

低栄養細菌の生産するグルコシダーゼ, ガラクトシダーゼ およびヘキソキナーゼ

佐藤優行, 篠田 究, 二宮泰教, 中條健二, 三村佳代子, 木村義雄

GLUCOSIDASES, GALACTOSIDASES, AND HEXOKINASE PRODUCED BY OLIGOTROPHIC BACTERIA

Masayuki SATO, Kiwamu SHINODA, Yasuyuki NINOMIYA, Kenji CHUJO, Kayoko MIMURA,
and Yoshio KIMURA

About 60% of oligotrophic bacteria isolated from soil assimilated maltose, cellobiose, melibiose, and lactose. Km values of α -, β -glucosidases, α -, β -galactosidases, and hexokinase in the cell free extract of these oligotrophic bacteria were estimated by using the each *p*-nitrophenyl glycosides, D-glucose and ATP as the substrates. These Km values suggested that these enzymes of oligotrophic bacteria had not necessarily higher affinity for the substrates than those of eutrophic bacteria had.

α -Glucosidase from an oligotrophic bacteria, Y-21, was partially purified by ammonium sulfate salting-out, DE-52 ion exchange chromatography, and Sephadex G-150 gel chromatography. The enzyme was most active at pH 6.5, not stable at 35°C, and inhibited by Cu, Ag, and *p*-chloromercuribenzoic acid. Km values of the enzyme for *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside and maltose were 0.12 mM and 12.4 mM, respectively.

Key words : oligotrophic bacteria, glucosidase, galactosidase, hexokinase, Km values.

緒 言

自然界は微生物にとって決して栄養豊富な環境ではない。一般に海洋をはじめ水圏環境はとくに栄養濃度が低い。微生物の宝庫といわれる土壌でさえ、栄養源はプアーである。ある推定によれば、土壌中の利用可能な炭素源の供給量は土壌細菌が1年間に平均3, 4回世代交代できる程度だという⁽¹⁾。したがって土壌細菌は飢餓に近い低栄養下で、分裂する機会がほとんどないまま栄養が来るまでひたすら待っているのが実状と思われる。

大腸菌などは栄養飢餓時にストレスタンパクを合成するなどして堪え忍ぶ戦略を取ることが知られている⁽²⁾。一方大腸菌などが飢餓と認識するような低栄養環境でも、わずかな栄養物を利用して細々と増殖する能力を獲得した微生物も多い。それらを一般に低栄養微生物と呼んでいる。とはいえ生理生化学的に明確な実体が解明されているわけではなく、ある基準以下の栄養濃度で生育可能な従属栄養微生物を指しているにすぎない。しかもさまざまな基準が提唱されている^(3,4)。

われわれはSuwa *et al.*⁽⁵⁾にもとづいて、NB培地の1万分の1希釈液（有機炭素濃度が1 ppm以下）でも生育可能な従属栄養細菌を土壌から分離し、低栄養細菌とするとともに、これらがどのような機構により低濃度栄養物質を吸収し資化するのか、その一端を解明する目的で実験を行ってきた^(6,7)。しかし、まだ低栄養下での生育を可能にする根拠となる明確な特質を見いだすに至っていない。

そこで本実験では、低栄養細菌が糖質を消化する時に働く酵素が、きわめて低い濃度の基質にも作用できるといった特質を持っているのではないかと考え、そうした性質を明らかにすることを目指した。消化酵素として α -, β -グルコシダーゼと α -, β -ガラクトシダーゼおよびヘキシナーゼの5つを取り上げ、それらの粗酵素あるいは部分精製酵素について、とくに基質に対するKm値に注目して、性質を調べた。

実験材料および方法

1. 使用菌株および培養

香川県、岡山県、徳島県内の各種土壌から分離された低栄養細菌48株⁽⁶⁾および既知標準菌株(菌名は各表中に示した)を使用した。分離菌はすべて通常の栄養培地では生育できない、いわゆる偏性低栄養細菌である。分離菌のうちY26とZ06は*Aeromonas* sp., Y95は*Chromobacterium* sp.⁽⁷⁾であるが、その他は未同定である。

