



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Brevibacterium fuscum var.dextranlyticum 0407株が生産するイソマルトトリオデキストラナーゼに関する研究
Author(s)	水野, 隆文
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第4446号
Issue Date	1998-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3137162
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51474
Type	doctoral thesis
File Information	000000322352.pdf



Brevibacterium fuscum var. dextranlyticum 0407株が

生産するイソマルトトリオデキストラナーゼに関する研究

北海道大学大学院 農学研究科

農芸化学専攻 博士後期課程

水野隆文

①

Brevibacterium fuscum var. *dextranlyticum* 0407株が
生産するイソマルトトリオデキストラナーゼに関する研究

農芸化学専攻 博士後期課程

水野隆文

目 次

	頁
第1章 序論	
第1節 デキストラナーゼに関する研究について	1
第2節 本研究の目的および概要	3
第2章 イソマルトトリオデキストラナーゼの精製および諸性質	
第1節 緒言	5
第2節 実験材料および方法	5
第3節 実験結果	
第1項 生産条件の確立	11
第2項 精製	11
第3項 諸性質	13
第4項 N末端および部分アミノ酸配列の決定	15
第4節 考察	16
第5節 要約	41
第3章 イソマルトトリオデキストラナーゼをコードする遺伝子の クローニングと構造	
第1節 緒言	42
第2節 実験材料および方法	43
第3節 実験結果	
第1項 イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の クローニング	46
第2項 塩基配列および推定アミノ酸配列	47
第3項 他の糖質関連酵素とのアミノ酸配列の相同性	48
第4節 考察	48
第5節 要約	69

第4章	イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の大腸菌に おける発現	
第1節	緒言	70
第2節	実験材料および方法	71
第3節	実験結果および考察	
第1項	発現プラスミドの構築	76
第2項	発現条件の検討	76
第3項	大腸菌で発現させたイソマルトトリオデキストラ ナーゼの精製	77
第4項	大腸菌で発現させたイソマルトトリオデキストラ ナーゼの諸性質	79
第4節	考察	79
第5節	要約	97
第5章	<i>Brevibacterium fuscum</i> var. <i>dextranlyticum</i> 0407株に おけるデキストラン代謝機構	
第1節	緒言	98
第2節	実験材料および方法	99
第3節	実験結果	
第1項	イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の 上流域のクローニング	101
第2項	各ORFと糖質関連酵素との相同性	103
第4節	考察	105
第5節	要約	131
第6章	<i>Brevibacterium fuscum</i> var. <i>dextranlyticum</i> 0407株が 生産する α -グルコシダーゼの精製と諸性質	
第1節	緒言	132
第2節	実験材料および方法	133
第3節	実験結果	

第1項	粗酵素液の調製	136
第2項	精製	137
第3項	諸性質	138
第4項	N末端配列の解析	138
第4節	考察	138
第5節	要約	146
第7章	総括	147
	謝辞	
	参考文献	

略号および語句の定義

Amp	ampicillin
APS	ammonium persulfate
bis	bis-acrylamide
bp	base pair
Cm	chloramphenicol
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1. ^{3,7}]decan}-4-yl)phenyl phosphate
DIG	digoxigenin
G1	glucose
G2	maltose
G3	maltotriose
G4	maltotetraose
HPLC	high performance liquid chromatography
IG2	isomaltose
IG3	isomaltotriose
IG4	isomaltotetraose
IG5	isomaltopentaose
IG6	isomaltohexaose
IG7	isomaltoheptaose
IMTD	isomaltotrio-dextranase
<i>imtd</i> gene	isomaltotrio-dextranase gene
IPCR	inverse polymerase chain reaction
IPTG	isopropyl thiogalactoside
kb	kilo base pair
LB	Luria-Bertani medium
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
pNPG	<i>p</i> -nitrophenyl α -D-glucopyranoside

PVDF	polyvinylidene difluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TE	10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) - 1 mM EDTA (pH8.0)
TEMED	<i>N,N,N,N</i> -tetramethylethylenediamine
Tris	hydroxymethyl aminomethane
UV	ultraviolet
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside

5' 側、3' 側

本論文ではすべて二本鎖DNAを取り扱っているため、両鎖についてそれぞれ5' 側、3' 側が存在するが、便宜上本論文ではイソマルトリオデキストラナーゼ遺伝子のセンス鎖についてのみ適用する。

fragment BH

probe CRを用いてクローニングされたゲノムDNA断片。4506bp。

fragment BX

PCRにより増幅した*imtd*遺伝子の5' 末端側上流域。3378bp。

fragment SK

probe BX 730を用いてクローニングされたゲノムDNA断片。3391bp。

dexA, *dexC*, *dexD*, *dexE*, *dexR*および*trpA*

それぞれ*imtd*遺伝子の周辺に見いだされた遺伝子の名称

DexA, DexC, DexD, DexE, DexRおよびTrpA

dexA, *dexC*, *dexD*, *dexE*, *dexR*および*trpA*の発現産物の名称

plasmid BH, plasmid SK, plasmid BX

それぞれfragment BH, fragment SH, fragment BXを大腸菌プラスミドベクターpBluescript II KS(+)に導入して作製したプラスミド。

probe AF, probe BF, probe CR, probe IT-I

イソマルトリオデキストラナーゼの部分アミノ酸配列をもとに合成したオリゴヌクレオチドプローブ。DIGによりラベルされている。

probe BX730

fragment BHの *Bam*HI-*Xho*I断片 (730bp)を用いて作製したプローブ。 *imtd* 遺伝子の5'側上流域のクローニングに用いた。

probe HCII602

fragment SKの *Hinc*II断片 (602bp)を用いて作製したプローブ。

position

クローニングおよびPCRで得られた各fragment (BH, SK, BX)において、それぞれの5'側末端の塩基をposition 1として表されるDNAの位置。

第1章 序論

第1節 デキストラナーゼに関する研究について

デキストラン分解酵素（デキストラナーゼ）の研究は、第2次世界大戦中から戦後にかけて、デキストランと呼ばれる多糖類の工業的な生産が確立されるにいたって始められた¹⁾。デキストランはグラム陽性菌である *Leuconostoc*²⁾ や *Streptococcus*³⁾ などが生産する多糖類であり、グルコシルトランスフェラーゼの作用によりシュクロースからのグルコース転移反応により合成される。デキストランはグルコース残基が α -1,6結合で連なった主鎖と、 α -1,2、 α -1,3および α -1,4などの分岐を有する α -グルカンであるが¹⁾、その部分分解物が代用血漿として利用できることが確認されたのをきっかけに⁴⁾、デキストラン部分分解物の酵素的調製を目的としたデキストラナーゼの研究が急速に進められるようになった¹⁾。1948年Ingelmanは *Cellvibrio fulva* が生産する酵素がデキストランを分解しうることを報告し⁵⁾、これと同年に *Penicillium* 属の菌の培養液中にデキストランを分解する活性物質が見いだされ⁶⁾、初めてデキストラナーゼという言葉が使用されるようになった。それ以降、デキストラナーゼは、かび⁷⁻⁹⁾、放線菌^{10,11)}、細菌^{12,13)}、植物¹⁴⁾、動物¹⁵⁾、ヒト¹⁶⁾ など様々な起源より単離されるようになり、医療、工業への利用が研究されるようになった。特に製糖工場においてパイプのつまりの原因となるデキストランの除去や口腔内でのう蝕形成の阻害を目的として、*Chaetomium glaucum* が生産するデキストラナーゼが歯磨剤^{17,18)} や製糖工場¹⁹⁾ で使用されている。

さらに自然界より様々なデキストラナーゼが単離されるに伴い、作用形式の相異によりデキストラナーゼの分類がなされるようになった。エンド型デキストラナーゼ (1,6- α -D-Glucan 6-gluconohydrolase : EC 3.2.1.11) はさまざまな起源より単離され、作用する α -1,6結合を特定せず、ランダムな分解を行う⁶⁾。分解物として最終的にグルコースを生産するものが多いが、*Cellvibrio fulva* 由来のデキストラナーゼなど比較的分子量の大きいイソマルトオリゴ糖までしか分解を行わない種類も存在する⁴⁾。

一方、デキストランの非還元末端から順次加水分解を行うエキソ型のデキストラナーゼは、これまでグルコデキストラナーゼ (1,6- α -D-Glucan glucohydrolase :

EC 3.2.1.70)²⁰⁾、イソマルトデキストラナーゼ (1,6- α -D-Glucan isomaltohydrolase: EC 3.2.1.94)²¹⁾、およびイソマルトトリオデキストラナーゼ (1,6- α -D-Glucan isomaltotriohydrolase: EC 3.2.1.95)²²⁾の3種類が報告されている。グルコデキストラナーゼは*Arthrobacter globiformis*および*Bacillus* sp.より、イソマルトデキストラナーゼは*Arthrobacter globiformis* T6株より、イソマルトトリオデキストラナーゼは*Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株よりそれぞれ単離されているが、そのなかでもイソマルトデキストラナーゼに関してはIwaiらによる全遺伝子配列の決定および大腸菌での高レベル発現²³⁾、高柳らによるデキストランからのイソマルトース調製法の確立²⁴⁾、Kimらによる転移反応を用いた特殊なオリゴ糖の生産²⁵⁾など、イソマルトース、および各種オリゴ糖の工業的生産に向けた様々な予備的実験が行われている。

興味深いことにエンド型およびすべてのエキソ型デキストラナーゼにおいて、*Arthrobacter*属およびそれと分類上非常に近い菌種である*Brevibacterium*属 (*Arthrobacter*属および*Brevibacterium*属はいずれもコリネ型細菌に分類)が生産菌として報告されている。酵素の一次配列を比較する場合、一般的に近い種が起源となっている酵素ほど配列の類似性が高く、酵素的な特徴も近くなる傾向があるが、*Bacillus stearothermophilus*が生産する α -アミラーゼ²⁶⁾、マルトジェニック α -アミラーゼ²⁶⁾、プルラナーゼ²⁷⁾およびネオプルラナーゼ²⁷⁾のように、同一の起源を持ち、配列も高い類似性を有する酵素でも、その基質認識や分解様式が異なる場合が存在する。このうちネオプルラナーゼの一次構造を決定したKurikiら²⁸⁻³⁰⁾は、ネオプルラナーゼが α -1,4および α -1,6結合の両方を水解することから、これらの酵素間には単なる保存領域の存在だけでなく、触媒部位および基質結合部位の共通性が存在することを仮定し、触媒部位と推定されるアミノ酸残基の置換によりネオプルラナーゼが α -1,4および α -1,6結合の加水分解活性を同時に失うこと、および基質結合に関与すると推定した部分の置換により、両結合に対するネオプルラナーゼの特異性が変化することを明らかにしている。同様に*Arthrobacter*属 (および*Brevibacterium*属)由来のデキストラナーゼ間においても、その一次配列上にデキストランという共通の基質に対する結合領域、および加水分解を触媒する領域が保存されているのではないかと考えられたが、1990年にOkushimaら³¹⁾により*Arthrobacter*属のエンド型デキストラナーゼの一次構造が解明されたのに続き、

1994年にIwaiらによりイソマルトデキストラナーゼ²⁴⁾、1996年にはOguma³²⁾らによりグルコデキストラナーゼ遺伝子のクローニングと配列の決定がなされた結果、エンド型デキストラナーゼは*Penicillium minioluteum* 由来のエンド型デキストラナーゼ³³⁾、および*Aspergillus niger*由来のイソプルラナーゼ³⁴⁾と、グルコデキストラナーゼは*Clostridium*属細菌由来のグルコアミラーゼ³⁵⁾とそれぞれ相同性を示すものの、*Arthrobacter*属由来のデキストラナーゼ間で相同性は認められず、特にイソマルトデキストラナーゼは他のいずれの糖質関連酵素と相同性を示していない。相同性を示す配列が少ないこと、さらには結晶化酵素のX線解析による立体構造の解明が進んでいないことなどにより、現在デキストラナーゼの構造と機能の関係はほとんど解明されていない状態にある。これらの解析を行うためには、新たにデキスラン分解酵素の配列決定を行い、比較の対象を広げていくことが重要であり、その視点からも、これまで見いだされたエキソ型のデキストラナーゼで唯一一次構造の解明がなされていないイソマルトトリオデキストラナーゼの構造解析が急務な課題と考えた。

第2節 本研究の目的および概要

本研究は*B. fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株が生産するイソマルトトリオデキストラナーゼの一次構造を他のエンド型および各種のエキソ型デキストラナーゼ、および糖質関連酵素と比較し、エキソおよびエンドのデキストラナーゼ活性、イソプルラナーゼ活性などの諸性質を決定づける一次配列、ドメイン、立体構造などを探索することを目的としている。従って、本研究は配列が未だ決定されていない唯一のエキソ型デキストラナーゼであるイソマルトトリオデキストラナーゼをコードする遺伝子 (*imtd*) のクローニングを行い、一次配列を決定することを第一の目的とした。さらに一次配列と機能の相関を明らかにするために必要な大腸菌での発現系の確立を行った。また、本酵素生産菌におけるデキスラン代謝系、すなわちイソマルトトリオデキストラナーゼによって菌体外に生成したイソマルトトリオースのその後の代謝経路についての解明を行った。本論文では、第2章においてイソマルトトリオデキストラナーゼの酵素的な諸性質および部分アミノ酸配列を解析し

た結果について記述した。第3章ではイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子のクローニングと一次配列、他の糖質分解酵素との相同性、周辺遺伝子構造の特徴について記載した。第4章ではイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子を大腸菌において発現した結果と発現酵素を精製し、諸性質を検討した結果を示した。第5章ではイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の発現を行うプロモーター領域、およびその周辺に見いだされたデキストラン代謝に関わると考えられる遺伝子群について述べ、さらにそこに見いだされた α -グルコシダーゼ遺伝子が実際に発現し、機能していることを第6章で報告する。

第2章 イソマルトトリオデキストラナーゼの精製および諸性質

第1節 緒言

Brevibacterium. fuscum var. *dextranlyticum* 0407株が培地上清に生産するイソマルトトリオデキストラナーゼはYamaguchiら^{22,36,37)}によってその生産菌の単離といくつかの酵素的な諸性質が報告されて以来、研究報告がいっさいなされておらず、他の起源より同酵素が生産されたという報告も存在しなかった。今回イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子のクローニングおよび発現を試み、一次配列上や酵素的な性質について他のエンド、エキソ型のデキストラナーゼと比較検討を行っていくには不十分な情報量であると言わざるを得ない。本章では、イソマルトトリオデキストラナーゼを精製し、諸性質の再検討を行ったほか、 K_m 、 V の測定、およびN末端と部分アミノ酸配列の決定を行った。

第2節 実験材料および方法

1. 菌体および培地

1) 使用菌株

B. fuscum var. *dextranlyticum* 0407株はYamaguchiら²²⁾により土壤中より単離されたものである。本研究で用いた菌株は旭化成工業株式会社ライフサイエンス総合研究所、高田正樹博士により恵与されたものを用いた。

2) 使用培地

酵素精製に用いた本菌培養のための液体培地は、Yamaguchiら²²⁾により報告された培地組成のうち、Polypeptonを2倍量にしたものである。Dextran T-2000、10 g ; ethanol、20 ml ; Polypepton、20 g ; yeast extract、0.5 g ; KH_2PO_4 、1.0 g ; K_2HPO_4 、1.0 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1.0 g ; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.05 g ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.020 gを脱塩水1.0 lに溶解したものを使用した。菌体保存用のスラントは上記の液体培地に粉末寒天を1.5 %になるように加えたものとした。

3) 保存菌株

B. fuscum var. *dextranlyticum* 0407株は1カ月ごとに新鮮なスラントに植え継ぎ、30℃で48時間培養後、4℃で保存した。

2. 酵素精製

1) 菌の培養

酵素精製のための菌体培養は2段階に分けて行った。前培養として12本の試験管に2mlずつ液体培地を取り、菌保存用のスラントから1白金耳分の菌体を接種した。24時間、37℃で振盪(200 rpm、Bio-Shaker, BR-30LF型式、Taitec)で培養した後、それぞれの試験管から100 mlの液体培地を入れた12本の500 ml容の坂口フラスコにそれぞれ1mlの培養液を加え、本培養とした。培養は96時間、37℃、200 rpmで行った。

2) カラムクロマトグラフィー

Dextran T-2000およびDEAE-Sepharose CL-6BはPharmacia Biotechより購入した。Bio-Gel P-100はBio-Lad Laboratoryより購入した。GIGAPITE (Hydroxylapatite)は東亜化学工業株式会社により恵与された。それぞれのカラムクロマトグラフィーは常法に従い行った。DEAE-Sepharose CL-6Bは10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5)、Bio-Gel P-100は0.2 M のNaClを含む10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5)、GIGAPITEは10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)でそれぞれ緩衝化を行った後に使用した。

3) 酵素活性の測定および単位

イソマルトトリオデキストラナーゼ活性は、Somogyi-Nelson法^{38, 39)}を用いて反応溶液の還元力を測定し、これを本酵素がデキストランを分解することにより遊離したイソマルトトリオース量に換算することによって決定した。反応液の組成は、1% dextran T-2000、0.125 ml; 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5)、0.25 ml; 酵素溶液、0.125 ml (約0.09 unit)の計0.5 mlとし、37℃で5分間の反応を行った。活性測定用の酵素溶液は各精製段階の酵素溶液を脱塩水で適当に希釈したものを用い、以後、特別に記載のないものはこの組成を標準反応組成とした。

酵素単位は上記の反応条件で、1分間に1 μmol のイソマルトトリオースに相当する還元力を与える酵素量を1 unitとした。

4) タンパク質の定量

DEAE-Sepharose カラム (2回目) までの精製段階のタンパク質濃度は比吸光係数 $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 10$ として計算した。IMTD-Iおよび-IIの比吸光係数決定のため、得られた酵素標品の一部を凍結乾燥し、精密に重量を測定した後10 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)に溶解して比吸光係数を求めた。

3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

1) 泳動

SDS-PAGEはLaemmliの方法⁴⁰⁾に準じて行い、泳動装置にはBio-Rad ミニプロティアンIIを用いた。12%のゲル(13 x 13 x 0.1cm)を使用して25 mAの定電流で泳動を行った。分子量マーカーとしてホスホリラーゼb (97,400)、牛血清アルブミン(66,200)、オボアルブミン (45,000)、カーボニックアンヒドラーゼ (31,000)、大豆トリプシンインヒビター (21,500)およびリゾチーム(14,000)を用いた。

2) CBB染色

泳動後、ゲルを12.5%のトリクロロ酢酸を含むCoomassie Brilliant Blue G-250で固定、染色した。脱色には8%酢酸を用いた。

3) PAS染色⁴¹⁾

SDS-PAGE後のゲルを40%エタノール、7%酢酸に浸し、2時間以上振盪してタンパク質を固定した。7%酢酸、1%過ヨウ素酸で4℃、暗所で1時間振盪し酸化した。7%酢酸で洗浄後、Shiff試薬で一晩、4℃で振盪し染色した。5%K₂H₂O₅、40%エタノール、5%酢酸で1時間、55℃で浸透した後、40%エタノール、5%酢酸で脱色した。

4. 薄層クロマトグラフィー(TLC)

IMTD-IおよびIIによるデキストラン分解生成物を薄層プレート (Merck Keisel gel

60 ; 10 x 10cm)を用いて分析した。標準混合液としてグルコース、マルトース、マルトテトラオース (各10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)、およびイソマルトース、イソマルトトリオース、イソマルトテトラオース (各10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) を使用した。標準組成で反応を行い、0、1、5、10および20分間で100 μl ずつ採取し、3分間煮沸することにより反応を停止させた。これに少量のイオン交換樹脂 (Amberlite、オルガノ株式会社) を加えて脱塩し、上澄液に2倍量の冷エタノールを加え、12,000 rpmで5分間遠心分離し、未分解のデキストランを除いた。この上澄液をTLC用の試料とした。

展開プレートの下から1 cmの箇所に、各標準溶液は1 μl 、各試料は10 μl ずつスポットした。展開溶媒にはイソプロパノール : *n*-ブタノール : H_2O = 12 : 3 : 4 (v/v)を用い、アニスアルデヒド発色剤⁴²⁾により糖を発色した。

5. 至適pHの決定

標準反応組成における緩衝液をBritton-Robinsonの広域緩衝液⁴³⁾に代え、5~11までのpH条件下におけるIMTD活性を測定し、至適pHを決定した。

6. pH安定領域の決定

pH5~11までのBritton-Robinson緩衝液⁴³⁾ 50 μl に酵素溶液10 μl を加え、15時間、4℃で保持した。315 μl の0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5)、125 μl の1% dextranを加え、37℃で5分間反応させて残存活性を測定し、pHに対するイソマルトトリオデキストラナーゼ活性の安定領域を決定した。

7. 温度安定領域の決定

氷上で混合した酵素溶液10 μl 、 H_2O 115 μl 、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 250 μl を37~75℃までの各温度で15分間保持した後、すばやく氷上に戻した。1% デキストラン 125 μl を加え残存活性を測定することにより、温度に対するイソマルトトリオデキストラナーゼ活性の安定領域を決定した。

8. デキストラン分解における K_m および V の決定

デキストラン分解における K_m 値および V 値を決定するため、0.125~2.5 mg/mlの基質濃度でのイソマルトトリオデキストラナーゼ活性を測定した。各基質濃度にお

ける反応速度を両逆数プロットし(Lineweaver-Burk plots)⁴⁴⁾、 K_m 、 V を決定した。計算には最小二乗法⁴⁵⁾を用いた。

9. IMTD-Iによるデキストラン分解率

精製IMTD-Iを用いて、デキストランの最終分解率をデキストラン濃度が2.5 mg/ml (標準組成) と10 mg/ml、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)の2種類の反応液により測定した。37 °Cでの反応開始後15分~48時間で1 mlずつサンプリングを行い、10分間100°Cで加熱し反応を停止させた。遊離したイソマルトトリオース量をSomogyi-Nelson法^{38,39)}で決定し、各時間での加水分解率を決定した。

10. N末端アミノ酸配列の決定

N末端配列の決定のために、ProSpin カートリッジ(Applied Biosystems)中のProblotTM polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に精製酵素500 pmol (0.035 mg)を転写し、アミノ酸配列をモデル477A プロテインシーケンサー(Applied Biosystems)により分析した。PVDF膜への試料の転写は本カートリッジのプロトコールに従った。

11. 逆相HPLCによるIMTD-Iの分離

IMTD-Iの分離にはTRI-ROTAR-VI HPLC System (日本分光) を、検出器にはUVIDEC-100-VI Spectrometer (日本分光) を使用した。また、カラムはFinepak SIL C8P (日本分光、4.6 x 50mm)を用い、0.1% トリフルオロ酢酸-アセトニトリル溶媒系により、70 °Cで1 ml/minの流速で分離溶出した。得られたIMTD-Iは550 °C、8時間以上加熱処理したビダール試験管に分取後、エバポレーターにより濃縮乾固し、アミノ酸組成およびアミノ酸配列の解析に供した。

12. アミノ酸組成

逆相HPLCを通して得られた精製酵素0.5 nmol(0.035 mg)に粉末尿素を最終的に4 Mになるように加え、全体で300 μ lになるように少しずつ0.2 M Tris-HCl緩衝液(pH 9.3)を加え試料を完全に溶解させた。1 μ lの2-メルカプトエタノールを加えて

窒素充填した後、室温で16時間放置した。さらに4-ビニルピリジン1.5 μ lを加え、窒素充填下で28 $^{\circ}$ C、4時間処理した。逆相HPLCで単離後、3回に分け、組成をモデル420A デリバタイザー(Applied Biosystems)により分析した。

13. IMTD-Iの部分アミノ酸配列の決定

1) Lysyl endopeptidase消化

逆相HPLCを通して得られた精製酵素1 nmol (0.07 mg)を4 M 尿素を含む0.2 M のTris-HCl緩衝液(pH 9.3)300 μ lに溶解し、1 μ lの2-メルカプトエタノールを加えて窒素充填した後室温で16時間放置した。さらに4-ビニルピリジン1.5 μ lを加え、窒素充填後暗所で28 $^{\circ}$ C、4時間処理した後1 μ lの90%ギ酸を添加して反応を停止させた。再び逆相HPLCに供して修飾されたタンパク質を回収し、エバポレーターにより乾固した後、再び4 M 尿素を含む0.2 M Tris-HCl緩衝液 (pH 9.3)300 μ lに溶解した。得られた試料に対し約1/100 (mol / mol)量のLysyl endopeptidase (和光純薬)を加え、37 $^{\circ}$ Cで8時間消化した。

2) ペプチドの分取

Lysyl endopeptidase消化により得られたペプチドの回収には、逆相HPLCにより、Asahipac Shodex C8P-50カラム(4.6 x 200mm)を用いた。流速0.8 ml/min、50 $^{\circ}$ Cの条件下で、216 nmおよび280 nmにおける吸光度を測定して検出を行った。溶出した各ペプチドは未使用の小型遠心チューブに分取したのち、遠心分離濃縮機を用いて濃縮乾固した。

3) アミノ酸配列の決定

アミノ酸配列の決定は、モデル477A プロテイン・ペプチドシーケンサー/120A PTH アナライザーシステムを用いて行った。乾固した試料は100% TFA 30 μ lに溶解して分析に供した。

第3節 実験結果

第1項 生産条件の確立

酵素生産菌である *B. fuscum var. dextranlyticum* の培地組成については、菌の単離、炭素源および窒素源等とともにすでに Yamaguchi²²⁾ らによって報告されているが、今回試験的に Polypepton と yeast extract それぞれの濃度を2倍にした培地を用いて、Yamaguchiらの培地と菌の増殖、および遠心分離により菌体を取り除いた培養上清1 ml当たりの酵素活性および培地のpHを比較した(Figure 2-1)。その結果、オリジナルの培地において、培養開始後36時間で既報とほぼ同じ最大活性(0.68 unit/ml)を示し、その後ほとんど変化しなかったのに対し、Polypeptonを2倍にした培地では既報の約3.7倍(2.54 unit/ml、培養96時間後)、yeast extractを2倍にした場合では約2.9倍(1.96 unit/ml、培養108時間後)に活性が増大した。

第2項 精製

1. 粗酵素液の調製および硫酸分画

酵素の精製はすべて4℃で行った。96時間後の培養液を12,000 xgで30分遠心分離し、得られた上澄液を精製のための粗酵素液とした。イソマルトトリオデキストラナーゼは2,400 unit回収され、比活性は1.4 unit/mgであった。事前に乳鉢でよくすりつぶした硫酸アンモニウムを加え60%飽和とし、4℃で一晩静置した。12,000 xg、30分の遠心分離により得られた上澄液にさらに80%飽和になるまで硫酸アンモニウムを加え、4℃でさらに一晩静置した。遠心分離により得られた沈澱を10 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)に溶解し、同緩衝液に対し、数回透析外液を取り替えながら24時間透析した。硫酸を用いた分画により、イソマルトトリオデキストラナーゼを50%の回収率(1,200 unit)で3.6倍(比活性5.0 unit/mg)にまで精製した。

2. DEAE-Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィー (1回目)

酵素溶液を10 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)で緩衝化したDEAE-Sepharose CL-6Bカラム(1.9 x 28.5cm、81ml)に添加し、100 mlの同緩衝液でカ

ラムを洗浄後、吸着タンパク質を0から1 Mまでの塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出させた。溶出は10 ml / hrの流速、3.5 cm / hrの線流速で行った。クロマトパターンをFigure 2-2に示した。得られた活性画分 (Fraction Nos. 39~42) を集め、コロジオンバックを用いて同緩衝液に透析しながら約4 mlにまで濃縮した。これらの操作により、イソマルトトリオデキストラナーゼを46%の回収率 (1,110 unit) で13倍 (比活性18 unit / mg) にまで精製した。

3. Bio-Gel P-100 カラムクロマトグラフィー

濃縮酵素溶液を0.2 M 塩化ナトリウムを含む10 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)で緩衝化したBio-Gel P-100 カラム(2.6 x 86cm、457 ml)に添加した。溶出は5 ml/hrの流速、0.94 cm / hrの線流速で上記の緩衝液を用いて行い、5 mlずつ画分を回収した。クロマトパターンをFigure 2-3に示した。得られた活性画分 (Fraction Nos. 27~31) を10 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)に対して24時間、数回緩衝液を取り替えて透析した。本過程でイソマルトトリオデキストラナーゼを35%の回収率 (840 unit) で15倍 (比活性22 unit / mg) にまで精製した。

4. DEAE-Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィー (2回目)

回収した活性画分を2回目のDEAE-Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィー(1.8 x 33cm、84 ml)に添加した。10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) で洗浄した後、吸着タンパク質を0から0.5 Mまでの塩化ナトリウムを用いた直線濃度勾配により溶出させた。溶出は8 ml / hrの流速、3.1 cm / hrの線流速で行った。クロマトパターンをFigure 2-4に示した。得られた活性画分 (Fraction Nos. 127~131) を集め、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して透析を行った。これらの操作により、イソマルトトリオデキストラナーゼを24%の回収率 (580 unit) で21倍 (比活性29 unit / mg) にまで精製した。

5. Hydroxylapatiteカラムクロマトグラフィー

透析した酵素溶液を10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)で緩衝化したHydroxylapatite カラムクロマトグラフィー(1.4 x 6.5cm、10 ml)に添加した。カラムは40 mlの同緩衝液により洗浄し、吸着したイソマルトトリオデキストラナー

ゼを10 mMから200 mMまでのリン酸緩衝液直線濃度勾配により回収した。溶出は1.5 ml / hrの流速、1 cm / hrの線流速で行った。Figure 2-5に示したように、IMTDの活性ピークは大きく2つに分かれ、先に溶出したフラクションNos. 66~68の画分をIMTD-I、次のフラクションNos.74、75の画分をIMTD-IIとした。以後、IとII、それぞれについて諸性質を調べ、比較、検討を行った。

得られた精製酵素の一部を-50℃で凍結乾燥し、比吸光係数を求めたところ、IMTD-Iは16.0、IMTD-IIは13.4であった。したがって、最終的に得られた活性および比活性はI、54.7unit/mg、IIが42.4 unit/mgとなった。

精製の手法はFigure 2-6に、および精製の過程はTable 2-1にまとめた。

第3項 諸性質

1. SDS-PAGEおよび分子量の決定、PAS染色

精製により得られた各酵素をSDS-PAGEで泳動し、CBB染色を行った(Figure 2-7)。I、IIともに単一なバンドを示し、泳動距離から算出した分子量は、どちらも約70,000であった。また泳動した各IMTDにPAS染色を行ったが、I、IIともに染色されず、糖鎖に由来する発色が認められなかった。

2. 薄層クロマトグラフィー

IMTD-IおよびIIによるデキストラン分解生成物にはどちらもイソマルトトリオースのみが認められ、その生成量は時間とともに増加した(Figure 2-8)。またIMTD-Iを用いて、酵素量を10倍、反応時間を30~120倍にしてプルラン分解能を調べたが、薄層プレート上に明確な分解反応物を認めることはできなかった(データは示していない)。

3. 至適pH

IMTD-IとIIの至適pHを求めた結果をFigure 2-9に示した。両酵素とも典型的なベル型の活性曲線を示し、至適pHはどちらも7.5であった。

4. pH安定性

各pHに対して15時間、4℃で保持した後のIMTD活性をFigure 2-10にまとめた。

pH 7.5で残存活性を測定したところ、IMTD-IでpH 5.5から9.0まで、IMTD-IIではpH 6.5から9.5まで安定であることが判明した。

5. 温度安定性

各温度で15分間保持した後のIMTD活性を求めたところ(Figure 2-11)、IMTD-Iでは55℃まで、IMTD-IIでは50℃まで安定であることが判明した。また、Iでは65℃、IIでは60℃を越えると活性は半分以下となり、両酵素とも70℃を越えると活性は10%以下となった。

6. デキストラン分解における K_m 、 V の決定

反応溶液中のデキストラン濃度に対して、酵素1mg当りの反応生成物イソマルトトリオースの遊離速度をそれぞれ逆数でプロットした(Figure 2-12)。IMTD-I、IIともにほぼ一直線上に乗り、おのおのについて K_m および V を最小二乗法を用いて計算した。その結果 K_m 値は両酵素でほとんどかわらず、Iで0.26 mg/ml、IIで0.27 mg/mlであった。また V はIで59.6、IIで42.8 μ mol of isomaltotriose/mg/minであった。

7. IMTD-Iによるデキストラン分解率

基質濃度の違いにより分解速度に差がみられたものの、どちらの場合においても反応開始後24時間にほぼ95%近くまで分解された(Figure 2-13)。

8. IMTD-Iによる最終デキストラン分解物の確認

IMTD-Iによるデキストラン分解物を薄層クロマトグラフィーにより確認した。経時的に採取した反応溶液中に含まれるデキストラン分解物を調べた結果、反応初期にはイソマルトトリオースのみが確認されたが、反応が進行するにつれイソマルトトリオース以外のオリゴ糖も確認されるようになった(Figure 2-14)。これらは標準糖として用いたグルコース、マルトース、マルトトリオース、およびイソマルトース、イソマルトトリオース、イソマルトテトラオースとは異なる泳動距離を示した。

9. アミノ酸組成

アミノ酸組成分析の結果はTable 2-2にまとめた。両酵素の組成に明確な差は認められなかった。また、この結果より両酵素とも1 molあたり30 mol程度のリジン残基が存在することが確認されたため、Lysyl endopeptidaseを用いて限定分解することにより、配列決定に適度な鎖長を有するペプチドが得られることが期待された。

第4項 N末端および部分アミノ酸配列の決定

1. N末端アミノ酸配列の決定

IMTD-IとII、ともに約500 pmolをProSpinに供して配列解析を行ったところ、両酵素とも9残基まで解読でき、どちらもAsn-Pro-Thr-Lys-Pro-Val-Glu-Asp-Ala-という全く同じ配列を示した。IとIIともにこれをN末端配列と推定するとともに、酵素のN末端側においてプロテアーゼによる切断などの修飾を受けていないものと判断した。

2. IMTD-Iのアミノ酸部分配列の決定

1) Lysyl endopeptidase消化

IMTD-IとIIにおいて、SDS-PAGEによる分子量の推定や、N末端配列、アミノ酸組成の結果より、両酵素が異なる遺伝子の産物である考えにくい。そこでこれ以降の配列決定はIMTD-Iにのみについて行い、まずピリジルエチル化した試料のLysyl endopeptidaseによる消化条件を検討するため、経時的に逆相HPLCで分解により得られたペプチドを回収した。その結果、消化開始後2時間でほぼ分解が完了することが確認された。

2) ペプチドの分離

ペプチドの単離は37°Cで8時間消化した後に行い、逆相HPLCにより33種類のペプチドを分離した (Figure 2-15)。回収したペプチドにはLEIT-の接頭語を付け、溶出順に番号を付けて命名した。

3) アミノ酸配列の決定

Figure 2-15に示した各ペプチドのうち、LEIT-5、LEIT-9、LEIT-12、LEIT-

13、LEIT-17、LEIT-18、LEIT-21、LEIT-32、およびLEIT-33の9種類についてアミノ酸配列を解析した。結果をTable 2-3に示した。

第4節. 考察

1. 菌の培養

本酵素生産菌である*B. fuscum* var. *dextranlyticum*の培養条件については、土壌中からの菌の単離とともに、培養条件について報告がなされている²²⁾。このうち、至適炭素源とされるエタノールについては、至適濃度についてもかな調査が行われているのに対し、窒素源であるPolypepton、およびビタミン源であるyeast extractについては、その至適濃度の解明はなされていない。そこで今回、窒素源およびビタミン含有量が高い培地ではさらに菌が増殖し酵素生産量が伸びるのではないかという仮定のもとに、既報の培地に比べPolypepton、およびyeast extractの含量を2倍にしたものを用い、酵素生産量を比較してみた。その結果、菌増殖の増加に比べ、どちらの場合においても酵素生産量が増加し、yeast extractを2倍にした培地ではさらに菌の増殖や酵素生産量が増加する傾向を示した。しかし、菌の培養に時間がかかりすぎることから、最も活性の高かったPolypeptonを2倍にした培地で96時間培養したものを酵素精製のための培養条件とした。この結果より菌培養の規模を小さくすることが可能となった。その一方、窒素源の増加による夾雑タンパク質の増加もあり、さらに本酵素が菌体外に生産されることから、精製が容易な無機塩を用いた合成培地の作製も検討すべきであろう。

2. イソマルトトリオデキストラナーゼの精製

得られた粗酵素液からのイソマルトトリオデキストラナーゼの精製には、アセトン分画、硫酸画分、Bio-Gel P-30、およびDEAE-celluloseを用いたYamaguchi²²⁾らとかなり異なる手法を用いた。SDS-PAGEで確認したところイソマルトトリオデキストラナーゼは培養上清の段階ですでにメインバンドであり、Bio-Gel P-100のゲル濾過後で分子量が若干異なる夾雑タンパク質がわずかに残るのみであった。しかし、この夾雑タンパク質は疎水クロマト担体であるButyl-Toyopearlを用いて取

り除くことができなかつた。陽イオン交換作用およびカルシウム結合の差違で分離を行うHydroxylapatiteのカラムを通したところ、夾雑タンパク質を取り除くことに成功した。しかし、イソマルトトリオデキストラナーゼの活性ピークは大きく二つに分かれた。よつて、それぞれのピークに含まれるIMTDをIMTD-I、および-IIとした。以後、両者について諸性質を調べ、比較、検討することにより、この二つの酵素が同じものなのか、異なる場合はその相違点を明確にしようと試みた。数多く報告されているエンド型デキストラナーゼについては、*Chaetomium glaucum*の生産する酵素⁴⁶⁾のように精製の最初の段階で二つに別れるもの(CD-1およびCD-2)、および*Aspergillus carneus*由来の酵素⁶⁾のように精製後pIの差により二つに分けられたものなどが報告されているが、エキソ型のデキストラナーゼについてはこれが最初の報告となる。しかしながら、部分アミノ酸配列をもとに作製したオリゴヌクレオチドプローブを用いたサザン解析の結果、*B. fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株の染色体上にはイソマルトトリオデキストラナーゼをコードする遺伝子は1コピーしか存在しないことが確認されたことより(第3章)、IMTD-IおよびIIは同一の遺伝子の産物であることが示唆された。

3. PAS染色

一般的に菌由来の酵素については糖が付加しているものは少ない。今回、細菌由来の酵素である二つのIMTDに対してPAS染色を行ったのは、精製の過程において分子量の違いでタンパク質を分離するBio-Gel P-100を通した場合、予想していたよりもかなり分子量の大きなタンパク質が得られる画分にイソマルトトリオデキストラナーゼ活性が若干認められたため、糖によるタンパク質溶出への影響が考えられたためである。しかしIMTD-I、IIともに糖鎖の存在は認められず、高分子画分のものが精製過程における酸化重合などで生じたオリゴマータンパク質である可能性が示唆された。

4. イソマルトトリオデキストラナーゼ活性に対するpHおよび温度の影響

pHによるイソマルトトリオデキストラナーゼ活性への影響を調べたところ両酵素がきれいなベル型曲線を描いて重なり、どちらも至適pHは7.5であった。これに対し、pHおよび温度安定性を調べた結果IとIIの間にわずかに差が見られた。まず

pHに対する安定領域は、IMTD-Iに比べIIがややアルカリ側に安定領域を有し、範囲もIに比べやや狭いという結果が得られた。さらに温度に対する安定性を比較した場合においても、IIはIよりも温度に対して不安定であった。これらの安定性の差がIとIIの比活性の差からIIに含まれる夾雑タンパク質の影響であることが考えられたが、明確な理由はわからなかった。また両酵素のLineweaver-Burkの式より、IとIIの K_m 値はほとんど変わらないものの、 V の値に差が見られた。これは両者の比活性の差によるが、この比活性の差が酵素の純度によると仮定し、比活性の低いIMTD-II (42.4 unit / mg)を仮に54.7 unit / mgとして計算を行うと、 V はIとIIでほぼ一致する。

5. IMTD-Iによるデキストラン分解率

イソマルトトリオデキストラナーゼによるデキストランの分解率については、Yamaguchiら²²⁾が基質濃度10%の条件で反応開始後約2時間で分解があまり進まなくなり、最終分解率は35%であると報告したのに対し³⁶⁾、今回、遊離したイソマルトトリオース量より計算した最終分解率は95%近くにまで達していた。イソマルトデキストラナーゼでは0.1%のデキストラン濃度で約35%まで分解する²⁴⁾。これに対しイソマルトトリオデキストラナーゼが95%まで分解することにより、本酵素はデキストランの非還元末端からの分解が α -1, 3や α -1, 4結合などの枝分かれ構造にまで達した場合でもその部分を飛び越えてさらに進行することが推定された。

6. 薄層クロマトグラフィーによる生成物の分析

Figure 2-8で示したとおり、IMTD-IとII両方において反応時間が20分以内（デキストランの分解率はどちらも5%以下）の場合デキストラン分解生成物として認められたのはイソマルトトリオースのみであり、エンド型デキストラナーゼに特有の多数のオリゴ糖は認められなかった。また、イソマルトデキストラナーゼに認められたプルラン分解能²⁴⁾は本酵素では認められなかった。同様の結果として*Penicillium luteum*由来のエンド型デキストラナーゼがプルランを分解できないことが報告されているが⁴⁷⁾、同じデキストラナーゼにおいても、異なる基質に対して様々な反応を示すことは大変興味深く思われた。

次にデキストランが95%まで分解された標準反応混合液中の生成物を再び薄層ク

ロマトグラフィーを用いて確認した結果、反応初期（15分後）では確かにイソマルトトリオースのスポットのみが認められたものの、分解が進むにつれて反応初期では認められなかった幾種類かのオリゴ糖の生成が認められるようになった（Figure 2-14）。エンド型デキストラナーゼをデキストランに作用させた場合、分解初期の段階では基質であるデキストランに作用して得られた各種のイソマルトオリゴ糖のスポットがほぼ同じ量で検出され、分解が進むにつれほとんどグルコース、もしくは最終分解産物のスポットが認められるようになるのに対し（データは示していない）これらのスポットはエンド型デキストラナーゼが示すパターンとは明らかに異なり、主として形成されるイソマルトトリオースのスポットに比べ非常に薄く、量的にも少ないものであった。これらのマイナースポットが得られた原因については、次の3つに要約し考える。

1) デキストランの分岐部分分解物

イソマルトトリオデキストラナーゼがデキストランをほぼ完全に分解することが可能なことから、次のように考える。デキストラン分解初期においては非還元末端付近の分解によりイソマルトトリオースのみを遊離するものの、反応が進行するにつれデキストランの分岐部分の分解も行われるようになると思われる。 α -1, 2、 α -1, 3および α -1, 4などの結合をもつデキストラン分岐部分（もしくはその分岐部分を越えた形で）の分解により、様々な結合様式をもつ二、三、四糖類が生産される。ただし、基質に用いているデキストラン T-2000は95%以上が α -1, 6結合からなる直鎖構造を取っており、分岐構造を有する分解産物が占める割合は5%以下である。

2) イソマルトトリオデキストラナーゼによる糖転移反応産物

デキストラン分解酵素による糖転移反応の報告としては、*Arthrobacter globiformis* T6株が生産するイソマルトデキストラナーゼがグルコースおよびマルトースを受容体として、非還元末端のC-4もしくはC-6の部位に α -イソマルトシル基を転移することが報告されている²⁵⁾。これまでイソマルトトリオデキストラナーゼの糖転移能についての報告はなされていないが、反応溶液中で転移反応も行われているとするならば、イソマルトトリオデキストラナーゼによるデキストラン分解産物であるイソマルトトリオース（ α -イソマルトトリオシル基）の転移が行われると考えられる。

3) イソマルトトリオデキストラナーゼのエンド型活性

イソマルトトリオデキストラナーゼによるデキストランの分解反応は、Sugiuraら³⁶⁾によってエキソ型に進行することがすでに報告されている。本研究においても、デキストラン分解の反応の初期にイソマルトトリオースのみ生成していることは、本酵素がエキソ型であることを示す。しかしながら、エキソ型の反応に対し、極めてわずかのエンド型の分解活性がある場合、TLC解析においてエキソ型の活性によるデキストラン分解産物であるイソマルトトリオースに対し、マイナースポットとして他のイソマルトオリゴ糖が確認される。

このうち3)については、イソマルトトリオース以外の生成物のスポットがイソマルトテトラオース、およびイソマルトペンタオースなどの移動度と一致せず、単純に α -1, 6結合からなるイソマルトオリゴ糖とは考えられなかったことから妥当ではないと判断した。残りの1)、2)については、マイナースポットを示す糖の同定をTLCによって断定することが難しいため、HPLCなどによる生成物の検討を考えている。また、酸による処理で枝を落としたデキストランに作用させた場合についても検討したいと考えている。さらにこのオリゴ糖が分離しきれなかったわずかな夾雑蛋白質による生成物であることも考えられるので、IMTD遺伝子の配列決定後、大腸菌で発現したIMTDによって同様の試験を行い、明確な答えを得たいと考えている。

7. N末端配列およびアミノ酸配列の決定

N末端配列の解析に用いた試料についてはHPLCによる精製は行わなかった。その結果両酵素とも9残基程度までしか解読できなかったが、どちらも全く同じ配列を示した。Table 2-2に示した両酵素のアミノ酸組成がほぼ同じことから、この二つの酵素が異なる遺伝子より発現しているとは考えにくい。いかなる理由でこの酵素がHydroxylapatiteのカラムを通した際に二つに分離したのかは現段階では不明である。

8. アミノ酸部分配列の決定および他の多糖類分解酵素との相同性

HPLCで精製、単離したIMTD-IのLysyl endopeptidaseによる分解は非常に効率良く行われ、ほぼ2時間で完全に分解されることが分かった。実際の分解には未

分解を防ぐために8時間消化を行い、33のペプチドを得ることができた。得られたペプチドの単離は逆相HPLCで行ったが、最初アセトニトリルの比率を1分間当たり1%の割合で上昇させたが、単独のペプチドとして配列を読むことができるまで分離することができず、最終的に0.5%/分の濃度勾配で各ペプチドを得た。ペプチドにはLEIT-の接頭語をつけ、配列の決定を行った。

解析したイソマルトトリオデキストラナーゼの部分配列と相同性を持つ配列を検索した結果、各ペプチドがすべて*Arthrobacter* sp.の細菌が生産するエンド型デキストラナーゼ³¹⁾の一次配列上に見いだされる結果となった (Figure 2-16)。ペプチドの解析により明らかになった部分のみを比較すると、イソマルトトリオデキストラナーゼと*Arthrobacter* sp. エンド型デキストラナーゼとの相同性は86%という非常に高い相同性を示した。両酵素の推定分子量がさほど変わらないこと (約70,000)、解析した部分配列が全配列の1/4を占めていること、さらに相同性が見いだされた領域が*Arthrobacter* sp. 由来エンド型デキストラナーゼのほぼ全域にわたっていることから、両酵素が全域にわたって非常に類似した配列を有していることが予想された。これらについては、次章においてイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の配列が決定された後に考察することにする。

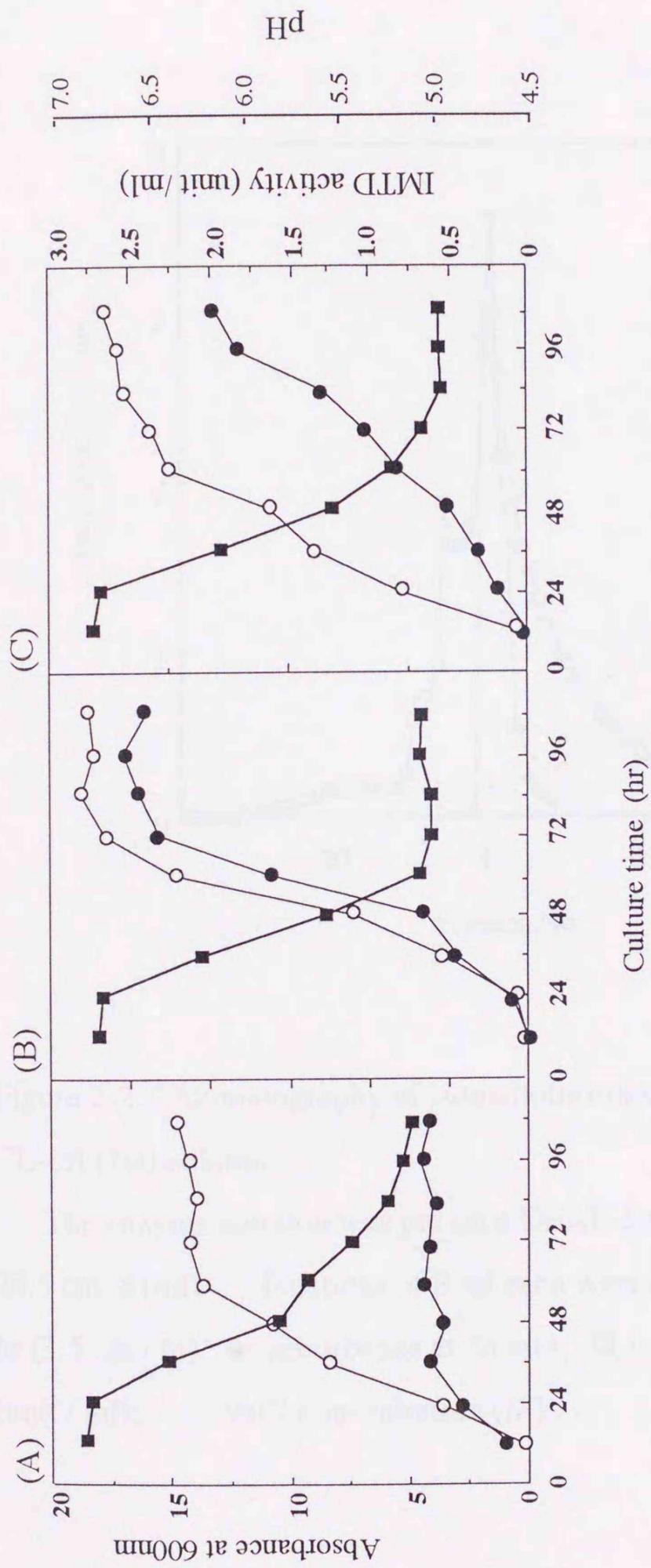


Figure 2-1. Bacteria growth, isomaltotriose-dextranase activity and pH curve of the medium culturing *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* strain 0407.

