

## 醤油麹菌 *Aspergillus oryzae* が生産する キシロシダーゼ XylA の精製と諸性質

安田庄子・北本則行

醤油の色は、味、香りと共にその品質を決定する重要な因子であり、淡口醤油や愛知県特産の白醤油の製造では、特に色が重要視されている。

醤油の着色・褐変の機構について、これまでに多くの研究がなされており、その主要因は醤油諸味中の糖類とアミノ酸類との間のアミノカルボニル反応によって生成されるメラノイジン色素であることが明らかにされている。糖類の中でもペントース、特にキシロースが最も褐変しやすいことから、醤油諸味中のキシロース濃度を低下させることが醤油の着色抑制に効果的であると考えられる。

醤油諸味中のキシロースは、主に醤油麹菌が生産するキシラン分解酵素（キシラナーゼ、キシロシダーゼなど）が醤油原料に作用することによって遊離される。中でもキシロオリゴ糖からキシロースを遊離させるエキソ型の酵素キシロシダーゼの活性を低下させれば、醤油諸味中のキシロース濃度が低下することが予想され、着色抑制が期待できる。本研究では醤油麹菌が生産する主要なキシロシダーゼを精製し、その諸性質について明らかにすることを目的とした。

### 1. 実験方法

#### (1) キシロシダーゼ XylA の精製

醤油麹菌 *Aspergillus oryzae* KBN616 をXP培地（2%キシラン（カバの木由来）、1%ポリペプトン、0.5%リン酸1カリウム、0.5%塩化カリウム、0.1%硝酸ナトリウム、0.05%硫酸マグネシウム7水和物）で10日間培養した。培養液を濾過し、培養上清250mlをpH6.0の10mMリン酸カリウム緩衝液で10倍に希釈した。同緩衝液で平衡化した STREAMLINE DEAE (Pharmacia Biotech) カラム (2.6×12.0cm) にたんぱく質を吸着させた後、1.0M塩化ナトリウムを含む同緩衝液を用いて溶出させた。キシロシダーゼ活性画分を同緩衝液で10倍に希釈し、HR16/20 Fast Flow Q-Sepharose 陰イオン交換カラム (Pharmacia Biotech) に供し、0Mから0.4M塩化ナトリウムの直線勾配によって溶出させた。キシロシダーゼ活性画分を集

め、同緩衝液に対して透析を行い、HR16/20 Fast Flow Q-Sepharose 陰イオン交換カラムを用いて同様の条件でクロマトグラフィーを再度行った。活性画分を集めて10mMのpH6.8リン酸カリウム緩衝液に対して透析し、同緩衝液で平衡化した Gigapite (生化学工業) ハイドロキシアパタイトカラム (1.0×7.0cm) に供した。溶出はpH6.8リン酸カリウム緩衝液10mMから300mMの直線勾配で行った。最後にキシロシダーゼをHiload 26/60 Superdex 200-pg gelカラム (Pharmacia Biotech) で精製した。

キシロシダーゼ活性はOoiらの方法<sup>1)</sup>に従って測定した。

たんぱく質の濃度測定はMicro BCA protein assay kit (Pierce) を用いて行った。

精製キシロシダーゼXylAのSDS-PAGEはLaemmliの方法<sup>2)</sup>に従い、12.5%ゲル濃度で行った。

#### (2) キシロシダーゼ XylAの至適pHおよびpH安定性

至適pHは、精製酵素をpH3.0からpH7.0の50mM酢酸緩衝液中で40℃15分間反応させて測定した。pH安定性は、pH3.0からpH7.0の50mM酢酸緩衝液中で30℃20時間インキュベートした後、至適pHで40℃15分間反応させて測定した。

#### (3) キシロシダーゼ XylAの至適温度および温度安定性

至適温度は、精製酵素を至適pHの50mM酢酸緩衝液中で35℃から65℃まで5℃刻みの温度で15分間反応させて測定した。熱安定性は35℃から65℃までの温度で15分間インキュベートした後水冷し、40℃15分間反応させて測定した。

#### (4) キシロシダーゼXylAに対する塩化ナトリウム濃度の影響

塩化ナトリウム濃度が0%から20%になるように調製した至適pHの50mM酢酸緩衝液中で、精製酵素を40℃15分間反応させて測定した。また、塩化ナトリウム15%での酵素の安定性を見るために、同緩衝液中で30℃0日、1日、2日、3日、9日インキュベート後の活性を40℃15

