

## 2. グルコアミラーゼの糖鎖構造

親株と変異株グルコアミラーゼに基質特異性の異なる 3 種類の脱糖鎖酵素、Endo H、PNGase F、PNGase A を作用させ、脱糖鎖による分子量の変化を SDS-PAGE で分析することにより、糖鎖の切断結果の違いを検討した。

基質特性の広い PNGase F による処理では、Fig. 5-1~5-4 に示すように親株と変異株グルコアミラーゼどちらも、非変性状態では 40 時間処理しても脱糖鎖による分子量の低下がほとんど起こらなかったが、SDS で変性した状態では 1 時間の処理で糖鎖が除去されて分子量が低下し、親株と変異株全てのグルコアミラーゼで同一の分子量 55 kDa の新たなバンドが確認された。この 55 kDa のバンドは PAS 染色で染色されず、糖鎖が完全に除去されたことを示唆している。それに対して Endo H 処理の場合は、Fig. 5-5~5-8 に示すように親株グルコアミラーゼと変異株グルコアミラーゼの反応結果は異なった。両変異株グルコアミラーゼは非変性状態及び SDS で変性した状態のどちらにおいても 1~12 時間程度の処理で脱糖鎖されて、PNGase F 処理の場合と同じ約 55 kDa のバンドが確認された。このバンドは PAS 染色で染まらなかったことから完全に脱糖鎖されていた。しかし、親株グルコアミラーゼでは 20 時間以上処理してもわずか 5 kDa 程度しか分子量の低下が起こらず、PAS 染色では染色バンドがみられたことから、部分的に脱糖鎖されただけで糖鎖は完全には除去されていなかった。

また、PNGase A 処理では、Fig. 5-9 に示すように親株の氷上タイプ株グルコアミラーゼを SDS で変性した状態で 12 時間以上処理した場合のみ、明らかに 55~60 kDa の複数のバンドが現れ、部分的な脱糖鎖が観察された。それ以外の菌株のグルコアミラーゼは、Fig. 5-10~5-12 に示すように SDS で変性した状態及び非変性状態でのいずれにおいても PNGase A 処理によって約 5 kDa のみの分子量の低下しかみられず、PAS 染色で染色されたことから (PNGase A 溶液に含ま

れる BSA の 66 kDa のバンドは糖鎖が無い(ため PAS 染色されない)、完全には脱糖鎖されていなかった。

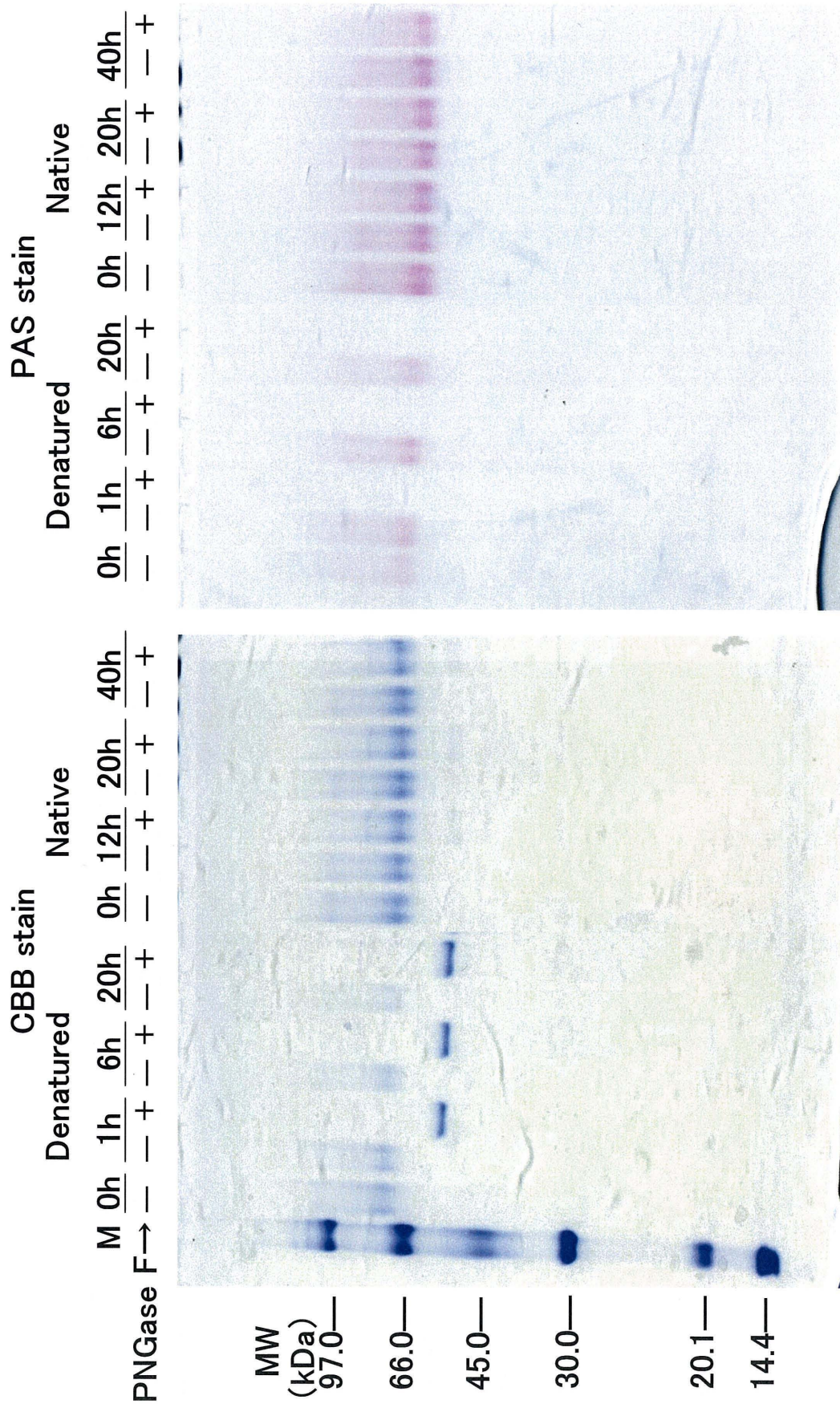


Fig. 5-1 SDS-PAGE of glucoamylase (from *Hikami*-type strain) incubated with PNGase F

