

〔生物工学会誌 第76巻 第5号 200-204, 1998〕

## ノ ー ト

*Streptomyces* sp. No. 499 によって生産される  $\beta$ -*N*-アセチル  
ヘキソサミニダーゼの精製と性質

藤森 光弘\*・沖谷 明紘

日本獣医畜産大学食品工学科  
〒180-8602 東京都武蔵野市境南町

(平成9年10月8日受付 平成10年2月9日受理)

Purification and Characterization of  $\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidase from  
*Streptomyces* sp. No. 499 —Note—MITSUHIRO FUJIMORI\* and AKIHIRO OKITANI (*Department of Food Science and Technology, Nippon Veterinary and Animal Science University, 1-7-1 Kyonan-cho, Musashino-shi, Tokyo 180-8602*) *Seibutsu-kogaku* **76**: 200-204, 1998.

In the course of our screening program for chitinase and  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase (HexoNAcase) from the fermented broth of about 800 stock cultures of *Streptomyces* sp. isolated from soil samples, the highest amounts of both enzymes were found to be produced in the broth by *Streptomyces* sp. No. 499 isolated from a soil sample collected at Toyonaka-shi, Osaka, Japan. The enzyme was produced by *Streptomyces* sp. No. 499 cultivated with chitin as the growth substrate. HexoNAcase from the filtrate of the broth was purified by chromatography using, successively, Amberlite CG-50, P-cellulose, and Sephadex G-100 columns. The enzyme was completely purified, its purity being confirmed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The molecular weight of the enzyme was demonstrated to be 52,000 by a gel chromatography and 57,000 by SDS-PAGE. Its optimum pH and temperature for hydrolytic action were 6.0 and 55°C towards *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminide, and 5.0 and 55°C towards *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -*N*-acetylgalactosaminide. The enzyme was confirmed to readily hydrolyze chitobiose, chitotriose, and chitotetraose in that order, releasing *N*-acetylglucosamine in the mode of the exo-type hydrolase.

[Key words: *Streptomyces*, chitinase,  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase,  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase]

エビやカニを加工する際に除去される甲殻は大部分が廃棄されているが、その主成分であるキチンの高度利用が期待されている。そして近年、人工皮膚、手術縫合糸、クロマト用担体への利用が実現し、食物繊維としての効果も認められている。キチンのさらなる利用をはかるためには、その加水分解物である *N*-アセチルグルコサミンオリゴマー (キチンオリゴ糖) を生産し、それらの機能についても調査する必要がある。すでに *N*-アセチル

ルグルコサミンヘキサマー (キトヘキサオース) には抗腫瘍活性や免疫増強効果があると報告<sup>2)</sup>されている。

著者らは、キチンからのキチンオリゴ糖の大量生産は、キチンのエンド型酵素分解とその生成物であるキチンオリゴ糖のエキシ型分解によっておこなうことがもっとも効率が高いと考え、その酵素源を放線菌に求めた。各地の土壌から生産菌のスクリーニングを行った結果、培養液中にキチンにエンド型で作用するキチナーゼ (EC 3.2.1.14) とキチンオリゴ糖にエキシ型で作用する  $\beta$ -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ (HexoNAcase) (EC

\* 連絡先, Corresponding author.

3.2.1.52) を菌体外酵素として生産する一菌株を得ることができた。HexoNAcaseは動物、植物、微生物<sup>3-15)</sup>などに広く分布していることが知られており、すでに分離・精製されたものも多い。しかし、放線菌のものでは分離・精製についての報告は見当たらず、性質については菌体結合性酵素の粗酵素を用いた報告<sup>12-15)</sup>があるのみである。

