

好熱菌の β -ガラクトシダーゼ遺伝子の クローニングと発現

平 田 晴 久*

β -ガラクトシダーゼ (β -gal) は、乳糖をグルコースとガラクトースに加水分解する作用を有し、乳糖不耐症者用の低乳糖牛乳の製造、あるいはチーズ製造過程で副産物として大量に生成する乳清中の乳糖からグルコース、ガラクトースの製造等の食品加工に広く利用されている。微生物に汚染され易い牛乳の加工では、その防止対策の一つに、雑菌の生育しにくい高温での処理が考えられるが、そのためには耐熱性に優れた酵素が必要である。一般に好熱菌（高温環境下（55℃）で生育可能な細菌）は、その構成蛋白質の耐熱性が常温菌のものに比べて高いので、耐熱性酵素の供給源として適当である。そこで筆者らは、遺伝子操作による耐熱性 β -gal 生産菌株の育種およびその耐熱性機構の解明を目的として、好熱菌の β -gal 遺伝子をクローン化し、構造、発現機構を調べている。ここでは中等度好熱菌 *Bacillus stearothermophilus*（生育温度45~70℃）の2種の β -gal 遺伝子のクローニングと発現について紹介する¹⁾。

B. stearothermophilus の生産する β -gal

図1のレーン1に示すように、DNA 供与体として用いた *B. stearothermophilus* IAM 11001株の細胞抽出液をポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により分画後、 β -gal の活性染色を行うと、3本のバンドが認められた。そこで移動度の大きい順に β -gal I、 β -gal II、 β -gal III と命名する。レーン2に示すように、この3種の β -gal の中で、 β -gal II、 β -gal III は70℃、15分間の熱処理で90%以上失活したが、 β -gal I は80%以上の残存

活性が認められ、最も耐熱性に優れた酵素である。

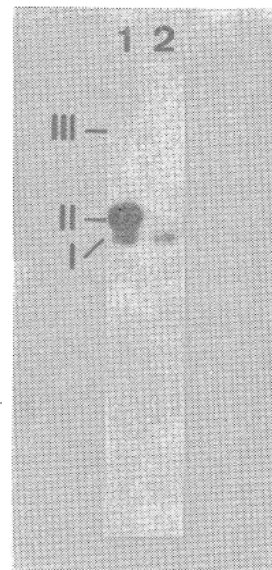


図1 *B. stearothermophilus* の β -ガラクトシダーゼのポリアクリルアミドゲル電気泳動
電気泳動後、6-プロモ-2-ナフタル- β -D-
-ガラクトピラノシドを基質として、活
性染色を行った。
レーン1：細胞抽出液
レーン2：70℃、15分間熱処理した細胞抽出液

まず最初に精製 β -gal II、 β -gal III の諸性質の比較から、両酵素の PAGE での移動度の違いは、主として構成サブユニットの会合度の違いによることを明らかにした。(i) β -gal II、 β -gal III の免疫学的性質を Ouchterlony 試験で調べると抗 β -gal II 血清に対して、両酵素とも沈降線を生じ、それらは融合した。これは両酵素が同じ抗原性をもつことを示す。(ii) SDS-PAGE で測定したサブユニット分子量は、両酵素とも 120,000 と同じである。(iii) 等電点ゲル電気泳動で測定した等電点は、 β -gal II が pH5.2、 β -gal III が pH5.1 とほぼ同

*平田晴久 (Haruhisa HIRATA), わかもと製薬株式会社, 生物化学研究部, 醸酵研究室, 現在: 大阪大学工学部醸酵工学科研究生

じ値である。同ゲル濾過により分子量を推定すると、 β -gal II は270,000、 β -gal III は520,000でそれぞれ二量体、四量体に相当する。

β -gal II, β -gal III の遺伝子 *bgaA* のクローニングと発現

次に大腸菌において、 β -gal I の遺伝子のクローニングを行った。本菌株の染色体 DNA を制限酵素 *EcoRI* で切断して得た種々の大きさの断片をプラスミドベクター pNL212²⁾ の *lacUV5* プロモーター下流に挿入し、組換えプラスミドを作成した。このプラスミドを大腸菌に導入した遺伝子バンクの中から、抗原抗体反応を利用するコロニーイムノアッセイ³⁾により、抗 β -gal II 血清と反応する蛋白質の生産株 (pHG10保持株) を取得した。図2に示すように、pHG10は2.7kbp (キロ塩基対) の *EcoRI* 断片を含む構造であるが、pHG 10保持株には β -gal 活性が認められず、しかも抗 β -gal II 血清と反応するポリペプチドの分子量は95,000と本来のものより小さかった。そこで同断片を含む9.0kbp の *ClaI* 断片を再度ベクター pACYC177 へクローニングしたプラスミド pHG 3を作成し、大腸菌に導入すると β -gal 活性を発現した。この活性発現に必要な領域は

pHG 32にクローニングした 3.8kbp の *EcoRI*-*BglII* 断片上 (図2のマップ上4.5-8.25kbp) にあり、 β -gal II, β -gal III のサブユニット分子量120,000から予想される遺伝子の大きさとよく一致した。この領域を *bgaA* と命名する。*bgaA* 内の2.7kbp の *EcoRI* 断片 (マップ上5.55~8.25kbp) をプローブとし、*EcoRI*, *CalI*, *EcoRV*, *StuI*, *SstII* で切断した染色体 DNA に対して Southern hybridization 法⁴⁾ で相同領域を検索すると、いずれも単一の断片が同定された。これは本菌株の染色体 DNA 上にこの遺伝子がただ一つ存在することを示す。以上の結果から、 β -gal II, β -gal III は同一遺伝子 *bgaA* にコードされると結論した。