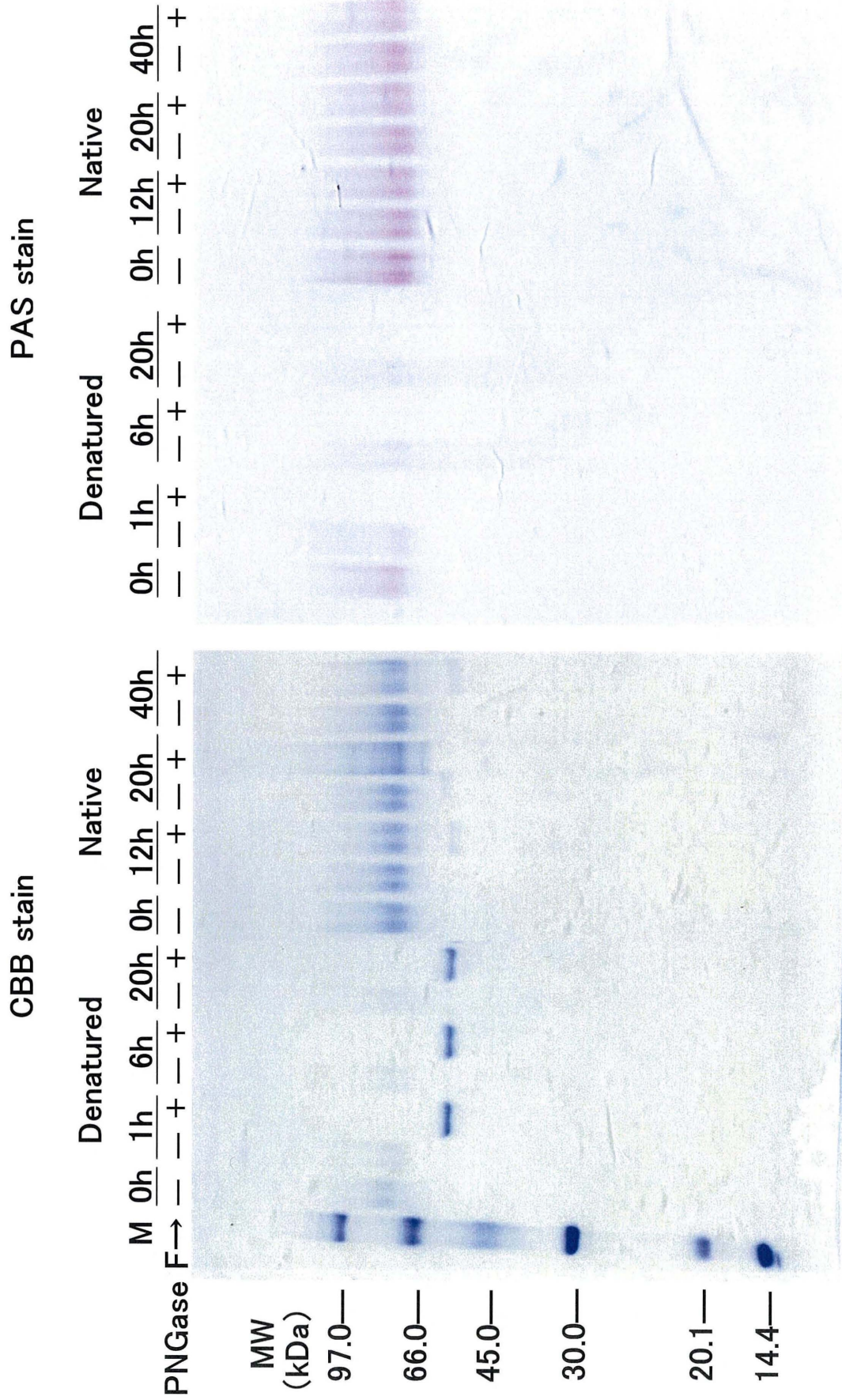


Fig. 5-2 SDS-PAGE of glucoamylase (from H-1 strain) incubated with PNGase F

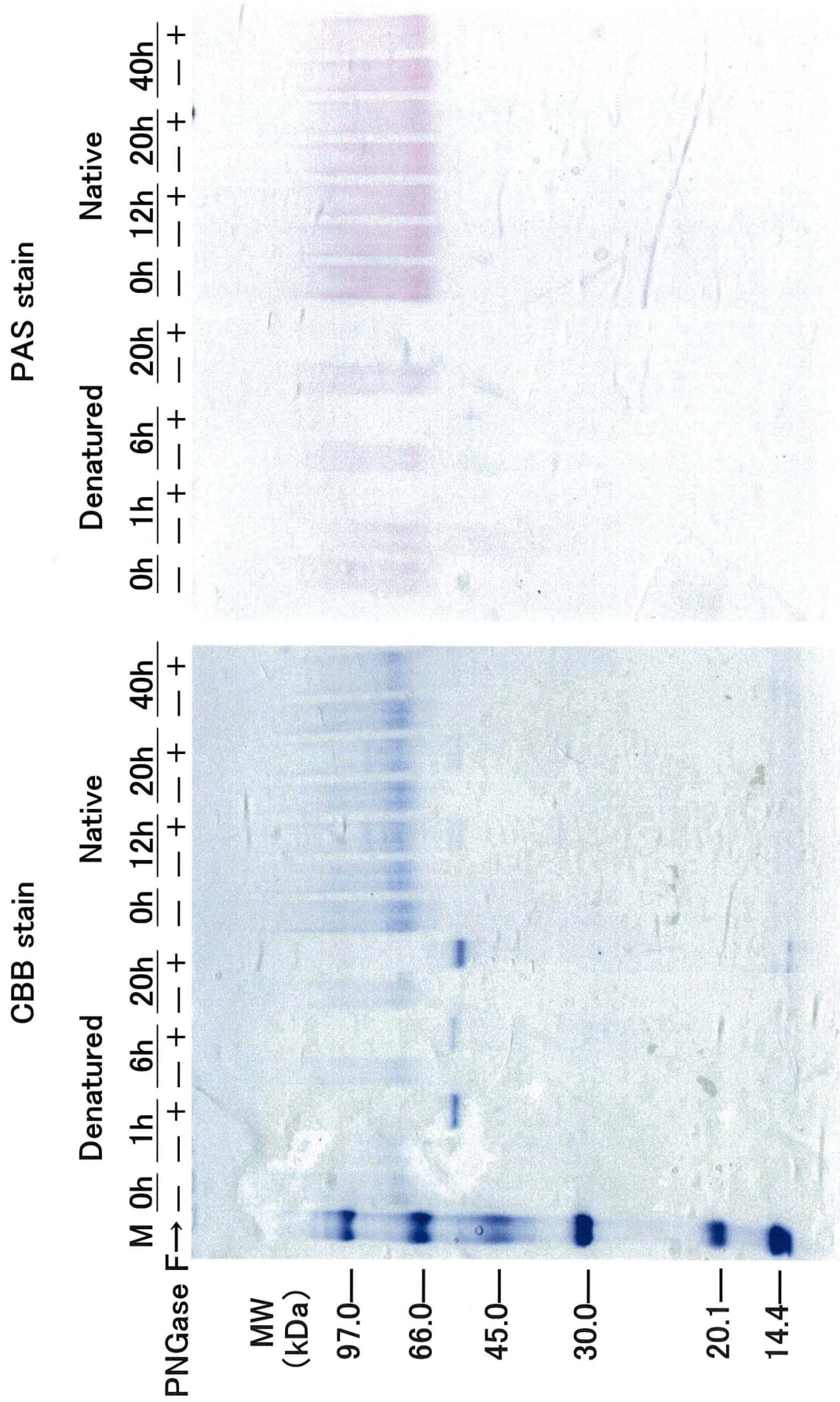


