

新規耐熱性β-1,3 グルカナーゼの諸性質

○種子田艶、四方孔、田中寿枝、岩田英之、鹿島康浩
(株式会社耐熱性酵素研究所)

多糖の一種、β-1,3グルカンは菌類や細菌、植物の細胞壁を構成する成分のひとつである。これを分解するβ-1,3 glucanaseは細胞融合、形質転換、細胞のプロトプラスト化といったバイオテクノロジーにおける試薬や病原菌の殺菌剤として、或いはビールやワイン醸造の過程で幅広く用いられる。また、近年β-1,3グルカンを部分分解した産物に生理活性が認められたこと、β-1,3グルカンを含む海藻類や酵母細胞壁はバイオマスとして有効利用が期待されていることなどから、今後様々な分野でさらなる高活性を有するβ-1,3 glucanaseの開発が望まれると考えられる。

一方工業的には、高い安定性を有し、高温で処理することで触媒作用を高め雑菌の混入を防ぐこともできるという理由から、耐熱性酵素がよく利用される。そこで我々は好熱菌からβ-1,3 glucanaseを取得し、組換えタンパクとして大腸菌で発現させた後に精製し、これらの酵素の酵素化学的特性について検討を行った。

データベースで得られた情報をもとに、好熱菌から4つの耐熱性β-1,3 glucanase、YK1、YK2、TT1、TT2をクローニングした。

大腸菌で発現させたこれらの酵素を基質溶液(0.5% ラミナリン、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液)に加え、至適温度にて5分間反応させた後、ソモギー・ネルソン法で活性を測定した。活性は1分間で1mgのグルコースに相当する還元力を生成する酵素量を1Uとする。

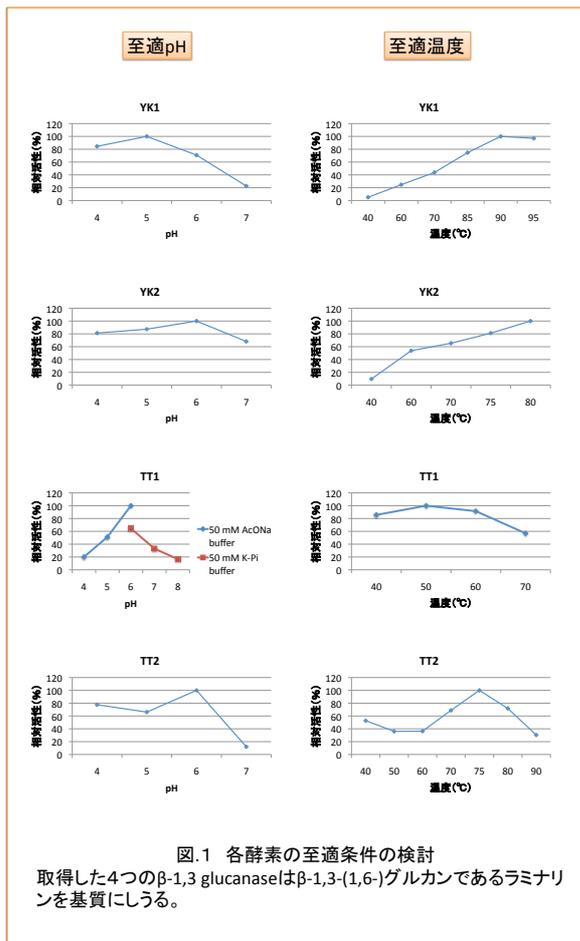


図.1 各酵素の至適条件の検討

取得した4つのβ-1,3 glucanaseはβ-1,3-(1,6-)グルカナーゼであるラミナリンを基質にする。

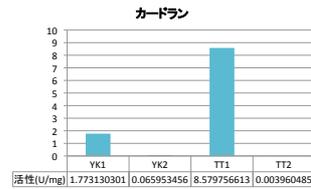


図.2 β-1,3グルカンを基質とした場合の比活性
各酵素を用いて、ラミナリン、カードラン、酵母β-グルカンへの活性の有無を検討した。TT2は低いレベルではあるがβ-1,3グルカナーゼに活性を示した。

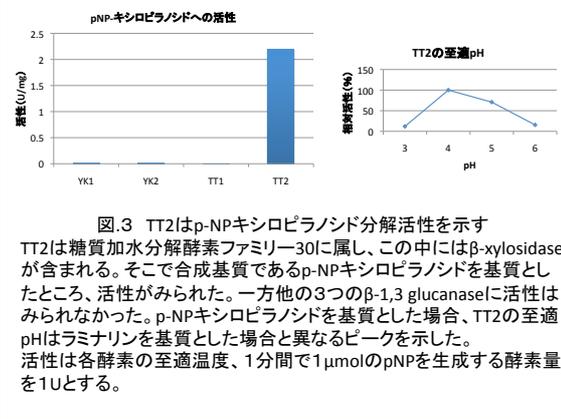


図.3 TT2はp-NPキシロピラノイド分解活性を示す
TT2は糖質加水分解酵素ファミリー30に属し、中にはβ-xylosidaseが含まれる。そこで合成基質であるp-NPキシロピラノイドを基質としたところ、活性がみられた。一方他の3つのβ-1,3 glucanaseに活性はみられなかった。p-NPキシロピラノイドを基質とした場合、TT2の至適pHはラミナリンを基質とした場合と異なるピークを示した。活性は各酵素の至適温度、1分間で1μmolのpNPを生成する酵素量を1Uとする。

Table 1. 各酵素の様々な基質への活性

| 基質 | YK1 | YK2 | TT1 | TT2 |
|----------------------|-----|-----|-----|-----|
| アビセル | ND | ND | - | ND |
| CMC | - | - | - | - |
| ラミナリン | + | + | +++ | + |
| カードラン | + | ± | ++ | - |
| 酵母β-グルカン | ± | - | ± | ± |
| p-NPキシロピラノイド | - | - | - | +++ |
| キシラン | ND | ND | ND | - |
| <i>S. cerevisiae</i> | - | ND | - | - |

まとめ

データベースで得られた情報をもとに、好熱菌から4つの耐熱性β-1,3 glucanaseについて組換えタンパクを作製し、その諸性質について検討を行った。この中でTT2はβ-1,3-(1,6-)グルカナーゼであるラミナリンとp-NPキシロピラノイドに対する活性を示した。TT2がキシロシダーゼ活性を有する可能性が見いだされたので、キシランあるいは他β-1,4-グルカナーゼを基質として活性測定を行ったが、活性はみられなかった。

今後はキシロトリオースを基質としてTT2による加水分解産物を決定しキシロシダーゼ活性の有無を明らかにすること、またβ-1,3-1,4-グルカナーゼ活性の検討などを行ってきたい。