

Pycnopus cinnabarinus の耐熱性 α -ガラクトシダーゼによる糖転移反応

大宝 明・光富 勝・都留 和子*

(食品製造学研究室)

昭和59年8月28日 受理

Glycosyltransfer Reaction Catalyzed by Thermostable α -Galactosidase from *Pycnopus cinnabarinus*

Akira OHTAKARA, Masaru MITSUTOMI and Kazuko TSURU*

(Laboratory of Food Technology)

Received August 28, 1984

Summary

Glycosyltransfer reaction catalyzed by the thermostable α -galactosidase purified from *Pycnopus cinnabarinus* was investigated by the application of high performance liquid chromatography to detect the reaction products.

The α -galactosidase was proved to catalyze galactosyltransfer reaction in the hydrolysis of melibiose, raffinose and stachyose, and to produce galactooligosaccharides corresponding to manninotriose, stachyose and verbascose, respectively, as the main transfer products.

In the action of the α -galactosidase on *p*-nitrophenyl α -D-galactoside, it was observed that the enzyme catalyzed galactosyltransfer reaction as well as hydrolytic reaction, and that in the presence as acceptors of lactose, sucrose, maltose, glucose, galactose and mannose, the enzyme could transfer the galactose liberated from *p*-nitrophenyl α -D-galactoside to respective sugars.

緒 言

著者らはさきに担子菌 *Pycnopus cinnabarinus* が培養濾液に各種グリコシダーゼを生産することを報告した¹⁰⁾。そのうちで活性が最も高かった α -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.22) を精製したところ、精製酵素は市販されている *Mortierella vinacea* の精製 α -ガラクトシダーゼよりも比活性が高く、極めて熱に安定であることがわかった¹²⁾。そこで、著者らは本酵素の利用を目的として、精製過程に熱処理を導入し、簡便にかつ高収率で酵素を精製する方法を確立し⁸⁾、さらに、キチンを担体とした本酵素の固定化法を開発し、固定化 α -ガラクトシダーゼも耐熱性であることを明らかにした⁹⁾。

本菌の精製 α -ガラクトシダーゼはメリビオース、ラフィノースおよびスタキオースなどのオリゴ糖類を分解する¹²⁾。従って、精製および固定化 α -ガラクトシダーゼは、ラフィノースの定量、甜菜糖製造においてラフィノースの分解によるショ糖収率の増大、あるいは豆乳中の膨

* 現在化学品検査協会

満因子ラフィノースやスタキオースの除去, などへ応用できる。著者らも本酵素の利用について現在研究中である。しかし, α -ガラクトシダーゼは他のグリコシダーゼと同様に加水分解反応とともに糖転移反応を触媒することが報告されており^{1,2,4-7,13-16)}, 本酵素も糖転移活性をもっていると推定された¹²⁾。従って, 本菌の α -ガラクトシダーゼをオリゴ糖類の分解に利用するためには, 本酵素による糖転移反応を明らかにしておく必要がある。

本報では, *P. cinnabarinus* の α -ガラクトシダーゼと各種糖類との反応生成物をおもに高速液体クロマトグラフィー (高速液クロ) を用いて調べ, 本酵素により触媒される糖転移反応を明らかにしたので, それらの結果について報告する。

実験方法

試薬および酵素 メリビオース, ラフィノースおよびスタキオースは, それぞれ Difco 製, 和光純薬工業製, および Sigma 製のものを使用した。p-ニトロフェニル α -D-ガラクトピラノシド (pNPGal) は Koch-Light 製である。 α -ガラクトシダーゼは *Pycnoporus cinnabarinus* IFO 6139 の培養濾液から前報¹²⁾の方法に従って精製した。酵素活性は pNPGal を基質として前報¹²⁾の方法により測定し, 毎分 $1\mu\text{mol}$ の p-ニトロフェノールを生成する酵素量を 1 単位とした。

