



微生物による新機能オリゴ糖の生産と利用

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-06-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小川, 喜八郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10458/5724

微生物による新機能オリゴ糖の生産と利用

小川喜八郎 太田一良

宮崎大学農学部

1. 研究目的

近年、生体の免疫・生体防御系調節、神経系調節、循環系調節、内分泌および外分泌調節等に関係する糖質の第3次機能が高齢化社会に向けての人類の健康、福祉等医療産業、食品産業および農業分野で最も期待されている。

中でもキチン・キトサン・オリゴ糖はビフィズス菌増殖促進、細胞免疫増強、抗感染病効果、抗腫瘍活性、植物生長促進、コレステロール低下、アトピー改善、食品保存性および植物病原菌増殖抑制等の多くの機能を示すことが知られており、これらのおりご糖糖を多量に、低コストで生産するための技術開発が進められている。従来、キトサンオリゴ糖は塩酸加水分解由来のもので、重合度も3-4糖以下の糖が40%を占め、機能性の高い5糖以上の調製が難しく、また、単糖が著量生じることおよび精製が困難なことがあげられている。しかし、エンド型のキトサンナーゼ酵素分解では単糖を生成することなく機能性の高い5-8糖のキトサンオリゴ糖を生成することができる。

本研究ではキトサン分解酵素（キトサンナーゼ）活性の高い微生物のスクリーニングを行い、本酵素活性の高い工業的生産菌、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*)の分離に成功した。本酵素の起業化（微生物特許取得、酵素の製剤化とおよび試薬開発）を目標に本酵素の酵素化学的性質、キトサンオリゴ糖の作用機構および生成条件等について研究した。

イヌリンは、フルクトース（果糖）が重合した多糖であり、キクイモなどの植物に貯蔵多糖として存在する。当研究室が保有する黒麹菌 *Aspergillus niger* No. 12株と青カビ *Penicillium* sp. TN-88株は、酵素エンド型イヌリナーゼ (2,1- β -D-fructan fructanohydrolase, EC 3.2.1.7) を細胞外に生産する。本酵素はイヌリン内部の β -2,1-フルクトフラノシド結合を切断して重合度3~5のイヌロオリゴ糖を生成する。イヌロオリゴ糖は種々の有益な機能性を示す。本研究では、*A. niger* No. 12株のゲノムDNAから2つの重複したエンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuA*および *inuB*をそれぞれ *EcoRI*断片としてクローニングし、構造解析を行った。これらの1,548 bpのOpen reading frame(ORF)を含む断片には、いずれも約45 bpの上流領域が存在するのみであったので、それぞれ遺伝子のさらに上流領域のクローニングと構造解析を行った。また、*inuA*および *inuB*遺伝子について、発現の有無について転写レベル検討した。併せてTN-88株のエンド型イヌリナーゼ遺伝子をクローニングし、その推定ア

ミノ酸配列と黒麹菌由来のそれと比較した。

ヘミセルロースの主成分を占めるキシランから生成されるキシロオリゴ糖は、腸内菌叢の改善、糖尿病に対する機能性食品素材として多方面でその利用が期待されている。糸状菌 *Aureobasidium pullulans* の培養ろ液から、キシランをキシロオリゴ糖に加水分解する細胞外酵素キシラナーゼを精製し、その酵素化学的諸性質を明らかにした。

2. 研究方法

(1) キトサナーゼ生産微生物を分離するためにキトサンを唯一の炭素源とする最小培地を用いた。キトサナーゼ活性測定にはRondole & Morgan法^{1,2)}を用いた。0.1 M酢酸塩緩衝液(pH5.0)で適当に希釈した酵素液0.5 mlと基質0.5 mlを反応させた後、アセチルアセトン試薬1 mlを加えて反応を停止させた。20分間加熱煮沸、冷却後エタノール3 mlとエールリッヒ試薬1 mlを加え緩やかに混合する。さらに、65-70℃、10分間煮沸、冷却後530 nmにおける吸光度を測定した。酵素力価は1分間に1 μ molのグルコサミンを生成する酵素量として表示した。微生物の同定は日本分析センターに依頼した。

