

氏名	イ 李	スン 承	ゼ 在
学位(専攻分野)	博士(農学)		
学位記番号	農博第1582号		
学位授与の日付	平成18年9月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科・専攻	農学研究科食品生物学専攻		
学位論文題目	Molecular engineering and regulation of the activity of bacterial and mammalian $\alpha$ -amylases for their application to food science and biotechnology (微生物および哺乳類 $\alpha$ -アミラーゼの食品工学への応用を目的とした分子工学と制御)		
論文調査委員	(主査) 教授 井上 國世 教授 安達 修二 教授 北畠 直文		

### 論文内容の要旨

$\alpha$ -アミラーゼは動物、植物、微生物など自然界に幅広く分布している。とくに微生物 $\alpha$ -アミラーゼは古くからデンプン加工業や製パン工業などに広く用いられてきた。しかし、デンプン加工用酵素には酸性領域での熱安定性の増強が望まれており、製パン用酵素には熱安定性の適度な低減が求められている。一方、小麦には多種類のアミラーゼ阻害剤(AI)が含まれ、なかでも0.19アミラーゼ阻害剤(0.19AI)は動物や昆虫、細菌の $\alpha$ -アミラーゼを阻害する。近年、AIには腸管での糖類吸収を遅延させる効果が報告され、糖尿病や肥満、高血圧の予防と治療への応用が期待されている。本論文は、酵素化学的および熱力学的手法を用いて、*Bacillus*  $\alpha$ -アミラーゼの熱安定性の制御機構を検討するとともに、0.19AIのブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼ(PPA)に対する阻害機構を解析し、食品生物学への応用性について考察したものである。その主な内容は以下のとおりである。

1. *B. licheniformis*  $\alpha$ -アミラーゼ(BLA)の酸性での活性増強: BLAは高い熱安定性を有することからデンプンの糖化工業における液化過程に用いられてきたが、糖化工業には反応pHの異なる過程が複数含まれていることから、BLAの酸性領域での活性と熱安定性の向上が望まれている。本研究では、好熱性BLA(以下PAと略称)の酵素活性とPAを産生する野生型菌体の変異体が産生する変異型BLA(以下MAと略称)の酵素活性とを比較した。MAではPAの8箇所のアミノ酸残基において置換が起こっている。MAの活性pH域はPAに比べ酸性側で顕著に拡大しており、とくにpH4.0でMAの活性はPAの3倍であった。MAはPAに比べて、検討したすべてのpH域で熱安定性が増大していた。示差走査熱量測定により両酵素の熱変性過程を調べたところ、MAの変性温度 $T_m$ はPAのそれに比べて10°C高かった。また、MAとPAの $T_m$ は $Ca^{2+}$ 添加により20°C以上も上昇した。以上のことから、PAからMAへの変異はBLAの熱安定性を著しく増大させ、その結果、酸性での活性が増大したものと考えられた。これらの結果は、デンプン糖化工業で利用される $\alpha$ -アミラーゼの改質に有用な知見を与えるものと考えられる。

2. *B. amyloliquefaciens*  $\alpha$ -アミラーゼ(BAA)の熱安定性の低減: 製パン工業において、 $\alpha$ -アミラーゼの添加はパンに種々の物性を付与する点で重要であるが、製パン後の残存活性はパンの品質低下につながる。現在、製パン工業には*Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -アミラーゼが使用されているが、本酵素は作用特性上の不都合があり、熱安定性が適度に低減された*Bacillus* 酵素の出現が望まれてきた。本章では、BAAの野生型(WT)とその変異型M77、M111および21Bの熱安定性と $Ca^{2+}$ 添加効果を比較検討した。アミノ酸配列233位にAspを持つWTとM77のグループは、233位にAsnを持つM111と21Bのグループに比べて高い熱安定性を示した。Asp233はBAAに含まれる $Ca^{2+}$ と相互作用すると推定され、この残基への変異導入が酵素の熱安定性を低下させたものと考えられた。これらの酵素に対する $Ca^{2+}$ の添加効果を検討したところ、WTとM77では $Ca^{2+}$ 添加により熱安定性が増大したのに対して、M111と21Bでは $Ca^{2+}$ 添加による安定化効果はほとんどみられなかった。これらの結果は、製パン工業におけるBAAの応用性を改良する上で有用な示唆を与える。

