

中等度好熱性アルカリ細菌 *Bacillus* sp. AAH-31 株由来 α -アミラーゼ のクローニングおよび酵素化学的諸性質

食品安全・機能性開発学講座 機能性食品変換学分野

向井 惇

(背景と目的) α -アミラーゼは、デンプン糖化産業を始めとした幅広い産業で利用されている。特に *Bacillus* 属細菌が生産する液化型アルカリ α -アミラーゼは、デンプン汚れを分解する目的で洗剤に添加されてきた。しかし、高温、アルカリ性での使用が求められている自動食器洗浄機の普及に伴い、従来の酵素製剤の耐熱性の乏しさが問題となってきた。そこで我々は、耐熱、耐アルカリ性 α -アミラーゼ分泌性を指標に、好熱性アルカリ細菌を土壌から探索し、*Bacillus* sp. AAH-31 株を取得した。本研究では、当該菌株より α -アミラーゼ (31Amy) 遺伝子をクローニングし、大腸菌による組換え酵素の諸性質を解析した。

(結果および考察) *Bacillus* sp. AAH-31 株より単離した 31Amy 遺伝子配列からの推定アミノ酸配列は、793 アミノ酸からなり、C 末端側にネオプルラナーゼ様配列が見出された。ネオプルラナーゼはプルランを加水分解してパノースを生成する酵素であり、 α -アミラーゼと構造類似性を示す。ネオプルラナーゼなど α -アミラーゼとの配列類似性を示す酵素は、 α -アミラーゼファミリーと呼ばれる酵素群を形成しており、一次構造中に活性中心の形成に関わる 4 つの保存領域を持つが、31Amy では保存領域 II に存在する求核触媒残基の C 末端側に隣接する残基が特徴的であった。すなわち同ファミリーの多くの酵素が Ala もしくは Val を持つのに対して、31Amy は Tyr を有していた。一方 C 末端領域とは異なり、N 末端領域はネオプルラナーゼとは全く配列類似性を示さず、N 末端側から 77 番目までのアミノ酸配列が炭水化物結合モジュール 20 に分類される糖結合ドメインとわずかに配列類似性を示した。このことから 31Amy はネオプルラナーゼ様の触媒ドメインと、基質結合を担う N 末端ドメインからなると考えられた。

次に、大腸菌により組換え 31Amy (r31Amy) を C 末端 His タグタンパク質として生産し、定法により精製した。r31Amy は pH 8.2, 75°C において最大活性を示した。ゲル濾過クロマトグラフィーと SDS-PAGE から r31Amy はおよそ 95 kDa の単量体であることが明らかとなった。この点は単量体で機能する唯一のネオプルラナーゼである *Thermoactinomyces vulgaris* 由来 α -アミラーゼ I と一致した。

r31Amy はアミロースなどの α -1,4 結合からなる直鎖状基質に加えて、ネオプルラナーゼと同様にシクロデキストリンに対しても活性を示した。しかし、r31Amy はネオプルラナーゼとは異なり、プルランには全く活性を示さなかった。一連の重合度のマルトオリゴ糖への反応効率は、重合度 8 までは重合度の増加に伴って増加したが、平均重合度 17 のアミロースへの反応効率はマルトオクタオースと同等であった。このことから r31Amy のサブサイトは 8 個であると推定された。*p*-ニトロフェニル α -マルトペンタオシドからは、アグリコンとして *p*-ニトロフェニル α -グルコシドおよび *p*-ニトロフェニル α -マルトシドが主として生成したことから、r31Amy は切断部位から非還元末端側（－側）に 5 つ、還元末端側（＋側）に 3 つのサブサイト、もしくは－側に 4 つ、＋側に 4 つのサブサイトを有すると考えられた。