(2) 本酵素製剤を阪急バイオインダストリー(株)に依頼して試作品を調製した。本酵素はDEAE-Sepharose CL-6BおよびSephacryl S-100 HRによるクロマトグラフ法で分画・精製した。精製酵素の一般的性質、特に、種々のキトサンに対するオリゴ糖の生成能をHPLC分析を行い、最適オリゴ糖生成基質の選抜や本酵素の転移作用等を調べた。さらに、現在、本酵素の遺伝子構造を解析している。

(3) *A. niger* No.12 株をフルクトースを炭素源とする液体培地を用いて30℃で5日間振とう培養した。この培養ろ液から細胞外エンド型イヌリナーゼをDEAE-セルロファインA-500(生化学工業)およびQ-セファロースHP

(Pharmacia LKB)によるカラム・クロマトグラフィーで電気泳動的に単一に精製した。本酵素の内部アミノ酸配列を決定するために、精製酵素をリシルエンドペプチダーゼ(和光純薬)、ブロムシアン(和光純薬)、又はV8プロテアーゼ(Promega)で切断後、ペプチドをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。分離されたペプチドはPVDF膜(Millipore)にブロッティングし、そのアミノ酸配列をプロテイン・シークエンサー(Perkin Elmer、476 A)で決定した。その内部アミノ酸配列を基にオリゴヌクレオチドを合成し、Polymerase Chain Reaction(PCR)のプライマーとした。一方、*A. niger* No.12 株からゲノムDNAを調製し、PCRの鋳型とした。PCRは、耐熱性DNAポリメラーゼAmpliTaq(Perkin Elmer)を用い、パーキン・エルマー model 2400 上で行った。増幅されたDNA断片はアガロース・ゲル電気泳動後、ゲルから切り出しWizard PCR Preps DNA Purification System

(Promega) を用いて単離した。この断片をベクター pCR II (TA Cloning Kit, Invitrogen) にクローニングし、塩基配列を決定した。この PCR 産物をジゴキシゲニン (DIG、ベーリンガー・マンハイム) でランダム・プライマー法により標識し、エンド型イヌリナーゼに特異的なプローブとして以下のハイブリダイゼーションに用いた。塩基配列は、ダイデオキシシーケンス法で決定し、データを遺伝子解析ソフト GENETYX-MAC で解析した。エンド型イヌリナーゼ遺伝子を保有する組換え大腸菌は、IPTG を含む LB 培地で培養後、菌体を超音波破碎機 (トミー精工、model UR-200P) で破碎した。100,000 x g で 1 時間超遠心後、上澄液のイヌリンおよびスクロース分解活性を測定した。(4) *Penicillium* sp. TN-88 株のイヌリンを炭素源とする液体培地に、本菌株の斜面培地から胞子を 1 白金耳量植菌し、30 °C、150 rpm にて 72 時間培養した。その培養液をブフナー・ロートで吸引濾過し、集菌した。ロート上の菌体を滅菌水で洗浄後、濾紙で菌体に含まれる水分を十分にとり、エペンドルフ・チューブに約 100 mg 分取した。DNA を調製し、上述の方法に従い、遺伝子をクローニングした。

(5) *A. pullulans* をキシランを炭素源とする酵素生産用液体培地で、5 日間、30 °C で液体振とう培養した後、そのろ液を回収して、細胞外酵素の精製に供した。ポリリチレングリコールを用い培養ろ液を 1/3 まで濃縮し、透析、遠心分離したものを濃縮粗酵素液として、カラムクロマトグラフィーにより精製した。DEAE-Cellulofine A-500 (生化学工業) 陰イオン交換クロマトグラフィーの結果、2 つのピークが認められ、溶出順に P-I および P-II とした。それぞれの画分を Cellulofine GCL-100 ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、Sephacryl S-100 HR ゲルろ過クロマトグラフィー、Hydroxyapatite によるクロマトグラフィーに供し、連続的に溶出した。キシラン分解活性は 45 °C で 30 分間反応させ、キシランから遊離した還元糖をジニトロサリチル酸法で定量した。次に本菌株の生産する P-I、P-II の各酵素について純度を SDS-PAGE により検定後、その酵素化学的諸性質について検討を行った。

3. 研究成果

(1) 工業的有用キトサナーゼ生産菌の選抜

キトサンを唯一の炭素源とする最小培地に生育する菌株の中で、キトサナーゼ活性の高い、唯一の市販酵素製剤を凌駕する菌株の分離に成功した (表 1)。この微生物は日本分析センターの分析の結果、*Bacillus* 属の細菌であることが分かり、*Bacillus subtilis* HK1 と命名した。