NB培地(1%ポリペプトン, 1%肉エキス, 0.5%NaCl)の10倍から100倍希釈した液を基本とし、これに各酵素の基質となる糖質(マルトース, セロビオース, メリビオース, ラクトース, グルコース)をそれぞれに0.2%ずつ添加したものをおもな培地とした。培養は2から6日間静置あるいは振盪により行った。菌の生育度は培養液の600nmにおける吸光度で表した。

2. 酵素活性の測定

菌体を遠心分離により集め、両糖加水分解酵素の場合は10mMリン酸緩衝液(pH7.0)で、ヘキシナーゼの場合は100mM Hepes緩衝液(pH7.0)でそれぞれ2回洗浄した。各緩衝液に懸濁した洗浄菌体を超音波破碎し、それを遠心分離して得られた上清液を粗酵素として用いた。

グルコシダーゼおよびガラクトシダーゼ⁽⁸⁾: 1mM *p*-nitrophenyl α -, β -D-glucopyranosideあるいは*p*-nitrophenyl α -, β -D-galactopyranosideの各基質を含む25mMリン酸緩衝液中に酵素液を加え、37℃で30分反応を進めた。これに0.5M Na_2CO_3 を等量添加して反応を止めた。遊離した*p*-nitrophenol量を400nmにおける吸光度から求めた。その他の糖質を基質に用いた場合は、遊離されるグルコース量を酵素分析法⁽⁹⁾で測定した。1単位は1分間に1 μ moleの基質を分解する酵素量とした。

ヘキシナーゼ⁽¹⁰⁾: 反応液組成は50mM D-グルコース, 10mM MgCl_2 , 10mM NADP, 10mM ATP, 2IUグルコース-6-リン酸脱水素酵素, 50mM Hepes緩衝液(pH7.5), および酵素液とした。ATPの添加により反応を開始し、一定時間後にNADPHの遊離に伴う340nmにおける吸光度の増加を測定した。ブランクテストには酵素の代わりに水を用いた。1単位は1分間に1 μ moleのNADPHを遊離する酵素量とした。

3. 糖およびタンパク質の定量

2糖類はフェノール硫酸法⁽¹¹⁾により求めた。タンパク質量はブラッドフォード法⁽¹²⁾により、牛血清アルブミンを標準物質として求めた。またクロマトグラフィーにおける各フラクション中のタンパクは280nmの吸光度でモニターした。

4. 酵素の精製と純度検定

硫酸分画：まず混在する核酸を除去するため、粗酵素液69mlに最終濃度が10mMになるようMnCl₂を加え、30分間攪拌した。遠心分離により上清液66mlを得た。これに硫酸を加え25%飽和から65%飽和までの分画を集めた。この分画を100mMリン酸緩衝液 (pH6.5) 中で十分透析した。

DE-52イオン交換カラムクロマトグラフィー：前記透析内液17.5mlをあらかじめ同緩衝液にて平衡化したDE-52イオン交換カラム (2.8×3.5cm) に吸着させ、0～0.5MのKCl傾斜勾配により溶出させた。1フラクションは2.5mlとした。

SephadexG-150ゲル濾過カラムクロマトグラフィー：前記クロマトグラフィーで得られた活性画分の濃縮液1mlを同緩衝液で平衡化したSephadexG-150カラム (1.6×90cm) を用いてゲル濾過した。1.5mlづつのフラクションに分けた。

タンパク質の純度検定：Davis⁽¹³⁾に準じた常法とおりのポリアクリルアミド電気泳動法により行った。タンパクの染色は0.2%クマシーブリリアントブルー-R-250により2時間行い、脱色はメタノール-酢酸-水 (3:1:6) 中で室温にて行った。

実 験 結 果

1. マルトース、セロビオース、メリビオースおよびラクトースの資化性および各酵素の生産

低栄養細菌48株について標記の各2糖類に対する資化性試験を行った。すなわち各糖を添加した培地で培養した場合の生育度が無添加の場合と比べて2倍以上に達し、しかも糖消費率が10%以上のものを資化性を有する菌とした。その結果マルトースに対しては25株、セロビオースでは30株、メリビオースおよびラクトースではいずれも29株がそれぞれ資化性を有していた。

