Alternaria alternata β -ガラクトシダーゼの精製と その酵素特性

菊池俊彦*・石渡尚子*

Purification and Characteristics of β -Galactosidase from *Alternaria alternata*

Toshihiko KIKUCHI* and Naoko ISHIWATA*

* Showa Women's University, 1-7, Taishido,
Setagaya-ku, Tokyo 154

Alternaria alternata β -galactosidase was purified and its characteristics were examined. Water extract of crude enzyme obtained from wheat bran culture was purified by salting-out of ammonium sulfate, and by column chromatographies of Sephacryl S-200, DEAE-TOYOPEARL 650 M and Hydroxyapatite. At the final stage, the enzyme was purified to 174-fold activity in comparison with its crude extract and shown unique activity band. Its character were followings; molecular weight was 125 000, optimum reaction pH was 4.0~4.5 for ONPG and 5.0~5.5 for lactose, and its stability was kept in the pH range 4.0~8.5. Optimum reaction temperature was about 60°C and heat stability was below 55°C in 1 hour. Km values were indicated respectively 1.56 mM for ONPG and 13.9 mM for lactose. Inhibitory actions were not observed in the tested reagents. (Received Apr. 6, 1992)

β -ガラクトシダーゼ (EC 3. 2. 1. 23, β -D-galactoside galactohydrolase), 別名ラクターゼ, はラクトースを加水分解しグルコースとガラクトースを遊離する一方, 転移反応によってオリゴ糖を生成することはよく知られている¹⁾²⁾. この酵素については, ラクトース消化吸収障害への経口投与剤あるいは低ラクトース乳・乳製品製造を目的として, 酵素生産性, 反応 pH などそれぞれ求められる特性のものが多種の微生物源から探索され, 諸性質が調べられてきた³⁾. また, 最近では, ビフィダス因子としての観点から, β -ガラクトシダーゼの生成するオリゴ糖に関しても多くの報告がみられる⁴⁻⁶⁾.

著者らは, 比較的高い耐熱性があるとされている *Alternaria* 属 β -ガラクトシダーゼ⁷⁻⁹⁾ のうち, 粗酵素による予備実験でもその特徴がみられ¹⁰⁾, また, 精製

酵素の特性についての報告例の稀な *Alternaria alternata* β -ガラクトシダーゼに注目し, 一連の実験を行った. 本報では抽出粗酵素の精製と得られた部分精製酵素の特性について報告する.

実験方法

1. 供試菌株および培養方法

供試菌株は国立衛生研究所より分与をうけ, 研究室に保存中の *Alternaria alternata* を用いた.

ポテトデキストロース寒天斜面培地で 25°C 7 日間前培養した供試菌株に滅菌水を加え, 胞子懸濁液 (胞子数 10^8 /ml) を調製した. これを小麦ふすま 35 g に 1% ラクトース水溶液 30 ml を加えた培地に 1 ml 接種し, 25°C 7 日間培養した.

* 昭和女子大学 (〒154 東京都世田谷区太子堂 1-7)

2. 粗酵素抽出液の調製

培養終了後のふすま培地に 10 倍容の蒸留水を加えホモジナイザーで破碎し、遠心分離 (12 000×g, 20 分間) して上澄を粗酵素抽出液とした。

3. 酵素活性の測定

β -ガラクトシダーゼ活性測定の基質として *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) およびラクトースを使用した。ONPG は 0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 4.5) に 5 mM になるよう溶解して基質溶液とし、その 0.4 ml に酵素液 0.1 ml を加え 37°C で 20 分間反応させた。1.0 ml の 0.25 M 炭酸ナトリウム溶液を加えて反応を停止させ、420 nm で吸光度を測定した。また、ラクトースは 0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 4.5) に 0.25 M になるよう溶解して基質溶液とし、ONPG と同様に反応させた後、沸騰浴中で 10 分間加熱し酵素を失活させ反応を停止し、遊離したグルコースをグルコース C-テストで測定した。

酵素単位は上記条件で 1 分間に 1 μ mol の *o*-Nitrophenol (ONP) または D-グルコースを遊離するのに必要な酵素量を 1 単位とした。

4. タンパク質量の測定

牛血清アルブミンを標準タンパク質として LOWRY らの方法¹³⁾に従って測定した。また、クロマトグラフィーによる精製過程では 280 nm の吸光度を測定し、タンパク質量とした。