オリゴ糖類に対する作用 0.2M オリゴ糖類 0.2ml, 1/30M リン酸緩衝液 (pH 5.5) 0.2ml, α -ガラクトシダーゼ 0.1ml (0.164 単位) を含む反応液を 37°C で, それぞれ 0.5, 3, 8 および 24 時間反応させた。4 分間煮沸して反応停止後, 反応液は 0.45 μm Millipore フィルターで濾過し, 高速液クロを用いて反応生成物を分離定量した。

pNPGal に対する作用 0.2M pNPGal 0.2ml, 1/30M リン酸緩衝液 (pH 5.5) 0.2ml, α -ガラクトシダーゼ 0.1ml (0.164 単位) を含む反応液, および, さらに 1M 各種糖類 0.1ml を加えた反応液を, 37°C で 24 時間反応させた。反応液はオリゴ糖類の場合と同様に処理したのち, 高速液クロを用いて反応生成物を調べた。

酵素法による糖類の定量 オリゴ糖類の分解によって生成したグルコースとガラクトースは, 高速液クロ法のほかに酵素法を用いて定量した。すなわち, グルコースは和光純薬工業製の Glucose C-Test Wako (ムタロターゼ・グルコースオキシダーゼ法) を用い, またガラクトースは Boehringer-Mannheim 製 Galactose UV-Test (ガラクトース・デヒドロゲナーゼ法) を用いて, それぞれ定量した。

高速液クロによる糖類の定量 高速液クロを用いたオリゴ糖類の分離定量は, 既報^{3,11)}に準じて行った。すなわち, 装置は Waters 製の 6,000A 型ポンプと U6K 型ユニバーサルインゼクターに R-401 型示差屈折計を連結して使用した。糖類は, Waters 製 μ -Bondapak CH カラム (3.9 \times 300 mm) を用い, アセトニトリル・水 (80:20) 混液を移動相として, 毎分 1.5ml の流速で分離した。糖類の検出には示差屈折計を使用し, 溶出液の屈折率 (感度 \times 8) を自動的に記録した。また, 基質に pNPGal を用いた場合は, 屈折率のほかに, 280 nm の吸光度を日本分光工業製 UVIDEC-100 II 型を使用して測定し, 糖類の p-ニトロフェニル化合物の生成を調べた。

基質に使用したオリゴ糖類とシュクロースおよびガラクトースの高速液クロによる溶出パターンを Fig. 1 に示す。本実験の条件で, ラフィノースおよびスタキオースとそれらの分解生成物シュクロースおよびガラクトースは完全に分離されたが, メリビオースの分解生成物グルコースとガラクトースは同時に溶出され, 分離できなかった。0.2~1.0 μmoles の範囲で各種糖類の高速液クロを行い, それぞれ糖量とピーク面積との関係を示したものが Fig. 2 である。この結果, すべての糖類について両者の間に直線性が認められたので, この方法で糖類の分離

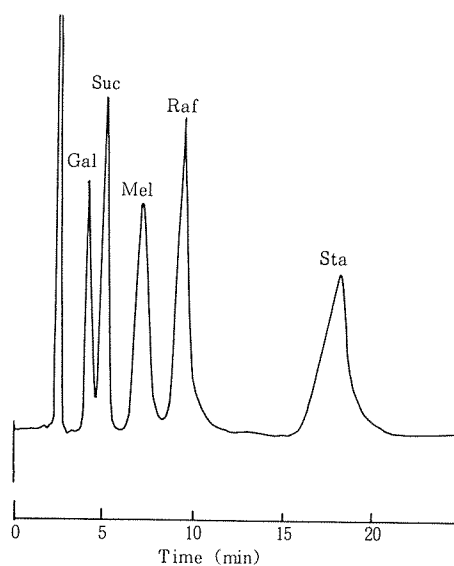


Fig. 1 Separation of sugars by high performance liquid chromatography.

A Waters Associates 6000A pump coupled to a U6K universal injector and a R-401 Differential Refractometer were used for high performance liquid chromatography (HPLC). Sugars were separated on a Waters Associates μ -Bondapak CH (3.9×300 mm) using a 80 : 20 mixture of acetonitrile and water as the mobile phase, at a flow rate of 1.5 ml/min, and detected by monitoring the refractive index at $\times 8$ attenuation. Gal, galactose; Suc, sucrose; Mel, melibiose; Raf, raffinose; Sta, stachyose.

