

## 発酵糸状菌の酵素

### Enzymes of filamentous fungi in fermentation

柏 木 豊

独立行政法人 食品総合研究所 応用微生物部 糸状菌研究室

#### はじめに

我が国の伝統的発酵食品の製造には、糸状菌、酵母、細菌が利用されている。なかでも、代表的醸造食品である味噌、醤油、日本酒は、麹菌 (*Aspergillus oryzae*) が分泌生産する酵素を発酵熟成工程に利用したものである。我が国の醸造発酵産業における糸状菌酵素の利用技術は主として麹菌が分泌生産する多種類の酵素群を巧みに利用するところから始まっている。

発酵糸状菌の中でも麹菌は「酵素の宝庫」といわれるように多種類の酵素を生産し、麹菌酵素のなかには、現在知られている酵素のほとんどの種類が含まれていると推測されている。麹菌の酵素剤であるタカジアスターゼは、明治時代に高峰譲吉によって米国にて開発され、酵素の工業的生産の先駆けとなったものである。現在でも消化酵素剤として医薬品原料などに用いられている。

本稿では、食品関連糸状菌の中心である麹菌が生産する酵素、特にアミラーゼ、セルラーゼ、プロテアーゼについて解説した。さらに、酵素活性の測定法、酵素生産微生物の検出、分離法についても簡単にまとめた。発酵糸状菌だけでなく、自然界に存在する微生物は酵素生産性や環境適応性において多様性を持つものであり、これまで知られていない有用な機能をもつ可能性が高い。遺伝子工学、分子生物学的技術の進展によって、有用微生物、酵素の開発が発展している現在においても、自然界に存在する微生物がその進化過程において獲得した酵素には人為的作出が及ばない高い機能を有するものがあり、自然界からの微生物、酵素の検索が現在でも重要な意味を持っていると考えられる。

本稿には糸状菌酵素の特徴、活性測定手法について簡単にまとめたが、遺伝子保存施設等に保持されている糸状菌をはじめとする微生物において、有用酵素、遺伝子等の探索の役に立てば望外の幸いである。

#### 1. 糖質加水分解酵素

##### 1) デンプン加水分解酵素

###### (1) 特徴

醸造麹菌は他種類の酵素を分泌生産するが、酒造工程ではデンプン分解酵素が主要な役割を担っている。ここでは、主要な酵素であるアミラーゼについて特徴と活性測定法を紹介する。

アミラーゼはデンプンを加水分解する酵素である。一般には $\alpha$ -アミラーゼ (EC 3.2.1.1.)、 $\beta$ -アミラーゼ (EC 3.2.1.2.)、エキソ-1,4- $\alpha$ -グルコシダーゼ (グルコアミラーゼ) (EC 3.2.1.3.)、 $\alpha$ -グルコシダーゼ (マルターゼ) (EC 3.2.1.20) がよく知られているが、デンプンの $\alpha$ -1,6 グルコシル結合のみを加水分解するイソアミラーゼ (EC 3.2.1.68)、デンプンの $\alpha$ -1,6 グルコシル結合に隣接する $\alpha$ -1,4 結合を加水分解するイソプルラナーゼ (EC 3.2.1.57) や特定のオリゴ糖を特異的に生成する酵素マルトトリオース生成アミラーゼ、マルトテトラオース生成アミラーゼ、マルトペンタオース生成アミラーゼ、マルトヘキサオース生成アミラーゼ等の存在が知られている。

以下に代表的アミラーゼのデンプンに対する作用の模式図を示した (図 1)。

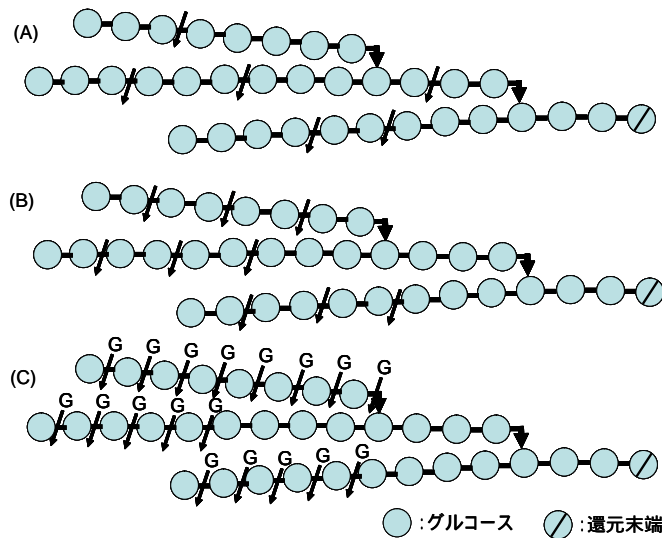


図1 代表的なアミラーゼのデンプン分解様式の模式図  
 (A)  $\alpha$ -アミラーゼ、(B)  $\beta$ -アミラーゼ、(C) グルコアミラーゼ

$\alpha$ -アミラーゼは、デンプン分子の  $\alpha$ -1,4 グルコシド結合をランダムに加水分解し、各種のマルトオリゴ糖を生成する。デンプン分子をランダムに分解することによりデンプン溶液の粘度を急激に低下させる働きを持つものである。この酵素は、日本酒醸造の米麹において麹菌が大量に分泌生産するものであり、蒸米のデンプンをデキストリン、オリゴ糖にまで加水分解し、酵母によるアルコール発酵の原料を供給する役割を担っている。自然界では麹菌だけではなく動植物から微生物まで多くの生物がこの酵素を持っている。工業的にも多くの工程で利用されており、例えば異性化糖工業のデンプン液化工程、綿織物、染め物工業におけるデンプン糊料分解除去、家畜飼料の飼料効率改善のための添加酵素剤などの多くの用途に用いられている。

$\beta$ -アミラーゼは、デンプン分子の非還元末端より、マルトース単位で加水分解を行う酵素である。この酵素は、大麦麦芽、さつまいも、大豆など植物由来のものが良く知られており、工業利用や酵素研究に供されているが、*Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium* 等の微生物からも特徴のある酵素が発見され、工業的に特に良く利用されている。しかしながら、発酵系状菌である麹菌はこの酵素を持っていない。 $\beta$ -アミラーゼは、麦芽水飴製造やマルトース製造等の食品工業での利用が進んでおり、特に微生物由来の酵素は耐熱性が高いため工業利用が盛んに行われている。

グルコアミラーゼは、デンプン分子の非還元末端からグルコース単位で加水分解を行う酵素である。この酵素は、主に糸状菌から発見されており、発酵系状菌である麹菌はグルコアミラーゼを大量に分泌生産することが知られている。この酵素は、 $\alpha$ -アミラーゼや  $\beta$ -アミラーゼとは違って、デンプンの  $\alpha$ -1,4 グルコシド結合のみならず  $\alpha$ -1,6 グルコシド結合も加水分解することができる。このため、日本酒醸造の諸味中でデンプンを完全にグルコースまでに分解し、アルコール発酵効率を高めるために重要な役割を担っている。

発酵系状菌は、アミラーゼ群の酵素を菌体外に良く分泌生産し、中でも麹菌は  $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼを主な分泌酵素としてよく生産する。麹菌は、アミラーゼの生産性が高いために日本酒醸造工程に麹として伝統的に用いられてきた。また、種麹メーカーによる品種改良や選抜育種によって、さらに酵素生産性の高い菌株が造成されている。

