



Kobe Shoin Women's University Repository

Title	納豆菌のレバンスクララーゼによるレバンの合成（分岐形成） のメカニズムについて The Mechanism of Branching in Levan by Bacillus Natto Levansucrase
Author(s)	飯塚 勝（IIZUKA Masaru）
Citation	神戸松蔭女子学院大学研究紀要人間科学部篇 Journal of the Faculty of Human Sciences, Kobe Shoin Women's University , No.1 : 19-28
Issue Date	2012
Resource Type	Bulletin Paper / 紀要論文
Resource Version	
URL	
Right	
Additional Information	

納豆菌のレバンスクララーゼによるレバンの合成（分岐形成）のメカニズムについて

飯塚 勝

神戸松蔭女子学院大学人間科学部

Author's E-mail Address: iizukaenzyme@yahoo.co.jp

The Mechanism of Branching in Levan by *Bacillus Natto* Levansucrase

IIZUKA Masaru

Faculty of Human Sciences, Kobe Shoin Womens's University

Abstract

納豆菌を脱脂大豆抽出液に無機塩を加えた培地で培養し、レバンスクララーゼを得た。本酵素はショ糖を基質として反応させると高分子のフルクタンであるレバンを合成する。レバン合成の途上でショ糖よりフルクトースを切り取り別のショ糖分子に転移して、3糖のケストースを生成し、その後順次フルクトース残基を転移してその鎖長を伸ばし、どこどこで分岐を持った分子量数百万の多糖を合成する。こうした高分子の多糖合成の多くはデンプンをはじめ複数の酵素が関与し、複雑な構造を構築する。しかし、レバン合成は単一酵素によりなされ、レバンの鎖長を伸長したり、分岐を作ったりしている。

そのメカニズムを明らかにする目的で、まずレバンを分解する酵素を生産する微生物を検索し、レバンよりフルクトース2個が β -2,6-結合した2糖のレバンビオースを生成する酵素生産菌を得た。それを用いレバンビオースを調製し、ショ糖と共存させた反応系でレバンスクララーゼのレバン合成を検討した。

この場合はレバンビオースはレバンの合成開始時のフルクトースの受容体として働き生成したレバンの末端に組み込まれていた。つまり、レバンスクララーゼはいろいろなオリゴ糖をアクセプターとしてフルクトース残基を転移するが、レバンビオースもよきアクセプターであった。生成したレバン（条件を限定して高濃度の食塩存在下で低分子のレバン合成を行った）は末端にレバンビオースを有する分子量がおおよそ3,500のものであった。次にこのレバンとショ糖を共存させてレバンスクララーゼを作用させるとその鎖長を伸長した約8,000の分子量のものが得られた。このレバンの鎖長伸長と分岐を増加する反応はレバンビオースを末端に有する分子量8,000のレバンを用いた場合にも繰り返され分子量約16,000のレバ

ンが合成された。分子量増加と分岐の増加は本酵素がフルクトース残基を伸長しながら先端で分岐をつくり、さらにフルクトースを転移して鎖長伸長を行っていると考えられた。

キーワード：納豆菌、レバンスクララーゼ、レバンビオース、レバンの分岐形成メカニズム

はじめに

レバンは微生物により菌体外に生成される多糖で、ショ糖分子を形成している果糖分子のC6位に新たに果糖が酵素で転移され、 β -2, 6-結合を生成することを順次繰り返す、高分子物質となったフルクタン¹⁾の1つである。

フルクタンは天然には植物が貯蔵多糖として生成するごぼうやにんにく中のフルクタンのイヌリン（この場合は β -2, 1結合をしている）と微生物の生成するレバンに大別されるが、馴染みのあるものはポリグルタミン酸とともに糸引き納豆の粘質物を形成している多糖である。デンプンはいくつかの異なった機能の酵素の働きで高分子を作り上げている。また、イヌリンの場合も複数の転移酵素が関与して多糖を合成している。

ところがレバン合成の場合はメインの結合は β -2, 6-結合であるが、ところどころで β -2,1-結合の分岐形成がなされている。しかもその合成は1つの酵素のみで高分子多糖を合成している。そこでそのメカニズムを明らかにする目的で、種々の条件でレバン合成を行い、合成経過をNMRで解析してみた。