β -gal I の遺伝子 *bgaB* のクローニングと発現

図2に示すように pHG 10 の 2.7kbp の *EcoRI* 断片を含む 9.1kbp の *XhoI* 断片を pACYC177 にクローニングしたプラスミド pHG 1 保持株は、 β -gal 活性を示すが、pHG 1 から4.8kbp の *BamHI* 断片を欠失させたプラスミド pHG 11 保持株は β -gal 活性を示さない。この *BamHI* 断片、あるいは同断片内の 3.0kbp の *PstI* 断片 (マップ上10.7~13.7

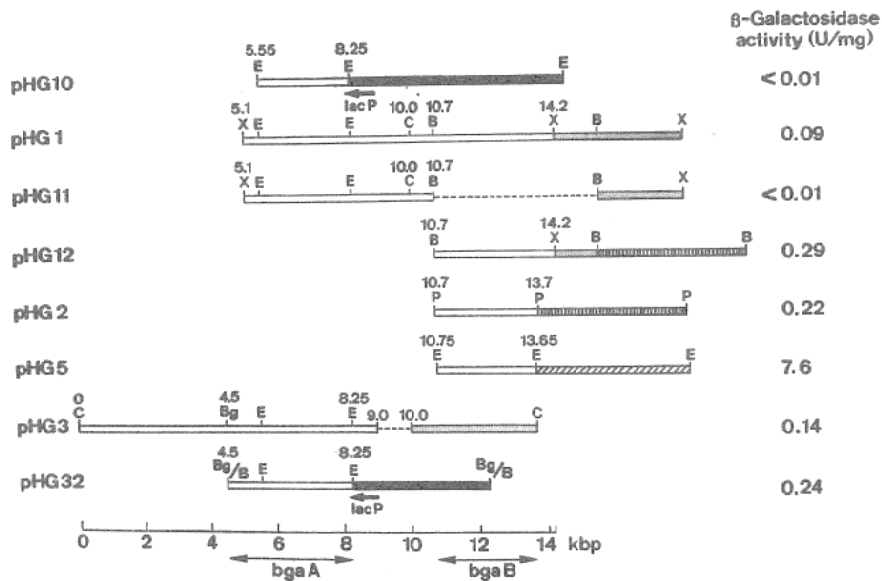


図2 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を含む組換えプラスミドの構造
 □ : *B. stearothermophilus* の染色体 DNA, ■ : pNL212, ▨ : pACYC177,
 ▩ : pBR322, ▧ : pUB110. B, Bg, C, E, P, X は *BamHI*, *BglII*, *ClaI*,
EcoRI, *PstI*, *XhoI* 部位を示す。 β -gal 活性は細胞抽出液の蛋白質当りの比活性で表
 わした。破線は欠失領域を示す。

kbp) をベクター pBR 322 にクローン化した pHG 12, pHG 2 保持株はどちらも β -gal 活性を発現した. この結果は *bgaA* から 2.4 kbp 離れた 3.0 kbp の *Pst* I 断片上に別の β -gal 遺伝子 (*bgaB*) があることを示す. この *Pst* I 断片から合成リンカーを用いて末端を *Eco* RI 部位に変換した断片をベクター pUB 110 に連結した. 得られたプラスミド pHG 5 を枯草菌に導入すると, β -gal の発現量は pHG 2 を持つ大腸菌の約 35 倍に上昇した. 以下に示すように pHG 5 保持株から調製した β -gal (*bgaB* 遺伝子産物) と本菌株の β -gal I の性質比較より *bgaB* 遺伝子産物が β -gal I であると同定した. (i) 抗 *bgaB* 遺伝子産物血清を用いて酵素活性の中和試験を行うと, β -gal I, *bgaB* 遺伝子産物とも中和され, 両酵素は同一抗原性であった. (ii) SDS-PAGE で測定したサブユニット分子量は両酵素とも 68,000 で同じである. (iii) 70°C において両酵素とも同じ熱安定性を示す.

β -gal I の枯草菌における高発現⁵⁾

表 1 に本菌株の β -gal の諸性質を, 表 2⁶⁾ に他の微生物起源の β -gal と本菌株の β -gal I の特性をまとめて示した.

