細菌 β -アミラーゼ抗体と免疫化学反応を示す 耐熱性 α -アミラーゼの分離[†]

金 在英*, 南森隆司**, 青木健次**, 新家 龍**

Isolation of Thermostable α -Amylase by Immunoreaction with Bacterial Anti- β -Amylase Serum

Kim Jae YOUNG,* Takashi NANMORI,** Kenji AOKI** and Ryu SHINKE**

* Division of Science of Biological Resources, The Graduate School of Science
and Technology, Kobe University,** Department of Agricultural Chemistry,
Faculty of Agriculture, Kobe University

(1-1, Rokkodaicho, Nada-ku, Kobe 657, Japan)

An attempt was made to isolate thermophilic bacteria growing at temperatures above 60°C and secreting β -amylase using immunoreaction between anti- β -amylase serum or IgG prepared from *Bacillus cereus* β -amylase and unknown amylases. Among 170 strains isolated from various sources like soils, hot springs, etc., only one strain was selected by dot-ELISA and Western blotting methods. Morphological and physiological properties of the strain indicated that the strain belongs to *Bacillus stearothermophilus*.

The amylase fraction was obtained from the culture filtrate by salting out with ammonium sulfate (0.7 saturation) and purified by ion-exchange chromatography on DEAE-cellulofine A-500 and gel filtration on Sephadex G-100. Further, by first protein liquid chromatography (FPLC) on Mono-Q HR5/5 column, the three amylase fractions (Fracts. I, II, and III) were obtained. Analysis of their hydrolytic products from starch showed that the amylases are classified to α -amylase. Their optimum pH and temperature were around 60 and 70°C, respectively, and the enzymes were stable around 70°C.

Among the three α -amylases only Fract. III had immunoreactivity with anti- β -amylase serum or IgG, and gave different products in starch hydrolysis; mainly glucose from soluble starch, and maltose and maltotriose from raw starch.

これまで著者らは¹⁾, 土壌から分離した β -アミラーゼ生産菌 *Bacillus cereus* BQ10 を親株として, 各種変異処理を行い, 孢子形成能欠損変異株で数百倍もの高い酵素生産能をもつ β -アミラーゼ生産菌を誘導・分離した。しかし, 微生物 β -アミラーゼは, 一般に耐熱性が小さく反応の至適 pH が中性ないしアルカリ性側にあって, 現状では実用酵素として利用されるまでには至っていない。

い。

そこで著者らは, 広く自然界から好熱性微生物を分離し, それらのなかに実用酵素生産菌を求めることとした。自然界から得られた微生物の酵素生産能については, 酵素量が比較的微量であることやヨウ素澱粉反応で検出されにくいことなどから, 抗原抗体反応を利用して調べた。この免疫化学反応を利用する方法は, 従来微小のために見逃していたかもしれない酵素生成能も検出できる可能性が高い²⁾。

本報では, *B. cereus* の β -アミラーゼの抗体を利用して耐熱性酵素生産菌を分離・同定し, 得られた耐熱性酵素について検討した結果を報告する。

[†] 本研究内容は日本農芸化学会関西支部第 355 回例会 (昭和 63 年 7 月) にて発表。

* 神戸大学大学院自然科学研究科博士課程

** 神戸大学農学部農芸化学科 (657 神戸市灘区六甲台町 1-1)

実験方法

1. β -アミラーゼの抗体調製法

B. cereus BQ 10-S1 SpoIII の生産する β -アミラーゼに対する抗体を既報²⁾に従って調製した。すなわち、 β -アミラーゼ溶液 (0.5 ml) に同量の Adjuvant Freund (半井化学薬品株) を混合し、ウサギに皮下注射した。その初回は精製 β -アミラーゼ 2 mg を注射し、続いて 1 mg を1週間ごとに3回注射した。最後に 3 mg を投与し、3日後に全血液を採取して β -アミラーゼ抗体を調製した。

2. 耐熱性アミラーゼ生産菌の分離・培養法

神戸大学構内の土壌、有馬温泉をはじめとする日本各地の温泉の泉源ならびにその付近の土壌などを中心に、広く自然界から試料を採取した。栓付試験管 (19×55 mm) に採取された各試料は、採取時の試料温度に保持して実験室に持ち帰り、それら試料に含まれる微生物の分離実験に供した。

