

Klebsiella pneumoniae 9-3B 由来のフィチン酸からイノシトールを

生成するフィターゼに関する研究

生命分子化学講座 応用菌学分野

大谷 翠

【目的】 土壌から単離されたグラム陰性細菌 *Klebsiella pneumoniae* 9-3B はフィチン酸が唯一の炭素・リン源である改変最少培地で生育することができる。我々はすでに、この株が有するフィチン酸から全てのリン酸基を遊離させ、イノシトールを生成できるフィターゼを単離、精製した。¹⁾ 本フィターゼをクローニングし、大腸菌を用いて発現することにより、酵素科学的特性を解明することを目的とした。

【方法と結果】 精製フィターゼの N 末端アミノ酸配列を解析し、得られた配列をもとに相同性検索を行った。その配列からプライマーを設計し、*K. pneumoniae* 9-3B のゲノム DNA を鋳型としてクローニングを行った。その結果、*K. pneumoniae* 342 由来の oligogalacturonide ABC transporter, periplasmic pectic oligomer-binding protein (TogB) と 99% の相同性を持つことがわかった。TogB は約 45 kDa の大きさを持ち、ABC トランスポーターにおいて、ガラクトuron酸誘導体の認識に関与するタンパク質である。TogB 遺伝子を pET28(b) に挿入し、大腸菌 BL21(DE3) を用いて IPTG 誘導により発現を行った。His-tag を用いたアフニティクロマトグラフィにより TogB を精製し、フィターゼ活性を測定したが、フィターゼ活性を確認することはできなかった。

バクテリア由来のフィターゼは 40 kDa 周辺のサイズを示すことがあるため、*K. pneumoniae* 9-3B からの精製の際、TogB とは別のフィターゼが同じ画分に混在した結果として、フィチン酸からイノシトールが生成した可能性について検討した。*K. pneumoniae* 9-3B が有するフィターゼを発現させるために、*K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 1084 が有する 3-phytase の配列をもとにプライマーを設計し、クローニングを行った結果、*K. pneumoniae* 342 が有するヒスチジン酸ホスファターゼ (HAP) と 100% のアミノ酸配列の相同性を持つフィターゼ遺伝子が得られた。この HAP を大腸菌で発現させたところ、約 45 kDa のサイズを持ち、フィターゼ活性を有していたが、イノシトールを生成することはなかった。そこで、*K. pneumoniae* 9-3B 由来生成フィターゼがフィチン酸からイノシトールを生成した要因として二つの仮説を立てた。一つ目は、過剰なフィターゼ存在によるイノシトールの生成、²⁾二つ目は、フィターゼと TogB の相互作用によるイノシトールの生成である。この二つの仮説についてそれぞれ検証したところ、両方の反応系において、フィチン酸の約 9 割がイノシトールへと変換されるという結果を得た。現在、フィチン酸からイノシトールへの変換の詳細を解析中である。

1) Lotis, E. *et al.* J. Biosci. Bioeng. **113**, 562-567. (2012)

2) Żyła, K *et al.* Poultry Science. **91**, 1915-1927. (2012)