これら各資化性菌の培養上清液 (菌体外) および菌体抽出液 (菌体内) それぞれについて、各消化酵素の活性を調べた。 α -および β -グルコシダーゼ活性はほとんどの菌でも菌体内に偏在しており、菌体外にはごくわずかであった。一方 α -および β -ガラクトシダーゼ活性はいずれも菌体内と外と両方に分布している菌が多かったが、平均すると総活性で菌体内の方が菌体外より約1.5倍高かった。

2. 各基質に対するKm値

各酵素活性が比較的高かった数菌株の粗酵素液 (菌体内) について種々の基質濃度における反応速度を測定し、Lineweaver-Burk plotsから各基質に対するKm値を求めた。この時4種のグルコシダーゼにはすべて合成基質であるp-nitrophenyl glycosideを基質として用い、ヘキシナーゼにはD-グルコースおよびATPを用いた。それぞれの反応はあらかじめ各活性のpH曲線から求めた各最適pHの下で行った。また比較のため2, 3の既知標準菌についても同じ方法でKm値を求めた。結果をTable 1, 2, 3にまとめた。

α -および β -グルコシダーゼのKm値は0.023から0.54の間にあり、5菌株の粗酵素では見かけ上複数の値が得られた。 α -および β -ガラクトシダーゼの場合は0.045から2.1までと、やや広い範囲の値を示した。またY01, Y03, Y04, およびY23の α -ガラクトシダーゼでは比較的高い基質濃度により明らかな活性阻害が認められた。ヘキシナーゼにおいてもY13, Y26および*B. subtilis*の場合にD-グルコースに対して見かけ上2つの値が得られた。なおこれらキナーゼについては自然

界に広く分布している4種のヘキソースに対する活性を比較し、Table 4. に示した。どの菌の酵素もD-グルコースに最も高い活性を有していた。

Table 1. Km values for *p*-nitrophenyl α - and β -D-glucopyranosides of crude glucosidases.

α -Glucosidase		β -Glucosidase	
Organisms	Km (mM)	Organisms	Km (mM)
Oligotrophic bacteria		Oligotrophic bacteria	
Y 20	0.034, 1.1	Y 04	0.24
Y 21	0.023, 0.044, 1.1	Y 12	0.22
Y 22	0.081	Y 16	0.31
Y 75	0.29	Y 22	0.11, 0.38
Z 02	0.069, 0.22	Y 23	0.28
Z 07	0.13	Y 26	0.54
		Y 31	0.17
<i>Bacillus cereus</i>		Z 02	0.18
K-681	0.099	Z 07	0.18
		Z 16	0.05, 0.15

Table 2. Km values for *p*-nitrophenyl α - and β -D-galactopyranosides of crude galactosidases.

α -Galactosidase		β -Galactosidase	
Organisms	Km (mM)	Organisms	Km (mM)
Oligotrophic bacteria		Oligotrophic bacteria	
Y 01	0.045	Y 07	0.084
Y 03	0.41	Y 20	0.15
Y 04	0.23	Y 28	0.17
Y 13	0.17	Y 30	0.17
Y 23	1.1	Y 96	2.1
Y 25	0.058	Z 02	0.61
Y 96	0.36	Z 07	0.70
Z 07	0.16		
Z 16	0.43	<i>Escherichia coli</i>	
		IFO 3301	0.16
<i>Escherichia coli</i>		<i>Micrococcus luteus</i>	
IFO 3301	0.049	IFO 3333	0.12

Table 3. Km values for D-glucose and ATP of crude hexokinases.

Organisms	Km (mM)	
	D-Glucose	ATP
Oligotrophic bacteria		
Y 13	0.032, 0.17	0.37
Y 26	0.049, 0.15	0.65
Y 95	0.47	0.51
Z 26	0.092	0.65
<i>Escherichia coli</i>		
IFO 3301	0.35	2.0
<i>Bacillus subtilis</i>		
IFO 13719	0.90, 3.0	0.082, 0.30

Table 4. Relative activity of hexokinases on four D-hexoses.