以前から多くの研究がなされ, すでに固定化酵素として実用化されている酵母 *K. lactis* の β -gal は, 耐熱性が低く, 高温処理には適さない. *A. oryzae*, *A. niger* 等のかびの β -gal や好熱菌 *B. acidocaldarius*, *B. stearothermophilus* AT-7 株の β -gal は, 耐熱性が高いが乳糖に対する親和性が低い (K_m 値が大きい) 欠点がある. 本菌株の β -gal I は耐熱性, 乳糖との親和性が高く, 応用上すぐれた条件を兼ねそなえている. しかしその生産量が低いため, クローン化した遺伝子 *bgaB* を用いて発現量向上を試みた. その結果, 枯草菌において, *B. stearothermophilus* の 50~100 倍の生産量を達成できた (枯草菌の細胞蛋白質当たり 6~10%, 図 3 レーン 3). また β -gal I と枯草菌の細胞蛋白質では耐熱性に差があることから熱処理による精製が可能となる. すなわち 70°C, 15 分間の熱処理で, 枯草菌由来の大半の蛋白質を凝固不溶化物として除去し, 純度 80% の β -gal

表 1 *B. stearothermophilus* の β -ガラクトシダーゼの性質

	β -gal I	β -gal II	β -gal III
サブユニット分子量	68,000	120,000	120,000
サブユニット数	4	2	4
至適温度 (°C)	70	60	60
至適 pH	5.5	7.2	未決定
等電点 pH	未決定	5.2	5.1
免疫反応			
抗 β -gal I 血清	+	-	-
抗 β -gal II 血清	-	+	+

表 2 種々の微生物起源の β -ガラクトシダーゼの特性

起 源	至適温度 (°C)	至適 pH	K_m 値 (乳糖, mM)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	37	6.3	30
<i>Aspergillus oryzae</i>	60	4.5	100
<i>Aspergillus niger</i>	60	4.5	53
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	70	6.0	120
<i>B. stearothermophilus</i> AT-7	65	6.2	110
<i>B. stearothermophilus</i> NRRLB-11229	65	7.0	25
<i>B. stearothermophilus</i> IAM11001 (β -gal I)	70	5.5	2.4
<i>Thermus thermophilus</i>	85	6.0	2.1

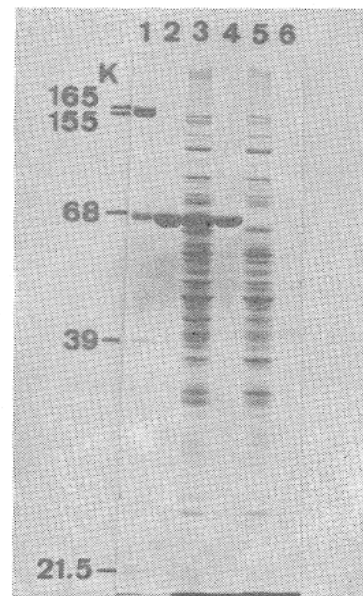


図 3 枯草菌の生産する β -ガラクトシダーゼ I の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
 レーン 1: 分子量標準蛋白質
 レーン 2: 精製 β -gal I
 レーン 3: pHG5 を保持する枯草菌の細胞抽出液
 レーン 4: 70°C, 15 分間熱処理したレーン 3 の細胞抽出液
 レーン 5: pUB110 を保持する枯草菌の細胞抽出液
 レーン 6: 70°C, 15 分間熱処理したレーン 5 の細胞抽出液

生産と技術

Iを回収率80%で取得できた(図3レーン4)。さらに1回のDEAE-セファデックスクロマトグラフィーで純度95%以上になった(図3レーン2)。

この精製 β -gal Iは65°Cで55時間、60°Cで155時間の活性半減期を示し、高温操作に十分耐え得るものと期待される。現在、適当な担体に固定化した β -gal Iを用いて、実用化へ向けて連続運転の条件検討を行っている。

このように有用ではあるが、生産量が低く、精製が困難な酵素も、その遺伝子を単離し増幅することによって大量生産が可能となった。

文 献

- 1) H. Hirata, S. Negoro, and H. Okada, J. Bacteriol. 160, 9(1984)
- 2) S. Negoro, T. Taniguchi, M. Kanaoka, H. Kimura, and H. Okada, J. Bacteriol. 155, 22(1983)
- 3) D.J. Kemp, and A.F. Cowman, Methods Enzymol. 79, 622(1981)
- 4) E.M. Southern, J. Mol. Biol. 98, 503(1975)
- 5) H. Hirata, S. Negoro, and H. Okada, Appl. Environ. Microbiol. in press.
- 6) 小林猛, 細胞工学, 2, 376(1983)



限りある資源を大切に……
の姿勢を守るDNT

現在は、“鉄の文明”と評され、今日の世界から鉄を無くしたら、恐らく一切の文化は終息するだろうといわれています。
DNTは、創立の礎となった重防食塗料「ズポイド」を通じて既に半世紀近く私たちの大切な鉄を守りつづけてきました。
そして、これからもDNTはズポイドを生みだした重防食技術をベースに、独自の技術開発を進め、さらに、海外の優れた技術と協力しあって、より優秀な重防食システムとして結合させ、限りある資源を守りつづけていきます。

●創造と調和をめざす●



DNT
大日本塗料

●大阪市此花区西九条6-1-124
〒554 ☎(06)461-5371(大代)
●東京都千代田区丸の内3-3-1
〒100 ☎(03)216-1861(大代)