(2) キトサナーゼの分画・精製

キトサナーゼ製剤を各種のイオン交換クロマトグラフィーにより精製し、酵素タンパク質的に単一名成分として精製した。本酵素の組成は単純であり、

比較的簡単に分離・精製できた（図1）。本酵素の分子量はおよそ29,000であり、等電点はおよそ9.0であった（図2）。

(3)キトサナーゼの性質

本酵素の最適条件はpH 7.0、55℃であった。pH5.0～7.0で安定であり、また、温度は40℃まで安定であった。基質特異性をキトサン・ヤエガキBの酵素活性を100とした相対活性（%）で示した。本酵素はキトサン・ヤエガキB、キトサン・ヤエガキS、キトサン9B、キトサン8およびキトサン7Bに対して強い活性が認められたキトサン10、キトサン9、キトサン8およびキトサン7はアセチル化の低い順となっているが、相対活性は高くなっているため、本酵素は脱アセチル化の高い基質に良く作用することが認められた（表2）。本酵素は基質の粘度低下と還元糖生成の相関からGlcN-GlucNをendo型で加水分解する酵素であることが認められた（図3）。

(4)キトサナーゼの機能性オリゴ糖生成

本菌由来のキトサナーゼは生理活性の高い4糖から6糖以上（およそ8糖まで）のオリゴ糖を80%以上を含む、優れたキトサンオリゴ糖生成酵素であることが確認された。また、本酵素は転移反応を示し、例えば、4量体のキトサンオリゴ糖を6～8糖のオリゴ糖を40%も生成する特徴を示す酵素である（表3）。

表1 分離菌のキトサナーゼ活性

分離菌	キトサナーゼ活性 (units/ml)
K0A	0.220
K0B	0.119
K0C	4.442
K0D	0.342
KH1	9.032
K01	0.154
K02	2.632
K4	0.875
H7	0.150
ケニヤ菌	0.048