B. fuscum var. *dextranlyticum* strain 0407 was cultured at 30 °C and 200rpm.

A, Original medium 22) ; B, Polypeptone-rich medium ; C, Yeast extract-rich medium, ○, A600 showing growth of *B. fuscum* var. *dextranlyticum*; ●, IMTD activity; ■, pH.

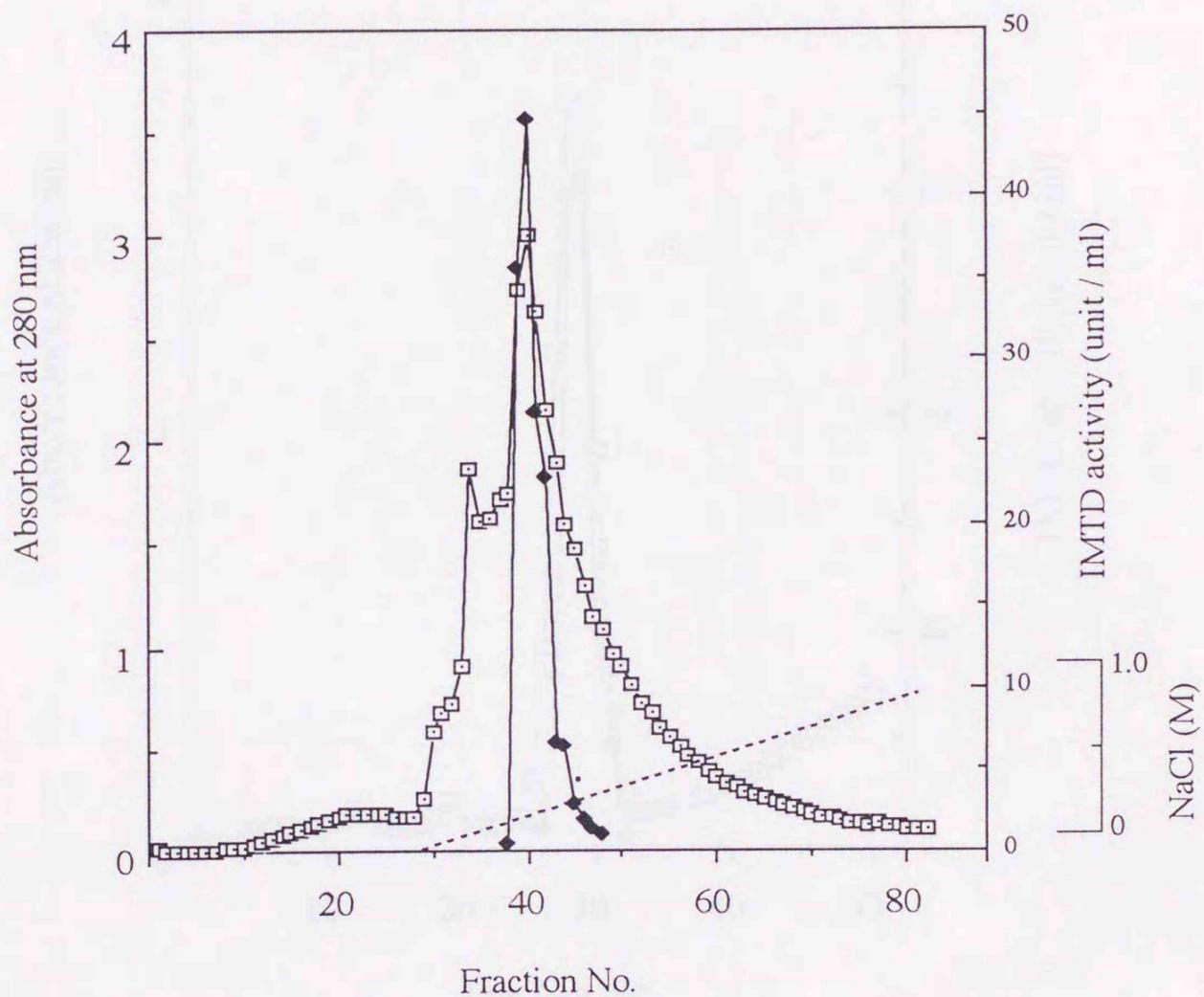


Figure 2-2. Chromatography of isomaltotrio-dextranase on a DEAE-Sepharose CL-6B (1st) column.

The enzyme solution was put on a DEAE-Sepharose CL-6B column (1.9 x 28.5 cm, 81ml). Fractions of 8 ml each were collected at a flow rate of 10 ml / hr (3.5 cm / hr). ◆, absorbance at 280nm; ◻, isomaltotrio-dextranase activity (unit / ml); ---, NaCl concentration (M).

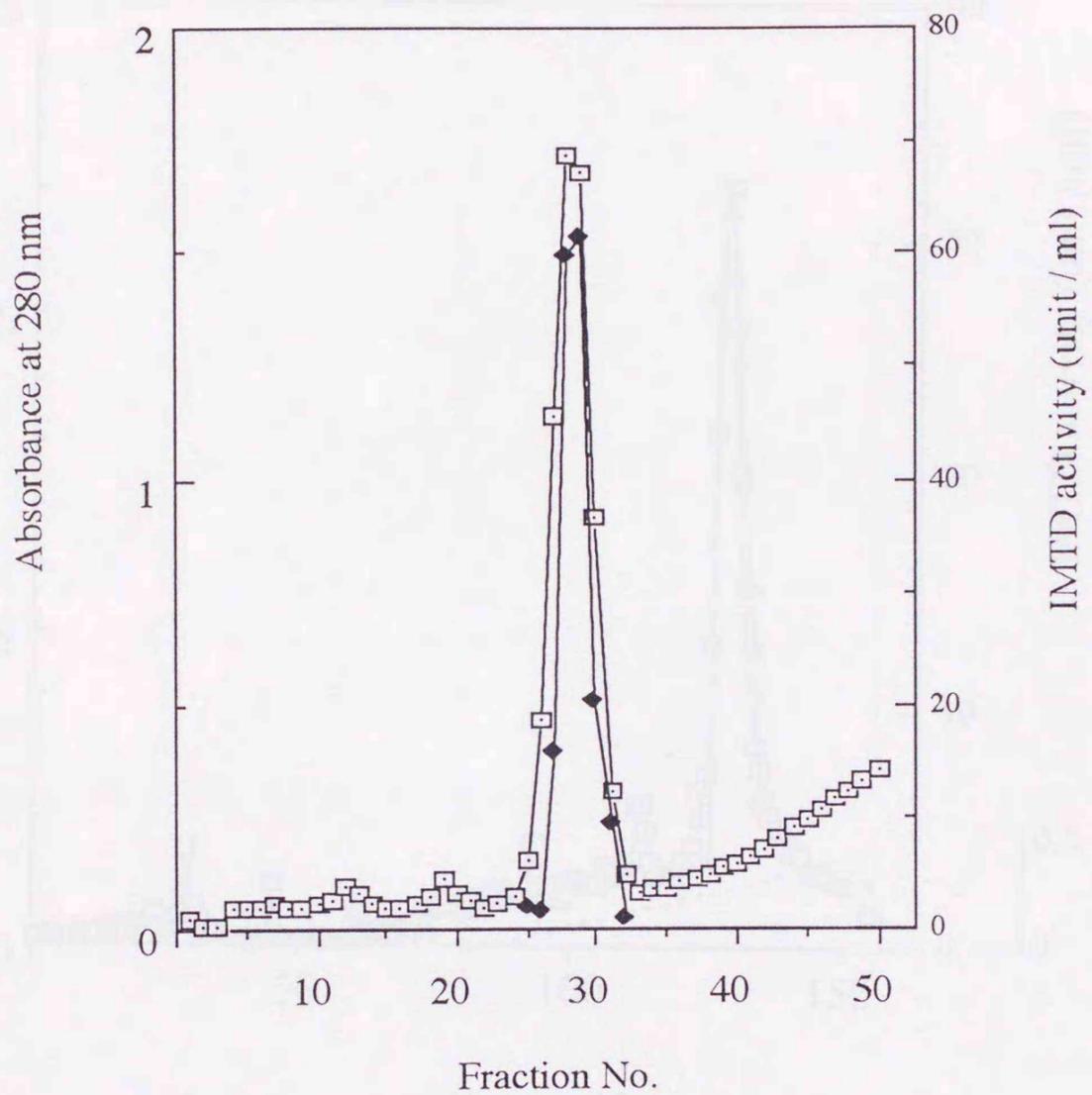


Figure 2-3. Chromatography of isomaltotrio-dextranase on a Bio-Gel P-100 column.

The enzyme solution was put on a Bio-Gel P-100 column (2.6 x 86 cm, 45 7ml). Fractions of 5 ml each were collected at 5ml / hr (0.9 cm / hr).

□, absorbance at 280nm; ◆, isomaltotrio-dextranase activity (unit/ml).

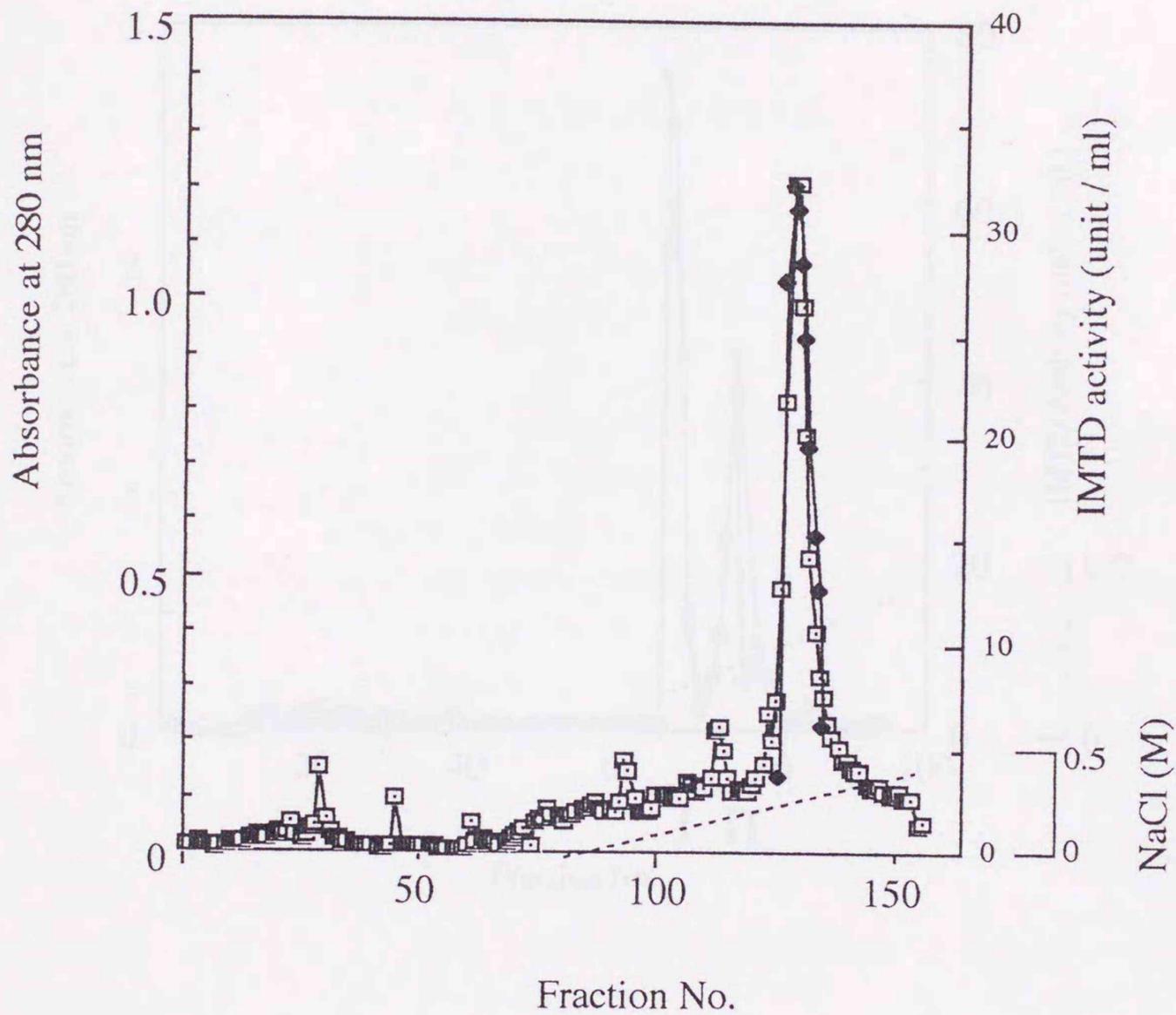


Figure 2-4. Chromatography of isomaltotrio-dextranase on a DEAE-Sepharose CL-6B (2nd) column.

The enzyme solution was put on a DEAE-Sepharose CL-6B column (1.8 x 33 cm, 84ml). Fractions of 3 ml each were collected at a flow rate of 8 ml / hr (3 cm / hr). \square , absorbance at 280nm; \blacklozenge , isomaltotrio-dextranase activity (unit /ml); --- , NaCl concentration (M).

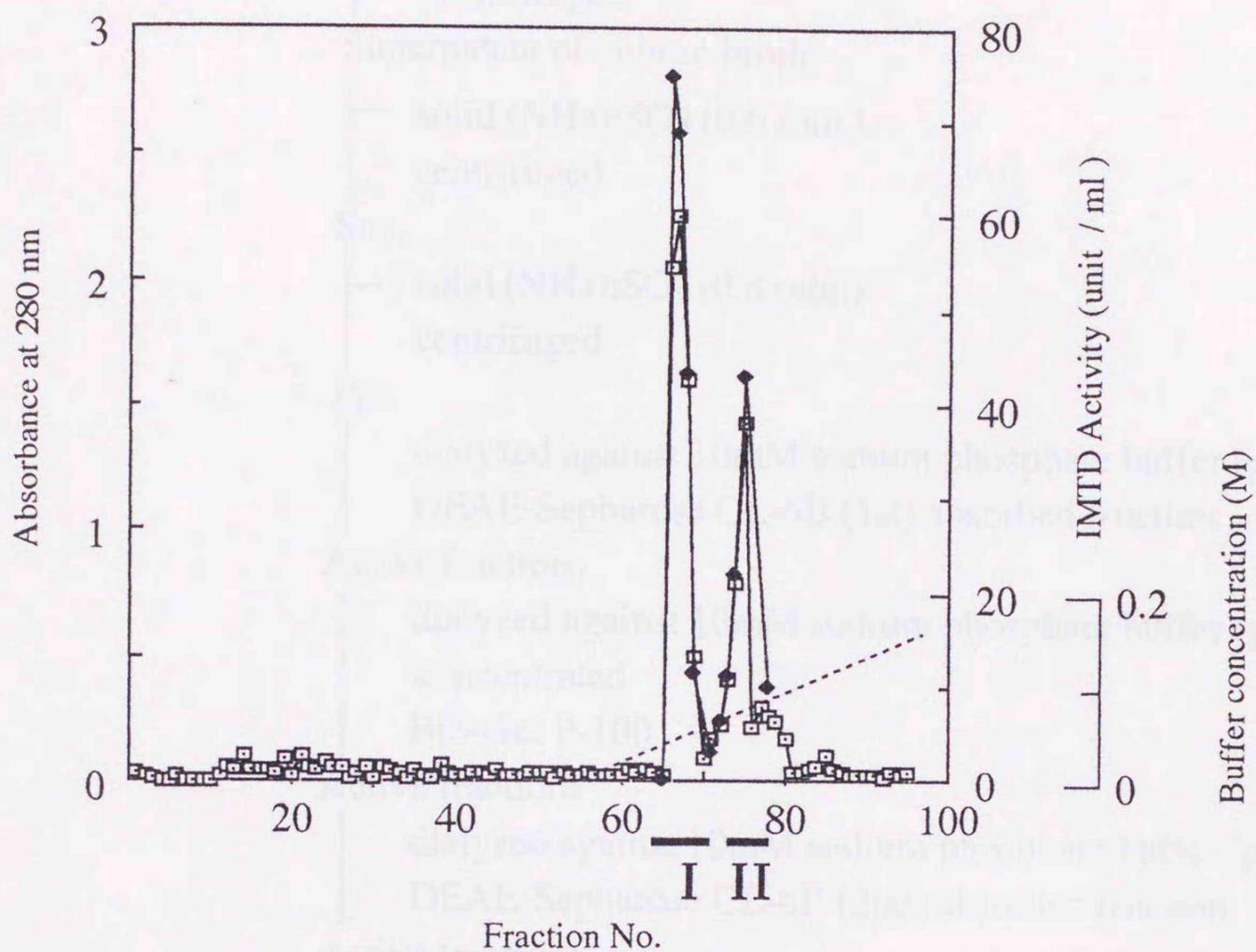


Figure 2-5. Chromatography of isomaltotrio-dextranase on a Hydroxylapatite column.

The enzyme solution was put on a Hydroxylapatite column (1.4 x 6.5 cm, 10ml). Fractions of 2 ml each were collected at a flow rate of 1.5 ml / hr (1cm / hr).

□, absorbance at 280nm: ◆, isomaltotrio-dextranase activity (unit / ml):

---, phosphate buffer (pH7.0) concentration (M).

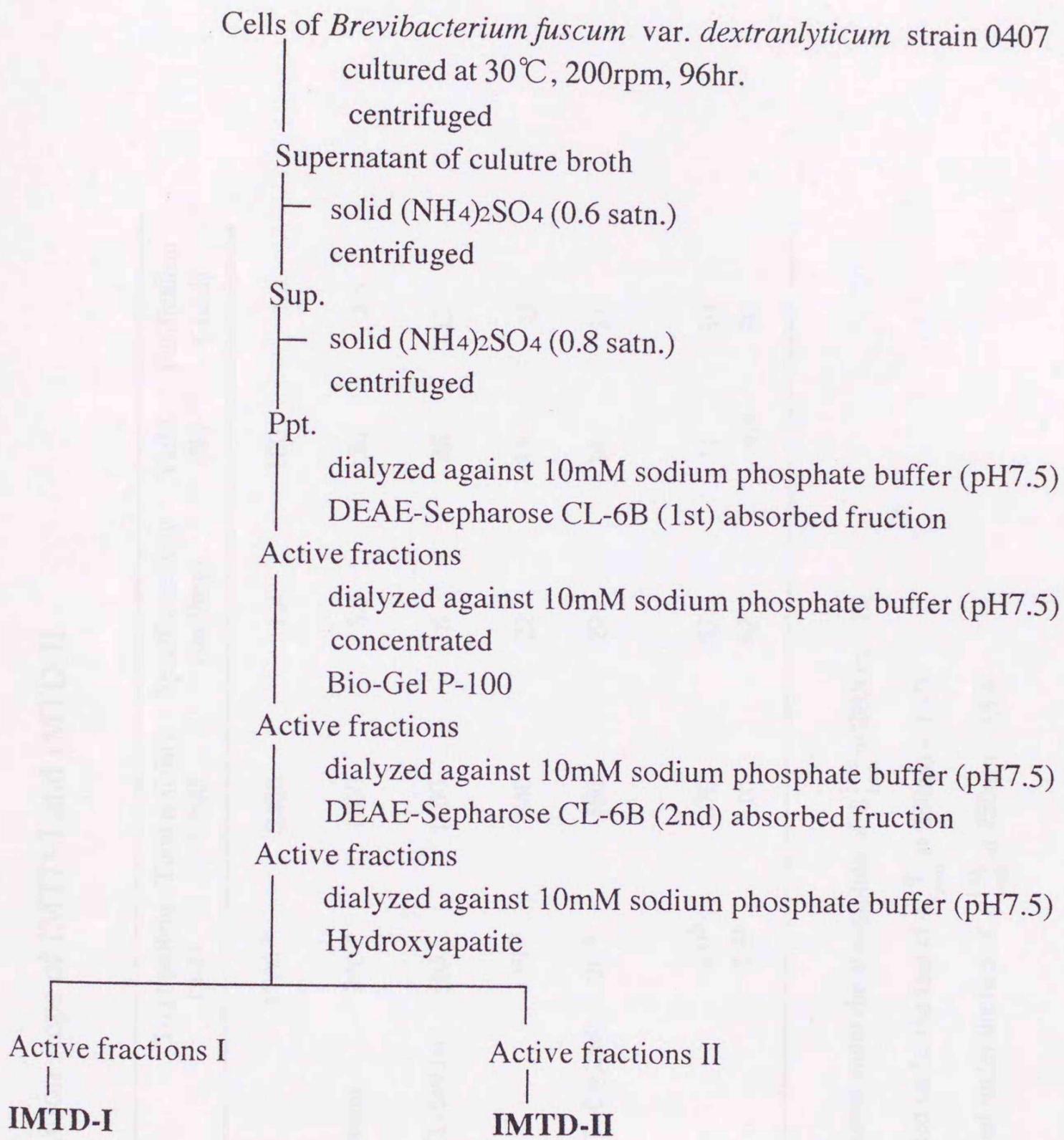


Figure 2-6. Purification procedure of isomaltotriose-dextranases from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum*.

Table 2-1. Purification steps of IMTD-I and IMTD-II

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification (-fold)
Crude enzyme	1700 ^a	2400	1.4	100	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ Fractionation	240 ^a	1200	5.0	50	3.6
DEAE-Sepharose CL-6B(1st)	63 ^a	1100	18	46	13
Bio-Gel P-100	39 ^a	840	22	35	15
DEAE-Sepharose CL-6B(2nd)	20 ^a	580	29	24	21
Hydroxylapatite					
IMTD-I	4.9 ^b	270	55	11	39
IMTD-II	2.5 ^c	110	42	4.4	30

a. These values were calculated under the assumption of $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ at 280nm = 10

b. These value was calculated under the fact of $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ at 280nm = 16.0

c. These value was calculated under the fact of $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ at 280nm = 13.4

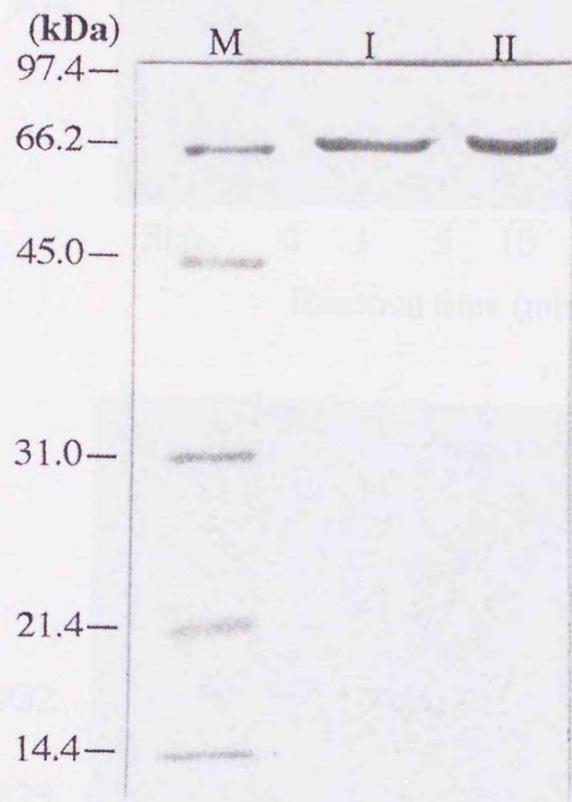


Figure 2-7. SDS- polyacrylamide gel electrophoresis of purified IMTD-I and -II.

I, IMTD-I (2 μ g); II, IMTD-II (2 μ g) .

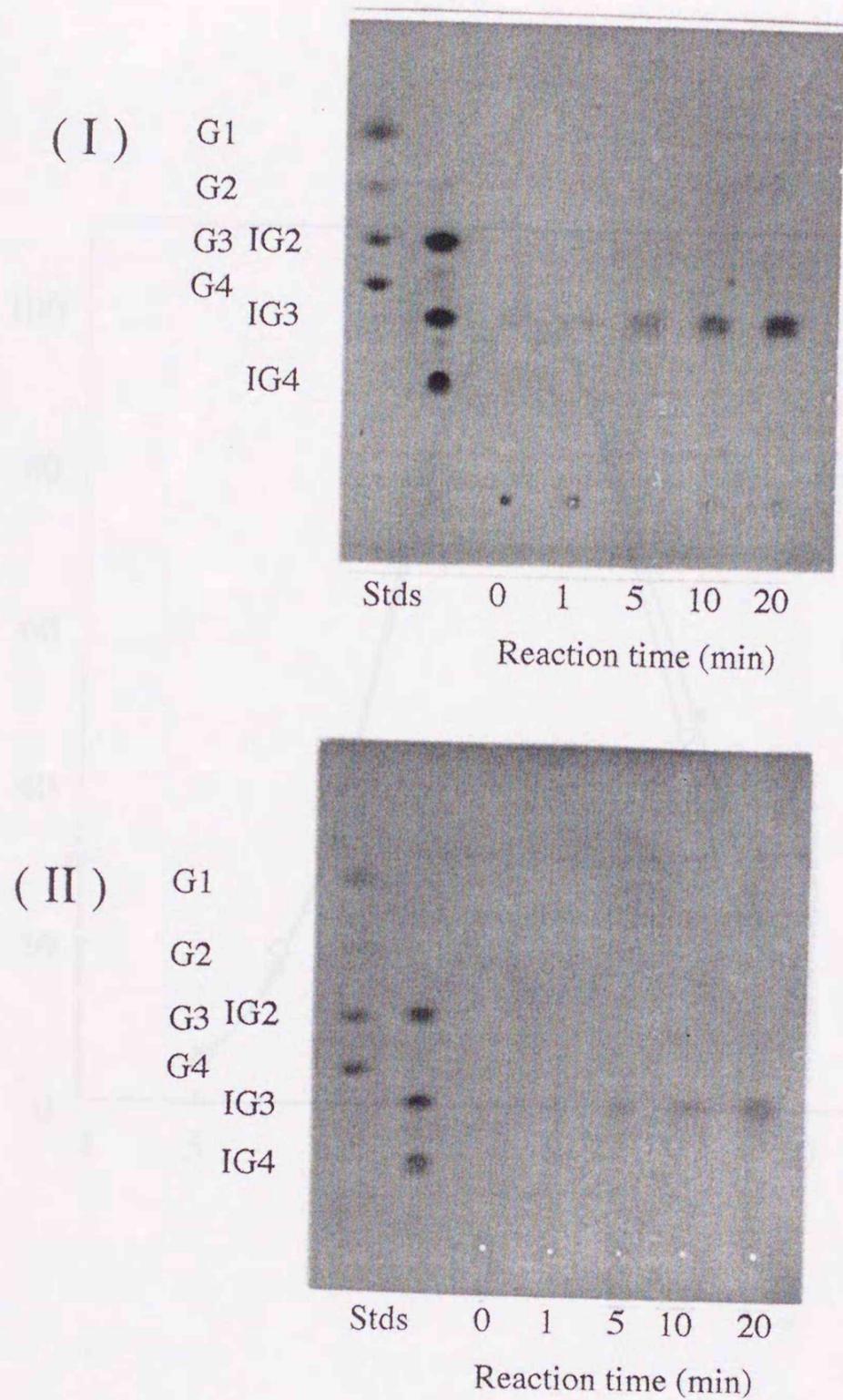


Figure 2-8. TLC for hydrolysis products of dextran by IMTD-I and IMTD-II. Samples were boiled to stop reaction at each reaction time. Stds; standards G1, glucose; G2, maltose; G3, maltotriose; G4, maltotetraose; IG2, isomaltose; IG3, isomaltotriose; IG4, isomaltotetraose; I, IMTD-I; II, IMTD-II.

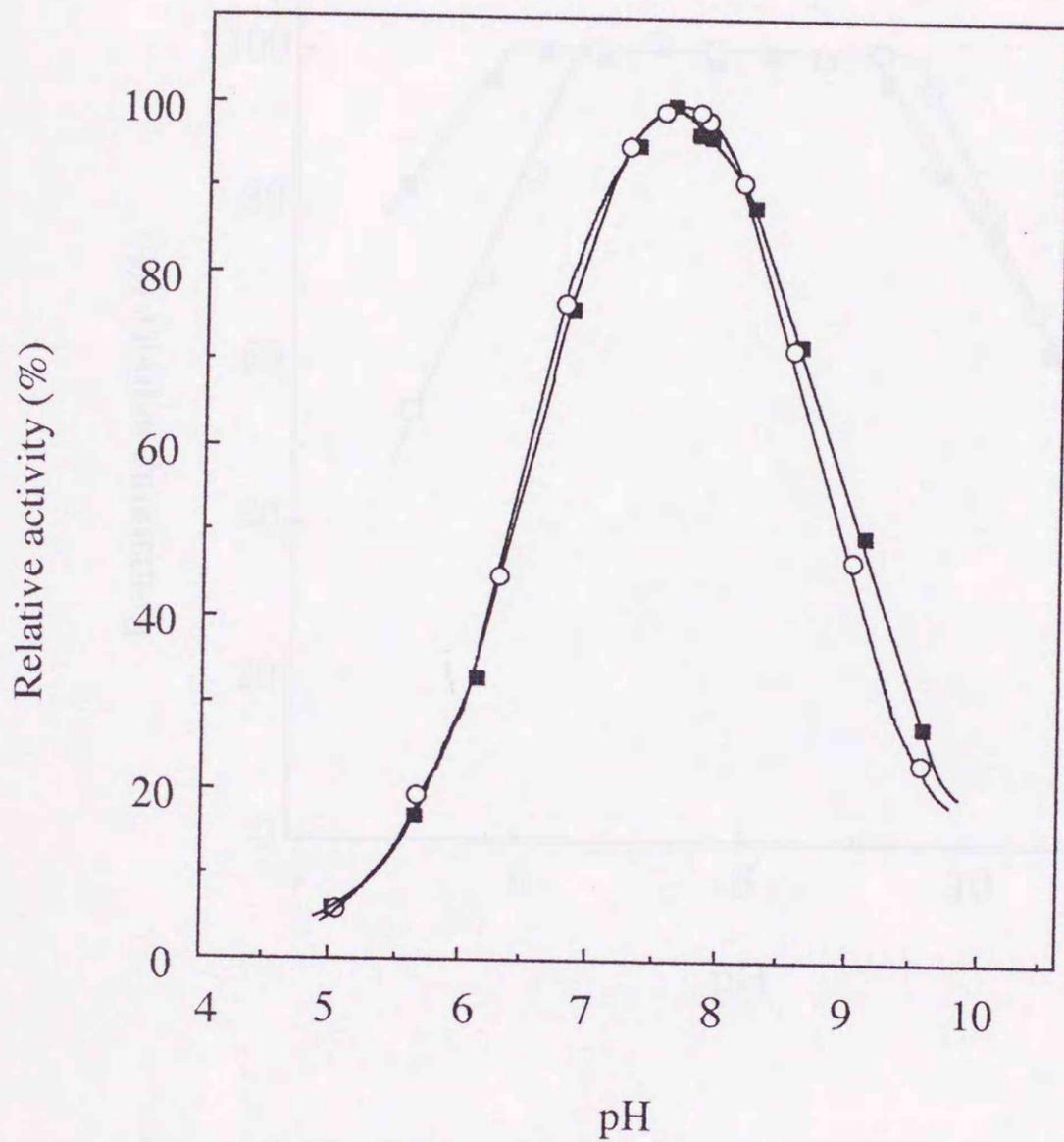


Figure 2-9 . Effects of pH on the activities of IMTD-I and IMTD-II.

The enzyme activity was measured in the standard reaction except that the Britton - Robinson buffer of each pH was used.

■, IMTD-I; ○, IMTD-II.

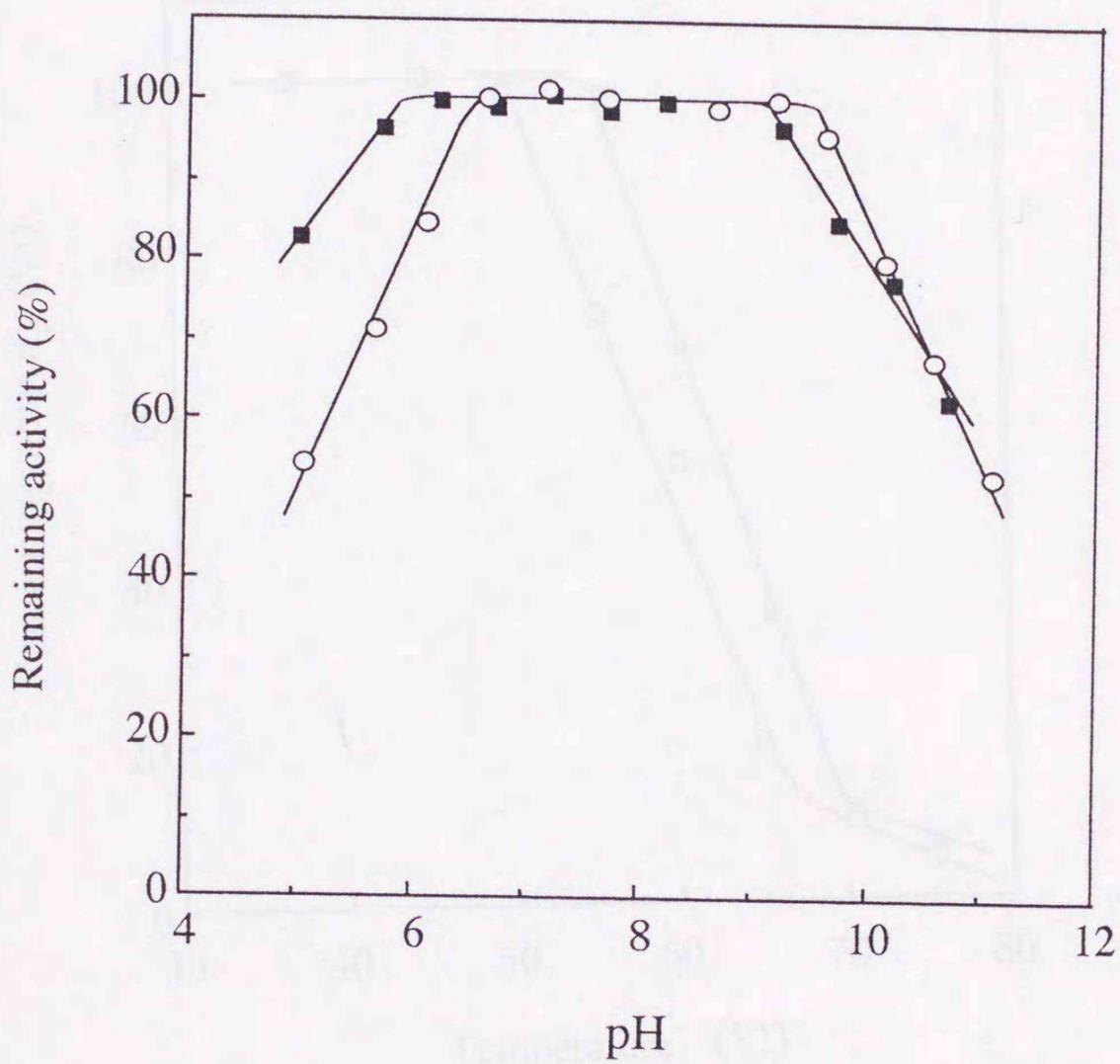


Figure 2-10. Effects of pH on the stabilities of IMTD-I and IMTD-II.

The purified enzyme was incubated at 4°C for 15hr in Britton - Robinson buffer of each pH. After pH of enzyme solution was adjusted to 7.5 with 0.1M sodium phosphate buffer, the remaining activity was measured. ■, IMTD-I; ○, IMTD-II.

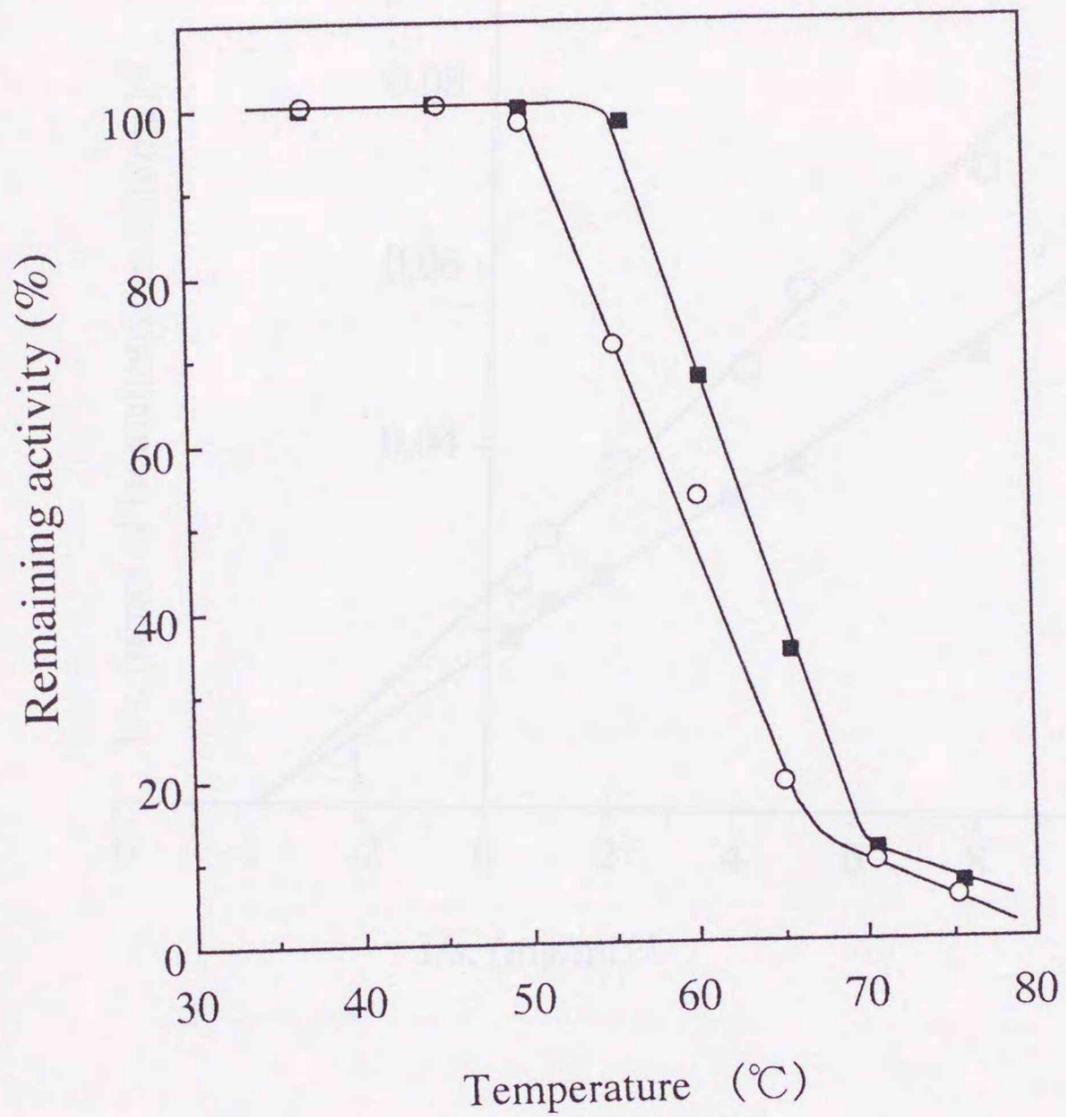


Figure 2-11. Effects of temperature on the stabilities of IMTD-I and IMTD-II.

The purified enzyme was incubated for 15 min at each temperature. The remaining activity was measured under the standard condition. ■, IMTD-I; ○, IMTD-II.

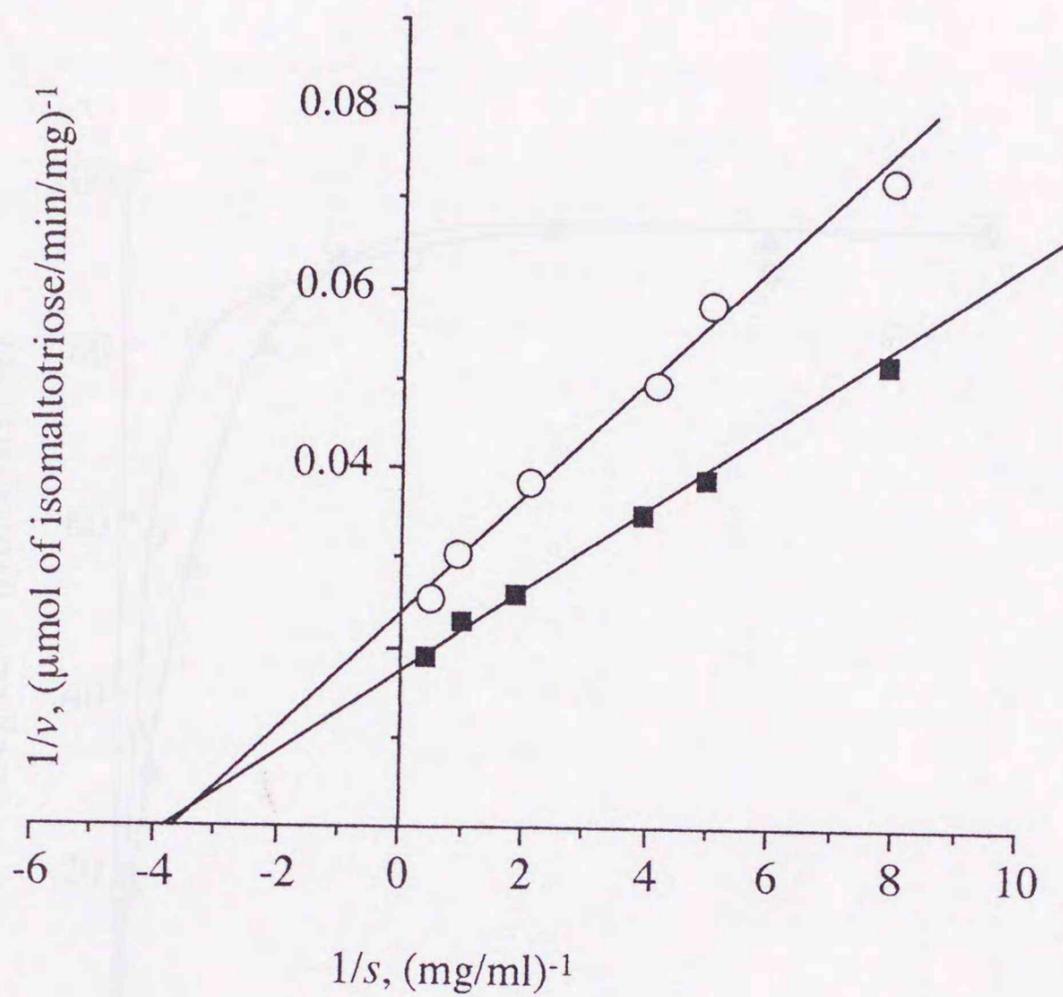


Figure 2-12. Lineweaver - Burk plots of IMTD-I and IMTD-II.

The reciprocal values of the dextran-hydrolytic velocity and substrate concentration were plotted. For calculation of the K_m and V of each enzyme, the least squares methods⁴⁵⁾ were used. ■, IMTD-I; ○, IMTD-II.