3. 0.19AI の PPA に対する阻害機構：0.19AI は水溶液中では 13 kDa タンパク質のホモダイマーで存在し、動物、昆虫および細菌の  $\alpha$ -アミラーゼを阻害する。本章では、0.19AI と PPA との相互作用および 0.19AI の熱安定性を検討した。0.19AI ダイマー 1 分子が酵素 1 分子に結合すること、および 0.19AI の PPA に対する阻害は拮抗型であることが示され、その阻害物質定数  $K_i$  は 30°C、pH 6.9 で 57.3 nM と求められた。一方、0.19AI の熱失活の活性化エネルギーは 87.0 kJ/mol であり、 $T_{50}$  (30 分間の熱処理で阻害活性を 50% 失う温度) は 88.1°C であった。0.19AI は高い熱安定性をもち、糖尿病や肥満の予防や治療を目的とした機能性食品や医薬品への応用において有用性が期待される。

4. 0.19AI の PPA に対する阻害に対する  $\text{Cl}^-$  の効果：PPA は低濃度の  $\text{Cl}^-$  により著しく活性化される。本章では、0.19AI の PPA に対する阻害に及ぼす  $\text{Cl}^-$  の効果を検討した。NaCl の濃度を 0 から 25 mM に増加させると PPA のミカエリス定数  $K_m$  は 7.3 から 3.7 mM に減少し、分子活性  $k_{\text{cat}}$  は 4 から 11  $\text{s}^{-1}$  へ増加した。 $K_i$  は 104 から 36 nM まで減少した。25 mM 以上の NaCl を添加しても、 $K_m$ 、 $k_{\text{cat}}$ 、 $K_i$  に有意な変化が現れなかったことから NaCl 添加による各パラメータの変化は  $\text{Cl}^-$  の PPA の活性化によるものと考えられた。また、0.19AI と PPA の結合には静電的相互作用のみならず、 $\text{Na}^+$  や  $\text{Cl}^-$  との特異的な相互作用の関与が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

細菌  $\alpha$ -アミラーゼはデンプン糖化工業や製パン工業など広く食品工業で利用されている。それぞれの用途により適した酵素化学的特性をもつ  $\alpha$ -アミラーゼの作出が望まれている。一方、小麦には、哺乳動物のアミラーゼを阻害するアミラーゼ阻害剤が含まれている。これらは肥満や糖尿病の改善に応用できる可能性があり、その生理活性に対する研究が進められている。本研究は、*Bacillus*  $\alpha$ -アミラーゼとその変異型酵素の熱安定性を酵素化学と熱力学の手法を用いて解析し、熱安定性の改変された  $\alpha$ -アミラーゼの食品産業への応用可能性を考察するとともに、小麦由来  $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤とブタ膵臓  $\alpha$ -アミラーゼとの相互作用を検討し、小麦  $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤の作用機構に関する知見を得たものであり、成果として評価すべき点は以下のとおりである。

1. *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -アミラーゼ (BLA) とその変異型酵素の活性の pH 依存性と熱安定性とを検討し、変異型酵素において酸性領域での熱安定性と活性の顕著な増大を確認した。この結果に基づいて、デンプン糖化工業の効率化を目的とする BLA の改質において有用な知見を提示した。

2. *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -アミラーゼ (BAA) と 3 種の変異型酵素の熱安定性および熱安定性に対する  $\text{Ca}^{2+}$  添加効果を比較検討し、Asp233 が Asn へ置換した変異型酵素において熱安定性の低下を確認した。野生型酵素で存在する Asp233 と  $\text{Ca}^{2+}$  との相互作用が変異型酵素では欠損しており、このことが熱安定性を低下させたものと考えられた。この知見は BAA の熱安定性を改変・制御するうえで有用であり、とりわけ製パン工業の効率化に適用できる可能性が高いことが示唆された。

3. 小麦  $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤 0.19AI とブタ膵臓  $\alpha$ -アミラーゼ (PPA) との相互作用を検討した。二量体の阻害剤 1 分子が酵素 1 分子と強固に結合し、拮抗型阻害を示した。また、本阻害剤は極めて高い熱安定性を有していた。本阻害剤を、肥満や糖尿病の予防・治療に対する医薬品や健康食品として応用する上で有用な知見を提示した。

4. 0.19AI の PPA に対する阻害に  $\text{Cl}^-$  が及ぼす効果を検討し、25 mM 程度の低濃度の NaCl の添加により阻害作用が顕著に増強されることを示した。また、0.19AI と PPA との相互作用には、静電的相互作用に加え、 $\text{Na}^+$  や  $\text{Cl}^-$  との特異的相互作用が関与する可能性を示した。

以上のように本論文は、微生物と哺乳類  $\alpha$ -アミラーゼについて、その機能および構造の分子工学と制御に関して多くの重要な知見を得たことに加え、その食品生物科学への応用に関して有用な洞察を加えたものであり、酵素化学、食品化学および農産製造学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成18年6月15日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。