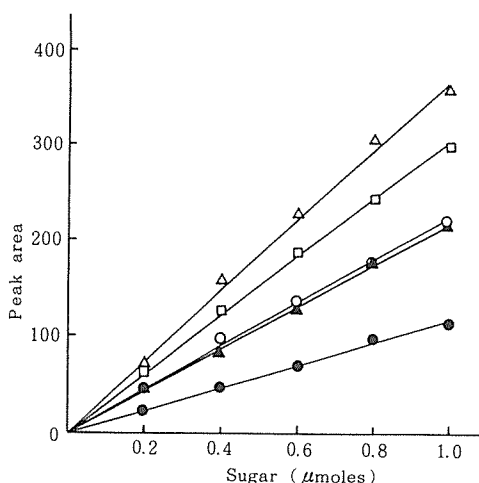


Fig. 2 Standard curves for sugars.

—●—, galactose; —▲—, sucrose;
—○—, melibiose; —□—, raffinose;
—△—, stachyose.

定量を行った。

実験結果

メリビオースに対する作用

本菌の α -ガラクトシダーゼがメリビオースと反応したときの生成物を高速液クロを用いて分離すると, Fig. 3 のようになった。すなわち, 本酵素はメリビオースをグルコースとガラクトースに分解するが, そのほかに二つの生成物のピークが検出された。一つはラフィノースの溶出位置附近, 他の一つはラフィノースとスタキオースの中間でそれぞれ溶出された。前者の生成は微量であったが, 後者は30分反応後にすでにその生成が認められ, 反応が進むに従い生成量が著しく増大した。しかし, 基質に0.01Mメリビオースを用いた場合, これらのピークは検出されなかった。

Fig. 4 は本酵素によるメリビオースの加水分解の経時変化を示したものである。メリビオースおよびグルコースとガラクトース生成量の和は高速液クロにより, またグルコースおよびガラクトースの生成量は酵素法により, それぞれ測定した。その結果, 酵素法を用いて定量したグルコースおよびガラクトースの生成量の和は, 高速液クロにより測定された両者の和にほぼ等しかったが, 反応を通じてグルコースに比較してガラクトースの生成量は著しく低い値であった。

ラフィノースに対する作用

本酵素がラフィノースと反応したときの生成物の高速液クロによる分離パターンは, Fig. 5 に示すとおりである。ラフィノースは α -ガラクトシダーゼによってシュクロースとガラク

