

1P-061 Kitasatospora sp. MK-1785 株由来マルトトリオース生成アミラーゼの X 線結晶構造解析○掃部 正浩¹, 西村 重徳¹, 谷 修治¹, 炭谷 順一¹, 多田 俊治², 川口 剛司¹(¹阪府大院・生環科・応生科, ²阪府大院・理・生物科学)

takashi@biochem.osakafu-u.ac.jp

[背景と目的]

Kitasatospora sp. MK-1785 株由来マルトトリオース生成アミラーゼ (G3Amy) は澱粉から特異的に G3 を生成することから G3 製造に有用な酵素である。さらに本酵素は水酸基を有する化合物に対して G3 を転移する活性も有しており、G3 配糖体合成酵素としての応用が期待される。本研究では G3Amy の触媒機構の解明を目指し、触媒ドメインの立体構造を X 線結晶構造解析により明らかにした。

[方法と結果]

分泌シグナル (Met1 ~ Ala33) および触媒ドメイン (Ala34 ~ Tyr489) をコードする G3Amy 遺伝子を大腸菌で発現させ、精製後、PEG を含む沈殿剤によって結晶化を行った。この結晶を用いて X 線結晶解析を行った結果、2.4 Å の分解能で触媒ドメインの構造を決定した。

触媒ドメインは一般的な α -アミラーゼでみられる (β/α)₈-バレル構造をとり、活性部位はクレフト中に存在していた。また、触媒残基は Asp225、Glu256、Asp319 であることが推測された。さらに、アグリコン、グリコン結合サイトで特徴的な構造が確認できた。アグリコン結合サイトでは、2つの芳香族アミノ酸が向かい合うような形で存在していた。このような構造は CGTase やマルトース生成アミラーゼでもみられることから、本酵素の転移活性およびエキソ型活性に寄与している可能性が示唆された。また、グリコン結合サイトにおいては、3 個分の糖残基が入る空間しかないことが予想され、本酵素の G3 生成能に寄与している可能性が示唆された。

Crystal structure of maltotriose-forming amylase from *Kitasatospora sp. MK-1785*○Masahiro Kamon¹, Shigenori Nishimura¹, Shuji Tani¹, Jun-ichi Sumitani¹, Toshiji Tada², Takashi Kawaguchi¹(¹Dep. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., ²Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)**Key words** amylase, maltotriose**1P-063 アメフラシ β -グルコシダーゼの固定化と応用**

○馬庭 沙織, 大島 美紀, 湯浅 恵造, 辻 明彦

(徳島大院・先端技科)

tsuji@bio.tokushima-u.ac.jp

[緒論] 固定化酵素は、再利用が可能であり、また熱や変性剤、有機物質等に対する安定性の増加が示唆される等、多くの利点を持つことから、酵素の利用効率の大幅な向上やそれに伴うコストの低減が期待される。本研究では、第三世代のバイオマスとして注目されている海藻バイオマスの分解を目指し、海洋軟体動物アメフラシの保有する β -グルコシダーゼに焦点を当て、固定化による酵素利用の効率化を目的とした。

[方法] アメフラシ消化液より各種カラムクロマトグラフィーを組み合わせて、2種類 (210kDa, 110kDa) の β -グルコシダーゼを精製した。これらの β -グルコシダーゼについて様々な方法により各種担体へ固定化を行った。また作成した固定化酵素について、酵素学的性質やアメフラシが主食とする海藻であるアオサへの作用を検討した。

[結果と考察] 単離した2種類の β -グルコシダーゼは、ConA Sepharose への固定及びアルギン酸カルシウムビーズを用いた包括固定において、ほぼ完全に活性を維持したまま固定することができた。これらの固定化 β -グルコシダーゼは、5 ~ 6 回の使用後も高い酵素活性が残存しており、アルギン酸カルシウムビーズ固定化酵素では高い熱安定性も認められた。また、ConA Sepharose 固定 β -グルコシダーゼは、同時に精製したアメフラシ由来の 45kDa のエンドグルカナーゼを共に作用させることで、アオサに対して、固定化していない同酵素を用いた場合と比べ210kではほぼ同等、110kでは81%の糖化力を示した。このことより、この固定化アメフラシ β -グルコシダーゼは、アオサ糖化において有効なものであると考えられる。

immobilization and application of beta-glucosidase from Sea hare

○saori maniwa, miki ooshima, keizou yuasa, akihiko tsuji

(Grad. Sch. Adv. Technol. Sci., Univ. Tokushima)

