

Corticium rolfsii のグルカナーゼ蛋白質の精製

八十川大輔 中川良二・池田隆幸・長島浩二

Purification of Glucanase from *Corticium rolfsii*

Daisuke YASOKAWA, Ryoji NAKAGAWA, Takayuki IKEDA and Koji NAGASHIMA

Corticium rolfsii をセルラーゼ誘導培地で培養したところ、その培養上澄にセルラーゼ、グルカナーゼ、ペクチナーゼ、酸性プロテアーゼ及びキシラナーゼの活性が認められた。このうちグルカナーゼについてイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、及び疎水クロマトグラフィーの手順で精製し、活性の回収率 12% で、約 48 倍の精製率であった。最終標品は比活性 80.3 U/mg で、SDS-PAGE により単一バンドを示した。そのバンドの推定分子量は 34,000 であった。

食品加工において、省エネルギー、付加価値の付与、工程の簡素化などの目的で酵素利用を検討、あるいは実用化している企業が増加しつつある。

遺伝子操作技術は、1) 目的とする酵素の化学的性質を解明する、2) 酵素の機能を改善する、3) 酵素の生産量を増加させる、4) 酵素精製を簡素化するなどに有効な先端技術である。我々は、この技術を利用して高品質で安価なセルラーゼ、グルカナーゼを生産し、食品工業分野での応用を目指している。今回、*C. rolfsii* の生産するグルカナーゼの精製を試みたので報告する。

標記斜面培養保存菌株をセルラーゼ誘導 (CI) 培地 100 ml (ポリペプトン, 10 g/l ; イーストエキストラクト Bacto, 5 g/l ; 硫安, 1.4 g/l ; 硫酸マグネシウム・7水和物, 0.3 g/l ; 尿素, 0.3 g/l ; Tween 80, 0.5 g/l ; アビセル, 8.0 g/l) に接種し種培養とした。27°C, 150 rpm で 8 日間培養後、種培養を 2 l の CI 培地 (ジャーファーメンター) に接種し、27°C, 150 rpm, 2 l / min 通気で 2~3 日培養した。

セルラーゼは少なくとも 3 種類の酵素の複合系であるので、濾紙分解活性 (FPase 活性)、微結晶セルロース分

解活性 (Avicelase 活性)、カルボキシメチルセルロース分解活性 (CMCase 活性)、および β -グルコシダーゼ活性を測定した¹⁾。グルカナーゼ活性はカードラン (和光純薬工業(株)) を基質として測定した。いずれの場合も Somogyi-Nelson 法²⁾ によりグルコース換算で還元糖を定量した。反応条件下 1 分間に 1 μ モルの還元糖 (グルコース換算) を遊離させる酵素活性を 1 U とした。蛋白質は、Bradford 法³⁾ により BSA 換算で定量した。

100 ml スケールの培養により *C. rolfsii* は培養 3~4 日目からそのセルラーゼ活性を発現し、8~9 日目ではほぼ最大活性を示した。これは Hariantono の報告⁴⁾ とほぼ同様の傾向であった。また、同一培養上澄にグルカナーゼ、キシラナーゼ、ペクチナーゼ、及び酸性プロテアーゼ活性を認めた (data not shown)。

培養上澄を硫安塩析 (80%飽和) し、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液に溶解、ゲル濾過 (BIO GEL P-6 DG) により脱塩した。本硫安塩析画分を TSKgel DEAE-TOYOPEARL 650 M のイオン交換クロマトグラフィー (0~0.4 M NaCl) により分画した。酵素活性は非吸着画分のセルラーゼ (I)、0.25 M NaCl 付近で遊離するセルラーゼ (II)、及び 0.33 M NaCl 付近で遊離するグルカナーゼ (III) に分画された (図 1)。グルカナーゼ画分を硫安塩析、脱塩後、Sephacryl S-200 HR で分子量分画した結果、CMCase 画分 (IV) とグルカナーゼ画分 (V) に分画された (図 2)。さらにグルカナーゼ画分を 1.33 M~0 M 硫安/10 mM リン酸ナトリウムの BUTYL-TOYOPEARL クロマトグラフィーで分画した (図 3)。その結果グルカナーゼは約 48 倍に精製された (表 1)。最終標品は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)⁵⁾ (図 4) により単一のバンドを示し、

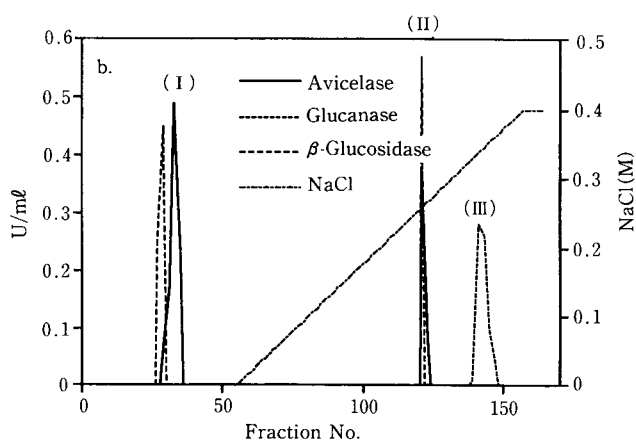
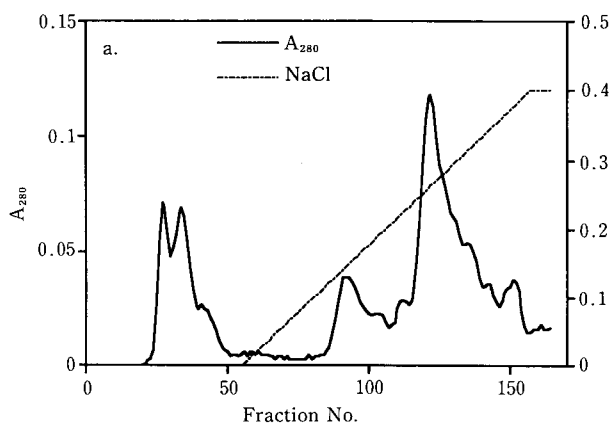