Table 2-3. Amino Acid Composition of IMTD-I and -II

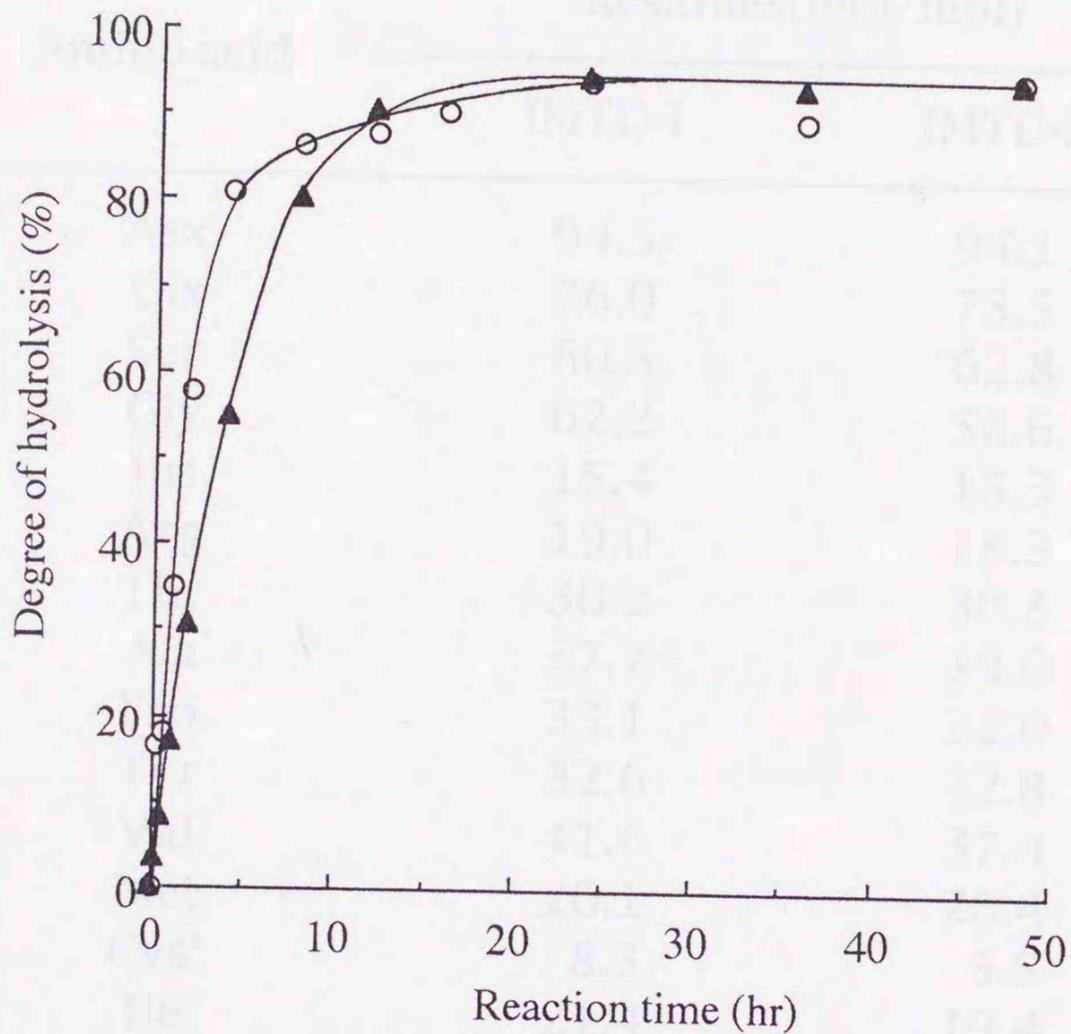


Figure 2-13. Time courses of dextran digestion by IMTD-I.

Using standard reaction mixture (0.25 % dextran) and reaction mixture of high substrate concentration (1% dextran), hydrolysis degree of dextran by IMTD-I was measured. To determine the amount of free isomaltotriose by Somogyi-Nelson method, each reaction mixture without enzyme was used for dilution of each samples. ○, 0.25% dextran; ▲, 1% dextran.

Table 2-2. Amino Acid Compositions of IMTD-I and -II

Amino acid	Residues(mol/mol)	
	IMTD-I	IMTD-II
Asx	94.5	94.1
Glx	76.0	73.5
Ser	60.5	62.8
Gly	62.2	58.6
His	15.4	15.3
Arg	19.0	18.3
Thr	30.2	30.3
Ala	37.7	39.0
Pro	33.1	32.0
Tyr	32.6	32.8
Val	41.6	37.4
Met	20.1	20.4
Cys ^a	8.3	5.5
Ile	21.4	19.4
Leu	26.8	24.8
Phe	21.1	23.1
Trp ^b	5.4	7.1
Lys	30.1	31.3

- a. Cys residue was measured as a *s*-pyridyletyletated cys.
 b. For preventing Trp destruction, 1-dodecantiol was used as a scavenger.

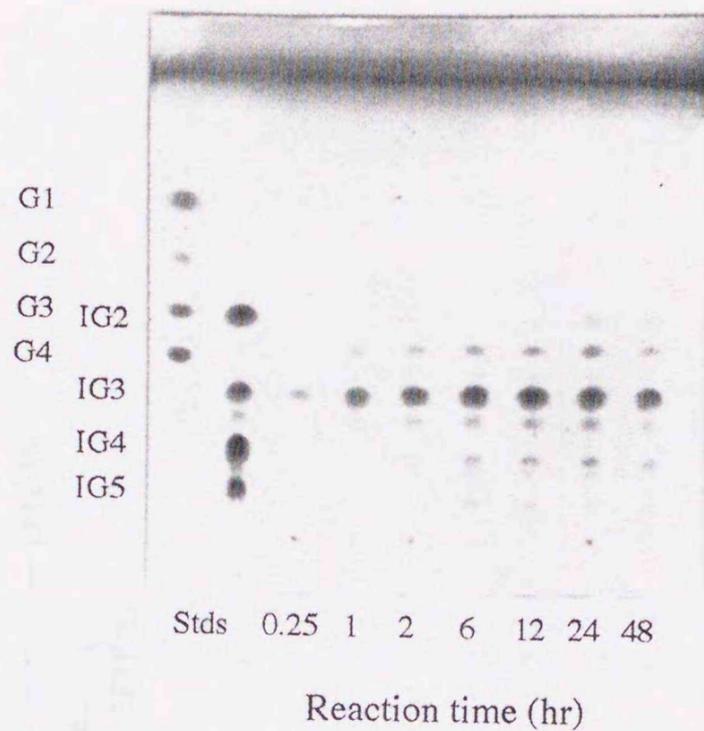


Figure 2-14. TLC for final hydrolysis products of dextran by IMTD-I.

Standard reaction mixture (0.25% dextran) was used. Samples were boiled to stop reaction at each reaction time. Stds, standards; G1, glucose; G2, maltose; G3, maltotriose; G4, maltotetraose; IG2, isomaltose; IG3, isomaltotriose; IG4, isomaltotetraose; IG5, isomaltopentaose.

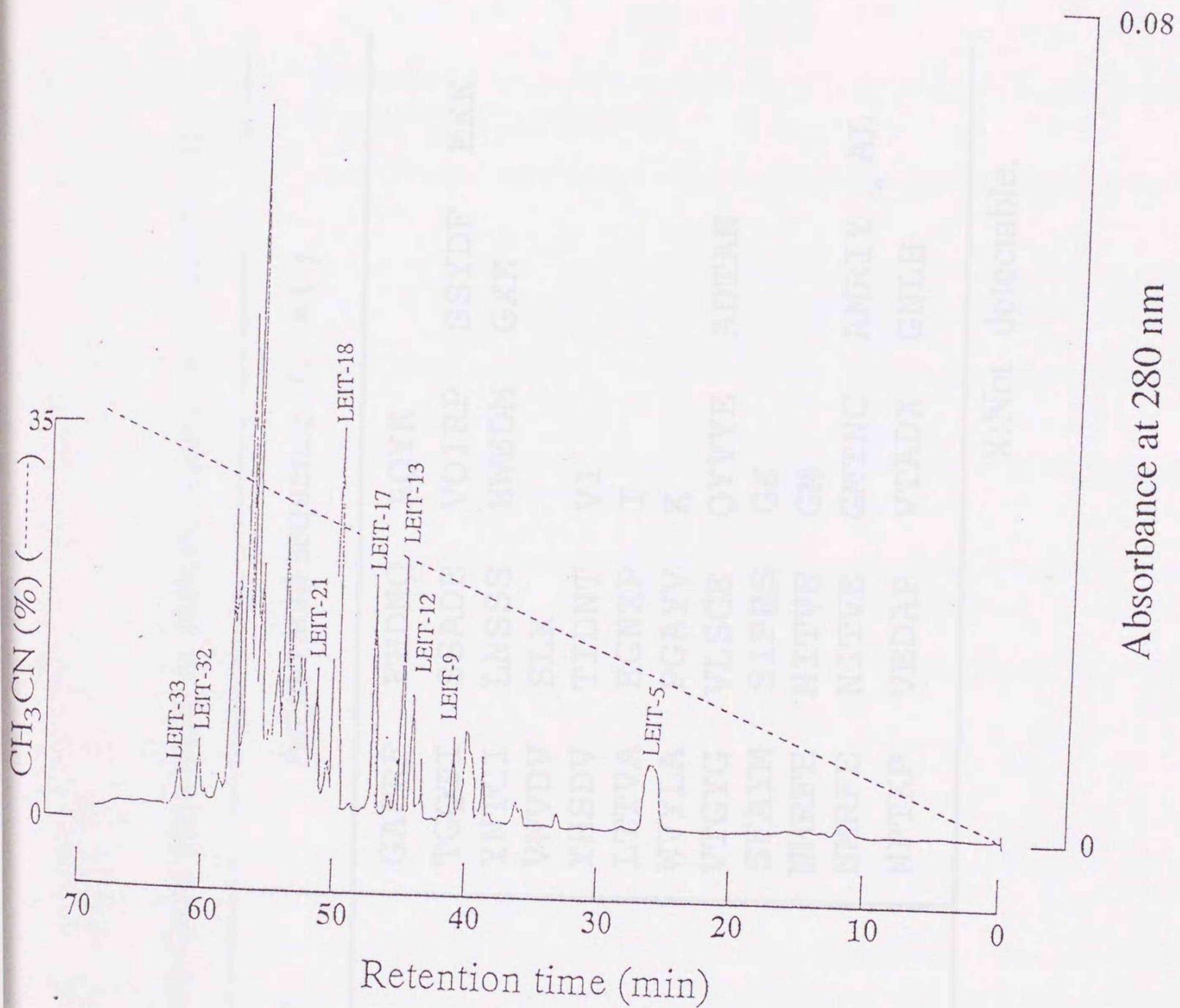


Figure 2-15. HPLC of peptides from IMTD-I digested by Lysyl endopeptidase.

Peptide separation was performed as follows. Column, Asahipak C8P-50; Column temperature, 50°C; Flow rate, 0.8ml/min; CH₃CN gradient, 0%→35% (0.5%/min); Detection, Absorbance at 280 nm.

Table 2-3. Amino acid sequences of peptide fragments from IMTD-I

Peptide name	Amino acid sequence (N→C)			
LEIT-5	GAFRF	FHDNQ	AQYK	
LEIT-9	TGQTI	SSADE	VQIRP	SSYDF
LEIT-12	YNTCI	LNSSS	HWEDM	GXX
LEIT-13	VWVDV	SLK		
LEIR-17a	YHSDV	TIDNT	VI	
17b	LTTVA	EGNXP	I	
LEIT-18	WVYLA	PGAYV	K	
LEIT-21a	VTGYG	VLSGE	QVVE	ADTAN
21b	SFAYM	SIPRS	GK	
LEIT-32	NMRFE	NITVE	GM	
LEIT-33	NMRFE	NITVE	GMTNC	AMRIY
N-terminal	NPTKP	VEDAP	VTADX	GNLH

X: Not detectable.

第5節 要約

B. fuscum var. *dextranlyticum* 0407株が菌体外に生産するイソマルトトリオデキストラナーゼの精製を行った。培地中の窒素源濃度の増加により酵素の生産量が向上した。硫酸沈殿、および各種カラムクロマトグラフィーを用いた一連の操作により、電気泳動的に均一になるまで精製した。精製酵素に関する物理化学的および速度論的な解析を行った。本酵素はデキストランを95%まで分解し、最終分解物にはイソマルトトリオース以外のオリゴ糖が含まれていた。N末端および部分アミノ酸配列を解析した結果、イソマルトトリオデキストラナーゼのアミノ酸配列は *Arthrobacter* 属の細菌が生産するエンド型デキストラナーゼと高い相同性を持つことが判明した。

第3章 イソマルトトリオデキストラナーゼをコードする遺伝子の クローニングと構造

第1節 緒言

第1章および前章で述べたとおり、今日まで様々な起源よりデキストラナーゼの単離がなされ、その酵素的な性質について研究されてきたが、1980年代に入り、遺伝子研究の技術的発展とともにデキストラナーゼの一次構造の解析が進むようになった。まず、う蝕形成の阻害を目的として、口内に生息するう蝕形成菌が生産するエンド型デキストラナーゼの配列が決定され⁴⁸⁻⁵⁰⁾、続いて*Penicillium minioluteum*³³⁾、*Arthrobacter*³¹⁾などのカビや細菌よりエンド型デキストラナーゼの配列が報告された。

一方、3種類が報告されているエキソ型のデキストラナーゼについては、まず1995年にIwaiら²³⁾によってイソマルトデキストラナーゼの一次配列が報告され、ついで1996年にOgumaら³²⁾によってグルコデキストラナーゼの配列が決定された。これら2つのエキソ型デキストラナーゼは*Arthrobacter globiformis*という同種の菌より生産されているものの、これらの酵素には互いに、さらには*Arthrobacter* sp.が生産するエンド型デキストラナーゼにも配列上の類似性が認められなかった。さらに、デキストラナーゼにおいてはいまだ結晶化およびX線解析が成功しておらず、これらのことより、現時点ではデキストラン分解酵素における構造と機能の関係を明らかにするまでには至っていないといえる。

前章で示したとおり、イソマルトトリオデキストラナーゼはその部分アミノ酸配列から、これまで見いだされたエキソ型デキストラナーゼの中で唯一エンド型デキストラナーゼと類似の配列を持つ酵素である。その一次構造の決定はデキストラン分解酵素の基質認識および触媒部位の推定を行う上で、もしくはグルコデキストラナーゼとイソマルトデキストラナーゼの比較では見いだされなかったエキソ型にデキストランを分解するための基質認識機構を解明するために必要不可欠な情報となりうる。

本章では*Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* 0407 株のゲノムDNAが

らイソマルトトリオデキストラナーゼをコードする遺伝子を単離し、その配列と特徴を述べるとともに、イソマルトトリオデキストラナーゼの推定アミノ酸配列を他の類似配列と比較した。

第2節 実験材料および方法

1. 菌株および培養条件

大腸菌JM109[*recA1*Δ*lac-proAB endA1 thi1 hsdR17 supE44 F'*[*traD36 proAB⁺lacI^qlacZ*ΔM15]⁵¹⁾は、形質転換の宿主株として用いた。大腸菌コンピテントセルはHanahanの方法⁵²⁾に従い調製した。ベクターにはpBluescript II KS (+)もしくはpBluescript II SK (+) (いずれもStratagene) を用いた。プラスミドDNAの調製はアルカリ/SDS法⁵³⁾で行った。大腸菌の培地はLuria-Bertani (LB)⁵⁴⁾培地を用いた。Ampを培地に添加する場合は、終濃度100 μg/mlになるように添加した。

2. オリゴヌクレオチドプローブの作製

前章に記載したイソマルトトリオデキストラナーゼの部分アミノ酸配列をもとに、4種類の合成オリゴヌクレオチドを購入した(北海道システムサイエンス)。各オリゴヌクレオチドをBoehringer Mannheim社のDIG Oligonucleotide Tailing Kitを用いて5'末端を標識し、これをサザンハイブリダイゼーションおよびスクリーニングの際にプローブとして用いた。

3. ゲノムDNAの単離

B. fuscum var. *dextranlyticum* 0407株の培養は第2章で述べた条件で行った。30℃で振盪(200 rpm、Bio-Shaker, BR-30LF型式、Taitec)し24時間経過した培養液100 mlを4℃、16,000xgで遠心分離し、菌体を回収した。ゲノムDNAをAusubel⁵³⁾らの方法に従って調製し、終濃度1 mg/mlになるようにTEに溶解後、-20℃で保存した。

4. サザンハイブリダイゼーション⁵⁴⁾

本酵素生産菌のゲノムDNA 5 μg を種々の制限酵素で完全消化し、1%アガロースゲルを用いて電気泳動した後、ナイロン膜 (Amersham)に転写した。転写後のナイロン膜をハイブリダイゼーション用緩衝液 {Rapid hyb buffer (Amersham)にポリ(A)を終濃度0.1 mg / mlになるように添加したもの} で密封し、室温で1時間放置した後、前述のDIG標識オリゴヌクレオチドをプローブとして終濃度1 pmol / mlになるように添加した。ハイブリダイゼーションは42 $^{\circ}\text{C}$ で6時間行った。ナイロン膜の洗浄は室温で行い、2 x SSC / 0.1% SDS溶液中で5分間、0.1 x SSC / 0.1% SDS溶液中で15分、それぞれ2回ずつ行った。DIG検出キット (Boehringer Mannheim)のプロトコールに従い、アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体とCSPDの反応による発光反応を用い、X線フィルムを感光させることにより陽性バンドの検出を行った。

5. 限定ゲノミックライブラリーの構築

*Bam*HI消化したゲノムDNAを1%アガロース電気泳動で分離した後、ゲルより4~5 kbの断片を抽出した。得られた断片を大腸菌プラスミドpBluescript II KS (+)の同制限酵素切断サイトに挿入した。さらに組換えプラスミド溶液を大腸菌JM109のコンピテントセルと混合し、氷中で約30分静置後42 $^{\circ}\text{C}$ で1分間処理することにより導入させた。混合液をSOC培地⁵⁴⁾に接種し、37 $^{\circ}\text{C}$ で約1時間振盪培養した後、0.1 M IPTGおよび2% X-galを各50 μl ずつ塗布したLB/Amp (直径8cm)培地上で一晩37 $^{\circ}\text{C}$ で培養した後、得られた約500個の白色コロニーを新しい培地に移し換え、37 $^{\circ}\text{C}$ で培養したものを限定ゲノミックライブラリーとして以後のスクリーニングに用いた。

6. 限定ゲノミックライブラリーのスクリーニング⁵⁴⁾

約500個の組換え大腸菌コロニーからなる*B. fuscum* var. *dextranlyticum* 0407菌株の限定ゲノミックライブラリーをナイロン膜に移し、前述したDIG標識オリゴヌクレオチドのうちの一つ (CR)をプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子を持つ陽性クローンのスクリーニングを行った。プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションおよび陽性クローンの検出は全て前述したサザンハイブリダイゼーションと同じ条件で行った。

7. 塩基配列の決定

塩基配列はSangerらのジデオキシ法⁵⁵⁾を用いて決定した。種々の制限酵素断片をpBluescript II KS (+)もしくはpBluescript II SK (+)ベクターの適当な部位に導入し、配列解析反応の鋳型に用いた。配列決定は蛍光標識されたユニバーサルプライマー (-21M13およびReverse primers, Applied Biosystems Inc.)およびThermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit (Amersham)を用いて行った。塩基配列およびアミノ酸配列の解析は、DNAid + ver.1.8およびDNASIS ver. 2.0 (Hitachi)を用いて行った。

8. 核酸電気泳動

DNAの電気泳動にはサブマリン型電気泳動槽 (Mupid-2, コスモバイオ社) を用い、0.8~1.2 %アガロースを担体とした。泳動用の緩衝液にはTAE [0.04 M Tris-acetate buffer (pH 8.0)、1 mM EDTA (pH 8.0)を含む]を用いた。DNA溶液に色素溶液 (0.25 % bromophenol blueを含む 30 % glycerol) を1/6 容加え、泳動用試料とした。ゲル中からDNA断片の回収する場合、必要な部分を切り出した後、Bandprep kit (Pharmacia Biotech) を用いて精製した。

9. DNAシーケンス用電気泳動

DNAの塩基配列決定に用いたゲルはSuper Reading DNA Sequence Solution (東洋紡) を用いて作製し、48 cm WTRプレート用Super Reading DNA Sequence Solution Gel作製のプロトコールに従って行った。電気泳動は373 S DNA Sequence System (Applied Biosystem)を用い、泳動時間16 hr、2800 V、40 mA、42 Wの条件で行った。

10. 類似配列の検索

相同性配列の検にはDDBJ Homology Search System (address, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology.html>) を用いた。解析プログラムはBlast ver. 1.4.9、データベースはPIRをそれぞれ用いた⁵⁶⁾。

11. 複数のDNA配列の比較

相同性を持つ配列の比較にはClustal W 1.5 解析ソフト (address, <http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~doi/cwww/cwww.html>) を用いた。パラメーターはすべてプログラム上の既定値で行った⁵⁷⁾。

第3節 実験結果

第1項 イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子のクローニング

1. プローブの調製

前章において報告したとおり、イソマルトトリオデキストラナーゼの部分アミノ酸配列と相同性を持つタンパク質をEMBLデータベースより検索した結果、イソマルトトリオデキストラナーゼより得られた部分配列がすべて*Arthrobacter* 属由来のエンド型デキストラナーゼの推定アミノ酸配列に見いだされた。この結果より、4種類の部分アミノ酸配列をもとにセンス側の配列で3種類(AF, BF, IT-1)、アンチセンス側で1種類のオリゴヌクレオチド (CR)を合成した (Table 3-1)。これらを用いてDIGでラベルし (probe AF, BF, CR, IT-1)、各種制限酵素で消化した*B. fuscum* var. *dextranlyticum* 0407菌株のゲノムDNAを用いたサザンハイブリダイゼーションを行った。probe AF、BF、および IT-1を用いた場合には複数の弱いシグナルが、probe CRを用いた場合において強いシングルのバンドが得られた (Figure 3-1)。このことによりprobe CRを用いることによりイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の単離が行えるものと判断し、以後の実験に用いた。

2. イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子のクローニング

probe CRを用いたサザン解析の結果、イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子は*Bam*HI消化により得られる約4.5 kbのDNA断片上に全長ないしは一部が存在することが確認された (Figure 3-2)。これより、この断片をクローニングすることを目的として、この大きさのゲノムDNAの*Bam*HI断片を大腸菌プラスミドpBluescript II KS (+)に導入後、大腸菌JM109を形質転換し、限定ゲノミックライブラリーの作製を行った。クローニングの手順をFigure 3-3に示した。スクリーニングの結果、

約500個の組換え体大腸菌のコロニーより一つの陽性クローンが得られた。

本形質転換体よりプラスミドを抽出し、pBHと命名した。pBHを種々の制限酵素により処理し、制限酵素地図を作製したところ、本組換え体は4.5 kbの *Bam*HI断片を含み、この中にサザンハイブリダイゼーションで陽性バンドとして得られた *Sa*II および *Xho*I断片（どちらも3.2 kb）が確認された。

第2項 塩基配列および推定アミノ酸配列

pBHのインサート部位の詳細な制限酵素地図をもとに配列決定用のサブクローニングを行った。得られたインサートは各種制限酵素によっていずれも約650 bp以下に消化されたため、制限酵素消化によって得られた断片の塩基配列を決定することにより、pBH中のインサート全長の解析を行った (Figure 3-4)。

クローン化したゲノムDNAは全長4,506 bpの *Bam*HI断片であり、サザンハイブリダイゼーションで確認された陽性クローンの大きさと一致した。本断片のほぼ中央に1,923 bpのオープンリーディングフレーム (ORF)が存在し (Figure 3-5)、塩基配列を解析した結果、イソマルトトリオデキストラナーゼのN末端および解析された7種類の部分アミノ酸配列はすべてこのORFがコードする推定アミノ酸配列中に見いだされた。このことより、本ORFがイソマルトトリオデキストラナーゼをコードしているものと確認した。イソマルトトリオデキストラナーゼの全DNA配列、および推定アミノ酸配列はFigure 3-6に示した。精製イソマルトトリオデキストラナーゼで解析したN末端配列は本ORFの開始コドンから38 アミノ酸残基目から始まっており、開始コドンから37 アミノ酸残基まではイソマルトトリオデキストラナーゼが菌体外に分泌される際に除かれるシグナル配列であると推定された。本遺伝子の開始コドンの7から11塩基上流には、リボゾーム結合部位と考えられている Shine-Dalgarno (SD)配列が存在していた。また、終始コドンはAmberであり、これより25から55塩基下流には、自立ターミネーションシグナルと考えられる回文 (パルンドローム) 配列が存在していた。

次にイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子におけるGC含量および使用されているコドン頻度についてまとめた (Table 3-2)。ORFにおけるGC含量は57.1%であり、これまで報告されている *Brevibacterium*属のGC含量 (60~67%)⁵⁸⁾に比べやや低めの値であったが、使用されているコドンの3塩基目に関しては、Cのみで

全体の53.2%、G+Cでは80%に達していた。

第3項 他の糖質関連酵素とのアミノ酸配列の相同性

イソマルトトリオデキストラナーゼの推定アミノ酸配列と相同性を持つ配列を検索した結果、部分アミノ酸配列の相同性検索と同じくOkusima³¹⁾らが報告した*Arthrobacter*属が菌体外に生産するエンド型のデキストラナーゼと最も高い相同性を示した (Figure 3-7)。イソマルトトリオデキストラナーゼの推定アミノ酸に対し相同性を示した部分は79%、さらに両者の成熟酵素部分で重なる (ギャップとならなかった) 範囲 (591 アミノ酸残基) の相同性は81%に達した。*Arthrobacter* 属由来のエンド型デキストラナーゼと相同性を示す糖質分解酵素はこれまで *Penicillium minioluteum* が生産するエンド型デキストラナーゼ³³⁾ と、*Aspergillus niger* が生産するイソプルラナーゼ³⁴⁾ が報告されており、さらに酵素的な諸性質は検討されていないものの、*Arthrobacter globiformis* T-3044 菌株が生産するグルコデキストラナーゼの下流に見いだされた遺伝子にコードされるエンド型デキストラナーゼ³²⁾ とも高い相同性を示した (Figure 3-8)。それぞれの配列に対するイソマルトトリオデキストラナーゼの相同性はそれぞれ33%、32%、67%であった。

第4節 考察

1. イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子のクローニング。

前章で述べたとおり、イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子が*Arthrobacter* のエンド型デキストラナーゼと高い相同性と類似していること、およびプローブとして用いたオリゴヌクレオチドをプライマーとし、イソマルトトリオデキストラナーゼ生産菌のゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った場合でも*Arthrobacter* のエンド型デキストラナーゼで予想された大きさのバンドが得られたことにより、各種オリゴヌクレオチドはイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子上においてもほぼ*Arthrobacter* のエンド型デキストラナーゼと同じ場所に位置するものと判断した。これを踏まえ、オリゴヌクレオチドプローブを用いたサザン解析により、イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子上の制限酵素サイトを調べた。サザン解析をN末

端配列を基に作製したオリゴヌクレオチドAFと、エンド型デキストラナーゼとの相
同性で最もC末端側に配列が認められたオリゴヌクレオチドCRを用いて行った場合、
*Bam*HI、*Sma*I、*Sa*II、*Xho*Iで消化した場合どちらもほぼ同サイズのバンドが認め
られた。よって、いずれの制限酵素で消化した場合においてもイソマルトトリオデ
キストラナーゼをコードするORFのほぼ全長が各種制限酵素消化で得られた陽性ク
ローンに含まれていると判断し、コロニーハイブリダイゼーションにはこれらのい
ずれかの制限酵素で消化した断片を用いることにした。

改めてプローブCRを用いたサザンハイブリダイゼーションを行った結果、
*Bam*HI消化した場合約4.5 kb、*Sma*Iで約6.5 kb、*Sa*IIと*Xho*Iで消化した場合約3.2
kbの陽性シグナルを示すバンドが得られた。陽性シグナルはいずれの制限酵素で消
化した場合においてもシングルバンドとして得られたため、本酵素をコードする
遺伝子は染色体上に1コピーだけ存在していることが示された。このことより、第
2章で精製の最終段階でイソマルトトリオデキストラナーゼの活性ピークが2つに分
かれたことは、一方が合成時に何らかの修飾を受けて生じたものと考えられる。

コロニーハイブリダイゼーションはまず*Sma*I消化で得られた約6.5 kbのゲノム
DNA断片を用いて行ったが、スクリーニングの結果1,200個のライブラリーから陽
性クローンを得ることができなかった。同様にして*Bam*HIで消化したもので約500
個の組換え大腸菌コロニーをスクリーニングした結果、一つの陽性クローンを得る
ことができた。このライブラリー作製する前の段階でIPTGおよびX-galを塗布した
プレートにおいて組換え体の選択を行ったが、6,500 bpの*Sma*I断片を2956 bpの
pBluescript II KS (+)に導入した場合、ベクターの自己連結を防ぐためにアルカリ
性フォスファターゼ処理⁵⁴⁾を行ったにも関わらず、組換え体は非常に低比率でしか
得られなかった。これに対し、4,500 bpの*Bam*HI断片を用いた場合、約1/3が組み
換え体として得られた。λファージを用いたプラークハイブリダイゼーションに比
べ、プラスミドを用いるコロニーハイブリダイゼーションでは導入できるDNA断片
の大きさが制限されることから、一種類の制限酵素で消化した断片でクローニング
を行う際には導入できる断片をなるべく小さく抑えることが必要であり、さらに切
断したベクターが自己連結 (self ligation) を起こさぬよう、2種類の切断面の異な
る制限酵素を用いたクローニングを行うことが重要である。

2. 他の多糖類分解酵素との相同性

部分アミノ酸配列の相同性から予想されたとおり、単離されたイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の配列は*Arthrobacter*属の細菌が生産するエンド型のデキストラナーゼ³¹⁾と非常に高い相同性を示した。これまで報告された3種類のエキソ型デキストラナーゼのなかで唯一他のデキストラナーゼと相同性を示したが、*Arthrobacter*属のエンド型デキストラナーゼとの相同性の高さから、この2つの配列の相異を中心に解析を行うことで、エキソ型とエンド型の分解様式の解明を進めていくことが可能であると判断された。

グルコデキストラナーゼ³²⁾はプルランを分解しグルコースを遊離するグルコアミラーゼ³⁵⁾と、イソマルトトリオデキストラナーゼはプルラン分解によりイソパノースを遊離するイソプルラナーゼ³⁴⁾と配列上の類似性を有している。また、イソマルトデキストラナーゼは他の配列と相同性を示していないが、デキストラン分解活性の1/500程度のプルラン分解活性を有しており、主にイソパノースを遊離することが報告されている。イソマルトデキストラナーゼがプルランを基質としてイソパノースを生成することは、プルランの α -1,6結合している二糖単位を認識し、その還元末端側の α -1,4結合を切断しているはずである。イソマルトトリオデキストラナーゼがプルランを切らない理由をこれに応用すると、本酵素はプルラン中のパノース単位を認識することになる。しかしパノース中には実際には α -1,4結合が存在し、これが基質認識上の問題になっている可能性がある。エキソ様式にデキストランを分解する酵素がこのようにプルラン分解酵素と相同性を示したり、それ自身がプルランを分解することができることより、デキストラナーゼの機能、特に基質認識と配列の関係を解明するためにプルラン分解酵素を取り上げるのは有用であろう。しかし、配列上の類似性があるが、イソマルトトリオデキストラナーゼはプルラン分解活性を有しておらず（データは示していない）、反対に*Aspergillus niger*由来のイソプルラナーゼはデキストラン分解能を有していない³⁴⁾。類似した配列がいかにしてデキストランとプルランを区別しているかについては、今後の研究で解明されていくことを期待する。

*Aspergillus niger*のイソプルラナーゼの配列を決定したAokiら⁵⁹⁾はイソプルラナーゼの配列と*Arthrobacter*³¹⁾、および*Penicillium minioluteum*が生産するエンド型デキストラナーゼ³³⁾の一次配列を比較、検討し、これらの配列には7カ所の保存領

域が存在すると指摘した。さらにそのひとつ (region III)が疎水性アミノ酸から構成されており、イソプルラーナーゼの立体構造において、疎水的なコアを形成していると報告している。この保存領域はイソマルトトリオデキストラナーゼでも認められており (Figure 3-9)、デキストランもしくはプルランのような α -1, 6結合を認識するような配列が存在する可能性がある。また、高橋ら⁶⁰⁾が精製イソマルトトリオデキストラナーゼの活性解離基を解離基のpKe値、解離熱、電導率変化によるpKe値の変化から解離基1がカルボキシル基と推定している。ただし解離基2を推定することはできなかった。Figure 3-9で示した保存領域の内、II, IV, V, VIの各領域ですべての酵素で保存されているカルボキシル基を持つアミノ酸 [アスパラギン酸 (D) もしくはグルタミン酸 (E)] が存在しており、デキストラン、もしくはプルランの分解に関与していることが考えられる。これについては化学修飾による速度論的解析、親和標識試薬の合成とそれを作用させた場合の結合アミノ酸の同定その他、大腸菌での発現系を確立した後部分変異等による活性の変化などから推定することが可能であろう。

3. デキストラン代謝に関わる遺伝子群の存在

今回得られたfragment BHにおいて、*imtd*の3'末端側下流に独自のプロモーターを有したORF (*trpA*)が存在した (Figure 3-10)。本遺伝子の推定アミノ酸配列 (TrpA)は*Arthrobacter nicotinovorans*のトランスポサーゼ (トランスポゾンが転移する際のDNA組み換え反応を触媒する酵素)⁶¹⁾と高い相同性 (65 %) および類似性 (70 %) を示したが (Figure 3-11)、特にデキストランの代謝に関与しているとは考えにくい。一方イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の開始コドンから96塩基上流より*Bacillus thermoglucosidasius*が生産するオリゴ1, 6-グルコシダーゼ⁶²⁾と高い相同性 (53 %) を示すORF (*dexA*)が存在することが確認された (Figure 3-11)。相同性が確認されたオリゴ1, 6-グルコシダーゼはイソマルトース、イソマルトトリオースなどの比較的短いイソマルトオリゴ糖に作用し、グルコースを遊離するほか、pNPG分解活性を示すことが報告されているが⁶²⁾、*dexA*の発現産物が同様の作用を有している場合、*dexA*とイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子は同じプロモーターで発現している (ポリシストロニックに転写される) 遺伝子であり、デキストラン代謝におけるオペロンを形成していることが予想された。本菌におい

では *imtd* 上流にはイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の発現に関わるようなプロモーター領域と考えられる配列は見いだされなかったことから、この2つの遺伝子がポリシストロニックな発現をしていることを裏付けている。さらに本酵素生産菌である *B. fuscum* var. *dextranlyticum* をデキストラン存在下で培養し、菌体を超音波破碎した後遠心分離して得られた無細胞抽出液を用いて α -グルコシダーゼ活性を測定したところ、イソマルトース、イソマルトトリオースおよび pNPG の分解活性が認められた（データは示していない）。このことより、本菌中に α -グルコシダーゼが作られ、デキストラン分解産物であるイソマルトトリオースが菌体内に運ばれ、代謝を受けていることが推測された。このことは菌体の外でイソマルトトリオデキストラナーゼの作用により生産されたイソマルトトリオースを菌体膜を通して菌体内に輸送する経路が存在することも同時に暗示している。これらについては、イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子上流域のクローニングと構造解析を行った第5章、さらに菌体内の α -グルコシダーゼについて検討した第6章において詳しく報告する。

Table 3-1. Oligonucleotide sequences used for *imtd* cloning.

name	Peptide sequence	Synthesized oligonucleotide ¹⁾	Sequence information
AF	NPTKPVEDA	AAAYCCIAAARCCIGTIGARGAYGC	26mer, inosine:4, mixture:8
BF	HDNQAQYKV	CAYGAYAAAYCARGCICARTAYAAARGT	26mer, inosine:1, mixture:128
CR	EGMTNCAM	CATIGCRCARTTIGTCATICCYTC	24mer, inosine:3, mixture:8
IT-1	EQYVYEADT	GARCARTAYGTTAYGARGCIGAYAC	26mer, inosine:2, mixture:64

1) Each nucleotide base is described in one letter notation. A, adenine; C, cytosine; G, guanine; T, Thymine; I, inosine; Y, C or T; R, A or G.

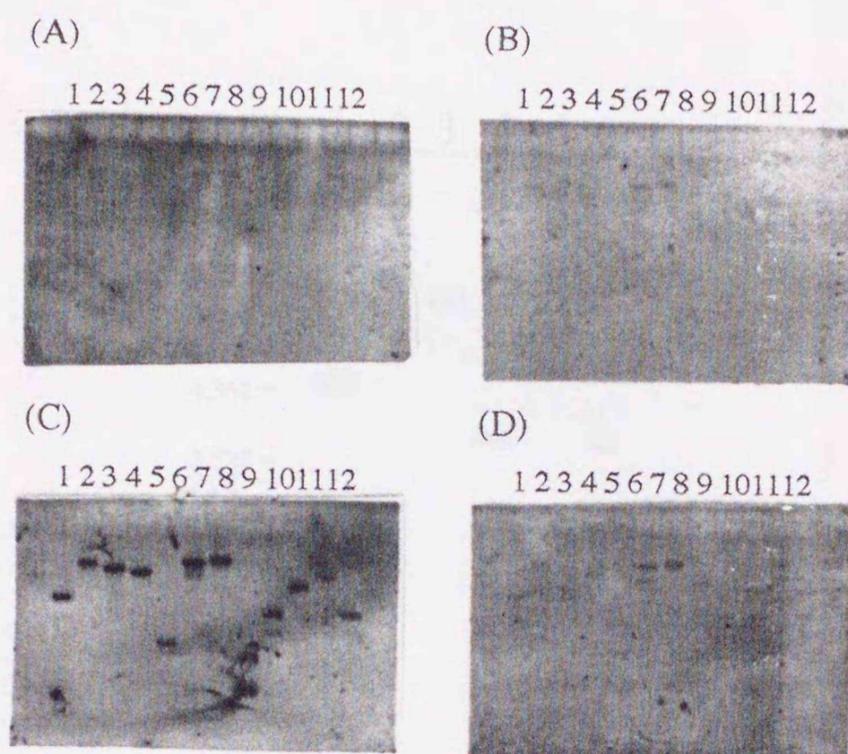


Figure 3-1. Southern blot analysis of genomic DNA fragments from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* using various probes.

Genomic DNA (5 μ g) was digested with *Bam*HI (lane 1), *Bgl*III (lane 2), *Eco*RI (lane 3), *Eco*RV (lane 4), *Hinc*II (lane 5), *Hind*III (lane 6), *Pst*I (lane 7), *Pvu*II (lane 8), *Sal*I (lane 9), *Sma*I (lane 10), *Xba*I (lane 11), *Xho*I (lane 12), and then fractionated on a 0.8% agarose gel.

The separated DNA fragments were transferred to nylon membranes and probed with four kinds of DIG-labeled oligonucleotide.

(A), probe AF; (B) probe BF; (C), probe CR; (D), probe IT-I.

Each X-ray film was exposed for 8 hr at room temperature.

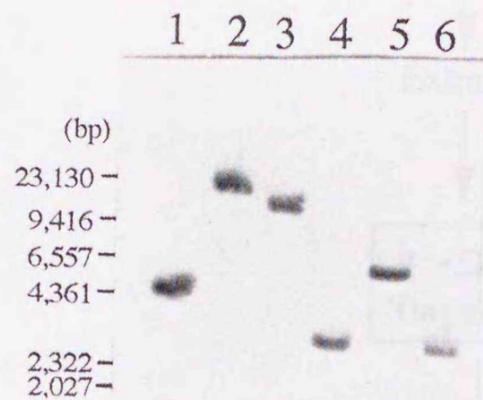


Figure 3-2. Southern blot analysis of *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* genomic DNA using the CR probe.

Genomic DNA (5 μ g) was digested with *Bam*HI (lane 1), *Eco*RI (lane 2), *Eco*RV (lane 3), *Sal*I (lane 4), *Sma*I (lane 5), *Xho*I (lane 6), and then fractionated on a 0.8% agarose gel.

The DNA fragments were transferred to a nylon membrane and probed with DIG-labeled oligonucleotide CR.

An X-ray film was exposed for 5h at room temperature.

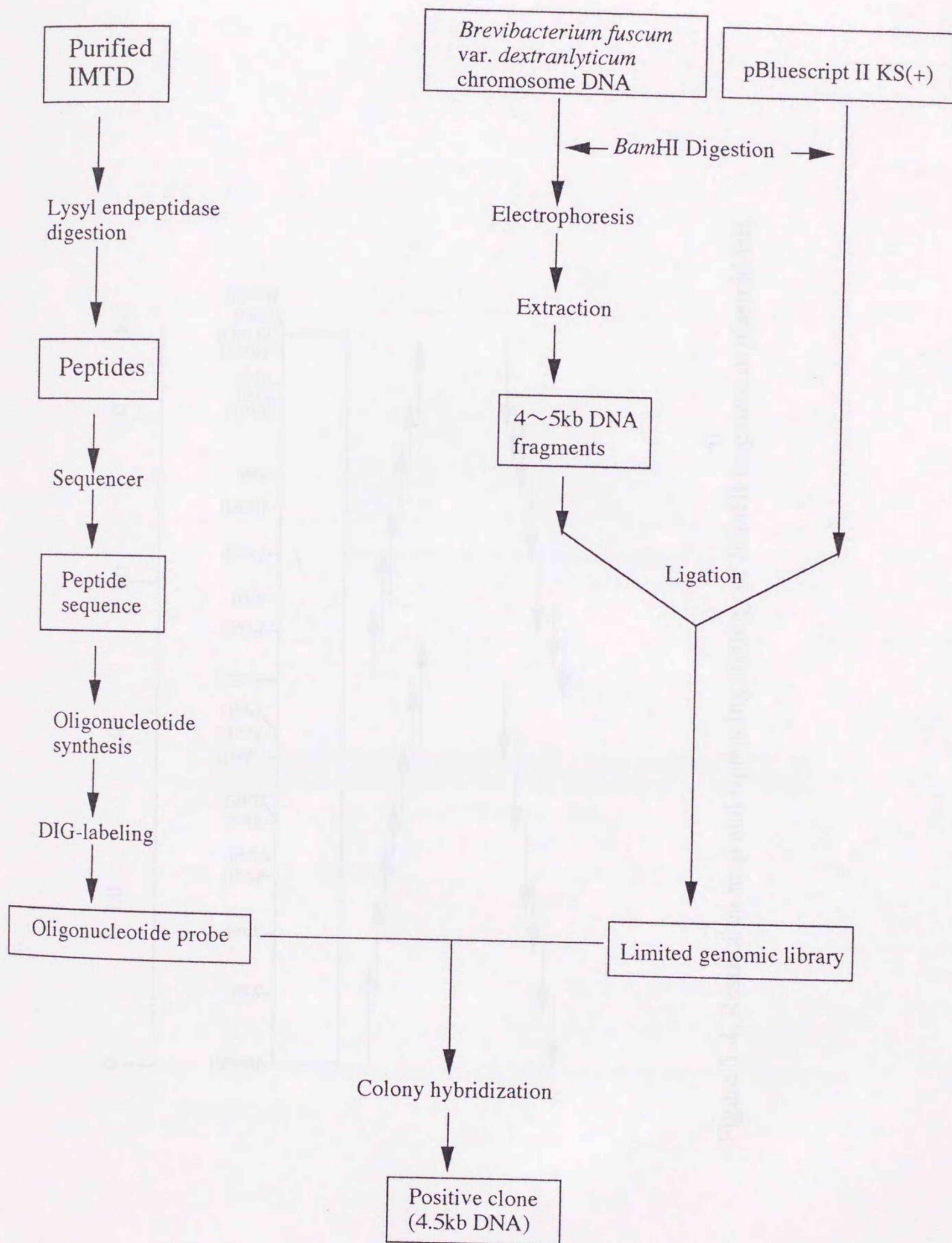


Figure 3-3. Schematic outline of the cloning procedure.
 Details are described in Materials and Methods.

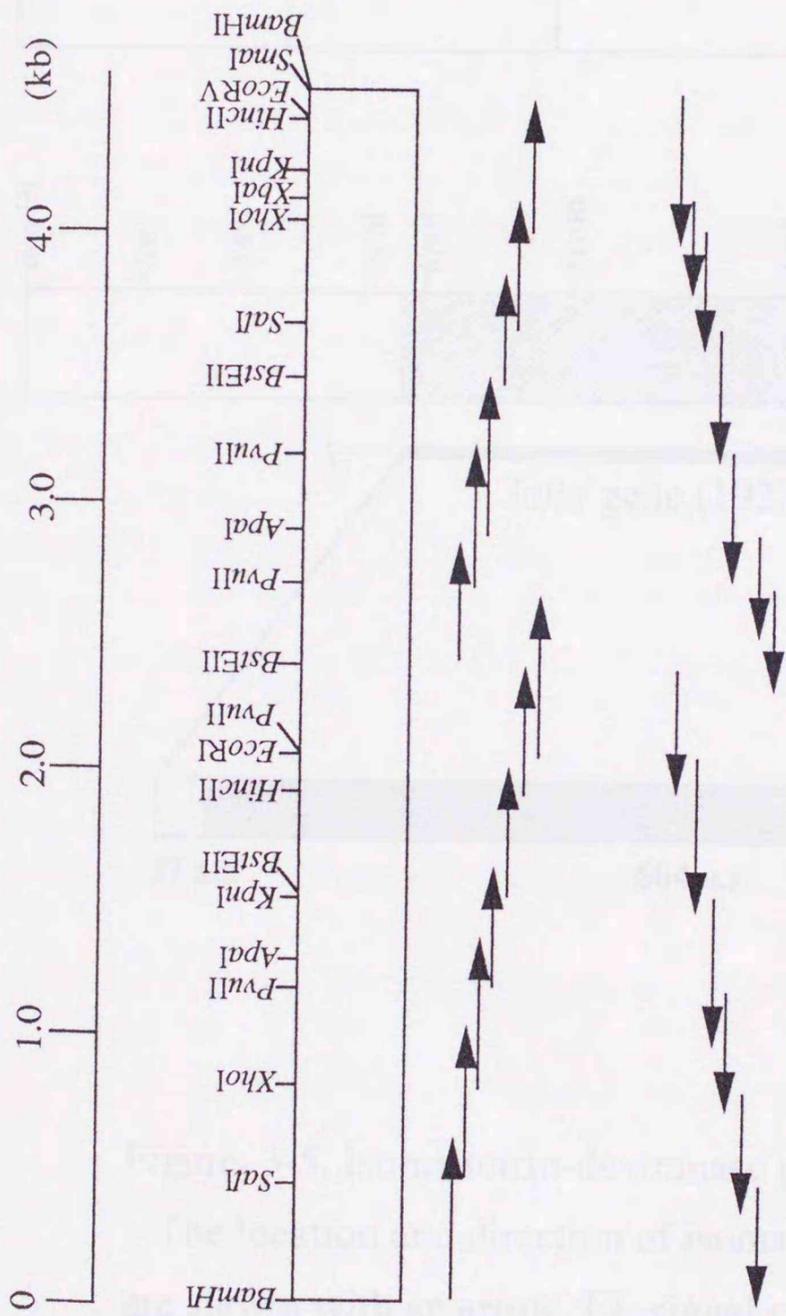


Figure 3-4. Restriction map and sequencing strategy of *Bam*HI fragment in plasmid BH.