$\alpha$ -アミラーゼは、デンプンの  $\alpha$ -1,4 グルコシド結合をランダムに加水分解する酵素であり、endo型アミラーゼである。デンプンの  $\alpha$ -1,6 グルコシド結合は加水分解できないため、最終生成物として  $\alpha$ -限界デキストリンとマルトオリゴ糖を生成する。麹菌の  $\alpha$ -アミラーゼはTaka-amylase Aとよばれ、麹菌酵素の主要な成分である。この酵素は、工業利用のみならず、酵素化学、生物科学の研究分野では、我が国において、はじめて蛋白質の結晶構造解析が完成するなど、酵素研究の基盤となったものである。1951年に赤堀四郎らによって酵素の結晶化が行われ<sup>1)</sup>、1970年代には、我が国が世界に先駆けてX線結晶構造解析によってその立体構造を完全に解明した<sup>2)</sup>(図2)。本酵素は、分子量 53,662 のシングルペプチドであり、一酵素分子あたり一個の  $\text{Ca}^{2+}$  を保持している。 $\text{Ca}^{2+}$  は酵素の安定性に重要であり、除去すると酵素は不安定となり失活する。

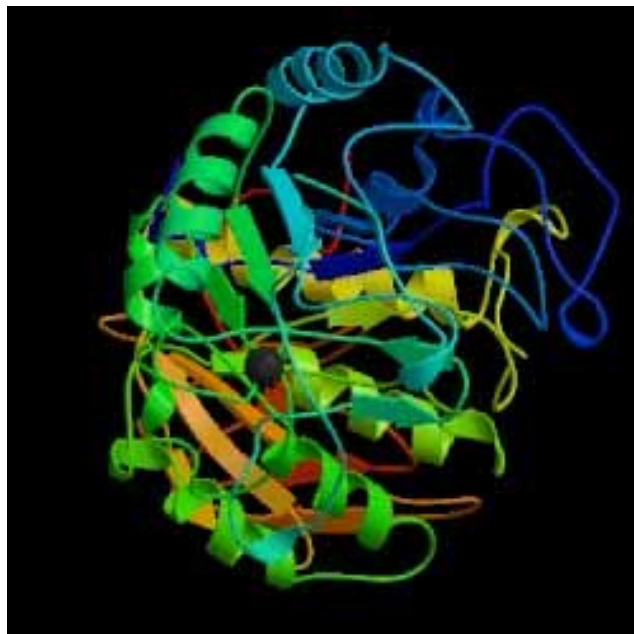


図2 X線結晶構造解析による Taka-amylase A の立体構造モデル  
PDBID: 2TAA, <http://www.rcsb.org/pdb/>

グルコアミラーゼは、デンプン分子の非還元末端から、グルコース単位で単糖を遊離する酵素であり、exo型アミラーゼである。この酵素は、 $\alpha$ -1,6 グルコシド結合をも加水分解するため、最終生成物はグルコースのみとなる。日本酒醸造においては、グルコースが酵母によるアルコール発酵の原料であることから、米デンプンをグルコースまで加水分解するグルコアミラーゼは最も重要な酵素である。

## (2) 酵素活性の測定

アミラーゼ活性の測定では、デンプンを基質として酵素反応後の還元力の増加を定量する方法が、よく用いられる。還元糖生成を測定する方法は、基質デンプンの糖鎖が加水分解されることによって生成する還元力を定量するため、 $\alpha$ -アミラーゼのような endo 型酵素、 $\beta$  アミラーゼ、グルコアミラーゼなどの exo 型酵素の別なく、デンプン加水分解酵素の活性を包括的に測定できる利点を持ち、微生物酵素活性の検索に適した方法である。還元糖の測定方法には、数多くの定量法が考案されているが、ここでは糖による銅イオンの還元を用いた Somogy-Nelson 法を紹介する。培養から得た粗酵素、精製酵素のいずれにも適応できるが、酵素液量、試薬使用量の低減化のため、セミマイクロスケールの液量にて反応を行っている。用いる試薬には、銅、ヒ素、モリブデン等の重金属が含まれており、有害実験廃液の低減化のためにもできるだけ小スケールの分析法を用いるのが望ましい。

基質：可溶性デンプン（市販）

適当な緩衝液にて 1%可溶性デンプン溶液を調製後、沸騰湯浴中にて加熱し完全に溶解する。ほぼ透明な水溶液となる。

試薬：Somogy 銅試薬（和光純薬）、Nelson 試薬（和光純薬）

操作：

ガラス製試験管（ビダール管、径 12mm）に基質可溶性デンプン液 200  $\mu$ L をとり、これに粗酵素液 50  $\mu$ L を加えて、適温にて酵素反応を行う。一定時間経過後、反応液に Somogy 銅試薬 250  $\mu$ L を加え混合して反応を停止する。直ちに、ガラス球にて試験管にふたをして沸騰湯浴中にて 20 分間煮沸し、煮沸終了後急速に水道水にて冷却する。冷却後、Nelson 試薬 500  $\mu$ L を注入して還元銅沈殿を溶解し発色させ、30 分静置した後 2.5 mL の蒸留水を加え、500 nm の吸光度を測定する（図 3）。