表1 *Aspergillus oryzae* KBN616 が生産するキシロシダーゼ XylA の精製

精製過程	全活性(*U)	全たんぱく質(mg)	比活性(U/mg)	収率(%)	精製倍率(fold)
培養上清	419	365.8	1.1	100	1.0
STREAMLINE DEAE	358	87.6	4.1	86	3.6
Q-Sepharose FF 1回目	262	36.7	7.2	63	6.3
Q-Sepharose FF 2回目	154	15.9	9.7	37	8.5
Gigapite	87	1.1	78.9	21	69.2
Superdex 200-pg	46	0.6	76.0	11	65.7

\*1分間に1 molのp-nitrophenolを遊離する酵素量を1unitとした

分間反応させて測定した。

(5) キシロシダーゼ XylA の基質特異性

$\alpha$ -ガラクトシダーゼ,  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ,  $\alpha$ -L-アラビノピラノシダーゼ,  $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼ,  $\beta$ -ガラクトシダーゼ,  $\beta$ -グルコシダーゼ,  $\beta$ -マンノシダーゼ活性はp-nitrophenyl基質を用い, Margolles-Clarkらの方法<sup>3)</sup>に従って測定した。

(6) N末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列の決定

精製たんぱく質をPVDF膜(Bio-Rad)にプロットした後, Applied Biosystems 477A-120AシークエンサーでN末端アミノ酸配列を決定した。また精製たんぱく質をV8プロテアーゼで部分消化し, 生じたペプチドをSDS-PAGEで分離した。3つの主なペプチドP1, P2, P3について同様にN末端アミノ酸配列を決定した。

## 2. 実験結果及び考察

醤油麹菌*Aspergillus oryzae* KBN616は培養液中に少なくとも3種類のキシロシダーゼを分泌生産するが, そのうちの主要なキシロシダーゼXylAを精製することができた。表1に示すように, 比活性76.0U/mgの精製XylAが0.6mg得られ, 活性回収率は11.0%, 精製倍率は65.7倍であった。図1のように, 精製XylAはSDS-PAGEで分子量110kDaの単一たんぱく質バンドを示した。この110kDaという分子量は, 報告されている他の*Aspergillus*属のキシロシダーゼと類似していた(90kDa~122kDa<sup>1), 9)~10)</sup>。

XylAの諸性質について調べた結果を表2にまとめた。XylAの至適pHは4.0, 至適温度は60℃であった。XylAはpH3.0から7.0の広い範囲で安定であり, 温度は45℃まで安定で, これを越えると徐々に失活した。pH安定性に関しては, *Aspergillus aculeatus*由来のキシロシダーゼと類似していた<sup>1)</sup>。

XylA反応液中の塩化ナトリウム濃度を0%から20%に増加させても80%以上のキシロシダーゼ活性を示した。また15%塩化ナトリウムを含む緩衝液中でXylAを30℃9日間インキュベートした後も, 初めの活性の80%を保持していた。

以上のことよりpH, 温度, 塩化ナトリウム濃度の観点

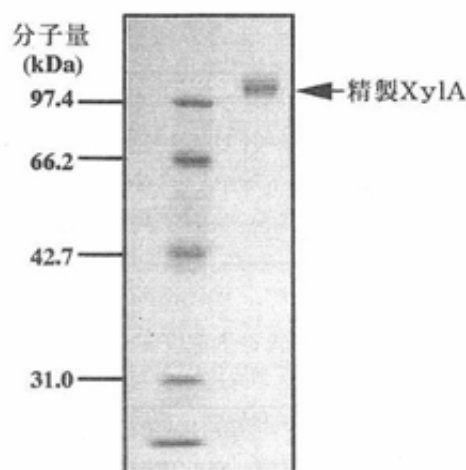


図1 精製キシロシダーゼ XylA の SDS-PAGE

表2 キシロシダーゼ XylA の諸性質

	XylA	*Xyl-1	Xyl-2	Xyl-3
分子量(kDa)	110	73	75	93
至適pH	4.0	> 4.5	> 4.5	> 4.5
pH安定性	3.0-7.0	4.5-5.5	5.0-5.5	4.5-5.5
至適温度(℃)	60	75	75	55
熱安定性(℃)	< 45	< 70	< 65	< 50
NaCl 15% での活性(%)	85	55	65	135