Key words Aplysia kurodai, beta-glucosidase, immobilization**1P-062 *Arthrobacter globiformis* M30 が生産する新規ケトース 3-エピメラーゼの精製と諸性質**○小坂井 太郎¹, 吉原 明秀², グラッパリ プシュバ キラン³, 新谷 智也³, 松谷 諒³, 何森 健²(¹愛媛大院・連合農, ²香川大・希少糖研セ, ³松谷化学工業)

taro.kozakai@gmail.com

D-ブシコースの3位をエピ化し D-フルクトースを生産する酵素を生産する *Arthrobacter globiformis* に属するバクテリアを土壌から分離した。この微生物は、食品製造において使用が認められる既存添加物名簿収載リストに収載されている安全性の極めて高く、希少糖生産においても大変重要な微生物である。A. *globiformis* M30 由来のケトース 3-エピメラーゼを精製し、酵素の諸性質を調べた結果を報告する。

D-ブシコースに生育した菌体から本酵素を各種クロマトグラフィー等によって電気泳動的に単一にまで精製した。本酵素は SDS-PAGE において約 32kDa、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量測定の結果、約 120kDa であり、4つのサブユニットを持つと推測された。精製酵素の至適 pH は pH7.5 ~ 8.0、至適温度は 60°C であり、Mg²⁺ の存在下では至適温度は 70°C に上昇し、80°C でも最大の約 97% の活性を維持した。基質特異性は D-ブシコースにおいて可逆的のエピ化反応を最も強く触媒し、次に D-フルクトースに対して 44% の活性を示した。Vmax と Km はそれぞれ D-ブシコースにおいて 168U/mg, 30.1mM、D-フルクトースにおいては 68.5U/mg, 31.5mM であった。金属イオン要求性は、Mg²⁺ で最も高い活性を示し、反応時に Mg²⁺ が無い場合と比較して約 1.5 倍の活性が認められ、Mn²⁺ や Co²⁺ においても高い活性が見られた。

Purification and characterization of novel ketose-3-epimerase from *Arthrobacter globiformis* M30○Taro Kozakai¹, Akihide Yoshihara², Pushpa Kiran Gullapli³, Tomoya Shintani³, Ryo Matsutani³, Ken Izumori²(¹United. Grad. Sch. Agric. Sci., Ehime Univ., ²RSRC, Kagawa Univ., ³Matsutani Chem. Ind. Co., Ltd)**Key words** *Arthrobacter globiformis*, D-psicose-3-epimerase, rare sugar, D-psicose production**1P-064 アメフラシの海藻 alpha-グルカン分解機構**

○大島 美紀, 西山 奈見, 馬庭 沙織, 湯浅 恵造, 辻 明彦

(徳島大院・先端技科)

tsuji@bio.tokushima-u.ac.jp

[緒論] アメフラシは腹足綱に属する軟体動物で、アオサを主食とする。アオサは、全国沿岸の浅海域に分布する緑藻類で、資源量も多く、有望な海藻バイオマスである。本研究では、ユニークな性質を持つアルファ-グルコシダーゼを中心に、アメフラシのアルファ-グルカン分解システムについて解析した結果を報告する。

[方法] アメフラシ消化液から、コーンスターチ及び 4-MU-アルファ-グルコシドを基質として用い、各種クロマトグラフィーによって、2種類のアルファ-アミラーゼ (80kDa, 59kDa)、2種類のアルファ-グルコシダーゼ (76kDa, 71kDa) を精製した。アオサ分解活性は、乾燥アオサを酢酸緩衝液 (pH5.5) に懸濁し、酵素と反応後、遊離したグルコース量で測定した。

[結果と考察] アメフラシアミラーゼは、デンプンと作用させると、G3、G2、G が遊離し、グルコース遊離活性は特に 80kDa 酵素が最も高かった。アルファ-グルコシダーゼのうち、76kDa 酵素は、マルトースとマルトヘプタオースには全く作用しなかったが、71kDa 酵素はグルコースにまで分解した。アメフラシ消化液では2種類のアミラーゼと71kDa アルファ-グルコシダーゼがアオサ中のアルファ-グルカンの分解に関与していると考えられた。乾燥アオサ 20 mg を 59kDa アミラーゼと 71kDa アルファ-グルコシダーゼと反応すると、0.6-0.7mg のグルコースが得られ、同じ活性値の麹菌アミラーゼを使用した結果より2倍のグルコースが遊離した。71kDa 酵素はシュクラゼ活性も有した。以上の結果は、アメフラシ酵素は微生物酵素とは異なる性質を持ち、海藻多糖の分解に適した酵素に進化していることを示唆した。

Alpha-glucan degradation in digestive fluid of sea hare

○miki ooshima, nami nishiyama, saori maniwa, keizou yuasa, akihiko tsuji

(Grad. Sch. Adv. Technol. Sci., Univ. Tokushima)

Key words Aplysia kurodai, alpha-glucosidase