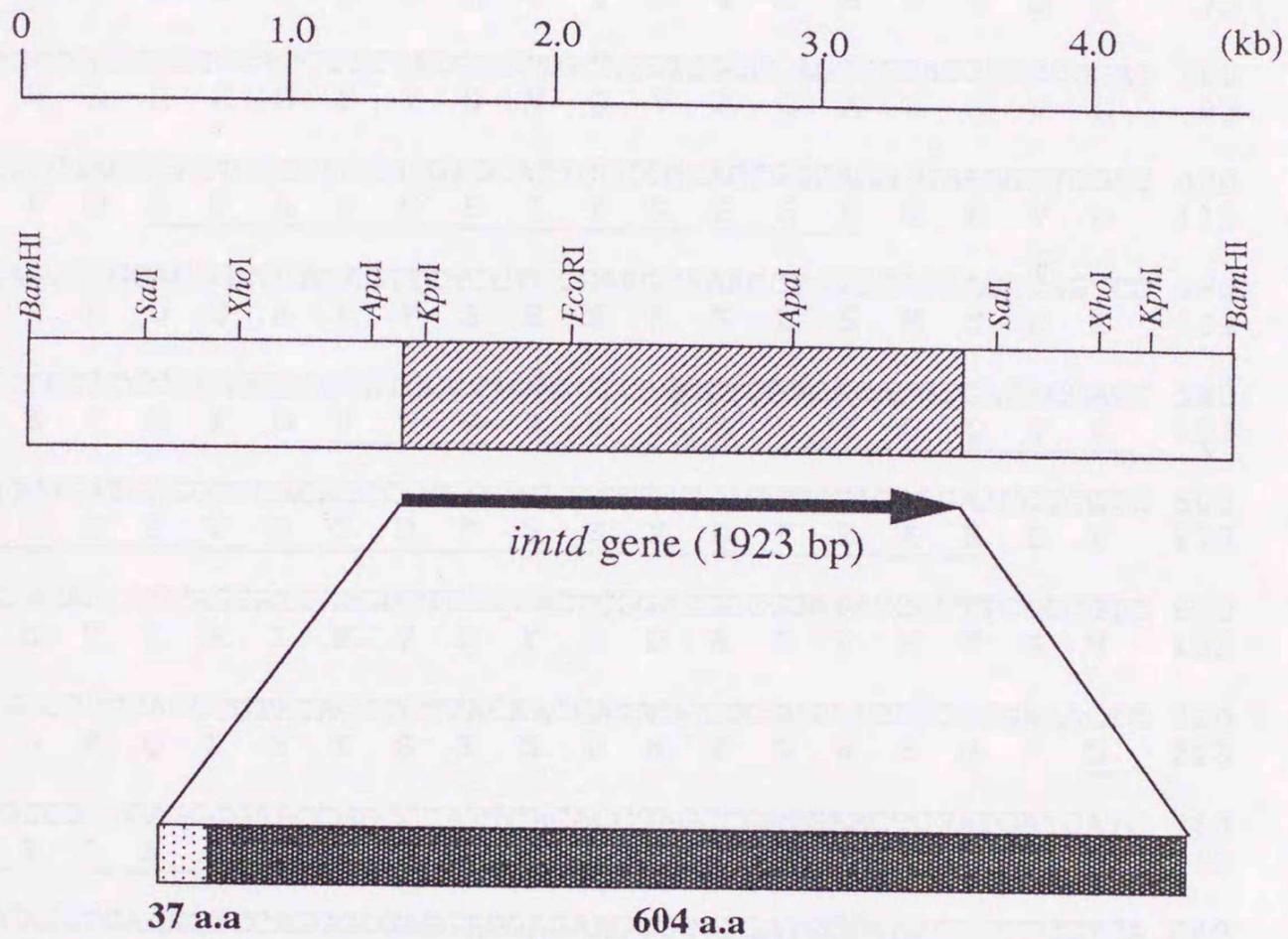


Figure. 3-5. Isomaltotrio-dextranase gene in plasmid BH.

The location and direction of isomaltotrio-dextranase gene are shown with an arrow. ▨, signal sequence region; ▩, mature protein region.

Apal

GGGCCCTCCCGGCGCACCCACACAAGGAAGTGTGCGGCCACCCACGGAGCCGTCTCA 60
CGCAACGAGAGAGGAACCCATCATGCCCACTACAGGGCTGAGGCAACTTGCACGAACCATC 120
M P T T G L R Q L A R T I 13

ACCATCGCCGTCGCGGCCACGCTGATTGGTACCGGTGCCGCAATACCGGCACAAGCCGGC 180
T I A V A A T L I G T G A A I P A Q A G 33

CCCGACCGGAAAAATCCCACCAAACCTGTTGAAGACGCCCCGGTCACCGCGGACGTTGGA 240
P D R K ↑ N P T K P V E D A P V T A D V G 53

AACCTGCACACCTGGTGGCAGACAACGCTGTTTACAACACTGACTCGCCACCGAGAAC 300
N L H T W W H D N A V Y N T D S P T E N 73

GGTGAAGTCCGCGCTCCTCCTTCTACGACGTGCAGGTGCGGCAGGCGCACCAACCGGAC 360
G E V R R S S F Y D V Q V A Q A H Q P D 93

AAGTTCTTCGACTCATTTCGCCTACATGAGCATTCCCCGCAGCGGCAAAGGAAAGGTCGGC 420
K F F D S F A Y M S I P R S G K G K V G 113

TACACCAAGGAGGACGGCGCAGAGTTCTCCTCCGAAGCAAACCTCTCGATGAGCTGGTCC 480
Y T K E D G A E F S S E A N L S M S W S 133

AGCTTCGAGTACGCGAAGGACGTGTGGGTTGACGTCAGCCTGAAGACAGGGCAGACCATC 540
S F E Y A K D V W V D V S L K T G Q T I 153

AGCTCAGCGGATGAGGTTTCAGATCCGTCCCAGCAGTTATGACTTCGAGAAGAAGCTCGTC 600
S S A D E V Q I R P S S Y D F E K K L V 173

GATGAGGACACCATCAGGATCAAGGTTCCCTACTCGGACGCCGGATACCGTTTCTCCGTC 660
D E D T I R I K V P Y S D A G Y R F S V 193

GAATTCGACCCCCAGCTGTATACGTCTTACAACGATATGTCCGGTAACAGCGGGAAACTC 720
E F D P Q L Y T S Y N D M S G N S G K L 213

ACCACTGTCGCTGAGGGGAACCGGCCTATTACACCGAGCCGATGAACTCGATGATGATC 780
T T V A E G N R P I H T E P M N S M M I 233

TTCGCCGAGCCGAAGCTCCAGGGCGAAGAGGAGAAGCGCCTGATCCCGAACCCTCGTCA 840
F A E P K L Q G E E E K R L I P N P S S 253

GGCAGCATCCACTACCCCGAAGAAGGGGAAGTGAAGGACCTCAACACCGTCACCGAAGAG 900
G S I H Y P E E G E V K D L N T V T E E 273

ATCATTACTTCAAGCCCGGCACCTACCACATGGGCTCGGACTATCATGCGGTACTTCCG 960
I I Y F K P G T Y H M G S D Y H A V L P 293

CCCAACGTGAAGTGGGTCTACCTTGCCTGGCGCGTACGTGAAGGGCGCGTTCCGCTTC 1020
P N V K W V Y L A P G A Y V K G A F R F 313

TTCCACGACAACCAGGCACAGTACAAGGTGACCGGCTACGGGGTGCTCTCCGGCGAGCAG 1080
F H D N Q A Q Y K V T G Y G V L S G E Q 333

TACGTCTACGAGGCGGACACCGCCAACAATTATAATGCCCTCAGCGGAGCCTCAAACCTGC 1140
Y V Y E A D T A N N Y N A L S G A S N C 353

CACGTCACCTGCGTGAAAATGCTTCAGTTCGAATCCTCTAACATCGGACAGCAGCTCGAC 1200
H V T C V K M L Q F E S S N I G Q Q L D 373

CTGCAAGGCGTCACCATCAACGAACCGCCCTACCACTCCTTCGTCGTCTACGCCACGAA 1260
L Q G V T I N E P P Y H S F V V Y A H E 393

GGCGAAAAGAGATAGGCGTGGAGAACTTCCGCATGAACGTGGAGAACTACAAGCAGGTC 1320
G E K E I G V E N F R M N V E N Y K Q V 413

GGCAGCTGGTACTGGCAGACAGACGGCATCGAGCTCTACCAGGGCGGCACCATGAAGAAC 1380
G S W Y W Q T D G I E L Y Q G G T M K N 433
ACGTTCTTCAACGCGAACGACGATGTGCTGAAGATGTACCACAGCGACGTCACCATCGAT 1440
T F F N A N D D V L K M Y H S D V T I D 453
AACACGGTAATTTGGAAAAACGAGAACGGGCCCCGTCATCCAATGGGGATGGACACCGCGG 1500
N T V I W K N E N G P V I Q W G W T P R 473
AACATCGACAACGTGAACGTCACCGACACAACCGTCATCCACAACCGCATGTACTGGAAA 1560
N I D N V N V T D T T V I H N R M Y W K 493
GACCCCAAGTACAACACCTGCATCCTCAACTCGTCATCGCACTGGGAAGACATGGGTTC 1620
D P K Y N T C I L N S S S H W E D M G S 513
ACTGCCAAGGCGGACCCGAACACAACGTGAAGAACATGCGATTCGAAAACATCACTGTC 1680
T A K A D P N T T V K N M R F E N I T V 533
GAAGGCATGACCAACTGCGCAATGCGGATCTATGCCCTGTCCAACACTGAGAACATTCAC 1740
E G M T N C A M R I Y A L S N T E N I H 553
GTCAAGAACCTCAGCATCGACAGCTGGAATGGCTTGGACTGGACTTCACAGGTCAGCCAC 1800
V K N L S I D S W N G L D W T S Q V S H 573
CTCAAGCGGTACACCAACTCCGCAGGCGAAAAAGTCACCATCGGCAATGAGATCCCCGAC 1860
L K R Y T N S A G E K V T I G N E I P D 593
GGTAACGGCCTCGCCCTCGAAAACACTCGGTCGGAGGCGAAATAATCGAGAAATCCGGC 1920
G N G L A L E N Y S V G G E I I E K S G 613
GACAACTGGAACGACTACAAGCTCGGACGCCTCGGATTCGACGGCGAGAACTGGGACAGC 1980
D N W N D Y K L G R L G F D G E N W D S 633
TGGAACGCCTGGAAATCCACACCCTAGGTAACCGGAACTCGTCAGCGGCGT **GGTGGGCAG** 2040
W N A W K S T P 641
AGGCACACA **ECCTCTGCCACCC** GGCTTATGCACTACGAAAAATCTCCAACCTGAACCACC 2100
GAATCTTGCCACATCAGGAGCACCGATTGATGTCACCCTCATGTTTCGAGCTCGATGACCT 2160
CCCCTTCGAAGCGTCCGCACGGCGAAAACAGAATGAACGCCTGCATCGGCATCGACGTCG 2220
GTGGAACGGGTATAAAGGGCGGAATA **GTCGAC** 2252
Sali

Figure 3-6. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the isomaltotrio-dextranase gene.

The deduced amino acid sequence of isomaltotrio-dextranase gene is described below the nucleotide sequence in one letter notation. The putative ribosome-binding site is double underlined. The palindrome sequence of putative terminator is represented by reversal letters. The amino acid sequences underlined are peptides that were determined with a protein sequencer. The arrow indicates the site cleaved by the signal peptidase in *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* .

Table 3-2. Codon usage of the isomaltotrio-dextranase gene from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum*

codon	count	%	codon	count	%	codon	count	%	codon	count	%
Phe TTT	0	0.0	Leu CTT	4	13.3	Ile ATT	6	18.2	Val GTT	6	12.8
Phe TTC	21	100.0	Leu CTC	16	53.3	Ile ATC	24	72.7	Val GTC	26	55.3
Leu TTA	0	0.0	Leu CTA	0	0.0	Ile ATA	3	9.1	Val GTA	2	4.3
Leu TTG	1	3.3	Leu CTG	9	30.0	Met ATG	17	-----	Val GTG	13	27.7
Ser TCT	2	2.0	Pro CCT	3	10.0	Thr ACT	8	17.4	Ala GCT	2	5.1
Ser TCC	15	30.6	Pro CCC	17	56.7	Thr ACC	27	58.7	Ala GCC	16	41.0
Ser TCA	6	12.2	Pro CCA	0	0.0	Thr ACA	7	15.2	Ala GCA	8	20.5
Ser TCG	9	18.4	Pro CCG	10	33.3	Thr ACG	4	8.7	Ala GCG	13	33.3
Tyr TAT	5	15.2	His CAT	1	6.3	Asn AAT	5	9.8	Asp GAT	5	8.0
Tyr TAC	28	84.8	His CAC	15	93.8	Asn AAC	46	90.2	Asp GAC	35	92.0
Och TAA	0	-----	Gln CAA	5	23.8	Lys AAA	11	31.4	Glu GAA	19	44.2
Amb TAG	0	-----	Gln CAG	16	76.2	Lys AAG	24	68.6	Glu GAG	24	55.8
Cys TGT	0	0.0	Arg CGT	2	10.5	Ser AGT	1	2.0	Gly GGT	6	12.2
Cys TGC	4	100.0	Arg CGC	8	42.1	Ser AGC	16	32.7	Gly GGC	27	55.1
Opa TGA	0	-----	Arg CGA	2	10.5	Arg AGA	0	0.0	Gly GGA	9	18.4
Trp TGG	18	-----	Arg CGG	5	26.3	Arg AGG	2	10.5	Gly GGG	7	14.3

[%; codon usage / each amino acid(%)]

IMTD	1	MPTTGLRQLARTITIAVAATLIGTGAAI PAQAG--PDRKNP-----TKPVE
Arthro.endo	1	MPGTGLGRLAKRMTAAAVFFISISAVLPAQAATAPAAAPP GVPAALKA E
IMTD	45	DAPVTADVGNLHTWWHDNAVYNTDSPTENGEVRRSSFYDVQVAQA HOPDK
Arthro.endo	51	RAITTVDNGNLHTWWHDNGVVFSPATPTQSS EVRRSSFYDVQVAQA NOPQK
IMTD	95	FFDSFAYMSIPRSGKGVGYTKEDGAEFSS EANLSMSWSSFYAKDVVW D
Arthro.endo	101	LYDAFSYMSIPRSGKGI GYTEEDGAEFSS DARLMSWSSFYAKDVVW E
IMTD	145	VSLKTGQTISSADEVOIRPSSYDFEKKLVDEDTIRIKVPYSDAGYRFSVE
Arthro.endo	151	VSLRTGQTISSADQVOIRPSSYDFEKKLVDA DTIRIKVPYSDAGYRFSVE
IMTD	195	FDPOLYTSYNDMSGNSGKLTTEAEGNRPIHTEP MNSMMIFAEPKLRGEE
Arthro.endo	201	FEPOLYTA YNDMSGDSGKLTTEAAGNRPIHTEP RNSMMVFAEPKLRGEOK
IMTD	245	KRLIPNPSGSGSIHYPEEGEVKDLNVTTEEIIYFKPGTYHMGSDYHAVLPP
Arthro.endo	251	ERLVPTEESGSGSIHYPEEGEVRLNLSVSEEIIYFRPGTYSMGPDYHAVLPA
IMTD	295	NVKWVYLAPGAYVKGAFRF FHDNOAQYKVTGYGVLSGEQYVYEADT ANNY
Arthro.endo	301	NVKWVYLAPGAYVKGAFRF LHDTSQYKVTGYGVLSGEQYVYEADT NNSY
IMTD	345	NALSGASNCHVTCVKMLQFESSNIGQQLDLQGV TINEPPYHSFVVY AHEG
Arthro.endo	351	HHLSGASNCHSSCVKMLQFASADAEQKLDLQGV TAEPPYHSFVVY GNE-
IMTD	395	EKEIGVENFRMNVENYKQVGSWYWQTDGIELY QGGTMKNTFFNANDDLK
Arthro.endo	399	-----QT FHMNVENYKQVGSWYWQTDGIELY KGS TMKNTFFNANDDLK
IMTD	445	MYHSDVTIDNTVIWKNENGPVIQWGWTPRNI DNVNV TD TTVIHNRMYWKD
Arthro.endo	444	MYHSDVTIDNTVIWKNENGPVIQWGWTPRNI DNVNV AN TTVIHNRMYWKD
IMTD	495	PKYNTCILNSSSHWEDMGST AKADPNTTVKNMRFEN ITVEGMTNCA MRIY
Arthro.endo	494	VKYNTCIFNSSSHWEDMGST TKADPNTTVKNMRFEN TA VEGMTNCA IRVY
IMTD	545	ALSNTENIHVKNLSIDSWNGLDWTSQVSHLKRYTNSAGEKVTIGNE IPDG
Arthro.endo	544	ALSDTENIHIKNFNIGAWNGLEWTSQVSHLKRYTNSAGEKVTIGNE VPDG
IMTD	595	NGLALENYSVGG EII EKSGDNWNY KLGRLGFDGENW DS WNAWKS TP
Arthro.endo	594	NGLALENYSVGG QVIEK TGGNSS DY QLGRLGFDGENW EN WNAWKS AP

Figure 3-7. Multiple alignment of isomaltotrio-dextranase and endo-dextranase from *Arthrobacter* sp.

The identical amino acid residues in each column are represented by white letters in blue
 IMTD, isomaltotrio-dextranase; Arthro. endo, endo-dextranase from *Arthrobacter* sp.³¹⁾

IMTD	1	MPTTGLRQLARTITIAV	AATLIGTGAAI	PAQAG-----	PDRKNPTKPVE
Arthro	1	MPGTGLGRLAKRMTAAA	AVFFISTSAVL	PAQAATAPAAAP	PGVPAALKAE
Arthro2	1	-----MKHYLRLLASAF	ALLLL-----	LPAAGQ-----	EPAAATE
Penicillium	1	-----MATMLKLLALTL	AISESAIGAVM	HPPGN-----	SHPGTHMG
Isopullulanase	1	-----MRSTGYLLTL	SA	AFOVA-----	-----
IMTD	45	DAPVTADVGNLHTWWH	DNAVYNTD	SPTENGE	VRRSSFYDVQVAQA
Arthro	51	RAITVDNGNLHTWWH	DNGVFS	PATPTQSSE	VRRSSFYDVQVAQANQPQ-
Arthro2	31	QIASPPQDTE	LRTWWHNNY	EYNATSPTQNG	NVRSSFYEVQVATAAAPE-
Penicillium	37	TTNNTHCGADFC	TWWHDSGEI	NTQTPVQPG	NVRQSHKYSVOVSLAGTNN-
Isopullulanase	18	QAAVTANNSQLL	TWWHNTGEI	NYQTPVADGN	VRSGLYSVKVQTPPASS
IMTD	94	KFFDSFAYMSIPRS	GKGVGY-----	-----	TKE DGAEFSSEANLSMS
Arthro	100	KLYDAFSYMSIPRS	GKGVGY-----	-----	TEE DGAEFSSDARLIMS
Arthro2	80	TRYDSFAYMSIPRS	GKGVGY-----	-----	TEP DGAEFSSSANLSMS
Penicillium	85	-FHDSFVYESIPRN	GNRIYAPT	PPNSNTLD	SSVD DGISIEPSIGLMA
Isopullulanase	68	LYYDSFVYLAIP	---GNG-----	-----	MS DQLOYTOGYNOTQA
IMTD	132	WSSFYAKDVWVDVSLKT	GOTISSADE	VQIRPSSYD	FEKKLVDEDTIRIK
Arthro	138	WSSFYAKDVWVEVSLRT	GOTISSADQ	VQIRPSSYN	FEKQLVDADTVRIK
Arthro2	118	WSSFYSTAVWVDVSLKT	GOTITSDVQ	VSIRPSKYT	FEKHLVDANTVRIK
Penicillium	135	WSQFEYSHD	VVKILATD	GSSLSG	PSD VVIRPVSISY
Isopullulanase	99	WTSFLYSHDAT	VKIS-RNGS--	SANSN	VVIRPVSISY
IMTD	182	VPYS DAGYRFSVEF	DPQLYT	SYNDMSGNSGK	LTVAEG-NRPIHT EPMNS
Arthro	188	VPYS DAGYRFSVEF	EPQLYT	AYNDMSGDSGK	LTTEAAG-NRPIHT EPRNS
Arthro2	168	VPYS LSGYRFSVEF	EPQNF	TAYNDMSGTAGV	LTETGGGDHRAIHT EPRNS
Penicillium	185	VPADANGRKFSVEF	KTDLYT	FLSDGNE----	YVTSGGS---VVGVEPTNA
Isopullulanase	145	VPYS PTGYRFSVEF	D-----	DDLIS---	LAPSGAR-----OPENA
IMTD	231	MMIFAEPKLOGEEKRLI	PNPSSGS	SIHYPEE	GEVKDLNTVTEEII YFKPG
Arthro	237	MMVFAEPKLRGEQKERLV	PTEESGS	SIHYPEE	GEVRNLNSVSEEII YFRPG
Arthro2	218	MMIFAEPKLRGEQKERLV	PTEESGS	SIHYPEE	GEVRNLNSVSEEII YFRPG
Penicillium	228	LVIFASPF	PSG----	MI PHMT	PDNTQTMTP GPINNGDWGAKSIL YFPFG
Isopullulanase	177	LLIFASPF	FENSSTK----	POPGSPNSIA	PAPGRVGLNTTSASTVVF NPG
IMTD	281	TYHMG-----	SDY HAVL	PPNVK	VVYLAPGAYVKGA FRFFHDNQAQ
Arthro	287	TYSMG-----	PDY HAVL	PANVK	VVYLAPGAYVKGA FRFLHDTQSQ
Arthro2	268	TYYMG-----	SGHRAT	MPP NYKWI	VVYLAPGAYVKGA FYFPSSTQGV
Penicillium	274	VYWMNQDQSGNSGK	LGSN HIRL	NSNTY	VVYLAPGAYVKGA IEYFT--KQN
Isopullulanase	223	VY YFT-----	GHD HML	VSSSVT	VVYFAPGAYVKGA VEFLS-TASE
IMTD	321	YKVTGYGVLSG	EQYVY EAD	TANNYNALS	GASNCHVTCVK MLQFESSNIG Q
Arthro	327	YKVTGYGVLSG	EQYVY EAD	TNNSYHLS	GASNCHSSCVK MLQFASADAE Q
Arthro2	308	YKVTGRGVLSG	EQYVY EAD	TTTSGYPH	STGANCHNTCVK MLEFSSSTMQ Q
Penicillium	322	FYATGHGILSGE	NYVYQAN	AGDNYIAV	KSDS----TSLR MWWHNNLGGG Q
Isopullulanase	262	VKASGHGVLSG	EQYVY WYAD	PDEGYOKAS	GANNNG---LRMWRGTLGNSS Q
IMTD	371	QLDLQGV	TINEPPYHS	FVVYAHEGE	KEIGVENFRMN VEN-YKQVGSWYWO
Arthro	377	KLDLQGV	TVAEPPYHS	FVVY GNE-----	QTFHMN VEN-YKQVGSWYWO
Arthro2	358	YLDVEGIT	ISEPPYHS	FVIY GPQ-----	NAYDMEMR VDANYKQVGSWYWO
Penicillium	368	TWYCVGPT	INAPPFNT	MDFN GNS-----	G- ISSQISD- YKQVGAFFFO
Isopullulanase	309	TFVLNGV	TVSAPPFNS	MDWS GNS-----	LDLITCR VDD- YKQVGAFFYO
IMTD	420	TDGIELYQGG	TMKNT F	FNANDD	VLKMYHS DVTIDNTVIWK NENGPVIOGW
Arthro	419	TDGIELYK	GSTMKNT F	FNANDD	VLKMYHS DVTIDNTVIWK NENGPVIOGW
Arthro2	403	TDGMELYK	GGRMNNT F	FHSNDD	VLKLYHS NVTVDNTVIWK NENGPVIOGW
Penicillium	409	TDGPEIY	PNSVVHDV	FWHVND	DAIKIYYS GASVSRATIWK CHNDPIIOGW
Isopullulanase	352	TDGLEMY	PGTILQDV	FYHTDD	DGLKMYYS NVTARNI VMWKE

IMTD	470	WTPRNI	DNV	NVTDTT	VIH	NRMYWKDPKY	NTC	ILNS	SS---	HWEDMG	ST--		
Arthro	469	WTPRNI	DNV	NVANTT	VIH	NRMYWKDVKY	NTC	IFNS	SS---	HWEDMG	ST--		
Arthro2	453	WAPHNI	DNV	VVTNTD	VIH	NRMYWKDVKY	NTC	IINS	SS---	HYANMG	SS--		
Penicillium	459	WTSRDI	SGVT	IDTLN	VIH	TRYIKSETV	VPSA	IIGAS	P---	FYASGM	SP--		
Isopullulanase	402	WTPRNT	ENVL	FDNVD	VIH	--QAYANAGN	NPGI	FGAVNN	LYAPDGL	SSNH			
IMTD	515	AKADPNT	IVKN	MRFENI	TV	EGMTNCA	MRIYALS	NTENI	HVKNLSI	-DSWN			
Arthro	514	TKADPNT	IVKN	MRFENT	AVE	EGMTNCAI	RVYALS	SDTENI	HIKNFNI	-GAWN			
Arthro2	498	TTADTAK	TISN	FRLENIT	VE	EGMTNCAV	RIYALS	NTENI	HIKNLNI	-GGWN			
Penicillium	504	DS---	RKSI	S-MTVS	NV	CEGLCPSLF	RITPL	QNYKN	FVVKNV	AFPDGLQ			
Isopullulanase	450	STGNSNM	TVRN	ITWSN	FR	EGSSSALF	RINPI	QNL	DNISIK	NVSI-ESFE			
IMTD	564	GLDWT	SQV	SHLKRY	TNS	SAGEKVT	IGNEIP	DGNGL	AL	ENYS	VGGEI	IEKSG	
Arthro	563	GLEWT	SQV	SHLKRY	TNS	SAGEKVT	IGNEVP	DGNGL	AL	ENYS	VGGQVI	IEKTG	
Arthro2	547	GLDYG	SQV	SHLKRY	SDT	ANNKV	WLGNETI	DSRGI	KL	ENY	T	VGGVKI	DKTT
Penicillium	550	TNSIG	TGE	SI	IPAAS	G	LTMG-----	LNIS	N	WT	VGG	QVTMEN	
Isopullulanase	499	PLSIN	TTE	SWMP	VWYDL	NNG---	LQITVT	D---	FSI	EGFT	VGNTT	ITAS-	
IMTD	614	DNW	NDYK	LGRL-	G	FDGEN	WDS	NAWK	STP				
Arthro	613	GNSS	DYQL	LGRL-	G	FDGEN	WEN	NAWK	SAP				
Arthro2	597	TNWN	DTQL	LGRL-	G	FDPEN	WDT	NAW	----				
Penicillium	586	--FQ	ANS	LGQF-	N	DGSY	WGE	WQIS	----				
Isopullulanase	541	---NA	ASV	GRID	G	VD	PAYAG	SVHY	ID---				

Figure 3-8. Multiple alignment among several dextran degradation enzymes and isopullulanase.

The identical amino acid residues in each column are represented by white letters in blue. IMTD, *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum*. isomaltotrio-dextranase; Arthro, *Arthrobacter* sp. endo-dextranase³¹⁾; Arthro2, *Arthrobacter globiformis* T-3044 endo-dextranase³²⁾; Penicillium, *Penicillium minioluteum* endo-dextranase³³⁾; Isopullulanase, *Aspergillus niger* isopullulanase³⁴⁾.

IMTD	1	MPTTGLRQLARTITIAVAATLIGTGAAIPAQAG-----PDRKNPTKPV
Arthro	1	MPGTGLGRLAKRMTAAAAVFFISTSAVLPAQAATAPAAAPPVPAALKAE
Arthro2	1	-----MKHYLRLLASAFALLL-----LPAAGQ-----EPAAATE
Penicillium	1	-----MATMLKLLALTLAISESAIGAVMHPPGN-----SHPGTHMG
Isopullulanase	1	-----MRSTGYLLTLSAAFQVA-----
I		
IMTD	45	DAPVTADVGNLHTWWHDNAVYNTDSPTENGEVRRSSFYDVQVAQAHQPD-
Arthro	51	RAITIVDNGNLHTWWHDNGVFSPATPTQSSEVRRSSFYDVQVAQANQPQ-
Arthro2	31	QIASPPQDTELRITWWHNNYEYNATSPQTQGNVRRSSFYEVQVATAAAPE-
Penicillium	37	TTNNTHCGADFCITWWHDSGEINTQTPVQPGNVRSKYSVQVSLAGTNN-
Isopullulanase	18	QAAVTANNSQLLITWWHNTGEINYQTPVADGNVRSGLYSVKVQTPPASS
II		
IMTD	94	KFFDSFAYMSIPRS GKGKVG Y-----TKEDGAEFSSEANLSMS
Arthro	100	KLYDAFSYMSIPRS GKGKIG Y-----TEEDGAEFS SDARL TMS
Arthro2	80	TRYDSFAYMSIPRS GKGKIG Y-----TEPDGAEFS SSANL SMS
Penicillium	85	-FHDSFVYESIPRNGNGRIYAPTPPNSNTLDS SVDDGISIEPSIGLNMA
Isopullulanase	68	LYYDSFVYLAIP--GNG-----MSDQLQYTOGYNQTOQA
III		
IMTD	132	WSSFYAKDVWVDVSLKTGQTISSADEVQIRPSSYDFEKKLVDEDTIRIK
Arthro	138	WSSFYAKDVWVEVSLRTGQTISSADQVQIRPSSYNFEKQLVDADTVRIK
Arthro2	118	WSSFYSTAVWVDVSLKTGQTISSVDQVSIKPSKYTFEKHLVDANTVRIK
Penicillium	135	WSQFEYSHDQVVKILATDGSLSGSPSDVIRPVSISYAISQSDGGIVIR
Isopullulanase	99	WTSFLYSHDATVKIS-RNGS--SANSNVVIRPISLNF PVR-YDNQSVYIT
IV		
IMTD	182	VPYSDAGYRFSVEFDPQLYTSYNDMSGNSGKLTTVAEG-NRPIHTEP MNS
Arthro	188	VPYSDAGYRFSVEFEPQLYTAAYNDMSGDSGKLTTEAAG-NRPIHTEP RNS
Arthro2	168	VPYSLSGYRFSVEFEPQNFYAYNDMSGTAGVLTETGGGDHRAIHTEP RNS
Penicillium	185	VPADANGRKFSVEFKTDLYTFLSDGNE----YVTS GGS---VVGVEPTNA
Isopullulanase	145	VPYSPYGYRFSVEFD-----DDLIS----LAPSGAR-----OPENA
V		
IMTD	231	MMIFAEPKLOGEEKRLIPNPSGSIHYPEE GEVKDLNTVTEEIIYFKPG
Arthro	237	MMVFAEPKLRGEQKERLVPTEESGSIHYPEE GEVRNLNSVSEEIIYFRPG
Arthro2	218	MMIFAEPKLRGGGEADRLIPTASAGTINYPQQGVVDNLGSLVTEEVTYFRPG
Penicillium	228	LVIFASPFPLPSG----MIPHMTPDNTQTMTP GPINNGDWGAKS ILYFPPG
Isopullulanase	177	LLIFASPFENSSTK----PQPGSPNSIAPAPGRVLGLNNTSASTVVFNPG
VI		
IMTD	281	TYHMG-----SDY HAVLPPNVK WVYLAPGAYVKGA FRF FHDNQAO
Arthro	287	TYSMG-----PDY HAVL PANVK WVYLAPGAYVKGA FRF LHDTQSQ
Arthro2	268	TYYMG-----SGH RATMPPNYK WY LAPGAYVKGA FYF PSSTQGV
Penicillium	274	VYWMNQDQSGNSGKLSN HIRLNSNTY WVYLAPGAYVKGA IEYFT--KQN
Isopullulanase	223	VYYFT-----GHD HMLVSSSVT WVYFAPGAYVKGA VEF LS-TASE
VII		
IMTD	321	YKVTGYGVLSGEQYVY EADTANNYNALSGASNCHVTCVKMLQFESSNIGQ
Arthro	327	YKVTGYGVLSGEQYVY EADTNNSYHHLSGASNCHS SCVKMLQFASADAEQ
Arthro2	308	YKVTGRGVLSGEQYVY EADTTTSGYPH STGANCHNTCVKMLFSSSTMQO
Penicillium	322	FYATGHGILSGENYVYQANAGDNYIAVKSDS----TSLRMWWHNNLGGGO
Isopullulanase	262	VKASGHGVLSGEQYVYADPDEGYQKASGANNNG---LRMWRGTLGNSSO
VIII		
IMTD	371	QLDLQGVITINEPPYHSFVVYAHEGEKEIGVENFRMN VEN-YKQVGSWYWO
Arthro	377	KLDLQGVITVAEPPYHSFVVY GNE-----QTFHMN VEN-YKQVGSWYWO
Arthro2	358	YLDVEGITISEPPYHSFVIY GPQ-----NAYDMEMR VDANYKQVGSWYWO
Penicillium	368	TWYCVGPTINAPPFNTMDFNGNS-----G-ISSQ ISD-YKQVGAFYGO
Isopullulanase	309	TFVLNGVTVSAPPFNSMDWS GNS-----LDLITCR VDD-YKQVGAFYGO
IX		
IMTD	420	TDGIELYQGGTMKNTFFNANDDV LKMYHSDVTIDNTVIWKNE NGPVIQWG
Arthro	419	TDGIELYKGSTMKNTFFNANDDV LKMYHSDVTIDNTVIWKNE NGPVIQWG
Arthro2	403	TDGMELYKGRMNNTFFHSNDDV LKLYHSNVTVDNTVIWKNE NGPVIQWG
Penicillium	409	TDGPEIYPNSVVDVFWHVNDDAIKIYYSGASVSRATIWKCHNDPIIQMG
Isopullulanase	352	TDGLEMYPGTILQDVFYHTDDGLKMYYSNVTARNIVMWKESVAPVVEFG

		→	
IMTD	470	WTPRNI DNVNVTDTT VIHNRMYWKDPKYNTCILNSSS---HWEDMGST---	
Arthro	469	WTPRNI DNVNVANTT VIHNRMYWKDVKYNTCIFNSSS---HWEDMGST---	
Arthro2	453	WAPRNI DNVVVTNTD VIHNRMYWKDVKYNTCIINSSS---HYANMGSS---	
Penicillium	459	WTSRDISGVTIDTLNVIHTRYIKSETVVP SAIIGASP---FYASGMSP---	
Isopullulanase	402	WTPRNTENVLFDNVDVIH--QAYANAGNPGIFGAVNNYLYAPDGLSSNH	
IMTD	515	AKADPNTTVKNMRFENITVEGMTNCAMRIYALSNTENIHVKNLST-DSWN	
Arthro	514	TKADPNTTVKNMRFENTAVEGMTNCAIRVYALSNTENIHIKMFNI-GAWN	
Arthro2	498	TTADTAKTISNFRLENITVEGMTNCAVRIYALSNTENIHIKLNLI-GGWN	
Penicillium	504	DS---RKSIS-MTVSNVVC EGLCPSLFRITPLQNYKNFVVKNVAFP DGLQ	
Isopullulanase	450	STGNSNMLVRNITWSNFRAEGSSSALFRINP IQNLDNISIKNVSL-ESFE	
IMTD	564	GLDWT SQVSHLKRYTNSAGEKVT IGNEIP DGNGLALENYSVGG EIEKSG	
Arthro	563	GLEWTSQVSHLKRYTNSAGEKVT IGNEVP DGNGLALENYSVGGQVIEKTG	
Arthro2	547	GLDYGSQVSHLKRYSDTANNKVWLGNETI DSRG IKLENYTVGGVKIDKTT	
Penicillium	550	TNSIGTGESIIPAASGLTMG-----LNISNWTVGGQKVTMEN	
Isopullulanase	499	PLSINTTESWMPVWYDLNNG---LQITVT D---FSIEGFTVGNTTITAS-	
IMTD	614	DNWNDYKLGRL-GFDGENWDSWNAWKSTP	
Arthro	613	GNSSDYQLGRL-GFDGENWENWNAWKSAP	
Arthro2	597	TNWNDTQLGRL-GFDPENWDTWNAW----	
Penicillium	586	--FOANSLGQF-NIDGSYWG EWOIS----	
Isopullulanase	541	---NAASVGRIDGVDPAYAGSVHYID---	

Figure 3-9. Conserved regions of dextranases and isopullulanase.

The alignment was generated by clustal W program. The identical and similar amino acid residues in each column are represented by white letters in blue and black letters in red, respectively. The seven conserved regions (I-VII) reported by Aoki *et al.*⁵⁹⁾ are indicated with allow. IMTD, *Brevibacterium fuscum* var. *dextranolyticum* isomaltotrio-dextranase; Arthro, *Arthrobacter* sp. endo-dextranase³¹⁾; Arthro2, *Arthrobacter globiformis* T-3044 endo-dextranase³²⁾; Penicillium, *Penicillium minioluteum* endo-dextranase³³⁾; Isopullulanase, *Aspergillus niger* isopullulanase³⁴⁾.

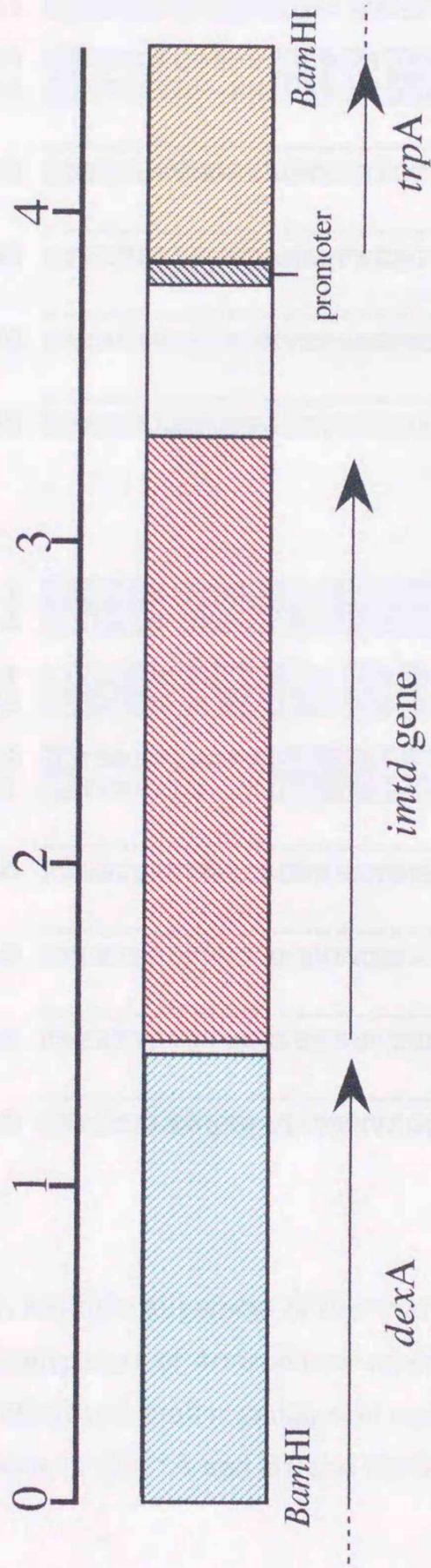


Figure 3-10. Open reading frames in cloned fragment BH.

The 5' region of ORF *dexA* and 3' region of ORF *trpA* were not included in fragment BH.

(A)

TrpA	1	MSHPNAL	LT	PRGRL	LL	AQC	VVD	DG	W	PL	RRA	ADV	FQ	VS	AT	TAA	RW	SS	RY	RL																															
TnpA	1	MSHPNA	F	LT	PRGRL	Q	LAQC	VVD	QC	W	SL	RRA	GAV	SG	V	S	I	P	T	A	ER	WAK	RY	LE																											
TrpA	51	LGP	AG	MN	DASS	RPH	RC	PR	RT	PA	R	TERR	I	I	A	I	R	V	N	R	R	W	G	P	ART	R	--	L	S	P	R	G																			
TnpA	51	EG	PE	G	M	E	D	R	S	S	R	P	H	S	S	P	R	G	T	A	T	R	TERR	V	I	A	V	R	V	N	R	R	W	G	P	CQ	D	R	G	Y	L	L	G	L	H						
TrpA	99	PS	F	D	R	A	P	C	P	G	P	V	R	L	A	R	L	S	W	L	D	R	A	T	G	R	V	I	R	R	Y	E	H	A	A	P	G	E	L	V	H	V	D	I	K	K	L	G	R	I	
TnpA	101	PS	T	V	H	R	V	L	S	-	R	H	R	L	A	K	L	T	W	L	D	R	G	T	G	R	V	I	H	R	Y	E	H	D	R	P	G	D	L	V	H	L	D	I	K	K	L	G	R	I	
TrpA		-----																																																	
TnpA	150	P	D	G	G	H	R	V	M	G	R	T	A	G	W	K	N	K	T	G	T	K	T	N	R	R	P	G	Y	H	L	H	N	A	E	D	D	H	S	R	L	A	Y	T	E	I	L	T	D		
TrpA		-----																																																	
TnpA	200	E	T	K	E	T	A	A	D	F	W	V	R	A	N	A	W	F	K	E	H	G	V	T	V	Q	R	V	L	A	D	N	G	N	C	Y	R	S	H	A	Y	A	E	A	L	G	P	D	M	K	H
TrpA		-----																																																	
TnpA	250	K	R	T	R	P	Y	R	P	Q	T	N	G	K	V	E	R	S	N	G	T	M	L	E	E	W	A	I	R	P	Y	R	S	E	A	E	R	V	A	A	F	P	D	W	L	H	A	Y	N	H	
TrpA		-----																																																	
TnpA	300	H	R	A	N	T	A	L	K	G	Q	T	P	A	S	R	V	T	N	V	S	G	Q	Y	N																										

(B)

TrpA	1	MSHPNAL	LT	PRGRL	LL	AQC	VVD	DG	W	PL	RRA	ADV	FQ	VS	AT	TAA	RW	SS	RY	RL																																		
TnpA	1	MSHPNA	F	LT	PRGRL	Q	LAQC	VVD	QC	W	SL	RRA	GAV	SG	V	S	I	P	T	A	ER	WAK	RY	LE																														
TrpA	51	LGP	AG	MN	DASS	RPH	RC	PR	RT	PA	R	TERR	I	I	A	I	R	V	N	R	R	W	G	P	ART	R	--	L	S	P	R	G																						
TnpA	51	EG	PE	G	M	E	D	R	S	S	R	P	H	S	S	P	R	G	T	A	T	R	TERR	V	I	A	V	R	V	N	R	R	W	G	P	CQ	D	R	G	Y	L	L	G	L	H									
TrpA	99	PS	F	D	R	A	P	C	P	G	P	V	R	L	A	R	L	S	W	L	D	R	A	T	G	R	V	I	R	R	Y	E	H	A	A	P	G	E	L	V	H	V	D	I	K	K	L	G	R	I				
TnpA	101	PS	T	V	H	R	V	L	S	-	R	H	R	L	A	K	L	T	W	L	D	R	G	T	G	R	V	I	H	R	Y	E	H	D	R	P	G	D	L	V	H	L	D	I	K	K	L	G	R	I				
TrpA		-----																																																				
TnpA	150	P	D	G	G	H	R	V	M	G	R	T	A	G	W	K	N	K	T	G	T	K	T	N	R	R	P	G	Y	H	L	H	N	A	E	D	D	H	S	R	L	A	Y	T	E	I	L	T	D					
TrpA		-----																																																				
TnpA	200	E	T	K	E	T	A	A	D	F	W	V	R	A	N	A	W	F	K	E	H	G	V	T	V	Q	R	V	L	A	D	N	G	N	C	Y	R	S	H	A	Y	A	E	A	L	G	P	D	M	K	H			
TrpA		-----																																																				
TnpA	250	K	R	T	R	P	Y	R	P	Q	T	N	G	K	V	E	R	S	N	G	T	M	L	E	E	W	A	I	R	P	Y	R	S	E	A	E	R	V	A	A	F	P	D	W	L	H	A	Y	N	H				
TrpA		-----																																																				
TnpA	300	H	R	A	N	T	A	L	K	G	Q	T	P	A	S	R	V	T	N	V	S	G	Q	Y	N																													

Figure 3-11. Multiple alignment of *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* TrpA and transposase of *Arthrobacter nicotinovorans* TnpA.

The identical and similar amino acid residues in each column are represented by white letters in blue (A and B), and black letters in red (B), respectively.