5. 酵素の精製

粗酵素抽出液を硫酸アンモニウム分画の後、Sephacryl S-200, DEAE-TOYOPEARL 650 M および Hydroxyapatite のカラムクロマトグラフィーによって精製した。これらの操作はすべて 4°C で行った。条件の詳細は実験結果に含めて記述した。

6. 電気泳動

DAVIS の方法¹³⁾に従い、7.5% ポリアクリルアミドゲルと 0.025 M Tris-0.19 M glycine buffer (pH 8.3) を用い、Coomassie brilliant blue R-250 でタンパク質を染色した。また、酵素タンパク質の活性染色は COHEN らの方法¹²⁾に従い、泳動を終了したゲルディスクを 4 mM 6-Bromo-2-naphthyl- β -D-galactopyranoside (BNG) 中で 37°C, 1 時間反応させ、0.1% Fast blue B で染色した。

7. 推定分子量の測定

WEBER らの方法¹³⁾に従い、SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて測定した。

8. 最適反応 pH および pH 安定性

pH 値によって 3 種類の buffer を使い分け、37°C で pH 2.0~10.0 の各 pH における酵素活性を測定した。安定性は 37°C で各 pH に 1 時間保持後、ONPG を基質として残存活性を測定した。

9. 最適反応温度および温度安定性

pH 4.5 で 30~80°C の各温度における酵素活性を測定した。

安定性は pH 4.5 で各温度に 1 時間保持し、急冷後 ONPG を基質として残存活性を測定した。

10. 反応速度パラメーター

0.4~6.4 mM ONPG および 4.0~64 mM ラクトースを基質として、pH 4.5, 37°C における K_m 値と V_{max} 値を LINEWEAVER らの方法¹³⁾に従って求めた。

実験結果および考察

1. 硫酸アンモニウム分画

粗酵素抽出液 1 000 ml に硫酸アンモニウムを 80% 飽和まで加え 4°C で 2 時間攪拌し、生じた沈殿を遠心分離 (10 000×g, 20 分間) して集めた。少量の 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) に溶解し濾過した後、同 buffer を用いて Sephadex G-25 カラム (ϕ 3.5×50 cm) で脱塩し、限外濾過によって約 20 ml まで濃縮した。

2. Sephacryl S-200 カラムクロマトグラフィー

硫酸アンモニウム分画後、脱塩・濃縮した活性画分を 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) で平衡化した Sephacryl S-200 カラム (ϕ 2.6×70 cm) に通しゲル濾過を行った。

結果を Fig. 1 に示した。

3. DEAE-TOYOPEARL 650 M カラムクロマトグラフィー

Sephacryl S-200 カラムクロマトグラフィーで得られた活性画分 (タンパク質量; 135.5 mg) を 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) で平衡化した DEAE-Toyopearl 650 M カラム (ϕ 2.6×25 cm) に通し、非吸着画分を同 buffer で洗浄後、全量 1 000 ml の同 buffer 中 0~0.5 M NaCl 濃度勾配で溶出した。結果を Fig. 2 に示した。

活性画分 90 ml を集め限外濾過で約 10 ml まで濃縮し、10 mM phosphate buffer (pH 6.8) に対し透析を行った。

4. Hydroxyapatite カラムクロマトグラフィー

上記の透析した活性画分 (タンパク質量; 5.0 mg)

Fig. 1 Sephacryl S-200 column chromatographic pattern

Column: Sephacryl S-200 ($\phi 2.6 \times 70$ cm) equilibrated with 50 mM phosphate buffer (pH 6.0); flow rate, 12 ml/h; fraction, 5 ml
 —○—: Protein
 —●—: β -galactosidase activity

Fig. 2 DEAE-TOYOPEARL 650 M column chromatographic pattern

Column: DEAE-TOYOPEARL 650 M ($\phi 2.6 \times 25$ cm) equilibrated with 50 mM phosphate buffer (pH 6.0); elution, liner gradient of NaCl concentration produced with each 500 ml of phosphate buffer and the buffer containing 0.5 M NaCl; flow rate, 30 ml/h; fraction, 10 ml
 —○—: Protein
 —●—: β -galactosidase activity
 ---: NaCl concentration

を 10 mM phosphate buffer (6.8) で平衡化した Hydroxyapatite カラム ($\phi 1.0 \times 15$ cm) に通した. 全量 160 ml の同 buffer 中 0~0.4 M NaCl 濃度勾配で溶出した. 結果を Fig. 3 に示した.

活性画分 24 ml を集め 50 mM phosphate buffer (6.0) に対し透析し, 限外濾過で約 10 ml まで濃縮した.