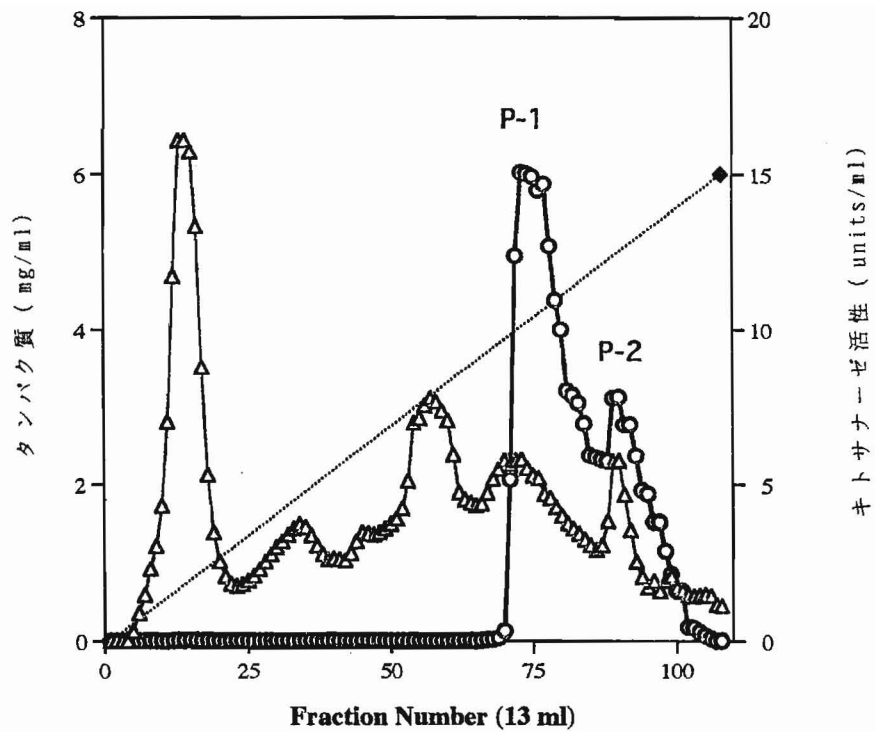


図1 DEAE-Sepahrose CL-6Bによる *Bacillus subtilis* 由来キトサナーゼの分画

△ タンパク質 (mg/ml) ○ キトサナーゼ活性 (units/ml)
◆ NaCl濃度

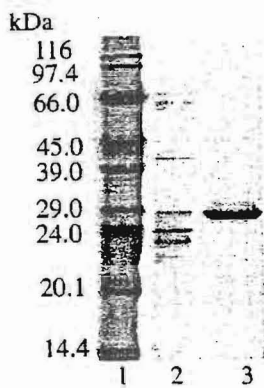


図2 精製酵素 (キトサナーゼ) の SDS-PAGE

1 分子量マーカー
2 粗酵素
3 精製酵素

表2 精製キトサナーゼの基質特異性

基質	相対活性 (%)
キトサン10	82.3
キトサン9B	78.5
キトサン8B	65.7
キトサン7B	53.2
キトサン・ヤエガキB	100
キトサン・ヤエガキS	97.9
キトサン・EL	98.5
キトサン (水溶性)	45.4
グリコールキトサン	3.5
部分脱アセチルキトサン	11.8
グリコールキチン	0
コロイダルキチン	0

基質の濃度 キトサン 0.2% キチン 1%

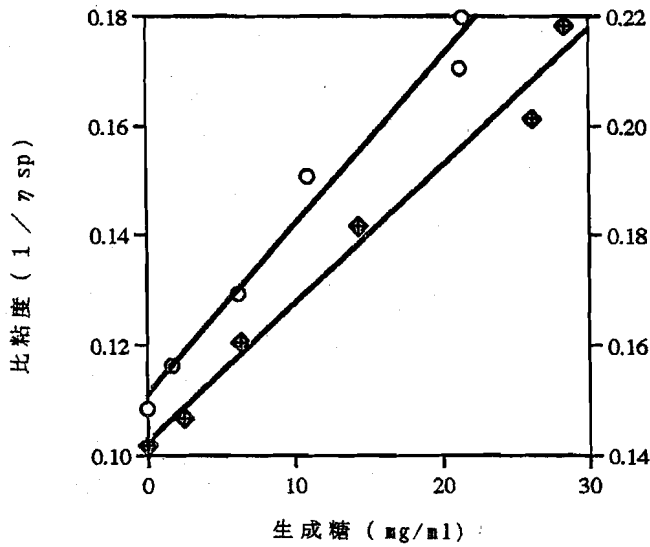


図3 キトサナーゼの基質粘度低下と糖化活性との関係

○ キトサン EL ◇ キトサン YB

表3 キトサナーゼのキトサンおよびキトサンオリゴ糖分解

基質	生成物 (%)						
	GlcN	(GlcN) ₂	(GlcN) ₃	(GlcN) ₄	(GlcN) ₅	(GlcN) ₆	>(GlcN) ₆
(GlcN) ₂	~	97.3	~	2.6	~	~	~
(GlcN) ₃	~	~	92.4	~	~	~	3.0
(GlcN) ₄	6.7	3.2	5.4	41.5	~	9.8	31.6
(GlcN) ₅	2.5	3.7	2.0	4.2	76.8	~	10.9
(GlcN) ₆	~	6.9	4.2	3.8	6.2	63.4	14.2
キトサン10	~	3.5	9.6	16.0	17.2	15.4	34.6

反応は基質濃度10%で、生成物の分析はHPLCで行った。

(5)新規キトサナーゼの工業的生産

本酵素のキトサンからのオリゴ糖生成能が市販製剤のそれに比べて、酵素活性や生理的に要求される機能性の高い5-6糖を生成することから本酵素の工業的生産を阪急バイオインダストリー(株)および協和化成(株)で行い、1999年9月に特許申請を行うと共に工業生産を開始した。

