g/ μ l) を 10 分間煮沸し、直ちに食塩を含む氷で冷却した。氷上でヘキサヌクレオチド混合液 2 μ l、dNTP 標識

混合液 2 μ l、Klenow 酵素 1 μ l に超純水を加え 15 μ l にした後、37°C で 1 時間反応させ、DIG 標識 DNA を合成した。0.2 M EDTA (pH 8.0) 2 μ ml を加え反応を停止し、4 M LiCl (和光純薬) 2.5 μ l、エタノール 75 μ l を加えてよく混合し、-70 °C で 30 分間放置した。遠心分離 (4°C、15,000 rpm、15 分間) し、上清を除いて減圧乾燥後、50 μ l の TE 緩衝液に溶解した。

2-2-4. 染色体 DNA のサザン・ハイブリダイゼーション

染色体 DNA 10 μ g それぞれに *Eco*RI、*Sph* I、*Xba*I、*Sac* I の各制限酵素を 100 U、各 10×緩衝液 10 μ l を混合し、超純水で全量を 100 μ l とした反応液をそれぞれ作製した。37 °C で 18 時間反応させ完全消化した後、精製し、超純水 15 μ l に溶解した DNA 断片をそれぞれ 1% TAE アガロース・ゲルで 30 V で 5 時間電気泳動し、分離した。電気泳動後のゲルを加水分解液 (0.25 M HCl) に入れ、20 分間振とうし、高分子量の DNA 断片を部分分解した。続いて変性溶液 (1.5 M NaOH/0.5 M NaCl) でゲルを 30 分間振とうすることで二本鎖 DNA をアルカリ変性させ、一本鎖 DNA にした。一方、アルカリ・トランスファー緩衝液 (0.4 M NaOH) の入ったトレイにガラス板を渡し、そのガラス板の上に同緩衝液に浸した三重の 3 MM ろ紙をその両端が同緩衝液に浸るようにに載せた。このろ紙の上にゲルをウェルを下にして密着させた。このゲルの上にゲルの大きさ (6×10 cm) より縦横 0.2~0.3 cm それぞれ長いプロットティング・メンブラン (Hybond-N+, Amersham) に載せ、同じ大きさに切った 3MM ろ紙 3 枚、同じ大きさに切ったペーパータオルを 5 cm 程度の厚さに順次積み重ねた。その上に平らな板を置き、5 g/cm² 程度の重しをしながら 16 時間放置して、毛細管現象によりメンブランに DNA 断片をプロットティングした。このメンブランを SSC 溶液 (33.3 mM NaCl /33.3 mM クエン酸ナトリウム) 中で 1 分間振とうした後、80°C で加熱し、DNA 断片をメンブランに固定した。

メンブランの洗浄及び検出は DIG DNA labeling and detection kit に添付の説明書に従って行った。メンブランを蒸留水に馴染ませた後、ビニール製のバッグに入れ、メンブラン面積 100 cm² あたり約 5 ml の割合でハイブリダイゼーション緩衝液 (0.5 M リン酸水素 2 ナトリウム溶液 [pH 7.2] 50 ml、500 mM の EDTA 0.2 ml、および SDS 7 g を混合した後、全量を蒸留水 100 ml とした) を入れた。これを 68°C で 5 分間以上振とうした。予め、10 分間煮沸し変性させ、氷中で急冷したプローブ溶液 (2-2-3 項参照) 3 μ l をハイブリダイゼーション緩衝液に

加え、68°Cで振とうしながら 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。このメンブランを 68°Cに保持した約 100 ml の洗浄液 (0.5 M リン酸水素 2 ナトリウム溶液 [pH 7.2] 40 ml、10% SDS 100 ml に蒸留水を加え 860 ml とした) で洗浄し、洗浄液を換えながら 4 回繰り返した。メンブランを約 100 ml の緩衝液 1 (0.1 M マレイン酸/0.15 M NaCl、pH 7.5) に入れて 1 分間浸透し、約 40 ml の緩衝液 2 (緩衝液 1/1% [w/v] ブロッキング試薬) で 30 分間振とうした。続いて約 40 ml の希釈抗体溶液 (緩衝液 2 で抗 DIG-AP 標識抗体を 150 mU/ml に希釈した) でメンブランを 30 分間振とうした後、100 ml の緩衝液 1 で 15 分間の攪拌洗浄を 2 回行った。メンブランを約 20 ml の緩衝液 3 (100 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、50 mM MgCl₂、pH 9.5) で 2 分間平衡化した後、緩衝液 3 を取り除いた。10 ml の緩衝液 3 に、NBT 溶液 (75 mg/ml NBT の 70% [v/v] DMF 溶液) 45 μ l と BCIP (X-リン酸) 溶液 (50 mg/ml BCIP の 100% [v/v] DMF 溶液) 35 μ l を加え、発色溶液を調製した。暗冷下で、ビニール・バッグにメンブランを入れ、約 10 ml の発色溶液を加え室温に放置した。発色したバンドを確認後、反応を停止するためにメンブランを 50 ml の緩衝液 4 (10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA、pH 8.0) に 5 分間浸した。

2-2-5. エキソ型イヌリナーゼ遺伝子を含む DNA 断片のクローニングと塩基配列の決定

制限酵素 *Xba*I で消化した染色体 DNA を電気泳動し、エキソ型イヌリナーゼ遺伝子に特異的なプローブ (2-2-3 項参照) を用いてサザン・ハイブリダイゼーションを行った。シグナルを示した 4.6 kbp の DNA 断片を抽出し、2-2-14 項②に従って pUC18 にライゲーション後、大腸菌 *E. coli* JM109 を形質転換した。⁶²、⁶³ 2-2-3 項で調製したプローブを用いて 2-2-14 項③にしたがってコロニー・ハイブリダイゼーションを行った。シグナルを示す形質転換体大腸菌 JM109 (pINU502) のプラスミドを 2-2-14 項④⑤に従って抽出し、4.6 kbp の DNA 断片の全塩基配列を決定した。

2-2-6. プロモーター領域を含む DNA 断片のクローニングと塩基配列の決定

2-2-4 項と同様に制限酵素 *Bam*HI で消化した染色体 DNA を電気泳動し、DNA 断片をメンブレンにブロットティングした後 2-2-3 項で調製したプローブを用いてサザン・ハイブリダイゼーションを行った。シグナルを示した 3 kbp の *Bam*HI

I 断片をクローニングし、エキソ型イヌリナーゼ遺伝子の開始コドンの上流 1.0 kbp の塩基配列をプライマー・ウォーキング法により決定した。

2-2-7. 全 RNA の調製

1-2-1 項で作製したイヌリナーゼ生産用液体培地 200 ml を 500 ml 容三角フラスコに分注し、*Penicillium* sp. TN-88 株を 1 白金耳量植菌した後、30°C で 48 時間振とう培養した。培養液から吸引ろ過により菌体を集め、3 L の滅菌蒸留水で洗浄した。全 RNA 抽出は RNA 抽出キット (ISOGEN、和光純薬) を用いて添付のプロトコールに従って行った。菌体 100 mg に ISOGEN 1 ml を加え混合した後、室温に 5 分間静置した。さらに、クロロホルム 0.2 ml を加えてよく混合し、室温に 3 分間放置した。その後、遠心分離 (4°C、15,000 rpm、15 分間) し、RNA を含む水相と DNA とタンパク質を含む中間層と有機溶媒相に分離した。水相に 0.5 ml のイソプロパノールを加えて 5~10 分間室温に放置し、遠心分離 (4°C、15,000 rpm、10 分間) により上清を除去した。ペレットを 70% エタノール 1 ml でリンスした後減圧乾燥し、DEPC 処理した超純水 0.5 ml に溶解した。この溶液を全 RNA 溶液とした。

2-2-8. mRNA の分離

2-2-7 項で調製した全 RNA 溶液から mRNA 精製キット mRNA PolyAtract mRNA Isolation Systems III (Promega) を用いて mRNA を単離した。全 RNA 溶液を 65°C で 10 分間保温し、それに Biotinylated-oligo (dT) probe 3 μ l と 20 \times SSC (キット付属) 13 μ l を加え、室温に 10 分間置くことで mRNA を Biotinylated-oligo (dT)probe に結合させた。一方、磁石台 (キット付属) を用いて Streptavidin paramagnetic particle (SA-PMPS) 懸濁液から SA-PMPS を集め、上清の保存液を除いた。0.5 \times SSC 緩衝液 0.3 ml に SA-PMPS を懸濁した後、同操作により SA-PMPS 集め、上清を除き洗浄した (この操作を 3 回繰り返した)。同緩衝液 0.1 ml に SA-PMPS を懸濁し、これに先述の mRNA が Biotinylated-oligo (dT) probe に結合した複合体の懸濁液を加え、2 分間毎に転倒混和しながら 20 分間放置した。この操作により mRNA が結合した Biotinylated-oligo (dT) probe を SA-PMPS に結合させた。再び磁石台でこの mRNA/Biotinylated-oligo (dT) probe/SA-PMPS 複合体を集め、上清を除いた。ペレットの mRNA/biotinylated-oligo (dT) probe/SA-PMPS 複合体を 0.1 \times SSC 緩衝液 0.3 ml に懸濁した後、同操作により複合体を集

め、上清を除き洗浄した（この操作を 4 回繰り返した）。最後に、DEPC 処理した超純水 0.25 ml に複合体を懸濁し、mRNA を溶出した。同操作により Biotinylated-oligo (dT) probe/SA-PMPS 集め、この上清を mRNA 溶液とした。

2-2-9. First-strand cDNA の合成

2-2-8 項で調製した mRNA から SMART RACE cDNA Amplification kit (Clontech) 付属のプロトコールに従い、First strand cDNA を合成した。5' RACE-Ready cDNA を合成するため、mRNA 溶液 3 μ l (1 μ g) と 5'-CDS プライマー [5'-(T)₂₅N₁N-3' (N=A, C, G, or T; N₁=A, G, or C)] 1 μ l、および SMART II Oligo-nucleotide [5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG-3'] 1 μ l を入れ混合した。一方 3' RACE-Ready cDNA を合成するため、mRNA 溶液 3 μ l (1 μ g)、3'-CDS プライマー [5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC (T)₃₀N₁N-3' (N=A, C, G, or T; N₁=A, G, or C)] 1 μ l を入れ、DEPC 処理した超純水を加えて全量を 5 μ l とした。これらの反応液を 70°C で 2 分間保温した後、氷上で 2 分間冷却した。これに 5 \times First-strand 緩衝液 (250 mM Tris-HCl [pH 8.3], 375 mM KCl, 30 mM MgCl₂) 2 μ l, 20 mM DTT 1 μ l, dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP, each at 10 mM) 1 μ l、逆転写酵素 (SuperScript II, Invitrogen) 1 μ l を加え、42°C で 90 分間反応させた。この後 TE 緩衝液 250 μ l を加えて希釈し、72°C で 7 分間保温し、逆転写酵素を失活させた。

2-2-10. RACE 法による mRNA の 5' 末端の決定

エキソ型イヌリナーゼ遺伝子の 5' 末端は SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech) を用いた 5' RACE で決定した。10 \times PCR 緩衝液 5 μ l、MgCl₂ 4 μ l、dNTPs 4 μ l、UPM (10 \times Universal Primer Mix、キット付属) 5 μ l、10 μ M アンチセンス・プライマー 5'-AGAAACTGGTCCTGGTATGGAGCT-3' (Fig. 2-3、P6) 1 μ l、前項で作製した 5' RACE-Ready cDNA 2.5 μ l、Taq DNA ポリメラーゼ 0.25 μ l を入れ、超純水を加えて全量を 50 μ l とした。PCR は 94°C に 10 分間保持することにより Taq DNA ポリメラーゼ活性化した後、94°C で 45 秒間、58°C で 45 秒間、72°C で 2 分間の反応を 30 回行った。続いて第一次 PCR 産物 1 μ l を鋳型に NUP (キット付属) と 10 μ M アンチセンス・プライマー 5'-ACATATGGTAGGTCCCATCAGCAT-3' (Fig. 2-3、P8) を用いた Nested PCR (鋳型、プライマー以外は First PCR 反応液組成と同様) を行った。反応条件は 94°C、10

分間の *Taq* DNA ポリメラーゼ活性化の後、94°Cで 45 秒間、59°Cで 45 秒間、72°Cで 2 分間の反応を 30 回行い、最後に 72°Cで 7 分間反応させた。5' RACE 産物を 2-2-14 項①④⑤に従って pCR2.1 にクローニングし、塩基配列を決定した。

2-2-11. RACE 法による mRNA の 3'末端の決定

エキソ型イヌリナーゼ遺伝子の 3'末端は SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech) を用いた 3'RACE で決定した。10×PCR 緩衝液 5 µl、MgCl₂ 4 µl、dNTPs 4 µl、UPM (10×Universal Primer Mix) 5 µl、10 µM センス・プライマー 5'-ATAACAACGCCAACTGGCTGGACT-3' (Fig. 2-3、P9) 1 µl、2-2-9 で作製した 3' RACE-Ready cDNA 2.5 µl を入れ、*Taq* DNA ポリメラーゼ 0.25 µl、Milli Q 水を加えて全量を 50 µl とした。PCR は、94°Cに 10 分間保持することにより *Taq* DNA ポリメラーゼを活性化した後、94°Cで 45 秒間、59°Cで 45 秒間、72°Cで 2 分間の反応を 30 回行った。続いて第一次 PCR 産物 1 µl を鋳型に NUP と 10 µM センス・プライマー 5'-TTGTGGATTGGTCAAGTGTGGAGG-3' (Fig. 2-3、P10) を用いた第二次 PCR (鋳型、プライマー以外は First PCR 反応液組成と同様) を行った。反応条件は第一次 PCR と同様に行い、最後に 72 °Cで 7 分間の伸長反応を行った。3' RACE 産物を 2-2-14 項①④⑤に従って pCR2.1 にクローニングし、塩基配列を決定した。

2-2-12. エキソ型イヌリナーゼの cDNA の解析

2-2-9 項で合成した一本鎖 cDNA 溶液を鋳型としてセンス・プライマー 5'-CGG AAT TCC GAA CAT GAA ATC GAT CAG CAT-3' (Fig. 2-3、P3) とアンチセンス・プライマー5'-GCT CTA GAG CCT ATA CCC ATG TAC TGC GTA CTT T-3' (Fig. 2-3、P4) (太字は *inuD* 遺伝子コード配列、下線部は制限酵素 *EcoRI*、*XbaI* の各認識部位を示す) を用いてエキソ型イヌリナーゼ cDNA の ORF を増幅した。増幅断片を *EcoRI*、*XbaI* で消化し、2-2-14 項②④⑤に従って pUC18 の同部位にクローニングし、塩基配列を決定した。

2-2-13. *inuD* 遺伝子と *inuC* 遺伝子の転写解析

本菌株のイヌリナーゼ生産用培地 (1-2-1 項参照)の炭素源をそれぞれ 1.5%グルコース、1.5 %イヌリン、1.5%フルクトース、1.5%スクロース、1.5%イヌリンと 1.5%フルクトース、1.5%イヌリンと 1.5%グルコースとした液体培地 (初

発 pH 5.5) をそれぞれ作製した。これらの培地に本菌株を植菌し、72 時間、30°C で回転振とう培養 (140 rpm) した。培養液から遠心分離により集めた菌体から 2-2-7 項と 2-2-8 項に従って mRNA を単離した。この mRNA 溶液 14.5 μ l (約 0.5 μ g) と 10 μ M の 17 塩基のオリゴ (dT) 溶液を混合し、70°C で 2 分間保温した後、10 \times PCR 緩衝液 2.5 μ l、25 mM MgCl₂ 溶液 2.5 μ l、10 mM dNTP 混合液 1 μ l、0.1 M DTT 2.5 μ l、逆転写酵素 (SuperScript II) 1 μ l を加え 42°C で 90 分間作用させ、一本鎖 cDNA を合成した。逆転写酵素は反応後、72°C で 7 分間保温し失活させた。

InuC、³⁹⁾*inuD* 遺伝子に特異的なプライマーを Primer Express プログラム (Applied Biosystems) を用いて設計、合成した (Table 2-1)。解糖系の 3-ホスホグリセレートキナーゼをコードする *pgk* 遺伝子⁶⁴⁾を内在性コントロール遺伝子とするため、同様に *Penicillium chrysogenum* の *pgk* 遺伝子 (accession number X13379)よりプライマーを設計、合成した。

各炭素源で生育した菌体由来の一本鎖 cDNA 溶液をそれぞれ一定倍率に適宜希釈した。これらをそれぞれ鋳型として、*inuC*、*inuD*、*pgk* 遺伝子に特異的な一対のプライマー (各終濃度 0.2 μ M) と SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRa)を用いて 25 μ l の反応液をそれぞれ作製し、PCR を行った。⁷⁹⁾PCR は ABI PRISM 7700 sequence detector (Applied Biosystems) を用いて 95°C で 10 秒置き DNA ポリメラーゼの活性化した後、95°C で 5 秒、60°C で 31 秒を 40 回行い、増幅した二本鎖 DNA に結合した SYBR Green I が発する蛍光を経時的に検出した。各遺伝子の増幅効率はいヌリンを炭素源とした時の cDNA 溶液の 1、4、16、64、256 倍希釈溶液を鋳型としてそれぞれの一対のプライマーで PCR を行い、それらの Ct 値と希釈倍率の対数のプロットよりそれぞれ求めた。

2-2-14. その他の方法

① TA クローニング

PCR 産物の TA クローニングは Original TA cloning kit (Invitrogen) を用いて行った。PCR 反応液 2 μ l、T ベクター (pCR 2.1、Invitrogen) を 1 μ l (0.1 μ g)、T4 DNA Ligase (Boehringer Mannheim) を 1 μ l (1 unit)、10 \times 緩衝液 (キット付属) 1 μ l に超純水を加え 10 μ l とした。この混合溶液を 14°C で 16 時間保温しライゲーションした。この溶液 2 μ l をコンピテント細胞大腸菌 INV α F' (Invitrogen) とよく混合し、氷中に 30 分間置いた後、42°C で 45 秒間加熱し、直ちに氷中で冷却した。これに SOC 培地 (2% [w/v] トリプトン、0.5% [w/v] 酵母エキス、0.05% [w/v]

NaCl、0.02 M グルコース、0.01 M MgCl₂ と 0.01 M MgSO₄)を 250 µl 加え、37°C で 1 時間回転培養した。一方、LB (1% [w/v] NaCl、1% [w/v] トリプトン・ペプトン、0.5% [w/v] 酵母エキス、2% [w/v] agarose)-ampicillin (50 µg/ml) プレートに 20% (w/v) ジメチルホルムアミド (和光純薬) に溶解した 2% (w/v) X-gal (ナカライテスク) 溶液 40 µl を塗布した。このプレートに培養液 50~100 µl を塗布し、37°C で一晩培養した。コロニーの形成が確認されたプレートを 4°C に 1 時間置き、白色コロニーの direct PCR は、各遺伝子の増幅に使用した反応液組成で鋳型 DNA の代わりに形質転換体の細胞を添加し、94°C で 10 分間置き *Taq* DNA ポリメラーゼを活性化した後、94°C で 1 分間、55°C で 1 分間、72 °C で 1~4 分間の反応を 25 回した。反応液をアガロース・ゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後、紫外線に当てクローンの DNA 断片の挿入とそのサイズを確認した。目的クローンを含む形質転換体を LB-ampicillin (50 µg/ml) 液体培地で 37°C、一晩培養し、培養液を 20%グリセロール懸濁液として-80°Cで保存した。

② その他のクローニング法

適当な制限酵素で消化し、精製したベクターDNA の溶液 (必要に応じて DNA 溶液 10 µl [1 µg] に CIAP [10 U]、10×CIAP 緩衝液を加え全量を 50 µl とした後、37°C で 30 分間反応させ、直鎖状にした 2 本鎖 DNA の両 5' 末端を脱リン酸化した) と同制限酵素で処理し精製した DNA 断片の溶液を、適当な割合で混合し 10 µl とした。これに 10 µl のライゲーション反応液 (I 液、Takara) を加え 16°C で一晩反応させライゲーションした。この溶液をコンピテント細胞 (*E. coli* JM109 competent cell、Takara) とよく混和し、氷中に 30 分間放置した後、42°C で 60 秒間加熱し、直ちに氷中で冷却した。これに SOC 培地を 900 µl 加え、37°C で 1 時間回転培養した。一方、LB-ampicillin (50 µg/ml) プレートに必要なに応じて 2% (w/v) X-gal 溶液 40 µl、20% (w/v) IPTG 溶液 35 µl を塗布した。このプレートに培養液 50~100 µl を塗布し、37°C で一晩培養した。コロニーの形成が確認されたプレートを 4°C に 1 時間置き、白色コロニーを direct PCR (2-2-14 項①参照) に供しクローンの DNA 断片の挿入とそのサイズを確認した。目的クローンを含む形質転換体を LB-ampicillin (50 µg/ml) 液体培地で 37°C、一晩培養し、培養液を 20%グリセロール懸濁液として-80°Cで保存した。

③ コロニー・ハイブリダイゼーション

形質転換体のコロニーが形成されたプレートを 4 °C で 1 時間冷却後、このプレートにナイロン・メンブランを 1 分間接触させ、室温で乾燥させた。コロニーの乗った面を上にして、変性溶液 (0.5 N NaOH/1.5M NaCl/0.1% [w/v] SDS) を浸したろ紙上に 15 分間、中和溶液 (1.0 M トリス-塩酸緩衝液 [pH 7.5]) に浸したろ紙上に 5 分間、2×SSC を浸したろ紙上に 15 分間順次置いた後、120°C で 30 分間保温した。以後 2-2-4 項と同様にサザン・ハイブリダイゼーションを行った。シグナルを示すコロニーと同じ位置に形成されているコロニーを元のプレートより LB-ampicillin 培地に接種し、37°C で一晩培養した。培養液は 20% グリセロール懸濁液として -80°C で保存した。

④ プラスミド DNA の調製

LB-ampicillin 培地 5 ml に大腸菌 *E. coli* (INV αF' また JM109) の形質転換体を植菌し、37°C で一晩培養した。培養液 1 ml を遠心分離 (室温、9,000 rpm、2 分間) し上清を除いた。菌体を TENS (10 mM Tris-HCl [pH 7.6]/1 mM EDTA [pH 8.0]/0.1 M NaOH /0.5% [w/v] SDS) 300 μl に懸濁し、菌体を溶解すると共に DNA をアルカリ変性させ、3 M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.2) 150 μl を加え懸濁し、溶液を中和した。次にクロロホルム 10μl を加え攪拌し、タンパク質を変性させた後、遠心分離 (4°C、15,000 rpm、5 分間) し、水相と中間層と有機溶媒相に分離した。水相 460 μl に等量のイソプロパノールを加え、室温で 10 分間静置した後、遠心分離 (4°C、12,000 rpm、5 分間) した。上清を除き、減圧乾燥したペレットを TE 緩衝液に溶解し、以後のタンパク質、RNA 除去操作は 2-2-2 項に示した核酸抽出以降と同様に行い、プラスミド溶液を調製した。

⑤ 塩基配列の決定法

BigDye terminator cycle sequencing FS (Applied Biosystems) にこの反応プロトコールに従った。DNA 溶液を 100~400 ng 分加え、10 μM のシークエンス・プライマー 4 μl、ターミネーター・プレミックス (A, C, G, T-BigDye Terminator、トリス-塩酸緩衝液 [pH 9.0]、AmpliTaq DNA Polymerase FS) 8 μl、超純水を加え全量 20 μl の反応液を調製した。サーマル・サイクラー (GeneAmp PCR System 2400、Perkin Elmer) にセットして PCR 反応を行った (96°C でホットスタートを行った後、96°C、10 秒、50°C、5 秒間、60°C、4 分間の反応を 25 回繰り返し

た。反応を終えた試料 20 μ l に 100 % エタノール 64 μ l と超純水 16 μ l を混合し、室温で 10 分間静置した。それを遠心分離 (室温、15,000 rpm、15 分間) し、上清を除き、70 % エタノール 100 μ l を加えて攪拌した。それを同様に遠心分離し、上清を除き減圧乾燥した。ペレットを 25 μ l の TSR (Applied Biosystems) に溶解し 95 $^{\circ}$ C で 2 分間加熱した後、氷上にて急冷した。サンプルをジェネティック・アナライザ・サンプルチューブ (P/N 401957、Perkin Elmer) に移し、チューブセプタ (P/N 401956、Perkin Elmer) で蓋をした。ABI PRISM 310 ジェネティックアナライザ (Perkin Elmer) を用いてキャピラリー(ロングリード用もしくはラピッドリード用)電気泳動行い、蛍光標識された DNA 断片を分離し、順次蛍光を検出した。得られた塩基配列の情報は遺伝子解析ソフト GENETYX-MAC ver. 11.1.2 を用いて解析した。

2-3. 結果および考察

2-3-1. 精製酵素の部分アミノ酸配列

精製したエキソ型イヌリナーゼの N 末端アミノ酸 30 残基配列 KESYTELYRP QYHFTPAQNW MNDPNGLLYA (Fig. 2-3 に示す 26 から 55 番目までのアミノ酸残基に相当)、Lys-C ペプチド断片 (45 kDa) の SKVKXVAIVGINPGGPPGTV (262 から 281 番目のアミノ酸残基に相当) と V8 ペプチド断片 (29 kDa) の ISFANTPATN NNAN (456 から 469 番目のアミノ酸残基に相当) をそれぞれ決定した。

2-3-2. エキソ型イヌリナーゼ遺伝子に特異的なプローブの作製

アミノ酸配列をもとに作製したプライマー (2-2-3 項参照) を用いて、本菌株の染色体 DNA を鋳型とした PCR により 1375 bp の増幅断片を得た。尚、増幅断片の推定アミノ酸配列中に精製酵素の N 末端および内部アミノ酸配列の存在を確認した。この増幅 DNA 断片を DIG 標識し、エキソ型イヌリナーゼ遺伝子に特異的なプローブとして、以後の実験に使用した。

2-3-3. 染色体 DNA のサザン・ハイブリダイゼーション

前項で作製した特異的プローブを用いて、制限酵素で消化した染色体とサザ

ン・ハイブリダイゼーションを行ったところ、*EcoR* I (9.8 kbp)、*Sph* I (6.7 kbp)、*Xba* I (4.6 kbp)、*Sac* I (8.5 kbp) についてそれぞれ一つずつのシグナルが検出された。これより本遺伝子が染色体 DNA 上に1コピー存在することが明らかとなった (Fig. 2-1)。

2-3-4. エキソ型イヌリナーゼ遺伝子のクローニング

プラスミド pUC18 を用いて *Xba* I 消化した染色体 DNA より 4.6 kbp の DNA 断片をクローニングした (pINU502)。その 4.6 kbp *Xba*I断片からさらに 2.9-kbp の *Xba* I-*Sac* I 断片をサブクローニングした (pINU503)。この 2.9 kbp の *Xba*I-*Sac*I断片は *inuD* 遺伝子の全コード領域を含んでいたが、5'非コード領域は 123 bp のみであった。したがって、*inuD* 遺伝子のさらに上流域をクローニングするために染色体 DNA を *Bam*H I で消化し、同じ 1375 bp のプローブ (2-3-2項参照) を用いてサザン・ハイブリダイゼーションを行った。シグナルが認められた 2.8 kbp の *Bam*H I DNA断片をクローニングした (pINU 508)。

2-3-5. エキソ型イヌリナーゼ遺伝子の塩基配列

pINU503 に組み込まれた *inuD* 遺伝子を含む 2.9 kbp の *Xba*I-*Sac*I断片の塩基配列を決定した。*inuD* 遺伝子の塩基配列と推定アミノ酸配列を Fig. 2-3 に示した。2875 bp の DNA 断片は 2106 bp の完全な *inuD* 遺伝子コード領域とその近傍領域を含んでいた。転写開始点下流の最初の ATG が開始コドンと推定され、その 3 塩基上流にアデニン(A)が存在した。⁶⁵⁾*inuD* 遺伝子の染色体 DNA と cDNA の塩基配列の比較により ORF 内に 56 bp のイントロンが一ヶ所示された。スプライス部位の 5' と 3' 末端配列は GTRNGY と YAG⁶⁶⁾ にそれぞれ一致し、スプライス部位の 3' 末端の 17 bp 上流の塩基配列 CCTAAC はラリアット形成に必要な塩基配列 RCTRAC⁶⁵⁾ に類似していた。*inuD* 遺伝子コード領域の GC 含量は 48% でエンドイヌリナーゼ遺伝子 *inuC*³⁹⁾ の 50.9% より低かった。コドンの 3 番目の塩基の存在比は A (17.8%)、T (31.1%)、G (21.5%)、C (29.6%) で、若干ピリミジン塩基が多かった。5'RACE 産物 13 クローンの塩基配列は開始コドンから -98 (2 クローン)、-91 (8 クローン)、-80 (2 クローン)、-76 (1 クローン) に 4 つの転写開始点を示した。3'RACE 産物 8 クローンの塩基配列は終止コドンから 59 と 122 bp 下流にポリ (A) 付加部位を示した (Fig. 2-3)。cDNA の 3'非コード領域にはポリアデニレーション・シグナル AATAAA は含まれていな