精製過程における総活性, 総タンパク質量, 比活性および収率をまとめて Table 1 に示した. 最終段階で得られた酵素標品の比活性は 4.53 units/mg であった. この値は *Aspergillus oryzae*¹⁴⁾ の 87.5 units/mg, *Penicillium citrinum*¹⁵⁾ の 98.1 units/mg には及ばないが, 同属の *Alternaria palmi*⁸⁾ の 4.70 units/mg に近似したものであった.

5. 酵素の精製度

最終精製段階における精製度をポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動によって検討し, 結果を Fig. 4 に示した.

精製酵素は明瞭な一つのバンドを示したほか, ごく僅少の染色物が認められ, きょう雑タンパク質の存在も考えられたが, 活性染色では β -ガラクトシダーゼ活性を

Fig. 3 Hydroxyapatite column chromatographic pattern

Column: Hydroxyapatite ($\phi 1.0 \times 15$ cm) equilibrated with 10 mM phosphate buffer (pH 6.8); elution, liner gradient of NaCl concentration produced with each 80 ml of phosphate buffer and the buffer containing 0.4 M NaCl; flow rate, 9 ml/h; fraction, 2 ml
 —○—: Protein
 —●—: β -galactosidase activity
 ---: NaCl concentration

Table 1 Purification of β -galactosidase from *A. alternate*

Stage	Total protein (mg)	Total activity (unit)*	Specific activity (unit/mg)*	Recovery (%)
Extraction	1393.8	36.4	0.026	100
Ammonium sulfate fractionation	338.4	35.1	0.104	96.4
Sephacryl S-200 chromatography	135.5	27.1	0.200	74.5
DEAE-TOYOPEARL 650 M chromatography	5.0	17.1	3.42	47.0
Hydroxyapatite chromatography	1.9	8.6	4.53	23.6

* ONP unit

Fig. 4 Electrophoresis of β -galactosidase in polyacrylamide gel

Thirteen μ g of protein was applied to gel and stained with Coomassie brilliant blue R-250.

示すバンドは一つのみであった。TANAKA ら¹⁴⁾は *Asp. oryzae* の β -ガラクトシダーゼ精製において 2-プロパノール分画, DEAE-Sephadex A-50 および Sephadex G-200 によるガラムクロマトグラフィーで電気泳動的にも超遠心的にも単一な酵素を得ている。本実験でも同様の方法で精製を試み, また他にも種々の方法で精製を行ってみたが十分な結果は得られなかった。このことから, 以後の実験には最終段階で得られた酵素標品を用いた。

MOZAFFAR ら¹⁶⁾は *Bacillus circulans* から電気泳動的に異なった二種類の β -ガラクトシダーゼを分離し, WIDMER ら¹⁷⁾は *Asp. oryzae* から等電点の類似した三種類の β -ガラクトシダーゼを分離している。しかし, 本菌株の β -ガラクトシダーゼは精製過程において活性が複数のピークとなることはなく, 電気泳動的にも活性

の認められるバンドは一つであり, 一種類のみであると考えられる。

6. 推定分子量

Fig. 5 の結果より本酵素の分子量は約 125 000 と推定された。糸状菌 β -ガラクトシダーゼの分子量は酵母 (約 200 000) あるいは細菌 (約 500 000) のそれよりも小さく, ほとんどが 100 000 前後である³⁾が, *Alternaria* 属のものは 150 000 前後⁸⁾¹⁸⁾と他の糸状菌よりもやや大きい値になっている。しかし, 本酵素の推定分子量は *Asp. niger*³⁾, *Asp. foetidus*¹⁹⁾ あるいは *P. multicolor*²⁰⁾ に近いものであった。

7. 最適反応 pH および pH 安定性

結果を Fig. 6 に示した。最適反応 pH は ONPG を基質とした場合 pH 4.0~4.5, ラクトースを基質とした時 pH 5.0~5.5 であり基質によって pH 1.0 程のずれが認められた。両基質間でのずれは *Asp. foetidus*¹⁹⁾ あるいは *Alt. tenuis*¹⁸⁾ の精製酵素でも, それぞれ pH 値で 1.3~0.5 および 0.2~0.4 と報告されている。このことは, 基質の種類によって酵素との結合状態に差異のあることも考えられるが, 酵素本来の特性か否かも含め, 今後, 検討すべき課題である。また, ラクトース分解活性は ONPG 分解活性よりもアルカリ側における活性低下が少なかった。

pH 安定性は Fig. 7 に結果を示した。本酵素は pH 4.0~8.5 の範囲で安定であり, *Asp. oryzae*¹⁴⁾ および *Asp. foetidus*¹⁹⁾ についても近似した値が報告されている。