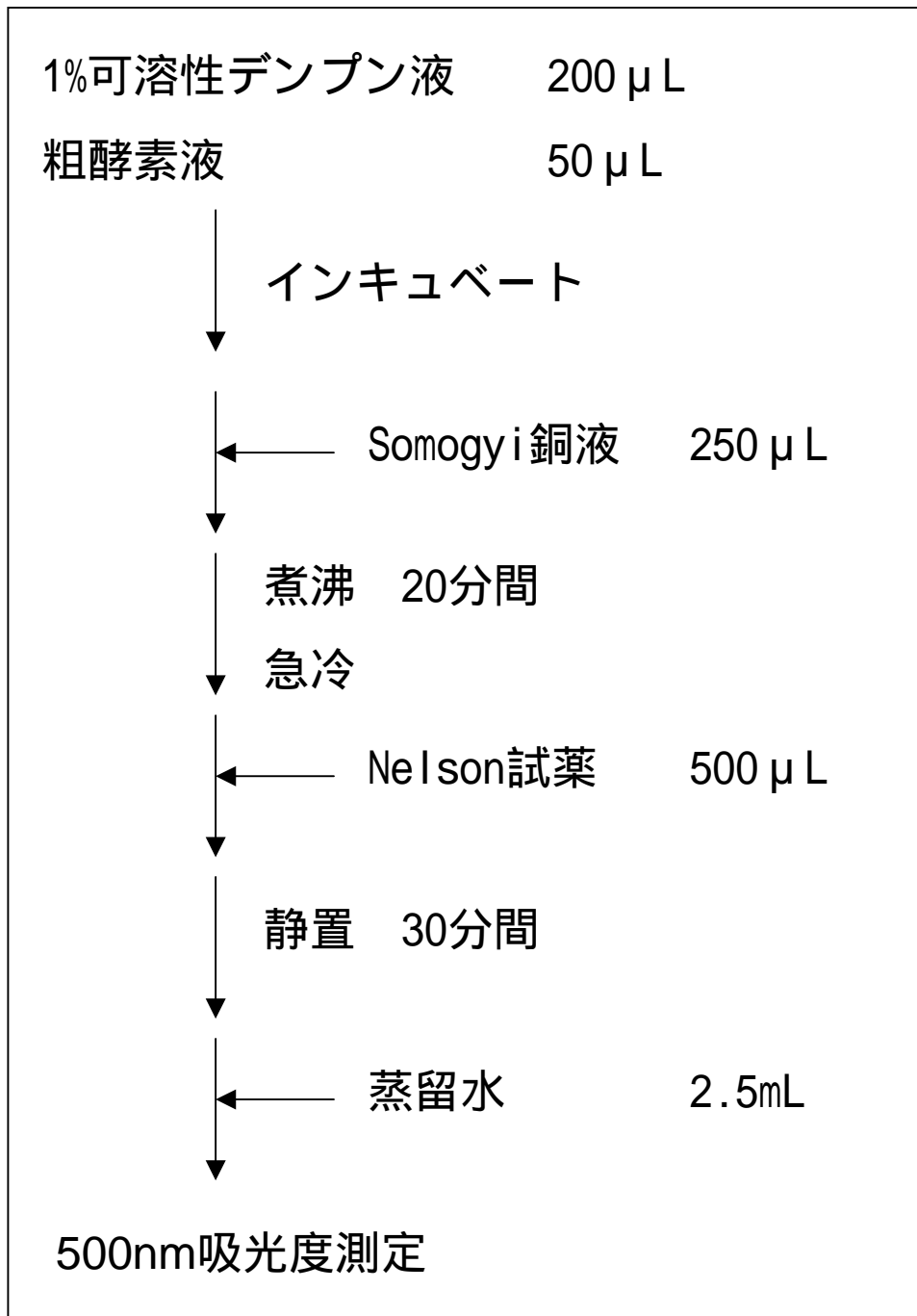


図3 Somogy-Nelson法によるアミラーゼ活性の測定の概要

## 2) セルラーゼ

### (1) 特徴

セルラーゼは、一般にセルロースを加水分解する酵素の総称であり、代表的酵素としてセルラーゼ(EC 3.2.1.4)、セルロース 1,4-β-セロビオシターゼ (EC 3.2.1.91)、β-グルコシダーゼ (EC 3.2.1.21) が知られている。

発酵系状菌では、焼酎用麹菌である *Aspergillus awamori*, *Aspergillus usami* 等が菌体外にセルラーゼを分泌する。*Aspergillus oryzae* も生産能を有しているが分泌量は少ない。一般に醸造工程において、セルラーゼが利用される場面は少ないが、後述のように農産廃棄物等の植物性バイオマスを分解低減化するには、セルラーゼ系酵素は重要なものであり、今後一層促進が望まれている環境負荷低減化、エネルギー循環系社会構築等のためには、酵素の工業的利用と相まって期待が高まるものである。

セルロースはグルコースが $\beta$ -1,4 グルコシド結合により高度に重合したグルコースポリマーであり、すべての植物の細胞壁構成成分として存在し、地球上で最も多く生産されている多糖である。植物は太陽光をエネルギー源として大気中の二酸化炭素を炭酸同化作用によって固定し、毎年膨大な量のバイオマスを生産している。そのうちセルロースは全地球上で毎年 400 億トン以上にも達すると推定されている<sup>3)</sup>。セルロースは成分こそグルコースの単一構成であるが、起源によって重合度などが多様であり、その性質によって各種の用途に使用されている。すなわち、綿や麻などのセルロース繊維は織布として、木材セルロースは紙パルプ産業の原料として重要である。また、化学処理によってレーヨン、キュブラ、アセテートなどの再生繊維、カルボキシメチルセルロースなどの粘性を有する工業原料、硝酸セルロースはプラスチック、フィルム、爆薬などとして多くの用途が開発されている。

しかし、農業生産の副産物として生じるセルロース系物質は一般的に廃棄物として取り扱われている。同じく植物が生産するグルコースポリマーである澱粉が、穀物や根茎などの農産物として生産され、食糧や食品原料としてきわめて重要に位置づけられるのに対して、澱粉と同時に農業生産により生ずるセルロース系産物はほとんど利用されず、大部分が農産廃棄物として焼却されるか、あるいは堆肥などとして土壌に還元されているのみで、利用率が非常に低いのが現状である。

そこで、イナワラ、モミガラ、木材チップなどの農産廃棄物のセルロース系物質を加水分解し、構成成分であるグルコースにまで変換できれば、これを発酵原料とするエタノール生産、あるいは直接食品原料としての利用が可能となり、将来懸念されるエネルギー循環や食糧不足への対応策となると考えられる。

セルロースは綿花、木材などの植物細胞壁の主成分であるが、糸状菌細胞壁、細菌や海産動物の構成成分としての存在も知られている<sup>4)</sup>。植物のセルロース成分はキシランなどのヘミセルロース、ペクチン質やリグニンと複雑に結合した状態で細胞壁を構成している。たとえば木材の細胞壁は、細胞の一番外側に一次細胞壁、その内側に二次細胞壁のS1、S2、S3層が層状になっている。それぞれの層ではセルロース繊維が配向したり、比較的ランダムな方向性で他の成分と結合している。これら植物細胞壁では、セルロースの構成割合は植物の種類や組織によって異なり、たとえば稲藁では 35%程度、木材では 40~50%、綿では 90%程度の値を示す<sup>5)</sup>。また、細菌 *Acetobacter xylinum* が菌体外に生産するセルロースは植物細胞壁のものとは異なり、ヘミセルロース、リグニン成分がほとんど存在しないため、ほぼ純粋なセルロースである。

セルロース分子はグルコースが $\beta$ -1,4 グルコシド結合のみにより連続した直鎖状高分子である。グルコースの重合度はセルロースの起源によって異なるが、木材では 6,000~10,000、綿では 8,000~10,000、藻類の一種 *Valonia* のものは 44,000 程度である<sup>6)</sup>。また、セルロース分子を構成する個々のD-グルコピラノース環は 180° づつ反転して連なり、同一セルロース分子鎖の隣り合うグルコース残基においてC3-OHとピラノース環のO、C6-OHとC2-OH間で水素結合を形成しているため、セルロース分子鎖は平たいリボンのような形状をとる。さらに隣接するセルロース分子鎖同士も分子間における水素結合を形成し、36本の分子鎖が束になって直径およそ 3.5 nmのマイクロフィブリルと呼ばれる非常に強固な基本繊維を形成している<sup>7)</sup>。分子内および分子間の水素結合を形成しているセルロース繊維は結晶構造をとっていることが、X線回折による測定から明らかにされている。しかし、セルロース繊維は全体にわたって結晶構造をとっているのではなく、結晶領域のなかに部分的に非結晶領域が混在しており、X線回折の観測から結晶領域の割合が結晶化度として表されている。セルロース繊維の結晶化度は、木材パルプセルロースで 65%、綿セルロースで 70%程度である<sup>8)</sup>。

一般に、セルロース繊維は強固な結晶構造をとる領域が多いため、その結晶構造部分を破壊しないと、酵素的あるいは非酵素的加水分解によってグルコースにまで経済的に糖化するのには容易ではなく、効率的で高度な技術は未だ確立されていない。自然界においてセルロースは主として微生物の働きで分解される。これまでに細菌から糸状菌にわたる多くの微生物がセルロース分解酵素を生産することが知られている(表1)。セルロース分解性微生物は土壌や草食動物の消化管などに生息し、植物体の細胞壁などのセルロースを分解している。これらの微生物は菌体外に複数のセルロース分解酵素成分を生産し、セルロースは作用機構の異なる複数の酵素成分の協同作用によって分解される(図4)。