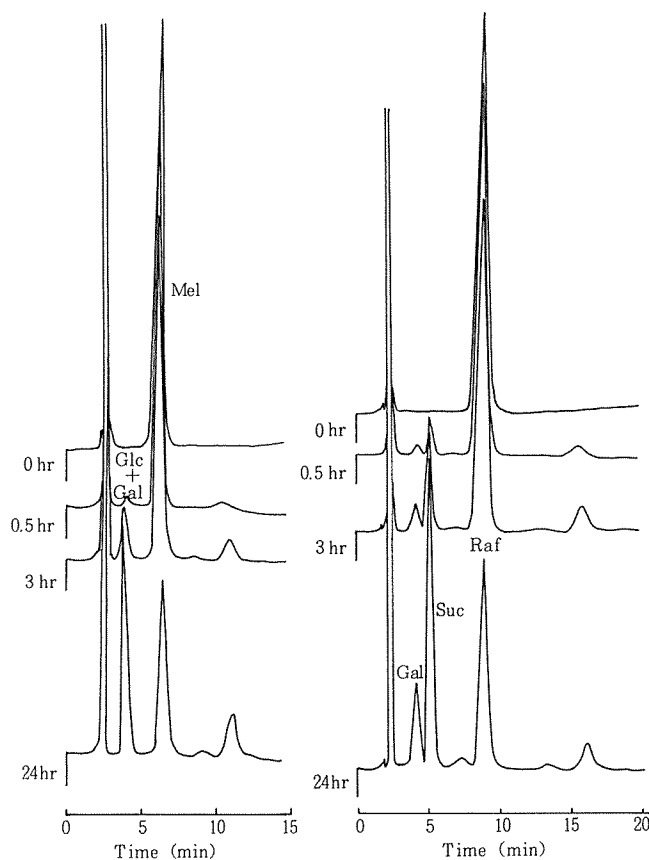


Fig. 3

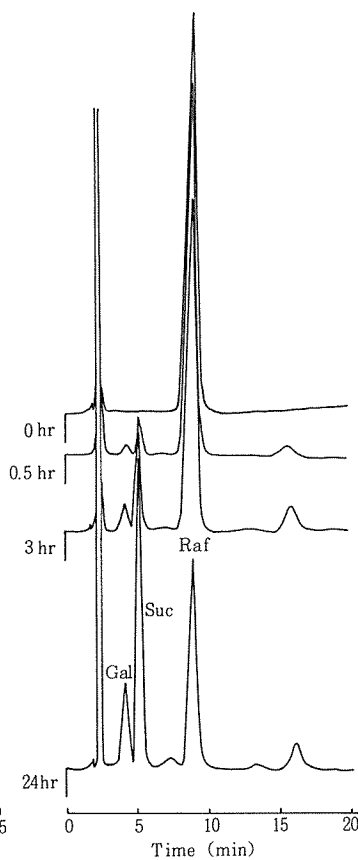


Fig. 5

Fig. 3 Chromatograms of the products formed by the action of the enzyme on melibiose.

The reaction mixture consisting of 0.2 ml of 0.2M melibiose, 0.2 ml of 1/30M phosphate buffer (pH 5.5), and 0.1 ml of enzyme solution (0.164 units) was incubated for 0.5, 3, and 24 hr at 37°C. The mixture was filtered through a 0.45 μ m Millipore filter and 10 μ l of the mixture was injected. Experimental details for HPLC were the same as in Fig. 1. Glc, glucose; Gal, galactose; Mel, melibiose.

Fig. 5 Chromatograms of the products formed by the action of the enzyme on raffinose.

The reaction mixture and experimental condition were the same as in Fig. 3, except that raffinose was used instead of melibiose. Gal, galactose; Suc, sucrose; Raf, raffinose.

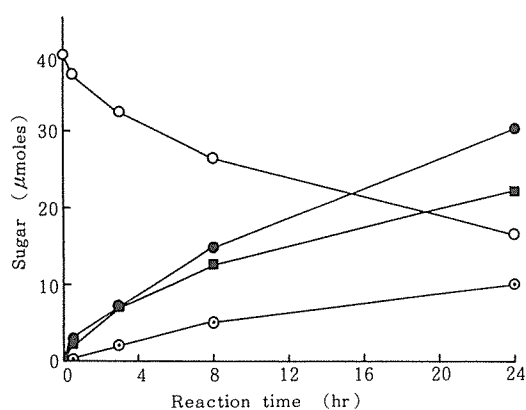


Fig. 4 Time course of the hydrolysis of melibiose with the enzyme.

The amounts of melibiose (○) and glucose plus galactose (●) were determined by HPLC, and those of glucose (■) and galactose (⊙) by enzymatic method.

トースに分解され、さらに反応生成物として三つのピークが認められた。そのうちの一つはラフィノースより速く、他の二つは遅く溶出されたが、最も大きいピークはスタキオースの溶出位置附近にあり、30分反応後からその生成が確認された。

本酵素によるラフィノースの加水分解の経時変化は Fig. 6 に示す。ラフィノースおよびシュクロースとガラクトースの生成量は高速液クロにより測定し、またガラクトース生成量のみ別に酵素法を用いて測定した。その結果、ラフィノースの分解におけるガラクトースの生成量は、高速液クロ法および酵素法ともにほぼ等しい値であったが、両測定法による値はともにシュクロースの生成量に比べてか