(6) *A. niger* No.12株エンド型イヌリナーゼ遺伝子の塩基配列と推定アミノ酸配列

プラスミドpINU103とpINU106の3.9と5.9 kbpのインサートからそれぞれ1.8 kbp *EcoRI*-*KpnI* 断片(pINU104)と2.5 kbp *EcoRI*-*HincII* 断片(pINU107)にサブクローニングし、全塩基配列を決定した。いずれのDNA断片にも516個のアミノ酸をコードするエンド型イヌリナーゼ遺伝子のOpen Reading Frame (ORF)が存在した。両遺伝子間には、23個のヌクレオチドの置換が存在したが、アミノ酸レベルでは8個が相違した。本遺伝子には介在配列は認められず、23個のアミノ酸配列からなる疎水性のシグナル・ペプチドが存した。成熟酵素のN末端グルタミンは環化し、ピログルタミン酸に変化したことにより、ブロックされたことが推定された。したがって、ピログルタミルアミノペプチダーゼ(ベーリンガー・マンハイム)でピログルタミン酸を除去した酵素タンパク質のN末端アミノ酸配列を決定した。このアミノ酸配列は、塩基配列からの推定アミノ酸配列のSer-25からAsp-37に一致した。また、成熟酵素には2個のシステイン残基が存在し、6ヶ所のN-グリコシド型糖鎖結合部位(N-X-T/S)が推定された。また、本酵素遺伝子を導入した大腸菌の無細胞抽出液でイヌリナーゼ活性が認められ、またスクロース分解活性は検出されなかった。また、細胞外には、イヌリナーゼ活性は検出されなかった。さらに、既報の糸状菌 *Penicillium purpurogenum* 起源の同酵素と73%の相同性を示した。

(7)エンド型イヌリナーゼ遺伝子由来の転写産物の解析

上述のように *A. niger* No.12株はそのゲノム上に重複したエンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuA*と *inuB*を保有する。*inuA*と *inuB*に特異的なDNAプローブを両遺伝子間でホモロジーが認められないそれぞれの3'非コード領域を基に作成した。イヌリン、フルクトース、またはグルコースを炭素源とする本菌株の液体培養後の菌体からそれぞれポリ(A)+RNAを調製した。各RNAから逆転写反応とそれに続くPCRで、本酵素をコードするcDNAを増幅した。いずれの炭素源で増殖した菌体から調製したcDNAも *inuB*に特異的なプローブとのみハイブリダイズし、*inuA*由来のcDNAは検出されなかった。本菌株のゲノムDNAから両遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、塩基配列を決定した。*inuB*遺伝子の5'上流に4ヶ所の転写開始点、翻訳開始コドンの103 bp上流にTATAボックス

ス (TATATA) が認められた。 *inuB* 転写産物のポリ (A) 付加部位は、翻訳終止コドンの 94~297 bp 下流に多数存在した。

(8) *Penicillium* sp. TN-88株エンド型イヌリナーゼのクローニングと構造解析

Penicillium sp. TN-88株エンド型イヌリナーゼのアミノ酸配列²¹⁾を基にプライマーを作成し、PCRによりゲノムDNAから本酵素遺伝子の一部を含む621 bpの断片を増幅した。これをDIG標識しエンド型イヌリナーゼ遺伝子に特異的なプローブとした。このプローブとゲノムDNAのサザン・ハイブリダイゼーションを行ったところ3.0-kbp *Bam*H I断片とハイブリダイズした。この断片をプラスミドpUC18にライゲーション後、大腸菌JM109を形質転換しゲノムDNAライブラリーを作成した。これを用いてコロニー・ハイブリダイゼーションを行い、得られたクローンをサブクローニングし、構造遺伝子(ORF)の一部と上流領域を含む*Sph*I-*Bam*H I断片(1.4 kbp)を得た。この塩基配列を基にプライマーを作成し、本菌株のmRNAからRT-PCR法により完全長cDNAをクローニングした。得られたcDNAの塩基配列を基にプライマーを作成し、ゲノムDNAを鋳型にしてPCRで本酵素遺伝子を増幅し、その塩基配列から1,545 bpのORFが推定された。TN-88株よりmRNAを調製し、5'および3'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)法により、完全長のエンド型イヌリナーゼcDNAを合成した。DDBJのデータ・ベースから相同性の高いアミノ酸配列を検索し、Clustal Wでアラインメントを行い、これをもとにNeighbor-Joining法により分子系統樹を作成した。

(9) *A. pullulans* FERM-P4257株由来キシラナーゼの精製と酵素化学的性質

A. pullulans FERM-P4257株がより多量のキシラナーゼを生産するような培養条件を設定した。その培養条件で本菌株を大量培養し、生産されたキシラナーゼをDEAE-Cellulofine A-500を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、Sephacryl S-100 HRを用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより精製し、SDS-PAGEにより純度検定および分子量測定を行った。一種類の酵素P-IIを電気泳動的に単一になるまで精製した。精製酵素の分子量は24,000と推定され、最適pHは3.5、最適温度は50℃であった。尚、比活性は最適条件では2144.1(U/mg)であった。pH 2.0~pH 6.0の酸性領域で高いpH安定性を示し、60℃まで熱安定性を示した。薄層クロマトグラフィーの結果からキシラン加水分解反応生成物として、キシロース、キシロピオース、キシロトリオースが確認された。P-IIのN末端アミノ酸配列は、Ala-Gly-Pro-Gly-Gly-Ile-Asn-Tyr-Val-Gln-Asn-Tyr-Asn-Gly-Asn-Leu-Gly-Gln-Phe-Thrであった。