かった。

2-3-6. *inuD* 遺伝子 5'近傍領域の塩基配列と *inuC-inuD* 遺伝子クラスターの存在

pINU508の2.8 kbp *Bam*HI断片をプライマー・ウォーキング法によりシークエンスし、*inuD*遺伝子開始コドン上流1 kbpの塩基配列を決定した。*inuD*遺伝子の5'非コード領域は開始コドンから-239に一つのCAAT ボックスを含んでいたが、転写開始点の上流にTATAモチーフは認められなかった (Fig. 2-3)。TN-88株は細胞外イヌリナーゼをイヌリンによって誘導的に生産する。¹⁶⁾ *Aspergillus nidulans* のプロリン遺伝子クラスターにおいてカタボライト抑制を司っているCreAタンパク質の結合部位のコンセンサス配列 5'-SYGGRG-3'⁴⁵⁾が開始コドンから-292 (GCGGAG)、-320 (GCGGAG)、-354 (CTGGGG)、-368 (CCGGAG)、-477 (CCGGAG)に認められた。*inuD*遺伝子上流1 kbpの塩基配列は同一菌株TN-88のエンド型イヌリナーゼ遺伝子*inuC*³⁹⁾の塩基配列の5'非コード領域を含んでいた。エンド型イヌリナーゼ遺伝子とエキソ型イヌリナーゼ遺伝子は6570 bpの*Bam*HI-*Sac*I DNA断片上でクラスターを形成し、859 bpの遺伝子間領域から逆方向に転写されていた (Fig. 2-2)。*inuC*、³⁹⁾*inuD*両遺伝子の転写開始点の間に519 bpの転写されない領域が存在した。その遺伝子間領域にはエンド型イヌリナーゼ遺伝子*inuC*³⁹⁾のコード鎖に*Aspergillus oryzae* α -アミラーゼの澱粉応答部位のコンセンサス配列 GGAAATT⁴⁴⁾を3コピー含み、エキソ型イヌリナーゼ*inuD*遺伝子コード鎖に5つのCreA結合部位を含んでいた (Fig. 2-5)。

2-3-7. *inuD* 遺伝子産物の推定アミノ酸配列

inuD 遺伝子の ORF は、精製酵素で決定した N 末端と内部のアミノ酸配列に相当する配列を含んでおり、アミノ酸 25 残基の分泌シグナルと 677 残基の成熟タンパク質をコードしていた。Ala-23 と Thr-25 番目のスレオニン von Heijne ら⁶⁷⁾の解析によって提唱されているシグナル・ペプチド切断部位の-3 と-1の規則に合致した。ヒドロパシー・プロットはシグナル配列が疎水的であることを示した。成熟タンパク質の 677 残基の推定アミノ酸配列から分子量は 74,518 Da、*pI* は 4.64 と算出された。推定分子量が SDS-PAGE によって測定された分子量 81 kDa より小さいのは糖タンパク質への SDS の結合が減少し、電気泳動における移動度が小さくなったためと考えられる。また推定 *pI* は IEF によって測定された 4.6 に一致した。 β -フルクトフラノシダーゼ・ファミリーに

属する酵素の活性に関与するアミノ酸残基は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のインベルターゼで詳細に調べられている。⁴³⁾モチーフ HX₂PX₄WMNDPNG のアスパラギン酸残基 (D) と ECP のグルタミン酸残基 (E) はそれぞれ求核分子とプロトン供与体として触媒に関与している。TN-88 株のエキソ型イヌリナーゼでは Asp-48 と Glu-248 による同様の触媒機構が考えられる。2 つのシステイン残基が 249 番目と 539 番目に存在し、精製酵素の活性が Ag⁺ と Hg²⁺ によって完全に失われたことから、保存された Cys-249 がエキソ型イヌリナーゼの活性部位を構成しているものと推察した。N-グリコシル型糖鎖結合部位が 8 カ所存在していた (103、293、397、433、674 番目の 5 つのアスパラギン残基は N-X-T 型、119、322、581 番目の 3 つのアスパラギン残基は N-X-S 型) (Fig. 2-3)。

2-3-8. *inuD* 遺伝子産物の推定アミノ酸配列の比較

糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88 株のエキソ型イヌリナーゼはタンパク質のアミノ酸配列のデータベースを用いた BLAST 検索⁶⁸⁾により *Aspergillus foetidus*⁶⁹⁾ の 1-fructosyltransferase (1-SST; EC 2.4.1.99) と 68 % (アミノ酸残基 28-307 対 21-299)、53 % (アミノ酸残基 465-701 対 300-536) の相同性を示した。*Penicillium* sp. TN-88 株のエキソ型イヌリナーゼと *A. foetidus* 1-SST⁶⁹⁾ とのアミノ酸配列の多重整列⁷⁰⁾ は TN-88 株のエキソ型イヌリナーゼに 308 番目のグリシン残基から始まる 157 残基のアミノ酸配列が挿入されていることを示した (Fig. 2-4A)。この 157 残基のアミノ酸配列はデータベース検索により放線菌 *Actinomyces naeshundii* レバナーゼ⁶⁰⁾ の内部領域に相同性を示した (Fig. 2-4B)。レバナーゼはレバン以外に、エキソ型イヌリナーゼと同様にスクロース、ラフィノース、イヌリンにも作用することから、*inuD* 遺伝子がアミノ酸 157 残基をコードしている DNA を原核生物から獲得したことが示唆された。

2-3-9. *inuD* 遺伝子と *inuC* 遺伝子の転写に及ぼす炭素源の影響

各種炭素源で生育した *Penicillium* sp. TN-88 株のエキソ型イヌリナーゼ遺伝子 *inuD* とエンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuC*³⁹⁾ の転写産物量を Real-time PCR で比較した。*inuC*、*inuD*、*pgk*⁶⁴⁾ 各遺伝子の PCR 増幅効率はいずれも 1.01、0.92 および 0.97 であった (Table 2-1)。得られた C_T (threshold cycle) 値を内在性コントロール遺伝子 (*pgk* 遺伝子) の C_T 値で引き、補正した C_T 値をもとに各遺伝子転写産物の相対量を算出した (比較 C_T 法)。*inuD* 遺伝子の転写産物量は炭素源

がグルコースの時に対して、イヌリン、フルクトースおよびスクロースの時にそれぞれ 3260、0.97 および 0.46 倍であった (Table 2-3)。一方、*inuC* 遺伝子の転写産物量は炭素源がグルコースの時に対してイヌリン、フルクトースおよびスクロースの時にそれぞれ 41.6、0.14 および 1 倍であった (Table 2-2)。このことより *Penicillium* sp. TN-88 株のエキソ型イヌリナーゼ遺伝子 *inuD* およびエンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuC* の転写は、共にイヌリンによって誘導され、フルクトース、スクロース、グルコースでは誘導されなかった。

イヌリンとフルクトース、イヌリンとグルコースのそれぞれ 2 種類の炭素源を含む場合の *inuD* 遺伝子の転写産物量は、イヌリンを唯一の炭素源とした場合の 1/217、1/10000 にそれぞれ低下しており、*inuC* 遺伝子の転写産物量はイヌリンを唯一の炭素源とした場合の 1/3、1/168 にそれぞれ低下していた。また両遺伝子とも、イヌリンと共存させた炭素源がグルコースの場合は、フルクトースの場合より転写産物量が 1/50 程度に低下した。

以上のように *inuD* 遺伝子と *inuC* 遺伝子の転写がフルクトースとグルコースによって抑制をそれぞれ同じ割合で受けていることが示唆された。また、両遺伝子の転写誘導は炭素源ごとに程度の差はあるが、パターンは一致していた。このことは両遺伝子が転写レベルで共通の調節を受けていることを示唆しており、*inuC-inuD* 遺伝子クラスターの遺伝子間領域に存在する上述した推定シスエレメントが、コンセンサス配列の相補鎖に存在する遺伝子の転写調節にも同様に作用する可能性が示唆された。

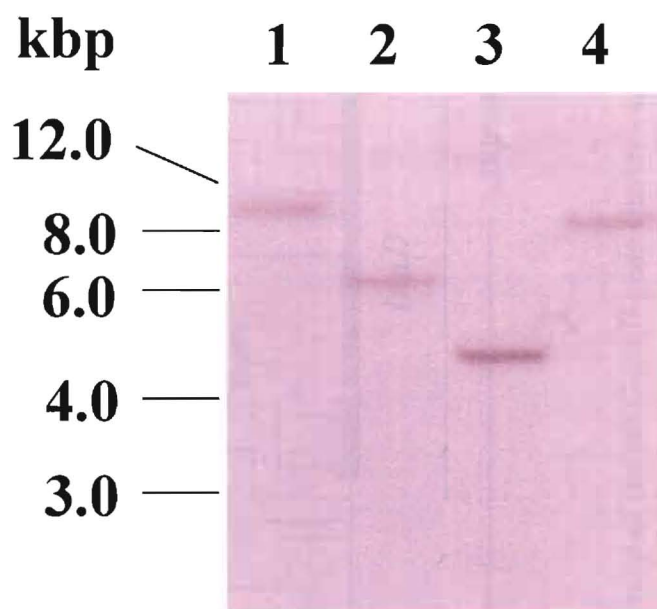


Fig. 2-1. Southern blot analysis of genomic DNA from *Penicillium* sp. strain TN-88. Genomic DNA was digested with *Eco*RI (lane 1), *Sph*I (lane 2), *Xba*I (lane 3) and *Sac*I (lane 4). The resultant fragments were separated by agarose gel electrophoresis. The blot was hybridized with a DIG-labeled probe specific for the exoinulinase gene. Hybridization signals were detected with a DIG labeling and detection kit. The positions of size markers are indicated on the left margin.

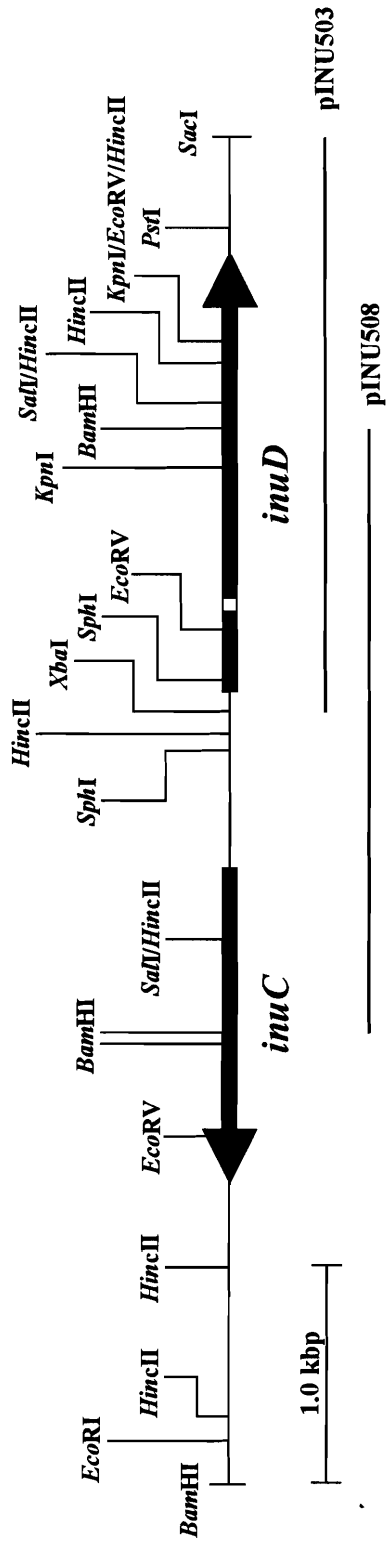


Fig. 2-2. Schematic representation and partial restriction map of the *inuC-inuD* gene cluster on the *Penicillium* sp. TN-88 genome. A partial restriction map of the 6570-bp *BamHI-SacI* DNA fragment was reconstructed by merging sequence data from Akimoto *et al.*³⁹⁾ and this study. The arrows represent the positions and directions of the ORFs corresponding to the *inuC* and *inuD* genes. An intron of 56 bp is indicated as open box. The solid lines below the map indicate the position of the inserts of plasmids pINU503 and pINU508.

Table 2-1. Oligonucleotide primers for real-time PCR.

Target gene	Primer	Sequence	Position ^a (5' to 3')	Amplified fragment size (bp)	Amplification efficiencies
<i>inuC</i>	Sp.inuC-376F	5'-ACCGGGTACACGGAGTCAAA-3'	376-395	79	1.01
	Sp.inuC-454R	5'-ACTTAACCCATGTCTGTCCAAGGT-3'	431-454		
<i>inuD</i>	inuD-1736F	5'-GCACGAATGGAAGTTCTGAGTTC-3'	1792-1814	74	0.92
	inuD-1809R	5'-TCCTATTCGTGTCTGCTGACTGA-3'	1843-1865		
<i>pgk</i> (reference gene)	pgk-1185F	5'-CGCTGTCAAGGCTGCTGAA-3'	1185-1203	57	0.97
	pgk-1241R	5'-GCGGTATCACCACCACCAA-3'	1214-1241		

a. Numbers are relative to the start codon on genome DNA.

Table 2-2. Comparison of *inuC* mRNA level in various carbon sources by comparative C_T method.

Carbon source	<i>inuC</i> Average C_T	<i>pgk</i> Average C_T	Δ C_T (<i>inuC</i>-<i>pgk</i>)	Δ Δ C_T (Δ C_T-Δ C_T glucose)	<i>inuC</i> Rel. to glucose
Glucose	31.23±0.25	24.65±0.07	6.58±0.21	0±0.21	1.0 (0.86-1.2)
Inulin	26.8±0.36	25.6±0.39	1.2±0.46	-5.38±0.46	41.6 (30.3-57.3)
Fructose	35.23±0.97	25.85±0.16	9.38±0.76	2.8±0.76	0.14 (0.08-0.24)
Sucrose	36.36	29.84±0.38	6.52±0.38	-0.06±0.38	1.0 (0.8-1.4)
I+F	33.55±0.18	30.72±0.28	2.83±0.28	-3.75±0.28	13.5 (11.1-16.3)
I+G	33.76±0.21	25.19±0.03	8.56±0.16	1.99±0.16	0.25 (0.23-0.28)
I+S	31.27±0.07	27.5±0.14	3.77±0.13	-2.81±0.13	7.0 (6.4-7.7)

Table 2-3. Comparison of *inuD* mRNA level in various carbon sources by comparative C_T method.

Carbon source	<i>inuD</i> Average C_T	<i>pgk</i> Average C_T	Δ C_T (<i>inuD</i>-<i>pgk</i>)	Δ Δ C_T (Δ C_T-Δ C_T glucose)	<i>inuD</i> Rel. to glucose
Glucose	31±0.81	24.65±0.07	6.35±0.7	0±0.7	1.0 (0.62-1.6)
Inulin	20.28±0.05	25.6±0.39	-5.33±0.34	-11.67±0.34	3260 (2570-4120)
Fructose	32.24±0.69	25.85±0.16	6.39±0.61	0.04±0.61	0.97 (0.64-1.5)
Sucrose	36.65±1.09	29.84±0.38	6.81±0.91	0.46±0.91	0.46 (0.39-1.4)
I+F	33.18±0.29	30.72±0.28	2.46±0.35	-3.89±0.35	14.8 (11.6-18.9)
I+G	33.15±0.12	25.19±0.03	7.95±0.1	1.61±0.1	0.33 (0.31-0.35)
I+S	30.07±0.23	27.5±0.14	2.57±0.23	-3.78±0.23	13.7 (11.7-16.1)

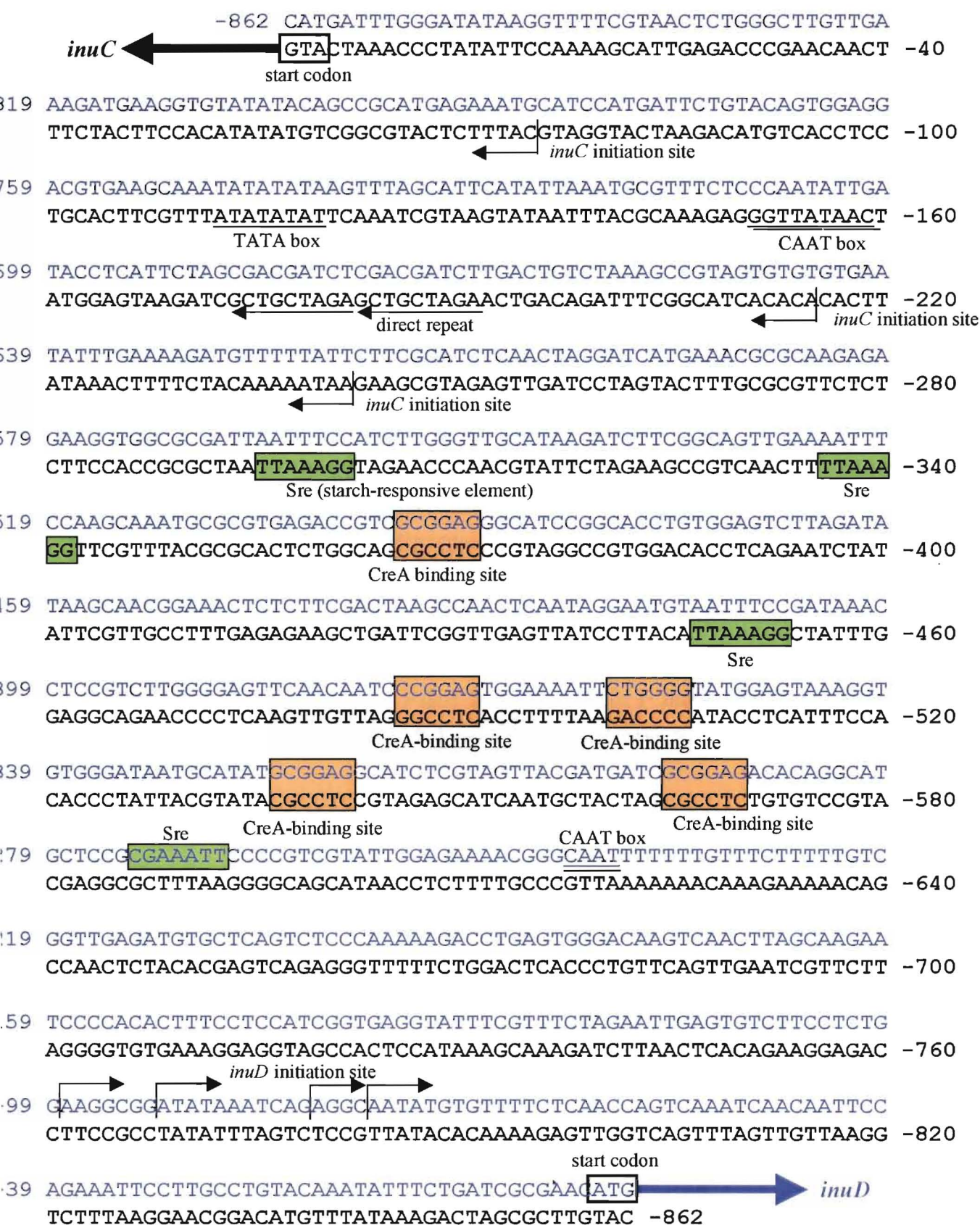


Fig. 2-5. Nucleotide sequence and putative *cis*-elements of intergenic region between *inuC* and *inuD* genes.

2-4. 要約

本章では糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88 株のエキソ型イヌリナーゼ遺伝子 *inuD* とそのプロモーター領域をクローニングし、その塩基配列を決定した。染色体 DNA のサザン・ブロット解析により本遺伝子が染色体 DNA 上に 1 コピー存在することを明らかにした。*inuD* 遺伝子はアミノ酸 25 残基の分泌シグナルと 677 残基の成熟タンパク質をコードし、ORF 内に 56 bp のイントロンが一ヶ所介在した。また、エキソ型イヌリナーゼの遺伝子 *inuD* は同一菌株 TN-88 のエンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuC* と染色体上でクラスターを形成しており、859 bp の遺伝子間領域から逆向きに転写されていた。*Penicillium* sp. TN-88 株のエキソ型イヌリナーゼ InuD は *A. foetidus*⁶⁹⁾ の 1-fructosyltransferase (1-SST; EC 2.4.1.99) と 68 % (アミノ酸残基 28-307 対 21-299) 、53 % (アミノ酸残基 465-701 対 300-536) の相同性を示した。InuD と *A. foetidus* 1-SST⁶⁹⁾ のアミノ酸配列の多重整列は TN-88 株のエキソ型イヌリナーゼに Gly-308 から始まるアミノ酸 157 残基の配列が挿入されていることを示した。この 157 残基のアミノ酸配列はデータベース検索により放線菌 *A. naeslundii* レバナーゼ⁶⁰⁾ の内部領域に相同性を示した。Real-time PCR による転写解析により、*Penicillium* sp. TN-88 株のエキソ型イヌリナーゼ遺伝子 *inuD* およびエンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuC* の転写は、共にイヌリンによって誘導され、フルクトースまたはグルコースで抑制されることを明らかにした。

第三章 黒麹菌 *Aspergillus niger* No. 12 株由来エキソ型イヌリナーゼの精製と性質

3-1. 緒言

第一、二章で述べた糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88 株がイヌリンによって誘導的にイヌリナーゼを生産するのに対し、中村らにより土壌から分離された黒麹菌 *Aspergillus niger* No. 12 株は、炭素源の種類に拘らず構成的に著量の細胞外イヌリナーゼを生産する。¹⁰⁾本菌株のエンド型イヌリナーゼは、精製され²⁸⁾そのコードする遺伝子 *inuB* がクローニングされている。³⁷⁾また本菌株は培養液中に1種類のエンド型イヌリナーゼしか生産しないが、その遺伝子は染色体上に *inuA* と *inuB* の2コピー存在した。³⁷⁾しかも *inuB* は、炭素源の種類に拘らず転写されるのに対し、*inuA* は転写されないことが明らかにされている³⁸⁾。

一方、本菌株のエキソ型イヌリナーゼ P-I、P-II の酵素化学的性質が報告されている。^{29、30)}本章では本菌株の培養ろ液から分子量 81 kDa のエキソ型イヌリナーゼを精製し、その性質について記述した。

3-2. 材料と実験方法

3-2-1. 使用菌株と培養条件

中村ら¹⁰⁾により大分県日田市の土壌からイヌリナーゼ生産菌として分離された *A. niger* No.12 株を使用した。本菌株のイヌリナーゼ生産用液体培地として3% (w/v) イヌリン (ダリア起源、Sigma)、2.0% (w/v) コーン・スティーブ・リカー、1.2% (w/v) リン酸二水素アンモニウム、0.07% (w/v) 塩化カリウム、0.05% (w/v) 硫酸マグネシウム、0.001% (w/v) 硫酸第一鉄を含む培地 (pH 4.5) を 100 ml ずつ 500 ml 容三角フラスコ 40 本に分注した。この液体培地に本菌株の胞子を1白金耳量植菌し、30 °C、140 rpm で5日間振とう培養した。

3-2-2. 酵素活性測定法

1-2-2 項に準じた。

3-2-3. タンパク質定量法

1-2-3 項に準じた。

3-2-4. エキソ型イヌリナーゼの精製

3-2-1 項の培養液を吸引ろ過し、培養ろ液と菌体を分離した。培養ろ液 3100 ml をセルロース・チューブ (C-65、三光純薬) に分注し、ポリエチレングリコール 20,000 を振りかけ濃縮した後、限外ろ過により 200 ml に濃縮し、脱塩した。20 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した DEAE-Cellulofine A-500 (生化学工業) カラム (2.6×45 cm) に濃縮した酵素液をロードし、流速 1.0 ml/min で未吸着部分を流出した。吸着した酵素を 0.05、0.1、0.2、0.3 M の NaCl を含む同緩衝液で順次溶出し、10 ml ずつ分取した (Fig. 3-1)。0.1 M NaCl で溶出した時のイヌリナーゼ活性とインベルターゼ活性を示すピーク画分 (Fraction No. 98~107) を減圧条件下コロジオンバッグで透析、濃縮した。酵素液を同緩衝液で平衡化した Q-Sepharose HP カラム (2.0×30 cm) にロードし、未吸着部分を流速 0.5 ml/min で流出した。吸着した酵素を 0~0.3 M の NaCl を含む同緩衝液で Linear gradient elution 法で溶出し、3 ml ずつ分取した (Fig. 3-2)。イヌリナーゼ活性とインベルターゼ活性を共に示すピーク画分 Fraction No. 63~68 を濃縮し、Superdex 200 pg (Amersham) カラム (2.6×70 cm) にロードした。0.15 M NaCl を含む 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) を流速 0.5 ml/min で流して 3 ml ずつ分取した (Fig. 3-3)。エキソ型イヌリナーゼはイヌリナーゼ活性とインベルターゼ活性を共に示す単一のタンパク質ピークとして溶出された。

3-2-5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

1-2-5 項に準じた。

3-2-6. 等電点電気泳動

1-2-6 項に準じた。

3-2-7. 酵素活性に及ぼす pH と温度の影響

1-2-7 項に準じた。

3-2-8. 酵素活性に及ぼす阻害剤と金属イオンの影響

1-2-8 項に準じた。

3-2-9. 基質特異性

1-2-9 項に準じた。

3-2-10. 薄層クロマトグラフィー

3% (w/v) イヌリン溶液 0.1 ml に 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で適宜希釈し供試酵素液 0.1 ml を加え 40°C で反応させた。0、5、10、20、30、45、60、180 および 360 分後に反応液を分取し、直ちに沸騰水中で 5 分間煮沸処理し反応を停止した。この分析試料を薄層クロマトグラフィー (1-2-10 で記述) により生成糖を検出した。

3-3. 実験結果

3-3-1. 酵素の精製

本酵素は *A. niger* No. 12 株の培養ろ液から 0.03% の回収率で、10 倍に精製された (Table 3-1)。最終精製のピーク画分の SDS-PAGE は 81 kDa の単一のバンドを示し (Fig. 3-4)、等電点電気泳動により pI は 5.0 と推定された。精製酵素のイヌリン分解活性は 52.8 units/mg、スクロース分解活性は 227 units/mg であった (I/S、0.23)。尚、本酵素は既報の 2 種類のエキソ型イヌリナーゼ P-I²⁹⁾、P-II³⁰⁾ と分子量が異なることから、新規のエキソ型イヌリナーゼであると推察された。

3-3-2. 酵素活性に及ぼす pH と温度の影響

本酵素のイヌリナーゼ活性の最適 pH は 4.5、pH 3.0~6.0 で安定であった。最適温度は 60°C、60°C まで安定で 70°C で完全に失活した。既報^{14、17、29、30、33-35)} の糸状菌エキソ型イヌリナーゼの最適 pH と温度はそれぞれ 4.0~5.2、温度は 45~60°C の範囲であり、本酵素も同程度であった。

3-3-3. 酵素活性に及ぼす金属イオンと阻害物質の影響

Mn²⁺で143、%賦活化され、Hg²⁺、pCMBで16.3%、4.9%に活性が低下した。本酵素の活性はpCMBとHg⁺によって阻害されたことから、SH基が活性に寄与しているものと推定された。

3-3-4. 基質特異性

本酵素はイヌリン(100%)スクロース(430%)、ラフィノース(120%)に作用し細菌レバンのβ-2,6フルクトフラノシド結合とメレチトースに作用しなかった(括弧内にイヌリン分解活性に対する相対活性を示す)。同属の糸状菌*A. awamori*由来エキソ型イヌリナーゼ¹⁴⁾はレバンに作用することから、*Aspergillus*属のエキソ型イヌリナーゼは2種類に分けられると考えられる。

3-3-5. 加水分解産物の経時的分析

イヌリン分解反応の初期からフルクトースが生成されており、本酵素がエキソ型イヌリナーゼであることが確認された(Fig. 3-5)。

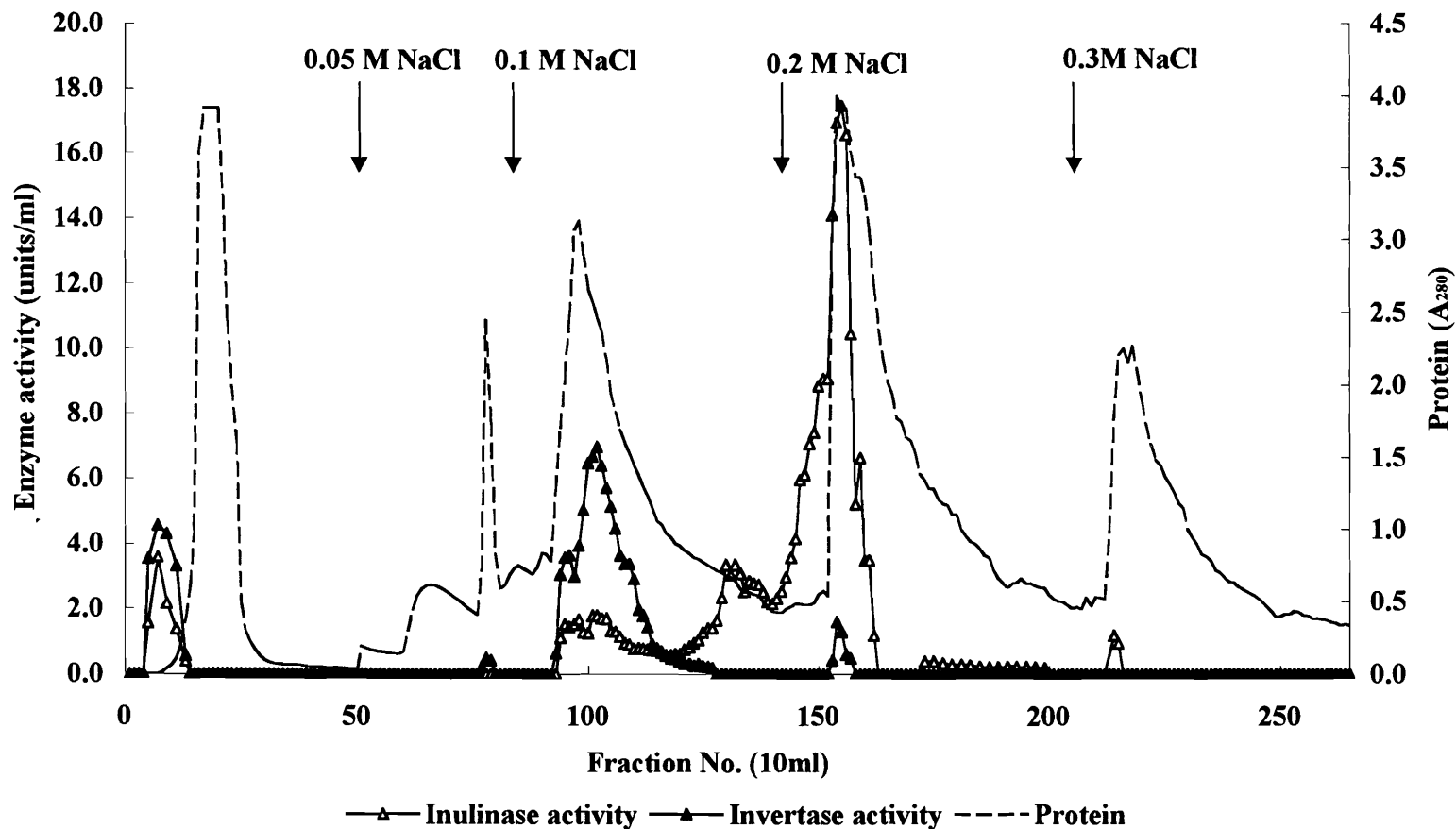


Fig. 3-1. Stepwise elution pattern of extracellular inulinase from *A. niger* strain 12 on DEAE-Cellulofine A-500. The column (26.4 × 450 mm) was equilibrated with 20 mM acetate buffer, pH 6.0. The adsorbed enzyme was eluted with the same buffer containing 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 M NaCl. Protein was estimated by absorbance at 280 nm and the enzyme activity was determined by DNS method.