なり低かった。

スタキオースに対する作用

Fig. 7 は本酵素とスタキオースが反応したとき、その生成物を高速液クロを用いて分離したものである。すなわち、 α -ガラクトシダーゼによってスタキオースから順次ガラクトースが遊離され、ラフィノースおよびシュクロースが生成される。これらの生成物のほかに、メリビオースの溶出位置附近、およびスタキオースよりかなり遅れた溶出位置に、それぞれ反応生成物のピークが検出された。

また、本酵素によるスタキオースの加水分解の経時変化を Fig. 8 に示した。スタキオースおよびその分解によって生成した糖類は高速液クロを用いて定量し、ガラクトースのみ別に酵素法により定量

した。二つの測定法により求めたガラクトースの生成量は、反応を通じてだいたい等しかったが、それらの値はラフィノースとシュクロースの生成量の和と比較してかなり低かった。

pNPGal に対する作用

本酵素が0.01Mおよび0.2M pNPGal と反応したときの生成物を高速液クロを用いて分離したところ、Fig. 9 の結果が得られた。すなわち、0.01M pNPGal のときは、明らかにガラクトースのみ生成されたが、0.2M pNPGal の場合は、複雑な溶出パターンとなり、ガラクトース以外の反応生成物によるピークが認められた。屈折率測定によって検出された最も遅いピークはメリビオースの溶出位置附近にあり、

この生成物は280 nmの吸光度測定では検出されなかった。

つぎに1Mの各種糖類（キシロース、アラビノース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フラクトース、ラクトース、シュクロース、マルトース）の存在において、本酵素の0.2M pNPGal に対する作用を調べた。そのうちグルコースおよびラクトースが存在したときの反応生成物の分離パターンを Fig. 10 に示した。いずれの場合もガラクトースのほかに二、三のピークが認められ、おもな反応生成物は280 nmの吸光度測定によって検出されず、屈折率測定によってのみ検出された。これらの反応生成物はグルコースの場合

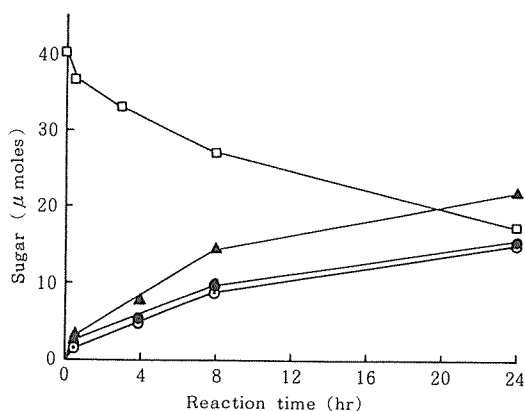


Fig. 6 Time course of the hydrolysis of raffinose with the enzyme.

The amounts of raffinose (□), sucrose (▲) and galactose (●) were determined by HPLC, and those of galactose (○) by enzymatic method.

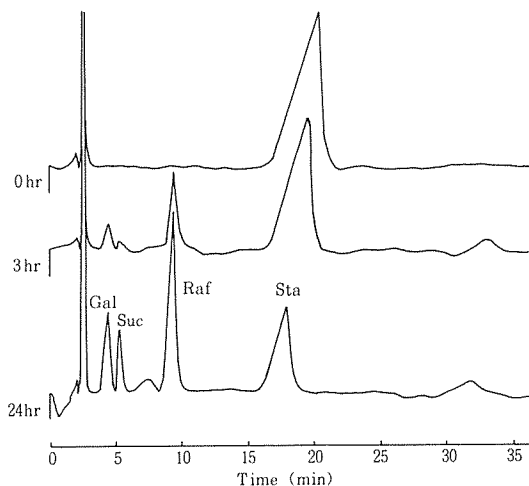


Fig. 7 Chromatograms of the products formed by the action of the enzyme on stachyose.

The reaction mixture and experimental condition were the same as in Fig. 3, except that stachyose was used instead of melibiose. Gal, galactose; Suc, sucrose; Raf, raffinose; Sta, stachyose.