Fig. 5-3 SDS-PAGE of glucoamylase (from *Ginka* strain) incubated with PNGase F

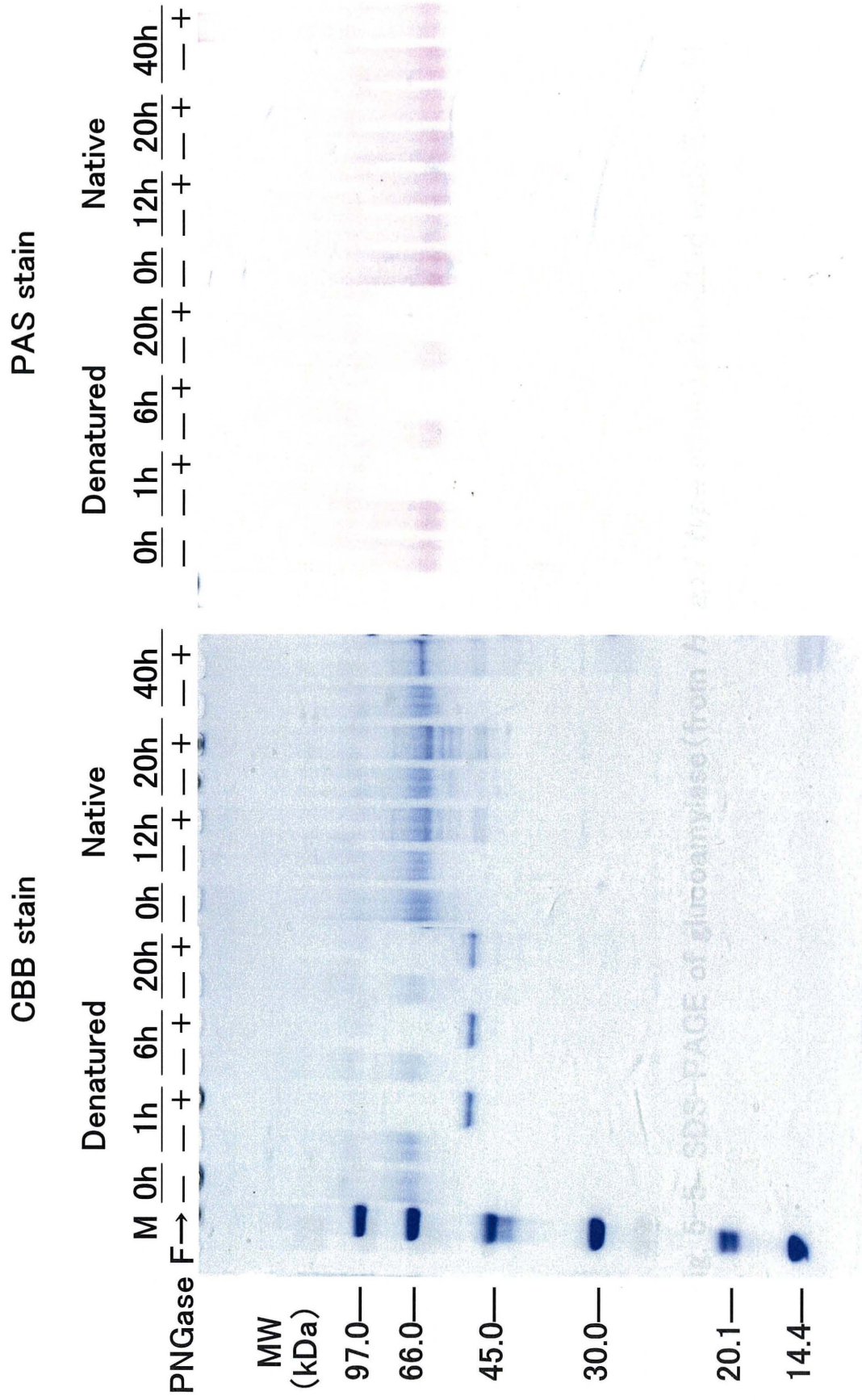


Fig. 5-4 SDS-PAGE of glucoamylase (from G-4 