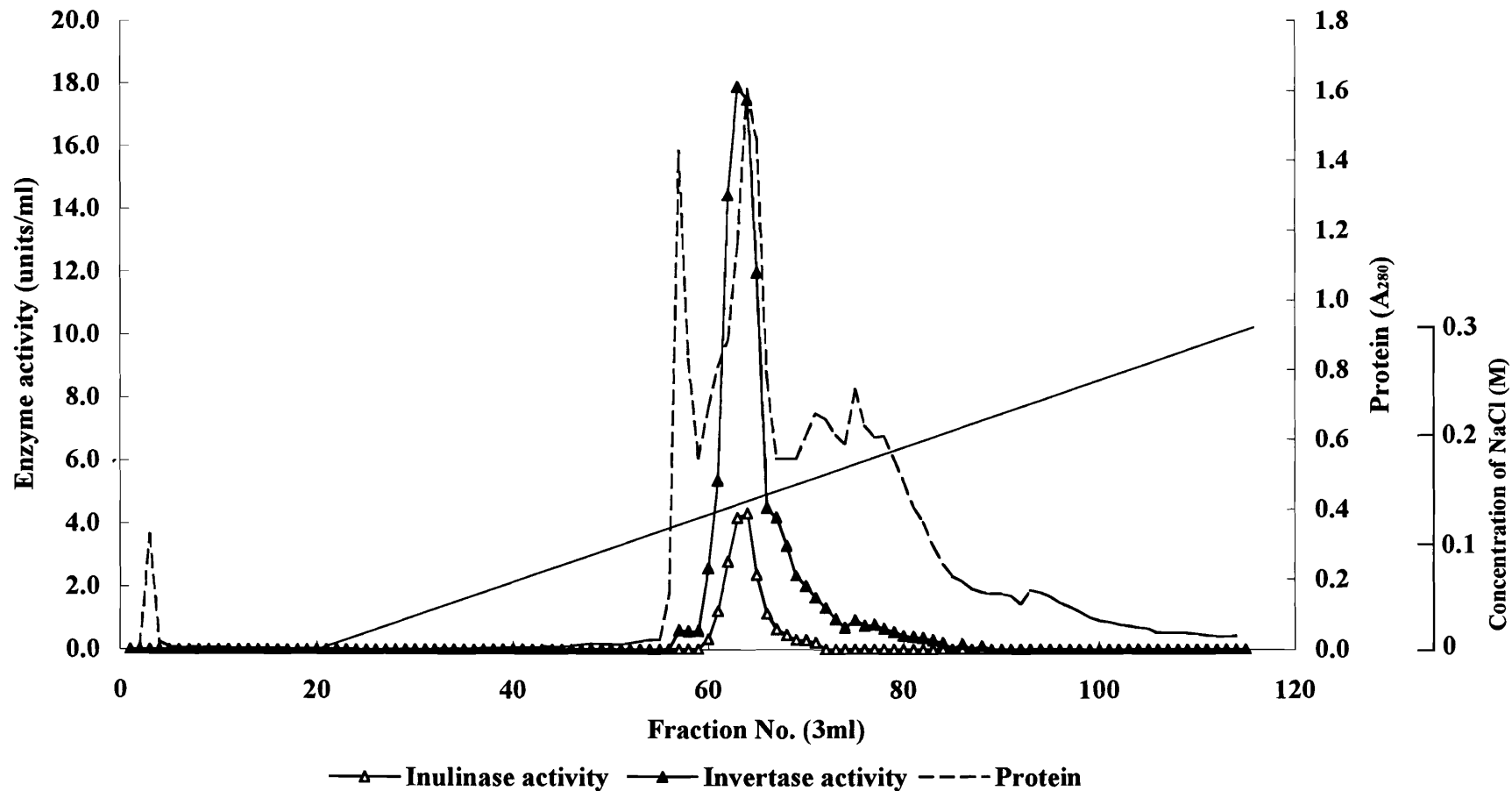


Fig. 3-2. Gradient elution pattern of extracellular inulinase from *A. niger* strain 12 on Q-Sepharose HP. The column (20.0 × 300 mm) was equilibrated with 20 mM acetate buffer, pH 6.0. The adsorbed enzyme was eluted with a linear gradient of 0 to 0.3 M NaCl in the same buffer. Protein was estimated by absorbance at 280 nm and the enzyme activity was determined by DNS method.

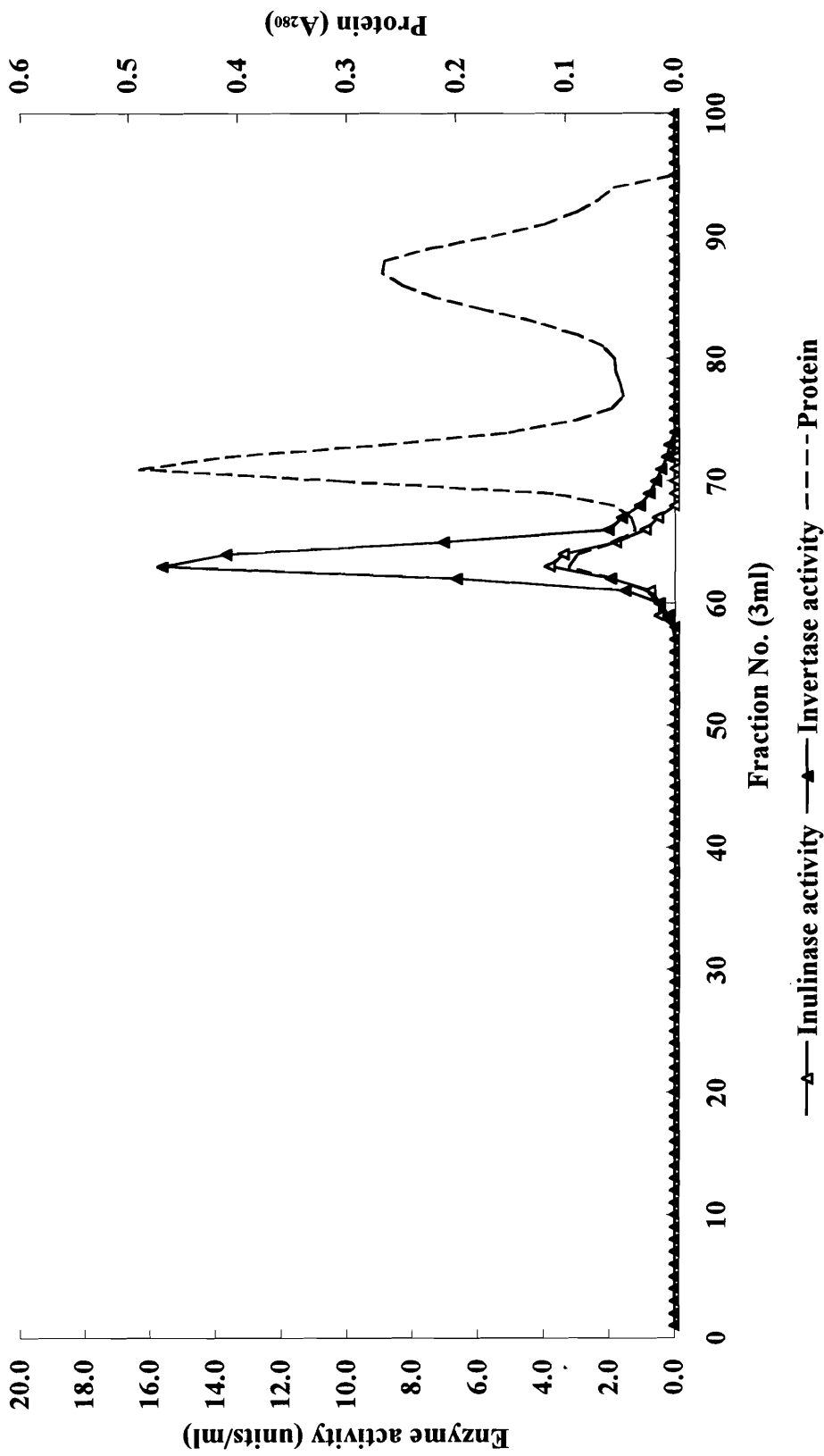


Fig. 3-3. Elution pattern of extracellular inulinase from *A. niger* strain 12 on Superdex 200 pg. The adsorbed enzyme was eluted by 10 mM acetate buffer (pH 6.0) containing 0.15 M NaCl. Protein was estimated by absorbance at 280 nm and the enzyme activity was determined by DNS method.

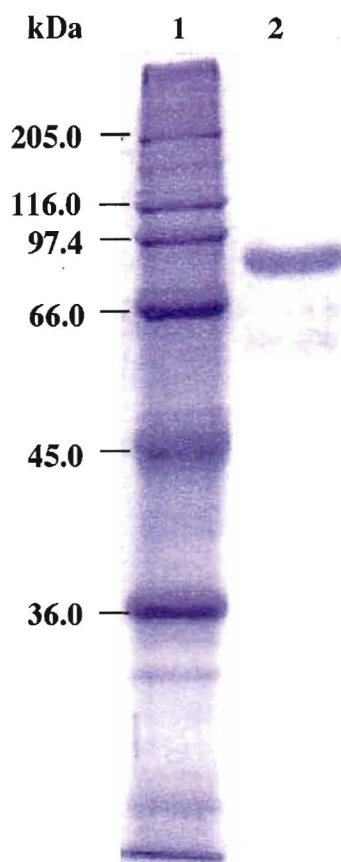


Fig. 3-4. SDS-PAGE (12.5 %) of exoinulinase from *A. niger* strain 12. Lanes: 1, standard proteins; 2, purified exoinulinase.

Table 3-1. Summary of purification of exoinulinase from *Aspergillus niger* strain 12.

Step	Total protein (mg)	Total activity (units) toward:		Specific activity (units/mg) toward:		I/S	Yield (%) ^a	Purification (fold) ^b
		inulin	sucrose	inulin	sucrose			
Culture filtrate	7,500	39,700	3,120	5.3	0.42	12.6	100	1.0
Concentration	4,350	33,000	3,030	7.6	0.7	10.9	83.1	1.4
DEAE-Cellulofine A-500	110	101	381	0.92	3.5	0.26	0.25	0.17
Q-Sepharose HP	12.2	42.3	156	3.5	12.8	0.27	0.11	0.66
Superdex 200 pg	0.24	12.7	54.4	52.8	227	0.23	0.03	10.0

^a I/S, Inulinase activity/invertase activity.

^b These values were based on the inulinase activity.

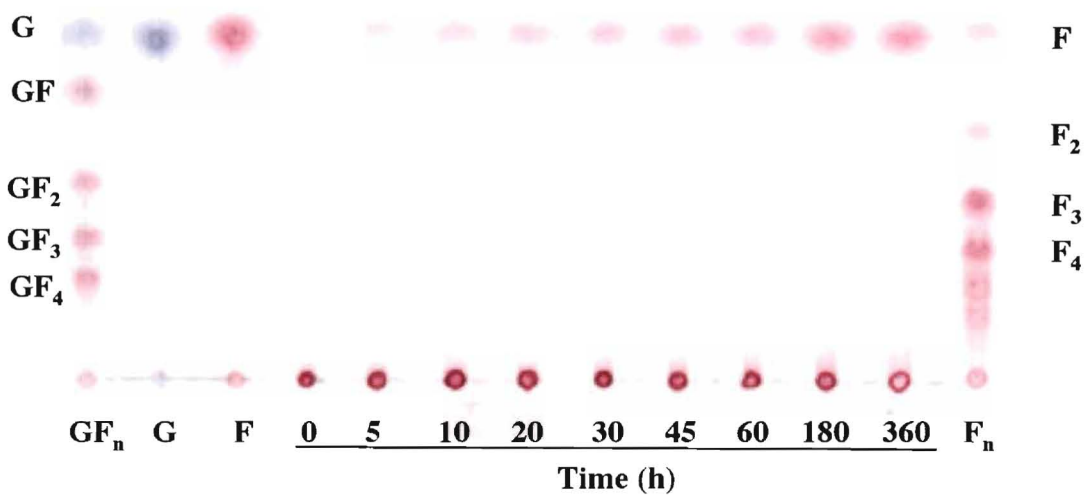


Fig. 3-5. TLC of inulin hydrolyzate with inulinase from *A. niger* strain 12. The enzyme reaction was done as described in the text. Standards: glucose (G), sucrose (GF), 1-kestose (GF₂), nystose (GF₃), 1^F- β -fructofuranosylnystose (GF₄), fructose (F), inulobiose (F₂), inulotriose (F₃), and inulotetraose (F₄).

Table 3-2. Comparison of properties of fungal exoinulinases.

Fungal strain	M_r (kDa)	pH optimum (stability)	Temperature optimum (stability)	K_m (mM)	Specific activity (U/mg) toward :		Activity toward levan	I/S	Ref.
					inulin	sucrose			
<i>Aspergillus awamori</i>	69	4.5	60°C (<50°C)	0.05	75	NA	+	NA	23
<i>Aspergillus niger</i>									
P- I	70	4.0 (4.0-7.0)	55°C (<50°C)	0.4	1.68	7.30	-	0.23	23
P- II	59	5.0 (4.0-7.0)	55°C (<50°C)	1.87	7.60	9.50	-	0.80	24
<i>Aspergillus niger</i>	81	4.5 (3.0-6.0)	60°C (<60°C)	NA ^a	52.80	227.00	-	0.23	This study
<i>Aspergillus ficuum</i>									
Exo I	76	4.7	60°C	15	NA ^a	NA ^a	NA ^a	0.16	23
Exo II	74	4.7	60°C	11	NA ^a	NA ^a	NA ^a	0.36	24
<i>Cryosporium panorum</i>									
F2	84	5.0 (5.0-7.5)	55°C (<50°C)	NA ^a	41.5	62.30	-	0.67	30
F3	70	6.0 (5.0-8.5)	55°C (<45°C)	NA ^a	10.50	36.20	+	0.29	30
<i>Penicillium</i> sp. 1									
P- I	86	4.5 (4.0-6.0)	45°C (<40°C)	173	44.3	22.7	+	2.0	25
P- II	64	5.0 (4.0-6.0)	45°C (<40°C)	233	16.3	25.0	+	0.65	25
P- III	66	4.0 (4.0-6.0)	50°C (<40°C)	157	1.39	1.22	+	1.1	25
<i>Penicillium trzebinskii</i>	87	5.2 (4.0-9.0)	NA ^a (<50°C)	42.0	103	61.7	-	1.7	26
<i>Penicillium</i> sp. TN-88	81	4.0 (5.0-7.0)	55°C (<50°C)	92.6	743	93.8	-	7.9	This study

^a NA, not available

3-4. 要約

本実験で黒麹菌 *A. niger* No. 12 株の培養ろ液より分子量 81 kDa、pI 5.0 のエキソ型イヌリナーゼを精製した。本酵素のイヌリン分解活性とスクロース分解活性はそれぞれ 52.8 と 227 units/mg であった。活性の最適 pH は 4.5、安定性は pH 3.0~6.0 の範囲であった。最適温度は 60°C、熱安定性は 60°C まで認められ、70°C で完全に失活した。本酵素はイヌリン分解反応初期より専らフルクトースを生成したことから、エキソ型イヌリナーゼであると考えられる。本酵素は、第一章で記述した *Penicillium* sp. TN-88 株のエキソ型イヌリナーゼと同様にレバンに作用しない型の酵素であった。

第四章 黒麹菌 *Aspergillus niger* No.12 株のエキソ型イヌリナーゼ遺伝子のクローニングと解析

4-1. 緒言

黒麹菌 *A. niger* No.12 株のエンド型イヌリナーゼ遺伝子はクローニングされ、その構造が明らかされている。³⁷⁾その遺伝子は染色体上に *inuA* と *inuB* の 2 コピー存在しており、*inuB* は炭素源の種類と無関係に構成的に転写されているのに対し、*inuA* は転写されないことが明らかにされた。³⁸⁾一方、第二章において糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88 株のエキソ型イヌリナーゼ遺伝子 *inuD* が同一菌株のエンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuC* と隣接して存在しており、その転写は real-time PCR を用いた解析により、両遺伝子ともイヌリンによって誘導され、グルコースとフルクトースによって抑制されていることが示された。このことから、本菌株におけるエンド型イヌリナーゼ遺伝子とエキソ型イヌリナーゼ遺伝子の位置関係とエキソ型イヌリナーゼの転写に及ぼす炭素源の影響の研究は興味深く思われる。また、エキソ型イヌリナーゼの遺伝子の構造は、第二章で述べた糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88 株と黒麹菌 *Aspergillus awamori*¹⁴⁾から報告されているのみであり、エキソ型イヌリナーゼの基質特異性の違いを構造から予測するには情報が不足している。本章では *A. niger* No.12 株のエキソ型イヌリナーゼ遺伝子のクローニングを行い、その塩基配列を決定し、RT-PCR によりその転写に及ぼす炭素源の影響について記述した。

4-2-1. 実験方法

4-2-1. アミノ酸配列の決定

Laemmli⁵⁷⁾の方法に従って前章で精製した *A. niger* No.12 株エキソ型イヌリナーゼ 500 µg を電気泳動し、ゲル中のタンパク質を PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜 (Immobilon-PSQ、Millipore) にブロッティングした。ブロッティング以後の操作は 2-2-1 項で記述した方法に従い、精製酵素 (81 kDa) の N 末端アミノ酸配列を決定した。

4-2-2. 染色体 DNA の調製

A. niger No. 12 株を 3-2-1 項で記述したイヌリナーゼ生産液体培地に植菌し、30°C で 3 日間回転振とう培養 (140 rpm) した。培養液を吸引ろ過し、菌体と培養ろ液を分離した。この菌体より 2-2-2 項に準じて染色体 DNA を抽出し、精製した。

4-2-3. エキソ型イヌリナーゼ遺伝子に特異的なプローブの作製

精製酵素の N 末端アミノ酸配列 FNYDQPY と既報¹⁴⁾の *A. awamori* と *Penicillium* sp. TN-88 株のエキソ型イヌリナーゼに保存されている内部アミノ酸配列 DWGPDFY からセンス・プライマー 5'-TTY AAY TAY GAY CAR CCS TAY-3' (Fig. 4-2A、P1) とアンチセンス・プライマー 5'-RTA RAA RTC SGG SCC CCA RTC-3' (Fig. 4-2A、P2) を設計し、合成した。プライマー 10 μM 溶液を各 1 μl、4-2-2 項で調製した染色体 DNA 溶液 1 μl、10×PCR 緩衝液 5 μl、25 mM MgCl₂ 4 μl、dNTPs 4 μl、*Taq* DNA ポリメラーゼ 0.25 μl を超純水で 50 μl とした反応液を作製した。PCR は 94°C、10 分間の DNA ポリメラーゼ活性化の後、94°C で 30 秒間、58°C で 30 秒間、72°C で 2 分 30 秒間の反応を 25 回し、最後に 72 °C で 7 分間反応させた。増幅した 942 bp の DNA 断片をアガロース・ゲル電気泳動で分離し Wizard PCR preps DNA purification system (Promega) を用いて抽出した。この DNA 断片を 2-2-3 項で記述した DIG DNA labeling and detection kit (Roche) を用いてランダム・プライマー法で DIG 標識した。また、PCR 産物を pCR2.1 にクローニングし、942 bp 塩基配列を決定した。

4-2-4. 染色体 DNA のサザン・ハイブリダイゼーション

染色体 DNA を *Bam*HI、*Sal* I、*Pst* I の各種制限酵素 100 U で完全消化し、1% TAE アガロース・ゲル電気泳動により DNA 断片を分離した。2-2-4 項で記述した方法に従って DNA 断片をブロットイングし、前項で作製した 942 bp のプローブを用いてサザン・ハイブリダイゼーションを行った。

4-2-5. エキソ型イヌリナーゼ遺伝子を含む DNA 断片のクローニングと塩基配列の決定

制限酵素 *Bam*HI 消化した染色体 DNA を電気泳動し、サザン・ハイブリダイゼーションでシグナルを示した 3.7 kbp の DNA 断片を抽出した。この DNA

断片を 2-2-14 項②に従って pUC18 にライゲーションし、大腸菌 JM109 株を形質転換した。LB/ X-gal/IPTG プレート上に生じた白色コロニーを 2-2-14 項③に従ってナイロン・メンブレンに転写し、4-2-3 項で作製したプローブを用いてコロニー・ハイブリダイゼーションを行った。シグナルを示す形質転換体 JM109 株のプラスミド (pINU602) を抽出し、3.7 kbp DNA 断片の全塩基配列を決定した。

4-2-6. cDNA の調製によるエキソ型イヌリナーゼ遺伝子の解析

3-2-1 項で作製したイヌリナーゼ生産液体培地 100 ml (pH 4.5) に本菌株を 24 時間、30°C で回転振とう培養 (140 rpm) した。培養液を吸引ろ過し、菌体と培養液を分離した。集めた菌体より 2-2-7 項に従って全 RNA 溶液を抽出し、得られた全 RNA 溶液より 2-2-8 項に従って mRNA を精製した。この mRNA を鋳型に 2-2-9 項に従って一本鎖 cDNA を合成した。センス・プライマー 5'-GGTGGATCCACCATGGCTCGTCTTTTGAAG-3' (Fig. 4-2A、P6) とアンチセンス・プライマー 5'-GGAATTAAGCGGCCGCTTAATTCCACGTCGAAGT-3' (Fig. 4-2A、P7) を用いてエキソ型イヌリナーゼ cDNA の ORF を増幅した。増幅断片を 2-2-14 項①に従って pCR2.1 にクローニングし、塩基配列を決定した。

4-2-7. エキソ型イヌリナーゼ mRNA の 5'末端、3'末端の決定

4-2-5 項で調製した一本鎖 cDNA を鋳型として 2-2-10、2-2-11 項で記述した方法に従って mRNA の 5'末端、3'末端を決定した。使用したプライマーと反応条件以外は 2-2-10 項と 2-2-11 項で記述した方法で行った。5' RACE には NUP (5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAAGT-3') (キット付属) とアンチ・センスプライマー 5'-TGAGATCCTCACTGGTAGCATGCC-3') (Fig. 4-2A、P4) を用いた。PCR は、94°C、10 分間の DNA ポリメラーゼ活性化の後、94 °C で 45 秒間、57 °C で 45 秒間、72 °C で 1 分間の反応を 30 回行い、最後に 72 °C で 7 分間反応させた。3'RACE にはセンス・プライマー 5'-ATTTGATAACACCTTCGCGAGCGT -3' (Fig. 4-2A、P5) と NUP (アンチセンス・プライマー、キット付属) を用いた。PCR は、アニーリング温度を 56°C とした他は 5'RACE の反応条件と同様に行った。5'および 3'RACE 産物を 2-2-14 項に従ってクローニングし、塩基配列を決定した。

4-2-8. *inuE* 遺伝子の転写解析

本菌株を3-2-1項で記述した培地でイヌリン、フルクトース、スクロースまたはグルコースを炭素源とした液体培地 (初発 pH 4.5) に本菌株をそれぞれ一白耳量植菌し、30°C、24時間、回転振とう培養 (140 rpm) した。各培養菌体から2-2-7項に従って全RNAを抽出し、2-2-8項に従ってmRNAを精製し、2-2-9項に従って一本鎖cDNAをそれぞれ合成した。調製した各一本鎖cDNA溶液1 µlに *inuE* 遺伝子に特異的な10 µMセンス・プライマー5'-ATGGCTCGTCTTTTGAAG-3' (Fig. 4-2A、P6) 溶液1 µlと10 µMアンチセンス・プライマー5'-TTAATTCCACGTCGAAGT-3' (Fig. 4-2A、P7) 溶液1 µl、10×PCR緩衝液 (AmpliTaq Gold付属) 5 µl、25 mM MgCl₂溶液4 µl、各10 mM dNTP溶液4 µl、*Taq* DNAポリメラーゼ (AmpliTaq Gold、PE) 0.5 µlを加え超純水で50 µlとした反応液をそれぞれ作製した。一方、*inuE* 遺伝子の転写レベルを比較するため、*inuE* 遺伝子に特異的な一対のプライマーの代わりに構成的に発現している*inuB* 遺伝子に特異的な10 µMセンス・プライマー5'-CAGTCTAATGATTACCGTCCA-3'溶液と10 µMアンチセンス・プライマー5'-ATTGCTGTCTCAACTTGTACC-3'溶液を加えた反応液をそれぞれ作製した。これらの反応液をサーマル・サイクラーにセットし、PCRは、94°C、10分間のDNAポリメラーゼ活性化の後、94 °Cで30秒間、55 °Cで45秒間、72°Cで2分間の反応を30回行った。これらのPCR反応液を1%アガロース・ゲルで電気泳動し、分離したDNA断片を2-2-4項に従ってナイロン・メンブランにブロッティングし、4-2-3項で作製した942 bpの*inuE* 遺伝子プローブまたは899 bp *inuB* 遺伝子プローブ (*inuB* 遺伝子³⁷⁾内部の*Pst*I DNA断片) を用いてサザン・ハイブリダイゼーションにより検出した。