1) 第1次スクリーニング法

第1次スクリーニング用培地には可溶性澱粉 1%, 肉エキス 0.5%, ポリペプトン 1%, 食塩 0.5%, 寒天 1.5%を含む培地 (pH 7.0) を用いた。土壌試料は無菌水に懸濁したものを、また液体試料の場合は適宜希釈液をそれぞれ 0.2 ml 宛本培地上に塗抹し、70°C で平板培養した。培養2～3日で生育してくるコロニーのうち、ヨウ素澱粉反応が陽性の検体を選択した。得られた菌株を、寒天を含まない同液体培地で70°C で振盪培養し、培養濾液のアミラーゼ活性を 3,5-ジニトロサリチル酸法⁴⁾で測定した。

2) 第2次スクリーニング法

第2次スクリーニングは Dot-ELISA 法³⁾によって行った。すなわち、1) の培養濾液およびその希釈液を Bio-Rad 社の Dot-ELISA 装置を用いてニトロセルロース膜に吸着させ、*B. cereus* の β -アミラーゼ抗体を1次抗体として30°C で1時間反応させたのち、パーオキシダーゼラベルした2次抗体 (Amersham 社) と1時間反応後、3,3'-ジアミノベンチジン溶液で発色させた。免疫反応陽性酵素を分泌する菌株を選択・分離した。

3) 第3次スクリーニング法

Dot-ELISA 法で陽性反応を示した培養濾液に β -アミラーゼ抗体を添加し30°C、30分間反応させた。それに少量のプロテインAを加えて共沈させ、得られた沈澱物を SDS-電気泳動し、ニトロセルロース膜に Western blotting を行った。膜上で同様に1次抗体と2次抗体を

反応させて発色させた。その結果、*B. cereus* の β -アミラーゼと同じ位置に陽性バンドを示す酵素を分泌する菌株を選択した。

3. アミラーゼ活性測定法

アミラーゼ活性の測定は、3,5-ジニトロサリチル酸試薬を用いる 3,5-DNS 法⁴⁾によった。すなわち、試験管に 0.25 ml の酵素溶液と 1%可溶性澱粉溶液 0.25 ml とを加え5分間反応させた。1 ml の 3,5-DNS 試薬を加えて反応を停止させ、沸騰水中で5分間加熱した後、流水中で冷却し、4.5 ml の水で希釈して 535 nm で比色した。検量線は各種濃度のマルトースを含む溶液について同様に発色せしめて作成したものを用いた。また、アミラーゼ活性は1分間に 1 μ mol のマルトースを生成する活性を1単位として表示した。

4. 分離菌株の同定法

上記方法で選択・分離された菌株の菌学的諸性質は、Bergey's Manual (1986)⁵⁾ および「微生物の分類と同定」(1985)⁶⁾に従って調べ、それらの結果によって同定した。

5. 耐熱性アミラーゼの分画と酵素反応生成物の分析

上記方法で選択・分離された好熱性菌を 500 ml の培地を含む 3 l 容三角フラスコで 70°C、24時間振盪培養した後、その培養液を遠心分離 (10,000 rpm, 20分間) し、得られた遠心上澄液に硫酸を 0.7 飽和になるように添加した。沈澱部を同様に遠心分離し、50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) に溶解した。同緩衝液で24時間透析後 Mono-Q HR 5/5 カラム (Pharmacia 社) に負荷し、食塩濃度 0.3 M までの gradient elution による高速蛋白液体クロマトグラフィー (FPLC) を行った。溶出速度は 1 ml/min で、得られる各画分のアミラーゼ活性を可溶性澱粉および生澱粉 (コムギ、和光純薬株) を基質として測定した。

酵素反応生成物の分析は、日立 665A-12 型高速液体クロマトグラフ (HPLC) にて行い、カラムは半井コスモシリパック D カラム (Nakarai Tesque Co.) 4.6×150 mm、溶出液 (アセトニトリル: 水=75:25) の流速は 1 ml/min であった。これら FPLC および HPLC の操作は室温で行った。

実験結果

1. 耐熱性アミラーゼ生産菌の分離

1) 第1次スクリーニングの結果

1%可溶性澱粉を含む寒天培地で70°Cにおいて生育する菌株を170菌株分離した。それらのうちヨウ素澱粉

Fig. 1. Detection of amylase by Dot-ELISA method.