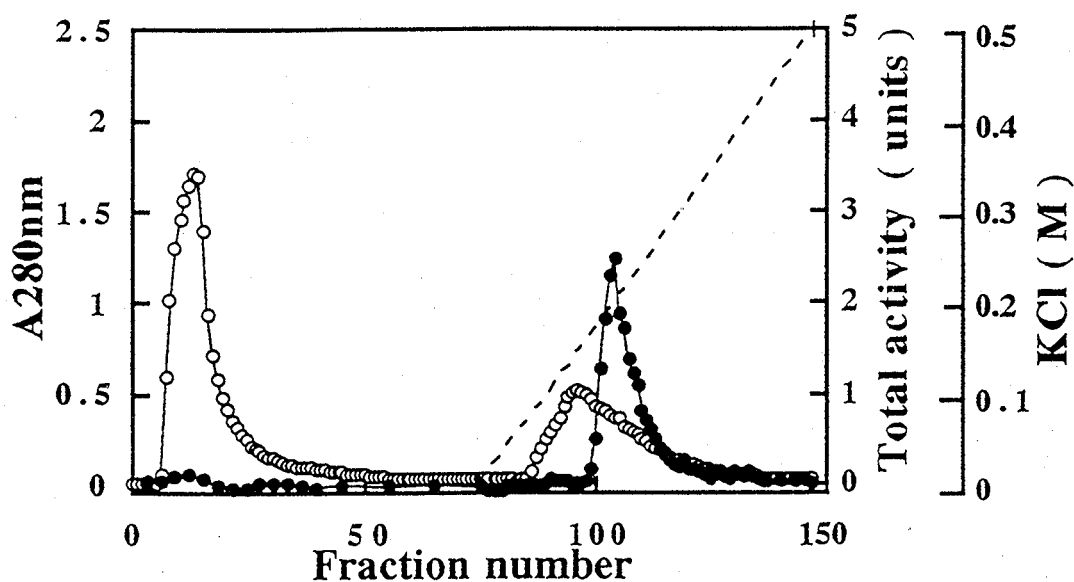
Substrate	Relative activity (%)					
	Oligotrophic bacteria				<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
	Y 13	Y 26	Y 9	Z 06	IFO 3301	IFO 13719
D-Glucose	100	100	100	100	100	100
D-Galactose	78	59	34	50	5.4	18
D-Mannose	29	45	10	41	1.9	21
D-Fructose	51	60	7.7	71	20	46

3. 低栄養細菌Y21株の生産する α -グルコシダーゼの精製と性質

前記の実験でY21菌の α -グルコシダーゼは生産量が多く、見かけの K_m 値が低く、しかも複数認められた。そこでこの酵素についてさらに詳しい知見を得るため、これを精製して性質を調べた。

(1) 酵素の精製

菌体抽出物から得られた粗酵素69mlを出発物として、硫酸分画を経てDE-52イオン交換クロマトグラフィー、およびSephadex G-150ゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した。各クロマトグラフィーの結果をFig. 1, 2に示した。硫酸分画も含めていずれの段階においても α -グルコシダーゼ活性が2つ以上の区分に分かれることはなかった。

Fig. 1. DE-52 Ion exchange chromatography of α -glucosidase.

● ; α -Glucosidase activity, ○ ; Absorbance at 280nm,
 ---- ; KCl.