4-3. 結果および考察

4-3-1. 精製酵素の部分アミノ酸配列

黒麹菌 *A. niger* No. 12 株の培養ろ液から精製したエキソ型イヌリナーゼのN末端から20残基のアミノ酸配列、FNYDQPYRGQYHFSPQKNWMを決定した。

4-3-2. エキソ型イヌリナーゼ遺伝子に特異的なプローブの作製

本菌株の染色体DNAおよび作製したプライマーを用いたPCRにより942 bp

の増幅断片を得た。尚、増幅断片の推定アミノ酸配列中に精製酵素のN末端アミノ酸配列 (Fig. 4-2B に示した 20 から 39 番目までのアミノ酸残基に相当) の存在を確認した。この増幅断片をもとに DIG 標識 DNA 断片を作製し、これをエキソ型イヌリナーゼ遺伝子に特異的なプローブとした。

4-3-3. 染色体 DNA のサザン・ハイブリダイゼーション

4-2-3 項で作製した特異的プローブを用いて、制限酵素で消化した染色体 DNA とサザン・ハイブリダイゼーションを行ったところ、*Bam*HI (3.7 kbp)、*Sal* I (9 kbp)、*Pst* I (6.5 kbp) についてそれぞれ一つずつシグナルが確認された。これより本遺伝子が染色体上に 1 コピー存在することが明らかとなった (Fig. 4-1)。

4-3-4. エキソ型イヌリナーゼ遺伝子のクローニング

プラスミド pUC18 を用いて *Bam*HI 消化した染色体 DNA より 3.7 kbp の DNA 断片をクローニングした (pINU602)。

4-3-5. エキソ型イヌリナーゼ遺伝子の塩基配列

pINU602 に組み込まれた *inuE* 遺伝子を含む 3.7 kbp の *Bam*HI 断片の塩基配列を決定した。Fig. 4-2B にクローニングした DNA 断片の 2276 bp の *Hinc*II-*Bam*HI 領域の塩基配列と *inuE* 遺伝子の推定アミノ酸配列を示した。3660 bp の DNA 断片は 1611 bp の完全な *inuE* 遺伝子コード領域とその近傍の塩基配列を含んでいた。*inuE* 遺伝子の上流域 1797 bp に相同性を示す ORF はデータベースに存在しなかった。*Penicillium* sp. TN-88 株染色体上でエンド型イヌリナーゼとエキソ型イヌリナーゼ遺伝子はクラスターを形成し、859 bp の遺伝子間領域から逆向きに転写されていた (2-3-6 項参照) が、*A. niger* No. 12 株ではそのようなクラスターの形成は認められなかった。*inuE* 遺伝子の染色体 DNA と cDNA の塩基配列の比較によりコード領域に一ヶ所のイントロン 60 bp が認められた。第二章で記述した *Penicillium* sp. TN-88 株と *Aspergillus awamori*¹⁴⁾ のエキソ型イヌリナーゼ遺伝子も保存された位置に一つのイントロンを含んでいた。スプライスされた部位の 5' と 3' 末端は GTRNGY と YAG⁶⁶⁾ にそれぞれ一致し、スプライス部位の 3' 末端の 14 bp 上流の塩基配列 ACTAAC はラリアット形成に必要な塩基配列 RCTRAC⁶⁵⁾ に一致した。*inuE* 遺伝子の 5' 非コード領域は開始コドンの -75 に TATA ボックス (TATAAA) を含んでおり、TATA ボックスの 33 と 51 bp 上流に CAAT ボックスの相

補配列ATTGが認められた。黄麹菌*Aspergillus oryzae*の α -アミラーゼ遺伝子の澱粉応答部位のコンセンサス配列GGAAATT⁴⁴⁾が*inuE*遺伝子のプロモーター領域に認められ、イヌリンによる転写誘導への関与が示唆された。また、*Aspergillus nidulans*においてカタボライト抑制を司っているタンパク質CreA結合部位のコンセンサス配列5'-SYGGRG-3'⁴⁵⁾が開始コドンの-319 (CCGGGG)、-342 (CTGGGG)、-392 (GCGGGG)、-398 (相補配列GTGGGG) に認められ、グルコースによる転写抑制が示唆された。5'RACE産物6クローンは開始コドンの-41 (3クローン)、-35 (1クローン)、-31 (2クローン) の転写開始点を示した。-54と-41番目の一組のATCTTCAG配列は順方向繰り返し配列と確認され、これらが*inuE*遺伝子の調節領域の部分として機能している可能性がある。また3クローンの3'RACE産物の塩基配列決定により終止コドン下流99 bp (2クローン) と106 bp (1クローン) のポリ (A) 付加部位を明らかにした。

4-3-6. *inuE* 遺伝子産物のアミノ酸配列

*inuE*遺伝子のORFは、精製酵素で決定したN末端アミノ酸配列に相当する配列を含んでおり、19残基の分泌シグナルと518残基の成熟タンパク質をコードしていた。Ala-17とAla-19はvon Heijneら⁶⁷⁾の解析によって提唱されているシグナル・ペプチド切断部位の-3と-1に一致した。ハイドロパシー・プロットはシグナル配列が疎水的であることを示した。成熟タンパク質の推定アミノ酸配列から分子量は57,251 Da、pIは4.92と算出された。推定分子量がSDS-PAGEによって測定された分子量81 kDa (Fig. 3-4)より小さいのは糖タンパク質へのSDSの結合が減少し、電気泳動における移動度が小さくなったためと考えられる。本酵素はN-グリコシル型糖鎖結合部位を9カ所含んでおり、糖タンパクであると示唆された (49、111、300、363、430、531番目の6つのアスパラギン残基はN-X-T型、67、112、398番目の3つのアスパラギン残基はN-X-S型)。エキソ型イヌリナーゼとエンド型イヌリナーゼ、インベルターゼ、レバナーゼは糖加水分解酵素ファミリー³²⁾に属している。酵母*Saccharomyces cerevisiae*のインベルターゼで保存領域MNDPNGのアスパラギン酸残基とECPのグルタミン酸残基はそれぞれ求核試薬とプロトン供与体として触媒に関与していることが明らかにされており、⁴³⁾同様の触媒機構が*A. niger* No. 12株 エキソ型イヌリナーゼのAsp-41とGlu-241によってなされていると考えられる。シグナル・ペプチド内のCys-11と別にCys-242が保存領域ECP内に存在した。本酵素はHg²⁺、pCMBで阻

害されることから、このCys-242が活性発現に関与していると考えられる。

4-3-7. アミノ酸配列の比較

*inuE*遺伝子産物のアミノ酸配列はBLAST検索によって1-fructosyltransferase (1-SST; EC 2.4.1.99) として報告されている*Aspergillus foetidus*遺伝子産物の537残基の3残基のみが置換されている。置換された3残基は119番目 (His対Gln) と476番目 (Gly対Ser) と499番目 (Thr対Ser) の位置で化学的に類似しており、触媒活性の違いを説明することはできない。Rehm⁶⁹⁾は*A. foetidus*の培養ろ液を500 mMのスクロースと保温すると1-kestoseが合成されると述べているが、*S. cerevisiae*で発現させた*A. foetidus*酵素は優先的にスクロースを分解し、TLC解析は少量の1-kestoseを形成することを示している。第五章にて*Pichia pastoris*で発現、分泌された*inuE*遺伝子産物は5.0% (w/v) のスクロース溶液と酵素活性測定条件で保温した時にでフルクトース残基転移活性を示さなかった。*A. foetidus*酵素は高濃度スクロース溶液中でフルクトース残基転移を触媒する付加的な活性を持つエキソ型イヌリナーゼと考えるのが適当だと思われる。*A. niger* No.12株エキソ型イヌリナーゼは*A. awamori*エキソ型イヌリナーゼ¹⁴⁾と91%、*Aspergillus*酵素と比較して挿入された157残基のアミノ酸配列を除いた*Penicillium* sp. TN-88株エキソ型イヌリナーゼ (第二章で記述) と61%の相同性を示した。*A. niger* No.12株酵素はイヌリンとレバンを加水分解する*A. awamori*酵素¹⁴⁾と高い一次構造の相同性を示しながら、レバンのβ-2,6フルクトフラノシル結合に対する活性を持たない。アミノ酸配列SVEVF (Fig. 4-3) は糸状菌エンド型イヌリナーゼと細菌レバナーゼで保存されており、酵母インベルターゼでは保存されていない。³⁷⁾糸状菌エキソ型イヌリナーゼのC末端領域にこの配列が存在することはこの配列が高分子のフルクトタンに結合する重要な役割を持つことを示唆している。³⁷⁾

A. niger No. 12株エキソ型イヌリナーゼは細菌レバナーゼ*Bacillus subtilis*⁷¹⁾ (42%)、*Actinomyces naeslundii*⁶⁰⁾ (41%)、*Bacillus polymyxa*⁷²⁾ (39%)、酵母インベルターゼ*S. cerevisiae*⁵⁸⁾ (39%)、*Pichia anomala*⁵⁹⁾ (40%)、酵母エキソ型イヌリナーゼ*Kluyveromyces marxianus*⁴⁶⁾ (38%)、糸状菌エンド型イヌリナーゼ*Penicillium* sp. TN-88³⁹⁾ (37%)、*Penicillium purpurogenum*⁴⁰⁾ (36%)、*Aspergillus niger*³⁷⁾ (35%) のβ-フルクトフラノシダーゼ・ファミリー酵素と顕著な相同性を示した。

4-3-8. 糸状菌エキソ型イヌリナーゼの進化上の位置

4-7-7項で記述した相同性を示した β -フルクトフラノシダーゼとの糸状菌エキソ型イヌリナーゼの進化的な位置を調べるために全長のアミノ酸配列をもとに、TREECON系統樹作成プログラム⁷³⁾を用いて近隣結合法⁷⁴⁾により無根系統樹を作製した。各枝分かれのブートストラップ信頼度⁷⁵⁾は93 %から100 %の範囲であった。*A. foetidus* 1-SSTは触媒活性について明らかでないので除外した。Fig. 4-4で示した系統樹において*Aspergillus*属と*Penicillium*属由来のエキソ型イヌリナーゼとエンド型イヌリナーゼは互いに離れた位置で別々にクラスターを形成していた。糸状菌エキソ型イヌリナーゼは酵母インベルターゼを含むクラスターと結合していた。一方エンド型イヌリナーゼは放線菌*A. naeslundii*レバナーゼと系統樹の枝を共有していた。*Bacillus*属細菌のレバナーゼは糸状菌エキソ型イヌリナーゼと糸状菌エンド型イヌリナーゼのクラスターの間位置していた。以上より糸状菌エキソ型イヌリナーゼと糸状菌エンド型イヌリナーゼはそれぞれ独自にイヌリンの末端と内部の β -2,1結合に対する加水分解活性を獲得したことが示唆された。

4-3-9. 炭素源による*inuE*遺伝子の転写調節

Fig. 4-5に示すように*inuE*遺伝子cDNAはイヌリンとスクロースを炭素源とした生育菌体由来のものは増幅されたが、フルクトース、グルコースを炭素源とした生育菌体由来のものは増幅されなかった。またポジティブ・コントロールの*inuB*遺伝子cDNAはいずれの炭素源でも増幅された。このことから*inuE*遺伝子の転写はイヌリンとスクロースによって誘導され、フルクトースとグルコースにより抑制されることが示された。また、エキソ型イヌリナーゼ遺伝子*inuE*とエンド型イヌリナーゼ遺伝子*inuB*の開始コドンの上流600 bp以内の塩基配列を比較した (Fig. 4-6)。正の調節因子である澱粉応答部位のコンセンサス配列GGAAATT⁴⁴⁾が*inuE*では1ヶ所存在し、*inuB*では-182 (GGAAATT) と-561 (TCACGGGC) に2ヶ所存在した。一方、負の調節因子であるCreA結合部位 (5'-SYGGRG-3')⁴⁵⁾が、*inuE*には-319 (CCGGGG) 、-342 (CTGGGG) 、-392 (GCGGGG) 、-398 (相補配列GTGGGG) に4ヶ所存在したのに対し、*inuB*では存在しなかった。このことから、イヌリナーゼの転写調節にこれらの転写因子が関与していることが示唆された。

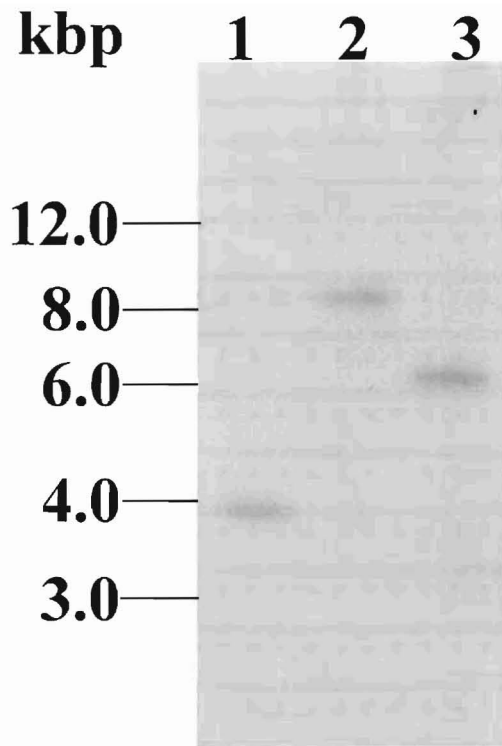


Fig. 4-1. Southern blot analysis of genomic DNA from *A. niger* strain 12.

Genomic DNA was digested with *Bam*HI (lane 1), *Sal*II (lane 2), or *Pst*I (lane 3). The resultant fragments were separated by agarose gel electrophoresis. The blot was hybridized with a DIG-labeled probe specific for the exoinulinase gene. Hybridization signals were detected with a DIG Labeling and Detection Kit. The positions of size markers are indicated on the left margin.

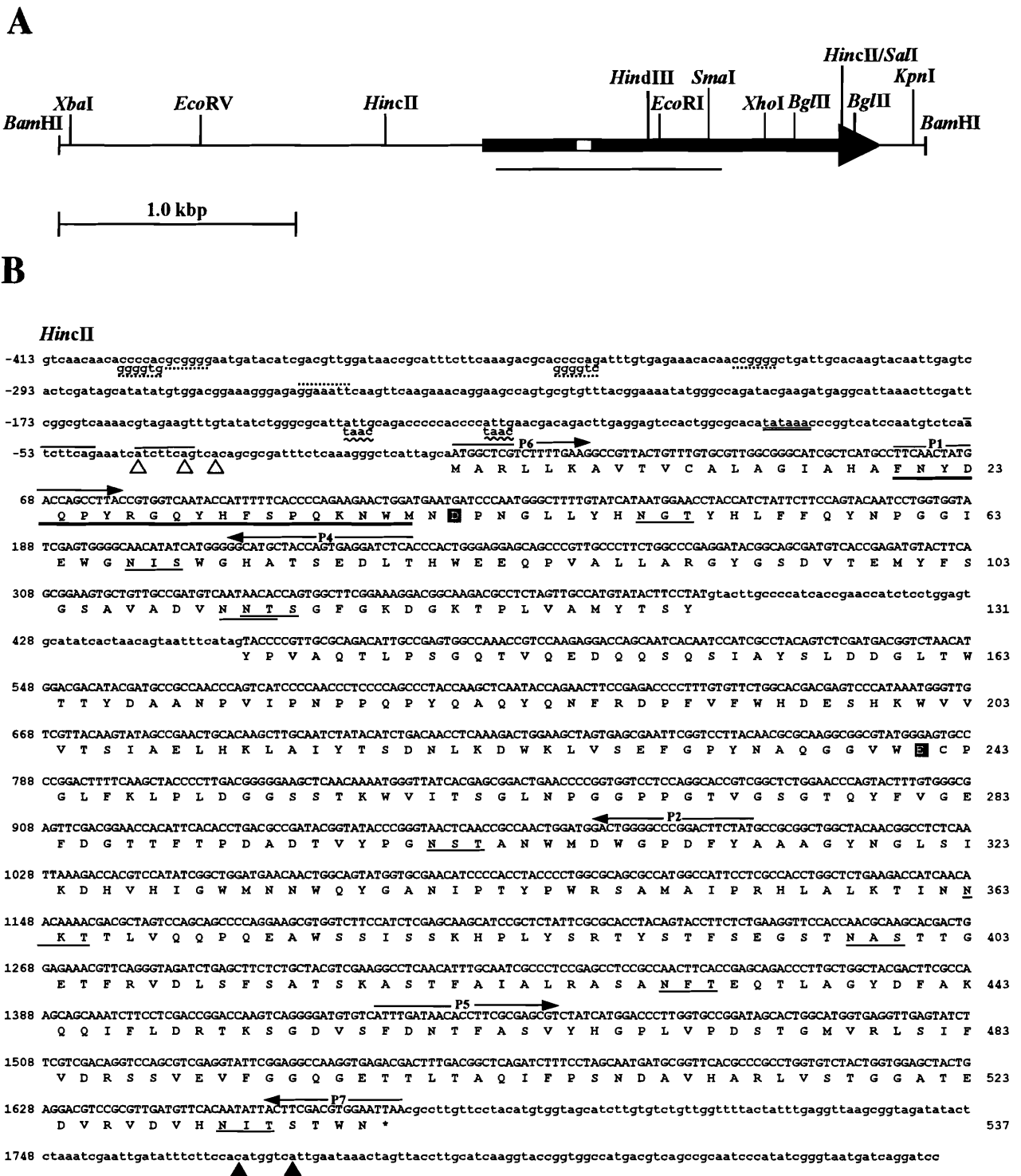


Fig. 4-2. (A) Restriction map of cloned DNA fragment containing the *inuE* gene from *A. niger* strain 12. The arrow represent the position and orientation of the ORF. An intron of 60 bp is shown as an open box. The solid line below the map indicates the location of the 942-bp PCR fragment used as an *inuE* probe. (B) Nucleotide and deduced amino acid sequences of *HincII*-*BamHI* region. Numbers in the left-hand column refer to the nucleotide sequence and are relative to the A of the ATG start codon, and numbers on the right represent amino acid residues. The coding sequence of the *inuE* gene is shown in uppercase letters. The deduced amino acid sequence is given by one-letter code below the nucleotide sequence at the first position of each codon. The stop codon is indicated by an asterisk. Putative CREB-binding sites (5'-SYGGRG-3') (dotted underlines), a starch-responsive element GGAAATT (dotted line), the CAAT sequences of the complementary strand (wavy underlines), a putative TATA box (double underline), a pair of direct repeat (overlines), transcription start points (open arrowheads), and polyadenylation sites (solid arrowheads), are shown in the 5'- and 3'-noncoding regions. The amino acid sequence underlined by the thick line was identical to that found for the purified protein. The putative catalytic residues are indicated by inverted letters. Potential sites for N-linked glycosylation are underlined. The positions of gene-specific primers, P1 to P7 (excluding the universal primer P3), are indicated by horizontal arrows.

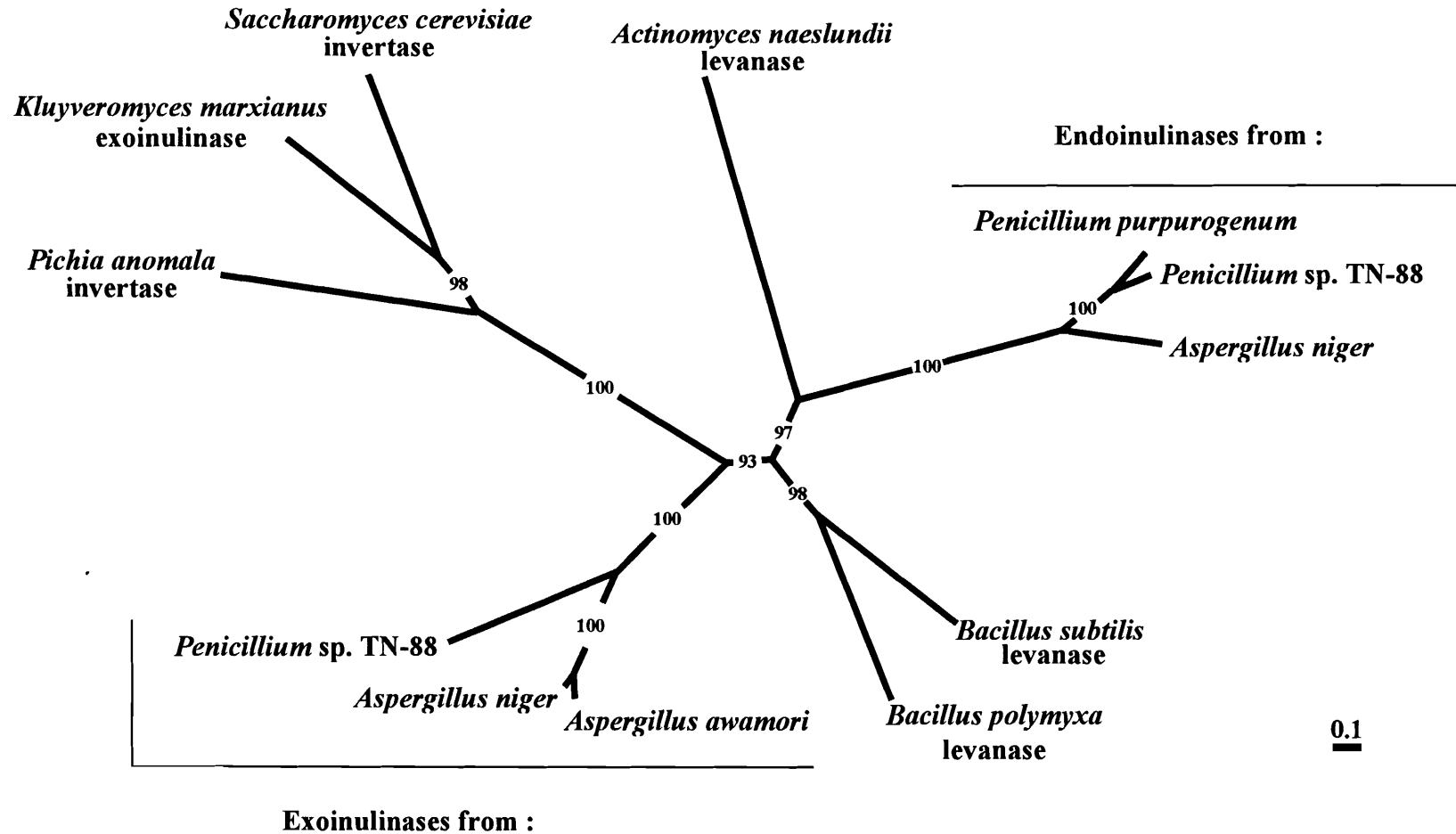


Fig. 4-4. Unrooted phylogenetic tree showing evolutionary distances among fungal exoinulinases and other homologous β -fructofuranosidases. The phylogenetic tree is constructed by neighbor-joining method on the basis of the deduced amino acid sequences. Numbers on the tree represent bootstrap confidence values (%) based on 1000 replications. The scale bar denotes 0.1 amino acid substitution per site. Sources of sequence data (accession numbers are given in parentheses): exoinulinases of *A. niger* (*inuE*, this study), *Penicillium* sp. TN-88 (*inuD*, AB041337), and *A. awamori* (*inuI*, AJ315793); levanases of *A. naeslundii* (*levJ*, U12274), *B. subtilis* (*sacC*, X05649), and *B. polymyxa* (*leIA*, Z26651); endoinulinases of *Penicillium* sp. TN-88 (*inuC*, AB041337), *P. purpurogenum* (*INUA*, D84360), and *A. niger* (*inuB*, AB012772); invertase of *S. cerevisiae* (*SUC2*, V01311) and *P. anomala* (*INVI*, X80640); *K. marxianus* exoinulinase (*INU1*, X57202)

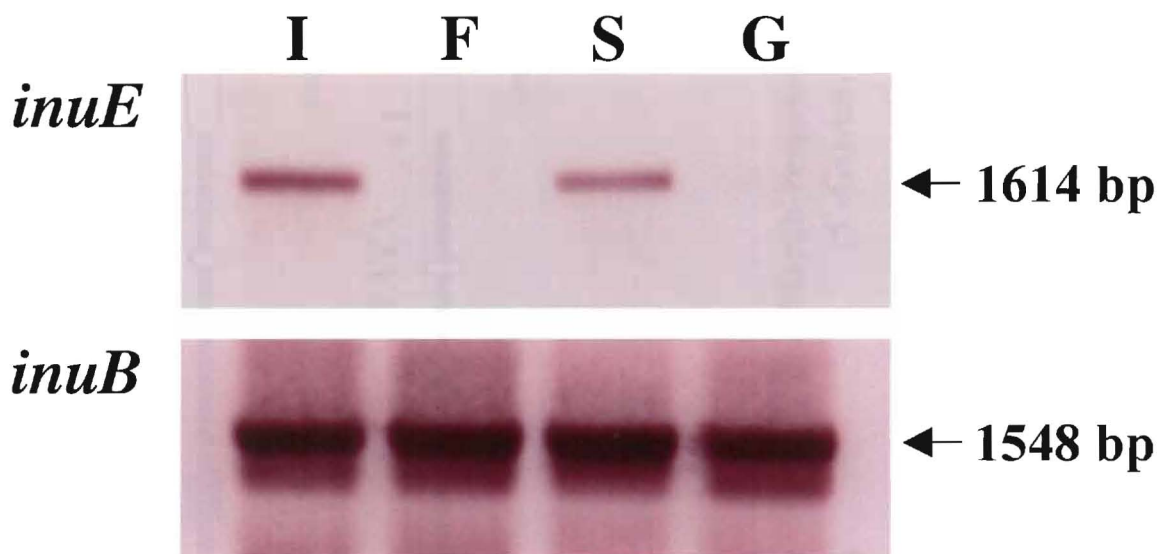


Fig. 4-5. RT-PCR products showing the expression pattern of the *inuE* gene in *Aspergillus niger* strain 12 grown on different carbon sources. First-strand cDNAs were generated from mRNA isolated from mycelia grown for 24 h on inulin (lane I), fructose (lane F), sucrose (lane S) and glucose (lane G). PCR was performed with gene-specific primers for *inuE* (top) and *inuB* (bottom). Equal volumes of each sample were run on agarose gel. The blots were hybridized with the respective DIG-labeled DNA probes specific for *inuE* and *inuB* genes. Hybridization signals were detected with DIG labeling and detection kit. Sizes of RT-PCR products are shown on the right margin.

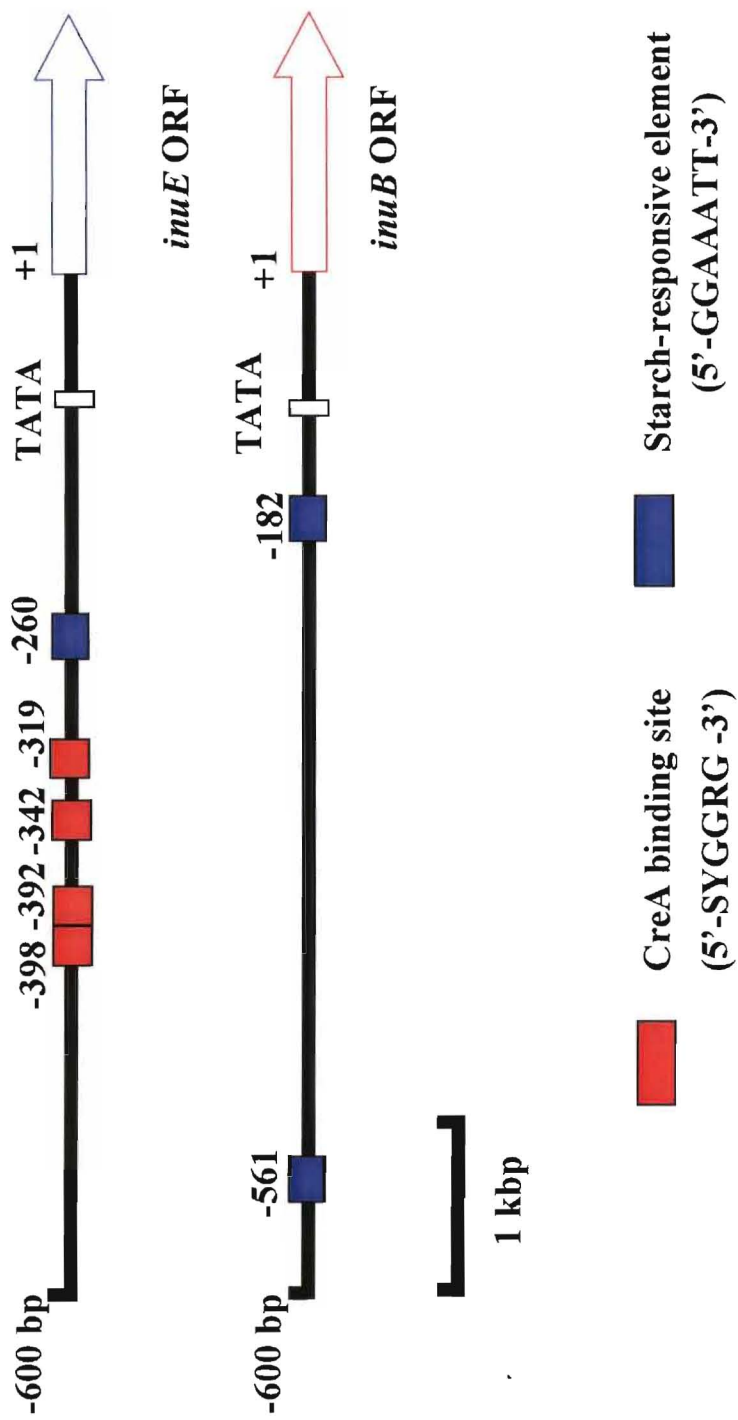


Fig. 4-6. Schematic drawing showing putative *cis*-elements loci in *inuE* or *inuB* promoter region, respectively.