Spo III: β -amylase from *Bacillus cereus* BQ10-S1 Spo III. β -Amy: purified β -amylase from the same strain. ○: samples (from the left, original, 1/2, 1/4, 1/8...solutions).

Table 1. Immunoreaction of thermostable amylase from strain B-1.

	Amylase activity	
	A_{535}	Relative activity
No addition	0.420	100
Anti- β -amylase serum (100 μ l)	0.255	61
Anti- β -amylase serum (200 μ l)	0.325	77
Anti- β -amylase IgG (50 μ l)	0.290	69

Anti- β -amylase serum or IgG was added to culture filtrate and incubated at 30°C for 30 min, to which protein A was added. Amylase activity of supernatant was measured by Bernfeld's method.

反応陽性のものを 50 菌株分離した。さらに、アミラーゼ活性の比較的強い菌株をそのなかから 30 菌株選択した。

2) 第 2 次スクリーニングの結果

第 1 次スクリーニングで得られた 30 菌株を 1% 可溶性澱粉を含む液体培地で 70°C, 24 時間振盪した。得られた各培養濾液について Dot-ELISA 法で免疫交差反応を試みた。その結果、3 菌株が免疫反応陽性であった。Fig. 1 はその結果の 1 例である。

3) 第 3 次スクリーニングの結果

第 2 次スクリーニングで得られた 3 菌株の各培養濾液に β -アミラーゼ抗体を添加し、30°C で 1 時間反応させ、Protein A と共沈後遠心上澄液についてアミラーゼ活性を 70°C で測定した。Table 1 からわかるように、上澄液中の酵素活性は約 30% 低下したことから、免疫化学反応によってアミラーゼ蛋白質が共沈したものと思われ

た。

次に、遠心沈澱部について SDS-電気泳動後、Western blotting 法を行った結果 (Fig. 2) からわかるように、3 菌株中の 1 菌株 (B-1 菌株) のみが *B. cereus* の β -アミラーゼと同じ位置に陽性バンドを示した。

これらのスクリーニングの結果から選択・分離された B-1 菌株について、菌学的諸性質を調べるとともにその分泌酵素を濃縮してクロマトグラフィー的分画に供した。

2. 耐熱性アミラーゼ生産菌の同定

土壌から分離され上記スクリーニング法で選択された B-1 菌株について菌学的諸性質を調べ、類似菌株のそれと比較した (Table 2)。B-1 菌株は好気性桿菌で末端内生孢子を形成し、VP テストは陰性、ゲラチンおよび澱粉分解性は陽性であった。生育 pH は弱酸性側にあり、生育温度は 40 ~ 75°C であった。類似菌株の諸性質との比較から B-1 菌株は、*Bacillus stearothermophilus* に

Fig. 2. Detection of amylase protein precipitated with anti- β -amylase IgG and protein A by Western blotting method.

A: amylase precipitated with anti- β -amylase IgG and protein A. B: β -amylase from *Bacillus cereus* BQ10-S1 Spo III.

属するものと推定し、*B. stearothermophilus* B-1 と仮名した。

3. 耐熱性アミラーゼの分画と酵素反応生成物

B. stearothermophilus B-1 の培養濾液の硫酸塩析、DEAE-セルロファイン A-500 のイオン交換クロマトグラフィー、セファデックス G-100 のゲル濾過等により得られた酵素標品を、さらに高速蛋白液体クロマトグラフィーで分画した。その結果は Fig. 3 からわかるように、アミラーゼ活性を示す 3 画分 (画分 I, II および III) が得られた。これら酵素画分について、可溶性澱粉ならびにコムギ生澱粉に対する酵素反応生成物を高速液体クロマトグラフィーによって分析した。可溶性澱粉に対する酵素反応は、1 ml の酵素溶液に 4 ml の 1% 可溶性澱粉溶液を加えて 70°C で 2 時間反応させた。得られた反応溶液をエバポレーターで約 1 ml に濃縮してクロマトグラフィーに供した。生澱粉に対する酵素反応は、B-1 菌株の培養濾液にコムギ生澱粉 (20 mg/ml) を懸濁し、50°C 振盪下で反応させ、その遠心上澄液中の生成還元糖を 3,5-DNS 法で測定した。