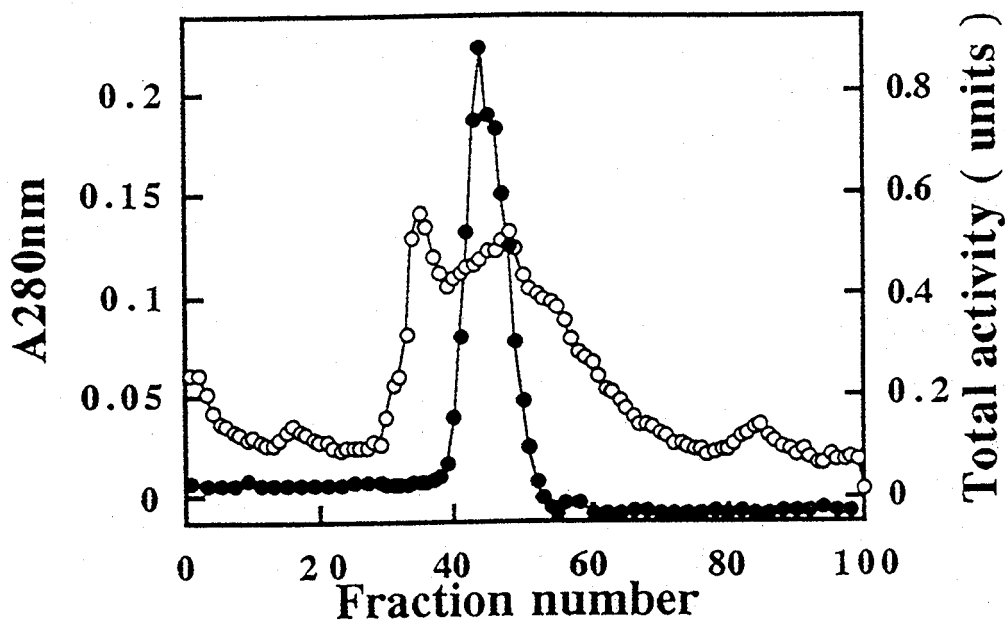
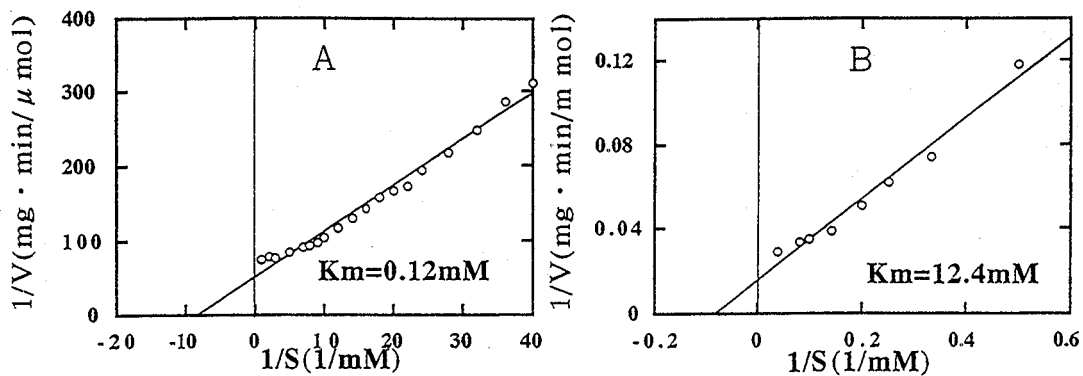
Fig. 2. Sephadex G-150 gel chromatography of α -glucosidase.● ; α -Glucosidase activity, ○ ; Absorbance at 280nm.Fig. 3. Lineweaver-Burk plots of α -glucosidase for *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (A) and maltose (B).

Table 5. Purification of α -glucosidase from an oligotrophic bacterium Y 21.

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/ml)	Yield (%)	Fold
Crude enzyme	69	258	42	0.16	100	1
Ammonium sulfate	17.5	81.2	40	0.49	95	3.1
DE-52 ion exchange	12.5	4.6	9.6	2.1	23	13
Sephadex G-150	10.5	0.5	4.6	9.2	11	58

Table 6. Characteristics of α -glucosidase from Y 21.

Optimum pH :	6.5	Stable pH :	6~11
Optimum temperature :	40℃	Stable temperature :	~30℃
Not active on cellobiose, maltotriose, methyl α -D-glucose, D-trehalose, sucrose, soluble starch, amylose, <i>p</i> -nitrophenyl α - and β -D-galactopyranosides.			
Inhibition: Cu, Ag, <i>p</i> -chloromercuribenzoic acid			

ここまでの精製過程をTable 5. にまとめた。活性の収率は約11%であり、比活性は約58倍に上昇した。この段階の精製酵素についてポリアクリルアミドゲル電気泳動法によりタンパクの均一性を検定した。2本のメインバンドと少数のマイナーバンドが確認された。このゲルをカットし各区分について酵素活性を検査したところ、2本のメインバンドのうち一方のみに活性が検出された。純粋な酵素が得られるまでさらに精製を進めるべきであるが、精製が困難で時間がかかるので、この部分精製酵素を使って酵素の性質を調べることにした。