第5節 要約

イソマルトトリオデキストラナーゼの部分アミノ酸配列を基に合成したオリゴヌクレオチドプローブを用い、イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子 (*imtd*) のクローニングを行った。約500個の組換え大腸菌をスクリーニングした結果、一つの陽性クローンを得た。*imtd*は全長1,923 bpであり、37アミノ酸残基からなるシグナル配列部分と604アミノ酸残基からなる成熟酵素をコードする部分より成り立っていた。イソマルトトリオデキストラナーゼは *Arthrobacter* 属の細菌由来のエンド型デキストラナーゼと高い相同性を示し、*Penicillium minioluteum* 由来のエンド型デキストラナーゼおよび *Aspergillus niger* 由来のイソプルラナーゼと配列の相同性が認められた。これらの配列間には高度に保存された領域が存在した。*imtd* を発現するプロモーター配列はクローニングにより得られたゲノムDNA断片上に見いだされず、*imtd* の96 bp上流より α -グルコシダーゼをコードしていると考えられる ORF (*dexA*) が存在した。

第4章 イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の大腸菌における発現

第1節 緒言

ネオプルラナーゼ、 α -アミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、サイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼなどの糖質関連酵素が4つの高度に保存された領域を有しており、これら酵素間の類似性と触媒機構の共通性より、「 α -アミラーゼファミリー」というグループにまとめられることが報告されているが⁶³⁾、この酵素スーパーファミリーを提唱したKurikiら³⁰⁾により、ネオプルラナーゼの保存領域に存在するアミノ酸の変異により、加水分解と転移反応の割合が逆転したことが報告されている。このことは、類似の配列を持ち、しかし働きが異なる酵素群において、それらの配列中に保存されている領域に酵素の作用様式を決定する因子が含まれていることを示唆している。一方、前章で示したように、*Brevibacterium fuscum*, var. *dextranlyticum* 0407菌株の生産するイソマルトトリオデキストラナーゼは *Arthrobacter* sp.³¹⁾ および *Penicillium minioluteum* が生産するエンド型デキストラナーゼ³³⁾、および *Aspergillus niger* が生産するイソプルラナーゼ³⁴⁾ とアミノ酸配列に相同性を示した。イソプルラナーゼの一次構造を決定したAokiら⁵⁹⁾によって、これらの糖質関連酵素の配列には触媒ドメインと想定される共通の保存配列が存在していることが報告されており、イソマルトトリオデキストラナーゼについてもこれらの領域はよく保存されていた。今後、デキストラン分解酵素群においても基質認識や触媒反応に関わる領域やアミノ酸残基などを解明していくために、結晶化およびX線解析などにより立体構造を推定することや、アミノ酸の変異による活性、もしくは作用様式や基質特異性の変化を比較することが重要である。しかしながら、変異酵素を獲得する場合、クローン化した各種デキストラナーゼ遺伝子を安定に発現し、アミノ酸置換を行った酵素を簡便に生産する系を確立することが最低限必要となる。

本章では、イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の大腸菌における安定かつ大量の発現を目的として行った。すなわち、発現用プラスミドの構築と発現条件の

検討、さらに発現イソマルトトリオデキストラナーゼの精製およびオリジナルの酵素との諸性質の比較結果について報告する。

第2節 実験材料および方法

1. 菌株および培養条件

大腸菌JM109[*recA1*Δ*lac-proAB* *endA1* *thi1* *hsdR17* *supE44* F'*[traD36 proAB* ⁺*lacI*^q*lacZ*ΔM15]⁵¹⁾は、形質転換の宿主株として、大腸菌BL21(DE3)[*hsdS gal* (λ *clts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1*)]およびBL21(DE3)pLysS [*hsdS gal* (λ *clts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1*) pLysS, Cm^r]⁶⁴⁻⁶⁶⁾は発現用の宿主株として用いた。大腸菌コンピテントセルはHanahan⁵²⁾の方法に従い調製した。発現用のベクターにはpET11aもしくはpET23d (いずれもNovagen社)を用いた。プラスミドDNAの調製はアルカリ/SDS法で行った。大腸菌の培地はLuria-Bertani(LB)培地を用いた。Ampを培地に添加する場合は、終濃度100 μg/mlになるように、Cmを添加する場合は同じく34 μg/mlになるようにそれぞれ加えた。

2. イソマルトトリオデキストラナーゼ発現用プラスミドの構築

1) pITD-Nの構築

イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子上に成熟酵素のN末端に相当する配列に制限酵素NdeI(認識配列: CATATG)により消化できるように、変異導入用プライマーITD-N(CCCGACCATATGAATCCCACCAAACCTG)を作製した。*B. fuscum* var. *dextranlyticum* 0407菌株のゲノムDNAを鋳型とし、プライマーITD-Nをセンス、第3章において作製したプライマーCRをアンチセンス側のプライマーとしてPCRを行った。得られたPCR産物(1514 bp)をNdeIとEcoRIで消化し、イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の5'末端側(475 bp)を一度大腸菌プラスミドpBluescript II KS (+)に導入した。DNA配列を解析し、PCRによる目的以外の変異が入っていないことを確認したのち、さらにイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の3'末端側(EcoRI-SaII, 1586 bp)を導入した。組換えプラスミドを制限酵素

*NdeI*および*SaII*で消化し、得られたイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子を含む断片を発現用ベクターpET11aの*NdeI*-*BamHI*サイトに導入し、発現用プラスミドpITD-Nを構築した (Figure 4-1)。

2) pITD-Sの構築

イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子を開始コドン部位より発現用ベクターに導入するために、開始コドン部位に制限酵素*NcoI*(CCATGG)サイトをPCRにより導入した。変異導入にプライマーITD-S(GGAACCACCATGGCCACTACAG-GGCTG)をセンス側、プライマーCRをアンチセンス側のプライマーとして用いた。

得られたPCR産物(1631 bp)は*NcoI*と*EcoRI*で消化し、イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の5'末端側(592 bp)を一度大腸菌プラスミドpBluescript II KS(+)に導入した。DNA配列を解析し、PCRによる目的以外の変異が入っていないことを確認した後、さらにイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の3'末端側(*EcoRI*-*SaII*,1586 bp)を導入した。得られた組み換えプラスミドを制限酵素*NcoI*と*SaII*で消化し、得られたイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子を含む断片を発現用ベクターpET23dの*NcoI*-*SaII*サイトに導入し、発現用プラスミドpITD-Sを構築した (Figure 4-2)。

3. 不溶性となった発現イソマルトトリオデキストラナーゼの抽出

急激な発現により大腸菌内で不溶性となった発現イソマルトトリオデキストラナーゼは、Kane⁶⁷⁾らの方法に従って抽出した。9,000 rpm、1分間の遠心分離により20 mlの培養液から菌体を回収した。750 μ lの10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.5)に懸濁後、超音波処理により菌体を破碎した。9,000 rpm、1分間の遠心分離により得られた沈殿を緩衝液 [100 mM Tris-HCl (pH 7.0)、5 mM EDTA、5 mM DTT、2 M 尿素、2 % Triton X-100]を用いて3回洗浄した後、遠心分離により得られた沈殿をさらにTriton X-100を含まない同緩衝液で洗浄した。8,000 rpm、5分間の遠心分離により得られた沈殿を不溶性画分として回収した。

4. 活性測定

大腸菌発現したイソマルトトリオデキストラナーゼの活性測定は、Somogyi-

Nelson法^{38,39)}によって生成イソマルトトリオースを定量することにより測定した。酵素単位は1分間に1 μmol のイソマルトトリオースに相当する還元力を示すのに要する酵素量を1 unitsとした。

5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

SDS-PAGEはLaemmliの方法⁴⁰⁾に準じて行い、泳動装置はBIO-RAD ミニプロテインIIを用いた。10%の分離ゲルを使用し、泳動は濃縮ゲル部分で18 mA、分離ゲル部分で24 mAの定電流で行った。

分子量マーカーとしてミオシンH鎖(200,000)、ホスフォリラーゼb(97,400)、牛血清アルブミン(66,200)、オボアルブミン(45,000)、カーボニックアンヒドラーゼ(31,000)、大豆トリプシンインヒビター(21,500)およびリゾチーム(14,000)を用いた。

6. カラムクロマトグラフィー

DEAE-Sepharose CL-6B、Bio-Gel P-100の各カラムクロマトグラフィーは常法に従って行った。DEAE-Sepharose CL-6Bは10 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)、Bio-Gel P-100は0.2 M 塩化ナトリウムを含む同緩衝液で緩衝化を行った後に使用した。

7. N末端配列の解析

大腸菌発現したIMTDのN末端解析は、Ikeuchi⁶⁷⁾らの方法に準じて行った。*E. coli* ITD-Nおよび-Sの無細胞抽出液をSDS-PAGEに供し、分離ゲル部分を転写用緩衝液(30 mM Tris, 17 mM boric acid, 0.055% SDS, 20% methanol)で処理したPVDF膜およびろ紙(Wattman 17chr 4枚 x 2セット)で挟み、8 Vの定電圧でタンパク質の膜転写を行った。転写後のPVDF膜を染色液(0.1% CBB R-250 / methanol)および脱色液(50% methanol)で処理後、発現IMTDのバンド部分の膜を切り出し、モデル477A プロテイン・ペプチドシーケンサー/120A PTH アナライザーシステムに供して配列の決定を行った。

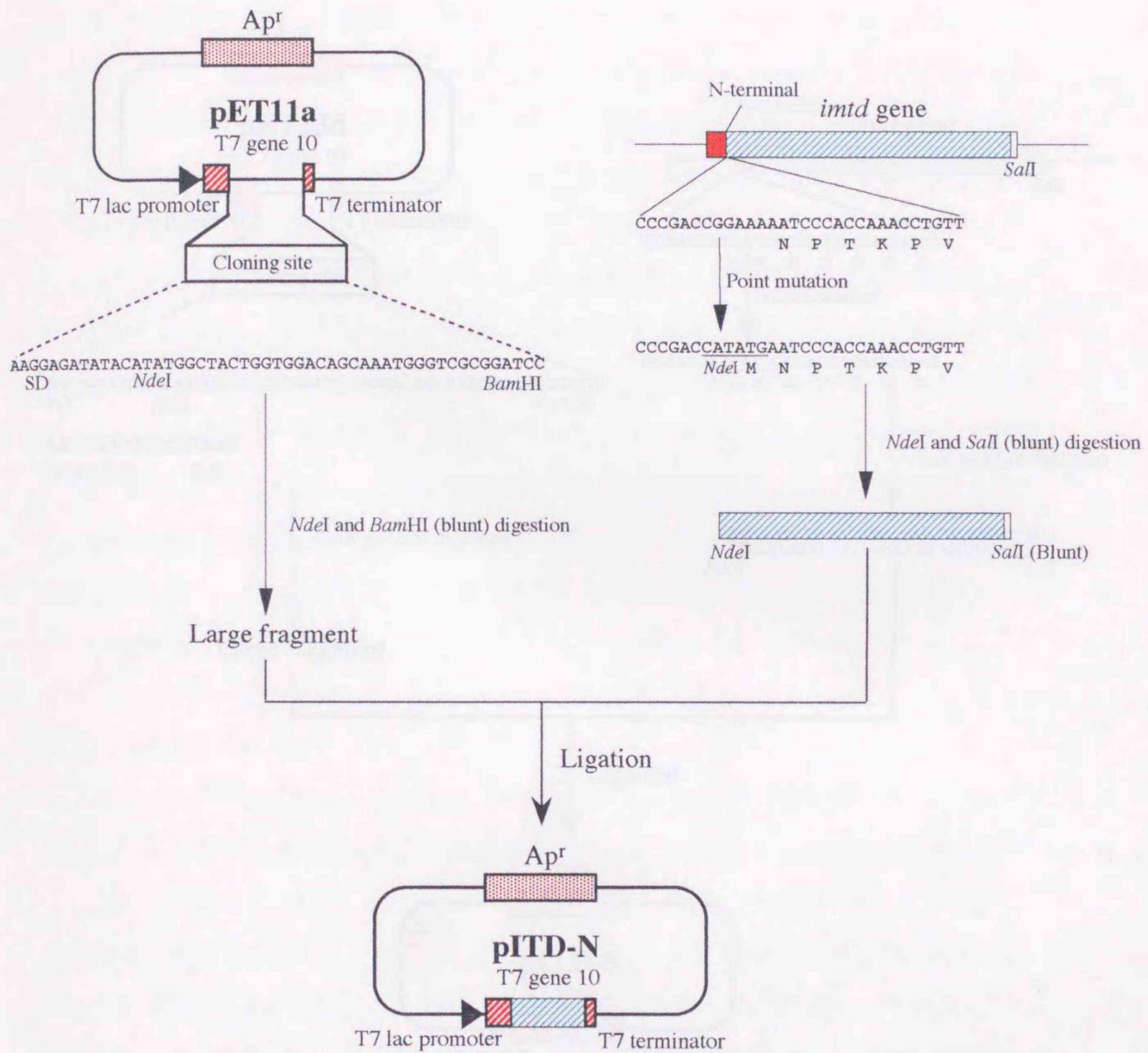


Figure 4-1. Construction and structure of an expression plasmid pITD-N.

Details are described in the text. Mature protein region of IMTD is shown with blue stripe, and signal peptide region is denoted with red.

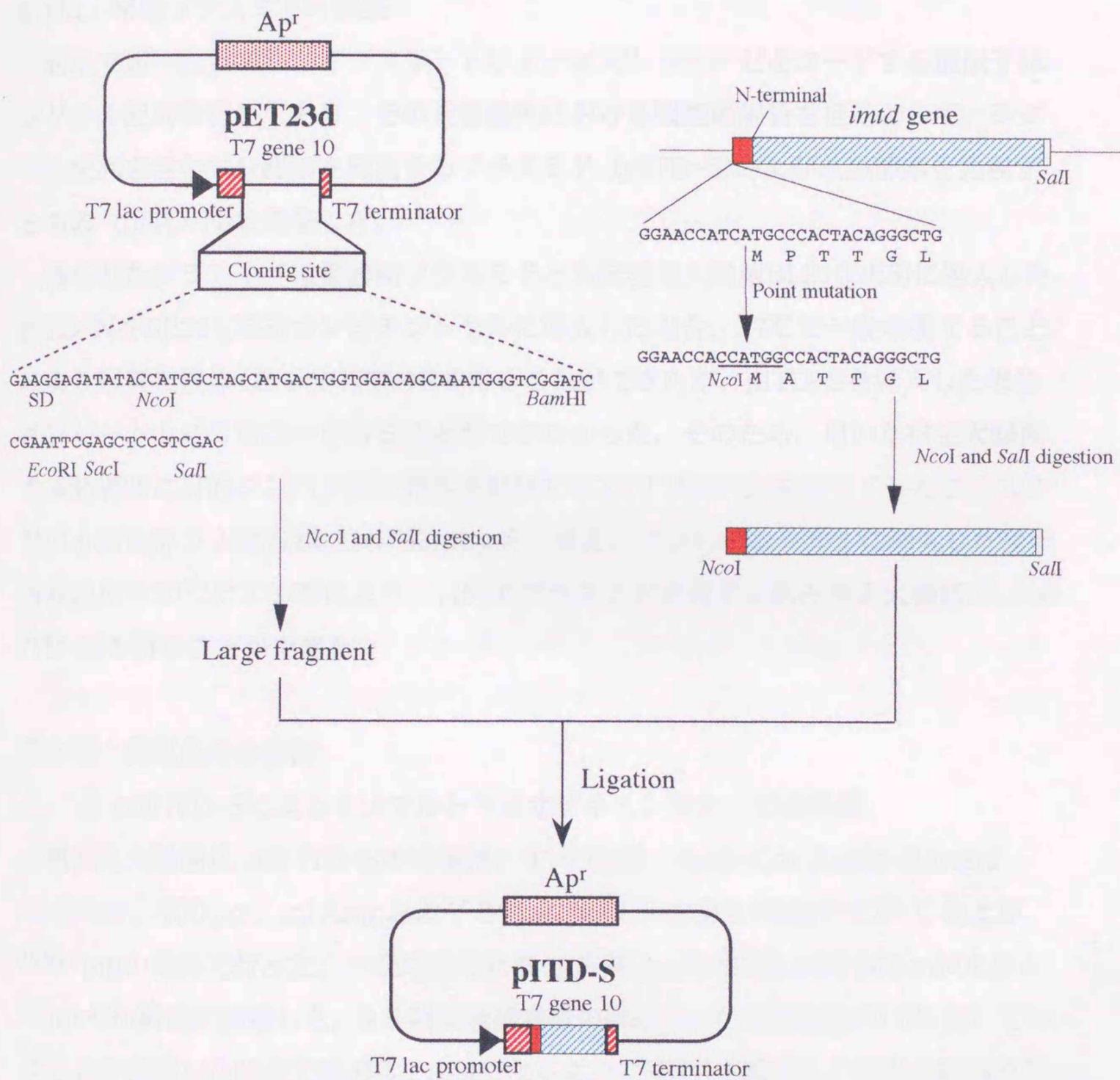


Figure 4-2. Construction and structure of an expression plasmid pITD-S.

Details are described in the text. Mature protein region of IMTD is shown with blue stripe, and signal peptide region is denoted with red.

第3節 実験結果

第1項 発現プラスミドの構築

前章で述べたとおり、イソマルトトリオデキストラナーゼをコードする遺伝子はシグナル配列を有しており、その大腸菌内における機能の解析を目的として、シグナル配列を含むプレ酵素を発現するプラスミド (pITD-S) および成熟酵素を発現するもの (pITD-N) を構築した。

得られたプラスミドは最初両プラスミドとも発現用大腸菌BL21(DE3)に導入した。pITD-NをBL21(DE3)コンピテントセルに導入した場合、37°Cで一晩培養することにより形質転換体 (*E. coli* ITD-N) を得ることができたが、pITD-Sを導入した場合はプレート上にコロニーを得ることができなかった。そのため、用いた宿主大腸菌を未誘導時に目的タンパク質の発現を抑制するT7リゾチームをコードしたプラスミドpLysSを持つ大腸菌BL21(DE3)pLysSに換え、コンピテントセルに導入した後の培養温度を30°Cにする事により、目的のプラスミドを有する組み換え大腸菌 (*E. coli* ITD-S) を得ることができた。

第2項 発現条件の検討

1. *E. coli* ITD-Sによるイソマルトトリオデキストラナーゼの発現

組換え大腸菌 *E. coli* ITD-S の培養は、すべてLB / Amp-Cm (Luria-Bertani medium、100 µg / ml Amp および 34 µg / ml Cm を含む) 培地中で30 °C および 200 rpm の条件で行った。一晩培養した *E. coli* ITD-S 培養液 1 ml を 100 ml の LB / Amp-Cm 培地に接種した。3.5 時間後培養液の 600 nm での吸光度が 0.6 に達していることを確認した時点で終濃度 1 mM になるように IPTG を添加し、発現の誘導を行った。IPTG 添加後 1、3、6 時間後に培養液の一部を取り出し、遠心分離により得られた菌体を超音波破碎し、イソマルトトリオデキストラナーゼの活性を測定した。その結果、イソマルトトリオデキストラナーゼ活性は 3 時間で最大値 (0.10 unit/ml of culture broth) となり、6 時間経過した時点で最大値の約 1/3 にまで活性が減少した (データは示していない)。さらに各サンプルの発現酵素量を SDS-PAGE により確認したが、発現の誘導を行ってから 3 時間以降ではイソマルトトリオデキストラナーゼの増加は認められなかった (Figure 4-3)。

2. *E. coli* ITD-Nによるイソマルトトリオデキストラナーゼの発現

組み換え大腸菌*E. coli* ITD-Nの培養にはLB / Ampを用いた。最初培養温度を37℃に設定し、200 rpmで培養を行った。*E. coli* ITD-Sと同様に前培養、IPTGによる発現を行い、発現誘導から3、6、18時間経過した時点で培養液の一部を取り、イソマルトトリオデキストラナーゼ活性とタンパク質量を測定した。その結果誘導6時間目において活性が最大値 (0.0165 unit / ml of culture broth)に達したが、その後低下していった。さらにSDS-PAGEで発現酵素量の解析を行ったが、6時間目以後の発現酵素の増加は認められなかった (Figure 4-4A)。一方発現誘導後6時間目の菌体を回収し、Kaneら⁶⁸⁾の方法に準じて不溶性画分の調製を行った。pITD-Nの発現産物と考えられる不溶性タンパク質が、精製イソマルトトリオデキストラナーゼと同じ分子量で検出された (Figure 4-4B)。

次に*E. coli* ITD-Nの培養温度を37℃から18℃、発現誘導時のIPTG濃度を1 mMから0.5 mMに代え、同様に発現試験を行った結果、増殖速度が遅いものの可溶性画分のイソマルトトリオデキストラナーゼ活性は経時的に増加し、発現誘導後36時間で培養液1mlあたり5.84 unitの活性が得られた (Table 4-1)。SDS-PAGEによる解析でも発現タンパク質は可溶性画分に蓄積されており (Figure 4-5B)、不溶性画分にはほとんど認められなかった (Figure 4-5C)。

第3項 大腸菌で発現させたイソマルトトリオデキストラナーゼの精製

1. 培養条件

プラスミドpITD-Nは常法に従い発現用大腸菌BL21(DE3)に導入した。LB/Ampプレート上に得られた組み換え大腸菌を単一コロニーから滅菌済みの爪楊枝を用いて10mlのLB/Amp培地に接種した。37℃、200 rpmで一晩振盪培養し、1 mlずつ4本の100 ml LB/Amp培地に接種した。18℃、200 rpmで24時間培養後、終濃度0.5 mMになるようにIPTGを添加し、イソマルトトリオデキストラナーゼの発現を誘導した。IPTG添加後さらに48時間培養した後、8,000 rpmで5分間遠心分離し、菌体を回収した。

2. 粗酵素液の調製

得られた組換え大腸菌は10 mMのリン酸緩衝液 (pH 7.5)で一度洗浄した後、20

mlの同緩衝液に懸濁した。水中に保持した状態で菌体を超音波により破碎した後、15,000 xgで10分間遠心分離し、得られた上清を粗酵素液とした。この操作により790 unit (比活性8.88 unit / mg)のイソマルトトリオデキストラナーゼを得た。

3. DEAE-Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィー (1回目)

酵素溶液を10 mMのリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)で緩衝化したDEAE-Sepharose CL-6Bカラム(3.3 x 35 cm, 299ml)に添加し、300 mlの同緩衝液でカラムを洗浄後、吸着タンパク質を0から1 Mまでの塩化ナトリウムを用いた直線濃度勾配により溶出した (Figure 4-6)。分画操作は10 ml / hrの流速、1.2 cm / hrの線流速で行った。得られた活性画分 (Fraction Nos. 55~58) を集め、コロジオンバッグを用いて同緩衝液に透析しながら約4 mlにまで濃縮した。これらの操作により、イソマルトトリオデキストラナーゼを87%の回収率 (210 unit)で3.3倍 (比活性2.9 unit / mg)にまで精製した。

4. Bio-Gel P-100 カラムクロマトグラフィー

濃縮酵素溶液を0.2M 塩化ナトリウムを含む10 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)で緩衝化したBio-Gel P-100 カラム(2.6 x 78 cm, 414ml)に添加した。溶出は5 ml / hrの流速、0.94 cm / hrの線流速で上記の緩衝液を用いて行った (Figure 2-7)。得られた活性画分 (Fraction Nos. 23~25) を10 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)に対して24時間、数回緩衝液を取り替えて透析した。これらの操作により、イソマルトトリオデキストラナーゼを38%の回収率 (83 unit)で3.6倍 (比活性3.2 unit / mg)にまで精製した。

5. DEAE-Sepharose カラムクロマトグラフィー (2回目)

回収した活性画分を2回目のDEAE-Sepharose カラム(1.8 x 33 cm, 84ml)に通した。100 mlの10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5)で洗浄した後、吸着タンパク質を0から0.5 Mまでの塩化ナトリウムを用いた直線濃度勾配により溶出した (Figure 4-8)。分画操作は5 ml / hrの流速、2 cm / hrの線流速で行った。得られた活性画分 (Fraction Nos. 107~110) を集め、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)に対して透析を行った。この精製段階の酵素標品をSDS-PAGEに供した

結果、*E. coli* で発現させたpITD-N由来のイソマルトトリオデキストラナーゼは単一なバンドを示した。(Figure 4-9)。よってこの段階のサンプルを精製酵素とし諸性質の検討を行った。精製の過程はTable 4-2に示した。

第4項 大腸菌で発現させたイソマルトトリオデキストラナーゼの諸性質

1. 至適pH

E. coli ITD-N由来イソマルトトリオデキストラナーゼの至適pHを求めた結果をFigure 4-10に示した。pH 7.7において活性が最大値を示した。

2. デキストラン分解における K_m 、 V の測定

反応溶液中のデキストラン濃度に対して、酵素1mg当りの反応生成物、イソマルトトリオースの遊離速度をそれぞれ逆数でプロットした(Figure 4-11)。その結果 K_m 値は0.72 mg/ml、 V は27.5 μ mol of isomaltotriose/mg/minであった。

3. 薄層クロマトグラフィー

E. coli ITD-N由来イソマルトトリオデキストラナーゼによるデキストラン分解産物を薄層クロマトグラフィーにより確認した(Figure 4-12)。分解初期にはイソマルトトリオースのみが確認されたが、デキストランの分解が進行するにつれ(分解率は示していない)イソマルトトリオースより移動度が小さいマイナースポットが確認されるようになった。ただし、オリジナルのイソマルトトリオデキストラナーゼで同実験を行った場合、イソマルトトリオースより移動度が大きいスポットが確認されたが、大腸菌組換え体からの精製酵素を用いた結果では、いずれの段階においても認められなかった。

第4節 考察

1. イソマルトトリオデキストラナーゼ発現系の構築

E. coli ITD-Sにおいて不溶化されていないにも関わらず、活性を持つ酵素量が少なかった原因としては、本菌に導入したイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝

子が有するシグナル配列が大腸菌で認識され、細胞内膜を通過しペリプラズム画分に輸送されたことが考えられた。ペリプラズム部位に蓄積されるタンパク質量が細胞質画分に比べ制限されること⁶⁹⁾から、発現の段階で制御されていることが推測される。*E. coli* pITD-S由来のイソマルトトリオデキストラナーゼをSDS-PAGEに供し、PVDF膜へブロットニングしたのち、N末端配列の解析をそれぞれ10残基目まで行った結果、発現していたイソマルトトリオデキストラナーゼはネイティブの酵素と同じN末端配列を有していた。*B. fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株で菌体外に酵素を生産するために使用されるシグナル配列が大腸菌でも認識されていることは、本酵素が大腸菌においては成熟酵素の状態でペリプラズム画分に輸送されていることを示す。ただし、*E. coli* pITD-Sについては18℃での培養や発現の誘導に用いたIPTGの濃度を低下するなどの処理を行っていないため、弱い誘導条件下での発現についても検討する必要がある。

E. coli ITD-Nを用いたイソマルトトリオデキストラナーゼの発現は、当初培養温度およびIPTG濃度をプロトコールで設定されている条件で行ったが、発現した酵素はほとんど不溶性となり、活性を有する状態では得ることができなかった。これは目的酵素の合成が急激に行われたため、タンパク質の折り畳み(folding)が追いつかないためではないかと考えた。そこで発現誘導を緩やかな条件にするために一般的に行われている低温での培養、および発現誘導剤であるIPTG濃度を下げることにより、発現酵素を可溶性の状態を得ることを試みた。その結果、菌の増殖速度が極度に低下し、18℃で培養を行った場合、発現誘導を行う培地濁度であるOD₆₀₀ = 0.6に達するまでに約24時間(37℃で行った場合約2時間)必要であったが、発現した酵素は大腸菌タンパク質の約18%を占めるまでに蓄積された。これらのことより、大腸菌におけるイソマルトトリオデキストラナーゼの発現は、急激な誘導を行わず、かつシグナル配列を除いた成熟酵素が細胞質に蓄積されるように設定することにより、菌体内における大量の蓄積が可能であることが示唆された。

2. 大腸菌発現イソマルトトリオデキストラナーゼの精製。

大容量培地で大腸菌を培養し、得られた菌体を超音波破碎した結果、無細胞抽出液中に、予備実験から予想された酵素量に比べ約1/3程度の活性しか回収できなかった。これは予備実験で少量の菌体を小型遠心チューブで行っていたのに比べ、超音

波処理の効率が悪く、破碎が不十分であったことや、長時間の破碎により熱失活が起こっていることなどによるのだろう。今後アミノ酸変異株からのイソマルトトリオデキストラナーゼの精製を行う場合は、小容量で破碎を行い破碎時間を極力短くするか、フレンチプレスなど熱が発生しないような条件での菌体破碎法を用いると良いかもしれない。

得られた無細胞抽出液からの発現酵素の精製は、3回のクロマトグラフィーによってSDS-PAGEでバンドが単一になった。しかしながら精製酵素の比活性はオリジナルの精製酵素に比べ半分以下という値となった。またオリジナルの酵素と諸性質を比較した結果、至適pHはほとんど変化しなかったが、 K_m 、 V 値を測定した結果オリジナルの値と大きく異なる結果となった。特に K_m が精製したオリジナル酵素の約3倍になった。このことより、今回の精製で得られた大腸菌由来のイソマルトトリオデキストラナーゼの比活性が低い原因として、精製が不十分であることよりも発現酵素自体の活性が低いことになる。この原因としては超音波破碎時の失活か、もしくは大腸菌で急激な発現が行われているために酵素が活性を持つ立体構造を取るように折り畳まれない (misfolding) 状態のイソマルトトリオデキストラナーゼ分子が存在していることが考えられる。特に今回の大量発現に用いたプラスミドはイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子のシグナル配列部分を持たない成熟酵素をコードしている部分のみを用いて構築されている。よって折り畳みが行われる前の段階で既にシグナル配列が存在せず、そのためにオリジナルの酵素と異なる折り畳みをする可能性がある。また、ペプチドシーケンサーによるN末端解析の結果、*E. coli* ITD-N由来のイソマルトトリオデキストラナーゼはN末端に開始コドンであるメチオニンが付加したままとなっており、このこともオリジナルの酵素に比べ活性が低い原因となっているのかもしれない。これらについては、*E. coli* ITD-N程度の活性を得ることが難しいが、シグナル配列を有したイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子を有するプラスミド pITD-Sを用いて発現を行い、精製を行うことにより明らかにしたいと考えている。

3. 大腸菌発現イソマルトトリオデキストラナーゼによるデキストラン分解産物

発現イソマルトトリオデキストラナーゼでデキストランを分解した場合に得られる生成産物を薄層クロマトグラフィーにより確認した。その結果オリジナルの酵素

と同様スタンダードとして展開したオリゴ糖と展開距離が一致しない数種類のマイナースポットが確認された。これに対し酸処理により分岐部分を除いたデキストランにオリジナルの酵素を作用させた場合、イソマルトテトラオース(IG4)以上のスポットが認められなくなった (Figure 4-13)。IG4はデキストランの酸分解により遊離したものであると考えられることから、脱枝処理によりマイナースポットが認められなくなったことにより、イソマルトトリオース以外のスポットはデキストランの分解により遊離した分岐部分であると考えられた。しかしながら、分岐部分を構成する α -1, 2、 α -1, 3、 α -1, 4などの結合を持つオリゴ糖に対し選択的に転移反応を行う可能性も残されていることより、本酵素による転移反応試験、もしくはHPLC、マススペクトル等を用いた分解産物の特定等を行って解明したいと考えている。さらに*B. fuscum* var. *dextranlyticum*をブルーデキストランを含むプレート上で生育した場合、ハローを形成することを確認しているが(データは示していない)、これがイソマルトトリオデキストラナーゼによるものであることを*E. coli* ITD-Nのハロー形成能により確認した (Figure 4-14)。これまでエキソ型の酵素はデキストランの分岐部分を分解できないことよりハローを形成することができないと考えられてきたが、本酵素によって分岐部分を超えて分解ができるようなエキソ型デキストラナーゼではブルーデキストラン培地上にハローを形成することが可能であることが判明した。よって、エンド型デキストラナーゼをブルーデキストラン分解能でスクリーニングする場合には、イソマルトトリオースよりも大きな単位で分解を行うエキソ型のデキストラナーゼである可能性があることを考慮に入れるべきである。

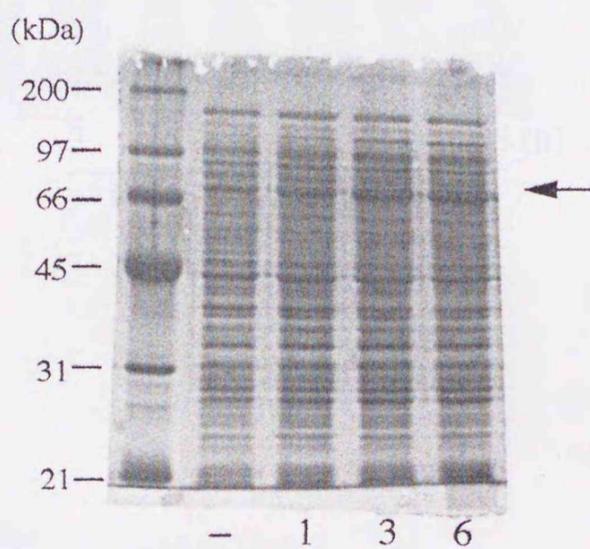


Figure 4- 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of cell-free extract from *E. coli* ITD-S.

Details are described in Materials and Methods. *E. coli* ITD-S was cultured at 30°C and 200rpm. IMTD expression was introduced by 1mM IPTG addition. Number of each lane shows the hours from expression induction.

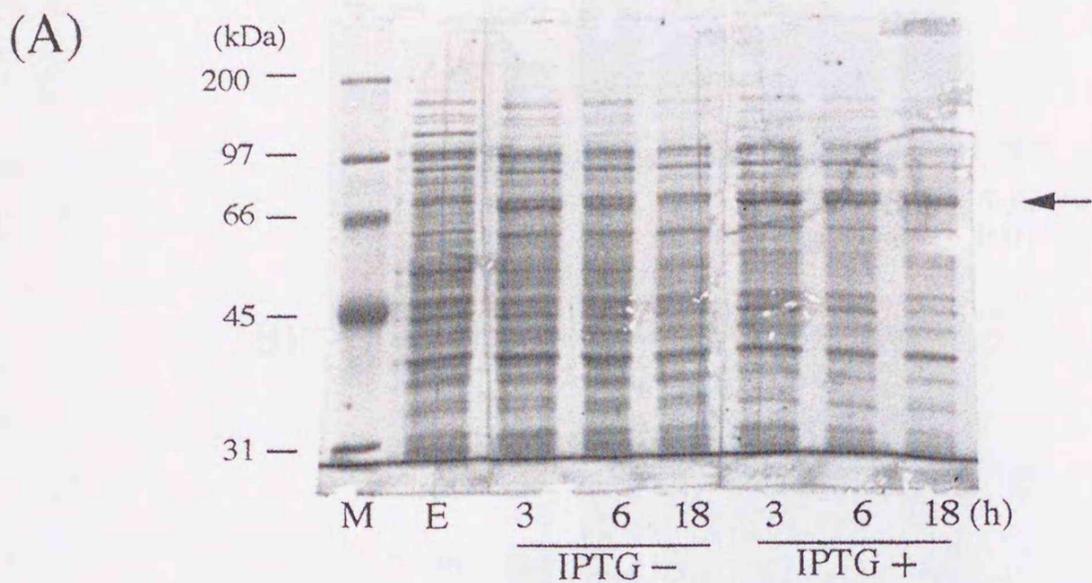


Figure 4-4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of isomaltotrio-dextranase from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* and *E. coli* ITD-N.

E. coli ITD-N was cultured at 37°C and 200rpm. IMTD expression was induced by 1mM IPTG addition. Number of each lane shows the hours from IPTG addition. (A), cell free extract ; (B), inclusion body fraction of 6hr induced *E. coli* ITD-N; E, *Escherichia coli* BL21 (DE3) cell free extract.

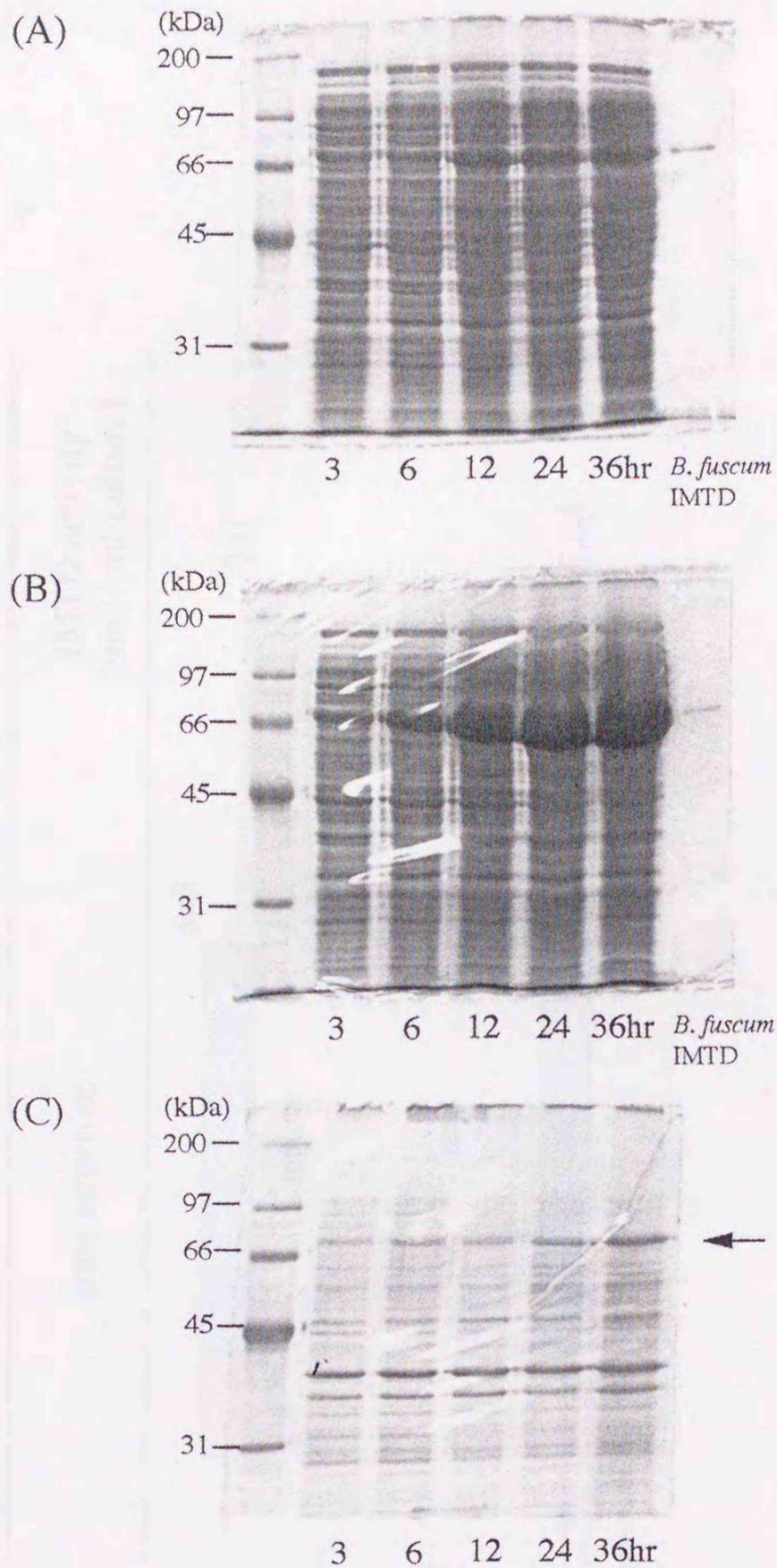


Figure 4-5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of isomaltotriose-dextranase from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranolyticum* and *E. coli* ITD-N.

Details are described in Materials and Methods. *E. coli* ITD-N was cultured at 18°C and 200rpm. IMTD expression was induced by 0.5mM IPTG addition. Number of each lane shows the hours from IPTG addition. (A), Cell-free extract of *E. coli* ITD-N cultured with 0mM IPTG; (B), Cell-free extract of *E. coli* ITD-N cultured with 0.5mM IPTG; (C), Inclusion body fraction of *E. coli* ITD-N cultured with 0.5mM IPTG.

Table 4-1. Production of isomaltotriose-dextranase in *Brevibacterium fuscum* var *dextranolyticum*, *E. coli* ITD-N, and *E. coli* ITD-S

	gene structure	IMTD activity (unit / ml culture)
<i>B. fuscum</i> var. <i>dextranolyticum</i>		2.0
<i>E. coli</i> ITD-N		5.84
<i>E. coli</i> ITD-S		0.10

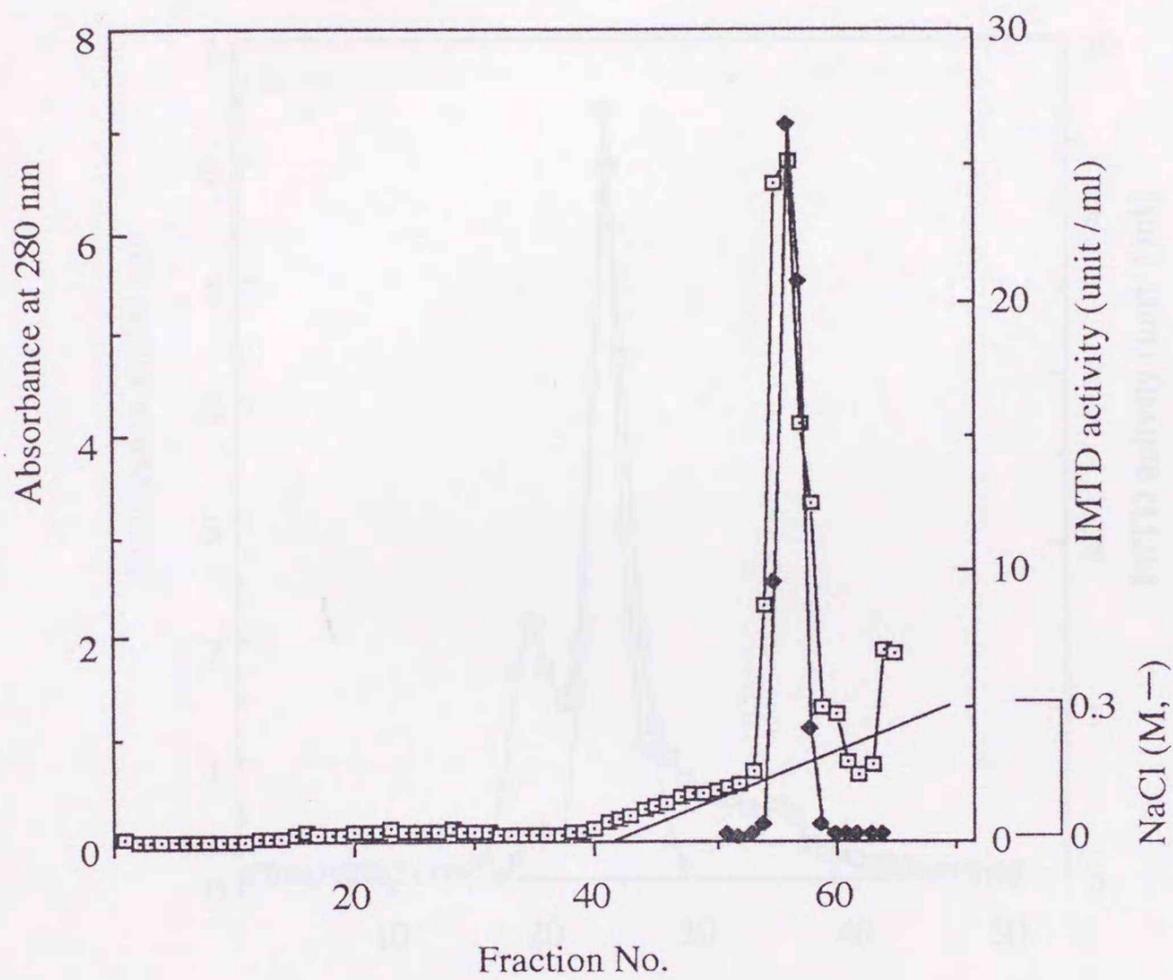


Figure 4-6. Chromatography of isomaltotrio-dextranase from *E. coli* ITD-N on a DEAE-Sepharose CL-6B column.

The enzyme solution was put on a DEAE-Sepharose CL-6B column (3.3 x 35 cm, 299ml). Fractions of 10 ml each were collected at a flow rate of 10 ml / hr (1.2 cm / hr). \square , absorbance at 280nm; \blacklozenge , isomaltotrio-dextranase activity (unit / ml); —, NaCl concentration (M).

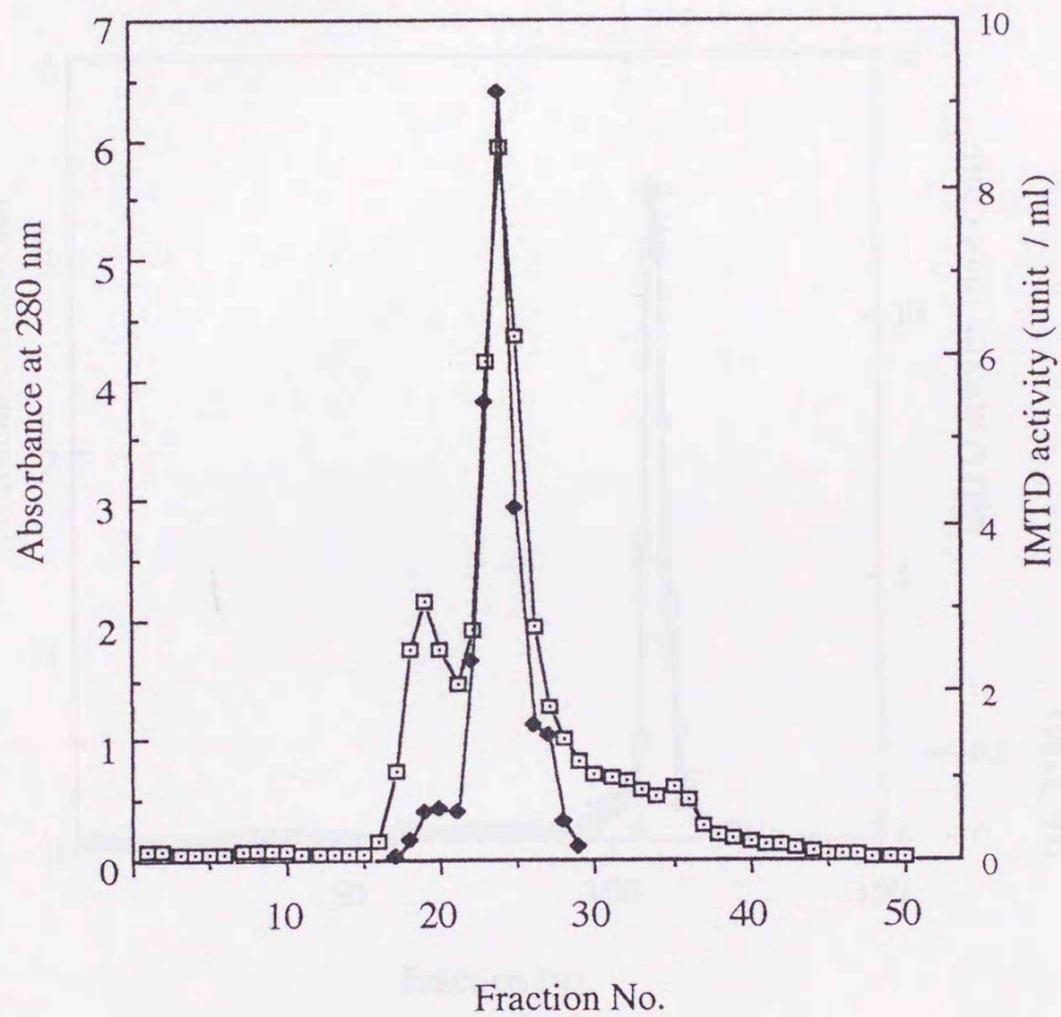


Figure 4-7. Chromatography of isomaltotrio-dextranase from *E. coli* ITD-N on a Bio-Gel P-100 column.

The enzyme solution was put on a Bio-Gel P-100 column (2.6 x 78 cm, 4 14 ml). Fractions of 5 ml each were collected at a flow rate of 5ml / hr (0.9 cm / hr). □, absorbance at 280nm; ◆, isomaltotrio-dextranase activity (unit /ml).

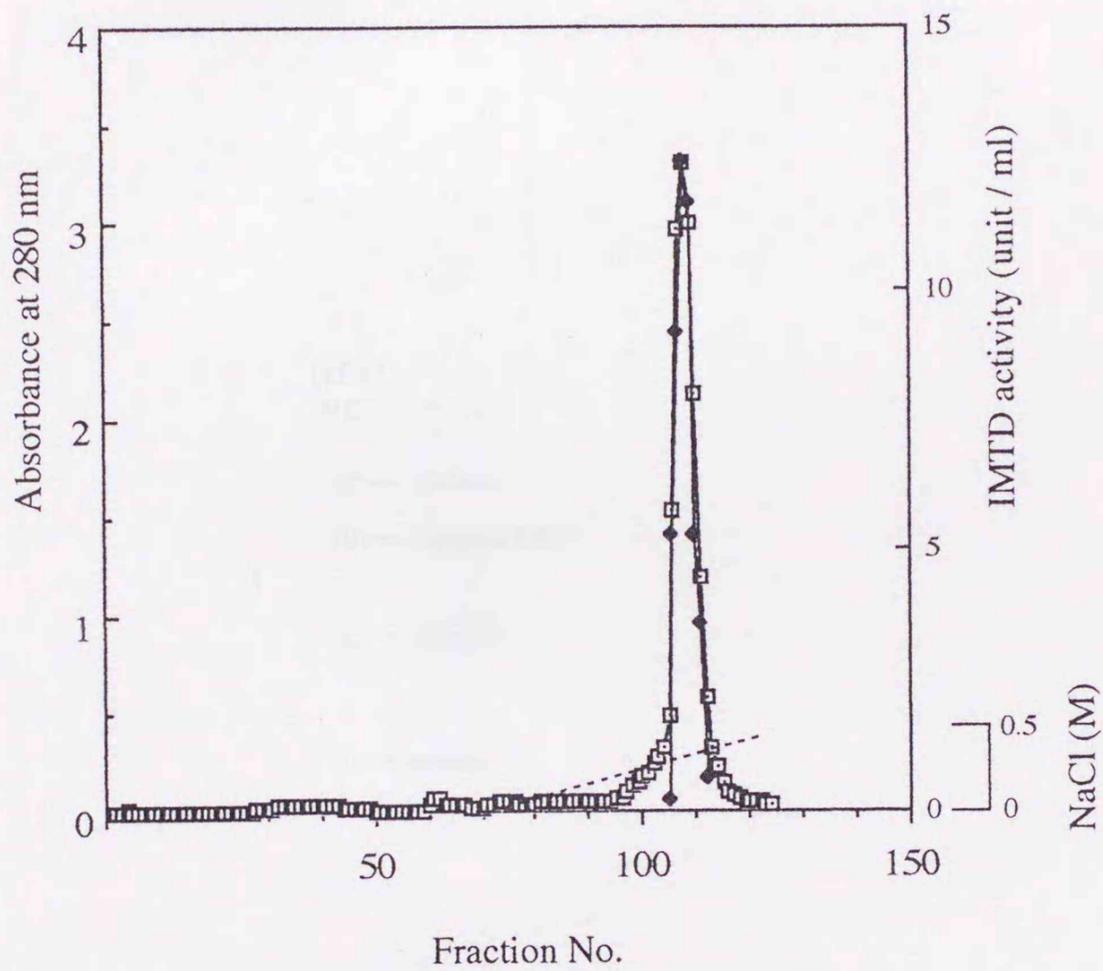


Figure 4-8. Chromatography of isomaltotrio-dextranase from *E. coli* ITD-N on a DEAE-Sepharose CL-6B (2nd) column.