4.4. 要約

本章では黒麹菌 *A. niger* No. 12 株のエキソ型イヌリナーゼ遺伝子 *inuE* をクローニングし、その塩基配列を決定した。染色体 DNA のサザン・ブロット解析により、本遺伝子が染色体 DNA 上に 1 コピー存在することが明らかにした。*inuE* 遺伝子のコード領域に一ヶ所のイントロン 60 bp が認められた。*inuE* 遺伝子の ORF は、精製酵素で決定した N 末端アミノ酸配列に相当する配列を含んでおり、19 残基の分泌シグナルと 518 残基の成熟タンパク質をコードしていた。*A. niger* No.12 エキソ型イヌリナーゼは *A. awamori* エキソ型イヌリナーゼと 91 %、*Aspergillus* 酵素と比較して挿入された 157 残基のアミノ酸配列を除いた *Penicillium* sp. TN-88 エキソ型イヌリナーゼと 61 %の相同性を示した。 β -フルクトフラノシダーゼとアミノ酸配列をもとに作製した無根系統樹は *Aspergillus* 属と *Penicillium* 属由来のエキソ型イヌリナーゼとエンド型イヌリナーゼは互いに離れた位置で別々にクラスターを形成していた。糸状菌エキソ型イヌリナーゼは酵母インベルターゼを含むクラスターと繋がっていた。一方、エンド型イヌリナーゼは *A. naeslundii* レバナーゼと系統樹の枝を共有していた。*Bacillus* 属細菌のレバナーゼは糸状菌エキソ型イヌリナーゼと糸状菌エンド型イヌリナーゼのクラスターの間位置していた。以上より、糸状菌エキソ型イヌリナーゼと糸状菌エンド型イヌリナーゼはそれぞれ独自にイヌリンの末端と内部の β -2,1 結合に対する加水分解活性を獲得したことが示唆された。*inuE* 遺伝子の 5' 非コード領域には澱粉応答部位⁴⁴⁾のコンセンサス配列 GGAAATT と CreA タンパク質の結合部位のコンセンサス配列 5'-SYGGRG-3'⁴⁵⁾が認められた。転写解析により *inuE* 遺伝子の転写はイヌリンとスクロースによって誘導され、フルクトースとグルコースにより抑制されることを明らかにした。

第五章 *Penicillium* sp. TN-88 株エキソ型イヌリナーゼ InuD に固有の内部アミノ酸配列の解析

5-1. 緒言

糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88 株のエキソ型イヌリナーゼのイヌリン分解活性 (743 units /mg) は、既報のエキソ型イヌリナーゼ^{14, 17, 29, 30, 33-35)}で最も高く、第三章で記述した黒麹菌 *Aspergillus niger* No.12 株の同酵素 (52.8 units/mg) の14倍、*Aspergillus awamori* 由来の同酵素¹⁴⁾(75 units/mg) の10倍である。また、イヌリン分解活性 (I) に対するスクロース分解活性 (S) の比を表す I/S の値は、既報のエキソ型イヌリナーゼでは1未満のものが多く、稀に2程度の酵素が報告されている。³³⁾ところが InuD の I/S は7.9 であり、他の同酵素と異なりスクロース分子よりイヌリン分子に対して著しく高い親和性を持つことが示唆された。糸状菌のエキソ型イヌリナーゼ遺伝子としては *Penicillium* sp. TN-88 株、³⁶⁾*A. niger* No.12 株、⁴²⁾*A. awamori* 由来¹⁴⁾のものが報告されているが、アミノ酸レベルの機能解析の報告はない。これら3種の糸状菌エキソ型イヌリナーゼの推定アミノ酸配列の多重整列 (Fig. 4-3) により、*Penicillium* sp. TN-88 株由来エキソ型イヌリナーゼ InuD には、*A. niger* No.12 株と *A. awamori* 由来の同酵素 InuE (537アミノ酸残基) と Inu1 (537アミノ酸残基) には存在しない157アミノ酸残基 (702アミノ酸残基の Gly-308 から Thr-464 まで) の挿入配列(以下、挿入配列と略す) が認められた。本章では、InuD の挿入配列がその高いイヌリン分解活性に寄与しているものと推察し、この挿入配列を InuE の内部に組込んだ融合酵素を酵母 *Pichia pastoris*⁷⁷⁾で分泌発現させ、その機能を解析した結果を記述する。

5-2. 材料と実験方法

5-2-1. 宿主とベクターDNA

酵母 *Pichia pastoris* GS115 株はメタノールを唯一の炭素源として生育することが可能である。しかもインベルターゼ活性を欠き、高い分泌効率を持つことからエキソ型イヌリナーゼやエンド型イヌリナーゼの異種発現系として好適な宿主である。また、histidinol dehydrogenase 遺伝子に変異を含むことから、ヒ

スチジン要求変異株である。

染色体組込型発現ベクターpHIL-S1 (Invitrogen) は発現カセットにアルコール酸化酵素遺伝子 (*AOX1*) のプロモーターとターミネーターを持ち、*HIS4* 遺伝子選択マーカーを含んでいる。また、*P. pastoris* の *PHO1* 遺伝子の分泌シグナルのコード領域が *AOX1* 遺伝子下流に挿入されている。従って外来遺伝子はこの分泌シグナルによって分泌発現される。

本章で使用したもう一つの酵母発現ベクターpPIC3.5 (Invitrogen) は、pHIL-S1と同様に発現カセットにアルコール酸化酵素遺伝子 (*AOX1*) プロモーターとターミネーターを含む。しかし、分泌シグナルのコード領域を含まないため、このベクターで分泌させるには、外来遺伝子の分泌シグナルをコードする領域も発現カセットに挿入する必要がある。このことから本ベクターは *P. pastoris* における外来性遺伝子の分泌シグナルの機能解析に有効である。

5-2-2. 融合遺伝子の作製

イヌリンを炭素源として生育した *A. niger* No. 12 株由来の一本鎖 cDNA (4-2-6 項参照) を鋳型としてプライマーEP1 と P4 (Table 6-1) と KOD-plus-DNA ポリメラーゼ (東洋紡) を用いて PCR により *inuE* 遺伝子の ORF を増幅した。この増幅 DNA 断片を制限酵素 *Bam*HI と *Not*I で消化し、発現ベクターpPIC3.5 の同部位に挿入した組換えプラスミドを pINU605 とした。また、イヌリンを炭素源として生育した *Penicillium* sp. TN-88 株の cDNA (2-2-9 項参照) を鋳型にプライマーDP1 と DP2 (Table 6-1) を用いて PCR により *inuD* 遺伝子の成熟タンパク質コード領域を増幅した。この増幅 DNA 断片を制限酵素 *Eco*RI と *Sma*I で消化し、酵母発現ベクターpHIL-S1 の *PHO1* の分泌シグナル下流の *Eco*RI-*Sma*I 部位に挿入し、pINU514 とした。融合遺伝子の作製は Fig. 6-1 に示す重複 PCR 伸長法⁷⁶⁾で行った。組換えプラスミド pINU605 を鋳型にプライマーP1 と P2、および P3 と P4 (Table 6-1) を用いて PCR によりそれぞれ 897 bp (断片①) と 717 bp (断片②) の DNA 断片を増幅した。一方、pINU514 を鋳型にして、プライマーP5 と P6 (Table 6-1) を用いて PCR により、157 残基の *InuD* 内部アミノ酸配列をコードする領域 (471 bp、断片③) を増幅した。作製した 3 種類の増幅 DNA 断片①②③を混合し、5 サイクルの PCR により結合させ 2085 bp DNA 断片を作製した。1%ア

ガロース・ゲル電気泳動で融合遺伝子 DNA 断片を分離後、ゲルから抽出し、これを鋳型としてプライマーP1とP4を用いて再度PCRを行った。得られたPCR産物を制限酵素 *NotI* で消化し、発現ベクターpPIC3.5の*NotI* 部位に挿入し、pINU607とした。

5-2-3. 酵母 *Pichia pastoris* での発現

制限酵素 *SacI* 消化によりプラスミド pINU605、pINU514、pINU607 を直鎖状とし、6-2-6 項で記述したエレクトロポレーション法により酵母 *P. pastoris* GS115 株の染色体上に存在する *AOX1* 遺伝子のプロモーター下流にそれぞれ組込んだ。

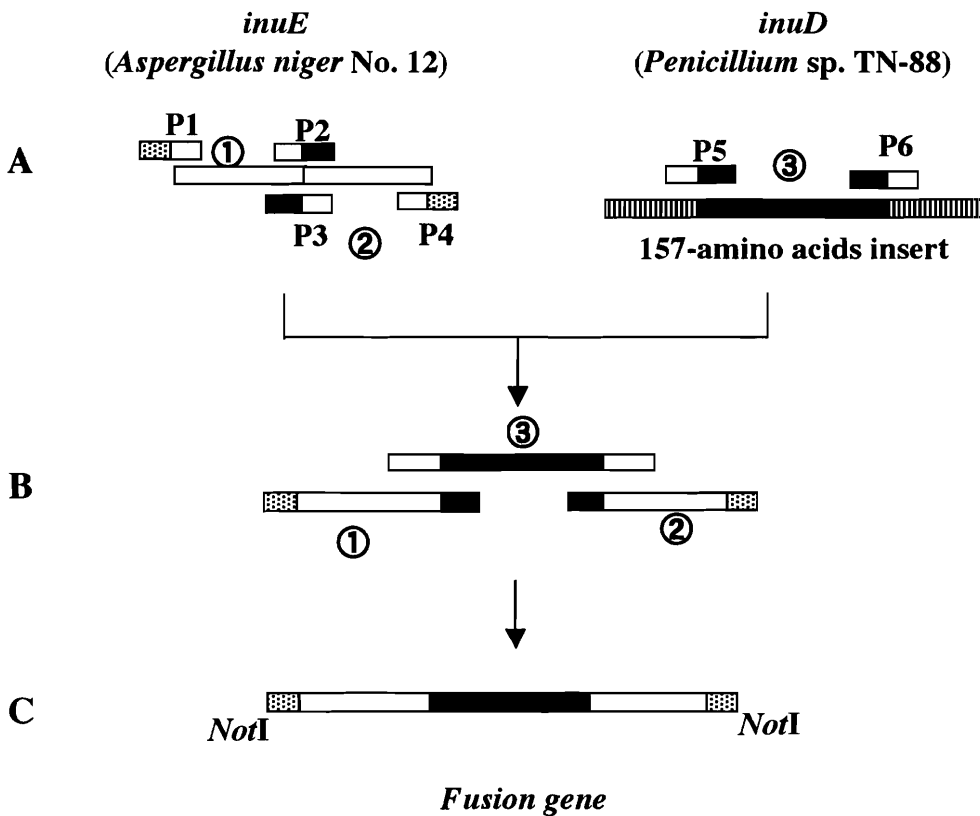


Fig. 5-1. Schematic drawing showing fusion gene construction.
 (A) N-terminal coding region of *inuE* gene (①), C-terminal coding region of *inuE* gene (②), and the coding region of 157-amino acid insert in *inuD* gene (③) were amplified by PCR using P1 and P2, P3 and P4, and P5 and P6, respectively. (1st PCR) (B) 1st PCR products ①②③ were mixed and subjected to 5 cycles PCR. (2nd PCR) (C) 2nd PCR product was separated by 1% agarose gel electrophoresis. Fusion gene was extracted from gel and subjected to PCR using P1 and P4 as template. (3rd PCR) P1, P2, P3, P4, and P6 show oligo-nucleotide primers for PCR and the sequences are shown in detail in Table 6-1.

Table 5-1. Primers for exoinulinase gene construction.

Primer	Sequence ^a	Position (5' to 3') or remark
DP1	5'-TTGAATTCAAGGAATCCTACACGGAAC TTTAC -3'	76 to 99 ^b (<i>EcoRI</i> site is underlined.)
DP2	5'-TAGCCCGGGCTATACCCATGTACTGCGTACTTT-3'	2142 to 2165 ^b (<i>SmaI</i> site is underlined.)
EP1	5'-GGTGGATCCACCATGGCTCGTCTTTTGAAG-3'	1 to 18 ^c (<i>BamHI</i> site is underlined.)
P1	5'-GCCATGGTGC GGCCGC ACCATGGCTCGTCT-3'	1 to 11 ^c (<i>NotI</i> site is underlined.)
P2	5'-ACCGTCTGGGGGGCCACCCGGGTATAACCGT-3'	978 to 992 ^b , 943 to 957 ^c
P3	5'-AACACCCCTGCCACA AACTCAACCGCCAAC -3'	1434 to 1448 ^b , 958 to 972 ^c
P4	5'-GGAATTAAGCGG CCGCTTAATTCCACGTCGAAGT -3'	1657 to 1674 ^c (<i>NotI</i> site is underlined.)
P5	5'-ACGGTATA CCCGGGTGGCCCCCAGACGGT -3'	943 to 957 ^c , 978 to 992 ^b
P6	5'-GTTGGCGGTTGAGTTTGTGGCAGGGGTGTT-3'	958 to 972 ^c , 1434 to 1448 ^b

a. Letters in bold type and italic type indicate the *inuE* and *inuD* coding sequence, respectively. Some of primers contained additional sequences at 5' ends to generate restriction sites (underlined).

b. Position refers to that in the *inuD* sequence indicated in Fig. 2-3.

c. Position refers to that in the *inuE* sequence indicated in Fig. 4-2A.

5-2-4. 組換え酵素の精製

BMMY 培地 [1.0% (w/v) 酵母エキス、2.0% (w/v) ペプトン、100 mM リン酸緩衝液、pH 6.0、1.34% (w/v) イースト・ニトロゲン・ベース (Sigma)、 4×10^{-5} % (w/v) ビオチン、0.5% (v/v) メタノール] 100 ml を 500 ml 容三角フラスコに分注した。各形質転換体を BMMY 培地で 24 時間毎にメタノール 0.5 ml を加えながら、30°C で 5 日間回転振とう培養 (150 rpm) した。培養液を遠心分離し、菌体と上清を分離した。上清を透析膜 (C-65、三光純薬) に入れ蒸留水中で透析し、ポリエチレングリコール 20,000 (和光純薬) で約 1/10 の液量に濃縮後、凍結乾燥した。凍結乾燥酵素標品を 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 2 ml に溶解し、DEAE-Cellulofine A-500 (生化学工業) カラム (10×200 mm) に供し、20 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) で未吸着部分を流出した (1.0 ml/min)。次に 0~0.6 M NaCl を含む同緩衝液で Linear gradient elution により吸着した酵素を溶出し、5 ml ずつ分取した。活性ピークの画分を集め、凍結乾燥し、0.15 M NaCl を含む 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した (20×600 mm) Sephacryl S-200 HR に供し、流速 1.0 ml/min で同緩衝液を流し、3 ml ずつ分取した。

5-2-5. 基質親和性

イヌリン (チコリ起源、Sigma) の分子量を 5,500 と推定し、0.25~10 mM の各濃度のイヌリン水溶液を調製した。また、2~100 mM の各濃度のスクロース水溶液を作製した。各濃度の基質溶液 0.1 ml に 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で希釈した各組換え酵素液 0.1 ml (イヌリン分解活性の測定には融合酵素 0.13 µg、InuD 0.16 µg および InuE 0.39 µg を用い、スクロース分解活性測定には融合酵素 0.13 µg、InuD 0.32 µg および InuE 0.04 µg を用いた) を加え、40°C で 10 分間作用させた。1-2-2 項で記述した DNS 法によりイヌリンおよびスクロース加水分解活性を測定し、Lineweaver-Burk プロットにより速度パラメーターをそれぞれ求めた (Figs. 6-5,-6)。

5-3. 結果および考察

5-3-1. エキソ型イヌリナーゼの分泌発現および精製

各形質転換体は同程度の生育を示し、5 日目には定常状態に達した。InuE、InuD および融合酵素の分泌量は 5 日目で 0.4、0.37 および 0.037 mg/ml であった (Figs.

6-2,-3)。これより糸状菌由来エキソ型イヌリナーゼ InuE の分泌シグナルが *P. pastoris* の分泌経路で認識されていることが示され、*PHO1* 分泌シグナルによる InuD の分泌量に匹敵したことから、InuE の分泌シグナルは高効率であると考えられる。一方、融合酵素の分泌量は InuE、InuD に比べて少なかったのは、融合酵素の構造が分泌を阻害したためと考えられる。InuE、InuD、融合酵素は酵母 *P. pastoris* にて機能を保持して分泌され、それぞれ電気泳動的に単一に精製された (Fig. 6-4)。分子量は InuE が 81 kDa、InuD が 106 kDa および融合酵素が 110 kDa であった。

5-3-2. 挿入配列が酵素活性に及ぼす影響

精製した組換え酵素のイヌリンとスクロースに対する比活性はそれぞれ InuD が 327 と 34 U/mg (I/S、9.6)、InuE が 40.4 と 150 units/mg (I/S、0.27) および融合酵素が 280 と 171 units/mg (I/S、1.6) であり、融合酵素のイヌリン分解活性は InuD に匹敵し、InuE に比べて 7 倍上昇した。一方、融合酵素のスクロース分解活性は InuE と同程度であった。このことから挿入配列が InuE のイヌリン分解活性を上昇させ、スクロース分解活性に影響を及ぼさないことが示された。

5-3-3. 挿入配列が酵素の基質親和性に及ぼす影響

組換え酵素のイヌリンとスクロースに対する K_m 値はそれぞれ InuE が 3.0 と 111 mM、InuD が 0.08 と 3.38 mM および融合酵素が 0.22 と 48.7 mM であった (Table. 6-5)。融合酵素のイヌリンに対する K_m 値は InuE の約 0.067 倍、InuD の約 2.8 倍であり、スクロースに対する K_m 値は InuE の約 0.5 倍、InuD の約 14 倍であった。このことから融合酵素のイヌリンに対する親和性が InuE よりも高く、InuD と同程度であること、スクロースに対する親和性が InuE と同程度で、InuD よりも低いことが示された。このことから、InuD の挿入配列が InuE のスクロースに対する親和性に影響を及ぼさず、イヌリンに対する親和性を向上させたと推察した。

5-3-4. 挿入配列のアミノ酸配列の比較

BLASTを用いたタンパク質データベースの検索により、挿入配列は放線菌 *Actinomyces naeshundii* のレバナナーゼ⁶⁰⁾ (LevJ、EC 3.2.1.65) の内部領域 (38%) と細菌 *Bacillus macerans* のシクロイヌロオリゴ糖合成酵素⁷⁸⁾ (CFT1、EC 2.4.1-) のC末端領域 (28%) に相同性を示した (Fig. 6-7)。放線菌 *Actinomyces naeshundii*

のレバナーゼ (LevJ、EC 3.2.1.65) はスクロース、ラフィノース、イヌリン、レバンを基質として加水分解反応を触媒する。一方、*B. macerans* のシクロイヌロオリゴ糖合成酵素はイヌリンを基質として分子内フルクトース残基転移反応を触媒し、 β -2,1結合でD-フルクトースが結合した環状オリゴ糖を生成する。InuD、LevJ、CFT1はすべて糖質加水分解酵素ファミリー32⁸⁰⁻⁸²)に属し、 β -フルクトフラノシド結合に作用する酵素に共通の推定触媒残基 (Fig. 6-7の矢印)をもつ。⁸⁾また、LevJはInuD同様その内部に他の細菌レバナーゼにはない331アミノ酸残基の挿入配列を持つと報告されてる(Fig. 6-7 LevJの下線部)。⁶⁰⁾興味深いことに、このLevJの内部アミノ酸配列にはInuDの挿入配列に相同性を示す領域が存在した。このことから挿入配列がイヌリンに対する親和性に寄与する領域であることが示唆された。

5-3-5. 属を超えて保存されているアミノ酸配列

Fig. 6-8の相同領域の多重配列は糸状菌*Penicillium* sp. TN-88のエキソ型イヌリナーゼInuD、放線菌*A. naeslundii*のレバナーゼLevJおよび細菌*B. macerans*のシクロイヌロオリゴ糖合成酵素 CFT1に保存されたアミノ酸配列を含む領域を示した。これらのアミノ酸配列は属を隔てて保存されており、イヌリン関連酵素において重要な機能を持つことが示唆された。InuDのN末端領域には触媒残基のAsp-48とGlu-248や、RDPモチーフ⁸³⁾が存在することから触媒部位と考えられる。RDPモチーフは糖質加水分解酵素ファミリー32と68に属する β -フルクトフラノシダーゼに保存されており、ファミリー68のレバンスクラナーゼでこのモチーフ内のアスパラギン酸がスクロース加水分解活性に関与していることが明らかにされている。また、C末端領域にはポリフルクタンへの結合に関与すると示唆されるSVEVFが存在することからイヌリン結合部位と推察され、挿入されたアミノ酸配列はこれらの部位をつなぐリンカー領域である可能性があると考えられる。

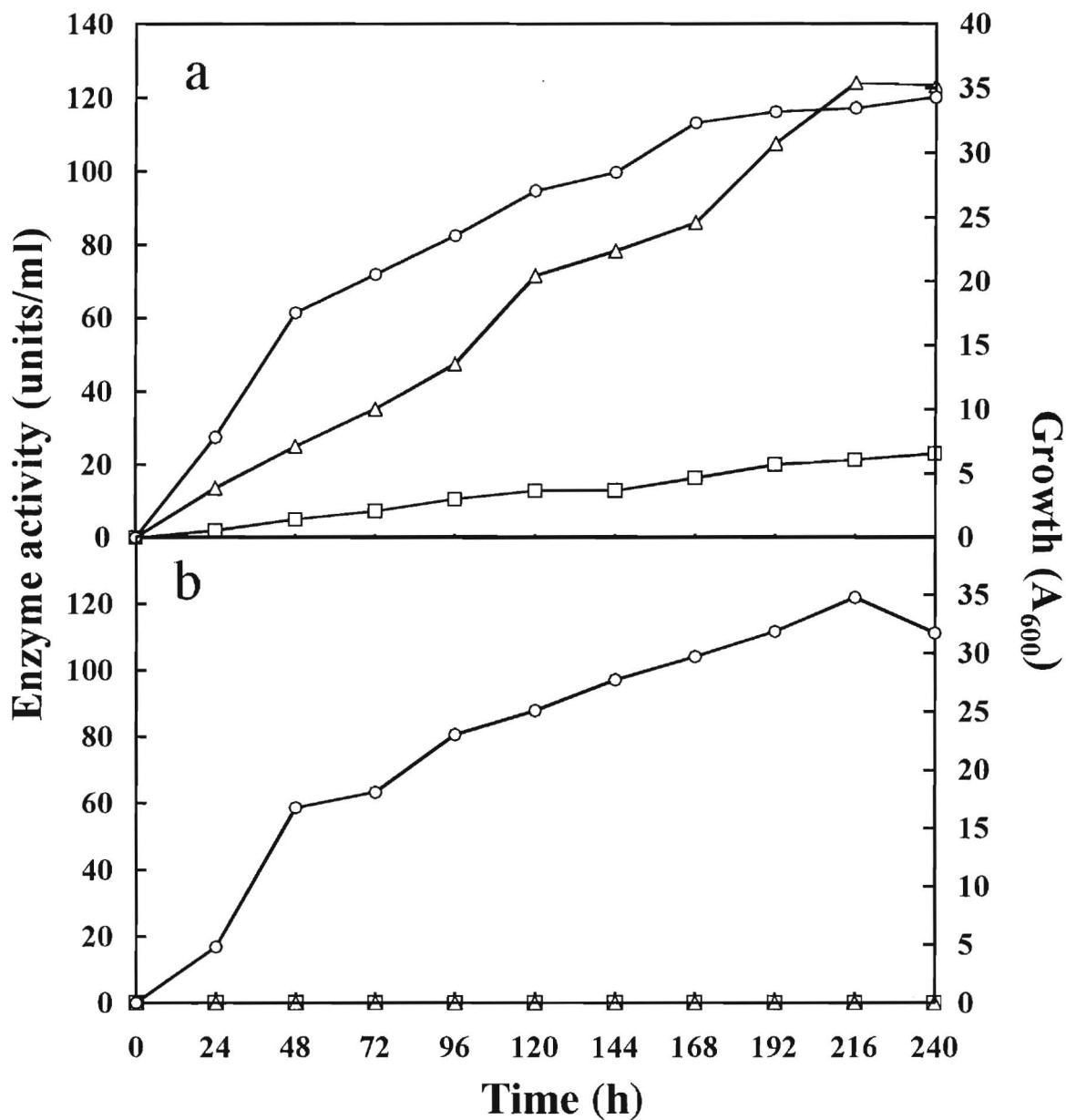


Fig. 5-2. Growth and extracellular inulinase production in shake-flask cultures of *P. pastoris* transformants. The pINU514 transformant carrying *inuD* (a) and the control transformant lacking *inuD* (b) were grown at 30°C in the buffered methanol complex medium (pH 6.0). Symbols: circles, growth (A_{600}); triangles, inulinase activity; squares, invertase activity.

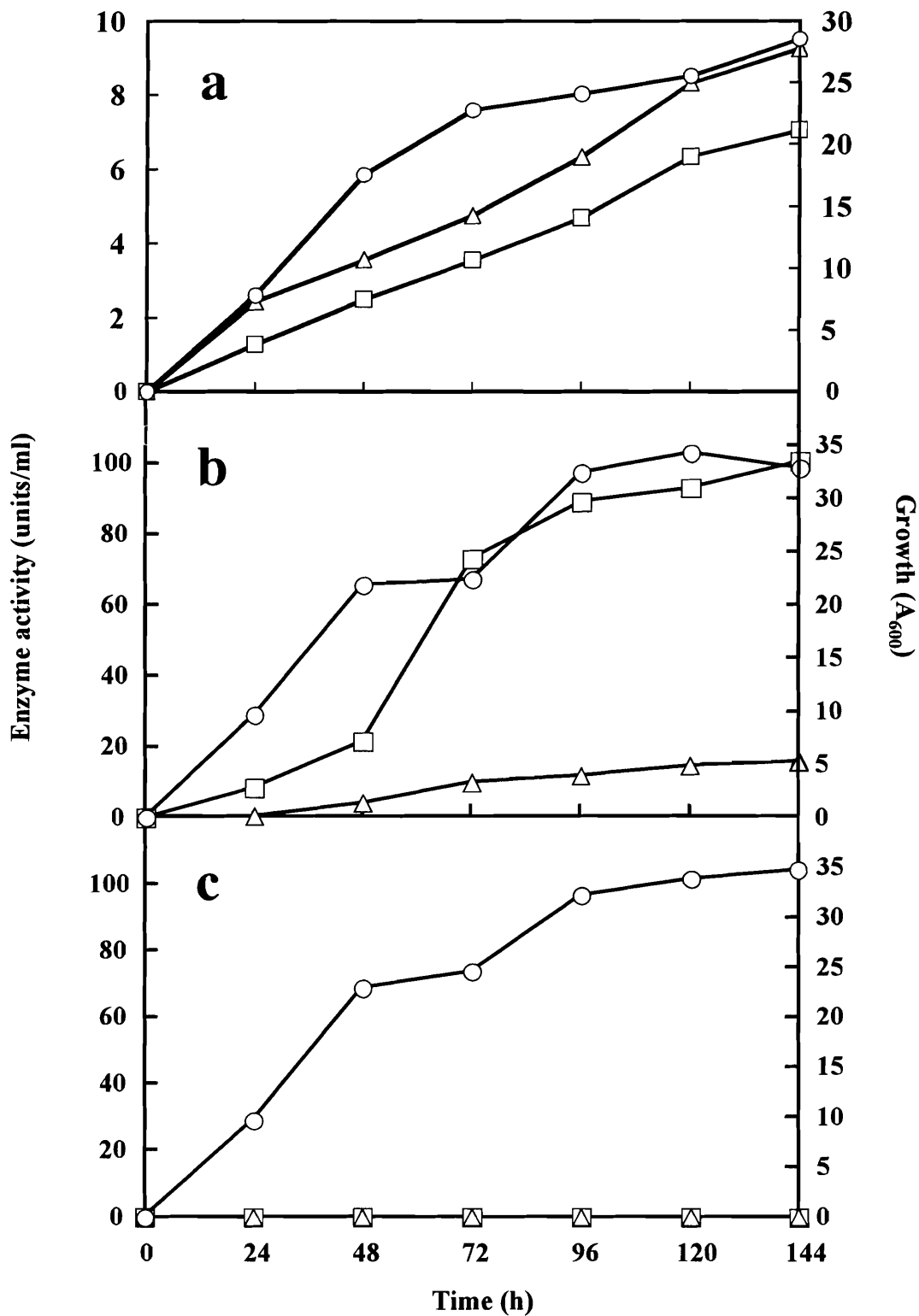


Fig. 5-3. Growth and extracellular inulinase production in shake-flask cultures of *P. pastoris* transformants. The pINU607 transformant carrying fusion gene (a), the pINU605 transformant carrying *inuE* gene (b) and the control transformant lacking fusion gene or *inuE* (c) were grown at 30°C in the buffered methanol complex medium (pH 6.0). Symbols: circles, growth (A_{600}); triangles, inulinase activity; squares, invertase activity.