その結果、画分 I, II および III のアミラーゼは可溶性澱粉を分解したが、画分 I および II の分解生成物がグルコース (62.5%), マルトース (25.0%) およびマルトトリオース (12.5%) であるのに対し、画分 III の分解生成物は主としてグルコース (86.9%) であることがわかった (Fig. 4A)。これらのことから、B-1 菌株の生産するアミラーゼは α -アミラーゼに分類される酵素であり、とくに画分 III がグルコース生成能の高い酵素であることがわかった。

Table 2. Comparison of morphological and physiological properties of strain B-1 and *Bacillus stearothermophilus*.

Properties	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Strain B-1
Spore shape	Elliptical	Elliptical
Spore position	Terminal	Terminal
Anaerobic growth	—	—
VP test	—	—
Hydrolysis of gelatin	+	+
Hydrolysis of starch	+	+
Growth at pH 6.8	+	+
pH 5.7	—	+
pH 5.3	—	+
Growth at 30°C	—	—
40°C	+	+
50°C	+	+
55°C	+	+
65°C	+	+

Symbols: +, 90% or more of strain are positive; —, 90% or more of strain are negative.

Fig. 3. Fractionation of amylase from strain B-1 on FPLC (Pharmacia Co., Ltd.).

Column, Mono-Q HR5/5; elution, 1 ml/min. I, amylase fraction I; II, amylase fraction II; III, amylase fraction III.

Fig. 4. Analysis of reaction products by amylase III from strain B-1 by HPLC (Hitachi 665A-12).

Column, Nakarai Cosmosil-packed column (Nakarai Tesque Co.) 4.6×150 mm; elution, 1 ml/min. A, soluble starch; B, wheat raw starch.

一方、生澱粉の場合には3画分とも同じ3種類の分解生成物を示した。画分Ⅲの場合を例示すると (Fig. 4B)、少量のグルコース (2.1%) と主成分のマルトース (51.3%) およびマルトトリオース (39.4%) であった。したがって、画分Ⅲは可溶性澱粉と生澱粉に対して作用様式を異にすることになり、画分ⅠおよびⅡとも酵素化学的に異なる α -アミラーゼ画分であると推論された。また、3画分の最適 pH および温度はそれぞれ pH 6.0 および 70°C であった。

考 察

B. cereus の β -アミラーゼで調製した β -アミラーゼ抗体を用いて耐熱性アミラーゼ生産菌のスクリーニングを試みた際に、耐熱性 α -アミラーゼ生産菌、*B. stearothermophilus* B-1 が分離・同定された。このことは、 β -アミラーゼ抗体の免疫化学反応部位と耐熱性 α -アミラーゼのそれとに共通した反応部位の存在することを推論させるものである。そこで、B-1 菌株の生産する三つ

の酵素画分について β -アミラーゼ抗体との免疫反応性を Fig. 2 と同様の方法で調べた結果、画分Ⅲのみが β -アミラーゼ抗体との反応性を示した。しかも、画分Ⅲの可溶性澱粉に対する主分解生成物がグルコースであり、生澱粉に対するそれがマルトースおよびマルトトリオースであることから、画分Ⅲは他の 2 画分と明らかに異なることが判明した。さらに、Table 1 の結果にみられたように、 β -アミラーゼ抗体と免疫化学反応で沈澱し、約 30% の α -アミラーゼ活性が減少したのは、三つの酵素画分中主として画分Ⅲによることも明らかである。

