

【目的】

ユリ科の多年生植物であるアスパラガスは貯蔵炭水化物としてイヌリン型及びイヌリンネオ型フルクタンを蓄積する。フルクタンは春から夏にかけ分解され、芽の再生のためのエネルギーとして利用され、夏から秋にかけては冬に備え貯蔵のために合成されると考えられる。このフルクタンの分解にはフルクタンエキソハイドロラーゼ (FEH) が関与する。最近、当研究室ではアスパラガス根から FEH 遺伝子と思われる遺伝子 *aoeh4* を単離し、組み換えタンパク質を生産し、その諸性質を調べてきた。しかし、詳しい酵素化学的諸性質はわかっていない。そこで本研究ではメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて組み換えタンパク質を生産し、より詳細な酵素化学的諸性質について調査した。

【方法】

aoeh4 遺伝子が挿入されたプラスミドを用いて形質転換された *P. pastris* により組み換えタンパク質 (AoEH4) を生産し、各種カラムクロマトグラフィーに供して酵素の精製を行った。そして、得られた精製酵素について酵素化学的諸性質を調査した。

酵素反応液組成は 0.2 M 基質 50 μ l、McIlvaine 緩衝液 (pH 5.0) 25 μ l、酵素液 25 μ l とした。反応温度は 30°C とし、酵素反応により遊離したフルクトース量を高速液体陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC) により定量した。加水分解活性は 1 分間に 1 μ mol のフルクトースを生成する酵素量を 1 ユニット (U) とした。

【結果】

P. pastris により生産した AoEH4 組み換えタンパク質は DEAE Sepharose FF、HiTrap Phenyl FF、Sephadex G-100 を用いて精製し、部分精製酵素 (総タンパク質量 0.100 mg、総酵素活性 0.888 U、比活性 8.88 U/mg) を得た (Table 1)。基質特異性の試験ではスクロース、1-kestose、ネオkestose、6-kestose、ニストース、4c、フルクトシルニストース、5d, 5c 混合物、6a、イヌリンを基質として用いた。その結果、イヌリンネオ型フルクトオリゴ糖である 5d, 5c 混合物に最も作用し、同じくネオkestose、4c にも高い作用を示した。また、イヌリン型フルクトオリゴ糖であるニストース、フルクトシルニストース、6a 及びイヌリンにも作用した。スクロース、1-kestose、6-kestose には作用しなかった (Fig. 1, Table 2)。速度パラメータの試験ではネオkestose とニストースの K_m 値を算出した。その結果、ネオkestose の K_m 値は 35 mM、ニストースの K_m 値は 290 mM となり、ネオkestose の方がニストースよりも親和性が高いことが示唆された (Fig. 2, 3)。アスパラガス根由来抽出糖 (DP \geq 6、DP=3-5) に対する反応生成物の経時変化の試験では AoEH4 組み換えタンパク質はフルクタンに作用しフルクトース、スクロース、1-kestose を生成した。長時間の反応ではフルクタンが分解されネオkestose やニストース、4c などのフルクトオリゴ糖の生成が見られた (Fig. 4, 5)。

これらの結果より、AoEH4 組み換えタンパク質は β -2,1 結合を有するイヌリン型フルクトオリゴ糖に作用するだけでなく、イヌリンネオ型フルクトオリゴ糖のグルコース 6 位とフルクトース 2 位の結合にも作用し、さらに高重合度のフルクタンにも作用する酵素であると考えられた。

Table 1. Summary of purification procedures of recombinant AoEH4.

Procedure	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (-fold)
Crude enzyme	1,378	62.9	0.0457	100	1
DEAE Sepharose FF	121	37.9	0.313	60.3	6.89
HiTrap Phenyl FF	5.17	22.4	4.33	35.6	95.0
Sephadex G-100	0.100	0.888	8.88	1.41	195

Table 2. Substrate specificity of AoEH4.

Substrate	Relative activity (%)
Sucrose	0
1-Kestose	0
6-Kestose	0
Neokestose	100
Nystose	44.2
4c	91.5
Fructosylnystose	60.3
5d, 5c	127
6a	63.3
Inulin	30.1

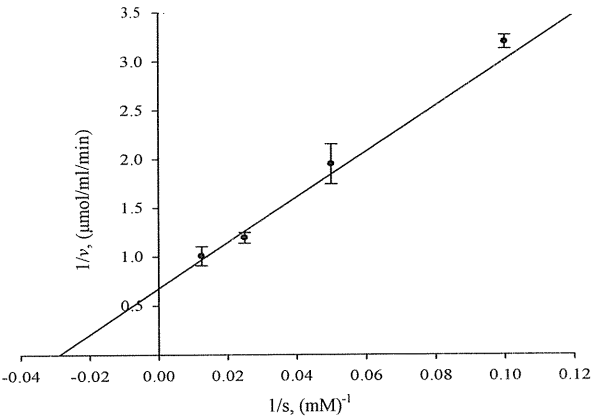


Fig. 2. Lineweaver-Burk plot for hydrolysis of neokestose by AoEH4.