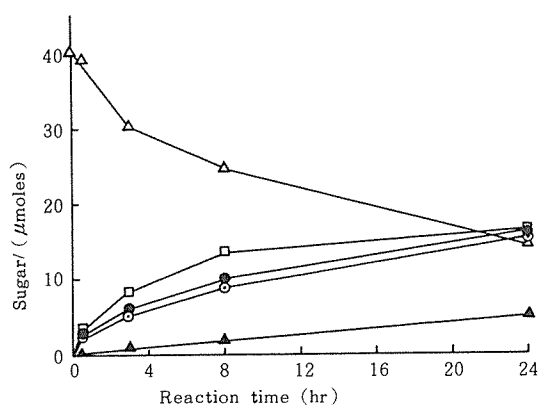


Fig. 8 Time course of the hydrolysis of stachyose with the enzyme.

The amounts of stachyose (Δ), raffinose (\square), sucrose (\blacktriangle) and galactose (\bullet) were determined by HPLC, and those of galactose (\odot) by enzymatic method.

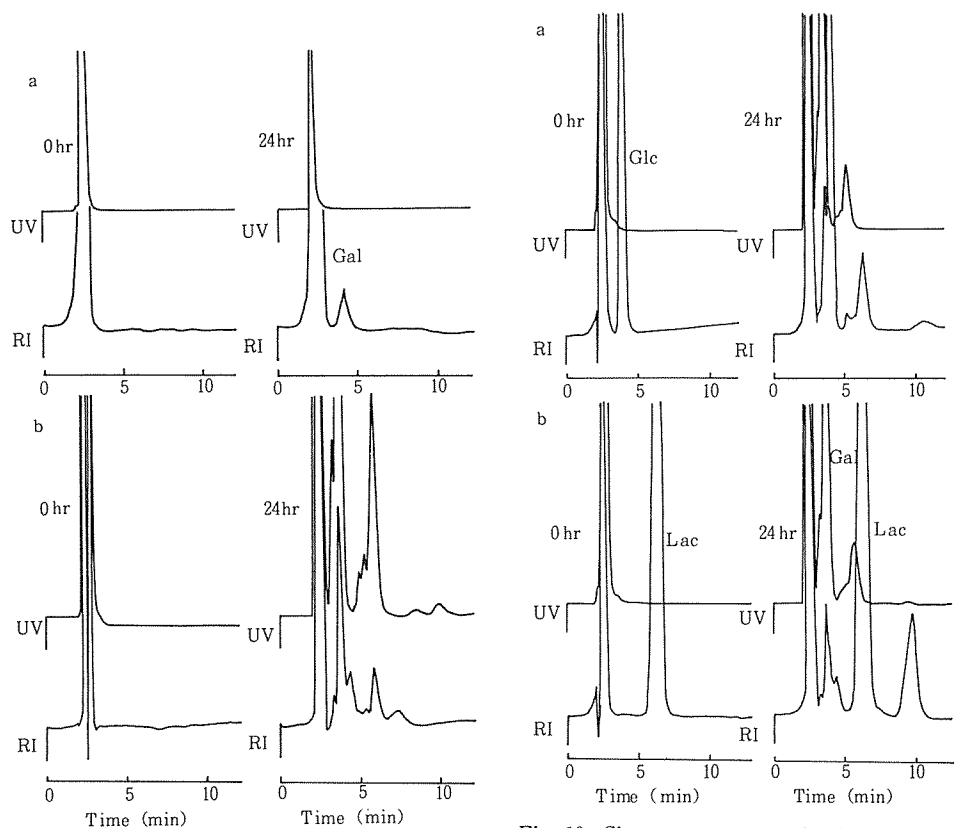


Fig. 9 Chromatograms of the products formed by the action of the enzyme on 0.01M (a) and 0.2M (b) pNPGal.

The reaction mixture consisting of 0.2 ml of 0.01M or 0.2M pNPGal, 0.2 ml of 1/30M phosphate buffer (pH 5.5), and 0.1 ml of enzyme solution (0.164 units) was incubated for 24 hr at 37°C. 20 μ l of the mixture was injected. Gal, galactose.