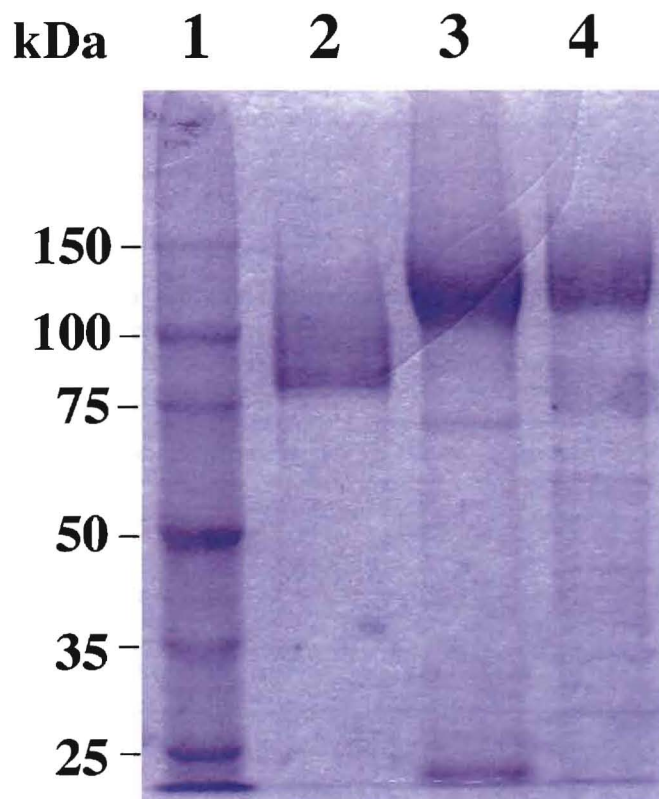


Fig. 5-4. SDS-PAGE of purified recombinant exoinulinases. The enzyme was subjected to SDS-PAGE on a 7.5% (w/v) polyacrylamide slab gel at pH 8.3. Protein was visualized by Coomassie brilliant blue R-250 staining. Lanes: 1, standard proteins; 2, InuE; 3, InuD; 4, fusion protein.

Table 5-2. Summary of purification procedure of recombinant exoinulinase (InuE).

Step	Total protein (mg)	Total activity (units) toward:		Specific activity (units/mg) toward:		I/S ^a	Yield (%) ^b	Purification (fold) ^b
		inulin	sucrose	inulin	sucrose			
Culture filtrate	1,110	723	2,870	0.65	2.6	0.25	100	1
DEAE-Cellulofine A-500	15.6	35.4	129	2.3	8.3	0.27	4.9	3.5
Sephacryl S-200	0.29	11.7	43.2	40.4	150	0.27	1.6	61.9

Table 5-3. Summary of purification procedure of recombinant exoinulinase (InuD).

Step	Total protein (mg)	Total activity (units) toward:		Specific activity (units/mg) toward:		I/S ^a	Yield (%) ^b	Purification (fold) ^b
		inulin	sucrose	inulin	sucrose			
Culture filtrate	1,000	5,470	47	5.5	0.48	11.4	100	1
DEAE-Cellulofine A-500	18.6	289	46.1	15.6	2.5	6.3	5.3	2.8
Sephacryl S-200	0.54	177	18.3	327	34	9.6	3.2	59.9

Table 5-4. Summary of purification procedure of recombinant exoinulinase (fusion protein).

Step	Total protein (mg)	Total activity (units) toward:		Specific activity (units/mg) toward:		I/S ^a	Yield (%) ^b	Purification (fold) ^b
		inulin	sucrose	inulin	sucrose			
Culture filtrate	1,240	306	153	0.25	0.12	2	100	1
DEAE-Cellulofine A-500	11.3	166	122	14.7	10.8	1.4	54	60
Sephacryl S-200	0.076	21.4	13.1	280	171	1.6	7	1,140

^a I/S, Inulinase activity/invertase activity.

^b These values were based on the inulinase activity.

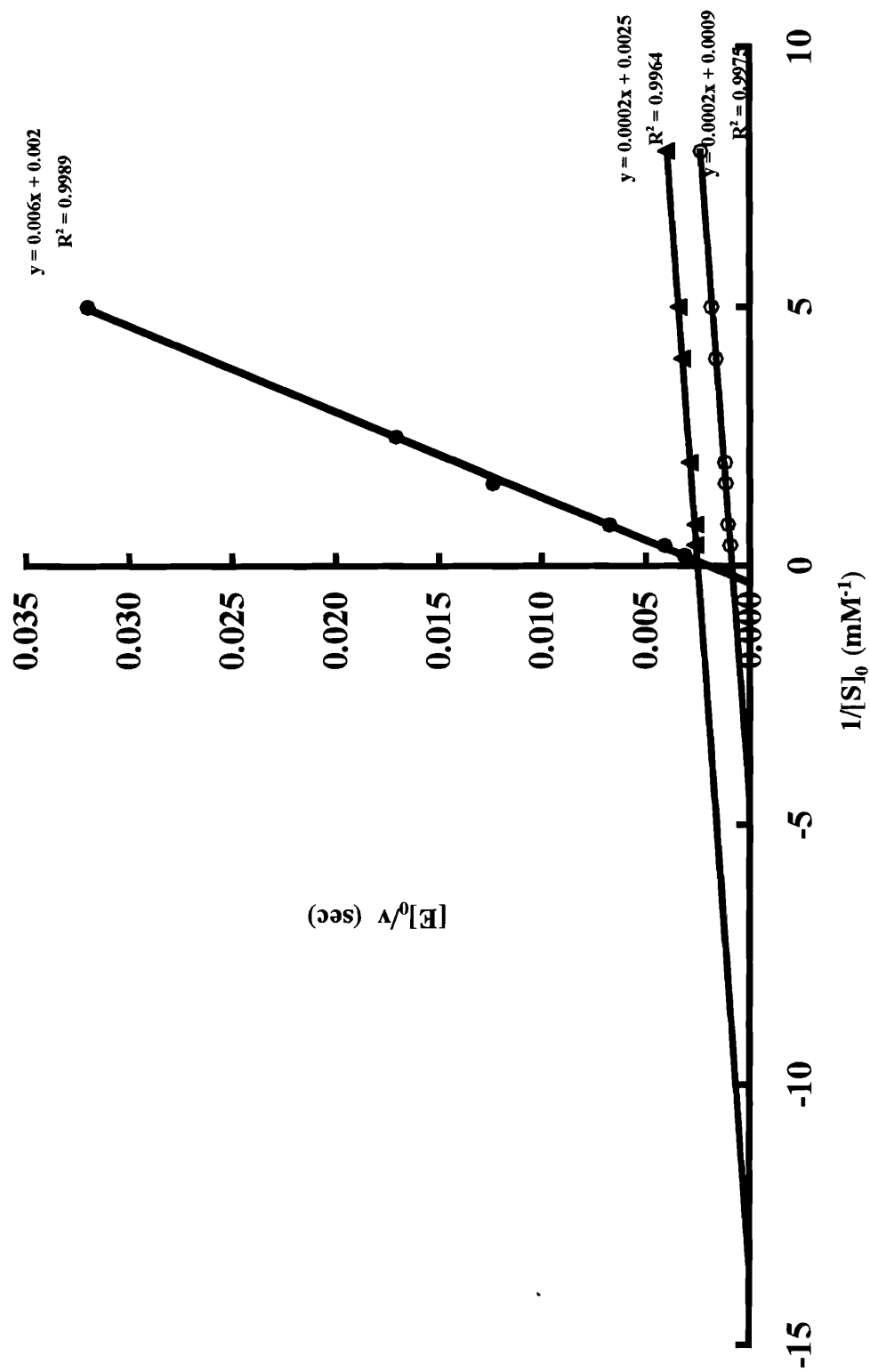


Fig. 5-5. Lineweaver-burk plot of inulinase activity of recombinant exoinulinases. Symbols: closed circles, InuE; triangles, InuD; open circles, fusion protein.

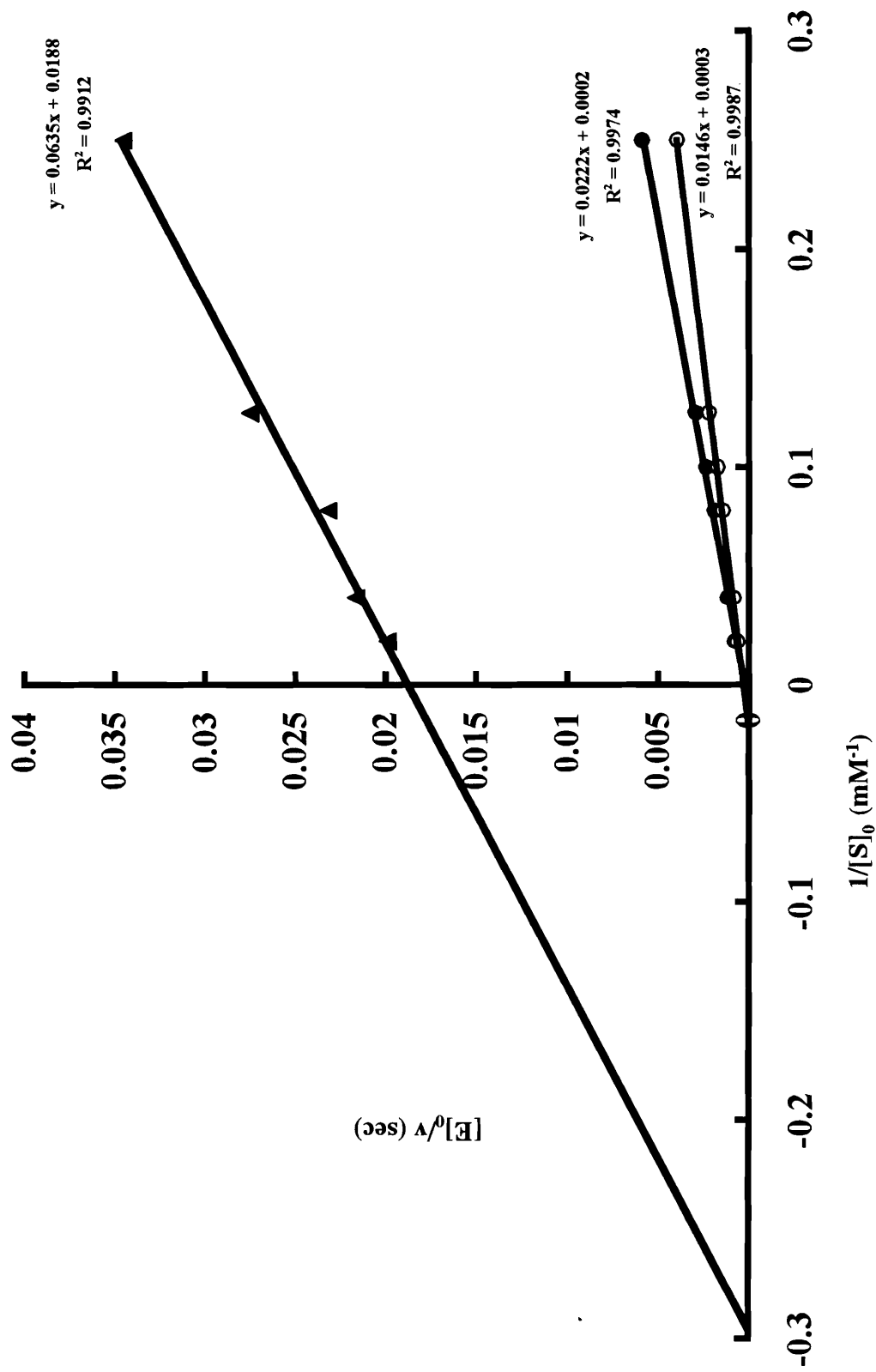


Fig. 5-6. Lineweaver-burk plot of invertase activity of recombinant exoinulinases. Symbols: closed circles, InuE; triangles, InuD; open circles, fusion protein.

Table 5-5. Kinetic properties of recombinant exoinulinases.

Exoinulinase	<i>Mr</i> (kDa)	Specific activity (units/mg)		<i>I/S</i> ^a	<i>K_m</i> (mM)		<i>k_{cat}</i> (sec ⁻¹)		<i>k_{cat}/K_m</i> (sec ⁻¹ ·mM ⁻¹)	
		Inulin	Sucrose		Inulin	Sucrose	Inulin	Sucrose	Inulin	Sucrose
InuE	81	40.4	150	0.27	3.0	111	500	5,000	167	45
InuD	106	327	34	9.6	0.08	3.38	400	53.2	5,000	15.7
Fusion protein	110	280	171	1.6	0.22	48.7	1,110	3,330	5,050	68.4

^a *I/S*, Inulinase activity/invertase activity.

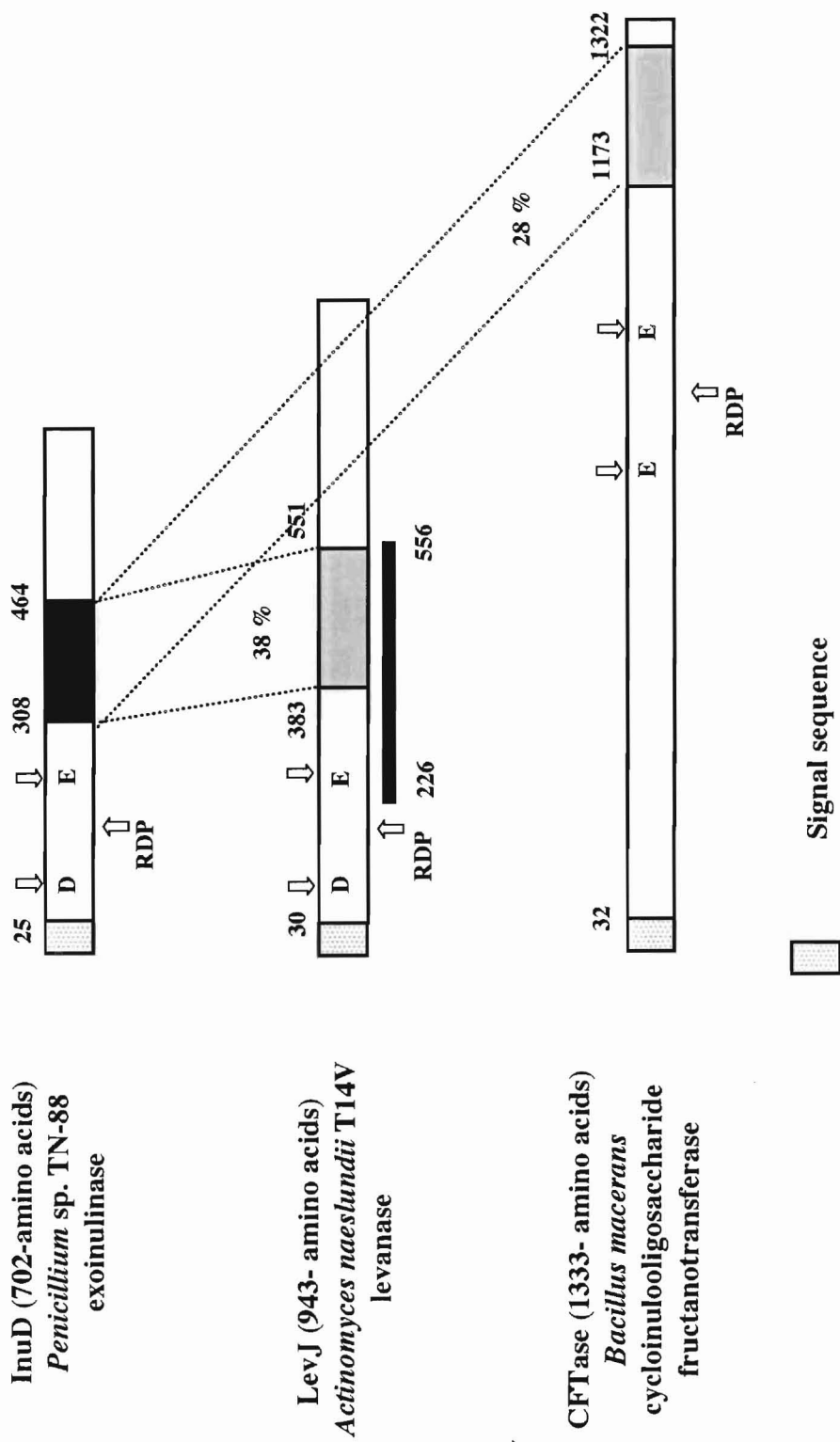


Fig. 5-7. BLAST search of 157-amino acid internal region in InuD.



Fig. 5-8. Alignment of amino acid sequences of homologous regions. The alignment shown was done using the CLUSTAL W program, InuD. *Penicillium* sp. TN-88 exoinulinase; LevJ, *Actinomyces naeslundii* levanase; Dashes (-) indicate gaps introduced during alignment. Asterisks indicate identity, and single and double dots (. and :) are semiconservative and conservative replacements, respectively. Black shadowing indicates identical amino acids. Sequence alignment was performed with Clustal W(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-j.html>)

5-4. 要約

P. pastoris における InuE、InuD および融合酵素の組換え酵素の分泌量は、培養後 5 日目でそれぞれ 0.4、0.37 および 0.037 mg/ml であった。各組換え酵素のイヌリン分解活性とスクロース分解活性はそれぞれ、InuD が 327 と 34 units/mg (I/S、9.6)、InuE が 40.4 と 150 U/mg (I/S、0.27) および融合酵素が 280 と 171 units/mg (I/S、1.6) であった。融合酵素のイヌリン分解活性は InuD に匹敵し、InuE に比べて 7 倍上昇した。一方、融合酵素のスクロース分解活性は InuE と同程度であった。組換え酵素のイヌリンとスクロースに対する K_m 値はそれぞれ InuE が 3.0 と 111 mM、InuD が 0.08 と 3.38 mM および融合酵素が 0.22 と 48.7 mM であった。融合酵素のイヌリンに対する K_m 値は InuE の約 0.067 倍、InuD の約 2.8 倍であり、スクロースに対する K_m 値は InuE の約 0.5 倍、InuD の約 14 倍であった。このことから、InuD の挿入配列が InuE のスクロースに対する親和性に影響を及ぼさず、イヌリンに対する親和性を向上させたと推察した。BLAST を用いたタンパク質データベースの検索により、挿入配列は放線菌 *A. naeslundii* のレバナーゼ⁶⁰⁾(LevJ、EC 3.2.1.65) の内部領域 (38%) と細菌 *B. macerans* のシクロイヌロオリゴ糖合成酵素⁷⁸⁾(CFT1、EC2.4.1-) の C 末端領域 (28%) に相同性を示した。それらの領域の多重整列は、糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88 のエキソ型イヌリナーゼ InuD、放線菌 *A. naeslundii* のレバナーゼ LevJ および細菌 *B. macerans* のシクロイヌロオリゴ糖合成酵素 CFT1 に属を超えて保存されたアミノ酸配列を示した。

第六章 エンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuB* の部位特異的変異実験による機能解析

6-1. 緒言

Reddy & Maley⁴³⁾は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のインベルターゼの部位特異的変異実験により、 β -フルクトフラノシダーゼ・ファミリーの保存領域 MNDPNG のアスパラギン酸 (D) 残基と ECP のグルタミン酸 (E) 残基がそれぞれ求核分子 (nucleophile) とプロトン供与体 (proton donor) として触媒反応に関係していることを明らかにした (Table 5-1)。ところが、エンド型イヌリナーゼでは保存領域 WMNDPNG 中のアスパラギン酸がグルタミン酸に、ECP 中のシステイン (C) がバリン (V) にそれぞれ置換している。エンド型イヌリナーゼはイヌリンに特異的に作用し、スクロースには作用せず、他の β -フルクトフラノシダーゼ・ファミリー酵素と特異性を異にしている。このことから糸状菌エンド型イヌリナーゼに特徴的なこれらのアミノ酸残基が基質特異性に関与していると考察した。本章では黒麹菌 *Aspergillus niger* No.12 株由来エンド型イヌリナーゼ InuB の野生型酵素 (WT) をメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* で異種発現させ、その変異体酵素 E43D、C236V、E43D/C236V を作製し、アミノ酸レベルの機能解析を行った結果について記述する。

6-2. 材料と実験方法

6-2-1. 使用菌株とプラスミド

大腸菌 *E. coli* BMH71-18 *mutS* は DNA ミスマッチ修復欠損変異体 (*mutS*) でトランスポゾン Tn10 の挿入によって作製された。そのトランスポゾンの挿入を維持するために培地中でテトラサイクリン (25~50 μ l/ml) による選択圧を加えなければならない。(Tn10 はテトラサイクリン耐性遺伝子を持つ)

6-2-2. 大腸菌 *Escherichia coli* BMH71-18 *mutS* 株コンピテントセルの調製

部位特異的変異体作製キット Transformer site-directed mutagenesis kit (Clontech) 付属の大腸菌 *E. coli* BMH71-18 *mutS* をテトラサイクリン (50 μ g/ml)

を含む LB プレートに画線操作により植菌し、37°Cで一晩培養した。シングル・コロニーをテトラサイクリン (50 µg/ml) が含まれる LB 液体培地に植菌し、37°Cで一晩培養した (220 rpm)。この培養液 1 ml を、500 ml 容三角フラスコに分注した 100 ml の LB 培地 (抗生物質は含まない) に植菌し、培養液の A_{600} が 0.5 ± 0.03 になるまで培養した。遠心分離 (1200×g、4°C、5 分間) より上清と菌体に分離した。菌体に TSS 溶液 (85% [v/v] LB 培地、10% [w/v] PEG [M.W. 8000、Sigma]、5% [w/v] DMSO [Sigma]、50 mM $MgCl_2$ [pH 6.5]) 10 ml を加え懸濁した。エッペンドルフ・チューブに 0.1 ml ずつ分注し、-80°Cに保存した。

6-2-3. *inuB* 遺伝子からの E43D と V236C 変異体の作製

部位特異的変異体作製は Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit (Clontech) を用いて行った。Table 5-2 に示した選択プライマー1 µg と変異プライマー1 または 2 (1 µg) に 10×リン酸化酵素緩衝液 2 µl、T4 ポリヌクレオチドリン酸化酵素 1 µl (10 units)、超純水を加え全量を 20 µl とした。この反応液を、37°Cで 1 時間保温し、各プライマーをリン酸化した。反応後、65°Cで 10 分間処理し T4 ポリヌクレオチド・リン酸化酵素を失活させた。この反応液 2 µl に 10×アニール緩衝液 2 µl、プラスミド DNA (pINU107) 溶液 2 µl (0.1 µg) を加え、超純水で全量を 20 µl とした。この反応液を 100°Cで 3 分間煮沸し、DNA を熱変性させ、一本鎖とした後、氷水に直ちにつけ 5 分間冷却した。この溶液に 10×合成緩衝液 (キット付属) 3 µl、T4 DNA ポリメラーゼ 1 µl (2~4 units)、T4 リガーゼ 1 µl (4~6 units)、超純水 5 µl を加え、37°Cで 2 時間保温することによって変異鎖を合成し、その両端を結合した。その後 70°Cで 5 分間以上保温し、酵素を失活させ、室温で冷却した。この溶液をエタノール沈殿し、精製した後、減圧乾燥しペレットを超純水 25 µl に溶かした。10×緩衝液 3 µl、制限酵素 *SspI* 2 µl を加え、37°Cで 2 時間反応させ、もとのプラスミドを一本鎖とした後 70°Cで 5 分間以上保温し、酵素を失活させた。このプラスミドとプライマーの混合液 5 µl を 5-2-2 項で調製した 100 µl の *E. coli* BMH71-18 *mutS* 細胞に加え、20 分間氷上に置いた。次に 42°Cで 1 分間置き氷令した後、1 ml の LB 培地を加え、1 時間回転培養した。この培養液 0.1 ml を、50 µg/ml アンピシリンと 50 µg/ml テトラサイクリンの 2 種類の抗生物質が入った LB 培地に塗布し、37°Cで培養した。得られたコロニーを、同様に 2 種類の抗生物質が入った LB 液体培地で培養し、2-2-14 項④に従ってプラスミドを形質転換体から抽出し精製した。このプラス

ミドは変異したものと元のものが混在している。そこで、混在している元のプラスミドを制限酵素 *SspI* で完全消化 (37°C、16 時間) し直鎖状にした後、70°C で 5 分間反応させ酵素を失活させた。(変異 DNA 断片が組込まれている pUC18 の *SspI* 部位は *EcoRV* になっているため *SspI* で消化されない) このプラスミド溶液 10 μ l を用いて、2-2-14 項②に従って大腸菌 *E.coli* JM109 を形質転換し、得られた形質転換体から 2-2-14 項④に従って抽出したクローン DNA の塩基配列を 2-2-14 項⑤に従って決定し、変異させた塩基配列を確認した。E43D、E236V の変異を含むプラスミドをそれぞれ pINU130、pINU131 とした。

6-2-4. *inuB* 遺伝子の E43D/V236C 二重変異体の作製

プラスミド pINU130 と pINU131 を制限酵素 *XhoI* で消化し、それぞれを 1% アガロース・ゲル電気泳動で分離した。pINU130 の DNA 断片をゲル抽出し、pINU131 の DNA 断片と置換し、*inuB* 遺伝子の E43D/V236C 二重変異型 DNA を含む組換えプラスミドを作製した。この組換えプラスミドを pINU132 とした。

6-2-5. 酵母 *P. pastoris* GS115 株のコンピテント細胞の調製

100 ml 容三角フラスコに作製した YPD 培地 10 ml に *P. pastoris* GS115 株を一白金耳量植菌し、30°C で 16 時間振とう培養 (140 rpm) した。培養液 0.1 ml を 500 ml 容三角フラスコに作製した新たな YPD 液体培地 125 ml に加え A_{600} が 1.3~1.5 になるまで前培養と同様に培養した。培養液を 300 ml 容遠心管に入れ、遠心分離 (4°C、1,500 \times g、15 分間) し、上清を除いた。ペレットを 125 ml の冷却した滅菌水に懸濁し、同条件で遠心分離し上清を捨てた。ペレットを 10 ml の冷却した 1 M ソルビトールに懸濁し、同様に遠心分離し上清を捨てた。ペレットを終体積が約 0.75 ml となるように冷却した 1 M ソルビトールに懸濁し、1.5 ml 容チューブに 80 μ l ずつ分注した。これをコンピテント細胞とし -80°C で保存した。

6-2-6. 酵母 *P. pastoris* の形質転換

pINU107 と前項で作製した組換えプラスミド pINU130、pINU131、pINU132 を鋳型として *inuB* pHILs1 S1、*inuB* pHILs1 A1 の一対のプライマー (Table 5-2) と *Taq* DNA ポリメラーゼ (Ampli*Taq* Gold、Perkin Elmer) を用いて PCR により組換え酵素のコード領域を増幅した。増幅 DNA 断片を制限酵素 *EcoRI* および