方法

レバンスクララーゼの調製 実験に用いた酵素は5%脱脂大豆、5%ショ糖、0.6% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、0.02% KCl、0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.03% $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ を含む液体培地に納豆菌を植菌し、16時間培養し、菌体を集め遠心により洗浄を繰り返した後、2M NaCl溶液に懸濁し、ミキサーで軽く攪拌して菌膜を分散させ、レバンスクララーゼを菌体から遊離させ遠心分離して菌体を除き、上澄（酵素液）を得た。

2. レバンの調製 高分子レバンは酵素液に日本ガイシ製のハニカム状の支持体を浸漬し、酵素を固定化して、50%ショ糖液に浸漬して37℃で反応を行った。低分子レバンは1M NaCl存在下に酵素溶液とショ糖液を混合して37℃で酵素反応を行った。合成したレバンはゲルクロマトグラフィーなどで夾雑物を除き凍結乾燥した。

3. レバン分解酵素生産菌の検索とレバン分解酵素の調製 レバンを培養基質とする平面培地（1%レバン、0.5%ポリペプトン、0.1% K_2HPO_4 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.5%寒天、pH7.0）に採取した土壌を滅菌水に懸濁したものを塗布し、27℃あるいは37℃で培養し、3日後、14日後に生育、単離できたコロニーを同組成の斜面培地に移した。

レバン分解酵素は分離した菌の培養により得た。精製は硫安沈殿、DEAE-Cellulose、Bio Gel p-100、DEAE-Toyopearl などによるクロマトグラフィーで行った。

4. レバンビオースの調製 3gの高分子レバン（1% 300ml）とレバン分解酵素8.5単位を含む

溶液を 30℃で 24 時間反応させ、100℃で加熱し、酵素を失活させた後、エバポレーターにて濃縮し、それを Bio Gel P-2 によりクロマトグラフィーで分離して単一のレバンビオースを得た。

5. 末端にレバンビオースを含むレバンの合成 レバンビオース 500mg、ショ糖 1000mg および 2M NaCl を含んだ溶液 2ml に 10 単位のレバンスクララーゼを加え、30℃で 1 夜反応させた。その反応混液を Bio Gel P-2 のカラムクロマトグラフィーで分画し、レバン画分を得た。

6. 酵素反応による生成物の同定 a.TLC（薄層クロマトグラフィー）、シリカゲルプレートを用い、n-ブタノールーピリジニー水（8：2：1）の溶媒で ambient temp（室温）で 5～6 時間展開し、乾燥後エタノールー硫酸混液（9：1、v/v）に浸し、乾燥後 110℃、5 分－10 分加熱発色させた。

b.HPLC（高速液体クロマト）、島津製作所製クロマトパック LC－6A に shimpack SCR101N(0.79 X 300mm) カラムを装備したもので、分離液は純水、カラム温度 55℃、検出器は示差屈折計で行った。

また、およその大きさはゲルクロマトタイプのカラムで既知マーカの保持時間から算出した。

c.NMR（核磁気共鳴スペクトルメトリー） D₂O に溶かしたサンプルを Varian-Unity plus 500 の装置で内部標準物質に DSS（sodium-4,4-dimethyl-4-sila pentane sulfonate）を用いて 40℃で測定した。

結果と考察

1. レバン分解酵素生産菌の検索 各地から採取した土壌を供試サンプルとしてレバンを含む培地に生育してくる菌を検索したところ、レバンビオースを主生成物とするレバナーゼ生産菌を得ることが出来た。顕微鏡的観察からは放線菌の 1 種とみなされた。

2. レバン分解酵素の精製

精製した酵素標品は SDS－PAGE 電気泳動では単一のバンドを示した。分子量は 49,600 と算出された（表 1）、（図 1）。

表 1. レバン分解酵素（レバナーゼ）の精製

精製方法	タンパク質 (mg)	全活性 (U)	比活性 activity (U/mg)	収量 (%)	精製度 index
Crude enzyme	2340	812	0.34	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	102	666	6.53	82	19.2
DEAE-cellulose	14.6	407	27.9	50	82.1
BioGel P-100	1.82	123	67.8	15	199
DEAE-Toyopearl	0.5	35	70.2	4	206

