

Ruminococcus albus NE1 株由来 β -1,4-マンナナーゼの同定 および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
阪本 安希

(背景と目的)

R. albus はウシなどの反芻動物の第一胃(ルーメン)に生育する偏性嫌気性細菌である。本菌はセルロース分解菌としてよく知られており、セルロース分解に関する酵素は多数同定されている。一方、同じく植物の細胞壁を構成するマンナンについては、最近本菌株による資化性が確認され、菌体内での代謝に関わる鍵酵素が同定された。しかし、*R. albus* 7 のゲノムには 8 つの菌体外 β -マンナナーゼ様遺伝子が存在しており、これらの酵素によるマンナンの初期分解過程は不明である。そこで本研究では *R. albus* NE1 株の培養上清より β -マンナナーゼを精製、同定し、大腸菌による組換え酵素の諸性質を明らかにした。

(結果および考察)

グアーガムまたはグルコースを炭素源として、それぞれ培養した *R. albus* NE1 株の培養上清のタンパク質を硫酸沈殿により回収し、 β -1,4-マンナン分解活性を TLC 解析した。その結果、グアーガム炭素源の培養上清からのみ重合度 4 までのマンノオリゴ糖が検出された。このことからグアーガムを炭素源とすることで、菌体外 β -1,4-マンナナーゼが誘導されることが明らかになった。

グアーガムを炭素源とした培地で *R. albus* NE1 株を培養した。粗酵素液には 2.4 g のタンパク質、1450 U の β -1,4-マンナナーゼ活性が含まれていた。粗酵素液を DEAE Toyopearl 650M による陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供した。活性画分は 7 つのピークに分かれて溶出したことから、複数の β -1,4-マンナナーゼが分泌されていると考えられた。比活性が高いピーク 1 つについてさらに精製を進め、分子量の異なる 2 つの β -1,4-マンナナーゼを精製した。一つは、7.35 U/mg, 0.039 mg の精製酵素が得られ、もう一方は、7.02 U/mg, 0.120 mg の精製酵素が得られた。この 2 つの β -1,4-マンナナーゼの N 末端アミノ酸配列は、*R. albus* 7 株の β -1,4-マンナナーゼ(Rumal_0327; RaM)のアミノ酸配列の N 末端より 30 番目のアミノ酸残基から 44 番目のアミノ酸残基に一致した。

Rumal_0327 を PCR により取得し、発現プラスミドを作製した。大腸菌を用いて組換え酵素(rRaM)を生産させ、精製した。rRaM の比活性は 55.5 U/mg であり、ネイティブ酵素に比べ比活性が 7.7 倍高かった。rRaM の至適 pH は 5.5 であり、至適温度は 45°C であった。 β -1,4-マンナン、グルコマンナンおよび、ガラクトマンナンに対する、速度パラメータを算出した。 k_{cat} は、それぞれ 80.9 s⁻¹, 353 s⁻¹ および、68.4 s⁻¹ であり、 K_m は 2.5 mg/ml, 2.0 mg/ml および、2.3 mg/ml であった。TLC 解析により rRaM は β -1,4-マンナンから重合度 4 以下のマンノオリゴ糖を生成し、反応初期には 4 糖を主として生成することが示された。最終生成物は 2 糖以下だったことから、3 糖が最小基質であった。