The enzyme solution was put on a DEAE-Sepharose CL-6B column (1.8 x 33cm, 84 ml). Fractions of 2 ml each were collected at a flow rate of 5ml / hr (2 cm / hr). □, absorbance at 280 nm; ◆, isomaltotrio-dextranase activity (unit / ml);—, NaCl concentration (M).

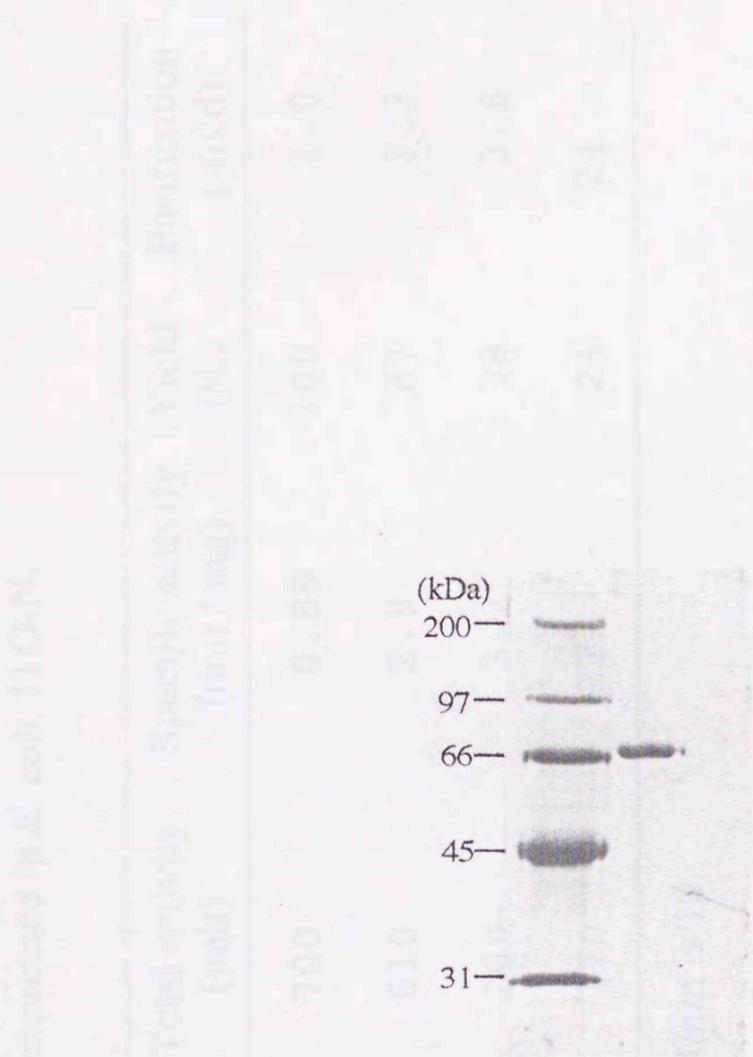


Figure 4-9. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified isomaltotriodextranase from *E. coli* ITD-N.

Table 4-2. Purification steps of isomaltotriose-dextranase expressed in *E. coli*. ITD-N.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit / mg)	Yield (%)	Purification (-fold)
Crude enzyme	790 ^a	700	0.88	100	1.0
DEAE-Sepharose CL-6B(1st)	210 ^a	610	2.9	87	3.3
Bio-Gel P-100	83 ^a	260	3.2	38	3.6
DEAE-Sepharose CL-6B(2nd)	7.9 ^b	170	21	24	24

a : calculated under the assumption that $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ at 280nm is 10.

b : measured by the Bradford method⁽⁶⁹⁾.

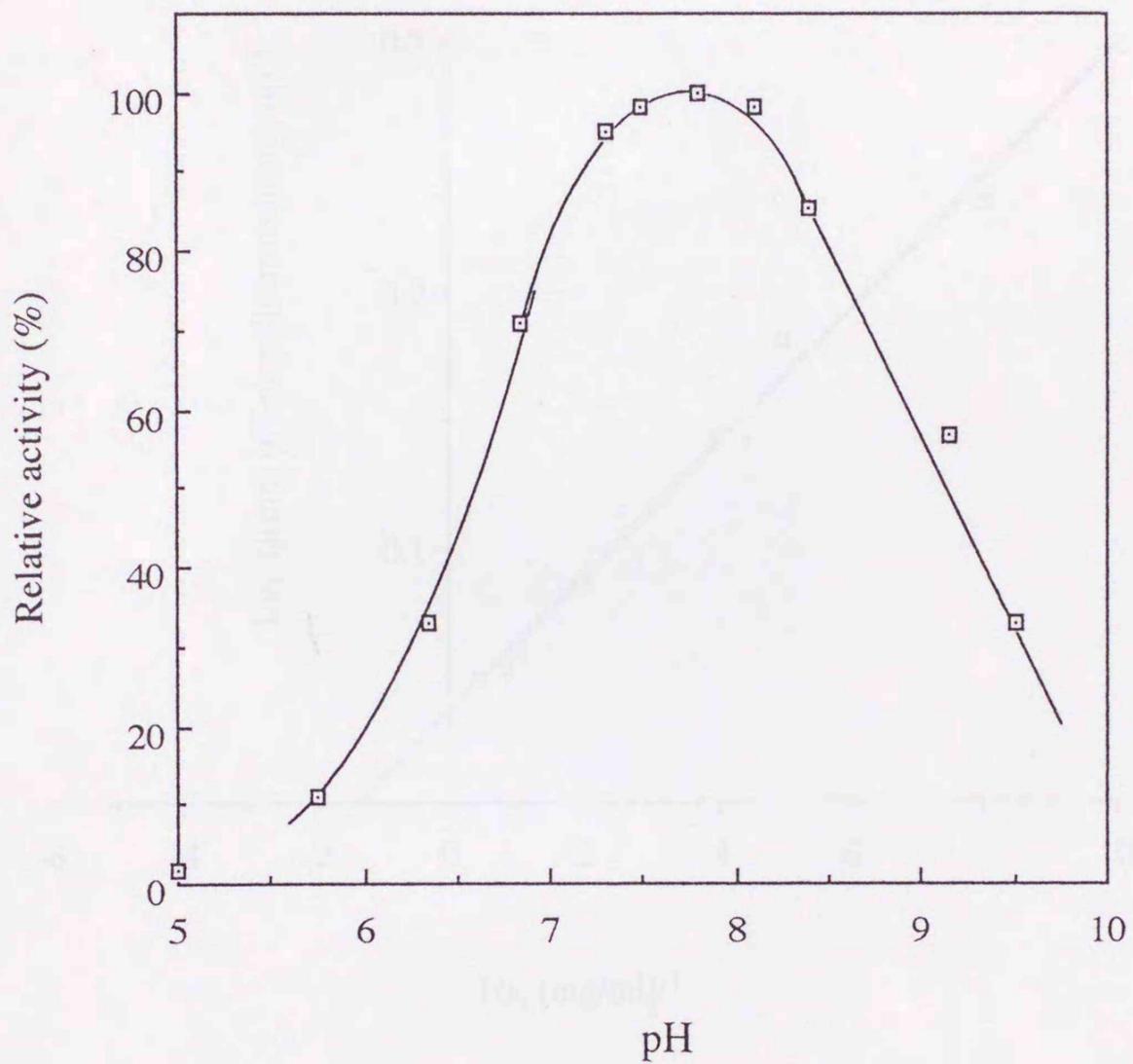


Figure 4-10 . Effects of pH on the activity of isomaltotriose-dextranase expressed in *E. coli* ITD-N.

The enzyme activity was measured in the standard reaction except that Britton - Robinson buffer of each pH was used.

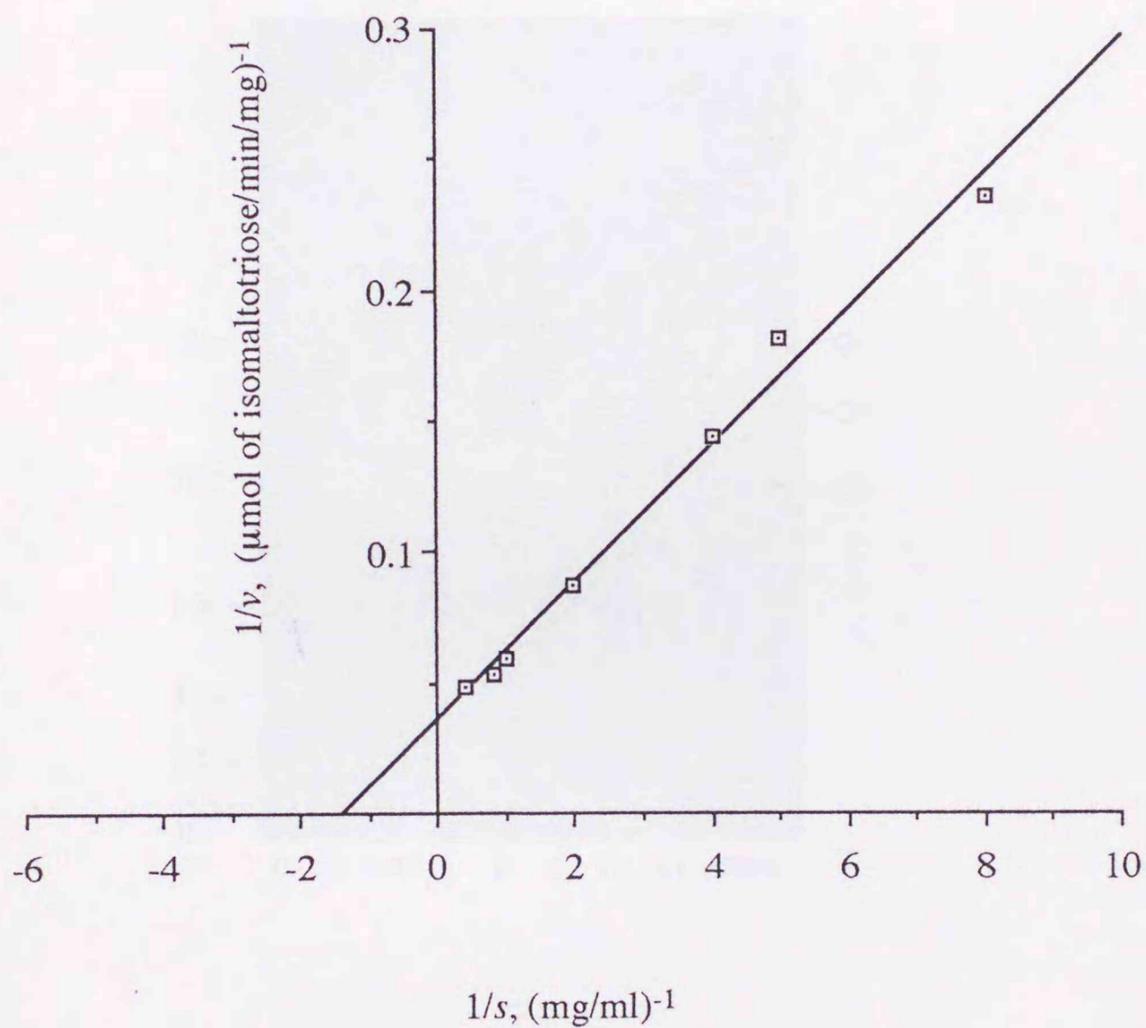


Figure 4-11. Lineweaver - Burk plots of hydrolysis of dextran by isomaltotriose-dextranase expressed in *E. coli* ITD-N.

The reciprocal values of the dextran-hydrolytic velocity and substrate concentration were plotted. For calculation of the K_m and V , the least squares method ⁴⁵⁾ was used.

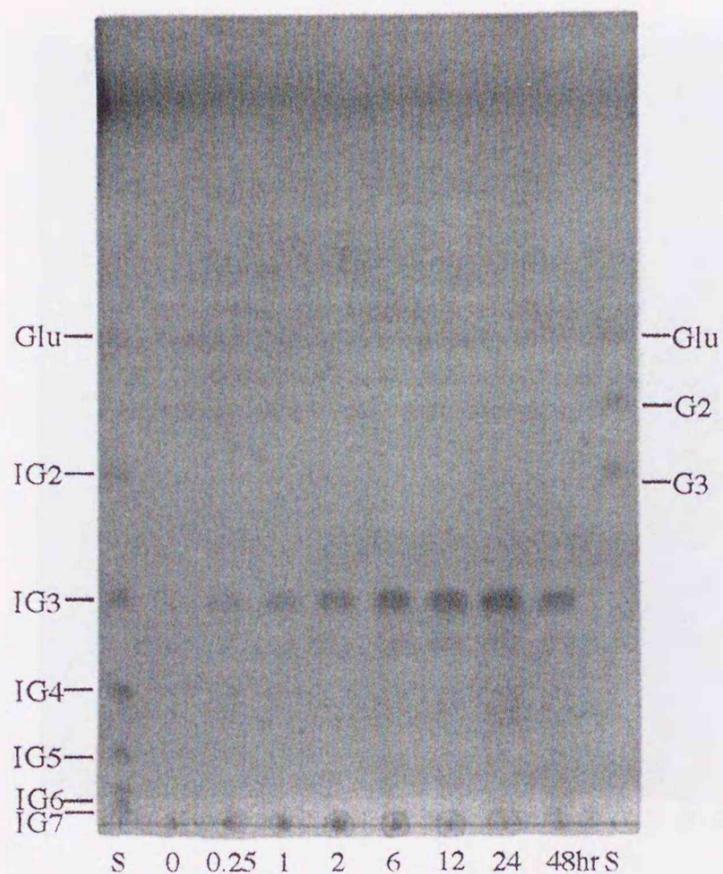
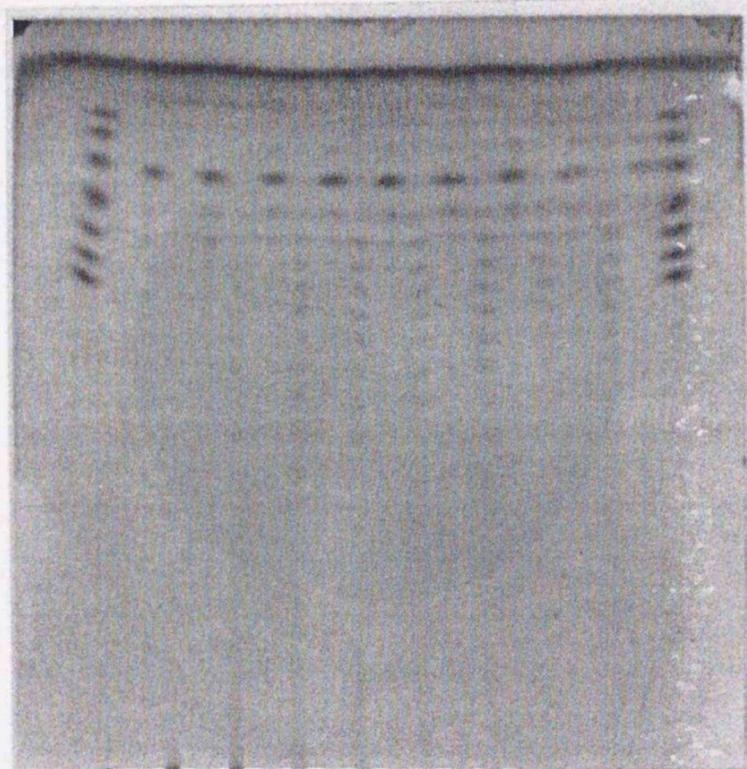


Figure 4-12. TLC for hydrolysis products of dextran by isomaltotriodextranase expressed in *E. coli* ITD-N.

Reaction mixture was boiled to inactivate the enzyme at indicated times. Development was done with a solvent system of isopropanol: *n*-butanol:H₂O=12:3:4 (v / v).

S, standards: Glu, glucose; G2, maltose; G3, maltotriose; IG2, isomaltose; IG3, isomaltotriose; IG4, isomaltotetraose; IG5, isomaltopentaose; IG6, isomaltohexaose; IG7, isomaltoheptaose.



S 1 1' 2 2' 3 3' 4 4' 5 5' 6 6' 7 7' 8 8' 9 9' S

Figure 4-13 . Thin layer chromatography of debranched dextran and its products by isomaltotrio-dextranase.

Dextran was treated with 0-0.4N HCl for 4 hr and neutralized with NaOH. Debranched dextran was hydrolyzed with isomaltotrio-dextranase at 37°C and for 48 hr. S, standards (glucose, IG2,IG3, IG4,IG5, IG6, and IG7). Dextran was debranched with HCl of 0N (lane 1), 0.05N (lane 2), 0.1N (lane 3), 0.15N (lane 4),0.2N (lane 5), 0.25N (lane 6), 0.3N (lane 7), 0.35N (lane 8), 0.4N (lane 9). After neutralization, each acid-treated dextran was hydrolyzed with isomaltotrio-dextranase (lane 1'-9'). Development was done with a solvent system of acetonitryl:ethyl acetate:1-propanol:H₂O = 85:20:50:100 (v/v).

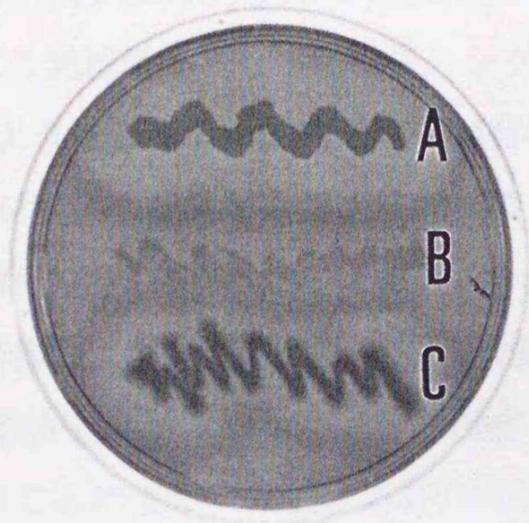


Figure 4-14. Detection of isomaltotrio-dextranase activity through halo formation on blue-dextran plate.

The medium used for blue-dextran plate was the same one of *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* slant with 0.2% Blue dextran 2000 (Pharmacia).

Before incubation, 50 μ l of 0.1M IPTG was spread on the surface.

A, *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* strain 0407; B, *E. coli* BL21 (DE3);

C, *E. coli* ITD-N.

第5節 要約

B. fuscum var. *dextranlyticum* 0407株のゲノムDNAより単離したイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子 (*imtd*)の大腸菌での発現を行った。*imtd*断片は成熟酵素をコードする部分のみとシグナル配列をコードする部分も含めた領域の2種類を調製し、それぞれ発現用プラスミドのT7ファージプロモーター下流に導入した。IPTGによる発現誘導を行った結果、シグナル配列部位を有する場合オリジナルの酵素と同じようにシグナル配列の切断が行われていたが、発現量は低く抑えられた。これは、シグナル配列が大腸菌においても分泌シグナルとして機能し、酵素がペリプラズム画分に蓄積するからであろう。一方成熟酵素部分のみを導入した場合、37℃での培養および1 mM IPTGによる発現誘導条件では発現タンパク質が不溶性となり、活性が得られなかった。培養温度を18℃に設定し、IPTG添加量を0.5 mMにまで下げるにより、発現酵素が可溶性となり、最終的に発現酵素は菌体タンパク質の約18%にまで達した。培養液あたりのイソマルトトリオデキストラナーゼ活性は、*B. fuscum* var. *dextranlyticum*と培養上清と比較して約2.9倍となった。大腸菌組換え体の無細胞抽出液よりイソマルトトリオデキストラナーゼの精製を行い、諸性質についてオリジナルの酵素と比較したが、比活性はオリジナルに比べ半分以下となり、 K_m の増加、 V の減少が確認された。

第5章 *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株におけるデキストラン代謝機構

第1節 緒言

デキストランをはじめプルラン⁷¹⁾、キシラン⁷²⁾などの多糖類を代謝する細菌より、これらの分解酵素をコードする遺伝子が単離、解析されている。その遺伝子の周辺には分解生産物の菌体内への取り込みや、その分解産物よりエネルギーを得る経路の酵素をコードする遺伝子群が存在し、オペロンを形成していると報告されている。^{71,72)} プルラナーゼおよび α -アミラーゼ活性を有する *Thermoanaerobacterium thermosulfrigenes* が、その染色体上にプルラナーゼをコードする遺伝子の3' 下流に、マルトース輸送タンパク質および α -アミラーゼをコードする遺伝子群が存在している^{71,73,74)}。またエンド型デキストラナーゼ生産菌として知られる *Streptococcus mutans* の染色体には、デキストラングルコシダーゼ遺伝子上流に α -ガラクトシダーゼ、糖質輸送タンパク質、ATP結合タンパク質などをコードする一連の遺伝子群が存在し、またこれらの遺伝子群のアンチセンス側に、多糖類代謝菌に見いだされている代謝制御タンパク質をコードする遺伝子も報告されている⁷⁵⁾。

第3章において、イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子 (*imtd*) の上流域には α -グルコシダーゼのC末端領域をコードしていると思われるORFの存在が明らかとなった。さらにfragment BHにおいてイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子上流域にプロモーター領域が存在せず、イソマルトトリオデキストラナーゼは本ORFとポリシストロニックな発現を行っていることが示唆された。これらのことは、*B. fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株の染色体上において、*imtd* 上流に他の多糖類分解酵素生産菌で見いだされているような糖質代謝に関わる遺伝子群が存在している可能性を示している。

本章では、第3章で単離した断片をもとに *imtd* の5' 末端側上流域への遺伝子歩行を行い、その結果見いだされたデキストラン代謝に関わる一連の酵素、タンパク質をコードする遺伝子群について報告する。さらに、第3章において見いだされなかったイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の発現に関わるプロモーター領域の推

定についてあわせて報告する。

第2節 実験材料および方法

1. 使用菌株

クローニングおよび塩基配列の決定に用いた大腸菌、プラスミドおよびこれらの取り扱いについては第3章に記載した。

2. *imtd*上流域のクローニング

基本操作は第3章で示したゲノミックDNAライブラリーのスクリーニングと同様の方法を用いた。クローニング用のプローブには第3章で単離した *Bam*HI断片 (4,506 pb)より、*Bam*HI-*Xho*I断片 (730 bp) を調製し、DIGでラベルしたものを使用した。DIGラベリングはDIG-High Prime (Boeringer mannheim)を用いて行った。ハイブリダーゼーションおよび洗浄は68 °Cで行った。

3. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)⁵³⁾

PCRにはGeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) を用いて行った。IMTD 遺伝子上流域のクローニングにより得られた *Sma*I-*Kpn*I断片 (3391 bp) の配列を基にオリゴヌクレオチドプライマー *Bam*1898 (TCCCAAACGGGATTGGTACA-TCTG, 24 mer) および *Xba*476 (CCTCTAGAAGTTGGAAAAGGAGAAGTACGCG, 31 mer) を合成した。PCR反応はTaKaRa Ex Taq (宝酒造)を用いた。PCRの反応組成100 μ lは10 ng 鋳型DNA、60 pmol *Bam*1898プライマー、60 pmol *Xba*476プライマー、0.2 mM dNTP混合物、2.5 unit Ex Taqを含むTaq緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂] からなり、94 °C、1 分間 (DNA 変性)-55 °C、2 分間 (プライマーのアニール)-72 °C、3 分間 (プライマーの伸長)の反応を25 サイクル行った。PCR産物は *Bam*HI および *Xba*I で消化した後、1 % アガロース電気泳動に供した。ゲルより回収したDNA断片は大腸菌プラスミド pBluescript II KS (+)の *Bam*HI および *Xba*I サイトにLigation kit (宝酒造)を用いて連結した後大腸菌JM109に導入し、その後の解析に用いた。

4. 塩基配列の決定

核酸電気泳動、DNAシーケンス用電気泳動、塩基配列およびアミノ酸配列の解析で用いた装置および基本操作についてはすべて第3章に記載した方法で行った。

5. 類似配列の検索および比較

相同性配列の検索および配列の比較はすべて第3章に記載したプログラムを用いて行った。

6. プロモーター領域の検索

DNA配列上に存在するプロモーター領域の検索はインターネットのプログラム⁷⁶⁾ (Promoter Prediction by Neural Network, address: <http://www-hgc.lbl.gov/projects/promoter.html>)を用いておこなった。

第3節 実験結果

第1項 イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子(*imtd*)上流域の解析

1. サザンハイブリダイゼーション (1回目)

第3章で作製したpBHの制限酵素地図、およびサザンハイブリダイゼーションの結果から、得られたfragment BHの5'末端側上流よりさらに2,000 bp上流に*Sma*Iによる認識部位が存在することが明らかになっている (Figure 3-2参照)。一方、fragment BHの5'末端側*Bam*HI-*Xho*I (730 bp) を用いてプローブ (probe BX) を作製し、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った (Figure 5-1)。その結果、*Eco*RI、*Eco*RI-*Sma*I、*Kpn*I、および*Kpn*I-*Sma*Iの各制限酵素で消化した*B. fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株のゲノム断片で、それぞれ約4,600、3,900、3,950、および3,400 bpに陽性シグナルを得た (*Apa*Iでの消化は不十分)。これらの結果より、ゲノムDNAを*Sma*Iと*Kpn*Iで消化し、約3.4 kbの*Sma*I-*Kpn*I断片をクローニングすることにより、pBHに含まれる*Bam*HI断片よりさらに2 kbほど上流の解析が可能であると判断した。

2. コロニーハイブリダイゼーション

B. fuscum var. *dextranlyticum* 0407菌株のゲノムDNAを*Sma*Iおよび*Kpn*Iで完全に消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。ゲルより3-4 kbのDNA断片を抽出し、*Sma*Iおよび*Kpn*Iで消化した大腸菌プラスミドpBluescript II KS (+)に導入後、大腸菌JM109の形質転換を行った。これをIPTGおよびX-Galを塗布したLB / Ampプレートに播種することにより、約1,200 個の組み換え体コロニーを得た (200 colonies/plate、組み換え体は全体の2/3)。プローブBXを用いたコロニーハイブリダイゼーションによるスクリーニングの結果、4個のコロニーにおいて陽性シグナルが確認された。各大腸菌が持つプラスミドについてそれぞれ制限酵素地図を作成した結果、3個のコロニーにおいて同じ制限酵素認識部位を有しており、かつpBHと重複する部分では同じ制限酵素地図を示した。従って得られた3個の陽性コロニーより一つを選択し、プラスミドpSKとして解析を行った。

3. fragment SKの解析

プラスミドpSKが有する約3.4 kbの *Sma*I-*Kpn*I断片 (fragment SK) に関して詳細な制限酵素地図を作製し、配列の決定を行った (Figure 5-2)。Fragment SKは全長3,391 bpであり、このうち3'側1,412 bpは先にクローニングしたfragment BHの *Bam*HI-*Kpn*I領域の配列と完全に一致した。本DNA断片には5'末端がとぎれているORF (*dexD*)、867 bpからなるORF (*dexC*)、全 *dexA*、*imtd*の5'末端が存在していた (Figure 5-3)。プロモーター配列の検索の結果、本DNA断片上にプロモーター領域と思われる配列は見いだされなかった。

4. サザンハイブリダイゼーション (2回目)

Fragment SKより制限酵素 *Hinc*IIを用いて602 bpの断片を調製し、DIGでラベルしたプローブ (probe HCII602) を作製した。 *Bam*HI、*Xho*I、*Sa*II、およびそれらと各種制限酵素で消化した *B. fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株のゲノムDNA断片に対するサザン解析の結果、fragment SKの5'末端より約3 kb上流に *Bam*HI認識部位が、同じく2.5 kb上流に *Sa*IIの認識部位が存在することが確認された (Figure 5-4)。

5. IPCR⁷⁷⁾によるfragment SKの5'末端側上流域の増幅

Fragment SKの5'末端側上流域の解析を行うため、サザンハイブリダイゼーションで確認されたfragment SKの5'末端側上流にある *Sa*II認識部位からfragment SK中の *Bam*HI部位までの約4.5 kbのクローニングを試みたが、プローブHCII602を用いたコロニーハイブリダイゼーションの結果、目的の断片を含んだポジティブクローンを得ることができなかった。そこでfragment SK上流域のクローニングに代わりに、 *B. fuscum* var. *dextranlyticum* ゲノムDNAの *Bam*HI断片(約5 kb)を用いたIPCRを行い、得られたfragment SKの5'末端側上流の増幅断片の解析を行った (Figure 5-5参照)。fragment SKの部分配列を基にして作製したプライマー (*Bam* 1898および *Xba* 476)を用いたPCRの結果、fragment SKの5'末端上流域約3 kbを含む3.5kbのDNA断片の増幅が確認された (Figure 5-6)。本増幅断片を *Bam*HIおよび *Xba*Iで消化し、大腸菌プラスミドpBluescript II KS (+)の同制限酵素認識部位に導入した結果、fragment SKの上流域約3 kbを持つプラスミドpBXを得

た。

6. fragment BXの解析

プラスミド pBXに含まれる *Bam*HI-*Xba*I断片 (fragment BX)について詳細な制限酵素地図を作製し、配列を決定した (Figure 5-7)。fragment BXは全長3378 bpからなり、3'末端側末端の474 bpはfragment SKの5'末端の配列と完全に一致していた。本断片にはfragment SKで確認されたdexDの5'末端部位、765 bpからなるORF (*dexE*)、および5'末端から1072 bpまでの領域において、相補鎖側 (相補鎖の3'末端1072 bp) にさらに一つのORF部分 (*dexR*)が存在していた。プロモーター配列の検索の結果、本DNA断片上においてセンス側に2箇所 (position 1101-1146 およびposition 2668-2713)、相補鎖側において1箇所 (position 2204-2159)においてプロモーターと考えられる配列が存在した。Fragment BH、SK、およびBXの配列決定により判明した*imtd*周辺のORFの位置、大きさおよび方向、プロモーターの位置および方向についてはFigure 5-8に、解析した全DNA配列についてはFigure 5-9に示した。

第2項 各ORFと糖質関連酵素およびタンパク質との相同性

1. *dexA*

Fragment BHにおいて3'末端側領域のみが確認されていた α -グルコシダーゼと相同性の高い配列 (*dexA*)は、fragment SHのクローニングにより全長が解析された。*dexA*のDNA配列、および推定アミノ酸配列についてはFigure 5-10に示した。本遺伝子の全長は1725 bpであり、開始コドンから8~11 bp上流にShine-Dalgarno (SD)配列が、終始コドンから1~18 bp下流には自立ターミネーターと考えられる回文配列が存在していた。本遺伝子におけるGC含量および使用されているコドン頻度についてTable 5-1にまとめた。ORFにおけるGC含量は59.4%、使用されているコドンの3塩基目については、Cが全体の47.5%、G+Cで72%を占めていた。

類似配列の検索を行った結果、本ORFは*Bacillus thremoglucosidasius*⁶²⁾および*Bac. cereus*⁷⁸⁾が生産するオリゴ1,6-グルコシダーゼ、および*Streptococcus mutans*が生産するデキストラングルコシダーゼ⁷⁵⁾と相同性を示した (Figure 5-

11)。これらの配列に対し本遺伝子の推定アミノ酸配列はいずれも約50%以上アミノ酸配列が一致した。さらに、相同性を示した配列はいずれも、 α -アミラーゼファミリーという(β/α)₈-バレル構造を持つ糖質関連酵素ファミリーに属しており⁶³⁾、その特徴として、触媒部位あるいは基質結合部位と考えられている高度に保存された4つの領域 (consensus regions) を有している⁶³⁾。本遺伝子の推定アミノ酸配列もこの領域を高度に保持している(Figure 5-12)。

2. *dexC*、*dexD*および*dexE*

α -グルコシダーゼ遺伝子の5'末端側上流域に見いだされた3つのORFは、類似配列の検索の結果、いずれも糖質分解酵素をコードする遺伝子の周辺に見いだされた糖質の膜輸送に関わるタンパク質と類似性を示した^{71,79)}。このうち*dexC* (864 bp)と*dexD* (942 bp)は細菌の細胞膜輸送タンパク質ファミリー (ABC輸送体スーパーファミリー) に属する輸送タンパク質⁷¹⁾、*dexE* (765 bp)は糖質結合タンパク質⁷⁹⁾と類似性が見いだされた。各ORFの推定アミノ酸配列と他の糖質膜輸送タンパク質間で配列を比較した結果はFigures 5-13、5-14およびFigure 5-15に示した。

*DexC*および*DexD*に対する相同域の比較には、*Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1株由来の膜輸送タンパク質(*AmyC*および*AmyD*)⁷¹⁾を、*DexE*との配列比較には*Streptococcus pneumoniae*で見いだされた膜輸送タンパク質(*MalX*)⁷⁹⁾をそれぞれコードする遺伝子の推定アミノ酸配列を用いた。*DexC*、*DexD*、*DexE*それぞれの類似配列に対して一致および類似するアミノ酸残基は、*DexC*-*AmyC*でそれぞれ26%および44%、*DexD*-*AmyD*で27%および46%、*DexE*-*MalX*で25%および35%となった。

3. *dexR*

類似配列の検索の結果、*dexR*の推定アミノ酸配列 (*DexR*)はキシロースの代謝を行う乳酸桿菌*Lactobacillus pentosus*のキシロース代謝制御タンパク質 (キシロース代謝に関与する遺伝子群の発現を抑制する) である*XylR*のC末端側配列⁸⁰⁾と類似した配列を有していることが判明した。*DexR*の*XylR*に対する配列の比較結果をFigure 5-16に示した。*DexR*と*XylR*の配列保存領域および両配列の類似性は、それぞれ24%および40%となった。

第4節 考察

1. *B. fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株におけるデキストラン代謝オペロンの存在

第2章で報告したとおり、イソマルトトリオデキストラナーゼはシグナル配列の切断を伴って菌対外に分泌され、培地中に蓄積する。このことはイソマルトトリオデキストラナーゼによるデキストランの分解が菌体の外で行われていることを示している。イソマルトトリオデキストラナーゼ生産菌である*B. fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株がデキストラン分解物をエネルギー源として利用するためには、分解産物であるイソマルトトリオースを菌体内へ輸送するタンパク質、さらにイソマルトトリオースをグルコースにまで分解する酵素(α -グルコシダーゼ)が必要となる。本菌におけるデキストラン代謝を解明するためには、これらのタンパク質の解明を行う必要があると考えていたが、第3章において*imtd*を含む*Bam*HI断片を解析した結果、イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子上流には推定アミノ酸配列が*Bacillus*属の細菌が生産するオリゴ1,6-グルコシダーゼ(α -グルコシダーゼ)⁶²⁾と相同性を持つORFのC末端側の一部が存在していることが確認された。そこでイソマルトトリオデキストラナーゼ活性が最大に達した培養96時間目において、培養上清と菌体内における α -グルコシダーゼ活性を測定した結果、培養上清には活性は認められず、超音波破碎した菌体の無細胞抽出画分において活性が認められた。この α -グルコシダーゼは至適pHが中性付近にあり、マルトオリゴ糖よりもイソマルトオリゴ糖により高い分解活性を示した(データは示していない)。一方、多糖類分解能を有する細菌では、分解する糖からグルコースを生産し、解糖系においてエネルギーを得るために必要なタンパク質をコードする遺伝子群が染色体上の一箇所に集中し、カタボライト抑制などの調節機構がその遺伝子群の複数の箇所において同時に行われている例がいくつか報告されている。例えば、*Thermoanaerobacterium thermosulfrigenes* EM1株は菌体外に α -アミラーゼ⁷³⁾、細胞膜の外側において膜に結合する形でプルラナーゼを生産し⁷⁴⁾、菌体内に α -グルコシダーゼを生産する高熱菌であるが⁷⁰⁾、染色体上に α -アミラーゼ遺伝子(*amyA*)とプルラナーゼ遺伝子(*amyB*)に挟まれる形で膜輸送タンパク質(*amyC*および*amyD*)、および糖質結合タンパク質(*amyE*)が存在している⁷¹⁾。*amyA*および

*amyB*がそれぞれ独自の、*amyC*、*D*、*E*は*amyE*の5'末端側上流にあるプロモーターを有しているが、それぞれのプロモーターによる発現制御以外にも、その5'末端側に存在するORFのプロモーターによっても転写が行われていることがノーザン解析により明らかにされており、多糖類分解酵素と糖質の膜輸送に関わるタンパク質の発現が協調的に行われていることが報告されている。*B. fuscum var.*

dextranlyticum 0407株においても同様に α -グルコシダーゼおよび糖質の膜輸送に関わるタンパク質が存在する場合、fragment BHの解析結果よりイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の3'末端側自己のプロモーター領域を有するトランスポサーゼ遺伝子が存在し、これが糖質の代謝に関わらないものと推定されることから、他の糖質関連タンパク質が存在するのは全てイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の5'末端側上流域であることが推測された。これらのことを解明すべく、さらにイソマルトトリオデキストラナーゼの発現に関わるプロモーター領域の検索を行うために、5'末端側上流域の解析をおこなった。

2. 各ORFの相同性

1) DexA、およびDexCDE

クローニングおよびIPCRによりイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子上流域を解析した結果、*imtd*の上流約6 kbにおいて5個のORF(*dexACDER*)が存在し、いずれも糖質の代謝に関わるタンパク質および酵素と相同性を示した。特にDexAはイソマルトオリゴ糖に高い活性を示す酵素群（オリゴ1,6-グルコシダーゼおよびデキストラングルコシダーゼ）と高い相同性を示し、菌体においてこれらの酵素と同様の活性が確認され、さらにFigure 5-1に示したサザン解析の結果から本遺伝子が染色体上に1コピーしか存在していないことから、本ORFの発現産物が α -グルコシダーゼであることが推定された。これらについては第6章において詳しく報告する。

一方、さらに上流域に見いだされたORFはそれぞれ膜輸送タンパク質および糖質結合タンパク質と低いながらも相同性を示した。相同性を示したタンパク質(*AmyC*、*AmyD*、および*MalX*)はいずれも糖質分解酵素の周辺に見いだされたものであるが、いずれも大腸菌のABC (ATP-binding cassette)トランスポーターと呼ばれる一連のATP依存型膜輸送タンパク質と相同性を持つものとして見いだされてい

るが、AmyC、AmyDのようにATPに依存しない種類も存在する。本菌におけるイソマルトトリオデキストラナーゼと α -グルコシダーゼの存在位置より、糖質の膜輸送はデキストラン代謝の重要な位置を占めており、本菌においても他の多糖類分解酵素同様に糖質分解酵素遺伝子の周辺に存在し、それらと連動する状態で発現することは当然のことと考えられる。本論文では相同性により各ORFの役割を推定するにとどまり、実際の働きについての情報は、プライマー伸長法を用いて各ORFの転写開始点を決定する他、各ORFの配列を基に作製したプローブを用い、培地中の炭素源(デキストラン、イソマルトトリオース、グルコースなど)と転写産物の関係をノーザン解析により解明することにより解明されることを期待する。

2) DexR

DexRと相同性を示したキシロース代謝抑制タンパク質XylR⁸⁰⁾は、キシロース資化菌である*Lactobacillus pentusus*の染色体上において、2種の膜輸送タンパク質(XylPおよびXylQ)、とキシロース代謝の第一反応を司るキシロースイソメラーゼ(XylA)に挟まれる状態で存在している。キシロースの代謝抑制はXylRとCcpAという2種類のタンパク質で行われているが⁸¹⁾、CcpAがキシロースイソメラーゼのプロモーター領域に存在するコンセンサスな結合領域(*Thermoanaerobacterium thermosulfrigenes*のamyABEの各プロモーター周辺にも存在)と結合し、代謝産物による転写抑制(カタボライト抑制)をおこなうのに対し、XylRはカタボライト抑制とは異なる経路で下流のXylAおよびXylB(キシロースキナーゼ)の転写を抑制している⁸¹⁾。*B. fuscum* var. *dextranlyticum*で見いだされたDexRによる α -グルコシダーゼやイソマルトトリオデキストラナーゼの転写抑制の有無についてはさらにDexR変異株を用いたノーザンハイブリダイゼーションなどを行う必要があるが、プロモーター領域の200bp前後にあると言われる代謝抑制タンパク質の結合領域は、今回解析した配列上に見いだされたプロモーター領域の周辺には見いだされず、XylR同様DexRによる転写抑制もグルコースなどにより誘導されない非カタボライト抑制型であることが推測された。

3. プロモーター領域

解析した*B. fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株の染色体DNA断片(9,500

bp) には4箇所のプロモーター領域が見いだされ (Figure 5-8)、それぞれ *dexR*、*dexE* および *dexD*、*dexA* および *imtd*、*trpA* のグループで発現を行っていると考えられた。しかしながら、開始コドンから推定転写開始点まで 33 bp という妥当な位置に存在する *trpA* 上流のプロモーター領域に対し、デキストラン代謝酵素およびタンパク質の発現に関わるプロモーター領域は、最初の開始コドンまでいずれも 300 ~ 1000 bp 以上の距離があった。原核生物における発現であることから、途中で終始コドンおよび自立ターミネーターが存在しない限りこの状態でも発現が可能であると考えられるが、mRNA の分解を考慮するとこの開始コドンまでの距離は非常に不利であるだろうと推定された。ただしこのスペースに代謝および転写抑制に関わるシグナルが存在することも考えられることから、これらについてもノーザン解析およびプライマー伸長法による転写開始点の特定を行い、解明されることを期待したい。

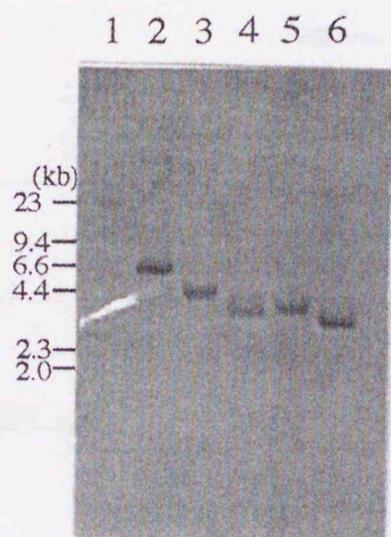


Figure 5-1. Southern blot analysis of *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* genomic DNA fragments of using the BX730 probe.

Genomic DNA ($5 \mu\text{l}$) was digested with *Apa*I (lane 1), *Apa*I-*Sma*I (lane 2), *Eco*RI (lane 3), *Eco*RI-*Sma*I (lane 4), *Kpn*I (lane 5), *Kpn*I-*Sma*I (lane 6) and fractionated on a 0.8% agarose gel. DNA fragments were transferred to a nylon membrane and probed with DIG-labeled DNA fragment BX730. An X-ray film was exposed for 3hr at room temperature.

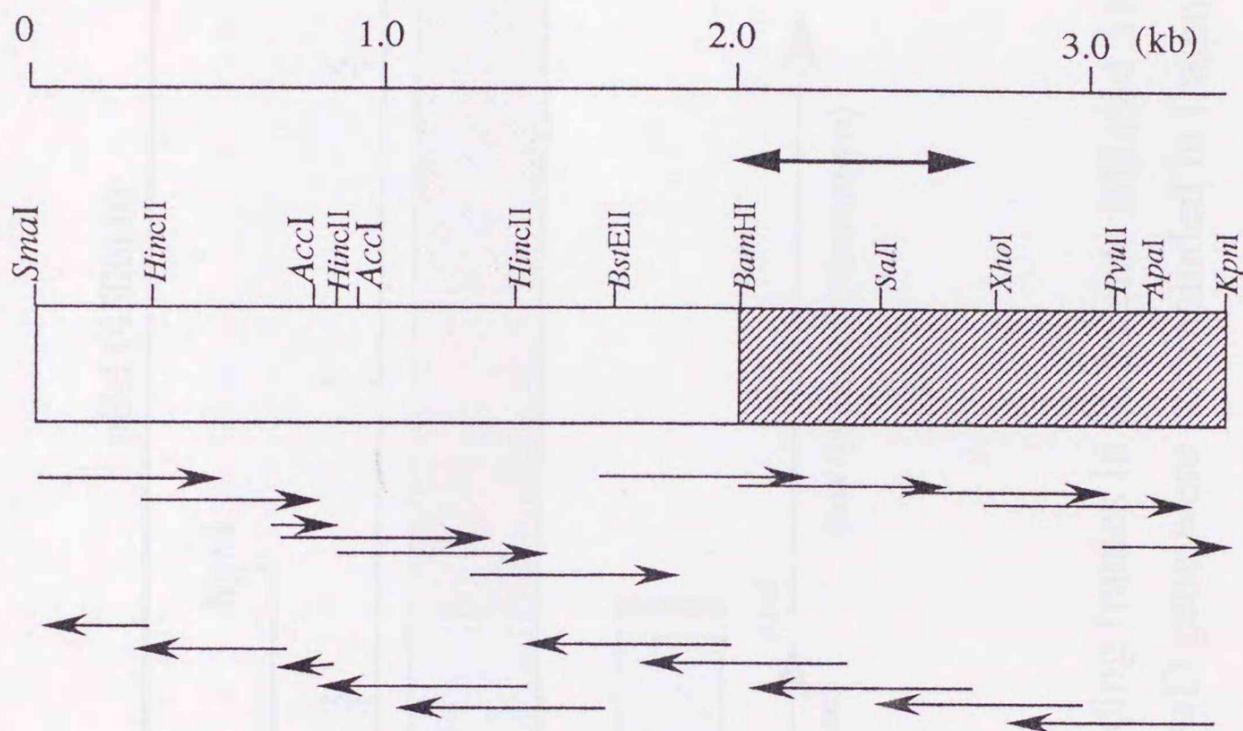
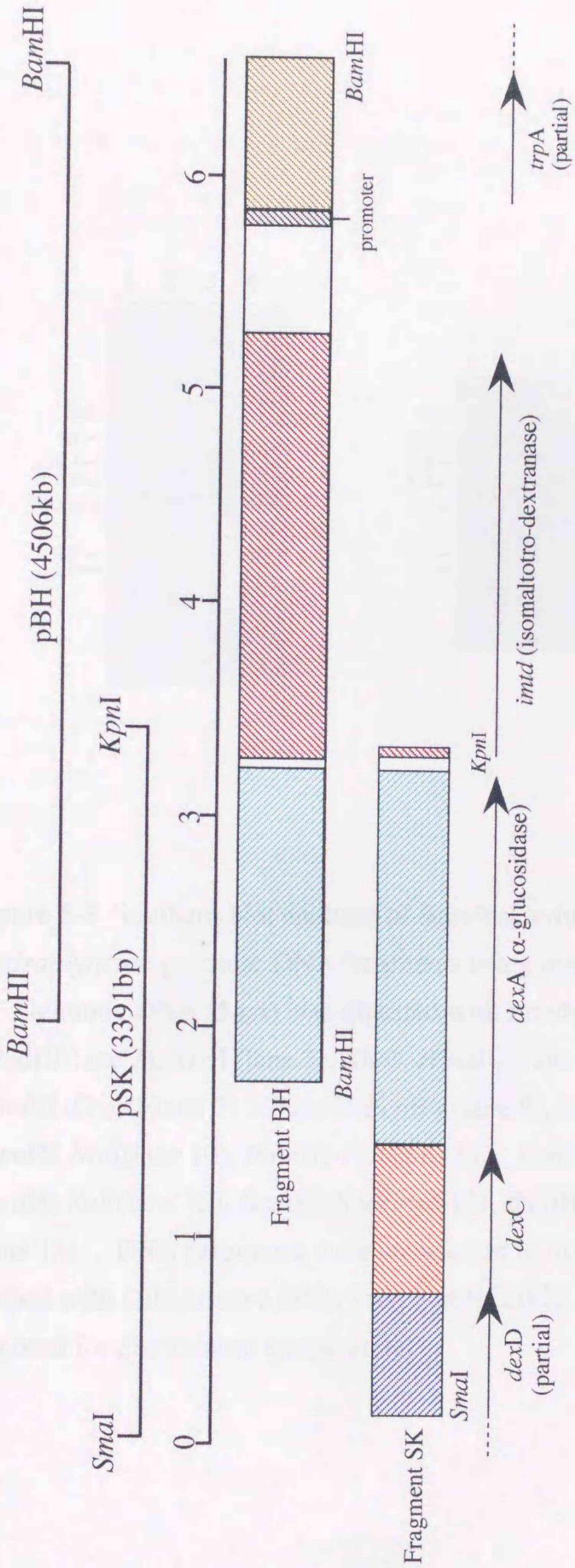


Figure 5-2. Restriction map and sequence strategy of fragment SK.