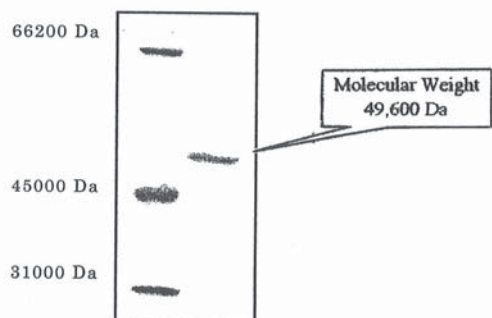
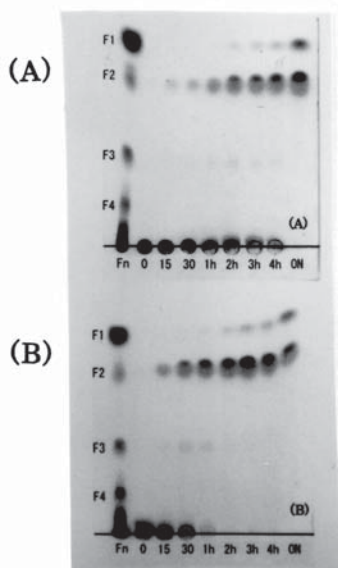


図1. レバンからレバンビオースを生成する
レバナーゼの精製酵素標品の電気泳動
(SDS-PAEG)

単一バンドを示し、分子量は 49,600 と
算出された。

3. レバン分解酵素のレバンに対する作用

1%のレバン溶液に本酵素を作用させた結果は（図2-a, b）に示すように3糖より大きなオリゴ糖の生成が認められず、ビオースを大量に生じることがわかった。



反応時間、min、(ON は overnight)

図2-a. 薄層クロマトグラフィーによる生成物の経時的変化

(A) 高分子レバンを基質とした場合

(B) 低分子レバンを基質とした場合

F1,F2,F3—はレバンオリゴ糖を示す。

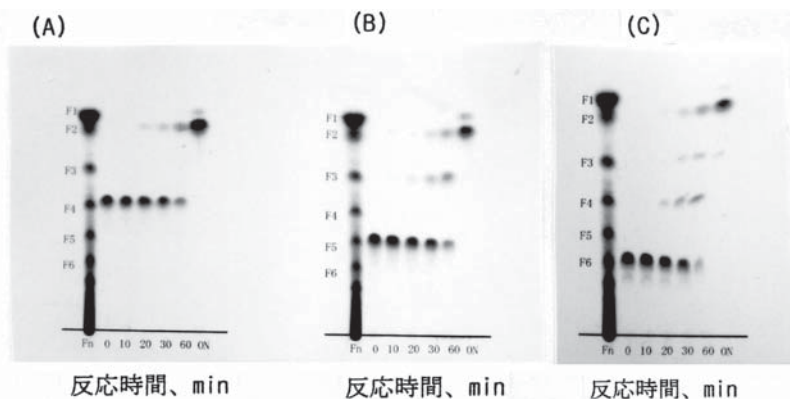
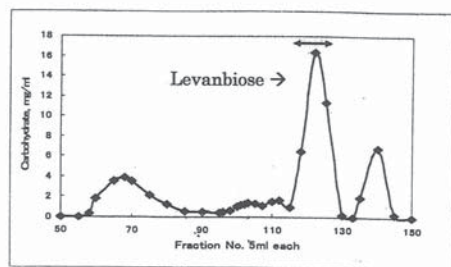


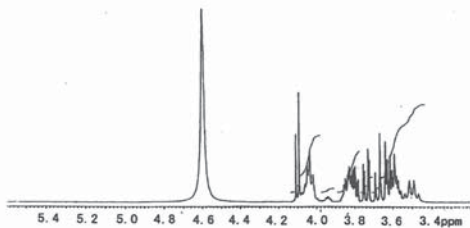
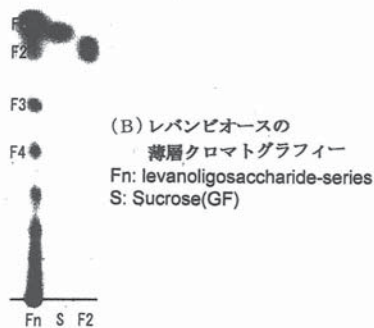
図2-b. レバンオリゴマー (F4,F5,F6) に対するレバナーゼによる
反応生成物の薄層クロマトグラフィー

F4 からの生成物 (A), F5からの生成物 (B), F6からの生成物 (C)

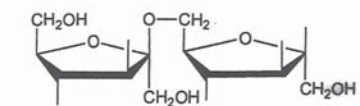
4. 納豆菌のレバンスクララーゼをレバンビオースとショ糖の共存する溶液中で反応させたところ合成されたレバンは分子量が約 3,500 のもので、末端にはフルクトビオース（レバンビオース）を末端に有するものであった（図 3- a, b, c）。