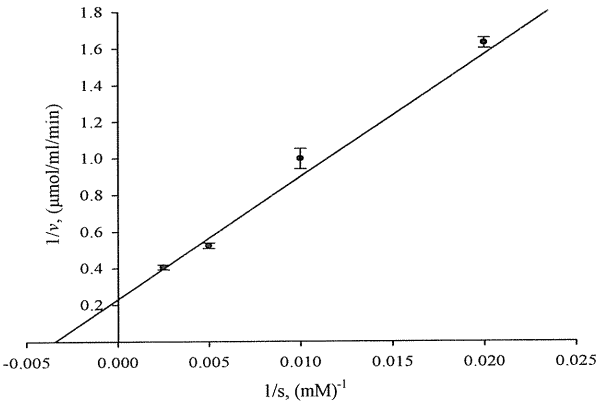


Fig. 3. Lineweaver-Burk plot for hydrolysis of nystose by AoEH4.

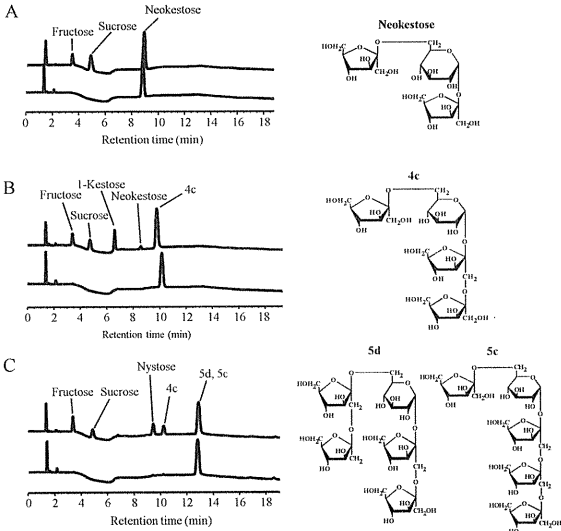


Fig. 1. HPAEC analysis of reaction products formed from neokestose (A), 4c (B) and 5d, 5c (C) by AoEH4.

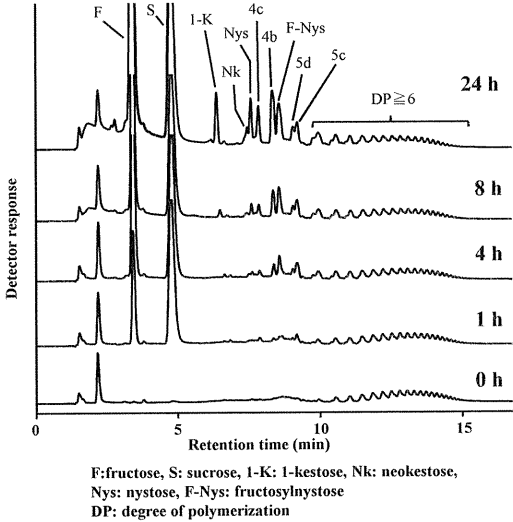


Fig. 4. HPAEC analysis of reaction products formed from oligosaccharides (DP ≥ 6) from asparagus roots by AoEH4.

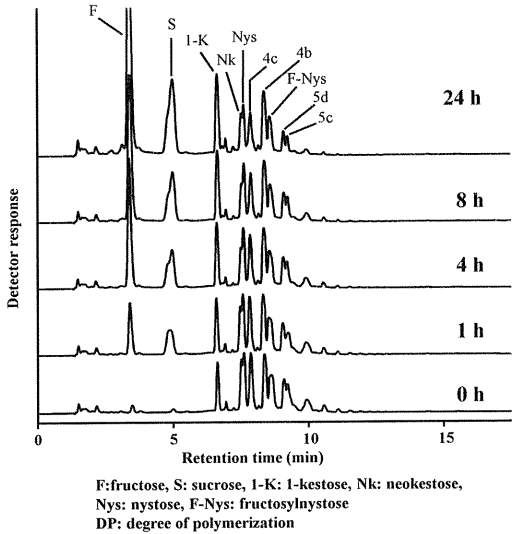


Fig. 5. HPAEC analysis of reaction products formed from oligosaccharides (DP=3-5) from asparagus roots by AoEH4.