The region which overlapped with fragment BH was showed as shadow.
 DNA fragment used for making probe was showed by a two-direction allow.



[111]

Figure 5-3 . Open reading frames in fragments BH and SK.
The 5' region of *dexD* gene were not included in fragment SK.

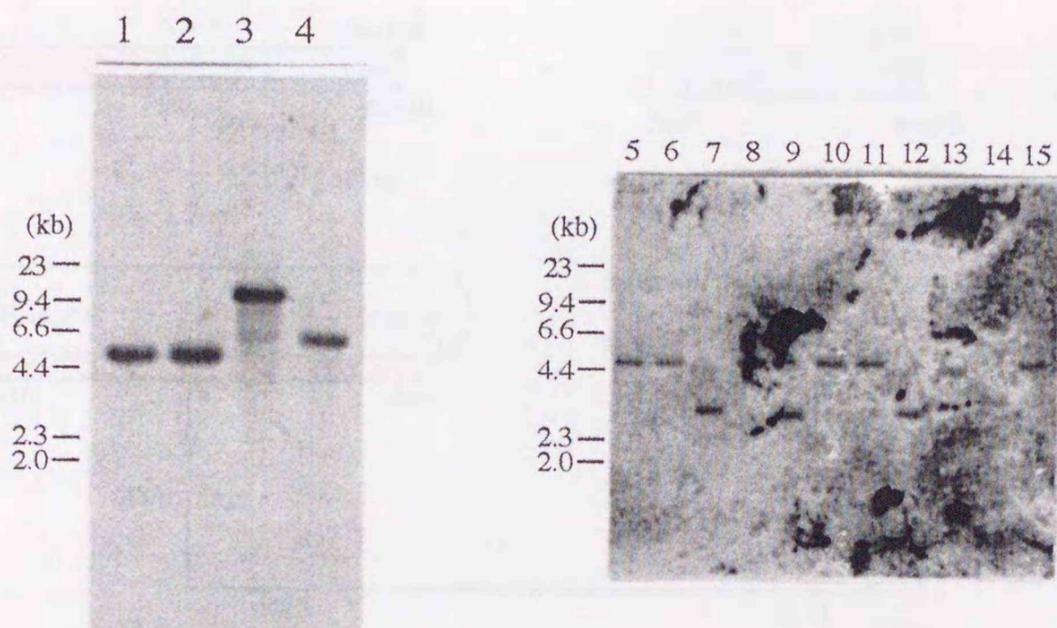


Figure 5-4. Southern blot analysis of *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* genomic DNA fragments using the HCII602 probe.

Genomic DNA ($5 \mu\text{l}$) was digested with *Bam*HI (lane 1, 5), *Bam*HI-*Hind*III (lane 2), *Xho*I (lane 3), *Xho*I -*Hind*III (lane 4), *Bam*HI-*Apa*I (lane 6), *Bam*HI-*Eco*RI (lane 7), *Bam*HI-*Eco*RV (lane 8), *Bam*HI-*Kpn*I (lane 9), *Bam*HI-*Not*I (lane 10), *Bam*HI-*Pst*I (lane 11), *Bam*HI-*Sac*I (lane 11), *Bam*HI-*Sal*I (lane 12), *Bam*HI-*Stu*I (lane 13), *Bam*HI-*Xba*I (lane 14), and *Sal*I (lane 15). DNA fragments were transferred to nylon membranes and probed with DIG-labeled DNA fragment HCII602. X-ray films were exposed for 3hr at room temperature.

Genomic DNA of *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum*

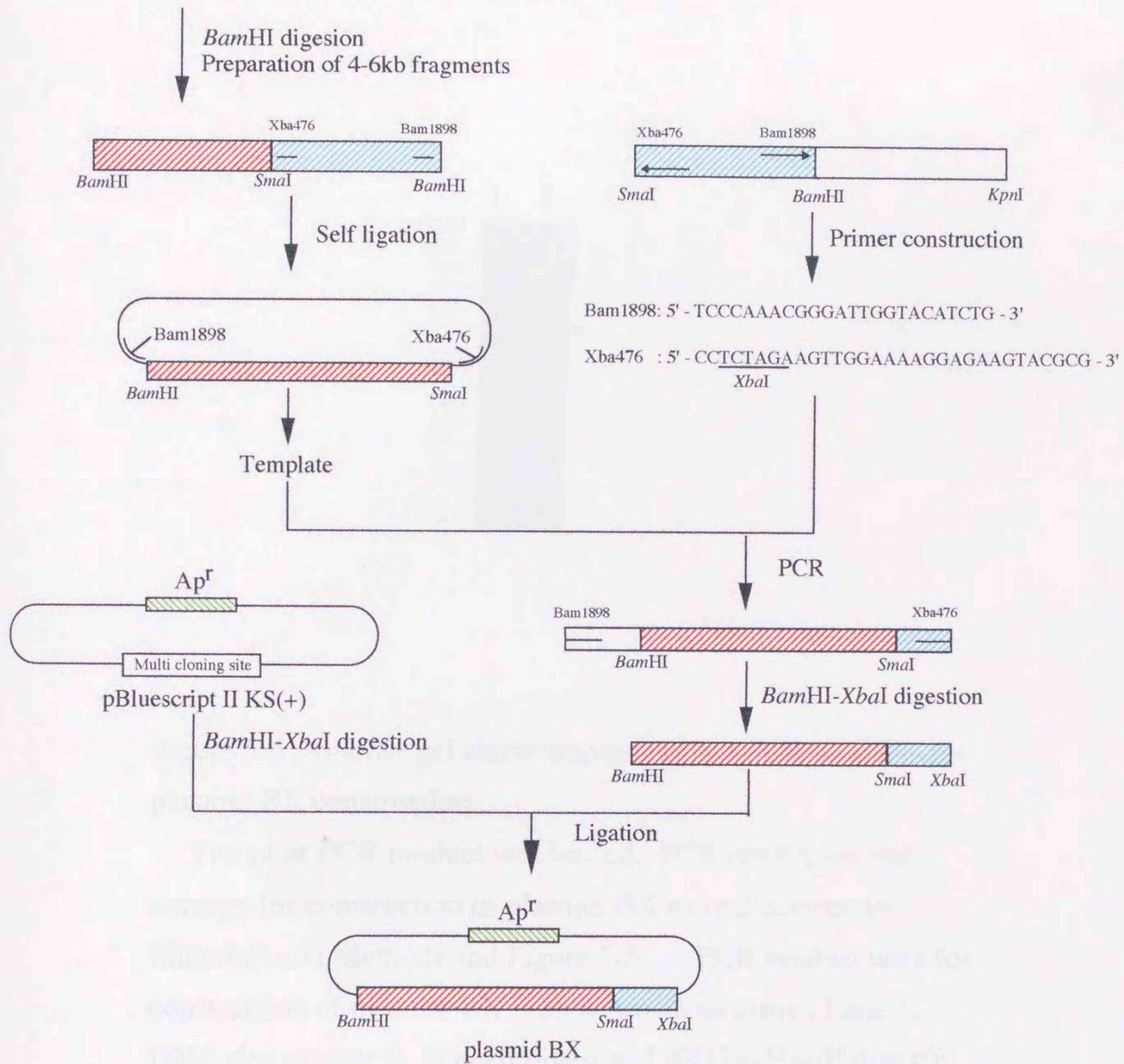


Figure 5-5. Strategy for construction of plasmid BX by inverse PCR.

Details are described in Materials and Methods. The regions of uncharacterized and overlapped with fragment SK are denoted with red and blue stripe, respectively.

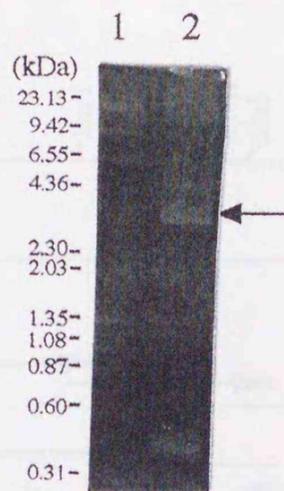


Figure 5-6 .Agarose gel electrophoresis of the PCR products for plasmid BX construction .

Ten μ l of PCR product was loaded. PCR conditions and strategy for construction of plasmid BX were described in Materials and Methods and Figure 5-5. PCR product used for construction of plasmid BX is shown with an arrow. Lane 1, DNA size marker (λ -*Hind*III digest and ϕ X174-*Hae*III digest); lane 2, the PCR product from self-ligated *Bam*HI fragments using Bam1898 and Xba 476 primers.

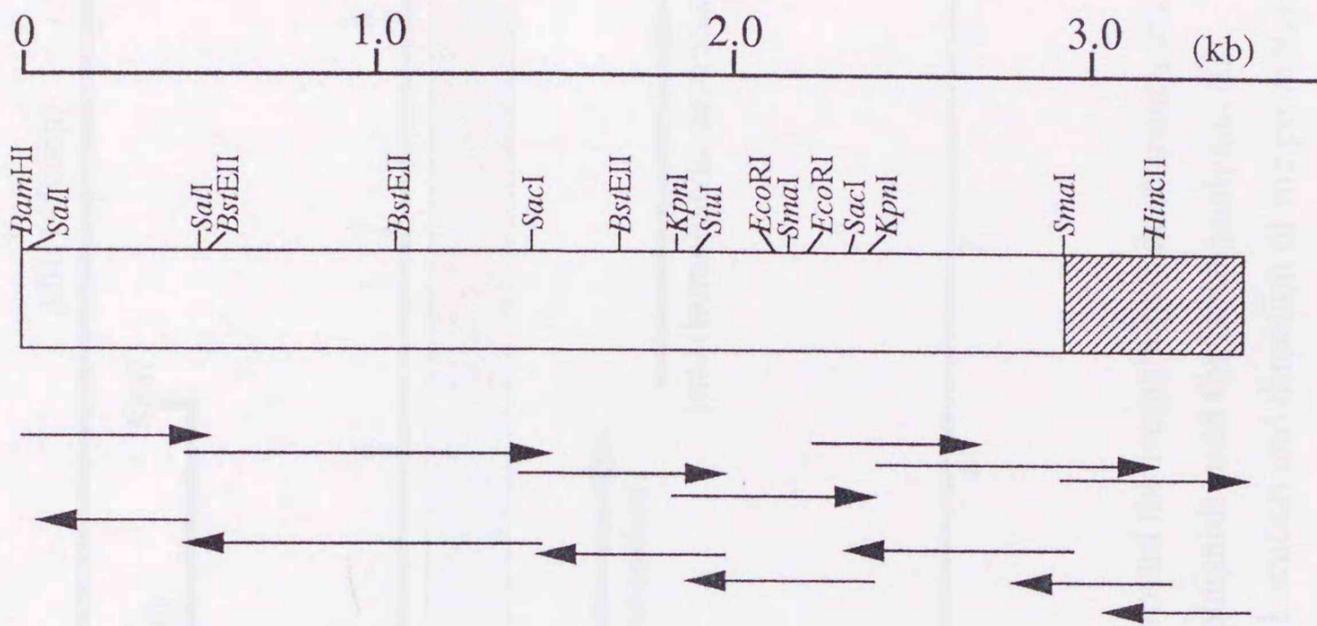


Figure 5-7. Restriction map and sequence strategy of fragment BX.

The region which overlapped with fragment SK was showed as shadow.

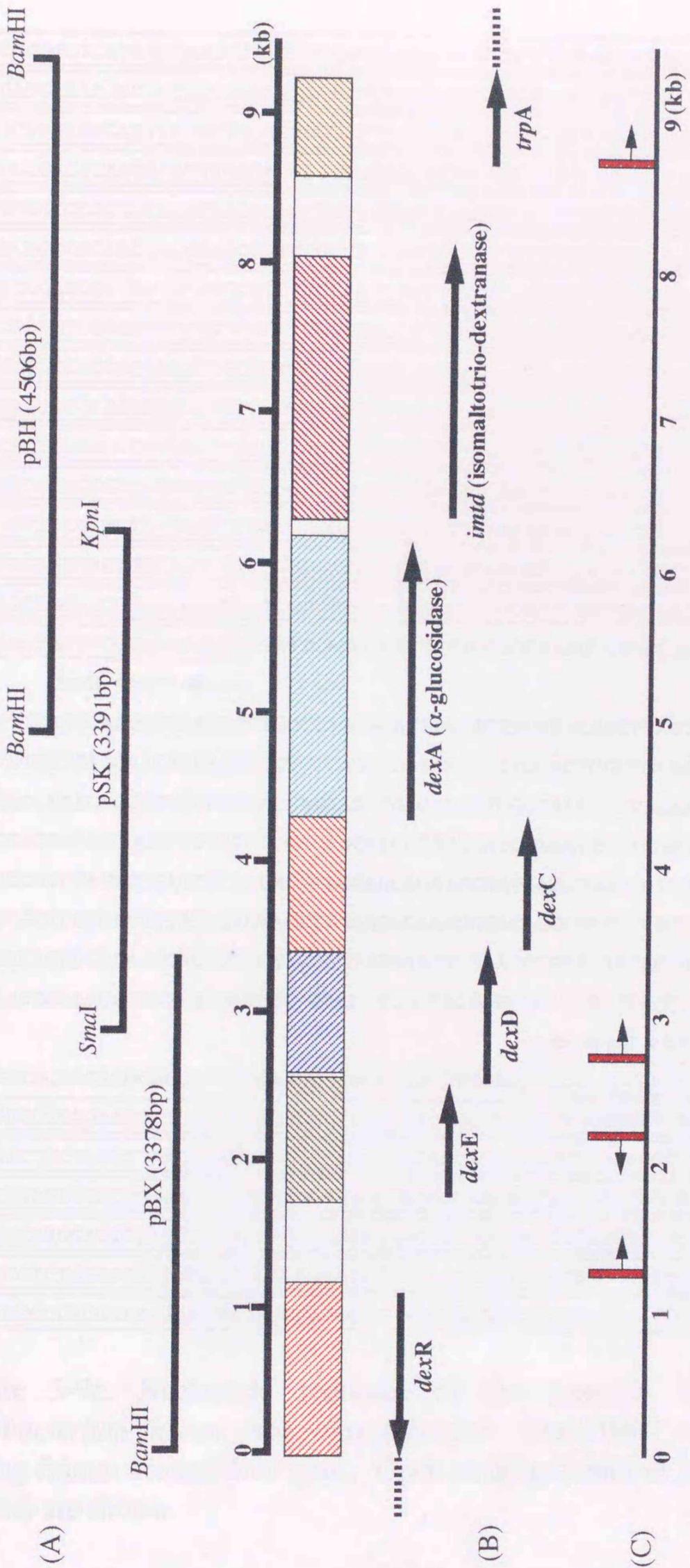


Figure 5-8. Open reading frames and promoter regions around the isomaltotriose-dextranase gene.
 (A), Location and length of the insert of constructed plasmids used for DNA analysis; (B), Location and direction of the open reading frames; (C), Location and direction of the promoters.

GGATCCCGTCTCATCGCTATGCCTTCGTCGACTGAGGCACGCGCTATGGAGGCGAGCCGGACGCCTTCGC	70
CGGCGATGATAATCCGCTGTGGGATGGTGAAGTTGCAGATTGCCGCGATAAGTCGCCCAGACCTCGTCC	140
GGCGTCTTGTATCACTCGCGCTGCGGCCGGATCGCCCTGCTGCGCGAGATCGAGCGCTTCCTCAAATTCC	210
ACGGTGCACCTAAGGCATTTGAGACGTGGCGGGCGATTGCGTCCGAATTGAGCATGCTGGTGGCGCACC	280
CTCGGTGGCCCGCGGCACATAAGGGTCCGGTCCGGTCCAAAGGCCAGTGCCCCACCAGGCCGATTCCGTA	350
GTCATACCCACGACGACGGAGCCGTTCCGCCACAAGGCCGAATCCGGTGCCGACACCCAAGGTGACTACC	420
GCGAACCAGATCGTCATCGCGTCTTCTCCGAACCAGTGCTCATACTCGGTGAAGGCGACTATGTCGTTGT	490
CGACCAGAGTCGGGATGCCGGTTCGCTTCGGTACCTTCTTGGCTAGGGGAAGATCGTTCCAGCCCAAAAA	560
AGGCGCGCTGACCACAAATTCGCGGTTCGGACGAGACCACCGATACCGATGCCAATTCCTCTTATCTTC	630
CGGTACGCCCCAGATCGTTGGTTCAGTCGAGCTATCAGTCGAATGACCGCCGCTGGACTTCGGTTCGGTGA	700
TGGCACTGACACGTGTGACTTGATGAACCCGCGAAGGTTAGTGAGCGCGCCGATGATCTCGTTCTCCCG	770
GAGCTTCATACCGATGAAGTGCTCCGCCTCGGCATCGACATCAAGTAGCCGTGTCGGGCGTCTACCTTG	840
CCGTCGTTATGTTCTCCGACCTCCAAGAGCAAGCCAGTTTCAACAAGTGGGGTGCTTAGCCGGCTGAGCG	910
ATCCGGGAGATAGTTGCAGGCGTCTGGCGATTGCTGCCCTGGAGATCGGCCCCGTCGGAGGACCTCGAT	980
TGCTACCGGGAGCGAGGCGTCCGGTCCGGCTGCCGACCAGGCGGAAGTGGTACCCTTCATTCTCACAC	1050
GGCTGATTAGTTTCGGGAAGCAC	1120
dexR start ←	
TAGTTTTGATCCAATATTAATACCTGCCAGCGCATGGGTACTTCTTCCGACTTACCGACCAATGGAGGT	1190
CATCTGTGTTTACCAACAAGAAGCAGTGGCAGCGGGTATCCGCTGCACTCGCTGCAACCACTCTTGCCAC	1260
GATCGGCCTAACTGGCTGCTCCTCACCAGGAAGTGAGCCAATGGCCAAACCCTGAAAGTCTGGTGGTGGG	1330
AGAACGACGACAGCGCGCTTTCGCGCGGCTGGAACCGGGCGATCGAAATTTTTGAAGAGCAGAACCCGGA	1400
CGTCACCGTCGAGTTCGAGCTCAAGACATACGAGCAGATGCAATAATCGGGTCAGCTTCTTCTCGATTCT	1470
GACGACGCTCCTGACGTTATGGAGTACCTGAAAGGGAACGCGACAGCCGGTCTCGTGTACAGGCTGGTC	1540
TTCTGACAGACCTCACGGACGTGCTACGGCGAGGAACTGGAATCTGGACAGCACCGCGCAGGACGTTGG	1610
GCTGTATGAGAACGGAGTGATGGGCTCAGGGCAACGCTACGGGGTCACCAACTACGGCGAGTACGTGTCA	1680
→ dexE start	
GTTTGGTACAACAAGGACCTTTTCGAGGAGCACACGGCCTCGAAGT	1750
ACAAGCGCTGGGAACCTTCGCCGATGAGGGCATCACTCCCTCGCGCTGGGTTCTCAGGATTACCCCGGT	1820
ACCCATCTGCTCTATGAACTCGCGTTGGGGAACATGGACCAGACCTCCTGGGAGGCCTACCAGCAGTTCC	1890
ACGGTGAAGTTGACTGGAACGCCTGGGAAAAGGCCGCGCAACAGTACAGAACTGGACCGAGCAAGGGTT	1960
CATCGGCAAGGATTGACGCGGCATCAGCGCCAGGACGCCGGCAATGCCTTCGTCGCAGGTCAGTACCCC	2030
ATGTTTCGCTTCGGGCACATGGTGGGCAGGAACTTCGCCGACCAGGTCACAGACTTCGAATTCGACCAGT	2100
TCCTCCTCCCAGGTAACGAACTACATCCCAGGTCGGCGGAAACCTCTGGGTAGTCCCCGAGAAGGCAGA	2170

Figure 5-9a. Nucleotide sequence of the genomic DNA fragment of *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* strain 0407 containing the open reading frames around *imtd* gene. Open reading frames of *dex* R (red) and *dex* E (blue) are shown.

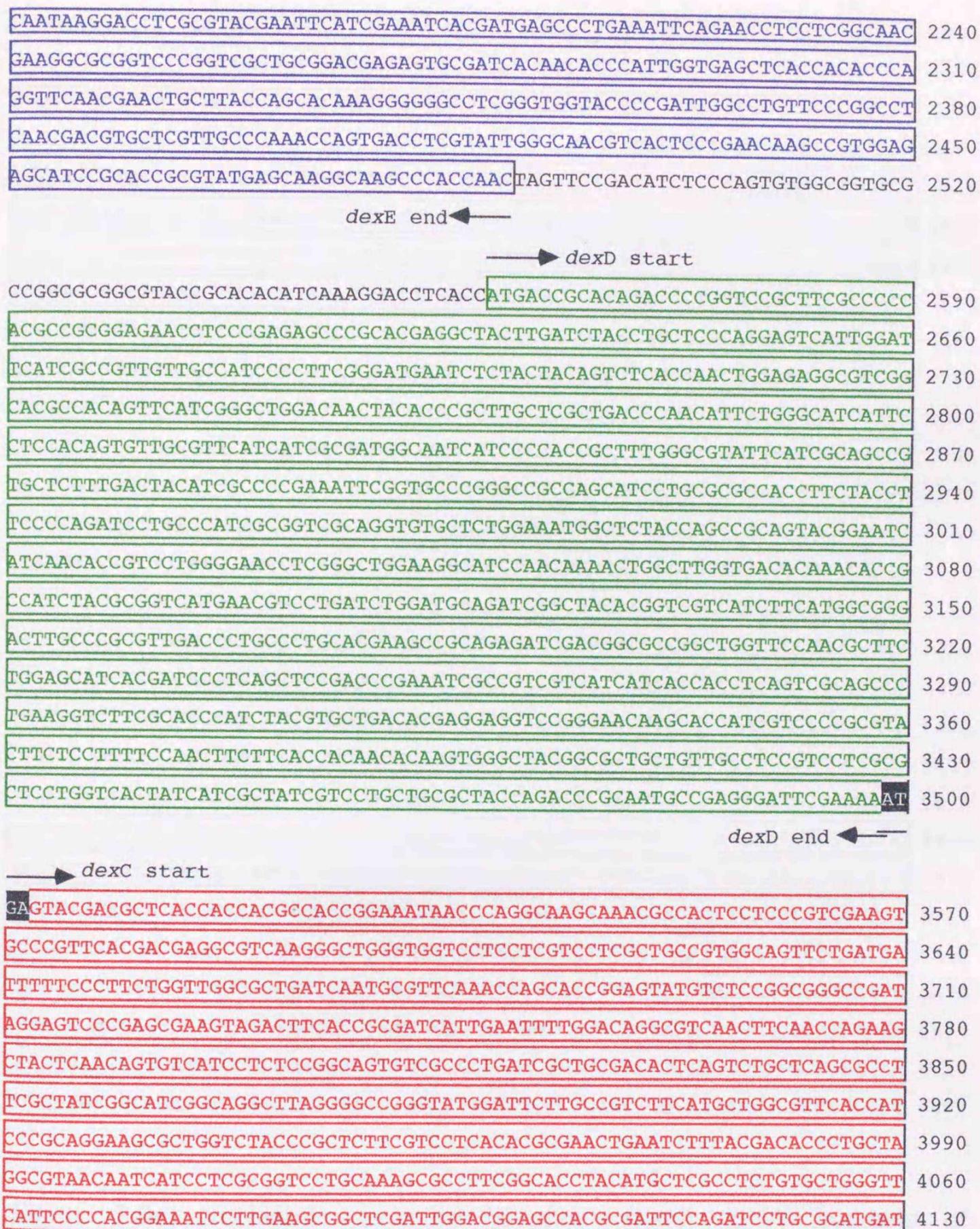


Figure 5-9b. Nucleotide sequence of the genomic DNA fragment of *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* strain 0407 containing the open reading frames around *imtd* gene. Open reading frames of *dexE* (blue), *dexE* (green), and *dexC* (red) are shown. The region that two ORF overlap is denoted with reversed letters in black.

CGTGCTGCCGCTCACCAGACCGACCCTCATGGTGCTCGTAACCTTTTTCTTCATCTGGACGTGGAACGAC 4200
 TTCCTTCCCTCCCTGGTGCTGCTGCCCTCCTCCGCGAACCGAGACCGTGTCCGGTCTCCCTCGGGGCTCTCA 4270
 GCGGGCAATACACCAGCGACCCGACCCTCTGGCAGCAGCGTCCATGGCCGGAATCCTGCCAGCCATCAT 4340

dexC end ← → dexA start

PTTCTTCTACTCTTCCAGCGCACCCCTCATGCGCGGTGTTAACATCGGAGCGATCAAATGACCACGCTGC 4410
 AACCGGCAACCCGCCACGCAAGCCTCAAAGCGACTGATGAATGGTGAAAGCCTCCGTCGTTTACCAGGT 4480
 CTACCCCGGAGTTTCGCTGACTCCAACGGCGACGGGATCGGCGACATCCAGGGCATCATCAGCCGGCTT 4550
 GATCACCTCCAGGAACTGGGCGTGGACGTCCTCTGGCTTTCACCCGTCTATGCTTCGCCGCAGGACGATA 4620
 ACGGCTATGACATCAGCGACTACTACTCCATCGATCCGACCTTCGGAACACTGGAAGACCTGGACGAACT 4690
 GATCGGCGAGTTGCATACCCGAGGCATGAAATTGGTGATGGATCTGGTCGTGAACCACACCTCAGATGAA 4760
 CACGAGTGGTTCAGGAATCACGATCGGACCGTACCCATCCCAAACGGGATTGGTACATCTGGCGGGACC 4830
 CGCACCACGGTGCCGAACCAACAATTGGGGGTCATTCTTCTCGGGATCCGCCTGGGAATGGGATGAACA 4900
 AACCGGACAGTACTTCCTCCACCTCTTCTCCAAAAGCAACCGGATCTCAACTGGGAGAACCCCGAAGTA 4970
 CGCGCCGCAATCTACCGGATGATGAACTGGTGGCTGGATCGGGGCATTGACGGCTTCCGCATGGACGTCA 5040
 TCAGTTTCATCTCAAAGCACCCCTGACCTTCCAGACGGTGCCGTGGGCAAGGGCGGGATATGGGGTGACGG 5110
 CATCCCATTTCTCGGTTCTGGGCCGCGCGTCCACGAATACCTGCAGGAAATGCACCGTGAGGTATTTGCT 5180
 CACCGCGACGCCGATCTACTGACCGTGGGTGAAATGGTCGACGTCACACCTGAACTGGCGCGGCTCTACA 5250
 CCGACCAGCGGCGCAAAGAACTCGACATGGTGTTCCTTTCGAGCACGTAGGACTCGACCACGGCGCGGA 5320
 CGGCAAGTTCAGCCGCAAAGCCCTCGACCTGGTCGCGGTGAAGCGCTCCTTCGCCCGATGGCAGGACGCA 5390
 TTGTCCGACGTCGGCTGGAACAGCCTCTACTGGAACAACCACGATCAACCACGAGTTGTGTCACGCTTCG 5460
 GCGATGACAGTGATCATTGGTATGAATCGGCGACAGCCTTTGCCACCATCCTCCACCTGATGCGTGGAAC 5530
 GCCCTACATCTACCAGGGCGAGGAGCTGGGCATGACAAATATGCCCTTACGAGCATCGATGAGTTCCGC 5600
 GACCTCGAGAGCCTCAACTATTACCGGCAGGCACTGGAACGAGATGGGGCTGACGCAGCAACCGTTCTCG 5670
 CCGGCATCACCGTCGGCGGACGCGATAACGCGCGCACCCCGGTCCAGTGGGACGCCTCAGTCCACGCCGG 5740
 ATTCACCACCGGTGAACCTTGGATACCAGTAAACCCCAACCACGGATGGCTGAATGCCGCCACTCAACGC 5810
 CAGGACCCCGAGTCCGTTTACGGGTGGTACAAACGGCTCATCCAACCTCCGCCACGAGGAACCGGTGATTG 5880
 TGGACGGAAGGTTCAACCTCATACTTGCCGACGATCCCAAATCTTCGCCTATACCCGCACGGATAGTGA 5950
 CACCGAACTCTTCATCGCCGCCAACTGCTCAGCGGACCCAGCTGCGCTACCTGGCGACGTTACCGAGGAA 6020
 TGGGACGACGCAGACGTCCTGCTCGCTAACCATCCAGGCGTCCGTGAGCTCGGAAGAACGCTCCTGCCCT 6090

Figure 5-9c. Nucleotide sequence of the genomic DNA fragment of *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* strain 0407 containing the open reading frames around *imtd* gene. Open reading frames of *dex C* (red) and *dex A* (blue) are shown. The region that two ORF overlap is denoted with reversed letters in black .

GGGAGGTGATCGTTCTACGACGCGCCTCGCGTAAGGCCCTAACAGCCGGGCCCTCCCGGCGCACCCAC 6160
dexA end ←

→ imtd start

ACAAGGAAGTGTGCGGCCACCCACGGAGCCGTCTCACGCAACGAGAGAGGAACCATCATGCCACTAC 6230
AGGGCTGAGGCAACTTGCACGAACCATCACCATCGCCGTCGCGGCCACGCTGATTGGTACCGGTGCCGCA 6300
ATACCGGCACAAGCCGGCCCCGACCGGAAAAATCCACCAAACCTGTTGAAGACGCCCCGGTCACCGCGG 6370
ACGTTGGAACCTGCACACCTGGTGGCAGACAACGCTGTTTACAACACTGACTCGCCACCGAGAACGG 6440
TGAAGTCCGCCGCTCCTCCTTCTACGACGTGCAGGTCGCGCAGGCGCACCAACCGGACAAGTTCTTCGAC 6510
TCATTGCCTACATGAGCATTCCCCGACGCGCAAAGGAAAGGTCGGCTACACCAAGGAGGACGGCGCAG 6580
AGTTCTCCTCCGAAGCAAACCTCTCGATGAGCTGGTCCAGCTTCGAGTACGCGAAGGACGTGTGGGTTGA 6650
CGTCAGCCTGAAGACAGGGCAGACCATCAGCTCAGCGGATGAGGTTTCAGATCCGTCCAGCAGTTATGAC 6720
TTCGAGAAGAAGCTCGTCGATGAGGACACCATCAGGATCAAGGTTCCCTACTCGGACGCCGGATACCGTT 6790
TCTCCGTCGAATTCGACCCCCAGCTGTATACGTCTTACAACGATATGTCCGGTAACAGCGGGAAACTCAC 6860
CACTGTCGCTGAGGGGAACCGGCCTATTCACACCGAGCCGATGAACTCGATGATGATCTTCGCCGAGCCG 6930
AAGCTCCAGGGCGAAGAGGAGAAGCGCCTGATCCCGAACCCCTCGTCAGGCAGCATCCACTACCCCGAAG 7000
AAGGGGAAGTGAAGGACCTCAACACCGTCACCGAAGAGATCATTTACTTCAAGCCCGGCACCTACCACAT 7070
GGGCTCGGACTATCATGCGGTACTTCCGCCAACGTGAAGTGGGTCTACCTTGCGCCTGGCGCGTACGTG 7140
AAGGGCGCGTTCGCTTCTTCCACGACAACCAGGCACAGTACAAGGTGACCGGCTACGGGGTGCTCTCCG 7280
GCGAGCAGTACGTCTACGAGGCGGACACCGCCAACAATTATAATGCCCTCAGCGGAGCCTCAAACCTGCCA 7350
CGTCACCTGCGTGAAAATGCTTCAGTTCGAATCCTCTAACATCGGACAGCAGCTCGACCTGCAAGGCGTC 7420
ACCATCAACGAACCGCCCTACCACTCCTTCGTCGTCTACGCCACGAAGGCGAAAAAGAGATAGGCGTGG 7490
AGAACTTCCGCATGAACGTGGAGAACTACAAGCAGGTCGGCAGCTGGTACTGGCAGACAGACGGCATCGA 7560
GCTCTACCAGGGCGGCACCATGAAGAACACGTTCTTCAACGCGAACGACGATGTGCTGAAGATGTACCAC 7630
AGCGACGTCACCATCGATAACACGGTAATTTGGAAAAACGAGAACGGGCCCGTCATCCAATGGGGATGGA 7700
CACCGCGGAACATCGACAACGTGAACGTCACCGACACAACCGTCATCCACAACCGCATGTACTGGAAAGA 7770
CCCCAAGTACAACACCTGCATCCTCAACTCGTCATCGCACTGGGAAGACATGGGTTCCACTGCCAAGGCG 7840
GACCCGAACACAACCTGTGAAGAACATGCGATTTCGAAAACATCACTGTCGAAGGCATGACCAACTGCGCAA 7910
TGCGGATCTATGCCCTGTCCAACACTGAGAACATTCACGTCAAGAACCTCAGCATCGACAGCTGGAATGG 7980
CTTGGACTGGACTTCACAGGTCAGCCACCTCAAGCGGTACACCAACTCCGCAGGCGAAAAAGTCACCATC 8050
GGCAATGAGATCCCCGACGGTAACGGCCTCGCCCTCGAAAACACTCGGTCGGAGGCGAAATAATCGAGA 8120
AATCCGGCGACAACCTGGAACGACTACAAGCTCGGACGCCTCGGATTCGACGGCGAGAACTGGGACAGCTG 8190
GAACGCCTGGAAATCCACACCTAGGTAACCGGAACTCGTCAGCGGCGTGGTGGGCAGAGGCACACAGCC 8260
imtd end ←

Figure 5-9d. Nucleotide sequence of the genomic DNA fragment of *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* strain 0407 containing the open reading frames around *imtd* gene. Open reading frames of *dex A* (blue) and *imtd* (green) are shown.

TCTGCCCACCGGCTTATGCACTACGAAAAATCTCCAACCTGAACCACCGAATCTTGCCACATCAGGAGCA 8330
 CCGATTGATGTCACCCTCATGTTGAGCTCGATGACCTCCCCTTCGAAGCGTCCGCACGGCGAAAACAGA 8400
 ATGAACGCCTGCATCGGCATCGACGTCGGTGGAAACGGGTATAAAGGGCGGAATAGTCGACGTCCTGACGG 8470
 GCAAGGTACATGGTGAGGTCCTTCACGTCGCGACTCCGCGCCCAGCCACACCTGGGACCGTTACAAACGC 8540
 CATAGCCCGGATCACGCAGCACCTCTCTCGACGAGGCGTCTTGTTGTTGCAAGAGGACCTACACGTAGGA 8610
 GTAGGGTTCCCCGCCATAGTCCACAAGGGGACGATACGTTCCGGCAGCGAACATTGATGAATCCTGGATCG 8680
 ACGTGACAGCCAACACTACACTCACTGAATACCTGAGGCTTCCGACTGTGGTCCTCAACGACGCCGACGC 8750
 CGCAGGACTTGCAGAAGCTCGTTCCGGCGCAGGTCAAGGAACCACGGGAGTAGTTCTCGTCATCACCCCTA 8820
 GGCACAGGAATCGGTTCCGGCACTAGTCATCAACGGAATCCTTGTGCCAACCTCGAACTCGGTCACCTCG 8890
 AGCTAGGTGTATTGACCACAGAGGTTAGTGACGGTCCGGCGTGGTTTGGTGACATGAAGAAGACCTCCGGG 8960

→ *trpA* start

TGAAGTGGGGCTTGTCTAGAGCATCCACTAACCAGGAGGTCTTCAATGTCCCACCCTAACGCCCTACTGA 9030
 CACCTCGCGGGAGGTTGTTACTGGCCCAGTGTGTTGTCGATGATGGTTGGCCGCTGCGCCGGGCTGCGGA 9100
 CGTCTTCCAGGTCTCTGCCACGACCGCTGCACGCTGGTCCTCCCGGTACCGTCTACTCGGGCCCCGCGGC 9170
 ATGAACGATGCCTCCAGCCGTCCGCACCGGTGTCCGCGCAGGACGCCGGCGCGCACGGAGCGGCGGATCA 9240
 TCGCGATCCGGGTCAACCGGCGGTGGGGCCCCGGCACGGACTCGGCTATCACCTCGGGGTCCATCCTTCGA 9310
 CCGTGCACCGTGTCTGGCCCGGTACGTCTGGCGAGACTGTCCTGGCTGGACCGTGCCACCGGACGGGTC 9380
 ATCCGCGCTACGAACACGCCGCGCCCCGGGAGCTCGTGCACGTGGATATCAAGAAGCTCGGGAGGATCC 9450

Figure 5-9e. Nucleotide sequence of the genomic DNA fragment of *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* strain 0407 containing the open reading frames around *imtd* gene.

Open leading frame of *trpA* (blue) is shown.

TGATGCGTGGAACGCCCTACATCTACCAGGGCGAGGAGCTGGGCATGACAAATATGCCCT 1200
 L M R G T P Y I Y Q G E E L G M T N M P 393
 TCACGAGCATCGATGAGTTCCGCGACCTCGAGAGCCTCAACTATTACCGGCAGGCACTGG 1260
 F T S I D E F R D L E S L N Y Y R Q A L 413
 AACGAGATGGGGCTGACGCAGCAACCGTTCTCGCCGGCATCACCGTCGGCGGACGCGATA 1320
 E R D G A D A A T V L A G I T V G G R D 433
 ACGCGCGCACCCCGGTCCAGTGGGACGCCTCAGTCCACGCCGGATTACCACCGGTGAAC 1380
 N A R T P V Q W D A S V H A G F T T G E 453
 CTTGGATACCAGTAAACCCCAACCACGGATGGCTGAATGCCGCCACTCAACGCCAGGACC 1440
 P W I P V N P N H G W L N A A T Q R Q D 473
 CCGAGTCCGTTTACGGGTGGTACAAACGGCTCATCCAACTCCGCCACGAGGAACCGGTGA 1500
 P E S V Y G W Y K R L I Q L R H E E P V 493
 TTGTGGACGGAAGGTTCAACCTCATACTTGCCGACGATCCCCAAATCTTCGCCTATACCC 1560
 I V D G R F N L I L A D D P Q I F A Y T 513
 GCACGGATAGTGACACCGAACTCTTCATCGCCGCCAACTGCTCAGCGGACCCAGCTGCGC 1620
 R T D S D T E L F I A A N C S A D P A A 533
 TACCTGGCGACGTTACCGAGGAATGGGACGACGCAGACGTCCTGCTCGCTAACCATCCAG 1680
 L P G D V T E E W D D A D V L L A N H P 553
 GCGTCCGTGAGCTCGGAAGAACGCTCCTGCCCTGGGAGGTGATCGTTCTACGACGCGGCC 1740
 G V R E L G R T L L P W E V I V L R R G 573
 TCGCGTAAGGCCCTAACAGCCGGCCCCCTCCCGGCGCACCCACACAAGGAAGTGTGCGGC 1800
 L A * 575
 CCACCCACGGAGCCGTCTCACGCAACGAGAGAGGAACCATCATGCCCACTACAGGGCTG 1860
 imtd gene →

Figure 5-10. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *dex* A (α -glucosidase gene).

The deduced amino acid sequence of *dex* A is described below the the nucleotide sequence in one letter notation. The putative ribosome-binding site is double underlined. The palindrome sequence of putative terminator is represented by reversal letters. The amino acid sequences underlined are conserved regions found commonly in the enzymes of α -amylase family. The start region of isomaltotrio-dextranase gene is shown with an arrow.

Table 5-1 . Codon usage of the α -glucosidase (DexA) gene from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum*

codon	count	%	codon	count	%	codon	count	%	codon	count	%
Phe TTT	2	8.3	Leu CTT	4	8.0	Ile ATT	2	8.0	Val GTT	6	16.2
Phe TTC	22	91.7	Leu CTC	23	46.0	Ile ATC	20	80.0	Val GTC	16	43.2
Leu TTA	0	0.0	Leu CTA	3	6.0	Ile ATA	3	12.0	Val GTA	4	10.8
Leu TTG	3	6.0	Leu CTG	17	34.0	Met ATG	12	----	Val GTG	11	29.7
Ser TCT	1	3.1	Pro CCT	4	13.8	Thr ACT	2	6.9	Ala GCT	6	14.3
Ser TCC	8	25.0	Pro CCC	11	37.0	Thr ACC	18	62.1	Ala GCC	19	45.2
Ser TCA	8	25.0	Pro CCA	6	20.7	Thr ACA	4	13.8	Ala GCA	8	19.0
Ser TCG	4	12.5	Pro CCG	8	27.6	Thr ACG	5	17.2	Ala GCG	9	21.4
Tyr TAT	5	25.0	His CAT	4	17.4	Asn AAT	3	15.0	Asp GAT	19	33.3
Tyr TAC	15	75.0	His CAC	19	82.6	Asn AAC	17	85.0	Asp GAC	38	66.7
Och TAA	0	----	Gln CAA	7	35.0	Lys AAA	8	61.5	Glu GAA	21	60.0
Amb TAG	0	----	Gln CAG	13	65.0	Lys AAG	5	38.5	Glu GAG	14	40.0
Cys TGT	0	0.0	Arg CGT	4	10.5	Ser AGT	4	12.5	Gly GGT	6	13.3
Cys TGC	1	100.0	Arg CGC	16	42.1	Ser AGC	7	21.9	Gly GGC	23	51.1
Opa TGA	0	-----	Arg CGA	6	15.8	Arg AGA	1	2.6	Gly GGA	10	22.2
Trp TGG	23	-----	Arg CGG	10	26.3	Arg AGG	1	2.6	Gly GGG	6	13.3

[% : codon usage / each amino acid(%)]

DexA	1	MTTLQPATRHASLKATDE	WVKASV	VYQVY	PRSF	ADSN	GDGIGD	IQGI	ISR
B. cereus	1	-----	MEKQ	WVKES	VYQIY	PRSF	MDSN	GDGIGD	LRGI
B. thermo	1	-----	MERV	WVK	EAVYQ	IYPRSF	YDSN	GDGIGD	IRGI
S. mutans	1	-----	MOKH	WV	HKATV	YQIYP	KSF	MDTNG	DGIGDLKGI
DexA	51	LDHLQELGVDV	LWLS	PVY	ASP	QDDN	GYDISD	YSI	DPT
B. cereus	37	LDYLKELGID	VIVL	SPVY	ESP	NDDN	GYDISD	CKI	MNE
B. thermo	37	LDYLKELGVDV	VWLS	PVY	KSP	NDDN	GYDISD	RDIM	DEF
S. mutans	37	LDYLOKLGVM	AIWLS	PVY	DSP	MDDN	GYDI	ANY	EAI
DexA	101	ELHTRGMKLV	MDLV	VNHTS	DEH	EWF	QESR	SDRTH	PK
B. cereus	87	EMHERNMKLM	MDLV	VNHTS	DEH	NWF	IESR	KSKD	NKY
B. thermo	87	EMHKGRIKLV	MDLV	VNHTS	DEH	PWF	IESR	KSKD	NPY
S. mutans	87	QAKMRDIKII	MDLV	VNHTS	DEH	TWF	IEA	REHP	DSS
DexA	151	PNNWGSF	FSGSAW	EWDE	QTGOY	FLHL	FSSK	KQPD	LWN
B. cereus	137	PNNWGAA	FSGSAW	OYDE	MTDEY	YLHL	FSSK	KQPD	LWN
B. thermo	137	PNNWESV	FSGSAW	EYDE	MTGEY	YLHL	FSSK	KQPD	LWN
S. mutans	132	PNDLESI	FSGSAW	OYD	DKSDQ	YVY	LFSS	KQPD	LWN
DexA	201	WLDRGIDGFR	MDVI	SFISK	HPDLP	DGAV	GKGGI	WGD	GIP
B. cereus	187	FWLEKIDGFR	MDVI	NFISK	EEGLP	TVETE	E-EGY	VSGH	KHFM
B. thermo	187	FWLDKGV	DGFRMDVI	NMISK	VEELP	DGEP	QSGK	KYAS	GSRY
S. mutans	182	FWIDKGI	GFRMDVI	DMIG	KIP	-----	AQH	IVSN	--
DexA	251	YLQEMHRE	VFAHRDA	LLTV	GEMVD	VTPE	LARLYT	DQRR	KELD
B. cereus	236	YLHEMNE	EVLSH--	YD	IMTV	GEM	PGVT	TEEA	KLYT
B. thermo	237	FLQEMNRE	VLSK--	YD	IMTV	GEM	TPGV	TPKE	GILYT
S. mutans	217	YLKEMNA	ASFGQ--	H	LLTV	GEM	TWGAT	PEIA	KQY
DexA	301	VGLDHGADG	-KFS	-RKAL	DLVAV	KRSFAR	WODAL	SD	-V
B. cereus	284	MDLDSGEGG	-KWD	-VKPCS	LLTL	KENLTK	WQKALE	H	-T
B. thermo	285	MDLDSGPGG	-KWD	-IRPWS	LADL	KKTMTK	WQKELE	G	-K
S. mutans	265	IGLOHKPEAP	KWDYV	KELN	VPALK	TIFNK	WQTELE	LGQ	GWNS
DexA	348	PRVVS	RFGD	SDHWY	ESATA	FATIL	HLMR	GTPY	IYQ
B. cereus	331	PRVVS	RFGND	GMYRI	ESAKM	LATV	LHMM	GTPY	IYQ
B. thermo	332	PRAVS	RFGD	GKYR	VESAK	LATF	LHMM	GTPY	IYQ
S. mutans	315	PRVLS	IWGN	TGKYR	EKSAK	ALAIL	LHLMR	GTPY	IYQ
DexA	398	DEFRDLES	LNYY	ROALERD	GADAAT	VLAGI	TVG	GRDN	ARTP
B. cereus	381	DEYRDIE	TLNMY	KEKVMER	GEDI	EKVMSI	YIK	GRDN	ARTP
B. thermo	382	EDYRDIE	TLNMY	KERVEEY	GDPQ	EVMEKI	YIK	GRDN	ARTP
S. mutans	365	NELDDIE	SLNYA	KEAFTN	-GKSM	ETI	MDSI	RMI	GRDN
DexA	448	GFTTG	-EPWI	PVNP	NHGWL	NAATOR	QDPE	SVYG	WYK
B. cereus	431	GFTTG	-EPWI	TVNP	NYKE	INV	QAION	KDSI	FYYY
B. thermo	432	GFTAG	-TPWI	PVNP	NYK	ENV	KAALED	PNSV	FHY
S. mutans	414	GFSTAD	KTWL	PVNP	NYK	DINV	QAAL	KNSN	SIF
DexA	497	GRFN	LILAD	DPQIF	AVTR	TSDTE	LFIA	ANC	SAD
B. cereus	480	GSYD	LILE	ENNP	SIFAV	VRTY	GVKLL	VIAN	F
B. thermo	481	GTYD	LILED	DPYI	YRYT	RTLGN	EQLIV	ITNF	S
S. mutans	464	ADFE	LLPTA	D-KV	FAYLR	KVRE	ERYL	IVV	NV
DexA	547	VLLAN	H	PGVR	---EL	GRT	L	PWE	VI
B. cereus	530	LLIH	NYD	VEN	-GPI	ENIT	LRP	YEAM	VFK
B. thermo	531	LLIS	NYD	VDEA	EEL	KEIR	LRP	WEAR	VYK
S. mutans	509	TLIS	N	T	NESA	--ALAN	HK	L	Q

Figure 5-11. Amino acid sequence homology among DexA and several isomaltooligosaccharide hydrolyzing enzymes.