*Sma*I で消化 (各 10 units、37°C、16 時間) し、発現ベクター pHIL-S1 の *Eco*RI-*Sma*I 部位に挿入し、それぞれ pINU133、pINU134、pINU135 および pINU136 とした。これらの組換えプラスミドを制限酵素 *Sac* I で消化 (10 units、37°C、16 時間) し、直鎖状とした後、前項で調製したコンピテント細胞に加え混合した。DNA と細胞の混合液を 0.2 cm キュベットに移し、氷中に 5 分間放置した後、エレクトロポレーション装置 (Bio-Rad Gene Pulser、Bio-Rad) を用いて 25 μ F、1.25 kV、200 Ω の条件で通電した。キュベットに 900 μ l の 1M ソルビトールを加え希釈し、100 μ l を MD プレート(1.34% yeast nitrogen base/4 \times 10⁻⁵% biotin/2% グルコース/1.5% agarose)に塗布した。生じたコロニーを、*P. pastoris* の染色体上に存在する *AOX1* プロモーター下流に、組換え DNA が挿入された形質転換体とした。

6-2-7. 酵素精製法

各形質転換体を 5-2-4 項で述べた条件で培養し、約 90 ml の培養ろ液から組換え酵素をそれぞれ電気泳動的に単一に精製した。

6-2-8. 組換え酵素の性質

[基質特異性]

0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解した酵素液 0.1 ml [WT (1.58 units/ml)、E43D (0.15 units/ml)、V236C (0.26 units/ml)、E43D/V236C (0.014 units/ml)] にスクロース、イヌリン (β -2,1-フルクタン)、レバン (β -2,6-フルクタン、*Serratia levanicum* 由来、和光純薬) の 0.5% (w/v) 水溶液 0.1 ml を加え、40°C で 24 時間作用させた。生成した還元糖量を 1-2-2 項で記述した DNS 法で測定し、酵素活性を算出した。

[基質親和性]

イヌリンの分子量を 5500 と推定し、0.25~10 mM の各濃度のイヌリン水溶液を調製した。各濃度の基質溶液 0.1 ml に 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で希釈した各組換え酵素液 0.1 ml (WT 5.4 μ g、E43D 5.2 μ g、V236C 1.27 μ g または E43D/V236C 22 μ g を含む) を加え、40°C で 5~30 分間作用させた。1-2-2 項で記述した DNS 法によりイヌリン加水分解活性を測定し、Lineweaver-Burk プロットで速度パラメーターを求めた (Table 5-7)。

[最適 pH]

組換え酵素を pH 1.0~12.0 の緩衝液にそれぞれ溶解した。緩衝液は、0.1 M 酢酸-HCl 緩衝液 (pH 1.0~4.0)、0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0~6.0)、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0~8.0)、0.1 M グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 9.0~12.0)を用いた。基質溶液 0.1 ml に各 pH の酵素液 0.1 ml を加え、40°C で 30 分間作用させた後、DNS 法に従いイヌリン分解活性を測定した。

[pH 安定性]

各組換え酵素を pH 1.0~12.0 の緩衝液にそれぞれ溶解し、30°C で 24 時間保温した。緩衝液は、0.1 M 酢酸-HCl 緩衝液 (pH 1.0~4.0)、0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0~6.0)、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0~8.0)、0.1 M グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 9.0~12.0) を用いた。処理後の酵素液を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で希釈した。基質溶液 0.1 ml に各 pH の酵素液 0.1 ml を加え、40°C で 30 分間作用させた後、DNS 法に従いイヌリン分解活性を測定した。

[最適温度]

組換え酵素を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解した。基質溶液 0.1 ml に酵素液 0.1 ml を加え、30°C、40°C、50°C、60°C、70°C 及び 80°C の恒温槽で 30 分間作用させた後、DNS 法に従いイヌリン分解活性を測定した。

[熱安定性]

組換え酵素を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解し、30°C、40°C、50°C、60°C、70°C 及び 80°C の各恒温槽で 30 分間保温した後、直ちに氷中で冷却した。基質溶液 0.1 ml に酵素液 0.1 ml を加え、40°C で 30 分間作用させた後、DNS 法に従いイヌリン分解活性を測定した。

6-3. 結果および考察

6-3-1. エンド型イヌリナーゼの分泌発現および精製

エンド型イヌリナーゼ InuB (WT) は酵母 *P. pastoris* にて機能を保持して分泌された (0.57 mg/ml、Fig. 5-1)。その変異体酵素 E43D、V236C、E43D/V236C

も同様に *P. pastoris* にて分泌発現し、それぞれの培養上清より電気泳動的に単一に精製された (Fig.5-2、Tables 5-3,-4,-5,-6)。分子量は WT が 74.0、E43D が 78.0、V236C が 70.2 および E43D/V236C が 66.7 kDa であった。

6-3-2. アミノ酸置換がイヌリン分解活性へ及ぼす影響

変異体酵素 E43D、V236C および E43D/V236C の速度パラメーター k_{cat} は、InuB (WT) の比べて小さくなり (Table 5-7)、それらの比活性は InuB の 135 (100%) に対し、それぞれ 4.8 (3.5%)、35.9 (26.6%)、0.31 (0.22%) units /mg に減少した (WT に対する相対活性を括弧内に示す)。E43D 変異体酵素の活性の著しい低下は、Glu-43 が触媒において重要な役割を持つことを示した。この Glu-43 は求核分子 (nucleophile) として機能しており、側鎖の炭素鎖がグルタミン酸より一つ短いアスパラギン酸に置換されたことによって機能が阻害されたと推察した。V236C 変異体酵素のイヌリン分解活性の低下は、疎水性アミノ酸バリンと非電荷の極性アミノ酸システインの置換が全体もしくは部分的なコンフォメーションを変化させ、Glu-235 のプロトン供与体 (proton donor) としての機能を阻害したためであると推察した。E43D/V236C 変異体酵素は 2 つのアミノ酸を置換したにも拘らず活性を完全に失っていなかった。

6-3-3. アミノ酸置換の基質特異性へ及ぼす影響

各酵素をそれぞれイヌリン、スクロース、レバンの 0.25% 水溶液に 24 時間作用させた結果、InuB (WT) とその変異体酵素 E43D、V236C、E43D/V236C はすべてイヌリンには作用したが、スクロース、レバンには作用しなかった。このことから Glu-43 と Val-236 は基質特異性に関与しないことが示唆された。

6-3-4. アミノ酸置換の pH、温度感受性へ及ぼす影響

各組み換え酵素の最適 pH は、WT と V236C が pH 5、E43D と E43D/V236C が pH 6 であり、各部位変異酵素とも WT と比較して大きな変化は見られなかった。80% 程度安定な pH の範囲は WT が pH 2~pH 11、E43D が pH 5~pH 8、V236C が pH 3~pH 11 であった。E43D/V236C はイヌリン分解活性が低く、pH 安定性を測定するのが困難であった。最適温度は WT と E43D/V236C が 50°C 付近であり、E43D が 60°C 付近、V236C が 40°C 付近であった。WT、E43D、V236C の各組換え酵素の活性は 60°C までは 80% 以上安定であり、70°C 以上で完全に失活

した。E43D/V236C の活性は 50℃までは 80%以上安定であり、70℃で完全に失活した。

Table 6-1. Comparison of conserved amino acid sequences of exoinulinases and other β -fructofuranosidases.

Enzyme	Microorganisms	Conserved sequence ^a		Ref.
Endoinulinase (<i>inuB</i>)	<i>Aspergillus niger</i> No.12	40-WMNE E PNG	234-WEVPD	37
Endoinulinase (<i>inuC</i>)	<i>Penicillium</i> sp. TN-88	40-WMNE E PNG	234-WEVPD	39
Exoinulinase (<i>inuE</i>)	<i>Aspergillus niger</i> No.12	38-WMNDPNG	240-WECPG	This study
Exoinulinase (<i>inuD</i>)	<i>Penicillium</i> sp. TN-88	45-WMNDPNG	247-WECPD	This study
Levanase (<i>levJ</i>)	<i>Actinomyces naeslandii</i>	71-WMNDPNG	249-WECPD	65
Levanase (<i>levA</i>)	<i>Bacillus polymyxa</i>	24-WMNDPNG	208-WECPD	70
Levanase (<i>levC</i>)	<i>Bacillus subtilis</i>	46-WMNDPNG	222-WECPD	71
Fructosyltransferase	<i>Aspergillus foetidus</i>	38-WMNDPNG	240-WECPG	66
Invertase (<i>INV1</i>)	<i>Pichia anomala</i>	39-WMNDPNG	222-YECPG	68
Invertase (<i>SUC2</i>)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39-WMND <u>P</u> NG	222-Y <u>E</u> CPG	69
Exoinulinase (<i>INUI</i>)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	50-WMNDPNG	237-YECPG	46

a. The locations of amino acid residues correspond to the positions in the precursor protein deduced from the sequencr of each gene. The amino acid residues typical for endoinulinases is shown in inverted letters. The catalytic residues found for *S. cerevisiae* invertase are underlined.

Table 6-2. Primers for site-directed mutagenesis of endoinulinase gene *inuB*

Primer name	Sequence ^a	Position (5' to 3')	Target ^a
Mutagenic primer 1	5'-TACTGGATGAACGAC <u>CCCA</u> AACGGCCTG-3'	1132-1158 ^b	WMNE <u>P</u> NG (E to D)
Mutagenic primer 2	5'- CAGGGTGGGAAT <u>TGT</u> CCCGACATGTTT G-3'	1706-1732 ^b	WEV <u>P</u> D (V to C)
Selection primer	5'-AAATGCTTCAAT <u>GATATCG</u> AAAAAGGAAG-3'	2490-2518 ^c	<i>SspI</i> → <i>EcoRV</i>
<i>inuB</i> pHILs1 sense	5'-CCGGAATTCCAGTCTAATGATTACCGTCCA-3'	1087-1107 ^b	-
<i>inuB</i> pHILs1 antisense	5'-TCCCCCGGGGAATTGCTGTCTCAACTTGTACC-3'	2614-2634 ^b	-

a. The target amino acid residues and altered nucleotides in the primers are underlined.

b. Position refers to that in the *inuB* sequence deposited in GenBank (AB012772).

c. Position refers to that in pUC18 sequence deposited in GenBank (E12615).

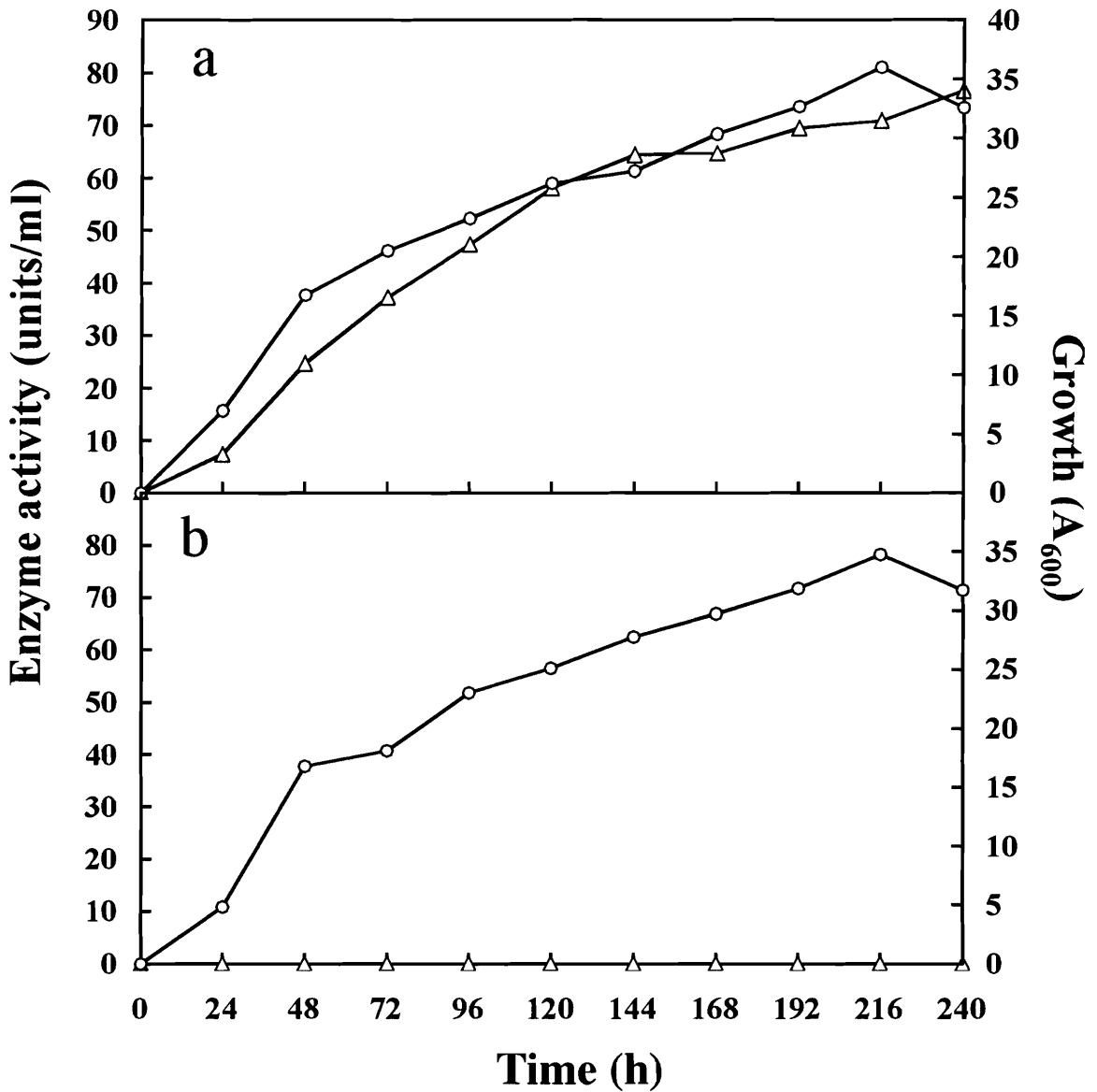


Fig. 6-1. Growth and extracellular inulinase production in shake-flask cultures of *P. pastoris* transformants. The pINU133 transformant carrying *inuB* (a) and the control transformant lacking *inuB* (b) were grown at 30°C in the buffered methanol complex medium (pH 6.0). Symbols: circles, growth (A_{600}) ; triangles, inulinase activity.

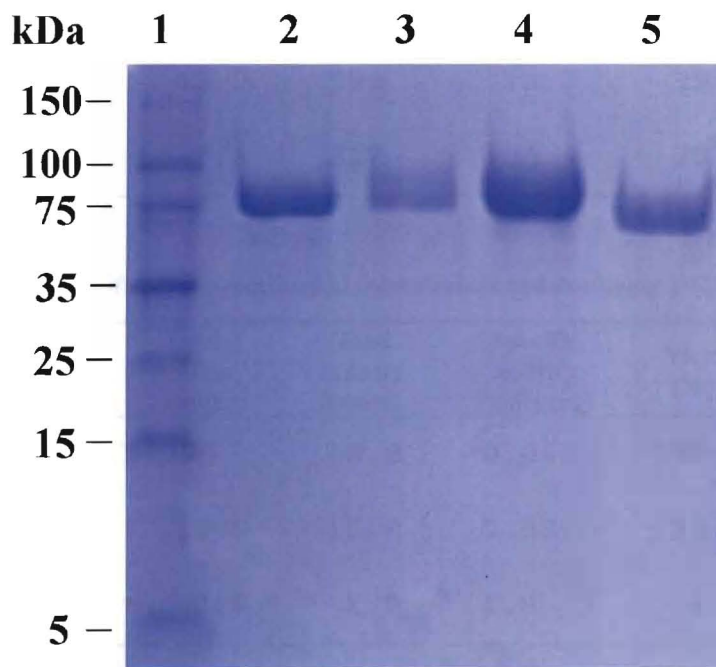


Fig. 6-2. SDS-PAGE of purified recombinant enzyme from *inuB* gene.

The enzyme was run on SDS-PAGE using 7.5 % (w/v) polyacrylamide slab gel at pH 8.3. Protein was stained by Coomassie brilliant blue R-250. Lanes : 1, standard proteins; 2, wild type; 3, E43D mutant; 4, V236C mutant; 5, E43D/V236C double mutant.

Table 6-3. Summary of purification procedure of recombinant endoinulinase (WT).

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Filtrate	1,210	1,520	1.2	100	1
DEAE-Cellulofine A-500	43.7	599	13.7	39.3	10
Sephacryl S-200	2.3	317	135	20.8	107

Table 6-4. Summary of purification procedure of recombinant endoinulinase E43D mutant.

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Filtrate	1,390	63.8	0.045	100	1
DEAE-Cellulofine A-500	18.9	15.8	0.83	24.8	18.1
Sephacryl S-200	0.6	2.9	4.8	4.5	103.8

Table 6-5. Summary of purification procedure of recombinant endoinulinase V236C mutant.

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Filtrate	1,020	332	0.3	100	1
DEAE-Cellulofine A-500	28.7	71.2	2.5	21.4	7.6
Sephacryl S-200	0.21	7.7	35.9	2.3	110

Table 6-6. Summary of purification procedure of recombinant endoinulinase E43D/V235C mutant.

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Filtrate	1,310	28	0.02	100	1
DEAE-Cellulofine A-500	26.4	8.1	0.31	28.8	14.3
Sephacryl S-200	1.3	0.4	0.31	1.4	14.4

Table 6-7. Kinetic properties of recombinant endoinulinases.

Endoinulinase	<i>Mr</i> (kDa)	Specific activity (units/mg)	K_m (mM)	k_{cat} (sec⁻¹)	k_{cat}/K_m (sec⁻¹·mM⁻¹)
WT	74	135 (100) ^a	52.5	25,000	476
E43D	78	4.8 (3.5) ^a	0.33	16.6	50.3
V236C	70.2	35.9 (26.6) ^a	2.35	385	164
E43D/V236C	66.7	0.31 (0.22) ^a	4.95	73.5	14.8

^a The values in parentheses indicate relative activity to wild-type enzyme activity.

6-4. 要約

エンド型イヌリナーゼの変異体 E43D はイヌリン分解活性を野生型の 3.5%に著しく低下させた。このことからエンド型イヌリナーゼの推定求核分子 Glu-43 はイヌリン分子内部の β -2,1 フルクトフラノシド結合の酸素分子に作用するための有効な距離を確保できるが、側鎖の炭素鎖が一つ少ない Asp 残基ではその距離が確保できず、求核分子として十分に機能しないことが推察された。また、Val-236 アミノ酸置換はイヌリン分解活性を野生型酵素の 26.6%に低下させた。このことから Val-236 はプロトン供与体 Glu-235 が完全な機能を保持するのに必要であることが示唆された。二重変異体 E43D/V236C はイヌリン分解活性を野生型の 0.22%に低下させた。また、エンド型イヌリナーゼの基質特異性にこれらの残基は直接的に関係しないことが示された。

総括

本研究は、糸状菌イヌリナーゼの構造と機能について明らかにすることを目的とし、*Penicillium* sp. TN-88 株と *Aspergillus niger* No. 12 株からエキソ型イヌリナーゼをそれぞれ精製し、それらをコードする遺伝子をクローニングした。また、両菌株のエキソ型イヌリナーゼとエンド型イヌリナーゼ遺伝子の転写に及ぼす炭素源の影響を検討した。

糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88 株の培養ろ液より分子量 81 kDa、*pI* 4.6 のエキソ型イヌリナーゼ InuD を 4.4 % の回収率で、329 倍に電気泳動的に単一に精製した。InuD のイヌリン分解活性は既報の同酵素で最も高い *Penicillium trzebinskii*¹⁷⁾ 由来の 7 倍の 743 units/mg と非常に高かった。また、InuD の至適条件は pH 4.0、55°C で、pH 5~7、50°C まで安定であった。InuD は 93.8 units/mg のスクロース分解活性を併せてもち、その *I/S* の値は 7.9 と既報の同酵素に比べて大きな値を示したが、レバンには作用しなかった。一方、*A. niger* No.12 株の培養ろ液から分子量 81 kDa、*pI* 5.0 のエキソ型イヌリナーゼ InuE を 0.03% の回収率で、10 倍に電気泳動的に単一に精製した。InuE のイヌリン分解活性は 52.8 units/mg で至適条件は pH 4.5、60°C で pH 3.0~6.0、60°C まで安定であった。InuE は 227 units/mg のスクロース分解活性を併せてもっていた (*I/S*、0.23) が、*Penicillium* sp. TN-88 株由来エキソ型イヌリナーゼ InuD と同様に、レバンに作用しなかった。InuE は同一菌株の既報の 2 種類のエキソ型イヌリナーゼ (P-I と P-II)^{29, 30)} と分子量が異なることから、新規のエキソ型イヌリナーゼであると推察した。本研究で精製した 2 種類のエキソ型イヌリナーゼは pH、温度に対する感受性は既報の同酵素の範囲であり、レバンに作用しなかったが、イヌリン分解活性は *Penicillium* sp. TN-88 株由来の酵素が *A. niger* No. 12 株由来の酵素よりも 14 倍高かった。

糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88 株のエキソ型イヌリナーゼをコードする遺伝子 *inuD* は、染色体 DNA 上に 1 コピー存在した。*inuD* 遺伝子は 2106 bp のコード領域からなり、56 bp のイントロンが 1ヶ所介在した。*inuD* 遺伝子 1 kbp 上流の塩基配列は同一菌株 TN-88 のエンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuC* の塩基配列の 5' 非コード領域を含んでいた。エンド型イヌリナーゼとエキソ型イヌリナーゼの遺伝子は染色体上でクラスターを形成しており、859 bp の遺伝子間領域から逆向きに転写されていた。*inuD* 遺伝子の ORF はアミノ酸 25 残基の分泌シグナルと 677 残基の成熟タンパク質をコードしていた。一方、*A. niger* No. 12 株

のエキソ型イヌリナーゼをコードする遺伝子 *inuE* は、染色体 DNA 上に 1 コピー存在した。*inuE* 遺伝子は 1611 bp のコード領域からなり、*Penicillium* sp. TN-88 株と *Aspergillus awamori* のエキソ型イヌリナーゼ遺伝子¹⁴⁾にも保存された位置に 60 bp のイントロンを一ヶ所含んでいた。*inuE* 遺伝子の上流域 1797 bp に相同性を示す ORF はデータベースになく、*A. niger* No. 12 株では *Penicillium* sp. TN-88 株のエンド型イヌリナーゼとエキソ型イヌリナーゼ遺伝子のようなクラスター形成は認められなかった。*inuE* 遺伝子はアミノ酸 19 残基の分泌シグナルと 518 残基の成熟タンパク質をコードしていた。*InuD* の Ala-23、Thr-25 と *InuE* の Ala-17、Ala-19 は von Heijne の解析⁶⁷⁾によって提唱されているシグナル・ペプチド切断部位の -3 と -1 にそれぞれ一致した。*InuD* の成熟タンパク質の推定分子量は 74,518 Da、*pI* は 4.64、一方、*InuE* の成熟タンパク質の推定分子量は 57,251 Da、*pI* は 4.92 と算出された。*N*-グリコシル型糖鎖結合部位を *InuD* は 8 箇所、*InuE* は 9 箇所それぞれ成熟タンパク質に含んでおり、両酵素は糖タンパク質であると示唆された。両酵素の推定分子量がそれぞれ SDS-PAGE によって測定された分子量より小さいのは糖タンパク質への SDS の結合が減少し、電気泳動における移動度が小さくなったためと考えられる。エキソ型イヌリナーゼとエンド型イヌリナーゼ、インベルターゼ、レバナーゼは糖質加水分解酵素ファミリー-32 に属しており、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のインベルターゼで保存領域 MNDPNG のアスパラギン酸残基 (D) と ECP のグルタミン酸残基 (E) はそれぞれ求核試薬とプロトン供与体として触媒に関与していることが明らかにされている。⁴³⁾このことから同様の触媒機構が、*Penicillium* sp. TN-88 株のエキソ型イヌリナーゼ *InuD* の Asp-48 と Glu-248、*A. niger* No. 12 株の同酵素 *InuE* の Asp-41 と Glu-241 によってなされていると推察した。

InuD は保存された Cys-249 と別の Cys-539 の 2 つのシステイン残基をもち、*InuE* は保存された Cys-242 を 1 つもつ。両酵素は *pCMB* で活性が阻害されることから、保存された *InuD* の Cys-249、*InuE* の Cys-242 がそれぞれ活性発現に関与しているものと考えられる。*A. niger* No.12 株由来のエキソ型イヌリナーゼ *InuE* は、*Aspergillus awamori* 由来の酵素¹⁴⁾と 91 %、*Aspergillus* 由来の酵素と比較して挿入された 157 残基のアミノ酸配列を除いた *Penicillium* sp. TN-88 株由来の酵素 *InuD* と 61 %の相同性を示した。*InuE* は、イヌリンとレバンを加水分解する *A. awamori* 由来の酵素と高い一次構造の相同性を示しながら、レバンの β -2,6 フルクトフラノシド結合に作用しない。このことからエキソ型イヌリナー

ゼの基質特異性の相異は、転写後修飾や、翻訳後修飾によって生じた可能性も考えられる。しかしながら、エキソ型イヌリナーゼに関する構造の情報は乏しく、基質特異性の違いに寄与する構造を予測することは難しい。今後の情報の蓄積が期待される。

Penicillium sp. TN-88 株のエキソ型イヌリナーゼ InuD と *Aspergillus foetidus* 1-SST⁶⁹⁾、*A. niger* No. 12 株、*A. awamori*¹⁴⁾のエキソ型イヌリナーゼのアミノ酸配列の多重整列は、InuD に Gly-308 から始まる 157 残基のアミノ酸配列が挿入されていることを示した。この 157 残基のアミノ酸配列はデータベース検索により放線菌 *Actinomyces naeslundii* レバナーゼ⁶⁰⁾ の内部配列と細菌 *Bacillus macerans* シクロイヌロオリゴ糖合成酵素⁷⁸⁾の C 末端領域にそれぞれ 38 と 28 % の相同性を示し、保存されたアミノ酸配列が認められた。これらのアミノ酸配列は属を超えて保存されており、イヌリン関連酵素において重要な機能を持つことが示唆された。*Penicillium* sp. TN-88 株のエキソ型イヌリナーゼ InuD と *A. niger* No.12 株の同酵素 InuE を、酵母 *Pichia pastoris* でそれぞれ分泌発現させた。また、InuD の高いイヌリン分解活性への寄与が示唆された挿入配列を、InuE 内部に組込んだ融合酵素も同様に酵母 *P. pastoris* で分泌発現させた。InuE、InuD、融合酵素は酵母 *P. pastoris* にて機能を保持して分泌され、それぞれ電気泳動的に単一に精製された。精製した組換え酵素のイヌリンとスクロースに対する酵素活性はそれぞれ InuD が 327 と 34 units/mg (I/S、9.6)、InuE が 40.4 と 150 U/mg (I/S、0.27) および融合酵素が 280 と 171 units/mg (I/S、1.6)であり、融合酵素のイヌリン分解活性は InuD に匹敵し、InuE に比べて 7 倍上昇した。一方、融合酵素のスクロース分解活性は InuE と同程度であった。このことから挿入配列が InuE のイヌリン分解活性を上昇させ、スクロース分解活性に影響を及ぼさないことが示された。組換え酵素のイヌリンとスクロースに対する K_m 値はそれぞれ InuE が 3.0 と 111 mM、InuD が 0.08 と 3.38 mM および融合酵素が 0.22 と 48.7 mM であった。融合酵素のイヌリンに対する K_m 値は InuE の約 0.067 倍、InuD の約 2.8 倍であり、スクロースに対する K_m 値は InuE の約 0.5 倍、InuD の約 14 倍であった。このことから融合酵素のイヌリンに対する親和性が InuE よりも高く、InuD と同程度であること、スクロースに対する親和性が InuE と同程度で、InuD よりも低いことが示された。このことから InuD の挿入配列が InuE のイヌリンに対する親和性を向上させるが、スクロースに対する親和性に影響を及ぼさないことが示された。InuD の N 末端領域は触媒残基の Asp-48、Glu-248

や RDP モチーフ⁸⁰⁾が存在することから触媒部位と推定される。また、その C 末端領域は、高分子量フルクタンへの結合に関与が示唆される SVEVF が存在することからイヌリン結合部位と考えられる。このことから、InuD の挿入配列はこれらの部位をつなぐ領域である可能性が考えられる。