本報では、本菌の生産する HexoNAcase の精製および性質について調べた結果について報告する。

キチナーゼの活性測定は、0.25 ml の酵素液に 0.02 M McIlvaine buffer (pH 6.0) に溶解した 0.025% カルボキシメチルキチン 6C (KATOKICHI 社) 溶液 1 ml を加え、50°C で 20 分間反応後、遊離した還元糖を Schales 法の変法<sup>16)</sup> で定量することによった。1 分間あたり、1  $\mu$ mol の *N*-アセチルグルコサミンに相当する還元糖を遊離する酵素量を 1 単位 (U) とした。HexoNAcase の活性測定は、0.1 ml の酵素液に 2 mM の *p*-ニトロフェニル-*N*-アセチルグルコサミニド (pNPGlcNAc) または *p*-ニトロフェニル-*N*-アセチルガラクトサミニド (pNPGalNAc) 0.2 ml と 0.1 M McIlvaine buffer (pNPGlcNAc のときは pH 6.0, pNPGalNAc のときは pH 5.0) 0.2 ml を加え、55°C で 10 分間反応後、遊離した *p*-ニトロフェノールを 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 2 ml の添加で発色させ、420 nm の吸光度で定量することによった。これを標準活性測定条件<sup>5)</sup> とした。pNPGlcNAc から 1 分間あたり 1  $\mu$ mol の *p*-ニトロフェノールを遊離する酵素量を 1 単位 (U) とした。キチンオリゴ糖分解活性の測定は、0.1 ml の酵素液に 2 mM キトビオース、キトトリオース、またはキトテトラオース 0.2 ml と 5 mM McIlvaine buffer (pH 6.0) 0.2 ml を混合、5 分間酵素反応をおこない、遊離する *N*-アセチルグルコサミンを Reissig 法<sup>17)</sup> で定量することによった。

国内各地より採取した土壌試料から純粋に分離した放線菌野生株 800 株をそれぞれスクリーニング用液体培地 (0.07% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.03% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0001% ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0001% MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.0% キチン粉末, pH 7.0) に植菌してロータリーシェーカーで 28°C, 130 rpm, 10 日間培養した。その間、24 時間ごとに培養液を採取して、キチナーゼ活性と HexoNAcase 活性 (基質は pNPGlcNAc) を測定した。その結果、豊中市で採取した一菌株 (*Streptomyces* sp. No. 499 株) の培養液中に両酵素のもっとも高い活性が認められた。そこで本菌を、150 ml の前培養培地 (0.5% グルコース, 0.5% 酵母エキス, 0.5% ベ

プトン, pH 7.0) で、前記同様ロータリーシェーカーで 48 時間培養し、滅菌水で菌体を洗浄後、30 ml の菌懸濁液を得、これを種菌とした。これを本培養液 (スクリーニング用液体培地に 0.1% グルタミンと 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えたもの) に 5% (v/v) 量接種して、ロータリーシェーカーで 28°C, 130 rpm で培養した。経時的に採取した培養液を遠心分離 (8,000 rpm, 20 分間) し、その上清の酵素活性を調べた (Fig. 1)。両酵素活性は 160 時間前後ではほぼピークに達し、以後キチナーゼ活性の低下はみられなかったが、HexoNAcase 活性は急激に低下した。そこで、本菌を上記本培養培地で 160 時間培養し、その上清 150 ml から HexoNAcase を精製した。

まず上清をリン酸で pH 4.0 に調整し、0.02 M McIlvaine buffer (pH 4.0) で平衡化した Amberlite CG-50 (Rohm and Haas 社) カラム (1.4×15 cm) にかけた。同 buffer でカラムをよく洗浄した後、0.1 M McIlvaine buffer (pH 8.0) で酵素を溶出したが、pH 4.2-7.0 で溶出された画分 (240 ml) に両酵素活性が認められた。pH 4.0 での失活を避けるため、この画分を、0.1 M McIlvaine buffer (pH 6.0) で透析後、pH 4.0 に調整してただちに、0.1 M McIlvaine buffer (pH 4.0) で平衡化した P-cellulose (Brown 社) カラム (1.4×13 cm) にかけた。同 buffer を含む 0-0.5 M NaCl の直線濃度勾配法で溶出したところ、HexoNAcase は 0.36 M NaCl 付近で溶出された。この活

