

# *Ruminococcus albus* NE1 株由来 cellobiose phosphorylase の 大腸菌による組換え酵素の生産と諸性質の解析

共生基盤学専攻 機能性食品変換学  
阿部 正太郎

(背景と目的) 反芻動物は一般に 4 つの胃を持つことで知られ、それぞれに異なる機能を備える。第一胃のルーメンでは胃酸や消化酵素の分泌は無く、微生物による発酵分解が主である。このためルーメン内では、細菌、原生動物、真菌およびバクテリオファージなど多種類の微生物が相互に関連しながら生息している。*R. albus* は、1957 年 Hungate が *Ruminococcus* 属の新たな種として分類したルーメン細菌である。ルーメン内の主要な cellulose 分解菌と考えられており、多くの cellulose 分解酵素を菌体外に分泌する。菌体内に取込まれた cellulose 分解物はさらに分解され利用される。*R. albus* の無抽出液中におけるセロビオースの加リン酸分解活性は、加水分解活性の 9 倍高く、cellulose 代謝にセロビオースホスホリラーゼ (CP) が大きく寄与することが報告されている。しかし、CP の単離は行われておらず、酵素機能は明らかにされていなかった。そこで本研究では *R. albus* の無細胞抽出液より CP の精製を行い、酵素の諸性質と一次構造を明らかにしてきた。本研究では CP の大腸菌による組換え酵素生産系を構築し、得られた酵素の諸性質を明らかにする事を目的とした。

(結果) 発現プラスミドで形質転換した *Escherichia coli* BL21 (DE3) を用い、組換えタンパク質の生産を 0.1 mM isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside により 30°C で 6 時間誘導した。可溶性画分と不溶性画分に分離し、それぞれ SDS-PAGE に供したところ、可溶性画分に目的のサイズ (96 kDa) のバンドが確認された。培養液 500 mL から CP 精製を行った結果、2.85 mg, 比活性 17.6 U/mg の精製 CP を得た。これを用いて加リン酸分解活性に対する pH と温度の影響を調べた。至適 pH は 6.2, pH 安定域は 5.0~8.6, 至適温度は 50°C, 温度安定域は 45°C 以下であった。また cellobiose および phosphate に対する速度パラメータを測定し Lineweaver-Burk プロットを作成した。得られたプロットより算出した CP の cellobiose に対する速度パラメーターは、 $K_{mA}$  値は  $3.93 \pm 0.2$  mM,  $K_{mB}$  値は  $1.02 \pm 0.1$  mM,  $K_{1A}$  値は  $15.0 \pm 1.0$  mM,  $k_{cat}$  は  $98.8 \pm 5.0$  sec<sup>-1</sup> と算出された。また加リン酸分解反応における生成物による阻害を検討するため、glucose および  $\alpha$ -glucose-1-phosphate (G 1-P) の存在下にて、cellobiose に対する反応速度を測定し、Lineweaver-Burk プロットを作成した。得られた直線群から、G 1-P は phosphate を拮抗的に阻害し、その他の組み合わせは混合型の阻害を示した。以上より CP による加リン酸分解反応は ordered bi bi 機構に従い、phosphate, cellobiose の順で CP に結合し、glucose, G 1-P の順に遊離することが明らかになった (Figure 1)。

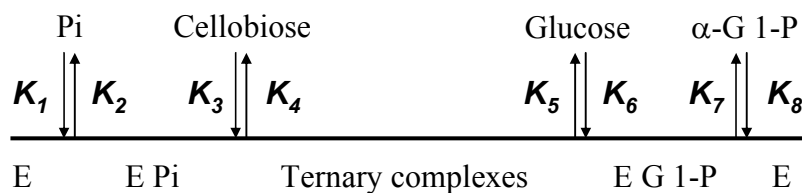


Figure 1. Ordered kinetic mechanism of CP from *R. albus* NE1.