strain) incubated with PNGase F

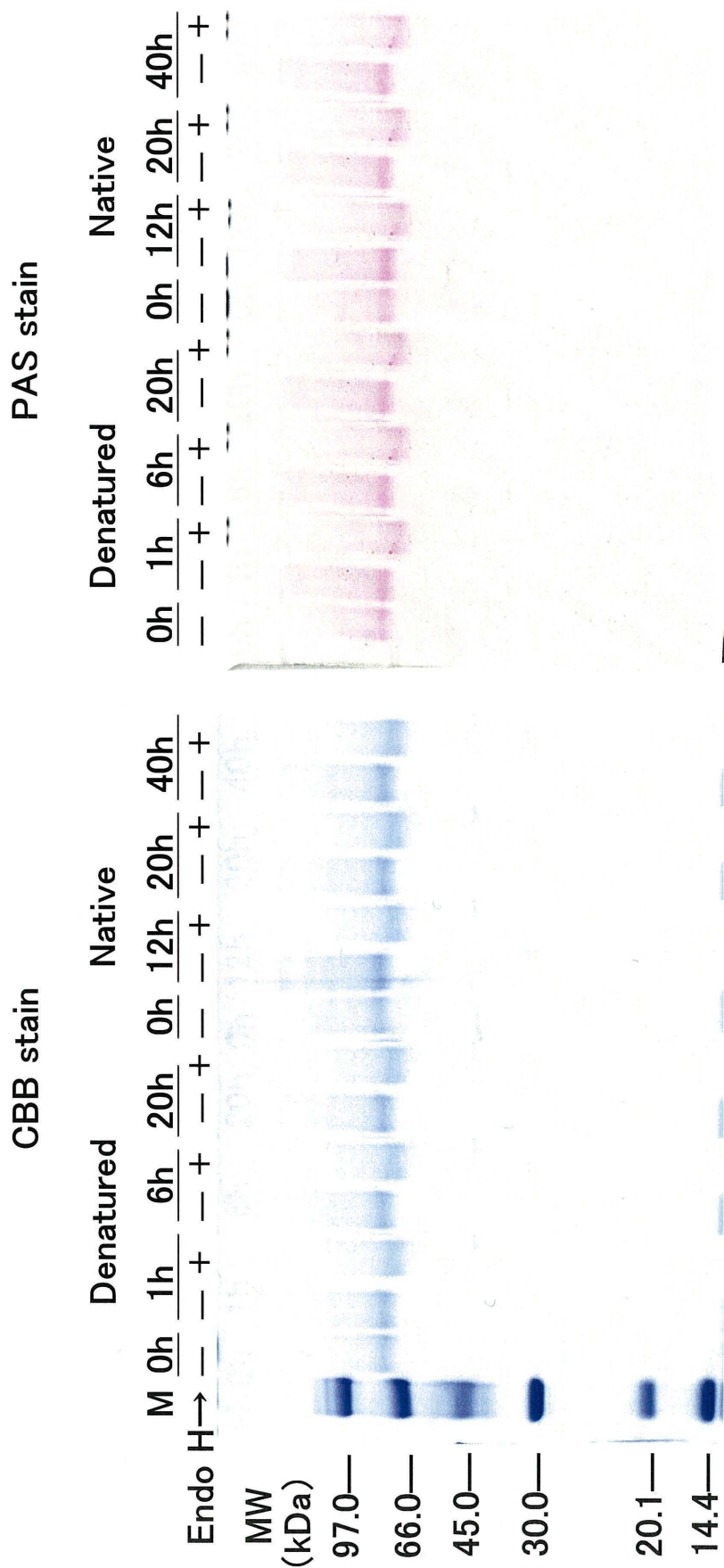


Fig. 5-5 SDS-PAGE of glucoamylase (from *Hikami*-type strain) incubated with Endo H