Fig. 10 Chromatograms of the products formed by the action of the enzyme on pNPGal in the presence of glucose (a) and lactose (b).

The reaction mixture consisting of 0.2 ml of 0.2M pNPGal, 0.2 ml of 1/30M phosphate buffer (pH 5.5), 0.1 ml of 1M glucose or lactose and 0.1 ml of enzyme solution (0.164 units) was incubated for 24 hr at 37°C. 10 μ l of the mixture was injected. Glc, glucose; Gal, galactose; Lac, lactose.

は二糖類, ラクトースの場合は三糖類に相当する溶出位置にあった. 同様なオリゴ糖の生成は, 二糖類ではシュクロースやマルトースの存在でも認められた. 単糖類の場合は, グルコースのほかにガラクトースやマンノースの存在でオリゴ糖が生成されたが, フラクトースおよびキシロースやアラビノースなど五炭糖の存在では, その生成が確認できなかった.

考 察

P. cinnabarinus α -ガラクトシダーゼがメリビオース, ラフィノースおよびスタキオースに作用したとき, 反応生成物を高速液クロを用いて調べた結果, 加水分解物以外の生成物のピークが確認された (Fig. 3, 5, 7). それぞれの反応でのおもな生成物は, その溶出位置からいづれももとのオリゴ糖よりも分子量が大きいオリゴ糖であると推定される. 一方, メリビオース, ラフィノースおよびスタキオースの加水分解によって生成されたガラクトース量は, それぞれグルコース生成量, シュクロース生成量, およびシュクロースとラフィノース生成量の和と一致するはずであるが, いづれの場合もガラクトース生成量のほうがかなり低い値であった (Fig. 4, 6, 8). これは, 本酵素の加水分解反応によりオリゴ糖類から生成されたガラクトースの一部が, 同じ酵素の糖転移反応により他の糖類に転移したためであると考えられ, 高速液クロで確認された加水分解物以外のピークは, いづれも糖転移化合物であると推定される.

これらの結果に関連して, *Streptococcus bovis*¹⁾, *Diplococcus pneumoniae*^{5,6)}, *M. vinacea*¹⁴⁾および *Vicia sativa*¹³⁾の α -ガラクトシダーゼによるオリゴ糖類の分解で, 転移化合物としてメリビオースからマンニトリオースの生成, ラフィノースからスタキオースの生成が, それぞれペーパークロマトグラフィーを用いて確認されている. また, *D. pneumoniae* α -ガラクトシダーゼの場合, これら転移化合物とともにガラクトビオースやガラクトトリオースの生成も報告されている²⁾. 本実験における高速液クロの溶出位置から判断すると, *P. cinnabarinus* α -ガラクトシダーゼによるメリビオースおよびラフィノースの分解において生成された転移化合物は, 従来の報告のようにマンニトリオースおよびスタキオースと推定され, またスタキオースの分解によって生成される転移化合物は, 恐らくベルバスコースであると考えられる. このほか高速液クロによって小さいピークが検出されることから, ガラクトースのみからなるオリゴ糖類の生成も予想される. これらの糖転移生成物の分離および化学構造については現在研究中である.

本酵素が pNPGal に作用したときの転移生成物は, Fig. 9 の高速液クロの結果のみからは確認できなかった. しかし, *Calvatia cyathiformis* の α -ガラクトシダーゼ⁷⁾は pNPGal と反応して, ガラクトビオースおよび未同定の糖類を生成するので, 本酵素の場合も類似の転移化合物を生成したと予想される. つぎに各種糖類をアクセプターとして加えたときの本酵素による pNPGal の分解では, 二糖類のラクトース, シュクロースおよびマルトース, 単糖類のグルコース, ガラクトースおよびマンノースの存在で, 高速液クロにおいて糖転移生成物に相当するピークが認められた (Fig. 10). 同様な糖転移反応は *Vicia sativa*¹³⁾や *Stachys affinis*⁴⁾など植物の α -ガラクトシダーゼについて報告されている. すなわち, これらの酵素は合成 α -ガラクトシドを分解し, シュクロース, グルコースおよびガラクトースをアクセプターとして, それぞれラフィノース, メリビオースおよびガラクトビオースを生成したが^{4,13)}, リボース, アラビノースおよびフラクトースがアクセプターのときは, 転移反応がおこらなかった^{2,13)}. 本実験でもこれらの報告と同様の結果が得られた. 従って, Fig. 10のグルコースをアクセプターとしたときの転移生成物は, その溶出位置から恐らくメリビオースであろう.