(2) 酵素の性質

得られた性質を一括してTable 6. にまとめた。活性の最適pHは6.5であり、pH 6 から11の範囲で安定であった。本酵素は40度付近で最大活性を示し、熱に不安定で40度10分間の加熱で60%以上失活した。Cu, Agおよび*p*-chloromercuribenzoic acidによって明らかな活性阻害を受けた。

p-nitrophenyl α -D-glucopyranosideおよびマルトースに対するKm値をLineweaver-Burk plots (Fig. 3) から求めた。それぞれ0.12mMおよび12.4mMであった。

考 察

一般に酵素の基質に対する親和性が高いほど、すなわちKm値が低いほど、その酵素はより低い濃度の基質に作用できる。したがって低いKm値を有する酵素を持つことは低栄養環境中でわずかな栄養源を代謝する上に好都合である。そこで当研究室で分離した低栄養細菌の酵素がそのような特徴を有しているかどうか注目した。酵素には糖質の代謝酵素として4種の糖質加水分解酵素 (α -あるいは β -の各グルコシダーゼおよびガラクトシダーゼ) と、EMP経路の最初の段階のヘキシナーゼと、合わせて5種を取り上げた。本来Kmの正確な値は各精製酵素を用いて測定されるべきではあるが、今回はその予備段階として広く各菌について粗酵素のままで測定し、およそそのKm値を推定することを目的とした。また各加水分解酵素の基質としては測定が比較的容易

な各々の *p*-nitrophenyl glycoside を用いた。

すでに報告されている各種微生物の当該基質に対する K_m 値⁽¹⁴⁻²²⁾と比較すると、今回の測定値はいずれも格別低いものではなく、既報の値の範囲内にあった。また見かけ上複数の K_m 値が得られたものもあった。これは粗酵素を使っているため不純物による影響が現れていると解釈されるが、 K_m 値の異なる複数のアイソザイムが含まれているという可能性も考えられる。もし細菌がそのようなアイソザイムを持つならば、基質濃度の違いによってアイソザイムを使い分けていることが期待される。そこで見かけ上複数の K_m 値を示した代表として Y21 菌株の α -グルコシダーゼを取り上げ、その精製を行ったが、カラムクロマトグラフィーでもゲル電気泳動によっても活性区分が分離することは観察されなかった。したがってこの酵素ではアイソザイムの存在は示唆されなかった。

さらに、菌体当たりの各酵素生産量においても同じ条件で比較した大腸菌や枯草菌などよりもむしろ劣っていたし、部分精製 α -グルコシダーゼでは熱に不安定でもあった。そうした結果をふまえると、本実験の範囲内では低栄養細菌が低濃度のこれら糖質を利用する上に都合の良い性質の代謝酵素を有しているといった根拠を得ることはできなかった。

われわれはすでに、放射能でラベルしたグルコースやアミノ酸を用いて低栄養細菌への取込み活性について K_m 値を測定し、その値が大腸菌と比べて大差ないことを知った⁽⁷⁾。また最近、低栄養細菌が大腸菌と同様に定常期において栄養飢餓だけでなく熱や酸素や浸透圧に対するストレス耐性を持ち、ある種のシグマ因子を有している可能性を見つけた⁽²³⁾。したがって低栄養細菌も大腸菌ほど明確ではないかもしれないが、低栄養を飢餓として認識して、転写を制御する機構を持っている可能性がある。以上のように当研究室で分離された土壌低栄養細菌では、いまだに低栄養下（有機炭素 1 ppm 以下）での生育を可能にする特別な仕掛けを見出すに至っていない。

要 約

土壌から分離した低栄養細菌のうち約60%がマルトース、セロビオース、メリビオースおよびラクトースを資化できた。それら資化性菌の中からグルコシダーゼおよびガラクトシダーゼ生産量の比較的多いものを選び、それらの粗酵素について各 *p*-nitrophenyl glycoside 基質に対する K_m 値を測定した。また代表的な4菌のヘキシキナーゼについてもD-グルコースおよびATPに対する K_m 値を求めた。これらの K_m 値は、すでに報告されている各種微生物酵素の値と大差なかった。したがって低栄養細菌が必ずしも低い濃度の糖質に対して親和性の高い代謝酵素を有しているわけではなかった。