図1 DEAE-TOYOPEARLによるグルカナーゼの精製
培養上清を塩析後、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) に交換した。試料を添加後カラム容積 (5×10 cm) 以上の同緩衝液で非吸着タンパク質を洗浄し、吸着タンパク質を0~0.4 M NaCl 直線濃度勾配で溶出した。活性は Somogyi-Nelson 法で測定した。

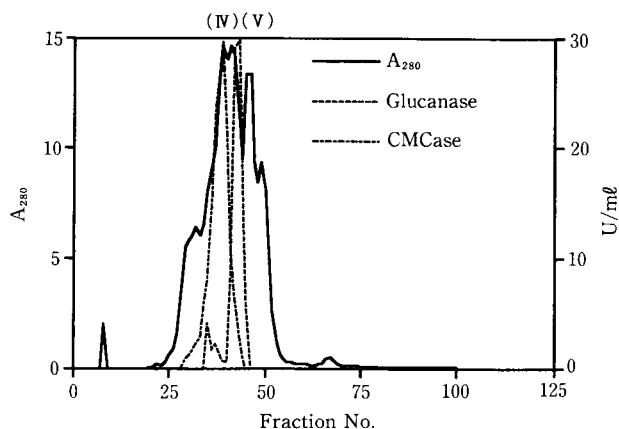


図2 Sephacryl S-200 HRによるグルカナーゼの精製
図1の(III)の画分をカラム (2.5×100 cm) に重層し、50 mM 酢酸ナトリウム-150 mM NaCl 緩衝液 (pH 4.0) で溶出した。活性は Somogyi-Nelson 法で測定した。

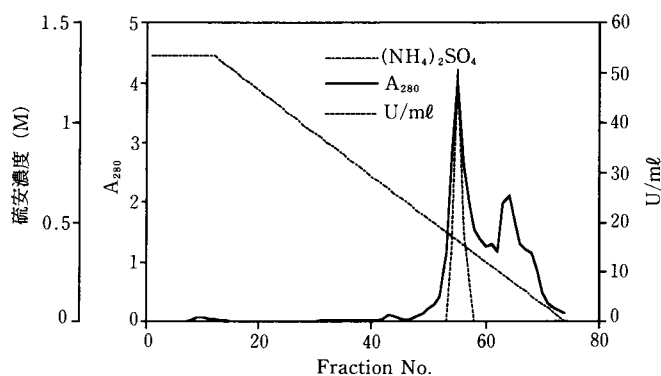


図3 BUTYL-TOYOPEARLによるグルカナーゼの精製

1.33 M 硫酸を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で置換した図2の(V)の画分を同緩衝液で平衡化したカラム (2.5×10 cm) に吸着させ、カラム容積の同緩衝液を流した後、1.33 M ~ 0 M 硫酸の直線濃度勾配で溶出した。

表1 グルカナーゼの精製の要約

精製ステップ	全蛋白 (mg)	全活性 (units)	比活性 (units/mg)	活性の収率 (%)	精製率 (倍)
脱塩	812	1348	1.66	100	1.0
DEAE-TOYOPEARL	179	904	5.05	67	3.0
Sephacryl S-200HR	12.6	179	14.2	13	8.6
BUTYL-TOYOPEARL	2.0	158	80.3	12	48.4

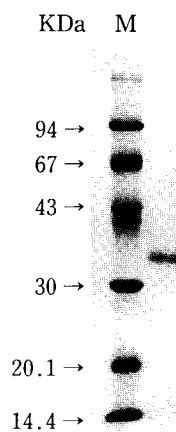


図4 精製グルカナーゼ蛋白質の SDS-PAGE

精製したグルカナーゼ活性画分 (蛋白量; 1.5 μg) を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。左レーンは分子量マーカー。

その推定分子量は 34 kd であった。このことから、本酵素は一種類のポリペプチド鎖からなることが推定される。

酵素の工業利用を考えると、酵素の基質特異性や活性特性などの酵素自体の性質のほか、生産菌株の培養の難易、培養コスト、酵素の濃縮精製コストなどを考慮にいれなければならない。*C. rolfsii* に関しては培養管理が比較的難しく酵素収量が一定しないため、本菌を培養して直接酵素を生産させるよりは、適当な宿主菌に目的酵素遺伝子をクローニングして酵素を生産させる方が良いと考えられる。また、後者の場合部位特異的変異を導入するなどして酵素を改変し、大量生産させることも可能である。

文 献

- 1) YAMANUBE, T., MITSUISHI, Y. and TAKASAKI, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 65(1987).
- 2) SOMOGYI, M. J.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19(1952).
- 3) BRADFORD, M. M.: *Anal. Biochem.*, **72**, 248(1976).
- 4) HARIANTONO, J.: 北大農学研究科博士論文 (1991).
- 5) LAEMMLI, U. K.: *Nature*, **227**, 680(1970).