メリビオースおよび pNPGal いずれの場合も、本酵素は0.2M (終濃度0.08M) のとき転移反応を触媒したが、0.01M (終濃度0.004M) では加水分解反応のみが認められた。ラフィノースの濃度を変えて反応させ、生成物をペーパークロマトグラフィーにより調べた別の実験でも、0.25M (終濃度0.1M) 以上で転移生成物が検出された。これらの結果から、*P. cinnabarinus* の α -ガラクトシダーゼをオリゴ糖類の加水分解に利用するときは、転移反応のおこらないオリゴ糖濃度で反応させることが必要である。また、本酵素は耐熱性であり、その最適温度75°Cでラフィノースに作用させた場合も、37°Cの場合と同様に糖転移反応が認められた。

摘 要

P. cinnabarinus の生産する耐熱性 α -ガラクトシダーゼにより触媒される糖転移反応を高速液クロを用いて調べた。その結果、本酵素はメリビオース、ラフィノースおよびスタキオースなどのオリゴ糖類の加水分解によって生成したガラクトースの一部を他の糖類に転移することがわかった。本酵素とメリビオース、ラフィノースおよびスタキオースとの反応により生成したおもな転移化合物は、それぞれマンニトリオース、スタキオースおよびベルバスコースであると推定された。本酵素は pNPGal に作用して加水分解反応とともに転移反応を触媒し、アクセプターとしてラクトース、シュクロース、マルトース、グルコース、ガラクトースおよびマンノースなどの糖類が存在するとき、糖転移化合物を生成することがわかった。

文 献

- 1) Bailey, R. W. (1963). *Biochem. J.*, **86**, 509-514.
- 2) Dey, P. M. and J. B. Pridham (1972). *Advan. in Enzymology*, Vol. 36, Academic Press Inc., New York, p. 105-108.
- 3) Gum Jr., E. K. and R. I. Brown Jr. (1977). *Anal. Chem.*, **82**, 372-375.
- 4) Kato, K., T. Ikami, H. Kono, R. Yamauchi and Y. Ueno (1982). *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1089-1090.
- 5) Li, Y. T., S. C. Li and M. R. Shetlar (1963). *Arch. Biochem. Biophys.*, **103**, 436-442.
- 6) Li, Y. T. and M. R. Shetlar (1964). *Arch. Biochem. Biophys.*, **108**, 301-313.
- 7) Li, Y. T. and M. R. Shetlar (1964). *Arch. Biochem. Biophys.*, **108**, 523-530.
- 8) Mitsutomi, M. and A. Ohtakara (1984). *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 3153-3155.
- 9) Mitsutomi, M., Y. Uchida and A. Ohtakara (1985). *J. Ferment. Technol.*, Submitted to publication.
- 10) Ohtakara, A., N. Hayashi and M. Mitsutomi (1981). *J. Ferment. Technol.*, **59**, 325-328.
- 11) Ohtakara, A., M. Mitsutomi and E. Nakamae (1982). *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 293-295.
- 12) Ohtakara, A., M. Mitsutomi and Y. Uchida (1984). *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1319-1327.
- 13) Petek, F., E. Villarroya and E. Courtois (1969). *Europ. J. Biochem.*, **8**, 395-402.
- 14) Suzuki, H., S. C. Li and Y. T. Li (1970). *J. Biol. Chem.*, **245**, 781-786.
- 15) Ueno, Y., T. Ikami, R. Yamauchi and K. Kato (1980). *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2623-2629.
- 16) Williams, J., E. Villarroya and F. Petek (1977). *Biochem. J.*, **161**, 509-515.