(A) 反応混液のバイオゲルP-2 (4.5 X 52cm)による
ゲルクロマトグラフィー



(C) レバンビオース (F2)のプロトンNMR



(レバンビオース)
 β -D-fructofuranosyl-(2,6)-D-fructofuranose

図 3. レバンからのレバンビオースの調製

- (A) 反応後の生成物の分離
(B) 分離したレバンビオースの TLC
(C) レバンビオースのプロトンNMR

シヨ糖のみの場合にはそれとは異なり、シヨ糖中の果糖分子の C6 位あるいは C1 位にフルクトースが転移してできる 3 糖（1-kestose あるいは 6-kestose）が末端に存在するレバンの生成が認められる（図 4-a, b）。

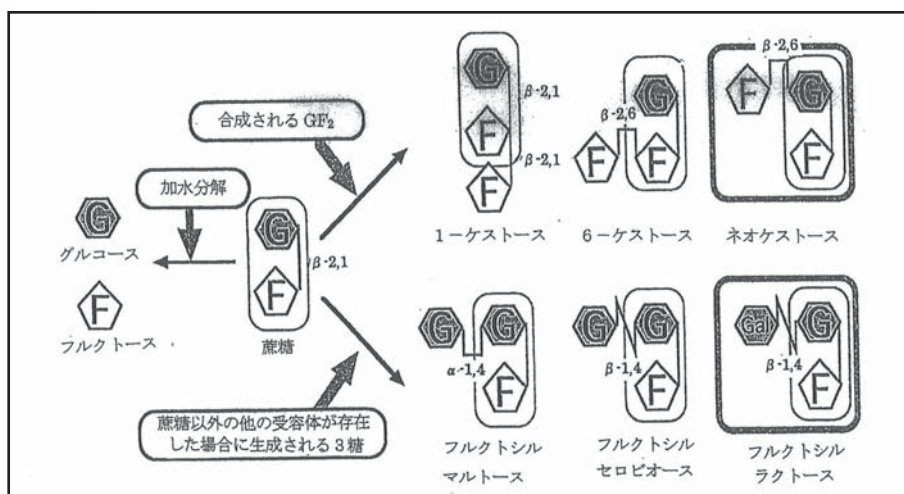


図 4-a レバンスクララーゼを用いたオリゴ糖の合成

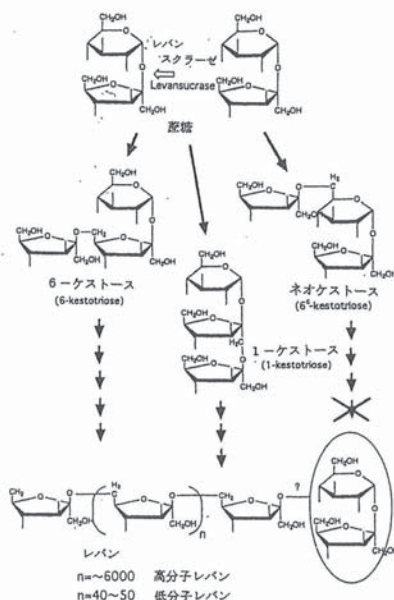


図 4-b 納豆菌のレバンスクララーゼによる蔗糖からの
レバンとレバンオリゴ糖（重合度 2～3）の合成

細菌がつくる多糖（レバン）合成では 1 種類の酵素が関係している。

5. さらに生成されたレバンビオースを末端に有する上述のレバンとショ糖を共存させて納豆菌のレバンスクララーゼを作用させると生成されたレバンは分子量約 8,000 となり、レバンビオースを末端に持った共存させた分子量 3,500 のレバンが鎖を伸長させたものであった。この反応は繰り返し起こり、レバンビオースを末端に持った分子量 8,000 のレバンとショ糖を共存させて納豆菌のレバンスクララーゼを作用させるとさらに鎖の伸長した分子量約 16,000 のものが生成された（図 5-a）。