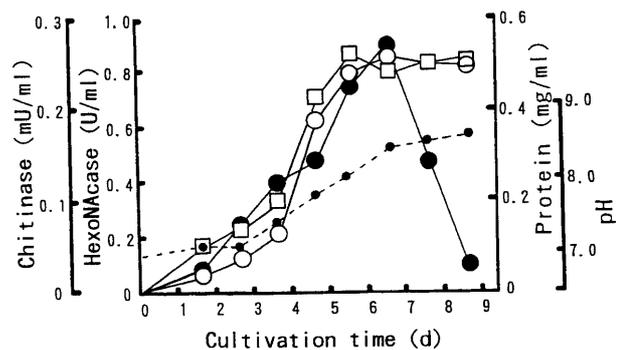


Fig. 1. Time course of production of HexoNAcase and chitinase during cultivation. *Streptomyces* sp. No. 499 was cultivated in an enzyme-producing medium, pH 7.0, containing 0.07% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.03% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>, 0.001% FeSO<sub>4</sub>, 0.0001% ZnSO<sub>4</sub>, 0.0001% MnSO<sub>4</sub>, 0.1% glutamine, 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and 1.0% carbon source (chitin powder, 65 mesh). A portion of the culture was withdrawn each day, centrifuged at 3000 rpm for 5 min, and chitinase and HexoNAcase in the supernatant were assayed with chitin and pNPGlcNAc, respectively. The protein concentration was measured by Lowry's method.<sup>18)</sup> Symbols: ○, chitinase; ●, HexoNAcase; □, protein; --●--, pH.

Table 1. Purification of  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase (HexoNAcase) from *Streptomyces* sp. No. 499.

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purity (fold)
Culture filtrate*	70.6	110.5	1.57	100	1.0
Amberlite CG-50	7.15	92.0	12.9	83.3	8.22
P-cellulose	0.348	24.7	71.0	22.4	45.2
Sephadex G-100	0.0814	22.6	278.0	20.5	177.0

\* 150 ml.

The enzyme activity was measured using pNPGlcNAc under the standard conditions.

性画分 (60 ml) をウルトラフィルター (UHP 43K, アドバンテック) で10倍まで濃縮し, 0.1 M NaCl を含む 0.1 M McIlvaine buffer (pH 6.0) で平衡化した Sephadex G-100 カラム (2.0×87.5 cm) にかけて溶出を行った. 得られた活性画分 (30 ml) にはキチナーゼ活性は認められなかった. 以上のようにして得られた精製酵素 (499E) では, 純度は粗酵素液から177倍に上昇し, その比活性は 278 unit/mg protein で, 収率は20.5%となった (Table 1).

499E は, Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィーでは, 分子量52,000の位置に溶出した. SDS-PAGE では, 分子量約57,000の単一バンドが検出され, 本酵素は単一タンパクにまで精製されたことが示された (Fig. 2).

本酵素の至適 pH は, Fig. 3 に示したように, pNPGlcNAc に対しては6.0で, pNPGalNAc に対しては5.0であった. 本酵素を各種 pH, 4°C で48時間保持したとき,

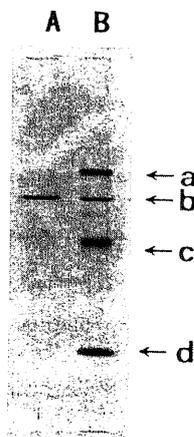


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified HexoNAcase, 499E. Electrophoresis was performed in a 12.5% polyacrylamide gel containing 0.3% SDS at a constant current of 15 mA according to Laemmli's method.<sup>19)</sup> Proteins were stained by the silver staining method. Lane A, 499E; lane B, molecular weight markers and 499E (a, bovine serum albumin, 68,000; b, 499E; c, ovalbumin, 45,000; d,  $\alpha$ -chymotrypsinogen, 25,000).