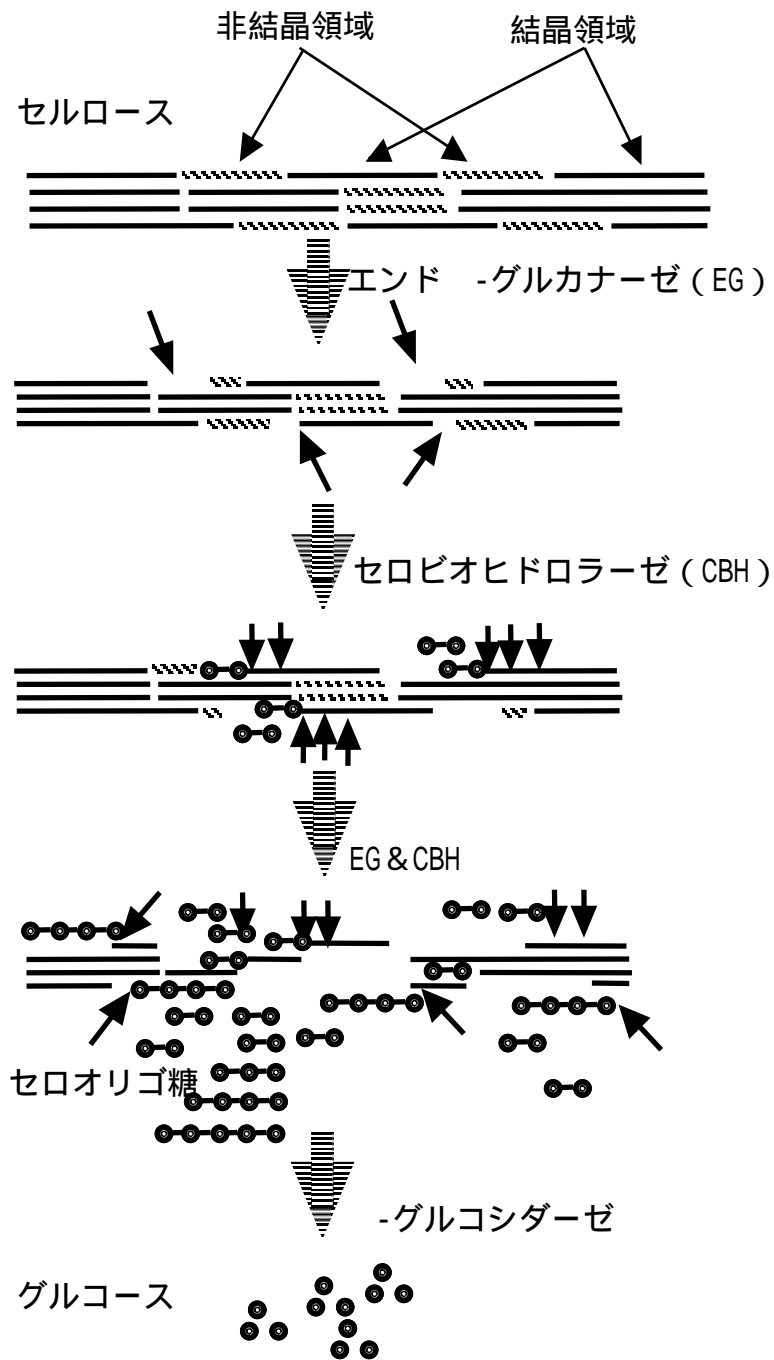


図4 セルラーゼの共同作用によるセルロース分解の模式図

表1 主なセルロース分解酵素生産菌

起源	
細菌	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
	<i>Cellulomonas fimi</i>
	<i>Cellulomonas uda</i>
	<i>Cellvibrio gilvus</i>
	<i>Clostridium thermocellum</i>
	<i>Pseudomonas fluorescense</i>
	<i>Ruminococcus albus</i>
放線菌	<i>Streptomyces lividans</i>
	<i>Thermomonospora curvata</i>
	<i>Thermomonospora fusca</i>
糸状菌	<i>Aspergillus aculeatus</i>
	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Aspergillus oryzae</i>
	<i>Chaetomium cellulolyticum</i>
	<i>Humicola insolens</i>
	<i>Irpex lacteus</i>
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
	<i>Penicillium purpurogenum</i>
	<i>Schizophyllum commune</i>
	<i>Sporotrichum thermophile</i>
	<i>Trichoderma reesei</i>
	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Trichoderma koninngi</i>	

現在，国際生化学・分子生物学連合酵素委員会報告<sup>9)</sup>では，セルロース分解酵素はグリコシダーゼ群の中のO-グリコシル結合を加水分解する酵素としてEC 3.2.1.X の番号が与えられており，セルラーゼ (EC 3.2.1.4)、β-グルコシダーゼ (EC3.2.1.21)、グルカン 1,4-β-グルコシダーゼ (EC 3.2.1.74)、セルロース 1,4-β-セロビオシダーゼ (EC 3.2.1.91) 4種類の酵素が認められている。

セルラーゼ (EC 3.2.1.4) はエンド型の作用形式でセルロース鎖を加水分解し，グルコース，セロビオース，およびセロオリゴ糖を生ずる酵素である。酵素によってセルロース鎖に対する作用のランダム度が異なり，グルコースから鎖長の長いセロデキストリンまで様々な反応生成物が生じる。この酵素は，セルロース鎖のグルコース残基のところどころにカルボキシメチル基を導入し可溶化した誘導体であるカルボキシメチルセルロース (CMC) などの非結晶性の基質をよく加水分解するが，綿繊維などの結晶性セルロースにはほとんど作用しないことが知られている。この酵素は CMC によく作用することからカルボキシメチルセルラーゼ (CMC アーゼ) と呼ばれたり，エンド-1,4-β-グルカナーゼ，エンドセルラーゼなどとも呼ばれている。

一方，セルロースをエキソ形式で加水分解する酵素はグルカン 1,4-β-グルコシダーゼ (EC 3.2.1.74) およびセルロース 1,4-β-セロビオシダーゼ (EC 3.2.1.91) である。これらの酵素はセルロース鎖を末端から加水分解しグルコースまたはセロビオースを特異的に遊離する酵素である。中でも，セルロース 1,4-β-セロビオシダーゼは代表的なエキソ型酵素であり，セルロース鎖の非還元末端からセロビオースを遊離する。現在のところ，この酵素は綿繊維やアビセルなどの結晶性セルロースに作用するが CMC などの非結晶性セルロースにはほとんど作用しないことが知られている。このためアビセラゼ，エキソセルラーゼとも呼ばれている。

β-グルコシダーゼ (EC 3.2.1.21) は，エンド-1,4-β-グルカナーゼおよびセルロース 1,4-β-セロビオシダーゼがセルロースから生成した短鎖長のセロオリゴ糖，セロビオースおよびβ-グルコシドに作用し非還元末端から

グルコースを遊離する酵素である。一般に基質オリゴ糖の鎖長が短いほどよく加水分解する特徴を持ち、セロビオースを特によく加水分解するものはセロビアーゼと呼ばれる。酵素によっては配糖体であるアリールβ-グルコシドをよく加水分解するものもある。セルロース分解酵素には、同じ加水分解形式でも基質特異性や生成物の異なる酵素が多数存在し、それらの名称は厳密には統一されているとはいえない。セルロース分解酵素系の名称の不統一は、自然界から多様な酵素が発見されていることが原因の一つともいえる。