4. 考察

上記のように本研究は実用化を目標に研究開発を行った。本研究では、1)

キトサンオリゴ糖生成酵素のスクリーニングを行い、工業的生産菌 *Bacillus subtilis* KH1 の分離に成功した。2) 本菌由来のキトサナーゼの分画・精製を行い、タンパク質的および酵素化学的諸性を調べると共に、作用機作ならびに遺伝子解析を行った。3) 本酵素によるキトサンからのキトサンオリゴ糖の生成条件および転移反応等について詳細に研究した。これらの結果から本酵素生産菌は本コンセプトのモデル化により応用可能な新規有用菌であることが証明された。

一方、工業化に際し、企業側では、1) 培養法の改良（培地組成、培地濃度、培養温度、培養 pH、通気攪拌条件、種菌の摂取量の検討。2) 精製工程の開発〔菌体の分離工程、キトサナーゼの濃縮工程（限外ろ過、低温減圧濃縮、タンパク）、色、臭いの除去（イオン交換樹脂、活性炭処理）、生菌除去精密ろ過工程（メンブランろ過、セラミックろ過）、粉末化工程（噴霧乾燥、凍結乾燥、送風乾燥）および製品化工程（粉末製品、液体製品、液体製品では安定化剤や防腐剤の検討）〕、3) キトサンオリゴ糖の製造方法の開発（アセチル化度の異なるキトサンを基質に基質濃度、作用温度、作用 pH、pH 調整用の酸の種類、基質添加法糖）および 4) キトサンオリゴ糖生成酵素およびキトサンオリゴ糖の分析と評価を行い、最終的に工業化可能な酵素であることが確認され、1999年9月に工業生産を開始し、さらに、特許を申請受理された。

本研究で *A. niger* No. 12 株に見出した 2 個のエンド型イヌリナーゼ遺伝子と同じように、麹菌 *Aspergillus oryzae*⁴⁾ と *Aspergillus awamori*⁵⁾ にそれぞれ 3 および 2 コピーの α -アミラーゼ遺伝子が重複して存在することが報告されている。最近、Uhmら⁶⁾ が *Aspergillus ficuum* (ATCC 16882) からエンド型イヌリナーゼをコードする遺伝子 *inu2* をクロニングし、その塩基配列を決定した。*A. ficuum* の *inu2* を含む 2.3-kbp *KpnI* 断片は、本菌株の *inuA* の 2.3-kbp *KpnI* 断片と同一であった。2 コピーの遺伝子の内、*inuB* のみの転写が認められた結果は、精製酵素の部分アミノ酸配列が *inuB* 遺伝子産物に対応する昨年度の結果と一致した。本実験条件では発現しなかった *inuB* 遺伝子については、特定の環境でのみ発現する遺伝子あるいは機能を失った偽遺伝子であると考察した。

インベルターゼ、レバナーゼ、イヌリナーゼは、基質特異性の相違に拘わらず、その一次構造に高い相同性を示す β -fructofuranosidase family を構成する。*Aspergillus* 属と *Penicillium* 属に由来する本酵素遺伝子は共通してイントロンを含まず、推定アミノ酸配列は β -fructofuranosidase motif (MNDPNG) の Asp が Glu-43 に置換した構造を特徴とした。また、ホモロジー検索から Glu-43 とともに Glu-233 の活性への関与が示唆された。上記 family に属する各酵素のアミノ酸配列を基に系統樹（図 4）を作成したところ、糸状菌のみ