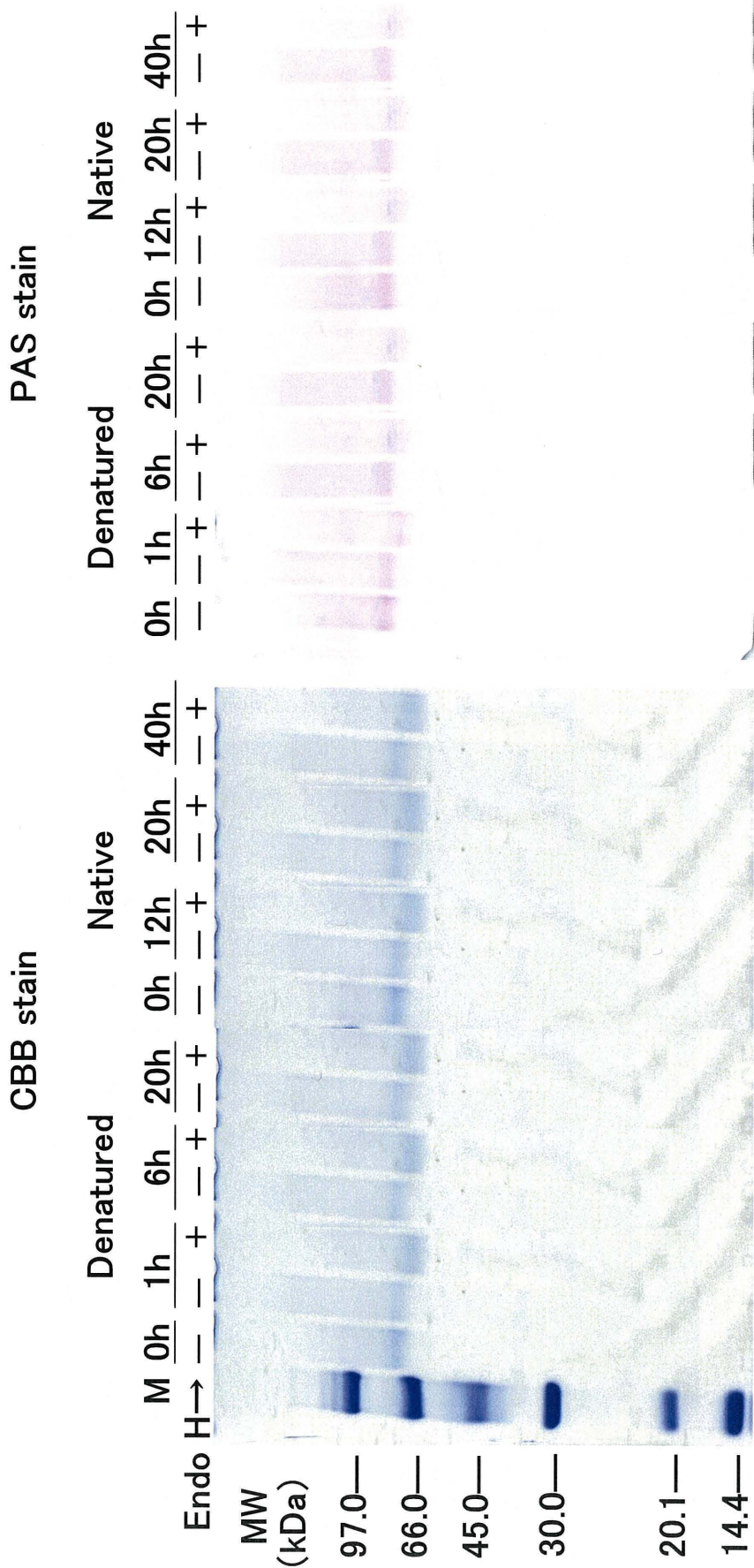


Fig. 5-7 SDS-PAGE of glucoamylase (from *Ginka* strain) incubated with Endo H

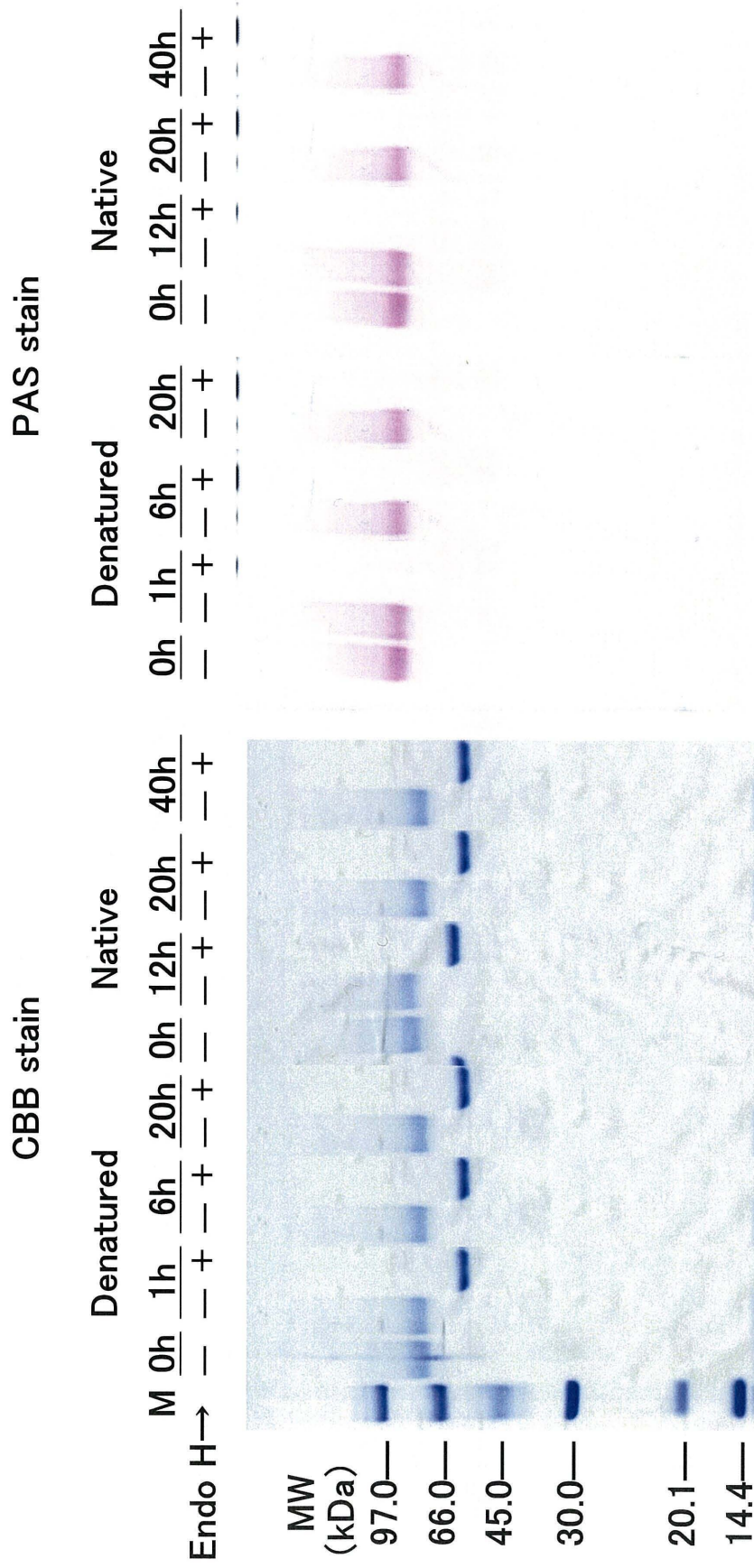