低栄養細菌 Y21 の α -グルコシダーゼが硫酸分画、DE-52イオン交換クロマトグラフィーおよびSephadex G-150ゲル濾過クロマトグラフィーによって部分精製され、比活性は約58倍上昇した。*p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside およびマルトースに対する K_m 値はそれぞれ0.12 mM, 12.4 mMであった。本酵素は熱に不安定であり、Cu, Agおよび *p*-chloromercuribenzoic acid によって活性阻害を受けた。

謝 辞

本実験のうち特に酵素の精製を遂行するに当たり、応用酵素化学研究室の何森 健教授および同研究室の大学院生の方々に貴重なアドバイスおよび懇切なご指導を賜った。深く感謝申し上げる。

引用文献

- 1) MORITA, R. Y. : *Can. J. Microbiol.*, 34, 436-441 (1988) .
- 2) MARTIN, A. : *Mol. Microbiol.*, 5, 3-10 (1991).
- 3) KUZNETSOV, S. I., DUBININA, G. A., and LAPTEVA, N. A. : *Annu. Rev. Microbiol.*, 33, 377-387 (1979) .
- 4) ISHIDA, Y., and KADOTA, H. : *Microb. Ecol.*, 7, 123-130 (1981) .
- 5) SUWA, Y., and HATTORI, T. : *Soil Sci. Plant Nutr.*, 30, 397-403 (1984) .
- 6) SATO, M., UENO, Y., SAWAMURA, Y., KAJIKAWA, K., KIMURA, Y., YOKOYAMA, K., and IZUMORI, K. : *Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ.*, 45, 31-40 (1993) .
- 7) KIMURA, Y., UENO, Y., KAJIKAWA, K., NAKAMURA, T., and SATO, M. : *Bull. Jpn. Soc. Microb. Ecol.*, 10, 21-29 (1995) .
- 8) KAJI, A., SATO, M., SHINMYO, N., and YASUDA, M. : *Agric. Biol. Chem.*, 36, 1729-1735 (1972).
- 9) DAHLQVIST, A. : *Biochem. J.*, 80, 547-551 (1961).
- 10) PORTER, E. V., CHASSY, B. M., and HOLMLUND, C. E. : *Biochim. Biophys. Acta*, 611, 289-298 (1980) .
- 11) DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., and SMITH, F. : *Anal. Chem.*, 28, 350-356 (1956) .
- 12) BRADFORD, M. M. : *Anal. Biochem.*, 72, 248-254 (1976) .
- 13) DAVIS, B. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404-427 (1964) .
- 14) 日本生化学会編：生化学データブックⅠ. pp.732-736. 東京化学同人，東京（1979）.
- 15) 日本生化学会編：生化学データブックⅡ. pp.208-209. 東京化学同人，東京（1980）.
- 16) DE CORI, S., SHANTHA KUMARA, H. M. C., and VERACHIETI, H. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3074-3078 (1994) .
- 17) SHANTHA KUMARA, H. M. C., DE CORI, S., and VERACHIETI, H. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2352-2358 (1993) .
- 18) GHERARDINI, F., BABCOCK, M., and SALYERS, A. A. : *J. Bacteriol.*, 161, 500-506 (1985) .
- 19) RIOS, S., PEDREGOSA, M., MONISTROL, I. F., and LABORDA, F. : *FEMS Microbiol. Letters*, 112, 35-42 (1993) .
- 20) KAWAMURA, S., KASAI, T., and TANUSI, S. : *Agric. Biol. Chem.*, 40, 641-648 (1976) .
- 21) SCOPES, R. K., TESTOLIN, V., STOTER, A., GRIFFITHS-SMITH, K., and ALGAR, E. M. : *Biochem. J.*, 228, 627-634 (1985) .
- 22) KLEIN, D. P., and CHARLES, A. M. : *Can. J. Microbiol.*, 32, 937-941 (1986) .
- 23) KIMURA, Y., OOKUBO, N., OZAWA, H., and SATO, M. : *Microbes and Environments*, 12, (1997). (in press)

(1997年5月30日受理)