InuE のアミノ酸配列は、BLAST 検索によって 1-fructosyltransferase (1-SST; EC 2.4.1.99) と報告された *A. foetidus* 酵素のアミノ酸配列 537 残基の内 3 残基だけが置換されていた。置換された 3 残基は 119 番目 (His 対 Gln) と 476 番目 (Gly 対 Ser) と 499 番目 (Thr 対 Ser) の位置で化学的に類似しており、触媒活性の違いを説明することはできない。Rehm ら⁶⁹⁾は *A. foetidus* の培養ろ液を 500 mM のスクロースと保温すると 1-kestose が合成されると述べているが、*Saccharomyces cerevisiae* で発現させた *A. foetidus* 由来酵素は優先的にスクロースを分解し、TLC 解析は少量の 1-kestose を形成することを示している。*P. pastoris* で発現、分泌された *inuE* 遺伝子産物は 5.0% (w/v) のスクロース溶液と保温してもフルクトース残基転移活性を示さなかった。このことから、*A. foetidus* 由来酵素は、高濃度スクロース溶液中でフルクトース残基転移を触媒する活性を持つエキソ型イヌリナーゼと考えるのが適当だと思われる。

糸状菌エキソ型イヌリナーゼの β -フルクトフラノシダーゼ・ファミリーにおける進化的な位置を調べるために全長のアミノ酸配列をもとに無根系統樹を製作した。各枝分かれのブートストラップの値は 93%~100%の範囲であった。*A. foetidus* の 1-SST は触媒活性について明らかでないので除外した。系統樹において *Aspergillus* 属と *Penicillium* 属糸状菌由来のエキソ型イヌリナーゼとエンド型イヌリナーゼは互いに離れた位置で別々にクラスターを形成していた。糸状菌エキソ型イヌリナーゼは酵母インベルターゼのクラスターと繋がっていた。一方、エンド型イヌリナーゼは *A. naeslundii* レバナーゼと系統樹の枝を共有していた。*Bacillus* 属細菌のレバナーゼは糸状菌エキソ型イヌリナーゼと糸状菌エンド型イヌリナーゼのクラスターの間位置していた。以上より糸状菌エキソ型イヌリナーゼと糸状菌エンド型イヌリナーゼはそれぞれ独自にイヌリンの末端と内部の β -2,1 結合に対する加水分解活性を獲得したことが示された。

Penicillium sp. TN-88株のエキソ型イヌリナーゼ遺伝子 *inuD* とエンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuC* の real-time PCR による転写解析により、両遺伝子の転写がイヌリンによって強く誘導され、フルクトース、グルコースで抑制されることを明らかにした。*inuC* と *inuD* の遺伝子間領域には正の調節因子である *Aspergillus*

oryzae α -アミラーゼの澱粉認識部位GGAAATT⁴⁴⁾が*inuC*³⁹⁾遺伝子の開始コドンの上流に3コピー存在し、負の調節因子であるCreA結合部位 (5'-SYGGRG-3')⁴⁵⁾が*inuD*遺伝子の開始コドンから-292 (GCGGAG)、-320 (GCGGAG)、-354 (CTGGGG)、-368 (CCGGAG)、-477 (CCGGAG)に存在した。このことから*inuC*、*inuD*遺伝子は共通の転写調節を受けており、推定シスエレメントがコンセンサス配列の相補鎖に存在する遺伝子の転写調節にも関与することが示唆された。一方、RT-PCRによる転写解析により*A. niger* No. 12株のエキソ型イヌリナーゼ遺伝子*inuE*の転写はイヌリンとスクロースによって誘導され、フルクトースとグルコースにより抑制されることを明らかにした。同一菌株のエンド型イヌリナーゼ遺伝子*inuB*の転写はグルコースによる抑制を受けず、構成的に転写されていた。*inuE*と*inuB*遺伝子の開始コドンの上流600 bp以内の塩基配列を比較したところ、正の調節因子である澱粉認識部位が*inuE*遺伝子の開始コドンの上流に1コピー存在し、*inuB*遺伝子の開始コドンから-182 (5-GGAAATT-3) と-561 (5-TCACGGGC-3) に2コピー存在した。また、負の調節因子であるCreA結合部位が、*inuE*遺伝子の開始コドンから-319 (CCGGGG)、-342 (CTGGGG)、-392 (GCGGGG)、-398 (相補配列GTGGGG) に4カ所存在したのに対し、*inuB*遺伝子では存在しなかった。即ち、エキソ型イヌリナーゼ遺伝子*inuE*には正負の調節因子が存在するのに対しエンド型イヌリナーゼ遺伝子*inuB*には正の調節因子しか存在せず、グルコースによる転写調節パターンとそれらの推定シスエレメントの存在のパターンが一致した。以上より、*Penicillium* sp. TN-88株と*A. niger* No. 12株のエキソ型とエンド型イヌリナーゼ遺伝子の転写調節にこれらの転写因子が関与していることが示唆された。

エンド型イヌリナーゼはスクロースに作用しない点でエキソ型イヌリナーゼを含む他の β -フルクトフラノシダーゼ・ファミリー酵素と特異性を異にしており、保存領域WMNDPNGとECPの下線部のアスパラギン酸残基 (D)、システイン残基 (C) がエンド型イヌリナーゼのみ、それぞれグルタミン酸残基 (E)、バリン残基 (V)に置換されていた。このことから、これらのアミノ酸残基がエンド型イヌリナーゼの基質特異性に関与していると推察し、アミノ酸レベルの解析を行った。エンド型イヌリナーゼInuB (WT) は酵母*P. pastoris*にて機能を保持して分泌された (0.57 mg/ml)。その変異体酵素E43D、V236C、E43D/V236Cも同様に*P. pastoris*にて分泌発現し、それぞれの培養上清より電気泳動的に単一に精製された。変異体酵素E43D、V236CおよびE43D/V236Cの速度パラメータ

k_{cat} は、InuB (WT) に比べて小さくなり、それらのイヌリン分解活性はInuBの135 (100%) に対し、それぞれ4.8 (3.5%)、35.9 (26.6%)、0.31 (0.22%) units/mgに減少した (WTに対する相対活性を括弧内に示した)。E43D変異体酵素の活性の著しい低下は、Glu-43残基が触媒において重要な役割を持つことを示した。このことからエンド型イヌリナーゼの推定求核分子Glu-43はイヌリン分子内部の β -2,1フルクトフラノシド結合の酸素分子に作用するための有効な距離を確保できるが、側鎖の炭素鎖が一つ少ないアスパラギン酸残基ではその距離が確保できず、求核分子として十分に機能しないと推察した。V236C変異体酵素のイヌリン分解活性の低下は、疎水性アミノ酸バリンと非電荷の極性アミノ酸システインの置換が全体もしくは部分的なコンフォメーションを変化させ、Glu-235残基のプロトン供与体 (proton donor) としての機能を阻害したためであると推察した。E43D/V236C変異体酵素は2つのアミノ酸を置換したにも拘らず活性を完全に失っていなかった。各酵素をそれぞれイヌリン、スクロース、レバンの0.25%水溶液に24時間作用させた結果、InuB (WT) とその変異体酵素 E43D、V236C、E43D/V236Cはすべてイヌリンには作用したが、スクロース、レバンには作用しなかった。このことから、Glu-43とVal-236は触媒反応に関与しているが、基質特異性に影響を及ぼさないことが示された。以上よりエンド型イヌリナーゼの基質認識には別の構造が関与していると考えられる。

本研究では、*Penicillium* sp. TN-88株と*Aspergillus niger* No. 12株の2種類の糸状菌からエキソ型イヌリナーゼをそれぞれ精製し、酵素化学的諸性質を明らかにした。また、コードする遺伝子をクローニングし、その一次構造が推定され、機能解析を可能にした。第一にエンド型イヌリナーゼ遺伝子とエキソ型イヌリナーゼ遺伝子の発現機構を転写レベルで示し、イヌリナーゼ遺伝子の転写因子研究への足がかりを築いた。第二にエンド型イヌリナーゼの触媒反応に関与するアミノ酸残基と、エキソ型イヌリナーゼの親和性に関与するアミノ酸配列を示したことによってイヌリナーゼの機能改変のための新たな知見を得た。第三に β -フルクトフラノシダーゼ・ファミリーの分子系統樹により、エキソ型イヌリナーゼとエンド型イヌリナーゼ遺伝子の進化的な関係を明らかにした。以上、本研究は、これまで酵素化学的性質の報告に限られていたエキソ型イヌリナーゼについて、遺伝子クローニングにより、その構造と機能から遺伝子発現制御、分子進化まで発展させ、糸状菌の糖質関連酵素の研究に貢献することができた。

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始懇切丁寧なる御指導・ご鞭撻を賜り、さらにご校閲の労をお取りいただきました宮崎大学農学部応用生物科学科 六車三治男教授並びに太田一良教授に対して心より感謝の意を表します。

本研究を行う間、有益なご助言を頂戴しました宮崎大学農学部応用生物科学科 吉田直人助教授ならびに宮崎大学農学部 中村豊彦名誉教授に深くお礼申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、適切なお助言とご校閲を賜りました佐賀大学農学部応用生物科学科 神田康三教授、鹿児島大学農学部生物資源科学科 安部淳一教授、宮崎大学工学部物質環境化学科 林 幸男教授に心から感謝申し上げます。

研究活動、学生生活を送る上で良き友であり、議論の相手となってくれた田中秀典氏を始め、宮崎大学農学部応用生物科学科微生物機能開発学研究室の多くのメンバーに深く感謝の意を表します。

最後に、私が学生生活を送る上で、経済的援助を下さり、いつも温かく見守ってくれた両親と祖母そして姉弟に深く感謝致します。

Summary

Inulin is a polyfructan, consisting of linear chains of β -2,1-linked D-fructofuranose molecules attached to sucrose at the reducing end. This polymer is a reserve carbohydrate in the roots and tubers of plants such as Jerusalem artichoke, chicory, and dahlia. Such inulin sources have recently received attention as potential feedstock for the production of fructose syrup, inulo-oligosaccharides, or fuel ethanol.

Microbial inulinases can be divided into exo- and endo-acting enzymes by the mode of action on inulin. Endoinulinase (2,1- β -D-fructan fructanohydrolase, EC 3.2.1.7) are specific for inulin and hydrolyze the internal linkages in inulin to yield inulotriose, -tetraose, and -pentaose as main products. In contrast, exoinulinase (β -D-fructan fructohydrolase; EC 3.2.1.80) split off terminal fructose units successively from nonreducing end of the inulinmolecule, but also sucrose and raffinose. To characterize exoinulinases, inulinase activity (I) is commonly compared with the invertase activity (S) of the same enzyme preparation; I/S ratio is useful criterion that may reflect the differences in affinity of each enzyme for inulin and sucrose. The ratios in the range of 0.02 to 2.0 have been reported for exoinulinase from filamentous fungi and yeast. An exoinulinase gene, *INU1*, from yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. To date, however, there are no published reports of the molecular cloning of exoinulinase genes from filamentous fungi. In this study, fungal exoinulinase genes were cloned from *Aspergillus* and *Penicillium* species.

An exoinulinase, P-I, was purified from the culture filtrate of a filamentous fungus *Penicillium* sp. TN-88 grown on inulin. The enzyme was homogeneous as judged by SDS-PAGE and IEF, which showed an apparent M_r of 81 kDa and pI of 4.6. The purified enzyme had extremely high specific activity, 743 units/mg, toward inulin. Inulinase activity was optimal at 4.0 and 55°C. A genomic DNA and cDNAs encoding this protein were cloned and sequenced for the first time as a fungal exoinulinase. The exoinulinase gene (*inuD*) was present as a single copy in the genome. An open reading frame of 2,106 bp was interrupted by a single intron of 56 bp, and encoded a 25-amino acid signal peptide and a 677-amino acid mature protein. The mature protein contained two Cys residues and eight potential *N*-linked glycosylation sites. The 5'-noncoding

region had a putative CAAT box at position -239. Four distinct transcription start points were observed at positions -98 (A), -91 (A), -80 (A) and -76 (A) from the start codon. The exoinulinase gene *inuD* was located 860-bp upstream of the previously reported endoinulinase gene *inuC* in the opposite direction of transcription. Transcriptions of *inuD* and *inuC* genes were simultaneously induced by inulin and repressed by fructose or glucose.

Another exoinulinase was purified from the culture filtrate of a filamentous fungus *Aspergillus niger* strain 12. The purified enzyme was homogeneous as judged by SDS-PAGE and IEF, which showed an apparent M_r of 81 kDa and pI of 5.0. The enzyme had specific activities of 52.8 units/mg toward inulin and 227 units/mg toward sucrose. Inulinase activity was optimal at 4.5 and 60°C. Subsequently, a genomic DNA segment and cDNAs encoding this protein were cloned and sequenced. Southern blot analysis indicated that the exoinulinase gene (*inuE*) was present as a single copy in the genome. An open reading frame of 1611 bp was interrupted by a single intron of 60 bp, and encoded a 19-amino acid signal peptide and 518-amino acid mature protein. The mature protein contained a single Cys residue and nine potential *N*-linked glycosylation sites. Three distinct transcription start points were observed at positions -41(A), -35(A) and -31(A) from the start codon. The 5'-noncoding region had a putative TATA box at position -75 (TATAAA). Transcription of *inuE* gene was induced by inulin or sucrose and repressed by fructose or glucose. The *inuE* cDNA was functionally expressed under the control of the alcohol oxidase gene promoter in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. The deduced amino acid sequence of *inuE* gene product was 91% identical to that of an exoinulinase from *Aspergillus awamori*.

Exo- and endoinulinases, invertases (EC 3.2.1.26), and levanases (EC 3.2.1.65) are members of glycoside hydrolase family 32. A neighbor-joining tree showed that exo- and endoinulinases found in *Aspergillus* and *Penicillium* spp. have independently evolved the respective hydrolytic activities toward terminal and internal β -2,1-fructofuranosidic linkages in inulin.

参考文献

- 1) E.J. Vandamme and D.G. Derycke: Microbial inulinases: fermentation process, properties, and applications. *Adv. Appl. Microbiol.*, **29**, 139-176 (1983).
- 2) M. Suzuki: Fructans in crop production and preservation, in *Science and Technology of Fructans*, M. Suzuki and N. J. Chatterton, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 227-255 (1993).
- 3) A. Pandey, C.R. Soccol, P. Selvakumar, V.T. Soccol, N. Krieger and J.D. Fontana: Recent developments in microbial inulinases; Its application, properties, and industrial applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **81**, 35-52 (1999).
- 4) 中村豊彦, 中津誠一郎: イヌリナーゼの生産と作用機構について. *澱粉科学*, **35**, 121-130 (1988).
- 5) H.E. Snyder and H.J. Phaff: The pattern of action of inulinase from *Saccharomyces fragilis* on inulin. *J. Biol. Chem.*, **237**, 2438-2441 (1962).
- 6) T. Uchiyama: Metabolism in microorganisms. Part II. Biosynthesis and degradation of fructans by microbial enzymes other than levansucrase. in *Science and Technology of Fructans*, M. Suzuki and N.J. Chatterton, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp.169-190 (1993).
- 7) J. Edelman and T.G. Jefford: The metabolism of fructose polymers in plants. 4. β -Fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus* L. *Biochem. J.*, **93**, 148-161 (1964).

- 8) T. Pons, O. Olmea, G. Chinaa, A. Beldarraín, G. Márquez, N. Acosta, L. Rodríguez and A. Valencia: Structural model for family 32 of glycosyl-hydrolase enzymes. *Proteins*, **33**, 383-395 (1998).
- 9) 中村豊彦, 帆足信一郎: *Penicillium* 属菌のイヌラーゼ生産のための基本的培養条件について. *農化*, **43**, 599-605 (1969).
- 10) 中村豊彦, 帆足信一郎, 中津誠一郎: *Aspergillus* 属菌のイヌラーゼ生産のための基礎的培養条件について. *農化*, **52**, 105-110 (1978).
- 11) D.G. Derycke and E.J. Vandamme: Production and properties of *Aspergillus niger* inulinase. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **34B**, 45-51 (1984).
- 12) R. Xiao, M. Tanida and S. Takao: Inulinase from *Chrysosporium pannorum*. *J. Ferment. Bioeng.*, **66**, 553-558 (1988).
- 13) B.E. Norman and B. Højer-Pedersen: The production of fructooligosaccharides from inulin or sucrose using inulinase or fructosyltransferase from *Aspergillus ficuum*. *Denpun Kagaku*, **36**, 103-111 (1989).
- 14) M. Arand, A.M. Golubev, J.R.B. Neto, I. Polikarpov, R. Wattiez, O.S. Korneeva, E.V. Eneyskaya, A.A. Kulminskaya, K.A. Shabalin, S.M. Shishliannikov, O.V. Chepurnaya and K.N. Neustroev: Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from *Aspergillus awamori*. *Biochem. J.*, **362**, 131-135 (2002).
- 15) S. Onodera and N. Shiomi: Purification and substrate specificity of *endo*-type inulinase from *Penicillium purpurogenum*. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2569-2576 (1988).

- 16) T. Nakamura, A. Shitara, S. Matsuda, T. Matsuo, M. Suiko and K. Ohta: Production, purification and properties of an endoinulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates inulotriose. *J. Ferment. Bioeng.*, **84**, 313-318 (1997).
- 17) S. Onodera and N. Shiomi: Purification and subsite affinities of *exo*-inulinase from *Penicillium trzebinskii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1443-1447 (1992).
- 18) K. Ohta, N. Suetsugu and T. Nakamura: Purification and properties of an extracellular inulinase from *Rhizopus* strain TN-96. *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 78-80 (2002).
- 19) H. Negoro: Inulase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Ferment. Technol.*, **56**, 102-107 (1978).
- 20) R.J. Rouwenhorst, M. Hensing, J. Verbakel, W.A. Scheffers and J.P. van Dijken: Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3337-3345 (1990).
- 21) H. Negoro and E. Kito: Purification and enzymatic properties of intracellular β -fructofuranosidase from *Candida kefyr*. *J. Ferment. Technol.*, **51**, 103-110 (1973).
- 22) A. Yokota, O. Yamauchi and F. Tomita: Production of inulotriose from inulin by inulin-degrading enzyme from *Streptomyces rochei* E87. *Lett. Appl. Microbiol.*, **21**, 330-333 (1995).
- 23) S.-I. Kang and S.-I. Kim: Molecular cloning and sequence analysis of an endo-inulinase gene from *Arthrobacter* sp. *Biotechnol. Lett.*, **21**, 569-574 (1999).
- 24) R.M.M. Gern, S.A. Furlan, J.L. Ninow and R. Jonas: Screening for microorganisms that produce only endo-inulinase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 632-635 (2001).

- 25) H.-J. Kwon, S.-J. Jeon, D.-J. You, K.-H. Kim, Y.-K. Jeon, Y.-H. Kim, Y.-M. Kim and B.-W. Kim: Cloning and characterization of an exoinulinase from *Bacillus polymyxa*. *Biotechnol. Lett.*, **25**, 155-159 (2003).
- 26) Y. Tsujimoto, A. Watanabe, K. Nakano, K. Watanabe, H. Matsui, K. Tsuji, T. Tsukihara and Y. Suzuki: Gene cloning, expression, and crystallization of a thermotolerant exo-inulinase from *Geobacillus stearothermophilus* KP1289. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 180-185 (2003).
- 27) T. Nakamura, Y. Nagatomo, S. Hamada, Y. Nishino and K. Ohta: Occurrence of two forms of extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 134-139 (1994).
- 28) 中村豊彦, 黒川隆則, 中津誠一郎, 上田誠之助: *Aspergillus* 属菌の生産する細胞外イヌラーゼ (P-III) の結晶化とその性質について. *農化*, **52**, 159-166 (1978).
- 29) T. Nakamura, T. Urakawa, M. Suiko and K. Ohta: Properties of extracellular inulinase (P-I) from *Aspergillus niger*. *Bull. Fac. Agric., Miyazaki Univ.*, **43**, 93-101 (1996).
- 30) 中村豊彦, 丸木誠一, 中津誠一郎, 上田誠之助: *Aspergillus* 属菌の生産する細胞外イヌラーゼ (P-II) の性質について. *農化*, **52**, 581-587 (1978).
- 31) T.B. Uhm, M.S. Chung, S.H. Lee, F. Gourronc, I. Housen, H.-S. Kim, J.H. Cassart, J.V. Beeumen, B. Haye and J. Vandenhaute: Purification and characterization of *Aspergillus ficuum* endoinulinase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 146-151 (1999).

- 32) R. Xiao, M. Tanida and S. Takao: Purification and some properties of endoinulinase from *Chrysosporium pannorum*. *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 244-248 (1989).
- 33) 中村豊彦, 中津誠一郎: *Penicillium* 属菌の生産する細胞外イヌリナーゼの性質について. *農化*, **51**, 681-689 (1977).
- 34) R. Xiao, M. Tanida and S. Takao: Purification and characteristics of two exoinulinases from *Chrysosporium pannorum*. *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 331-334 (1989).
- 35) M. Ettalibi and J. C. Baratti: Molecular and kinetic properties of *Aspergillus ficuum* inulinases. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 61-68 (1990).
- 36) S. Moriyama, H. Akimoto, N. Suetsugu, S. Kawasaki, T. Nakamura and K. Ohta: Purification and properties of an extracellular exoinulinase from *Penicillium* sp. strain TN-88 and sequence analysis of the encoding gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1887-1896 (2002).
- 37) K. Ohta, H. Akimoto, S. Matsuda, D. Toshimitsu and T. Nakamura: Molecular cloning and sequence analysis of two endoinulinase genes from *Aspergillus niger*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1731-1738 (1998).
- 38) H. Akimoto, T. Kushima, T. Nakamura and K. Ohta: Transcriptional analysis of two endoinulinase genes *inuA* and *inuB* in *Aspergillus niger* and nucleotide sequences of their promoter regions. *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 599-604 (1999).
- 39) H. Akimoto, N. Kiyota, T. Kushima, T. Nakamura and K. Ohta: Molecular cloning and sequence analysis of an endoinulinase gene from *Penicillium* sp. strain TN-88. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 2328-2335 (2000).

- 40) S. Onodera, T. Murakami, H. Ito, H. Mori, H. Matsui, M. Honma, S. Chiba and N. Shiomi: Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNA and gene encoding *endo*-inulinase from *Penicillium purpurogenum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 1780-1785 (1996).
- 41) T.B. Uhm, K.-S. Chae, D.W. Lee, H.-S. Kim, J.-P. Cassart and J. Vandenhoute: Cloning and nucleotide sequence of the *endo*inulinase-encoding gene, *inu2*, from *Aspergillus ficuum*. *Biotechnol. Lett.*, **20**, 809-812 (1998).
- 42) S. Moriyama, H. Tanaka, M. Uwataki, M. Muguruma and K. Ohta: Molecular cloning and characterization of an *exo*inulinase gene from *Aspergillus niger* strain 12 and its expression in *Pichia pastoris*. *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 324-331 (2003).
- 43) A. Reddy and F. Maley: Studies on identifying the catalytic role of Glu-204 in the active site of yeast invertase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 13953-13958 (1996).
- 44) S. Tani, T. Kawaguchi, M. Kato, T. Kobayashi and N. Tsukagoshi: A novel nuclear factor, SREB, binds to a *cis*-acting element, SRE, required for inducible expression of the *Aspergillus oryzae* Taka-amylase A gene in *A. nidulans*. *Mol. Gen. Genet.*, **263**, 232-238 (2000).
- 45) B. Cubero and C. Scazzocchio: Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.*, **13**, 407-415 (1994).
- 46) O. Laloux, J.-P. Cassart, J. Delcour, J. V. Beeumen and J. Vandenhoute: Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424. *FEBS Lett.*, **289**, 64-68 (1991).

- 47) M.W. Pariza and E.M. Foster: Determining the safety of enzymes used in food processing. *J. Food Protect.*, **46**, 453-468 (1983).
- 48) T. Nakamura, Y. Ogata, A. Shitara, A. Nakamura and K. Ohta: Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 164-169 (1995).
- 49) H. Hidaka, M. Hirayama and N. Sumi: A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1181-1187 (1988).
- 50) T. Nakamura, Y. Ogata, Y. Kamo, M. Hirayama and K. Ohta: Inulo-oligosaccharides: continuous production from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* and *in vitro* utilization by bifidobacteria. *Food Sci. Technol. Res.*, **7**, 145-148 (2001).
- 51) K. Muramatsu, S. Onodera, M. Kikuchi and N. Shiomi: The production of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium* spp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1451-1454 (1992).
- 52) L.A. Underkofler, W.K. McPherson and E.I. Fulmer: Alcoholic fermentation of Jerusalem artichokes. *Ind. Eng. Chem.*, **29**, 1160-1164 (1937).
- 53) K. Ohta, S. Hamada and T. Nakamura: Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 729-733 (1993).

- 54) T. Nakamura, Y. Ogata, S. Hamada and K. Ohta: Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 564-566 (1996).
- 55) G.L. Miller: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 426-428 (1959).
- 56) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 57) U.K. Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 58) R. Taussing, and M. Carlson: Nucleotide sequence of the yeast *SUC2* gene for invertase. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1943-1954 (1983).
- 59) J.A. Perez, L. Rodoriguez and T. Ruiz: Cloning and sequence analysis of the invertase gene *INV1* from the yeast *Pichia anomala*. *Curr. Genet.*, **29**, 234-240 (1996).
- 60) J.M. Norman, K.L. Bunny and P.M. Giffard: Characterization of *levJ*, a sucrose/fructanase-encoding gene from *Actinomyces naeshlundii* T14V, and comparison of its product with other sucrose-cleaving enzymes. *Gene*, **152**, 93-98 (1995).
- 61) K. Kamei, Y. Yamamura, S. Hara and T. Ikenaga: Amino acid sequence of chitinase from *Streptomyces erythraeus*. *J. Biochem.*, **105**, 979-985 (1989)
- 62) J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis: Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

- 63) C. Yanisch-Perron, J. Vieira and J. Messing: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103-119 (1985).
- 64) I.C. Hoskins and C.F. Roberts: Expression of the 3-phosphoglycerate kinase gene (*pgkA*) of *Penicillium chrysogenum*. *Mol. Gen. Genet.*, **243**, 270-276 (1994).
- 65) M. Kozak: The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.*, **108**, 229-241 (1989).
- 66) S.E. Unkles: Gene organization in industrial filamentous fungi. In "Applied molecular genetics of filamentous fungi", eds. J.R. Kinghorn, and G. Turner, Chapman and Hall, London, pp. 28-53 (1992).
- 67) G. von Heijne: A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 4683-4690 (1986).
- 68) S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D.J. Lipman: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402 (1997)
- 69) J. Rehm, L. Willmitzer and A.G. Heyer: Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. *J. Bacteriol.*, **180**, 1305-1310 (1998).
- 70) J.D. Thompson, D.G. Higgins and T.J. Gibson: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680 (1994)

- 71) I. Martin, M. Débarbouillé, E. Ferrari, A. Klier, and G. Rapoport: Characterization of the levanase gene of *Bacillus subtilis* which shows homology to yeast invertase. *Mol. Gen. Genet.*, **208**, 177-184 (1987).
- 72) S. Bezzate, M. Steinmetz, and S. Aymerich: Cloning, sequencing, and disruption of levanase gene of *Bacillus polymyxa* CF43. *J. Bacteriol.*, **176**, 2177-2183 (1994).
- 73) Y. Van de Peer and R. De Wachter: TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.*, **10**, 569-570 (1994)
- 74) N. Saitou and M. Nei: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425 (1987)
- 75) J. Felsenstein: Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 783-791 (1985)
- 76) S.N. Ho, H.D. Hunt, R.M. Horton, J.K. Pullen and L.R. Pease: Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, **77**, 51-59 (1989).
- 77) J.M. Cregg, T.S. Vedvick, and W.C. Raschke: Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, **11**, 905-910 (1993).
- 78) H.-Y. Kim and Y.-J. Choi: Molecular characterization of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus macerans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 995-1000 (2001).
- 79) L. Meijerink, C. Mandugers, L. van de Locht, E. Tönnessen, F. Goodsaid, and J. Raemaekers: A novel method to compensate for different amplification efficiencies

- between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J. M. Diag.*, **3**, 55-61 (2001).
- 80) B. Henrissat: A classification of glycosyl hydrolase based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, **280**, 309-316 (1991).
- 81) B. Henrissat, and A. Bairoch: New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, **293**, 781-788 (1993).
- 82) P.M. Coutinho, and B. Henrissat: Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", eds H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat, and B. Svensson, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK., pp. 3-12 (1999).
- 83) F. R. Batista, L. Herández, J. Arrieta, C. Menéndez, R. Gómez, Y. Támara and T. Pons: Substitution of Asp-309 by Asn in the Arg-Asp-Pro (RDP) motif of *Acetobacter diazotrophicus* levanscrase affects sucrose hydrolysis, but not enzyme specificity. *Biochem. J.*, **337**, 503-506 (1999).