Fig. 5-8 SDS-PAGE of glucoamylase (from G-4 strain) incubated with Endo H

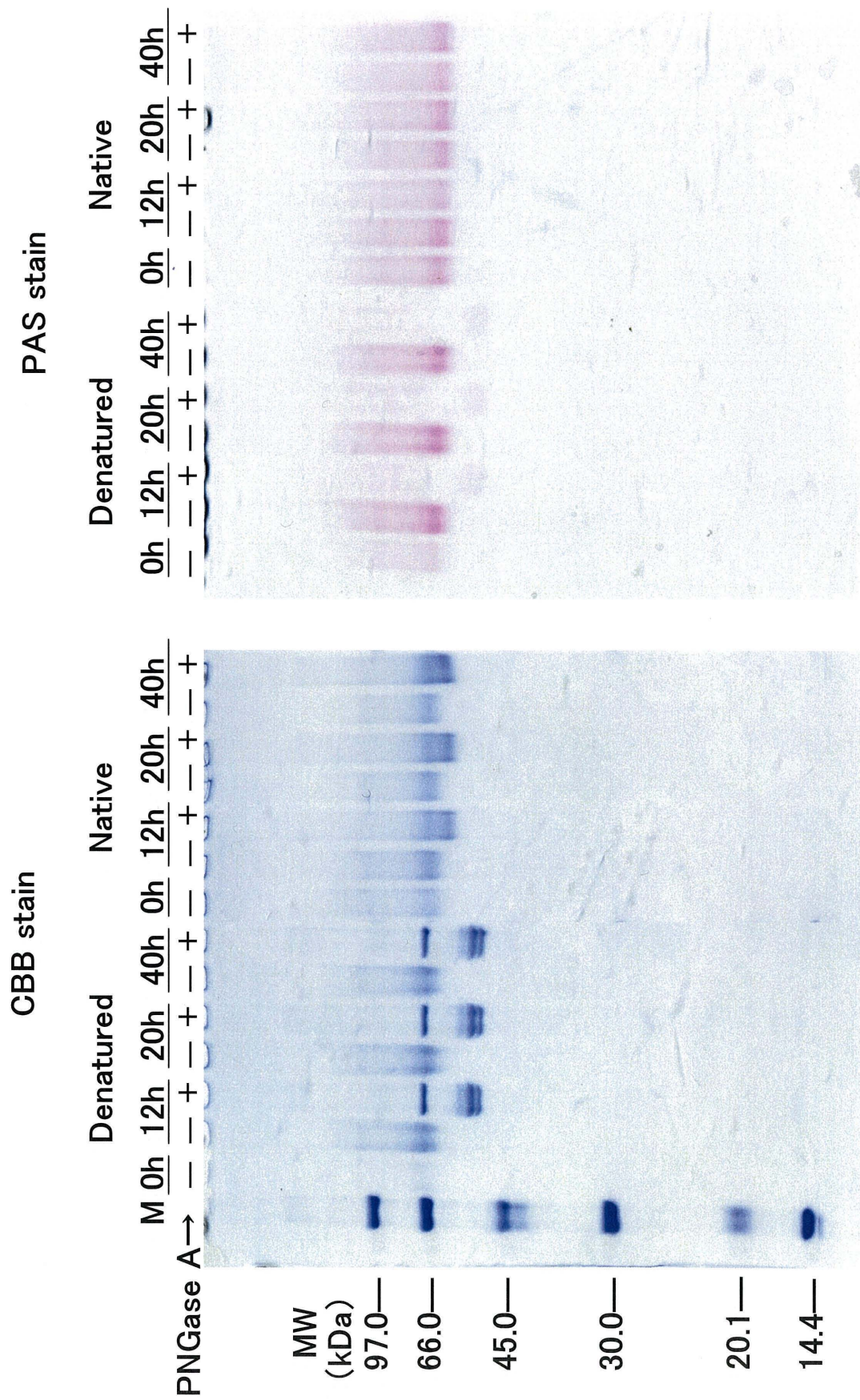


Fig. 5-9 SDS-PAGE of glucoamylase (from *Hikami-type* strain) incubated with PNGase A