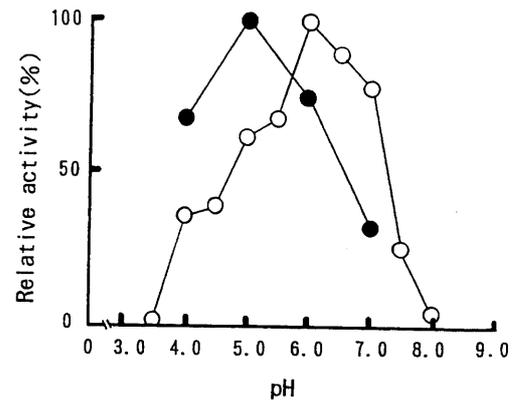


Fig. 3. Effect of pH on the activity of purified HexoNAcase. The enzyme was assayed with 4 mM pNPGlcNAc (○) or pNPGalNAc (●) in 0.1 M McIlvaine buffer of various pH values at 55°C for 10 min.

pH 6.0 でもっとも安定であった.

本酵素の至適温度は, Fig. 4 に示したように, pNPGlcNAc と pNPGalNAc のいずれに対しても 55°C であった. 酵素を 20-80°C の各温度に10分間放置後, その残存活性を調べたところ, 40°C 以下ではほとんど失活しなかったが, 60°C では31%が, 70°C では90%以上が失活した.

本酵素に 1 mM の  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ , EDTA,  $\text{ICH}_2\text{COOH}$ ,  $\text{HgCl}_2$  を加え, pH 6.0, 55°C で10分間放置後, pNPGlcNAc に対する活性を測定したところ,  $\text{HgCl}_2$  でのみ85%の阻害が認められたが, その他の化合物ではほとんど影響が認められなかった.

本酵素による pNPGlcNAc と pNPGalNAc の分解速度を基質濃度 0.25-4.0 mM の範囲で測定してミカエリス

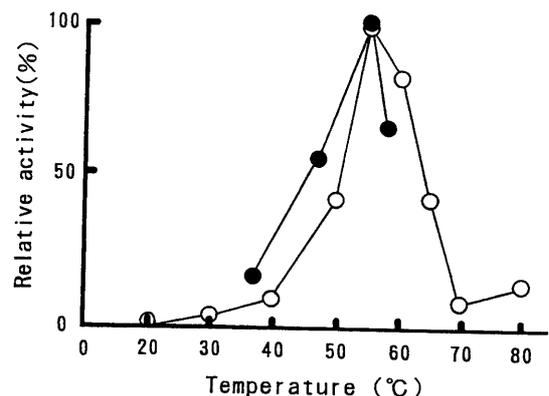


Fig. 4. Effect of temperature on the activity of purified HexoNAcase. The enzyme was assayed with pNPGlcNAc (○) and pNPGalNAc (●) in 0.1 M McIlvaine buffer of pH 6.0 and 5.0, respectively, at various temperatures for 10 min.

定数を求めたところ、pNPGlcNAc に対しては 0.33 mM で、pNPGalNAc では 0.40 mM であった。

本酵素 0.1 ml に 2 mM の基質 (pNPGlcNAc, pNPGalNAc, *p*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ジアセチルキトビオシド (pNP(GlcNAc)<sub>2</sub>), *p*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-トリアセチルキトトリオシド (pNP(GlcNAc)<sub>3</sub>), キトビオース, キトトリオース, キトテトラオース) それぞれ 0.1 ml と 5 mM McIlvaine buffer pH 6.0 (pNPGalNAc では pH 5.0) 0.1 ml を加え、55°C, 10分間反応後、各基質に対する作用程度を調べた。合成基質では *p*-ニトロフェノールの、キトオリゴ糖では *N*-アセチルグルコサミンの 1 分間あたりの遊離モル数を測定した。本酵素はキトビオースに対しては、pNPGlcNAc に対する活性値の 95%, キトトリオースに対しては 32%, キトテトラオースに対しては 26% の活性値を示した。また、pNPGalNAc に対しては 62%, pNP(GlcNAc)<sub>2</sub> では 10%, pNP(GlcNAc)<sub>3</sub> では 2.1% の活性値を示した。

