

3C10-2 好熱性 *Bacillus* 属細菌由来のクローン化 α -cyclo-dextrinase の精製と性質

○上元 雅也¹, 滝澤 昇²⁽¹⁾岡山理大院・工・応化, ⁽²⁾岡山理大・工・応化)

【目的】好熱性細菌*Bacillus stearothermophilus* K-12481株よりクローン化した α -シクロデキストリナーゼの精製と諸性質の解析を目的とした。【方法と結果】*B. stearothermophilus* K-12481株由来の α -シクロデキストリナーゼ遺伝子をヒスチンタグベクターpQE30に組み込み、大腸菌JM109に形質転換した。この組換え大腸菌の培養液を遠心分離後、上清を超音波破碎し、さらに遠心分離を行い、その上清を粗酵素液とした。粗酵素液を固定金属アフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーによりSDS-PAGE上で単一バンドになるまで精製した。本精製酵素の最適温度は45℃、最適pHは4.5 (50mMのグリシン塩酸バッファー)であり、熱安定性は40℃で10分加熱しても80%以上の高い残存活性を示した。この結果、精製酵素は粗酵素と比べ、少し熱に対して弱くなっていることが明らかとなった。次に、本酵素が基質である α -シクロデキストリンを加水分解する際の反応機構を解析するために、薄層クロマトグラフィー及びペーパークロマトグラフィーを行い、酵素分解産物を調べた。その結果、最終的にはグルコースとマルトースにまで分解するが、酵素反応の初期段階では、マルトトラオースやマルトペンタオースが分解産物として多く現れていることが明らかとなった。

Purification and characterization of a cloned alpha-cyclodextrinase from *Bacillus stearothermophilus* K-12481

○Masaya UEMOTO, Noboru TAKIZAWA

(Dept. Appl. Chem., Fac. Eng., Okayama Univ. Sci.)

Key words cyclodextrin, purification, enzyme

3C10-4 *Cladosporium* sp. S-9 由来 β -1,3-glucan synthase のクローニング

○原川 広野, 進藤 斉, 角田 潔和, 小泉 武夫

(東農大・応生科・醸造)

【目的】前報¹⁾までに β -グルカン高含有糸状菌の検索を目的として、自然界分離株よりスクリーニングを行い*Cladosporium* sp. S-9を選抜した。また、糸状菌の細胞壁の構成成分として存在する β -1,3-glucanには免疫賦活化に関する活性とわけて抗腫瘍活性が認められており、本株の熱水抽出画分においてもSarcoma180に対し対照としたアガリクスより高い抑制効果を示した。本報では、 β -1,3-glucan生合成経路のKey enzymeである β -1,3-glucan synthaseのスクリーニングおよびクローニングを目的とした。【方法および結果】*Cladosporium* sp. 由来 β -1,3-glucan synthaseはProtein Databaseに報告がないため、Degenerate PCR法により約800bpのFragmentを得た。このFragmentを解析した結果、近縁種由来 β -1,3-glucan synthaseと高い相同性を示したため、さらにGenomeWalkingを行いPromoter領域を含む酵素遺伝子推定領域の全長を決定した。また、翻訳タンパク質は近縁である糸状菌*Aspergillus fumigatus*、*Aspergillus nidulans*、*Magnaporthe grisea*、*Neurospora crassa*、*Schizosaccharomyces pombe*由来 β -1,3-glucan synthaseと40~60%の相同性を示した。さらに大腸菌で発現させたので併せて報告する。

1) 原川広野：2005年度農芸化学会大会講演要旨集、p257

Cloning of beta-1,3-glucan synthase from *Cladosporium* sp. S-9

○Hirono HAKAWA, Hitoshi SHINDO, Toshitaka KAKUTA,

Takeo KOIZUMI

(Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric.)

Key words beta-glucan, antitumor activity, *Cladosporium* sp.