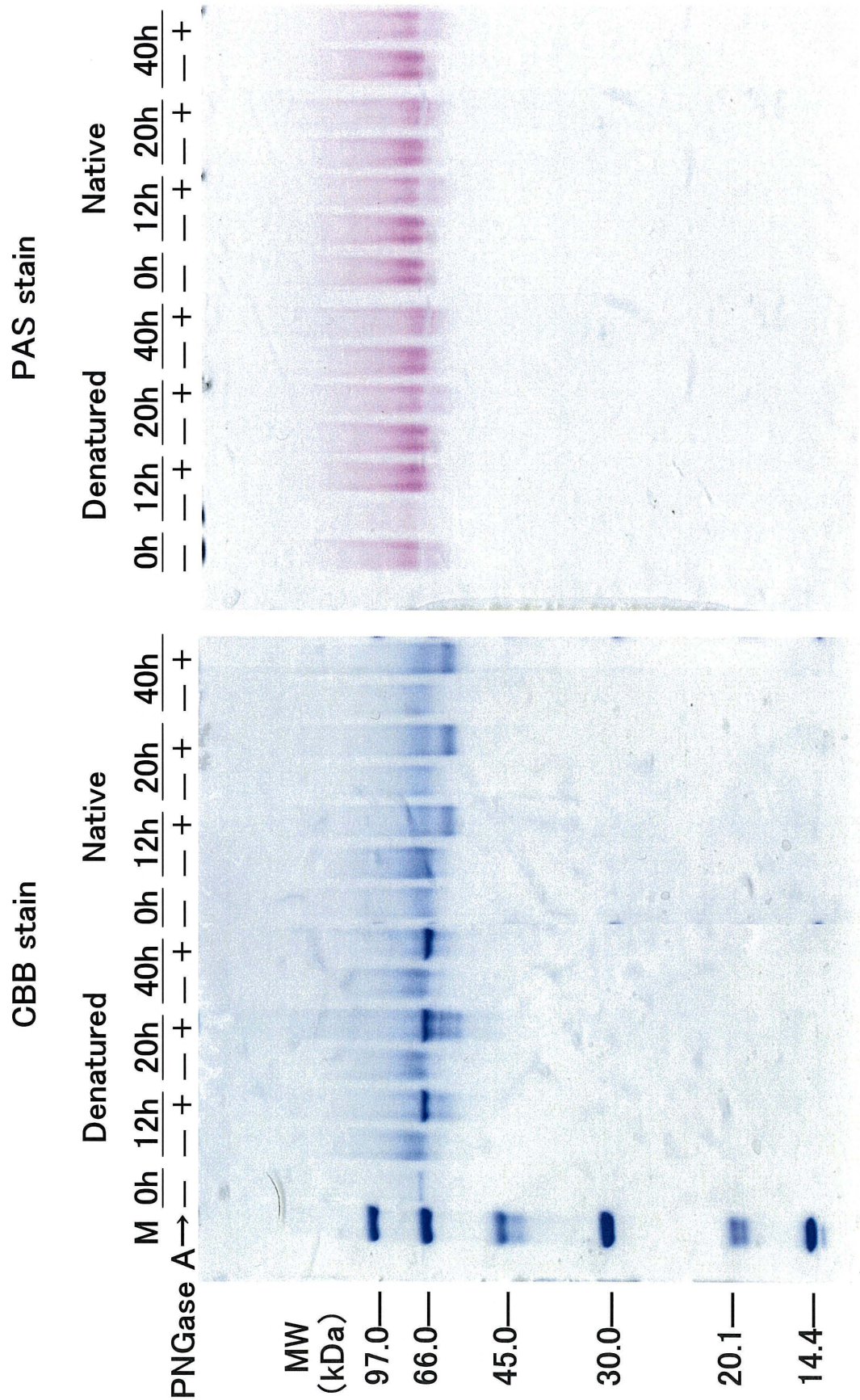


Fig. 5-10 SDS-PAGE of glucoamylase (from H-1 strain) incubated with PNGase A

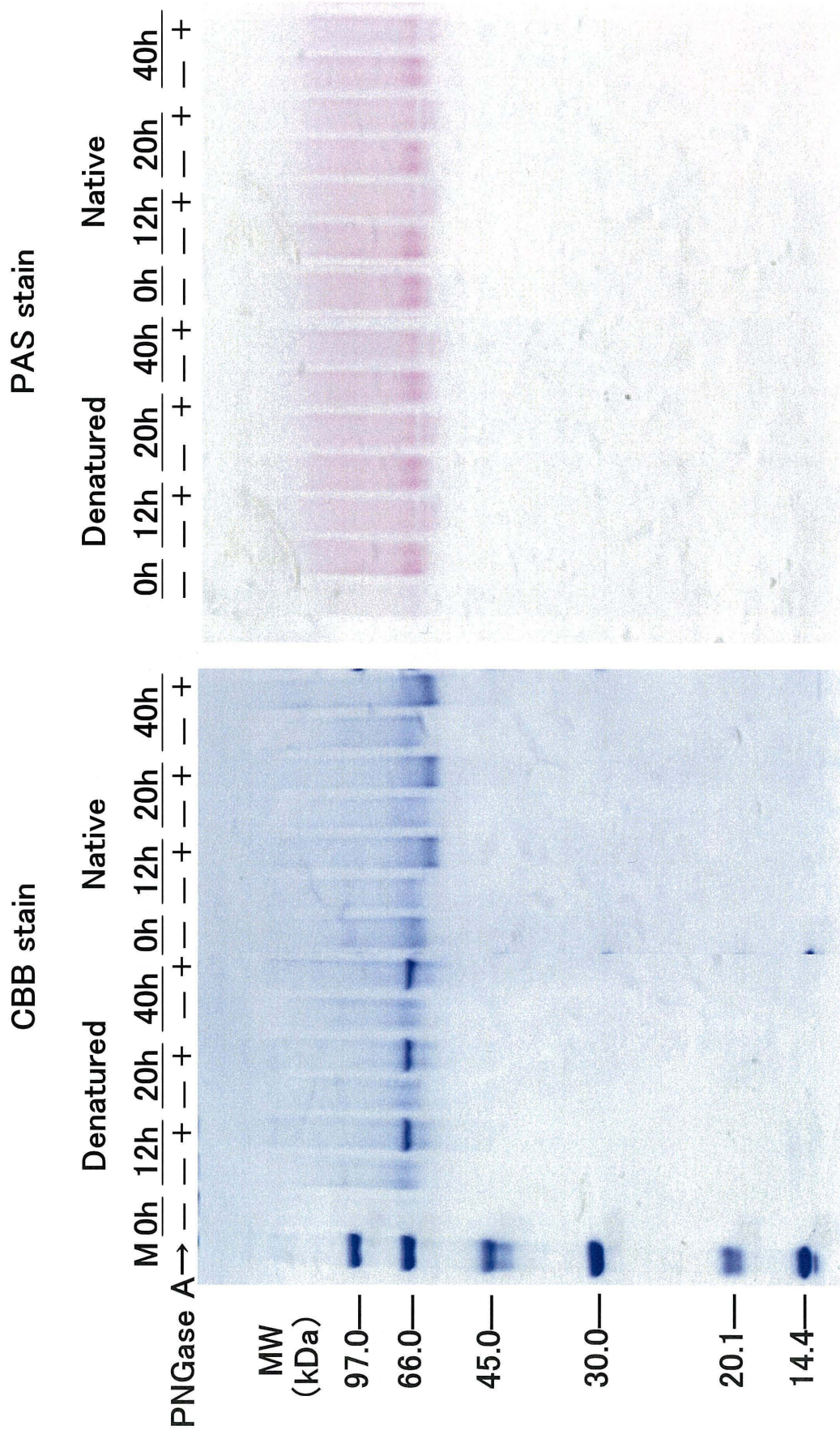


Fig. 5-11 SDS-PAGE of glucoamylase (from *Ginka* strain) incubated with PNGase A

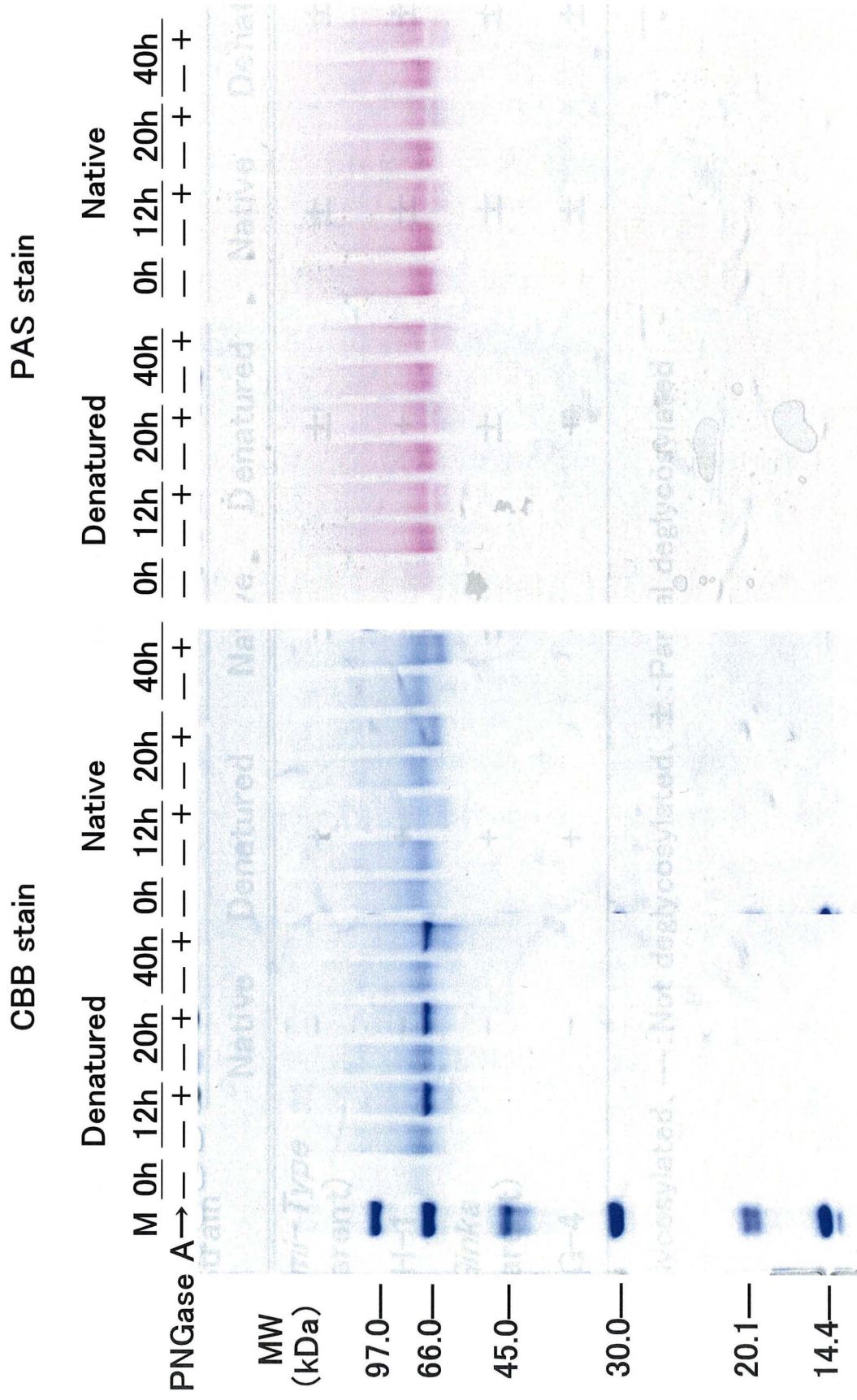


Fig. 5-12 SDS-PAGE of glucoamylase (from G-4 strain) incubated with PNGase A

Table 5-2 Deglycosylation treatment of glucoamylases from parent strains and mutant strains

Strain	PNGase F		Endo H		PNGase A	
	Native	Denatured	Native	Denatured	Native	Denatured
<i>Hikami-Type</i> (parent)	-	+	±	±	±	±
H-1	-	+	+	+	±	±
<i>Ginka</i> (parent)	-	+	±	±	±	±
G-4	-	+	+	+	±	±

± : Deglycosylated, — : Not deglycosylated, ± : Partial deglycosylated