

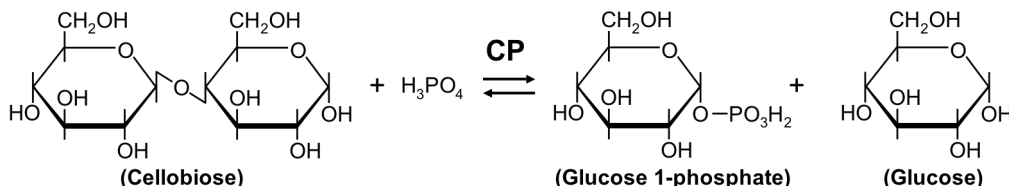
*Ruminococcus albus* NE1 株由来セロビオース資化性酵素の  
精製と酵素化学的諸性質の解析

食品安全・機能性開発学講座 機能性食品変換学分野  
河内 慎平

**【背景と目的】** *R. albus* はルーメン内の主要なセルロース資化性菌と考えられ、セルロース代謝に関する研究が幅広く行われてきた。本研究室においても、セルロース系バイオマスの有効利用を目指し cellobiose epimerase (CE) の同定および構造と機能に関する研究を進めてきた。*R. albus* NE1 菌体内より CE を精製する際、基質として用いたセロビオースの分解および転移活性を示す画分を見いだした。そこでセルロース資化に関わる新たな酵素活性と位置づけ、その活性を示す酵素の同定と諸性質の解析を行った。加えて、その酵素タンパク質をコードする遺伝子断片の取得も試みた。

**【方法】** 培養液 12 L から得られた菌体を破砕し、粗酵素液を得た。各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製し、薄層クロマトグラフィーによる定性的評価により、目的とする活性画分を回収した。精製酵素の酵素化学的諸性質および N 末端アミノ酸配列を解析した。N 末端アミノ酸配列からデータベース検索により類似タンパク質の相同配列を取得し、その情報をもとにプローブを作製した。サザンブロット解析および inverse PCR により得られた増幅断片の塩基配列を解析することで本酵素をコードする遺伝子断片を取得した。

**【結果】** 各種クロマトグラフィーにより、*R. albus* NE1 株の培養菌体から目的の酵素タンパク質を、電気泳動的に均一な標品として得た。本酵素はセロビオースから、グルコースあるいはセロトリオース、セロテトラオースを生成した。また、この活性は緩衝液にリン酸緩衝液を用いた時のみに検出されたことから、cellobiose phosphorylase (CP; EC 2.4.1.20) であると考えられた。精製 CP は最終的に 4.7 mg 得られ、比活性は 31.7 U/mg であった。CP の至適 pH は pH 6, pH 安定性は pH 4-8, 至適温度は 50°C, 温度安定性は 45°C 以下であることが明らかになった。また、反応速度論的解析を行った結果、セロビオースに対する  $K_m$  は 1.2 mM,  $V_{max}$  は 34.1 U/mg であった。基質特異性に関しては、 $\beta$ -1,4 結合を有するオリゴ糖に広く作用するものの、ガラクトースは認識しないことが明らかになった。一次構造の解析結果から、CP は 2469 bp からなる 822 アミノ酸残基の ORF にコードされていることが明らかになった。



**【結論及び考察】** *R. albus* NE1 株由来 CP を同定し、酵素化学的諸性質を明らかにした。同定した CP は糖転移方向の反応性が高く、セロオリゴ糖を基質とすること、さらにマンノビオースにも作用する点など、これまでの CP の報告にはない新たな知見が得られた。本 CP は、セロデキストリンのみならずマンナンを含む細胞壁多糖の取込や代謝に関与するものと考えられる。今後、*R. albus* NE1 株 CP の構造と他の CP の構造との比較や部位特異的変異導入などにより、異なる基質特異性を示す原因を明らかにしていく必要がある。