セルロース分解酵素の研究は、古くは1906年頃にカタツムリの消化管の液を木綿に作用させたのが最初のものであるとされる。本格的な酵素化学的研究は、1950年にReeseら<sup>10)</sup>によって提案されたC1-Cx酵素説により、研究者の注目を集めてからのことである。C1-Cx説は、天然セルロースは先ずC1酵素によって断片化し、さらにCx酵素とβ-グルコシダーゼによりグルコースまで分解されるという、複数酵素の協同作用によるものである。その後、Woodら<sup>11)</sup>は*Trichoderma koningii*の培養濾液からC1酵素に相当する成分を精製し、これがエキソ型セルラーゼであることを示し1,4-β-D-グルカンセロビオヒドロラーゼ(CBH)と命名した。同時期に結晶性セルロースであるアビセルに対してよく作用する酵素が*Trichoderma viride*の酵素製剤中より発見されアビセラゼと命名されたが、その生成物はほとんどセロビオースであることからCBHと同じものであると考えられた<sup>12)</sup>。その後、*T. viride*由来の酵素製剤からエンドβ-グルカナーゼ<sup>13-15)</sup>、CBH<sup>15,16)</sup>、β-グルコシダーゼ<sup>15,17)</sup>が精製されそれぞれ酵素化学的性質が明らかにされた。種々の酵素の酵素化学的研究が進むにつれ、現在ではまぎらわしいのでC1酵素およびCx酵素という名称はほとんど使われていない。

Okadaらはメイセラゼ(*T. viride*由来の酵素製剤)に含まれるセルロース分解酵素成分の分画法を確立し<sup>18)</sup>、12個のエンド型セルラーゼと1個のβ-グルコシダーゼの計13個におよぶ酵素を蛋白的に精製しその性質を詳細に検討した<sup>19-21)</sup>。その中で、従来セロビオヒドロラーゼとされていた酵素がセロビオース以外にわずかのグルコースを常に生成する現象を解析し、この酵素がセロビオースを基質として転移反応を起こした結果生じたセロテトラオースを加水分解してグルコースを生成することを明らかにした。彼等はセロビオヒドロラーゼはエキソ型の酵素ではないと結論している。

さらにMuraoらは新規のセルラーゼ高生産菌*Aspergillus aculeatus*<sup>22)</sup>を分離し、そのセルロース分解酵素系に属する9個の酵素を精製し、*Aspergillus*属糸状菌では初めてアビセラゼの存在を明らかにした<sup>5)</sup>。また、一般に確認されていないが、*A. aculeatus*のセルロース分解酵素系からは、セルロース鎖の還元末端からもセロビオースを生成する酵素の存在が示される<sup>5)</sup>など、既知の酵素のいずれとも異なるものが見つかっており、今後セルロース分解酵素の分類には新しい発見がなされるものと考えられる。

表2 セルラーゼ研究の流れ

1906	Seillère	カタツムリ消化液による木綿の分解
1912	Pringsheim	セルロース分解の段階的機序の想定
1950	Reese	セルラーゼ C1-Cx 酵素説
1951	Siu	hydrogen bondase 仮説
1953	Whitaker	セルラーゼ単一酵素説
1953	Marsh	セルロース膨潤因子仮説
1968	Okada ら	<i>Trichoderma viride</i> のエンドセルラーゼの単離
1972	Wood ら	<i>Trichoderma koningii</i> のエキソセロビオヒドロラーゼの単離
1979	Wood	セルラーゼのエンド-エキソ酵素説
1980	Kanda ら	<i>Irpex lacteus</i> セルラーゼ系酵素の系統的精製
1983	Shoemaker	<i>Trichoderma reesei</i> セロビオヒドロラーゼ遺伝子のクローニング
1983	Béguin ら	<i>Clostridium thermocellum</i> のエンドグルカナーゼ遺伝子のクローニング
1983	Lamed ら	<i>C. thermocellum</i> セルロソームの発見
1987	Murao ら	<i>Aspergillus aculeatus</i> セルラーゼ系酵素の系統的精製
1988	Okada ら	<i>T. viride</i> セルラーゼ系酵素の系統的精製



細菌のセルロース分解酵素系では、好熱嫌気性菌 *Clostridium thermocellum* の酵素系について系統的な研究がなされている<sup>23)</sup>。天然セルロースの分解には複数の酵素が協同的に作用しており、*C. thermocellum*のセルロース分解酵素系は作用の異なる複数の酵素が菌体外において複合体セルロソームを形成し、酵素複合体によって効率的にセルロース分解を行っていると考えられている<sup>24)</sup>。

近年では、セルロース分解酵素の構造 - 機能相関について分子生物学的研究が盛んに行われるようになり、麹菌 *Aspergillus oryzae*、糸状菌 *Trichoderma reesei* や好熱性細菌 *Clostridium thermocellum* 等多くの微生物のセロビオヒドロラーゼ (CBH)<sup>25)</sup> やエンドβ-グルカナーゼ<sup>26-28)</sup> の遺伝子が得られている。これらの遺伝子の塩基配列から推定された酵素の一次構造の比較などによって、セルロース分解酵素の特徴が解明されている。酵素の一次構造解析方法の一つとして疎水性クラスター分析 (HCA) がある<sup>29)</sup>。これは(1) 酵素蛋白のアミノ酸配列を全てα-ラセンとし、(2) α-ラセン上のアミノ酸配列を平面に展開し、(3) この平面上において隣接する疎水性アミノ酸の領域を疎水性クラスターとして、この疎水性領域の形状を個々の酵素について比較するものである。このHCAに基づいて、セルラーゼをはじめとする糖質関連酵素のアミノ酸配列を解析し、glycosyl hydrolase family (GHF)として蛋白質構造的分類が行われている。GHFは現在 91 ファミリーに分類されており、そのうちセルラーゼは 14 ファミリー、セロビオヒドロラーゼは 6 ファミリー、β-グルコシダーゼは 3 ファミリーに分かれている(<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/GH.html>)。

今後、セルロース分解酵素の構造と機能を理解し、有効に利用するためには、構造に関するデータと酵素化学的データがさらに蓄積され解析されることが必要である。そのためにも、微生物等からセルラーゼ等の酵素を探索することがますます必要になるものと思われる。

## (2) 微生物のセルロース分解酵素活性の検出

### 色素結合セルロースを用いる方法

色素結合セルロース：Cellulose Azure (Sigma)

Cellulose Azureは、Fernleyらによって開発されたセルラーゼ活性検出用基質である<sup>30)</sup>。セルロースに青色色素Remazol Brilliant Blue Rを結合させたものであり、微生物等のセルラーゼによって分解されると、色素が培地中に遊離拡散するため、酵素活性を検出することができる。

### 方法

0.5 ~ 1% Cellulose Azure 添加 Czapeck-Dox 寒天培地に試料液を塗抹し、適温にて 5 ~ 7 日間培養を行う。コロニー周囲の基質が分解拡散し、ハローを形成したものを釣菌する。



図5 Cellulose Azure 添加寒天培地によるセルラーゼ生産菌の検出  
微生物コロニー周囲の色素結合セルロースが分解されることにより  
ハローが生じる。

## 酸処理セルロースを用いる方法

### 酸処理セルロース

酸処理セルロースは佐々木らの方法<sup>31-32)</sup>に基づいて調製した。セルロース粉末 50 gに氷冷した 60% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 200 mLを加え、氷上において粘性をもつ半透明のペースト状になるまで攪拌し、1時間放置した。これに氷冷アセトン 2 Lを注ぎセルロースを沈殿させ、生成した白沈をポリトロンホモジナイザーにて懸濁液状にした。グラスフィルター (No.3) 上においてこの白沈を回収し、さらに 0.5 L氷冷アセトンで再懸濁、グラスフィルター濾過によって洗浄した。回収した白沈を蒸留水 300 mLに懸濁しポリトロンホモジナイザーにて均一化し、蒸留水を加えて容量を 500 mLとした。これに 1N NaOHを加えpH 5~6 にpH調整した後、グラスフィルター上において 75%アセトン 3 Lで洗浄し、つづいて 99.5%エタノールおよびエーテルによって溶媒を置換し、風乾して酸処理セルロース粉末とした。