本酵素をキトビオース, キトトリオースおよびキトテトラオースに作用させ、その反応物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にかけた。その結果、Fig. 5 に示したようにキトビオースからは *N*-アセチルグルコサミンのみが、キトトリオースからはキトビオースと *N*-アセチルグルコサミンが、キトテトラオースからはキトトリオース, キトビオース, *N*-アセチルグルコサミンが生成した。キトテトラオースからの生成物ではキトビオースよりも *N*-アセチルグルコサミンの量が多いことが認められた。この結果は、キトテトラオースからはキトビオースが最初に生成するのではなく、キトトリオースと *N*-アセチルグルコサミンが生成されること、つまり本酵素は糖鎖の末端に作用することが示された。このことと先に示した本酵素が pNPGlcNAc, pNP(GlcNAc)<sub>2</sub>, pNP(GlcNAc)<sub>3</sub> に作用したときに、糖鎖が長いほど *p*-ニトロフェノールの遊離が遅くなる結果とを合わせると、本酵素は糖鎖の非還元末端に作用し、*N*-アセチルグルコサミンを遊離するエキソ型であると推定された。

これまでに放線菌由来酵素については岩本ら<sup>12-15)</sup> が、*Streptomyces* sp. L-13 で存在を認め、粗酵素の段階で報告した菌体結合性酵素 (L-13) しか見当たらない。また、放線菌近縁菌では、Nanjo ら<sup>7)</sup> が *Nocardia orientalis* から精製した酵素 (NE) がある。それらの酵素と 499E を比較すると、SDS-PAGE で測定した分子量は 499E が 57,000, NE が 54,000 で両者は似ている。至適温度は、499E が 55°C, L-13 が 40°C, NE が 70-75°C であり、3 者でかなりの違いがある。pNPGlcNAc に対しての至適

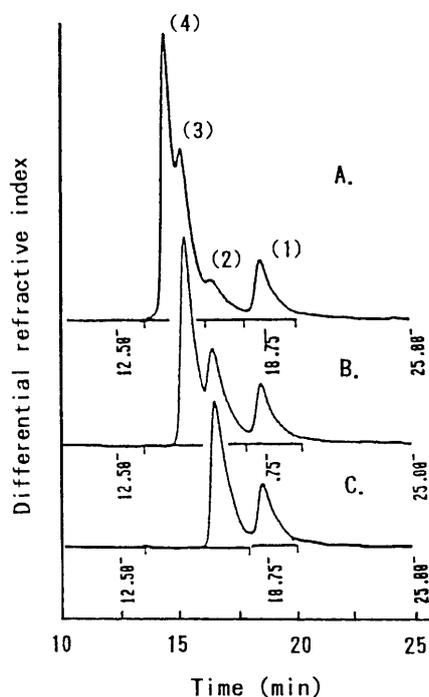


Fig. 5. Separation of enzymatic hydrolysis products of chitooligomers by HPLC. Reaction mixtures containing 0.2 ml of 2 mM of chitotetraose (A), chitotriose (B), or chitobiose (C), and 0.36 units of purified HexoNAcase in 0.2 ml of 5 mM McIlvaine buffer (pH 6.0) were incubated at 55°C for 60 min. After the reaction was stopped by boiling for 3 min, the reaction mixture were filtered through a 0.2- $\mu$ m TSK-W-type filter and 50  $\mu$ l of the filtered sample was applied onto a TSK-G-OLIGO-PW+G-OLIGO-PW column (7.8  $\times$  300 mm) and eluted with 5 mM McIlvaine buffer (pH 6.0) at a flow rate of 1.0 ml/min. The eluates was monitored by the differential refractive index. Peak assignments: (1) *N*-acetylglucosamine; (2) chitobiose; (3) chitotriose; (4) chitotetraose.