に存在が知られているエンド型イヌリナーゼの起源は細菌のレバナーゼ遺伝子に近いものと考察され、他のフルクトフラノシダーゼとは別のクラスターを形成した。

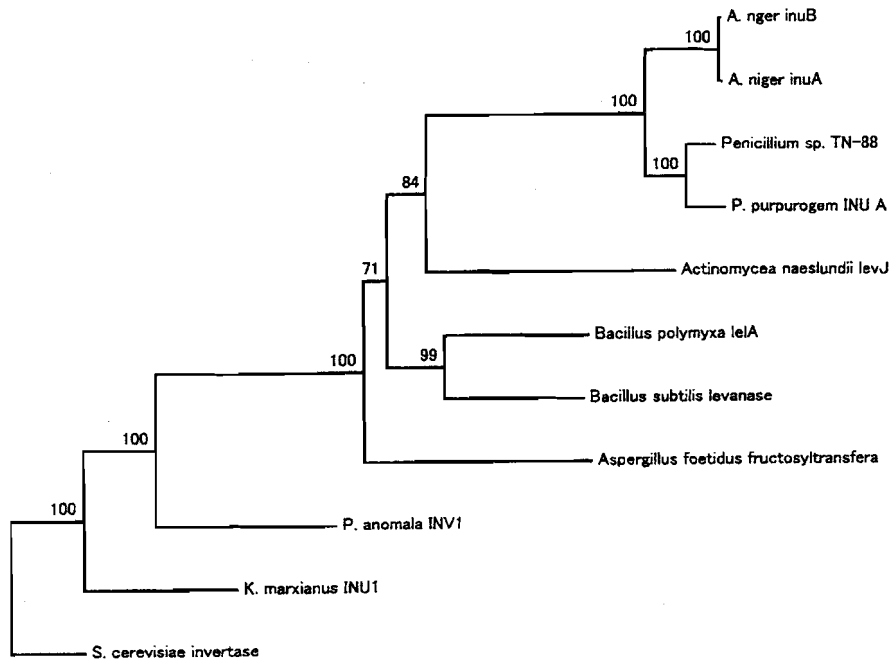


図4 エンド型イヌリナーゼと他の β -フルクトフラノシダーゼの分子系統樹

当研究室保存菌株の*A. pullulans* FERM-P4257株は高いキシラン分解活性を持つキシラナーゼを細胞外に生産する。本研究ではキシランのより効率的な利用を目的として、FERM-P4257株の生産する細胞外キシラナーゼP-IIを精製し、その酵素化学的諸性質を明らかにした。この細胞外キシラナーゼは、特に酸性領域で高いpH安定性を示し、工業的有用性が示唆された。また、現在精製中のP-Iは既報のキシラナーゼの約2倍の分子量を持つことから、新規な酵素と推察された。

5. 引用文献

- 1) C. J. Randle and W. T. J. Morgan, The determination of glucosamine and galactosamine, *Biochemical Journal*, 61, 86-589(1955).
- 2) 夜久富美子、セルラーゼの示すキトサナーゼの活性について、*Chemistry Express*, 5, 257-260(1990).
- 3) 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, Journal of Fermentation and Bioengineering, 84(4), 313-318 (1997).

- 4) S. Wirsal, A. Lachmund, G. Wildhardt, and E. Ruttkowski, Three α -amylase genes of *Aspergillus oryzae* exhibit identical intron-exon organization, Molecular Microbiology, 3(1), 3-14(1989).
- 5) D.R. Korman, F.T. Bayliss, C.C. Barnett, C.L. Carmona, K.H. Kodama, T.J. Royer, S.A. Thompson, M. Ward, L.J. Wilson, and R.M. Berka, Cloning, characterization, and expression of two α -amylase genes of *Aspergillus niger* var. *awamori*, Current Genetics, 17, 203-212 (1990).
- 6) T.B. Uhm, K.-S. Chae, D.W. Lee, H.-S. Kim, J.-P. Cassart, and J. Vandenhoute, Cloning and nucleotide sequence of the endoinulinase-encoding gene, *inu2*, from *Aspergillus ficuum*, Biotechnology Letters, 20(8), 809-812(1998).