### 方法

1~2%酸処理セルロース添加 Czapeck-Dox 寒天培地に試料液を塗沫し、適温にて 5~7 日間培養を行う。コロニー周囲の酸処理セルロース粒子が酵素により分解され、透明ハローを形成したコロニーを釣菌する。

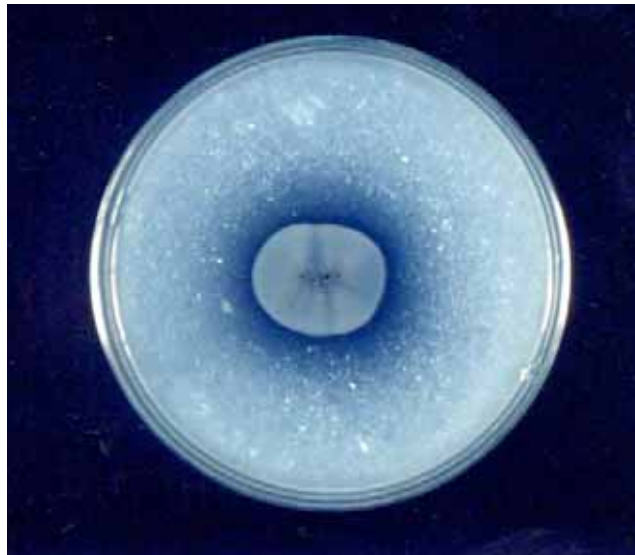


図 6 酸処理セルロース添加培地によるセルラーゼ生産菌の検出  
セルラーゼによってコロニー周囲の酸処理セルロースが分解され  
透明ハローが観察される。

### 酵素活性の測定

セルラーゼの活性測定には、カルボキシメチルセルロース (CMC) が基質として良く用いられる。CMC は、セルロースにカルボキシメチル基を導入したものであり、水溶性高分子である。水溶液は粘性を有する透明な液であり、カルボキシメチル基による置換度 (D.S., degree of substitution) の違いによって溶解度、溶液の粘度が異なる。試薬レベルの市販品では、低粘度タイプが使いやすい。

酵素活性は、CMCの加水分解により生じた還元力を定量する方法によるが、Somogy-Nelson法等では反応液が酸性になるため、残存するCMCが沈殿を形成し比色定量に影響を及ぼす。CMC沈殿が生じないDinitro salicylic acid (DNS)による方法がある<sup>33)</sup>。DNS法の還元糖検出感度は、Somogy-Nelson法の 1/10 程度である。しかし、反応後における基質CMCの沈殿が生じないことから、活性測定を省力化できる。

## 試薬

カルボキシメチルセルロース、 low viscosity (Sigma)

Dinitro salicylic acid (DNS) 試薬

A液：4.5% NaOH 300 mLと1% DNS 880 mLを混合して、ロッシェル塩 225 gを溶解する。

B液：10% NaOH 22 mLに結晶フェノール 10 gを溶解し、蒸留水にて100 mLにする。この液 69 mLにNaHCO<sub>3</sub> 6.9 gを溶解する。

B液にA液を加えて混合し、室温にて2日間安定化させた後、濾紙にて濾過して、褐色ビンに保存する。

## 操作

1% CMC 基質液に酵素液を加え、一定時間酵素反応を行わせたのち、煮沸などによって酵素反応を停止する。酵素反応液 0.1 mLをビュール試験管にとり、DNS 試薬 0.3 mLを加えて良く混合し、ガラス球にてふたをして5分間煮沸する。水道水にて冷却後、蒸留水 2.5 mLを加えて希釈し、500 nmの吸光度を測定する。

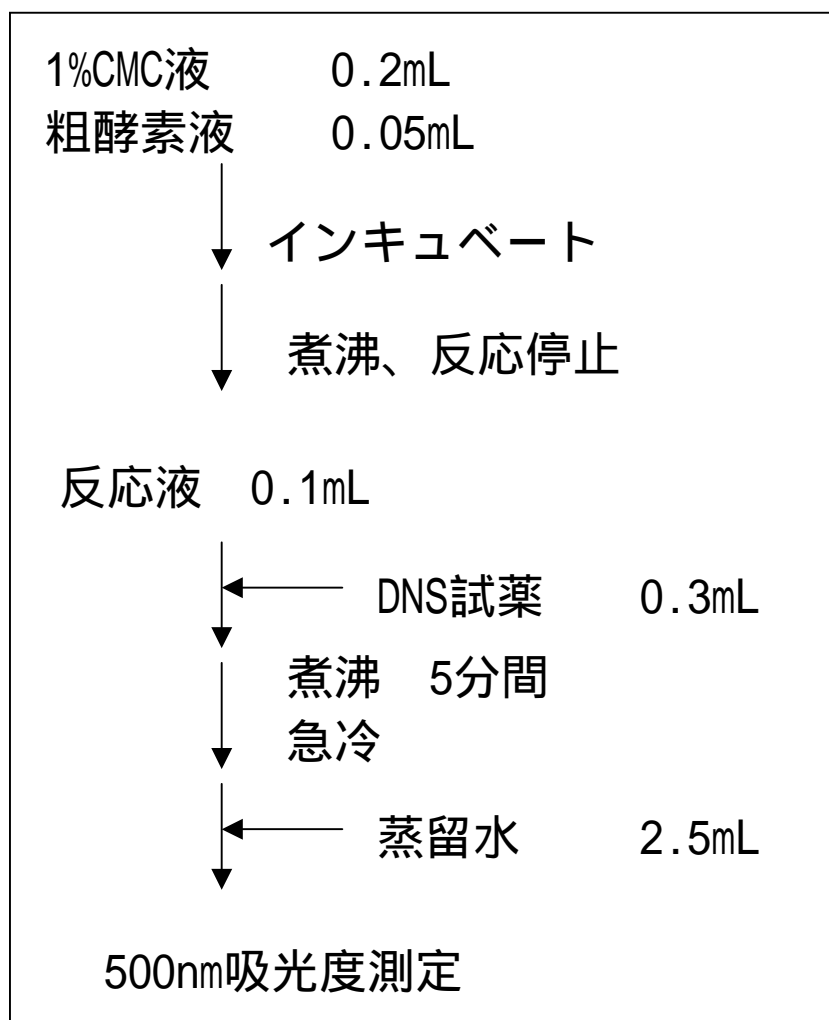


図7 DNS法によるセルラーゼ活性の測定

## 2. 蛋白質分解酵素（プロテアーゼ）

### (1) 特徴

麹菌の蛋白質分解酵素は、醸造発酵産業において重要な役割を果たしている。特に醤油醸造では、麹菌の蛋白質分解酵素によって原料大豆の蛋白質をアミノ酸まで加水分解し、グルタミン酸をはじめとする呈味アミノ酸を醤油諸味中に蓄積させる。蛋白質分解酵素は味噌、醤油製造の中心的役割となるものである。国際生化学・分子生物学連合酵素委員会酵素命名法では、ペプチド結合を分解する酵素の総称としてペプチダーゼを用い、蛋白質のペプチド鎖をランダムに分解するエンドペプチダーゼとペプチド鎖末端から分解するエキソペプチダーゼに大別している。両者を含めた総称としてプロテアーゼが慣用的に用いられている。また、蛋白質分子内のペプチド結合を切断する酵素であるエンドペプチダーゼをプロテイナーゼ、ペプチド鎖のN末端あるいはC末端からアミノ酸を逐次遊離する酵素エキソペプチダーゼをペプチダーゼの名称が慣用的に用いられてきた。プロテイナーゼは蛋白質をランダムに分解するが、低分子量のペプチドには作用しにくい性質をもつ、ペプチダーゼは低分子量のペプチドをよく分解してアミノ酸あるいはジペプチドを生成する。麹菌酵素による蛋白質の加水分解は、これらの酵素の共同作用によって行われている。