8. 最適反応温度および温度安定性

Fig. 8 に示したように, この条件下で ONPG および ラクトースいずれの基質でも 60℃ 前後において活性

は最高となった。双方とも最適温度を過ぎると活性は急速に減少し80℃で失活した。この最適反応温度は、*Alt. palmi*⁸⁾の65℃、*Alt. alternate*の粗酵素⁹⁾が60~70℃であったのに比べ、本菌株の酵素は *Alternaria* 属

としては低いものであった。温度安定性は Fig. 9 に結果を示した。本酵素は55℃、1時間まで安定であった。*Alt. palmi*の精製 β -ガラクトシダーゼ⁸⁾は65℃、2時間保持でも活性は25%しか低下しないという報告も

Fig. 5 Molecular weight determination of β -galactosidase on 7.5% polyacrylamide gels in sodium dodecyl sulfate

- A: α_2 -macroglobulin (Molecular Weight 170 000)
 B: β -galactosidase from *Alt. alternate*
 C: Phosphorylase b (M.W. 97 400)
 D: Glutamate dehydrogenase (M.W. 55 400)
 E: Lactate dehydrogenase (M.W. 35 500)

Fig. 6 Effect of pH on enzyme activity

The activities at various pH were measured under the standard assay conditions with 0.1 M citrate-HCl (pH 2.0-3.0) or 0.1 M citrate-phosphate (pH 3.5-8.0) or 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5-10.0) buffers

- : ONPG
 —○—: Lactose

Fig. 7 Effect of pH on enzyme stability

Enzyme was kept in various pH at 37°C for 1 h with 0.1 M citrate-HCl (pH 2.0-3.0) or citrate-phosphate (pH 3.5-8.0) or Tris-HCl (pH 8.5-10.0) buffers, and then each solutions were diluted with 0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 4.5).

The remaining activities were determined by the standard assay method used ONPG.

Fig. 8 Effect of temperature on enzyme activity

The activities at respective temperatures were measured by the standard assay method.

- : ONPG
 —○—: Lactose

あるが、一般的な糸状菌の酵素に比べ本酵素は耐熱性があると言える。

9. 反応速度パラメーター

結果を Fig. 10 に示した。 K_m 値は ONPG に対して 1.56 mM, ラクトースに対して 13.9 mM であった。

Fig. 9 Effect of temperature on enzyme stability

Enzyme was kept at respective temperatures for 1 h in 0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 4.5) and then in an ice bath for 30 min.

The remaining activities were determined by the standard assay method used ONPG.

Fig. 10 Lineweaver-Burk plot of β -galactosidase used ONPG and lactose as substrates

Activity is expressed as μ M of ONP and glucose formed per min.

—●—, A: ONPG

—○—, B: Lactose

Table 2 Effects of various reagents on β -galactosidase activity

Reagent (1 mM)	Relative activity (%)
None	100
MgSO ₄	104
MnSO ₄	90
CaCl ₂	98
CuSO ₄	100
BaCl ₂	104
FeSO ₄	89
AgNO ₃	100
HgCl ₂	99
ZnSO ₄	102
CaCl ₂	100
NaCl (10 mM)	104
KCl (10 mM)	103
<i>p</i> -Chloromercuribenzoate (0.1 mM)	102
EDTA	102
Dithiothreitol	103
2-Mercaptoethanol	101
Iodoacetoamide	102

The activity was measured under the standard assay conditions.

The concentration of reagents indicate the final concentration in reaction mixture.

この数値を *Asp. oryzae*¹⁴⁾ の 0.72 mM および 18.0 mM に比べると、本酵素はラクトースに対する親和性が高いことが認められる。また、*Asp. foetidus*¹⁹⁾ の 1.61 mM, 68.8 mM, あるいは *Pen. citrinum*¹⁵⁾ の 1.7 mM, 25.0 mM よりもそれぞれ高い値であった。

V_{max} 値は ONPG に対して 6.73 μ M/min/mg protein, ラクトースに対して 783.4 μ M/min/mg protein であった。