3C10-3 *Paenibacillus* sp. KM21 が産生する2種類のキシログルカン特異的エンド- β -1,4-グルカナーゼについて

○矢追 克郎, 日吉 あや子, 三石 安

(産総研・生物機能)

(目的)キシログルカンは、植物細胞の一次細胞壁に普遍的に存在し、セルロースと同様な構造を主鎖に、高頻度にキシロースが分岐結合したヘテロ多糖で、植物細胞の伸長や形態分化に重要な役割を担っているものと考えられている。このようなキシログルカンの役割を解明するために、キシログルカンを特異的に分解することのできる各種グリコシダーゼは、極めて有用な分析手段である。今回我々は、キシログルカンに特異的に作用する2種類のエンド- β -1,4-グルカナーゼ(XEG5およびXEG74)を単離し、その性状解析および遺伝子クローニングを行った。(方法と結果)土壌より単離した*Paenibacillus* sp. KM21の培養液から、各種クロマトグラフィーにより2種類のXEGを精製し、N末端アミノ酸配列および内部アミノ酸配列を決定し、得られたアミノ酸配列をもとに遺伝子クローニングを行った。その結果、XEG5とXEG74はそれぞれ糖質加水分解酵素ファミリー5と74に属する酵素であることが明らかになった。これらの基質特異性について検討を行ったところ、セルロースは分解せず、キシログルカンに対して高い特異性を有していた。また、XEG5はエンド型の活性を、XEG74はエンド-プロセス型な活性を示すことが示唆された。さらに、様々な構造のキシログルカンオリゴ糖を用いて基質特異性の検討を行ったところ、XEG74は従来のキシログルカン分解酵素とは異なる部位での分解活性を有することが明らかになった。

参考文献：Yaoi et al. 2005 Appl. Environ. Microbiol. in press

Two xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanases from *Paenibacillus* sp. KM21

○Katsuro YAOI, Ayako HIYOSHI, Yasushi MITSUISHI

(IBRF, AIST)

Key words xyloglucan, endoglucanase, xyloglucanase, beta-1,4-glucanase

3C10-5 *Arthrobacter psychrolactophilus* F2 株由来低温性 β -ガラクトシダーゼの諸性質とその一次構造の解析

○池端 諒子, 藤本 裕二, 田村 貴恵, 林 敬人, 宮地 竜郎,

中川 智行, 富塚 登

(東農大・生物産業・食科)

【目的】我々は、自然界より低温性 β -ガラクトシダーゼ(β -GAL)を生産する低温菌の単離を行ってきた(1,2)。これら低温菌のうち、*A. psychrolactophilus* F2株由来低温性 β -GALは最適温度が10℃であり、その利用が期待される酵素の一つである。本研究ではF2株由来の低温性 β -GALの諸性質と利用、さらにはその一次構造を明らかにした。【方法及び結果】F2株由来低温性 β -GALは至適pH 8.0、最適温度10℃で、45℃以上で急速に失活する性質を有していた。また、10Uの本酵素は生乳1ml中の乳糖の約80%を24時間にて分解する能力を有していた。一方、本酵素の一次構造を部分的に明らかにしたところ、BglApは*Arthrobacter* sp. C2-2株および*A. psychrolactophilus* B-7株由来 β -GALとはそれぞれ79%、75%の相同性を示した。また、BglApは前半部分にはGlycoside Hydrolase Family 2 (GH2)に関するモチーフが、配列後半にはGH42に関するモチーフが見られた。以上の結果はF2株由来 β -GALが低温下での生乳処理に適しており、新規低温性産業用酵素としての利用が可能であることを示している。

1) Nakagawa, T. et al. 2003. *Lett. Appl. Microbiol.* 37: 154-157.

2) Nakagawa, T. et al. 2006. *Microbiol. Res.* 161: In press.

Molecular characterization of cold-active β -galactosidase from *Arthrobacter psychrolactophilus* strain F2

○Ryoko IKEHATA, Yuji FUJIMOTO, Takae TAMURA,

Takahito HAYASHI, Tatsuro MIYAJI, Tomoyuki NAKAGAWA,

Noboru TOMIZUKA

(Dept. Food Sci. Technol., Tokyo Univ. Agric.)

Key words beta-galactosidase, cold-active enzyme, *Arthrobacter psychrolactophilus*