

新奇 β -D-ガラクトフラノシダーゼの遺伝子同定及び諸性質の解析

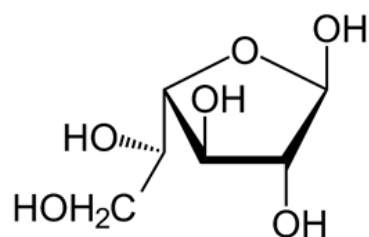
農学部 松永恵美子

はじめに

現在、私は農学研究院研究教育支援センターに所属し、この支援センターに登録されている機器の管理、分析などを行っている。一方で、農学部の発酵化学研究室に席をおき、発酵に関わる微生物（酵母、カビ、大腸菌など）を用いて有用物質の生産、精製、諸性質の解析を行っている。今回は新奇の β -D-ガラクトフラノシダーゼを精製することができたので、この有用物質（酵素）について発表したい。

【緒言】

多糖や複合糖質の構成糖のひとつである β -D-ガラクトフラノース (Gal_f) は多くの病原性の原核、真核生物に存在しており、ガラクトースから形成される五員環の糖である。この Gal_f はカビや細菌に存在しているが、酵母や植物、哺乳類には存在せず、哺乳類に対して免疫原性であることが明らかになっている。そのため、Gal_f は病原性の改善のため抗真菌剤のターゲットとなっている。多糖や複合糖質の Gal_f の生合成に関しては研究がな



β -D-ガラクトフラノース

されているが、分解に関してはあまり研究がなされていない。分解にかかわる因子の一つにガラクトフラノシダーゼ (Gal_f-ase) がある。この Gal_f-ase は多糖や複合糖質から加水分解によって遊離することができる酵素である。この Gal_f-ase は Exo-、Endo-型共に培養液からの精製の報告はある。しかし、遺伝子の同定については現在までに報告されていない。本研究では、Gal_f 特異的な酵素の遺伝子の探索をおこない、大腸菌を用いて精製し、その酵素の諸性質の解析を行った。

【方法・結果】

様々な場所より土壌を採取し、その土壌サンプルから放線菌約 300 株を単離した。これら放線菌を培養し、その培養液上清を調べ、Gal_f-ase を生産する放線菌 3 株 (JHA19、JHA 26、EMA216) を見つけた。そのうちの 1 つである JHA19 の全ゲノムについてゲノム解析を行い、得られたゲノム情報により既知のフラノシダーゼと相同性を持つ配列の探索を行った。結果、4 つの候補遺伝子が見つかった。この 4 つの候補遺伝子を実験室で発現させ、活性を調べた結果、GH2 ファミリーに属する 1 候補遺伝子が高い Gal_f-ase 活性を持つことがわかった。次に、この酵素の基質特異性を調べるため、様々な pNP 基質を用いて活性を測定した結果、本酵素は Gal_f 特異的な新奇な Gal_f-ase であることが示唆された。また、この酵素が天然基質にも作用するかを調べるため、*A. fumigatus* の細胞壁構成成分の Gal_f を持つガラクトマンナン (GM) に作用させ TLC を用いて活性を調べた結果、Gal_f が GM より遊離されたことから、この酵素は天然基質にも作用することがわかった。