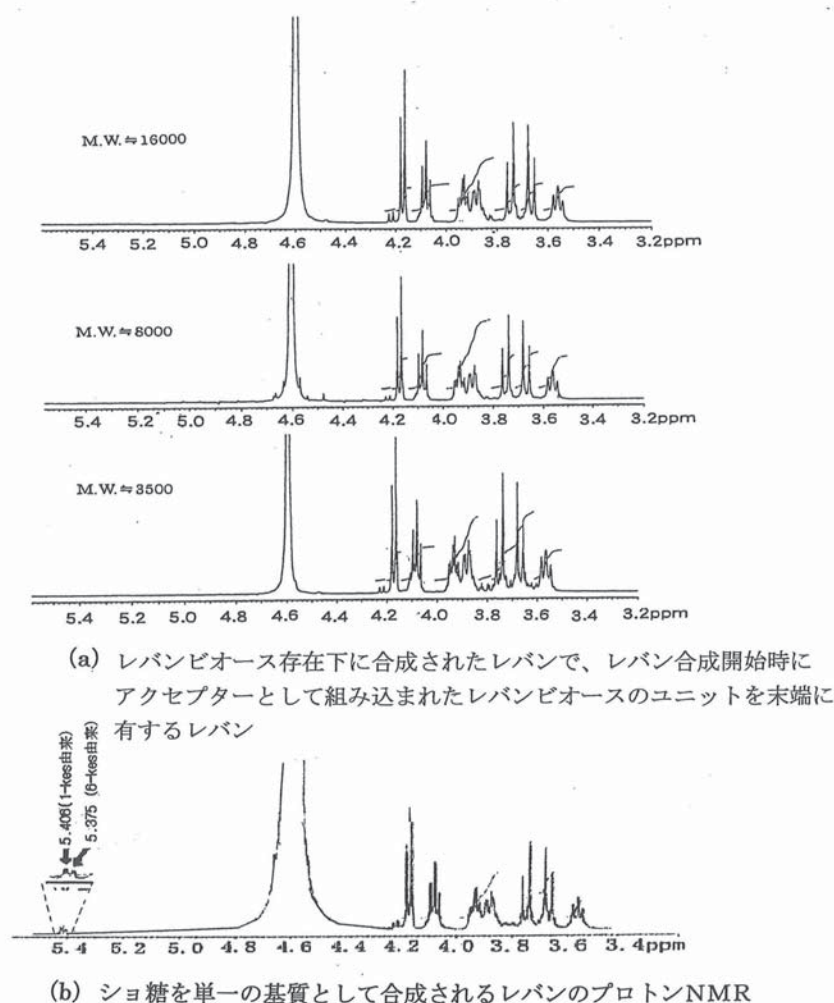


図 5. 分離されたレバンビオースを末端に有するレバンのプロトンNMR (a) とショ糖のみから合成されたレバン (b)

6. レバンの分岐について ショ糖量を制限して段階的に合成したレバンビオースを末端に有するレバン (F2- レバン) は分岐ができることにより、フルクトースの3位のC (カーボン) に結合したプロトンが影響を受け、少しケミカルシフト (シグナル) が移動する。したがって $^1\text{H-NMR}$ 図から分岐の割合を求めることができる。表2に示すように F2- レバンの分子量が増加するにしたがって、分岐の割合も高くなっていることがわかる。分岐の仕方はデンブンのように直鎖の途中で分岐を作るか、もしくは直鎖の先端で分岐を作り、さらに鎖長伸長するのかのどちらかが考えられるが、分子量の増加と分岐の数の増加から直鎖の伸長した先で分岐を形成していると考えられる (図6)。

表2. 生成されたレバンビオースを末端に有するレバンの
分子量と分岐頻度 (β -2,1 と β -2,6 結合の比は分岐間の計算
上の残基数に相当する)

生成されたレバンの分子量	β -2,1 : β -2,6
3500	1 : 20.38
8000	1 : 18.81
16000	1 : 11.02

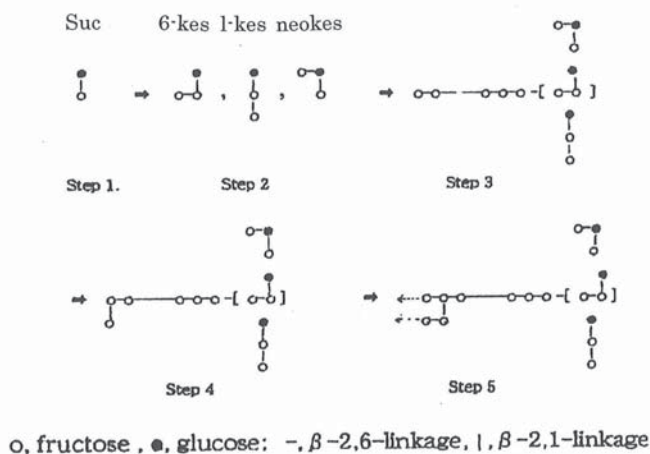


図6. レバン合成における分岐形成の過程

レバンスクララーゼはショ糖のみを基質として作用させると反応初期にショ糖に1つフルクトースが転移した3種のケストース (転移するフルクトースの位置により1-ケストース、ネオケストース、6-ケストース) ができる (1)。