\*Xyl-1 ~ 3 は醤油麹から抽出・精製されたキシロシダーゼ<sup>1)</sup>

から, XylAは醤油諸味中でも十分にキシロシダーゼ活性を保持していると推測される。

Hashimotoら<sup>1)</sup>によって醤油麹から抽出・精製されたXyl-1, Xyl-2, Xyl-3の諸性質を表2右に示したが, 類似したものはなかった。これらについてはアミノ酸配列についての情報がなく, 後に述べるXylAの部分アミノ酸配列と比較ができないため同一遺伝子産物が含まれるかどうかは不明である。

XylAのp-nitrophenyl基質に対する加水分解活性を測定したところ, キシロシダーゼ活性以外にも明らかに $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ活性,  $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼ活性を示した。このような基質特異性に関する

表3 精製 XylA の *p*-nitrophenyl 基質に対する比活性

<i>p</i> -Nitrophenyl 基質	比活性 (U/mg)
βXylNp	76.0
αGalNp	0.2
αArafNp	8.8
αArapNp	21.2
βArapNp	0.2
βGalNp	0.0
βGluNp	0.8
βManNp	0.0

βXylNp, *p*-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside; αGalNp, *p*-nitrophenyl-α-galactopyranoside; αArafNp, *p*-nitrophenyl-α-L-arabinofuranoside; αArapNp, *p*-nitrophenyl-α-L-arabinopyranoside; βArapNp, *p*-nitrophenyl-β-L-arabinopyranoside; βGalNp, *p*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside; βGluNp, *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside; βManNp, *p*-nitrophenyl-β-D-mannopyranoside.

表4 XylA の内部アミノ酸配列

ペプチド	N 末端アミノ酸配列
P1	SFHDQEVSRQDL
P2	ADLIIFAGGIDNTLETEAQD
P3	FGHGLFYT

曖昧さは *Aspergillus niger* や *Trichoderma reesei* 由来のキシロシダーゼにも見られる<sup>3)・6)</sup>。

精製 XylA の N 末端アミノ酸は決定できなかったため、ブロックされていると考えられた。そこで内部アミノ酸配列を調べるために XylA をプロテアーゼで部分分解し、得られた 3 つのペプチドについてシーケンスしたところ、表 4 のように決定された。ホモロジー検索を行った結果、*Aspergillus niger* の XlnD、*Trichoderma reesei* の BxII と高い相同性を示した。

以上のように、本研究では醤油麹菌が生産するキシロシダーゼ XylA の諸性質について明らかにした。この情報をもとに今後遺伝子発現制御技術を用いることにより、XylA および醤油麹菌が生産する他のキシラン分解酵素が醤油の褐変化に及ぼす影響について検討しようと考えている。

### 3. 要約

醤油麹菌が生産する主要なキシロシダーゼ XylA を精製した。分子量 110kDa、至適 pH は 4.0、至適温度は 60℃ であった。XylA は pH 3.0-7.0、温度は 45℃ までと広い範囲で安定で、醤油諸味中とほぼ等しい塩化ナトリウム濃度 15% においても高い安定性を示した。XylA はキシロシダーゼ活性の他に α-L-アラビノフラノシダーゼ活性、β-L-アラビノピラノシダーゼ活性を有することが明らかになった。XylA の内部アミノ酸配列を 3 カ所決定し、ホモ

ロジー検索の結果、他のカビのキシロシダーゼと高い相同性を示した。

### 文 献

- Ooi, T., H. Fujimoto, S.-L. Wang, T. Takizawa, H. Hidaka, S. Ogura, S. Murao, and M. Arai : *Oyo Toshitsu Kagaku*, **42**, 45 (1995).
- U.K. Laemmli : *Nature*, **227**, 680 (1970).
- Margolles-Clark, E., M. Tenkanen, T. Nakari-Setälä, and M. Penttilä : *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3840 (1996).
- Kitprechavanch, V., M. Hayashi, and S. Nagai : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1703 (1986).
- Kurakake, M., S. Osawa, and T. Komaki : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 2010 (1997).
- van Peji, N. N. M. E., J. Brinkmann, M. Vrsanká, J. Visser, and L. H. de Graaff : *Eur. J. Biochem.*, **245**, 16 (1998).
- Hashimoto, T., M. Morishita, K. Iwashita, H. Shimoi, Y. Nakata, Y. Tsuji and K. Ito : *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 479 (1999).