このように、 β -アミラーゼ抗体と耐熱性 α -アミラーゼの画分Ⅲとの間に免疫化学反応が認められ、また画分Ⅲのみが可溶性澱粉と生澱粉とで異なった分解生成物を与えるなど、興味ある事実が認められた。これまで生澱粉分解活性をもつアミラーゼの研究は、かびのグルコアミラーゼ^{7,8)}、細菌の α -アミラーゼ⁹⁻¹⁴⁾、 β -アミラーゼ^{15,16)} およびグルコアミラーゼ¹⁷⁾ など多数にのぼるが、B-1 菌株の画分Ⅲにみられたような可溶性澱粉と生澱粉に対する分解生成物の相違することを報告したものはないように思われる。

今後、画分Ⅲと他の酵素画分との差異、とくに生澱粉吸着性を中心とする酵素反応機構の差異などを中心に詳細な研究が必要であると考えられる。

要 約

B. cereus の B-アミラーゼで調製した B-アミラーゼ抗体を用いる抗体抗原反応を利用して耐熱性アミラーゼ生産菌の選択・分離を試みた。その過程で、 β -アミラーゼ抗体と免疫化学反応性を示す耐熱性 α -アミラーゼを生産する好熱性菌株 (B-1 菌株) を分離し、*B. steartophilus* B-1 と同定した。

B-1 菌株の生産する α -アミラーゼを硫酸塩析で濃縮し、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過などで精製した後、Mono-Q HR 5/5 カラムを用いる FPLC で三つの酵素画分 (画分Ⅰ、ⅡおよびⅢ) に分画できた。3 画分とも可溶性澱粉を分解してグルコース、マルトース、マルトトリオースを生成したが、画分Ⅲの分解生成物はグルコースが主体であった。生澱粉に対しては、3

画分ともマルトースとマルトトリオースが主分解生成物であった。画分Ⅲは可溶性澱粉と生澱粉とで分解生成物を異にすることや β -アミラーゼ抗体と免疫化学反応を示す主成分であることなど興味ある事実が認められた。

文 献

- 1) 新家 龍：醸酵工学，57，102-113 (1979)。
- 2) T. NANMORI, R. SHINKE, Y. NAKANO, S. KITAOKA and H. NISHIRA: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 383-389 (1985)。
- 3) Bio-dot Microfiltration Apparatus Instruction Manual: Bio-Rad Laboratories (1983)。
- 4) P. BERNFELD: *Advances in Enzymology*, **12**, 385 (1951)。
- 5) D. CLAUS and R. C. W. BERKELEY: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, p. 1105-1139 (1986)。
- 6) 長谷川武治編：微生物の分類と同定，学会出版センター，p. 105-153，東京 (1985)。
- 7) S. UEDA: *Denpun Kagaku*, **25**, 124-131 (1978)。
- 8) S. UEDA, B. C. SAHA and Y. KOBAYASHI: *Microbiol. Sci.*, **1**, 21-26 (1984)。
- 9) K. ISONO: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 852-857 (1970)。
- 10) K. YUTANI, I. SAKAKI and K. OGASAWARA: *J. Biochem.*, **74**, 573-579 (1973)。
- 11) K. MIZOKAMI, K. KAKUTANI and K. KITAHARA: *Denpun Kagaku*, **25** 132-139 (1978)。
- 12) H. TANIGUCHI, F. ODASHIMA, M. IGARASHI, Y. MARUYAMA and M. NAKAMURA: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2107-2115 (1982)。
- 13) 高谷友久，大島智子，不破英次：日本澱粉学会講演要旨集，p. 214 (1986)。
- 14) T. TANAKA, E. ISHIMOTO, Y. SHIMOMURA, M. TANIGUCHI and S. OHI: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 399-405 (1987)。
- 15) 三吉新介，東原昌孝，岡田茂孝：澱粉科学，**33**, 238-243 (1986)。
- 16) 金 在英，南森隆司，青木健次，新家 龍：日本農芸化学会関西支部例会，第 355 回講演要旨集，p. 6 (1988)。
- 17) S. TAKAO, H. SASAKI, K. KUROSAWA, M. TANIDA and Y. KAMAGATA: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1979-1987 (1986)。

(昭和 63 年 11 月 9 日受付，昭和 63 年 12 月 20 日受理)