麹菌は多種類の蛋白質分解酵素を生産するが、アルカリプロテイナーゼ(EC3.4.21.63)、中性プロテイナーゼ(EC3.4.24.39)、アスパルティックプロテイナーゼ(EC 3.4.23.18)、酸性カルボキシペプチダーゼ(EC 3.4.16.5)、ロイシンアミノペプチダーゼ(EC 3.4.11.1.)等が知られている。

(<http://us.expasy.org/cgi-bin/enzyme-search-de>)

醤油麹菌である *Aspergillus sojae*、醤油用に育種された *Aspergillus oryzae* は特に蛋白質分解酵素の生産性が高い。

### (2) 酵素活性測定

麹菌などの微生物の生産するプロテアーゼ活性の測定は、多くの方法が行われているが、醤油醸造における麹の酵素活性の測定には、全プロテアーゼ活性の方法が用いられる。酵素反応基質としてミルクカゼインを用い、酵素反応を行い溶液中に遊離するアミノ酸を測定する方法である<sup>34)</sup>。

#### 試薬

2%ミルクカゼイン溶液に0.1Mリン酸緩衝液(pH 7)を等量混合し基質液とする。

トリクロロ酢酸溶液：0.4Mトリクロロ酢酸溶液

#### 操作

ミルクカゼイン基質液4 mLに、粗酵素液1 mLを加え、30、20分間反応を行う。反応終了後、トリクロロ酢酸溶液5 mLを加えよく混合して、30、30分間放置して、反応停止と未分解基質の不溶化を行う。

No.5ろ紙にて反応液をろ過し、ろ液の280 nmの吸光度を測定して、基質から遊離したアミノ酸、ペプチドの水溶性画分を定量する。または、No. 5ろ紙にてろ過後、ろ液1 mLに0.4M炭酸ナトリウム液5 mLを加え、2倍希釈フェノール試薬1 mLを加えて、30、20分間放置し十分に発色させる。660 nmの吸光度を測定し、基質から遊離したアミノ酸を定量する。

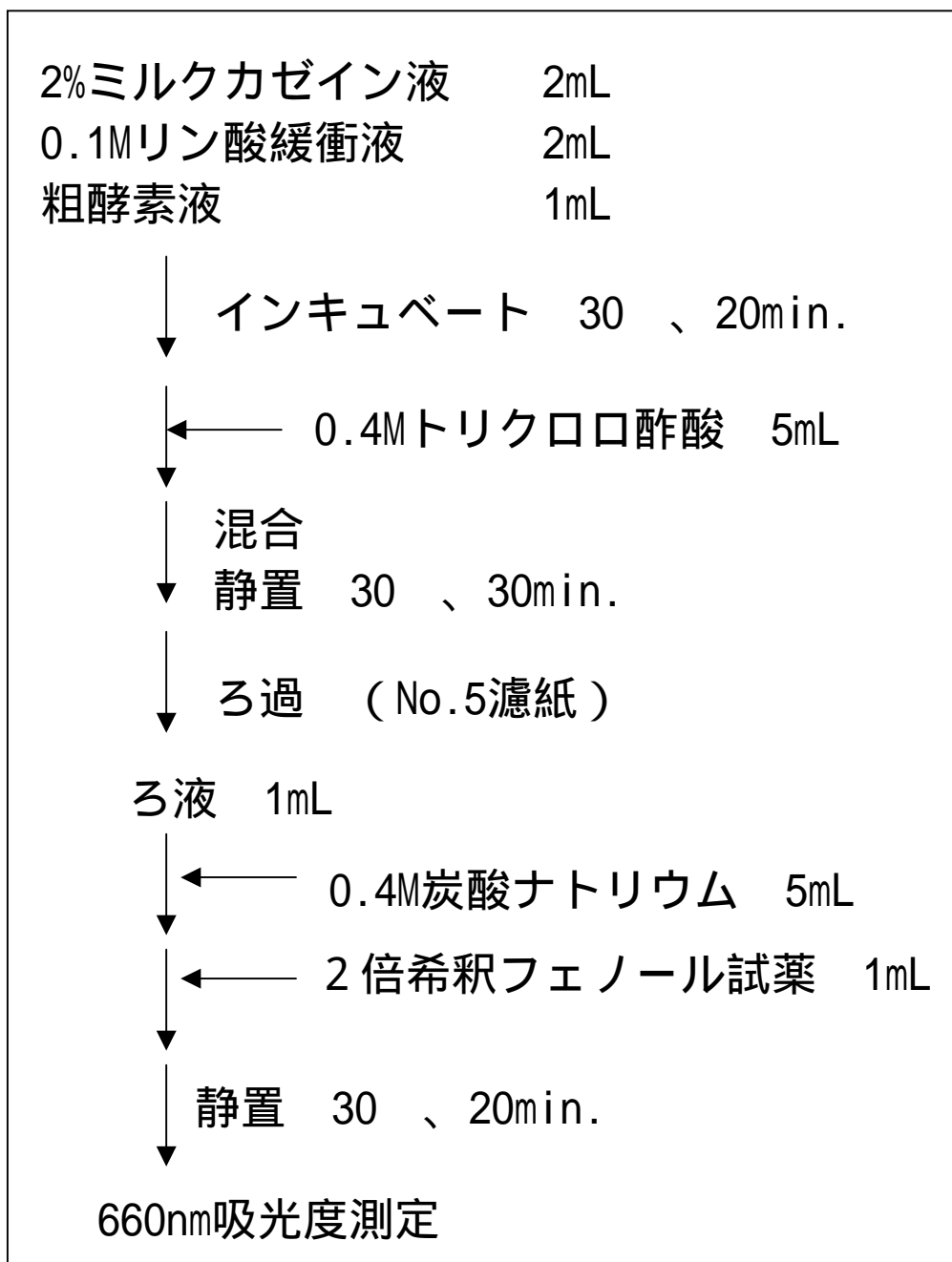


図8 全プロテアーゼ活性の測定法

### おわりに

本稿では、発酵糸状菌の酵素として醸造工程にて主要な役割をはたすアミラーゼ、セルラーゼ、プロテアーゼについてまとめた。醸造用糸状菌である麹菌が他種類の酵素を分泌生産することから、麹菌の分泌する酵素剤は「酵素の宝庫」であるとも言われており、ここにあげた酵素はほんの一部である。麹菌酵素には、ヌクレアーゼ、リパーゼ等の他、各種の酸化還元酵素群も存在しており、目的によっては有用な用途開発が期待される。伝統的に発酵醸造食品に用いられてきた麹菌を異なる視点から見直すことにより、環境、エネルギー、医療、食品などの分野で利用されることが期待される。