それらをアクセプターとして、さらにフルクトースが転移され高分子化されてレバンとなる。しかし、途中の低分子のレバンではネオケストースのショ糖部分のフルクトースが容易に切断されるためか、生成されるレバンの末端にネオケストースはほとんど認められない。

その結果低分子の生成されたレバンをプロトン NMR で調べると、1-ケストースと 6-ケストースが末端にあるレバンがおおよそ 1:1 の量比で見つかることが多い。

さらにメリビオースなど種々のオリゴ糖とショ糖を共存させてレバンスクララーゼを作用させるとショ糖からのケストースの生成が認められず、オリゴ糖の方が優先して受容体として働き、ショ糖がフルクトース供与体となってレバン合成が行われる。

これらの事実はレバンスクララーゼ本体の活性中心にショ糖と親和性の高いフルクトース供与体結合部位とフルクトース受容体結合部位が存在する構造を持つことが示唆される（図 7）。イヌリンやフルクトオリゴ糖は腸内細菌の資化性によってビフィズス菌増殖活性や整腸作用や食物繊維としての機能を持っていることが報告されている（2）。ケストース類（1-ケストース、ニストース、フルクトシルニストース）も難う蝕性やビフィズス菌の増殖因子として健康に役立つ生理作用を持った甘味剤として市場にでてから久しい。ほかのオリゴ糖も同様の効果が期待されるが、ネオケストースや 6-ケストースの効果については報告が少ない。レバンビオースについてはビフィズス菌の増殖因子としての生理的効果があることが確かめられた（3）。

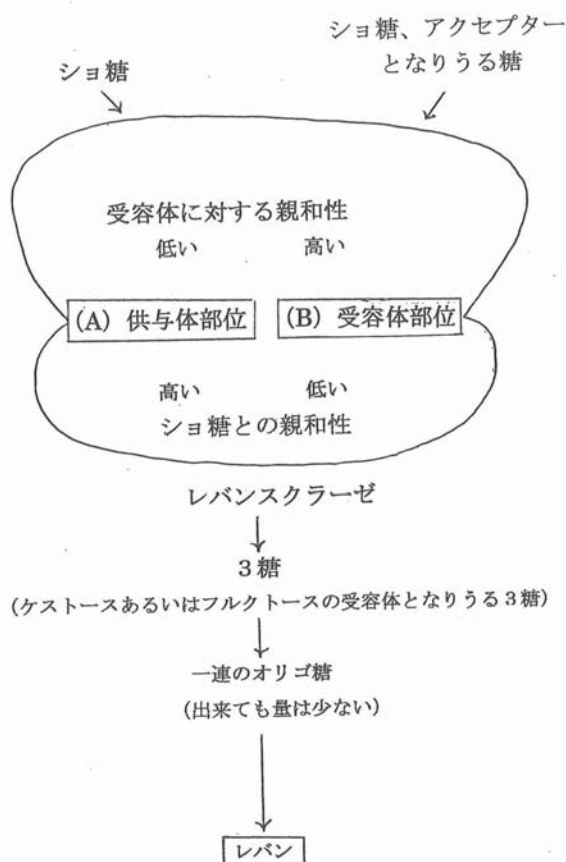


図 7. レバンの合成経路

謝辞

本研究の一部に参加協力された前田（山北）麻美 理学修士、苅田修並 理学修士、NMR の測定をしていただきました大阪市立大学大学院生活科学研究科技術職員前川智美 学術修士に感謝致します。

参考文献

- (1) M.IIZUKA, T.Mima, Y.Ben Ammar, K.Ito and N.Minamiura, Mechanism of Synthesis of Levan by *Bacillus natto* levansucrase, *J.Appl.Glycosci.*, 49, pp229-237 (2002)
- (2) 斉藤安弘、別冊フードケミカルー 4 “甘味料総覧” p.73 (1990)
- (3) M.IIZUKA, N.Minamiura and T.Ogura, Utilization of Fructan, In *Glycoenzymes*, ed. by Masatake Ohnishi, *Japan Scientific Societies Press/KARGER* pp.241-258 (2000)

(受付日 : 2012. 1. 10)