6. 成果の発表

①研究発表

- 1) 小川喜八郎、オムマサバ、A.C., 杉村さつき、吉田直人、*Acremonium*属起源のキチナーゼの精製と性質、日本農芸化学会西日本支部大会講演要旨集、p.36(1996).
- 2) オムマサバ A. クリスピナス、杉村さつき、ナスリン ベゴマ、木場雅子、吉田直人、武部英日、小川喜八郎、*Bacillus* sp.由来キトサナーゼの精製と性質、日本農芸化学会 西日本支部・関西支部合同大会講演要旨、p.28 (1997).
- 3) 小川喜八郎、オムマサバ A. クリスピナス、吉田直人、井上順一、仮屋勲一、細菌由来新規キトサナーゼの精製と性質、日本農芸化学会誌（講演要旨集）、73、30(1999).
- 4) 小川喜八郎、宮嶋俊吉、仮屋勲一、細菌由来の新規キトサナーゼの精製と性質、第13回シンポジウム特集、日本キチン・キトサン学会、2、254-255 (1999).
- 5) Omumasaba, C. A. 吉田直人、堰口義明、仮屋勲一、小川喜八郎、*Bacillus subtilis*の生産する新規キトサナーゼによるキトオリゴ糖の生成、日本生物工学会九州支部大会（第6回）、p.25 (1999).
- 6) 太田一良、秋元秀俊、松田周作、中村豊彦、*Aspergillus niger* エンド型イヌリナーゼをコードする遺伝子は重複して存在する、日本農芸化学会西日本支部大会講演要旨、p.23 (1998).
- 7) 清田直幸、立川朋久、秋元秀俊、串間隆志、太田一良、中村豊彦、

- Penicillium* sp. TN-88株由来エンド型イヌリナーゼ遺伝子のクローニング、日本農芸化学会誌（講演要旨集）、73、26（1999）.
- 8) 秋元秀俊、串間隆志、太田一良、中村豊彦、*Aspergillus niger* エンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuA* と機能および *inuB* の上流領域のクローニングと構造解析、日本農芸化学会誌（講演要旨集）、73、26（1999）.
 - 9) 秋元秀俊、串間隆志、太田一良、中村豊彦、*Aspergillus niger* エンド型イヌリナーゼ遺伝子は重複により偽遺伝子 *inuA* と機能をもつ *inuB* へと進化した、日本農芸化学会西日本支部大会講演要旨、p. 31（1999）.
 - 10) 清田直幸、秋元秀俊、串間隆志、太田一良、中村豊彦、*Penicillium* sp. TN-88株エンド型イヌリナーゼをコードするゲノムDNAとcDNAのクローニング、日本農芸化学会西日本支部大会講演要旨、p. 32（1999）.
 - 11) 太田一良、秋元秀俊、清田直幸、串間隆志、太田一良、中村豊彦、糸状菌エンド型イヌリナーゼの一次構造と分子進化、日本農芸化学会誌（講演要旨集）、74、234（2000）.
 - 12) C. A. Omumasaba, N. Yoshida, Y. Sekiguchi, K. Kariya, and K. Ogawa, Purification and some Properties of a novel chitosanase from *Bacillus subtilis* KH1, *Journal of General and Applied Microbiology*, 46(1), 19-27(2000).
 - 13) K. Ohta, H. Akimoto, S. Matsuda, D. Toshimitsu, and T. Nakamura, Molecular cloning and sequence analysis of two endoinulinase genes from *Aspergillus niger*, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62(9), 1731-1738（1998）.
 - 14) H. Akimoto, T. Kushima, and T. Nakamura, and K. Ohta, Transcriptional analysis of two endoinulinase genes *inuA* and *inuB* in *Aspergillus niger*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(6), 599-604（1999）.
 - 15) H. Akimoto, N. Kiyota, T. Kushima, and T. Nakamura, and K. Ohta, Molecular cloning, characterization and phylogentic analysis of an endoinulinase gene from *Penicillium* sp. strain TN-88（投稿準備中）

②出願特許

- 1) 発表者 小川喜八郎、オムマサバ エー.クリスピナス、吉田直人、井上順一、仮屋勲一
- 2) 出願人 阪急バイオインダストリー（株）、協和化成（株）
- 3) 発明の名称 キトサナーゼ
- 4) 特許番号 特願平11-250711

5) 種類名 特許願

6) 出願日 平成11年9月3日

③その他

遺伝子登録(accession numbers)

A. niger inuA gene (AB012771)

A. niger inuB gene (AB012772)

関連研究

Zaita, N., Fukushige, T., Tokuda, M., Ohta, K., and Nakamura, T.,
Preparation and enzymatic properties of *Aspergillus niger*
endo-inulinase immobilized onto various polysaccharide supports,
Food Science and Technology Research, 6(1) 1-6 (2000).