## 参考文献

- 1) 赤堀四郎；日本におけるタカアミラーゼ研究のあゆみ . , 化学 , 38 , 79-85 , (1983)
- 2) Y. Matsuura et al.; Molecular structure of taka-amylase A. I. Backbone chain folding at 3 Å resolution., *J. Biochem* (Tokyo), **87**, 1555-1558 (1980)
- 3) 古谷剛；セルロース資源 . , バイオマス-生産と変換 ( 下 ) , 柴田和雄 , 木谷収編 , pp.98 , 学会出版センター , (1981)
- 4) R.L. Whistler and E.L. Richards; Hemicellulose, The Carbohydrates IIA, Ed. by W. Pigman and D. Horton, pp.448, Academic Press, NY (1970)
- 5) 村尾沢夫 , 荒井基夫 , 阪本禮一郎；セルラーゼ . , 講談社サイエンティフィック , 講談社 , 東京 (1987)
- 6) G. Franz and W. Blaschek; Cellulose., Methods in Plant Biochemistry, 2, Ed. by P. M. Day, pp.301, Academic Press, NY (1990)
- 7) G. Franz and W. Blaschek; Cellulose., Methods in Plant Biochemistry, 2, Ed. by P. M. Day, pp.229-300, Academic Press, NY (1990)
- 8) D. Fegnel and G. Wegener, Wood; Chemistry, Ultrastructure, Reactions, Walter de Gruyter, Berlin and NY (1984)
- 9) Enzyme nomenclature, Recommendation of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Academic Press, N.Y.(1992)
- 10) E.T. Reese, R. G.H. Siu and H. S. Levinson; The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationships to the mechanism of cellulose hydrolysis., *J. Bacteriol.*, **59**, 485-497 (1950)
- 11) T.M. Wood and S.I. Maccrae; The purification and properties of the C1 component of *Trichoderma koningii* cellulase., *Biochem. J.*, **128**, 1183-1192 (1972)
- 12) L.E.R. Berghem and L.G. Pettersson; The mechanism of enzymatic cellulose degradation Purification of a cellulolytic enzyme from *Trichoderma viride.*, *Eur. J. Biochem.*, **37**, 21-30 (1973)
- 13) L.E.R. Berghem, L.G. Pettersson and U. -B. Axio- Fredriksson; The mechanism of enzymatic cellulose degradation- Purification and some properties of 2 different 1,4-β-glucan glucanohydrolases from *Trichoderma viride.*, *Eur. J. Biochem.*, **61**, 621-630 (1976)
- 14) S.P. Shoemaker and R.D. Brown Jr.; Characterization of endo 1,4-β-D-glucanase purified from *Trichoderma viride.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **523**, 147-161 (1978)
- 15) G. Beldman, M. F. Searle-Van Leeuwen, F.M. Rombouts and F.G.J. Voregen; The cellulase of *Trichoderma viride* - Characterization and comparison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and β-glucosidases., *Eur. J. Biochem.*, **146**, 301-308 (1985)

- 16) E.K. Gum Jr. and R.D. Brown Jr.; Structural characterization of glycoprotein cellulase 1,4- $\beta$ -D-glucan cellobiohydrolase C from *Trichoderma viride*., *Biochim. Biophys. Acta*, **446**, 371- 386 (1976)
- 17) L.E.R. Berghem and L.G. Pettersson; The mechanism of cellulose degradation- Isolation and some properties of a  $\beta$ - glucosidase from *Trichoderma viride*., *Eur. J. Biochem.*, **46**, 295-305 (1974)
- 18) 岡田巖太郎 , 田中義正 ; セルラーゼ-天然セルロースの酵素的分解機構 . , 澱粉科学 , **35**, 253-277 (1988)
- 19) G. Okada; Enzymatic studies on a cellulase system of *Trichoderma viride* Part 2 Purification properties of 2 cellulases., *J. Biochem.*, **77**, 33-42 (1975)
- 20) G. Okada and K. Nishizawa; Enzymatic studies on a cellulase system of *Trichoderma viride* Part 3 Trans glycosilation properties of 2 cellulase components of random type., *J. Biochem.*, **78**, 297-306 (1975)
- 21) G. Okada; Enzymatic studies on a cellulase system of *Trichoderma viride* Part 4 Purification and properties of a less random type cellulase., *J. Biochem.*, **80**, 913-922 (1976)
- 22) S. Murao and J. Nakamoto; Isolation and identification of a cellulolytic enzyme producing microorganism., *J. Ferment. Technol.*, **57**. 151-156 (1979)
- 23) J. Petre, R. Rongin and J. Millet; Purification of an endo- 1,4- $\beta$ -glucanase from *Clostridium thermocellum*., *Biochimie*, **63**, 629-639 (1981)
- 24) R. Lamed, E. Setter and E.A. Bayer; Characterization of a cellulose binding, cellulase containing complex in *Clostridium thermocellum*., *J. Bacteriol.*, **156**, 828-836 (1983)
- 25) S. Shoemaker, V. Schweickart, M. Lander, D. Gelfand, S. Kwok, K. Myambo and M. Innis; Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase I derived from *Trichodeima reesei* strain L27., *BIO/TECHNOLOGY*, **1**, 691-696 (1983)
- 26) P. Beguin, M. Rocancourt, M.C. Chebrou, and J.P. Aubert; Mapping of mRNA encoding endoglucanase A from *Clostridium thermocellum*., *Mol. Gen. Genet.*, **202**, 251-254 (1986)
- 27) O. Grepinet and P. Beguin; Sequence of cellulase gene of *Clostridium thrmocellum* coding endoglucanase B., *Nucleic Acid Res.* **14**, 1791-1799 (1986)
- 28) D. Petre, J. Millet, R. Rongin, P. Beguin, H. Girard and J.P. Aubert; Purification and properties of the endoglucanase C of *Clostridium thermocellum* produced in Escherichia coli., *Biochimie*, **68**, 687-695 (1986)
- 29) C. Gabouriaud. V. Bissery, T. Benchetrit and J.P. Mornon; Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analysis amino acid sequences., *FEBS Lett.*, **224**, 149-155 (1987)

- 30) H.N. Fernley; The use of reactive dyestuffs in enzymology: new substrates for cellulolytic enzymes., *Biochem J.*, **87**, 90-5 (1965).
- 31) N.R. Gilkes, B. Henrissat, D.G. Kilburn, R.C. Miller Jr. and A.J. Warren; Domains in microbial  $\beta$ -glucanase; sequence conservation, function, and enzyme families., *Microbiol. Rev.*, **55**, 303-315 (1991)
- 31) 佐々木堯, 佐藤陽子, 中川禎人, 白石真人, 貝沼圭二; 凍結粉碎したもみからセルロースの結晶性と酵素分解性., *日食工誌.*, **26**, 523-529 (1979)
- 32) T. Sasaki, T. Tanaka, N. Nanbu, Y. Sato and K. Kainuma; Correlation between X-ray diffraction measurements of cellulose crystalline structure and the susceptibility to microbial cellulase., *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1031-1042 (1979)
- 33) G.L. Miller; Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar., *Anal. Chem.*, **31**, 426-428 (1959)
- 34) 大場他; 醤油麹のプロテアーゼ活性の簡易比濁測定法., *日本醤油研究所雑誌*, **9**, 91-98 (1983)

**生物研資料**

平成 16 年 2 月

January, 2004

**微生物遺伝資源利用マニュアル (16)**

2004 年 2 月 24 日 印刷

2004 年 2 月 29 日 発行

編集兼  
発行者 独立行政法人農業生物資源研究所

National Institute of Agrobiological Sciences

〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2