pH は、499E が 6.0, L-13 が 6.0, NE が 4.0 でいずれも酸性域である。pNPGlcNAc に対する  $K_m$  値は、499E が 0.33 mM, L-13 が 0.25 mM, NE が 0.11 mM であり、また、pNPGalNAc に対しては、499E が 0.40 mM, NE が 0.40 mM であり、いずれも似た値である。化学物質による影響は、Zn<sup>2+</sup> で 499E が 95%, L-13 が 8.1%, NE が 96% の残存活性を示し、L-13 の阻害が著しい。Hg<sup>2+</sup> では、499E が 14.4%, NE が 90% の残存活性を示し、前者の阻害が著しい。以上のように 499E は、L-13 や NE とはいくつかの点で似た性質を有する酵素であると結論される。

## 要 約

国内各地より採取した土壌試料から純粋に分離培養した放線菌 800 株を用いて、キチナーゼおよび HexoNAcase

を生産する菌株をキチン粉末を含む培地でスクリーニングした結果、豊中市で採取した土壌試料から分離した *Streptomyces* sp. No. 499 株が培養液中に両酵素をもっとも多く生産することを見いだした。本菌株を用いた培養液から Amberlite CG-50, P-cellulose および Sephadex G-100 を順次用いたクロマトグラフィーによって HexoNACase を精製し、その性質を調べた。精製した HexoNACase は SDS-PAGE で単一バンドを示した。分子量は Sephadex G-100 カラムで 52,000, SDS-PAGE で 57,000 と測定された。基質 pNPGlcNAc に対する至適 pH は pH 6.0 で、至適温度は 55°C であり、pNPGalNAc に対するそれらは pH 5.0 と 35°C であった。本酵素はキトビオース、キトトリオース、キトテトラオースの順によく作用し、*N*-アセチルグルコサミンを遊離することから、エキソ型で作用することが確認された。

### 文 献

- 1) 戸倉清一：最後のバイオマス キチン，キトサン（キチンキトサン研究会編），p. 51-86, 技報堂，東京（1988）.
- 2) Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Tokura, S., and Azuma, I.: *Vaccine.*, **2**, 93-99 (1984).
- 3) Bahl, O. P. and Agrawal, K. M. L.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 2970-2978 (1969).
- 4) Mega, T., Ikenaka, T., and Matsushima, Y.: *J. Biochem.*, **68**, 109-117 (1970).
- 5) Ohtakara, A., Yoshida, M., Murakami, M., and Izumi, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 239-247 (1981).
- 6) Yamamoto, K., Lee, K. M., Kumagai, H., and Tochikura, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 611-619 (1985).
- 7) Nanjo, F., Ishikawa, M., Katsumi, R., and Sakai, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 899-906 (1990).
- 8) Ohtakara, A.: *Bull. Hiroshima Women's Univ.*, **6**, 1-12 (1971).
- 9) Tarentino, A. L. and Maley, F.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 811-817 (1974).
- 10) Trimble, R. B., Tarentino, A. L., Evans, G. E., and Maley, F.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 9708-9713 (1979).
- 11) 大宝 明：最後のバイオマス キチン，キトサン（キチンキトサン研究会編），p. 189-222, 技報堂，東京（1988）.
- 12) 岩本 徹，加納 誠，佐々木毅，稲岡 恵：醸酵工学，**54**, 316-322 (1976).
- 13) Iwamoto, T., Inaoka, M., and Naka, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1913-1915 (1983).
- 14) Iwamoto, T., Inaoka, M., and Naka, H.: *J. Ferment. Technol.*, **63**, 29-36 (1985).
- 15) Iwamoto, T., Okiura, T., Sasaki, T., and Inaoka, M.: *J. Ferment. Technol.*, **65**, 593-596 (1987).
- 16) Imoto, T. and Yagishita, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1154-1156 (1971).
- 17) Reissig, J. L., Strominger, J. L., and Leloir, L. F.: *J. Biol. Chem.*, **217**, 959-966 (1955).
- 18) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., and Farr, L. F.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 19) Laemmli, U. K.: *Nature*, **227**, 680-685 (1970).