10. 金属イオンおよび阻害剤の影響

結果を Table 2 に示した。本酵素は試験に用いた全ての試薬によってほとんど阻害を受けなかった。酵母や細菌の β -ガラクトシダーゼは、 K^+ Mg^{2+} Mn^{2+} 等の金属イオンによって活性化され、 Na^+ , Ca^{2+} 等によって阻害されることが報告されている³⁾。糸状菌では *Penicillium* 属の酵素が Cu^{2+} および Hg^{2+} によって強い阻害を受けることが認められている^{15) 20)} が、*Aspergillus* 属や *Alternaria* 属の酵素は活性に影響を受けないとされている。PCMB 等の SH 基阻害剤に影響されない

ことは、本酵素の活性部位には遊離の sulfhydryl 基がないことを示唆している。

要 約

Alt. alternate を小麦ふすま培地に培養し、 β -ガラクトシダーゼ粗酵素液を抽出した。硫酸アンモニウム塩析の後、Sephacryl S-200, DEAE-TOYOPEARL 650 M および Hydroxyapatite カラムクロマトグラフィーを順次用いて精製を行った。その結果、比活性で 174 倍に精製され、回収率は 23.6% であった。この段階で酵素は活性染色では単一のバンドを示したが、単一タンパク質を得るまでには至らなかった。この部分精製酵素の分子量は 125 000, 最適反応 pH は ONPG を基質とした場合 4.0~4.5, ラクトースを基質とした場合 5.0~5.5 で、pH 4.0~8.5 の範囲内で安定であった。最適反応温度は両基質に対しても 60°C であり、pH 4.5・1 時間保持においては、55°C まで安定であった。 K_m 値は ONPG に対して 1.56 mM, ラクトースに対して 13.9 mM であった。また、本酵素は、金属イオンを始め各阻害剤の影響をほとんど受けなかった。

文 献

- BURVALL, A., ASP, N.-G. and DAHLQVIST, A.: *Food Chem.*, **4**, 243 (1979).
- TOBA, T., TOMITA, Y., ITOH, T. and ADACHI, S.: *J. Dairy Sci.*, **64**, 185 (1981).
- MAHONEY, R.R. In: *Developments in Dairy Chemistry*, Vol. 3, Fox, P.E. ed., (Elsevier Applied Sci., Elsevier), p. 69 (1985).
- BURVALL, A., ASP, N.-G. and DAHLQVIST, A.: *Food Chem.*, **5**, 189 (1980).
- NAKANISHI, K., MATSUMOTO, R., TORII, K., YAMAMOTO, K. and KAMIKUBO, T.: *Enzyme Microb. Tech.*, **5**, 115 (1983).
- TANAKA, R., TAKAYAMA, H., MOROTOMI, M., KURASIMA, T., UYAMA, S., MATSUMOTO, K., KURODA, A. and MUTAI, M.: *Bifidobacteria Microflora*, **2**, 17 (1983).
- AGRAWAL, S., SONANAT, H.M. and DUTTA, S.M.: *J. Dairy Sci.*, **65**, 866 (1979).
- AGRAWAL, S. and DUTTA, S.M.: *J. Food Sci., Technol.*, **24**, 211 (1987).
- MACRIS, B.J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 1035 (1982).
- 石渡尚子: 未発表.
- 日本生化学会編: タンパク質 I, 第 1 版 (東京化学同人, 東京) p. 91, p. 351, p. 494 (1990).
- COHEN, R.B., TSOU, K.C., RUTENBURG, S.H. and SELIGMAN, A.M.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 239 (1952).
- LINEWEAVER, H. and BURK, D.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934).
- TANAKA, Y., KAGAMIISHI, A., KIKUCHI, A. and HORIUCHI, T.: *J. Biochem.*, **77**, 241 (1975).
- WATANABE, T., KIBESAKI, Y., TAKENISHI, S., SAKAI, K. and TSUJISAKA, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 943 (1979).
- MOZAFFAR, Z., NAKANISHI, K., MATSUNO, R. and KAMIKUBO, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 3053 (1984).
- WIDMER, F. and LEUBA, J.L.: *Eur. J. Biochem.*, **100**, 559 (1979).
- LETUNOVA, E.V., TIKHOMIVA, A.S., SHIYAN, S.D., MARKIN, V.A., KHORLINA, A. Ya. and BEZBORODOV, A.M.: *Biochem.*, **46**, 745 (1981).
- BORGLUM, G.B. and STERNBERG, M.Z.: *J. Food Sci.*, **37**, 619 (1972).
- TAKENISHI, S., WATANABE, Y., MIWA, T. and KOBAYASHI, R.: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2533 (1983).

(平成 4 年 4 月 6 日受理)