The identical amino acids are shown in white letters in blue. DexA, *Brebibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* DexA (α -glucosidase); *B. cereus*, *Bacillus cereus* oligo 1,6-glucosidase⁷⁸; *B. thermo*, *Bacillus thermoglucosidasius* oligo 1,6-glucosidase⁶²; *S. mutans*, *Streptococcus mutans* dextran glucosidase⁷⁵.

Enzyme	Origin	Region 1	Region 2	Region 3	Region 4
α -glucosidase (DexA)	<i>B.f.var. dextranlyticum</i>	GMKLVMDLVVNH	DGFRMDVI SF	LTVGEMVD	NSLYWNNHD
oligo 1,6-glucosidase	<i>B.cereus</i>	NMKLMMDLVVNH	DGFRMDVI NF	MTVGEMPG	NSLYWNNHD
oligo 1,6-glucosidase	<i>B.thermoglucosidasius</i>	GIKLVMDLVVNH	DGFRMDVI NM	MTVGEMPG	NSLYLNNHD
dextran glucosidase	<i>S.mutans</i>	DIKII MDLVVNH	GGFRMDVI DM	LTVGETWG	NSLFWNNHD

Figure 5-12. Highly conserved regions among α -glucosidase, oligo 1,6-glucosidases and dextran glucosidase.

The amino acid residues identical with the consensus sequence of α -amylase family are denoted with white letters in blue.

(A)

```
DexC 1 MSTTLTTPPEITQAS KRHSSRRSARSRRG VKGWVLLVLAAVAV LMIFFP
AmyC 1 -----MR KVH----- VQKYLTLFLGIVLSL LWISL

DexC 51 FWLALINAFKPAPPEYVSGGPIGVPS-----EV NFNQKLLNSVI
AmyC 26 FYIILVNSFKTKLELFTN-TLSLPKSLMLDNYKTAAANL NLSEAFSNTLI

DexC 89 LSGSVALIAATLSLLSAFAIGIGRLRGRVWILAVFMLAFTIPEALVYPL
AmyC 75 ITVFSILIIAIFSSMTAYALQRVKRKSSVIIYMIFTVAMLIPFQSVMIPL

DexC 139 FVLTRELNLYD TLLGVTIILAVLQSAFGTYMLASV LGSFPTEILEAARLD
AmyC 125 VAEFGKFHFL- TRSGLVFMYLGFSSSLGVFLYYGALKGIPTSLDEAALID

DexC 189 GATRFQILRMIVLPLTRPTLMVLVTFFF IWTWNDFFLPLVLLPSSANQTV
AmyC 174 GCSRFRITYWNIILPLLNPPTITLAVLDIMWIWNDYLLPSLVINKVGSRTL

DexC 239 SVSLGALSGOYTS DPPTALAAASMA GILPAIIFFLLFORTLMRGVNI GAIK
AmyC 224 PLMIFYFFSOYTKQWNLGMAGLTIAILPVVIFYFLAQRKLVTAIIAGAVK

DexC 289 -
AmyC 274 Q
```

(B)

```
DexC 1 MSTTLTTPPEITQAS KRHSSRRSARSRRG VKGWVLLVLAAVAVLMIFFP
AmyC 1 -----MR KVH----- VQKYLTLFLGIVLSLWISL

DexC 51 FWLALINAFKPAPPEYVSGGPIGVPS-----E VNFNQKLLNSVI
AmyC 26 FYIILVNSFKTKLELFTN-TLSLPKSLMLDNYKTAAANLNLSEAFSNTLI

DexC 89 LSGSVALIAATLSLLSAFAIGIGRLRGRVWILAVFMLAFTIPEALVYPL
AmyC 75 ITVFSILIIAIFSSMTAYALQRVKRKSSVIIYMIFTVAMLIPFQSVMIPL

DexC 139 FVLTRELNLYD TLLGVTIILAVLQSAFGTYMLASV LGSFPTEILEAARLD
AmyC 125 VAEFGKFHFL- TRSGLVFMYLGFSSSLGVFLYYGALKGIPTSLDEAALID

DexC 189 GATRFQILRMIVLPLTRPTLMVLVTFFF IWTWNDFFLPLVLLPSSANQTV
AmyC 174 GCSRFRITYWNIILPLLNPPTITLAVLDIMWIWNDYLLPSLVINKVGSRTL

DexC 239 SVSLGALSGOYTS DPPTALAAASMA GILPAIIFFLLFORTLMRGVNI GAIK
AmyC 224 PLMIFYFFSOYTKQWNLGMAGLTIAILPVVIFYFLAQRKLVTAIIAGAVK

DexC 289 -
AmyC 274 Q
```

Figure 5-13. Multiple alignment of the DexC and a membrane transporter protein AmyC.

The AmyC was reported as one of the membrane proteins for maltose transport of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* ⁷¹⁾. The identical and similar amino acid residues in each column are represented by white letters in blue (A and B), and black letter in red (B), respectively.

(A)

DexD	1	MTAQT	PVRF	APT	PRRTS	REP	ARG	Y	L	I	Y	L	L	P	G	V	I	G	F	I	A	V	V	A	I	P	F	G	M	N	L	Y	Y	S																
AmyD	1	-----	MAK	K	A	K	F	F	K	N	G	I	W	Y	W	L	F	I	A	P	T	L	L	S	L	I	I	V	V	L	I	P	F	I	I	G	I	Y	Y	S										
DexD	51	L	T	N	R	G	V	G	T	P	O	F	I	G	L	D	N	Y	T	R	L	L	A	D	P	T	F	W	A	S	F	L	H	S	V	A	F	I	I	A	M	A	I	I	P	T	A	L	G	V
AmyD	41	F	I	D	N	G	I	N	Q	P	V	F	I	G	L	K	N	F	M	T	L	R	D	D	A	E	F	W	N	S	I	I	F	T	A	K	F	A	V	A	C	I	V	I	I	N	V	V	L	
DexD	101	F	I	A	V	L	F	D	Y	I	A	P	K	F	G	A	R	A	A	S	I	L	R	A	T	F	Y	L	P	Q	I	L	P	I	A	V	A	G	V	L	W	K	W	L	Y	Q	P	Q	Y	G
AmyD	91	S	L	A	M	L	V	T	R	K	I	F	A	R	N	-----	F	M	R	T	A	F	Y	L	P	N	L	I	G	G	L	I	L	G	F	I	W	N	F	I	F	V	D	V	F	Q				
DexD	151	I	I	N	T	V	L	G	N	L	G	L	E	G	I	Q	Q	N	W	L	G	D	T	N	T	A	I	Y	A	V	M	N	V	L	I	W	M	O	I	G	Y	T	V	V	I	F	M	A	G	L
AmyD	135	T	I	S	D	A	T	H	I	G	W	L	G	G	-----	W	L	S	T	T	N	T	G	F	W	G	L	V	I	V	T	S	W	O	M	I	G	Y	V	M	V	I	Y	I	A	Y	I	E		
DexD	201	R	V	D	P	A	L	H	E	A	A	E	I	D	G	A	G	W	F	O	R	F	W	S	I	T	I	P	Q	L	R	P	E	I	A	V	V	I	I	T	S	V	A	A	L	K	V	F	A	
AmyD	181	S	I	P	T	D	L	I	E	A	S	K	I	D	G	A	N	S	W	Q	O	F	R	N	V	V	F	P	L	I	A	P	A	F	T	V	S	L	F	I	L	S	N	S	F	K	L	F	D	Q
DexD	251	I	Y	V	L	T	R	G	G	P	G	T	S	T	I	V	P	A	Y	F	S	F	S	N	F	F	T	T	Q	V	G	Y	G	A	A	V	A	S	V	L	A	L	L	V	T	I	A	I	V	
AmyD	231	N	L	S	L	T	A	G	A	P	G	N	T	T	Q	M	I	T	L	N	I	Y	Q	T	A	F	S	A	Q	E	M	A	V	G	Q	A	K	A	V	I	M	F	L	I	I	A	V	I	S	V
DexD	301	L	L	R	Y	Q	T	R	N	A	E	G	F	E	K																																			
AmyD	281	Q	V	-	Y	L	T	Q	K	R	E	-	V	E	M																																			

(B)

DexD	1	MTAQT	PVRF	APT	PRRTS	REP	ARG	Y	L	I	Y	L	L	P	G	V	I	G	F	I	A	V	V	A	I	P	F	G	M	N	L	Y	Y	S																
AmyD	1	-----	MAK	K	A	K	F	F	K	N	G	I	W	Y	W	L	F	I	A	P	T	L	L	S	L	I	I	V	V	L	I	P	F	I	I	G	I	Y	Y	S										
DexD	51	L	T	N	R	G	V	G	T	P	O	F	I	G	L	D	N	Y	T	R	L	L	A	D	P	T	F	W	A	S	F	L	H	S	V	A	F	I	I	A	M	A	I	I	P	T	A	L	G	V
AmyD	41	F	I	D	N	G	I	N	Q	P	V	F	I	G	L	K	N	F	M	T	L	R	D	D	A	E	F	W	N	S	I	I	F	T	A	K	F	A	V	A	C	I	V	I	I	N	V	V	L	
DexD	101	F	I	A	V	L	F	D	Y	I	A	P	K	F	G	A	R	A	A	S	I	L	R	A	T	F	Y	L	P	Q	I	L	P	I	A	V	A	G	V	L	W	K	W	L	Y	Q	P	Q	Y	G
AmyD	91	S	L	A	M	L	V	T	R	K	I	F	A	R	N	-----	F	M	R	T	A	F	Y	L	P	N	L	I	G	G	L	I	L	G	F	I	W	N	F	I	F	V	D	V	F	Q				
DexD	151	I	I	N	T	V	L	G	N	L	G	L	E	G	I	Q	Q	N	W	L	G	D	T	N	T	A	I	Y	A	V	M	N	V	L	I	W	M	O	I	G	Y	T	V	V	I	F	M	A	G	L
AmyD	135	T	I	S	D	A	T	H	I	G	W	L	G	G	-----	W	L	S	T	T	N	T	G	F	W	G	L	V	I	V	T	S	W	O	M	I	G	Y	V	M	V	I	Y	I	A	Y	I	E		
DexD	201	R	V	D	P	A	L	H	E	A	A	E	I	D	G	A	G	W	F	O	R	F	W	S	I	T	I	P	Q	L	R	P	E	I	A	V	V	I	I	T	S	V	A	A	L	K	V	F	A	
AmyD	181	S	I	P	T	D	L	I	E	A	S	K	I	D	G	A	N	S	W	Q	O	F	R	N	V	V	F	P	L	I	A	P	A	F	T	V	S	L	F	I	L	S	N	S	F	K	L	F	D	Q
DexD	251	I	Y	V	L	T	R	G	G	P	G	T	S	T	I	V	P	A	Y	F	S	F	S	N	F	F	T	T	Q	V	G	Y	G	A	A	V	A	S	V	L	A	L	L	V	T	I	A	I	V	
AmyD	231	N	L	S	L	T	A	G	A	P	G	N	T	T	Q	M	I	T	L	N	I	Y	Q	T	A	F	S	A	Q	E	M	A	V	G	Q	A	K	A	V	I	M	F	L	I	I	A	V	I	S	V
DexD	301	L	L	R	Y	Q	T	R	N	A	E	G	F	E	K																																			
AmyD	281	Q	V	-	Y	L	T	Q	K	R	E	-	V	E	M																																			

Figure 5-14. Multiple alignment of the DexD and a membrane protein AmyD.

The AmyD was reported as one of the membrane proteins for maltose transport of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*⁷¹⁾. The identical and similar amino acid residues in each column are represented by white letters in blue (A and B), and black letters in red (B), respectively.

(A)

```

DexE 1 MPTTFDEFEQALGTFADEGITPLALGSQ--DYPG-----
MalX 1 MSSKFMKSTAVLGTVTLASLLLVACGSKTADKPADSGSSEVKELTVYVDE

DexE 32 -----TH LLYELALGNMDQTSWE-----
MalX 51 GYKSYIEEVAKAYEKEAGVKVT LKTGDALGGLDKLSLDNQSNGNVPDVMMA

DexE 50 -----
MalX 101 PYDRVGSLGSDGQLSEVKLSDGAKTDDTTKSLVTAANGKVYGAHAVIESL

DexE 50 -----AYQQFDG-----EVDWN-----
MalX 151 VMYYNKDLVKDAPKTFADLENLAKDSKY AFAGEDGKTTAFLADWTFNFYYT

DexE 62 ----AWEKAAATVON-----WTEQGFIGKDSI
MalX 201 YGLLAGNGAYVFGONGKDAKDIGLANDGSIAGINYAKS WYEKWPKGMQDI

DexE 86 GISAQDAGNAFVAGQYPMFVSGTWWAGTFADQVTDFFDQF-LLP-GNEL
MalX 251 EGAGNLIQTFQEGKTAIIDGPWKAQAFKDAKVNYGVATIPTLPNGKEY

DexE 134 HPGSGGNLWVPEKADNKDLAYEFIEITMSPEIONLLGNEG-AVPVAADE
MalX 301 AAFGGGKAWVIPAQAVKNLEASQK FVDFLVATEQOKVLYDKTNEIPANTEA

DexE 183 SAITTPIG-ELTTPRFNELL-ISTKGGLGWYDPWPV PGLNDVLAQTSIDL
MalX 351 RSYAEGKND ELTTAVIKQFKNIQPLPNI SQMSAVWD PAKN-MLFDAVSGQ

DexE 231 VLGNTPEQAVESIRTAYE QGKPTN
MalX 400 KDAKTAANDAVTLIKETIKQKFG-

```

(B)

```

DexE 1 MPTTFDEFEQALGTFADEGITPLALGSQ--DYPG-----
MalX 1 MSSKFMKSTAVLGTVTLASLLLVACGSKTADKPADSGSSEVKELTVYVDE

DexE 32 -----TH LLYELALGNMDQTSWE-----
MalX 51 GYKSYIEEVAKAYEKEAGVKVT LKTGDALGGLDKLSLDNQSNGNVPDVMMA

DexE 50 -----
MalX 101 PYDRVGSLGSDGQLSEVKLSDGAKTDDTTKSLVTAANGKVYGAHAVIESL

DexE 50 -----AYQQFDG-----EVDWN-----
MalX 151 VMYYNKDLVKDAPKTFADLENLAKDSKY AFAGEDGKTTAFLADWTFNFYYT

DexE 62 ----AWEKAAATVON-----WTEQGFIGKDSI
MalX 201 YGLLAGNGAYVFGONGKDAKDIGLANDGSIAGINYAKS WYEKWPKGMQDI

DexE 86 GISAQDAGNAFVAGQYPMFVSGTWWAGTFADQVTDFFDQF-LLP-GNEL
MalX 251 EGAGNLIQTFQEGKTAIIDGPWKAQAFKDAKVNYGVATIPTLPNGKEY

DexE 134 HPGSGGNLWVPEKADNKDLAYEFIEITMSPEIONLLGNEG-AVPVAADE
MalX 301 AAFGGGKAWVIPAQAVKNLEASQK FVDFLVATEQOKVLYDKTNEIPANTEA

DexE 183 SAITTPIG-ELTTPRFNELL-ISTKGGLGWYDPWPV PGLNDVLAQTSIDL
MalX 351 RSYAEGKND ELTTAVIKQFKNIQPLPNI SQMSAVWD PAKN-MLFDAVSGQ

DexE 231 VLGNTPEQAVESIRTAYE QGKPTN
MalX 400 KDAKTAANDAVTLIKETIKQKFG-

```

Figure 5-15. Multiple alignment of the DexE and maltose-binding protein MalX.

The MalX gene of *Streptococcus pneumoniae*⁷⁹⁾ was reported as a similar gene to maltose-binding protein of *E. coli*. The identical and similar amino acid residues in each column are represented by white letters in blue (A and B), and black letters in red (B), respectively.

(A)

```
DexR 1 MTTSAWSARRADASLPVAI EVLRRGPISRAAIARRLO LSPGSL SRLSTPL
XylR 1 MDIADQTFVKKVNQKLLK EILKNSPISRAKLSEMTG LNKSTVSSQVNTL

DexR 51 VETG LLL EVGEHNDGKV GRPTRL LDVDAEAEHF IGMKLRENE IICALTNL
XylR 51 MKENLVFEI GQGQSS-G GRRPVMLVFNKKA GYSIGIDVGVVDY ISSGILTDL

DexR 101 RGF I KSHVSVPI TDR SP----AAV IRLIARLTNDLG-ADRKIR GIGIGIG
XylR 100 EGTIILDQHHHLESN SPEITKDIL IDMIHHF ITRMPQSPYGLI GIGICVP

DexR 146 GLVRNREFV VSA PFLGWNDLP LAKKVT EATGI PTLVDNDIVAFTEY EHWF
XylR 150 GLIDKNQKI VFT PNSNRDIDLKSF IQEKFNV PVFIENEANAGAYG EKVF

DexR 196 GEGRDDDRFAVVTLGV GTGFGLVANGSVVVD DDIYGI GLVGHWPLDPTGPL
XylR 200 GAAKNHNNIIYASIST GIGIGV IINHL YRGVSGFS GEMGHMTIDFNGPK

DexR 246 CAAGHRGCATSMLNSDAIARHVSNALGRT VEFEEAL DLAQQGD PAAARVI
XylR 250 CSCGNRGCWELYASEK ALLKSLQTKK-KK VSYQDIIDL AHLNDIGTLNAL

DexR 296 ODAGRGLGRLIAAICNLTI PQR I IAGEGVRLAS IARA SVDEGIAMRRD-
XylR 299 ONFGFYLGIGLTN I LNTFNPOA I ILRNSI IESHMPVLN SIRSEVSSRVYP

DexR -----
XylR 349 QLGNSYELLPSSLGKNAPALGMSSIVIEHFLDIVKM
```

(B)

```
DexR 1 MTTSAW SARRADASLPVAIEVLR RGPISRAAIARRLO LSPGSL SRLSTPL
XylR 1 MDIADQ T FVKKVNQKLLKEILKNSPISRAKLSEMTG LNKSTVSSQVNTL

DexR 51 VETG LLL EVGEHNDGKV GRPTRL LDVDAEAEHF IGMKLRENE IICALTNL
XylR 51 MKENLVFEI GQGQSS-G GRRPVMLVFNKKA GYSIGIDVGVVDY ISSGILTDL

DexR 101 RGF I KSHVSVPI TDR SP----AAV IRLIARLTNDLG-ADRKIR GIGIGIG
XylR 100 EGTIILDQHHHLESN SPEITKDI LIDMIHHF ITRMPQSPYGLI GIGICVP

DexR 146 GLVRNREFV VSA PFLGWNDLP LAKKVT EATGI PTLVDNDIVAFTEY EHWF
XylR 150 GLIDKNQKI VFT PNSNRDIDLKSF IQEKFNV PVFIENEANAGAYG EKVF

DexR 196 GEGRDDDRFAVV TLGVGTGFGLVANGSVVVD DDIYGI GLVGHWPLDPTGPL
XylR 200 GAAKNHNNIIYASIST GIGIGV IINHL YRGVSGFS GEMGHMTIDFNGPK

DexR 246 CAAGHRGCATSMLNSDAIARHVSNALGRT VEFEEAL DLAQQGD PAAARVI
XylR 250 CSCGNRGCWELYASEK ALLKSLQTKK-KK VSYQDIIDL AHLNDIGTLNAL

DexR 296 ODAGRGLGRLIAAICNLTI PQR I IAGEGVRLAS IARA SVDEGIAMRRD-
XylR 299 ONFGFYLGIGLTN I LNTFNPOA I ILRNSI IESHMPVLN SIRSEVSSRVYP

DexR -----
XylR 349 QLGNSYELLPSSLGKNAPALGMSSIVIEHFLDIVKM
```

Figure 5-16. Multiple alignment of the DexR and xylose repressor protein XylR.

The XylR was reported as a regulatory protein on the xylan metabolism of *Lactobacillus pentosus*⁸⁰. The identical and similar amino acid residues in each column are represented by white letters in blue (A and B), and black letters in red (B), respectively.

第5節 要約

イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子上流域を新たに解析し、存在するORFおよびプロモーター領域の解析を行った。コロニーハイブリダイゼーションおよびIPCRによるクローニングと配列決定の結果、イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の5'末端側上流域に5個のORFの存在が確認された。相同性配列の検索結果DexEは糖質結合タンパク質と、DexCおよびDは糖質の膜輸送タンパク質と、DexAは α -グルコシダーゼと、またこれらとは逆向きに存在するDexRはキシロース代謝における代謝抑制タンパク質とそれぞれ相同性を示した。さらにこれらのORFの発現に関わると推定されるプロモーター領域がそれぞれ判明した。

第6章 *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株が生産する α -グルコシダーゼの精製と諸性質

第1節 緒言

α -グルコシダーゼ [EC3.2.1.20, α -D-glucoside glucohydrolase]は、オリゴ糖または配糖体のような α -グルコシド結合を持つ基質の非還元末端から α -D-glucoseを遊離する酵素の総称である⁸²。本酵素は細菌⁸³⁻⁸⁶、酵母^{87,88}、昆虫⁸⁹、植物⁹⁰⁻⁹³、哺乳動物^{94,95}など生物界に広く存在し、糖の代謝において重要な役割を果たしていることが報告されているが、その起源により基質特異性が著しく異なる。千葉らは基質特異性に基づき α -グルコシダーゼを(1)ビール酵母 α -グルコシダーゼのように合成配糖体やショ糖のようなheterogeneousな基質に対し高い水解力を持つグループ、(2)多くの微生物起源 α -グルコシダーゼのようにオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖のようなhomogeneousな基質に対し高い水解力を持つグループ、(3)ソバ α -グルコシダーゼのように低分子基質に対して作用するのみならずデンプンやグリコーゲンのような高分子基質に対しても水解力を持つグループという3つのグループに分類している^{96,97}。これらの α -グルコシダーゼについては、すでに一次配列が決定されたものも多く⁹⁸⁻¹⁰⁴、また、Svenssonら⁶³により α -グルコシダーゼを含む糖質関連酵素にはその一次配列に高度に保存された領域 (consensus region) および特徴的な触媒ドメイン [(β/α)8-barrel domain]を持つ α -アミラーゼファミリーと呼ばれる酵素群が存在することが報告されているが、 α -グルコシダーゼのすべてが α -アミラーゼファミリーに属するわけではない。現在、 α -アミラーゼファミリーに属する α -グルコシダーゼの基質特異性についても、 α -グルコシダーゼファミリーの配列上の特徴から解明しようとする研究がある。

前章で報告したとおり、イソマルトトリオデキストラナーゼ生産菌である*B. fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株のゲノムDNA上には、*imtd*から5'末端上流方向にデキストラン代謝に関わる遺伝子群が存在しており、そのひとつとしてイソマルトオリゴ糖に対し高い水解力を持つ α -グルコシダーゼをコードしているORFが見いだされた。

本ORFの発現については、まずイソマルトトリオデキストラナーゼによるデキストラン分解がイソマルトトリオースまでであり、解糖系を経たエネルギーの獲得に

はさらに α -グルコシダーゼによるイソマルトトリオースからグルコースまでの分解を行う必要があること、また*imtd*の発現にかかわるプロモーター領域は本ORFのさらに5'末端側上流に存在していることから、本ORFの発現が実際に行われ、本菌におけるデキストラン代謝に関与している可能性が高いと考えられた。

さらに、本菌をデキストランを炭素源として培養した場合、イソマルトトリオースを分解しグルコースを遊離する活性が菌体内に存在することを確認している。この活性が先に見いだされた α -グルコシダーゼ遺伝子の発現産物であり、実際にデキストランの代謝に関与するものであれば、さらに菌体外においてデキストランの分解で得られたイソマルトトリオースを菌体内に輸送する経路が必要となる。この場合、 α -グルコシダーゼ遺伝子のさらに上流域に見いだされた糖質膜輸送タンパク質 (DexCおよびDexD)、糖質結合タンパク質 (DexE)をコードしていると推定される各ORFも実際に発現し、機能していることが想定されるが、これらのことを立証するためには、まず第一に菌体内に見いだされた α -グルコシダーゼ活性が、第4章でクローニングされた α -グルコシダーゼ遺伝子の発現産物であることを証明する必要がある。

本章では*B. fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株より α -グルコシダーゼの単離を行い、いくつかの酵素学的な性質について報告するほか、N末端アミノ酸配列の解析により、本活性が前章で報告した α -グルコシダーゼ遺伝子の発現産物であることの証明を試みた。

第2章 実験材料および方法

1. 使用菌株

本章で使用した菌株については、第2章に記述したとおりである。

2. 試薬

p-ニトロフェニル α -D-グルコピラノシド (pNPG)はNacalai Tesqueより、Glucostat試薬は和光純薬工業より購入した。その他特に明記しない試薬はそれぞれ市販品を用いた。

3. 活性測定

5 mM pNPG 0.2 ml、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.2 ml、および酵素溶液 0.1 mlの計0.5 mlからなる反応液を37 °Cで5 分間反応させた後、1 M 炭酸ナトリウム 1mlを加え反応を停止した。酵素反応により遊離した *p*-ニトロフェノール (pNP) を400 nmの吸光度を測定することにより定量した。酵素単位は上記の反応条件で、1分間に1 μ molのpNPを生産するのに要する酵素量を1 unit とした。

4. 菌の培養

培地の組成、温度、および振盪条件は、第2章において記載したイソマルトトリオデキストラナーゼの精製のために行った培養と同じ条件で行った。5mlの培地に新たに植え継いだ *B. fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株1白金耳を採種し、一晚培養し前培養とした。これを1mlづつ100mlの培地 (500 ml容坂口フラスコ x 4本) に接種し、さらに96 時間培養を行った。

5. 粗酵素液の調製

超音波破碎にはBranson Ultrasonics社の Model 250 / 450 Sonifierを用い、Output=5、Duty cycle=5の設定で30 秒間破碎した後、3分間氷上での冷却を繰り返して行った。10,000 xg、5 分間の遠心分離で回収した菌体を10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)で洗浄し、再び同条件で菌体を回収した。20 mlの10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)で菌体を懸濁した後、14本の1.5 ml容小型遠心チューブに分注した。それぞれのチューブごとに超音波破碎し、15,000 xg、15 分間遠心分離し、上清を回収した。小型遠心チューブに新たに10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)750 μ lを加え、ペレットを懸濁した後、再び超音波破碎を行った。破碎と上清の回収を10 回繰り返し、得られた無細胞抽出液を粗酵素液として用いた。

6. カラムクロマトグラフィー

DEAE-Sepharose CL-6B、Bio-Gel P-100の各カラムクロマトグラフィーは常法に従って行った。DEAE-Sepharoseは10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 、Bio-Gel

P-100は0.2 M 塩化ナトリウムを含む同緩衝液で緩衝化を行った後に使用した。

7. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

1) PAGE

PAGEはDavis¹⁰⁵⁾らの方法を改良して、BIO-RAD Laboratory社のミニプロテインII装置を用いて行った。分離ゲルに7.5 %ポリアクリルアミドゲル[7.5 % acrylamide, 0.2 % bis, 0.375 % APS, 0.1 % TEMED]を、濃縮ゲルには2.5 %ポリアクリルアミドゲル[2.5 % acrylamide, 0.625 % bis, 0.125 M Tris-HCl buffer (pH 6.8), 0.0375 % APS, 0.1 % TEMED]を使用した。試料は1倍量のサンプル緩衝液[60 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8), 10 % glycerol, 0.005 % BPB]を加えて混合したものを用いた。泳動用緩衝液には25 mM Tris-192 mM glycine (pH 8.3)を用い、10 mAの定電流で泳動を行った。

2) SDS-PAGE

SDS-PAGEは10 %のゲル濃度で行った。使用装置および基本操作はすべて第4章に記載した方法で行った。

3) CBB染色

タンパク質の染色には染色液としてRapid CBB KANTO (関東化学)を用いた。10分間の染色の後、ゲルを一度蒸留水で洗浄し、10% (v/v) 酢酸-15% (v/v) メタノールを用いて脱色を行った。

4) 活性染色

泳動後のゲルをUV照射用トランスイルミネーター上に用意し、5mM 4-methyl-umbelliferyl α -D-glucoside / 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5)を刷毛を用いてゲルに塗布した。5分間室温で放置した後、 α -グルコシダーゼ活性を示すバンドをUV照射により検出した。

8. 至適pH

至適pHの反応組成は以下のように設定した。酵素溶液10 μ lおよびpH 5.0から

9.7までのBritton-Robinsonの広域緩衝液⁴³⁾各390 μ lを試験管に取り、2分間37°Cで保持した後、100 μ lの5mM pNPGを加えさらに5分間反応させた。1 mlの1 M Na₂CO₃を加え反応を停止した後、各反応溶液の活性を遊離したp-ニトロフェノール (pNP) を400 nmの吸光度を測定することにより定量した。活性曲線は最大活性を示したpHの活性量を100%として、各pHの活性比を表示した。

9. イソマルトトリオース分解活性

α -グルコシダーゼのイソマルトトリオース分解における K_m および V 値は、遊離するグルコース量をGlucostat試薬を用いたTris-glucose oxidase-peroxidase法¹⁰⁶⁾で定量することにより求めた。

5 mM、2.5 mM、および1 mMのイソマルトトリオース 0.2 ml、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 0.2 ml、および酵素溶液 0.1 mlの計0.5 mlからなる反応液を37 °Cで15分間反応させた後、1 mlの2M Tris-HCl緩衝液 (pH 7.0)を加え反応を停止した。さらに発色試薬[Glucostat reagentを0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)125 ml (0.04% phenol、0.08% 4-aminoantipyrineを含む) に溶解したもの]200 μ lを添加して37 °Cで1時間反応後、505 nmの吸光度を測定し、標準曲線より遊離したグルコースを定量した。各基質濃度における反応速度を両逆数プロットし、 K_m および V を決定した。

10. N末端配列の解析

精製 α -グルコシダーゼのN末端解析に用いた機材および操作は、第4章に報告した方法に準じて行った。

第3節 実験結果

第1項 粗酵素液の調製

遠心分離により得られた*B. fuscum* var. *dextranlyticum*菌体は一度10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)で洗浄した後、超音波により破碎した。遠心分離と破碎操作を10回繰り返すことにより、20 mlの黄色の無細胞抽出液を得た。この段階

で α -グルコシダーゼは113 unit得られ、比活性は0.11 unit/mgであった。

第2項 精製

1. DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィー

酵素溶液を10 mMのリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)で緩衝化したDEAE-Sepharose CL-6Bカラム(2.0 x 28cm、87ml)に添加し、250 mlの同緩衝液でカラムを洗浄後、吸着タンパク質を0から1 Mまでの塩化ナトリウムを用いた直線濃度勾配により溶出した。分画操作は10 ml / hrの流速、3.2 cm / hrの線流速で行った。クロマトパターンはFigure 6-1に示した。得られた活性画分 (Fraction Nos. 75、76) を集め、コロジオンバックを用いて同緩衝液に透析しながら約5 mlにまで濃縮した。この段階で α -グルコシダーゼは回収率92% (104 unit)、比活性0.57 unit / mgであった。

2. 調製用電気泳動法による精製

得られた酵素溶液の10分の1量 (10 unit) を用いて、Native PAGEによる精製を行った。各レーン20 μ l (0.2 unit相当、50レーン) の酵素溶液を泳動し、4-methylumbelliferyl α -D-glucosideを用いた活性染色の結果、各レーンにおいて α -グルコシダーゼ活性を示す明確なシングルバンドを得た (Figure 6-2) 。このバンドをゲルより切り出し、細かく切断した後3 mlの10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 中で一晩、4 $^{\circ}$ Cで保持し、 α -グルコシダーゼの回収を行った。この段階で得られた α -グルコシダーゼを全量用いた場合に換算した場合、回収率12.6% (14.2 unit)、比活性1.82 unit / mgとなった。

3. Bio-Gel P-100カラムクロマトグラフィー

酵素溶液は0.5 mlにまで濃縮し、0.2 M NaClを含む10 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)で緩衝化したBio-Gel P-100カラム(0.9 x 50cm、32ml)に供した。溶出は0.8 ml/hrの流速、1.2 cm / hrで上記の緩衝液を用いて行った。得られた活性画分を10 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)に対して数回透析した後、精製酵素標品として以後の実験に用いた。この段階で得られた α -グルコシダーゼを全量用

いた場合に換算した場合、回収率6.5% (7.4 unit)、比活性87.3 unit / mgとなった。精製の過程はTable 6-1に示した。

4. SDS-PAGE

各精製段階の酵素標品をSDS-PAGEに供した結果、 α -グルコシダーゼは分子量約65,000の単一バンドとして得られた(Figure 6-3)。

第3項 諸性質

1. 至適pH

α -グルコシダーゼの活性曲線をFigure 6-4に示した。最大活性はpH 7.5の緩衝液を用いた場合に得られた。

2. イソマルトトリオース分解活性

基質濃度に対する精製 α -グルコシダーゼの反応速度を両逆数プロットし(Figure 6-5)、本酵素のイソマルトトリオース分解における K_m および V を測定した結果、それぞれ7.1 mM、1.0 μ mole/min/mgとなった。

第4項 N末端配列の解析

PVDF膜に固定した約100 pmolの精製 α -グルコシダーゼをペプチドシーケンサーに供し、N末端配列の解析を行ったが、配列を決定するのに十分なアミノ酸のフェニルチオヒダントイン誘導体を得られず、配列を決定することができなかった。

第4節 考察

B. fuscum var. *dextranlyticum* 由来の α -グルコシダーゼはpNPGだけではなくイソマルトトリオースに対する分解能を有していた。よって、本活性が存在することにより、イソマルトトリオデキストラナーゼの働きにより遊離したイソマルトトリオースをグルコースにまで分解し、解糖系を経てエネルギーを得ていることが示唆された。今後他のオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、さらにはデンプンおよびデキ

ストランに対する速度論的解析を行い、本 α -グルコシダーゼの基質認識に対する知見を得たいと考えている。

SDS-PAGEにおける精製 α -グルコシダーゼの分子量はほぼ65,000であり、DexAの推定アミノ酸配列から計算された分子量65,700と良く一致した。さらに、この α -グルコシダーゼがイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の5'末端側上流に見いだされたDexAの発現産物由来の酵素であることを証明すべく、ペプチドシーケンサーによる解析を試みた。しかしながら、明確なN末端の配列を得ることができなかった。これが単純な試料量の不足によるものか、本酵素のN末端が修飾によりブロックされているためなのかは判断できなかった。よってこの問題を解決するために、十分量の精製 α -グルコシダーゼを調製後、Lysyl endpeptidase等のプロテアーゼによる消化を行い、得られたペプチドの解析により改めて判断したいと考えている。また、本酵素のDexA由来の是非に関わらず、イソマルトトリオデキストラナーゼ同様dexAの大腸菌発現を行い、 α -グルコシダーゼの活性を調べる予定であるが、菌体内の α -グルコシダーゼが本遺伝子によるものであれば、他のオリゴ1,6-グルコシダーゼおよび α -アミラーゼファミリーに属する糖質関連酵素との比較により、本酵素の特徴と配列の関係について解析していきたいと考えている。特に本酵素はイソマルトトリオデキストラナーゼというイソマルトトリオースのみを生産するデキストラナーゼとオペロンを形成しており、 α -アミラーゼファミリーに属する糖質分解酵素の中で、イソマルトトリオースに対する親和力が高いことが予想される。これらについては他の基質に対する活性を調査してから判断したい。

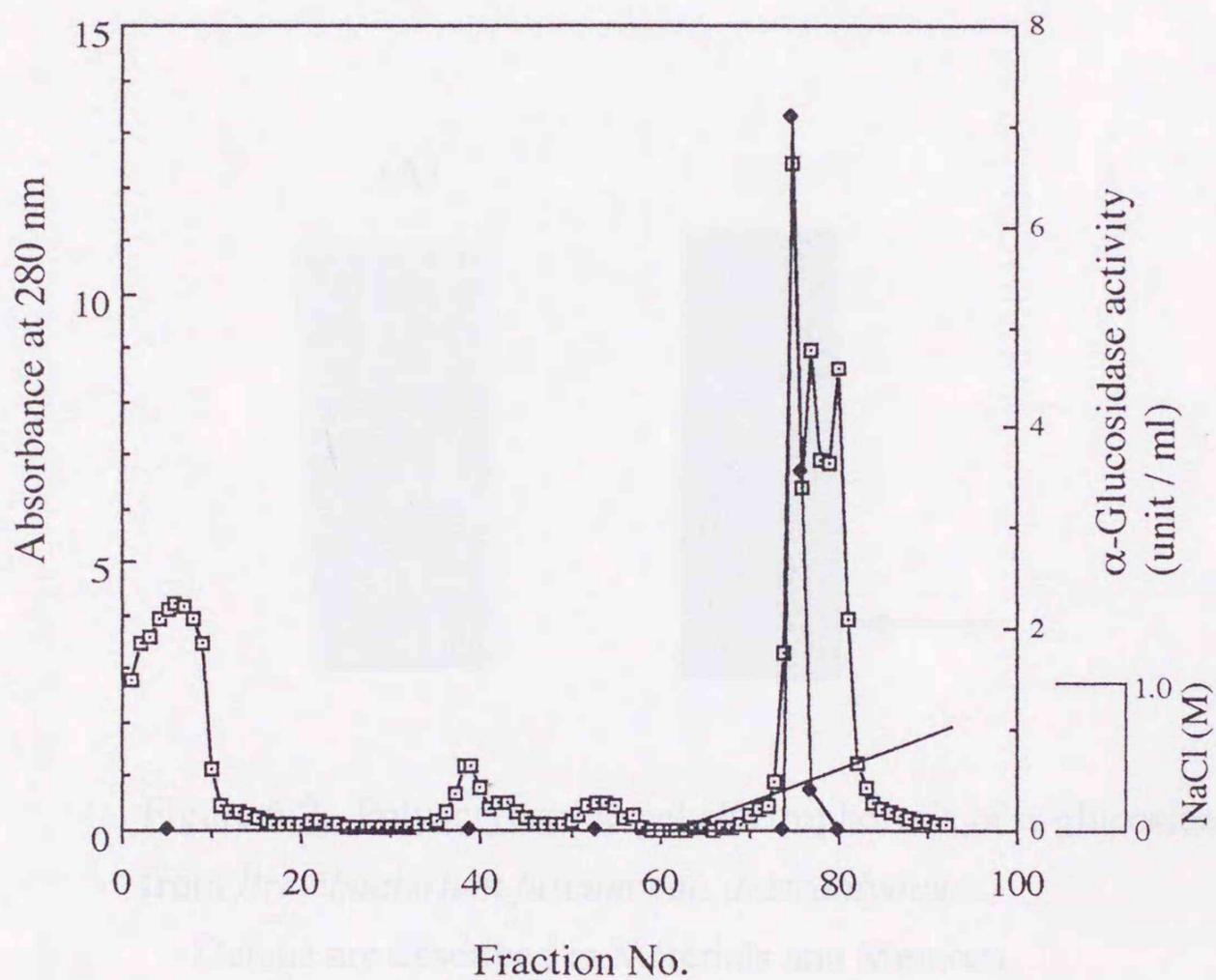


Figure 6-1. Chromatography of α -glucosidase on a DEAE-Sepharose CL-6B column.

The enzyme solution was put on a DEAE-Sepharose CL-6B column (2.0 x 28cm, 82ml). Fractions of 10ml each were collected at a flow rate of 10 ml / hr (3.2 cm / hr). \square , absorbance at 280 nm; \blacklozenge , α -glucosidase activity (unit / ml); — , NaCl concentration (M).

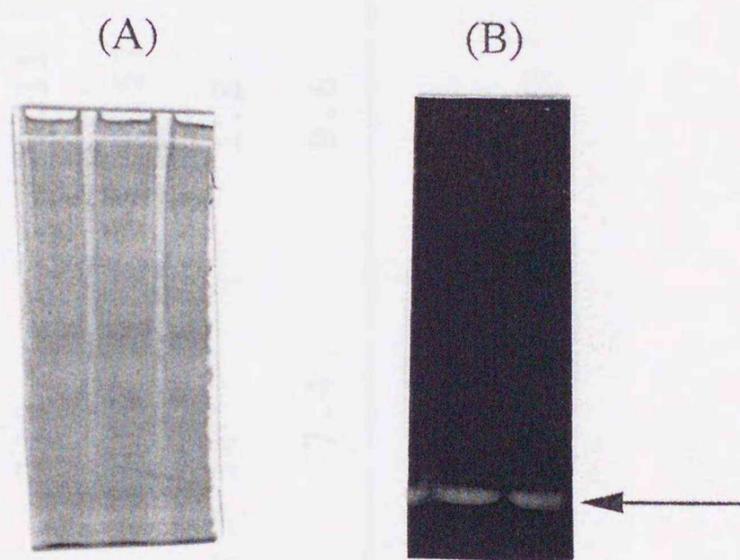


Figure 6-2. Polyacrylamide gel electrophoresis of α -glucosidase from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum*.

Details are described in Materials and Methods.

(A), CBB staining; (B), active staining. α -Glucosidase was detected by 5 mM 4-methylumbelliferyl α -D-glucoside (showed with an arrow).

Table 6-1. Purification steps of α -glucosidase from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum*.

Purification step	Total protein ^a (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit / mg)	Yield (%)	Purification (-fold)
Crude enzyme	990	110	0.11	100	1.0
DEAE-Sepharose CL-6B	180	100	0.57	92	5.2
PAGE	7.8	14	1.8	13	16
Bio-Gel P-100	0.8	7.4	9.6	6.5	87

a : calculated under the assumption that $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ at 280nm is 10.

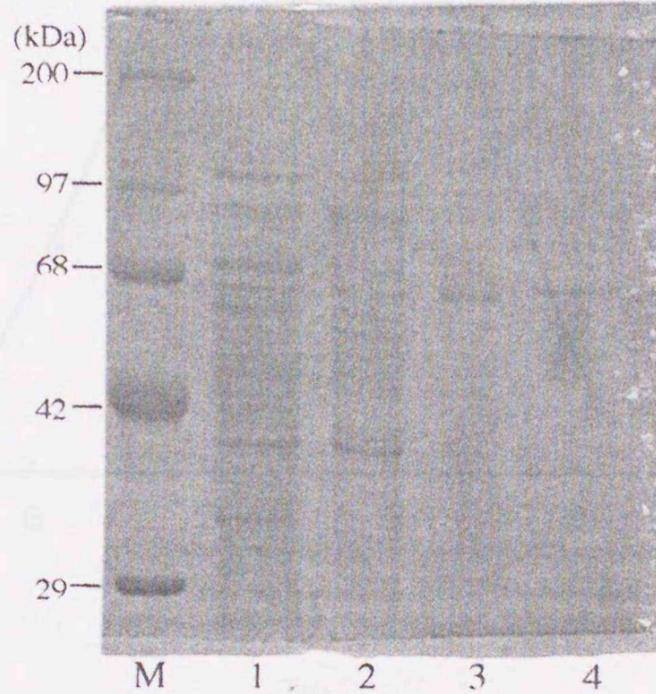


Figure 6-3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins at each stage of α -glucosidase purification.

Cell-free extract (lane 1) and active fractions of DEAE-Sepharose CL-6B (lane 2), preparative PAGE (lane 3), and Bio-Gel P-100 (lane 4) were loaded. The gel was stained with Rapid CBB and decolorized with 10% acetic acid and 15% methanol.

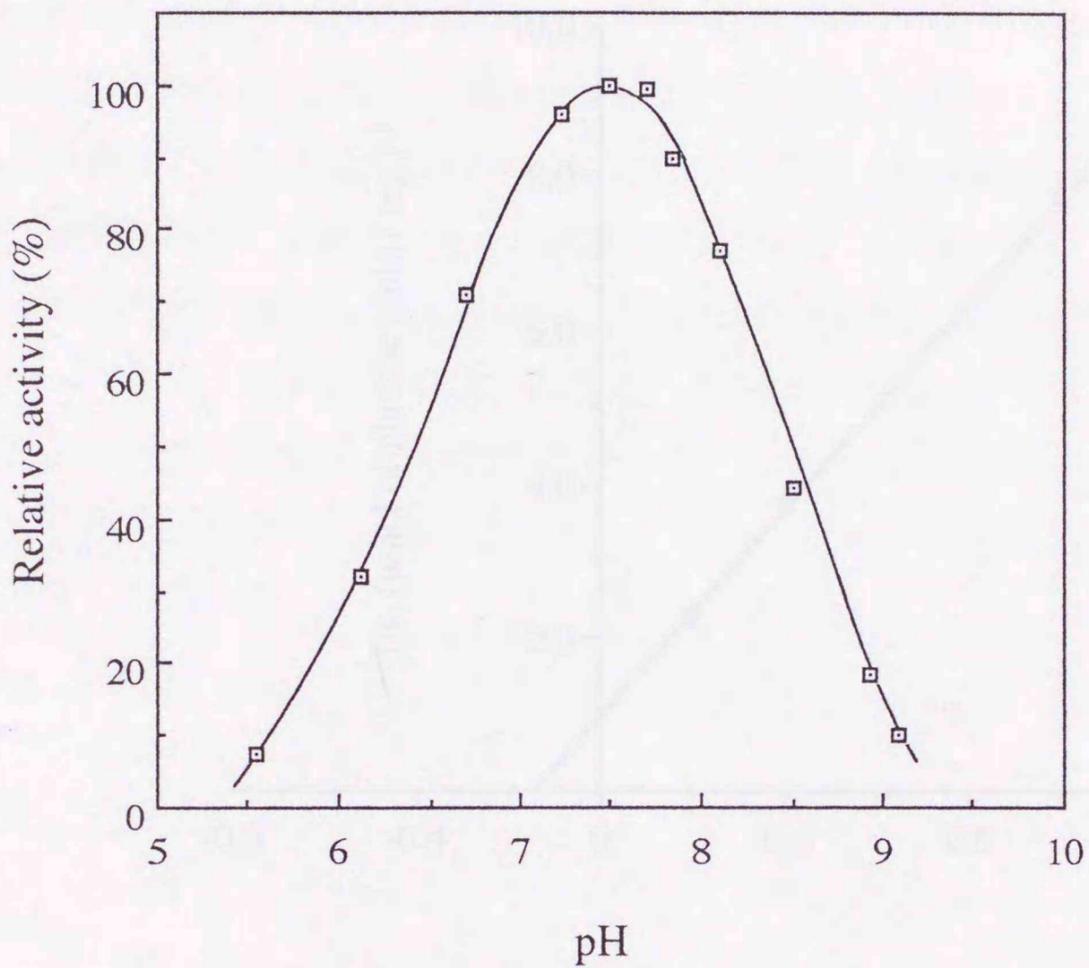


Figure 6-4. Effects of pH on the activity of α -glucosidase.

The enzyme activity was measured in the standard reaction except that Britton - Robinson buffer of each pH was used.

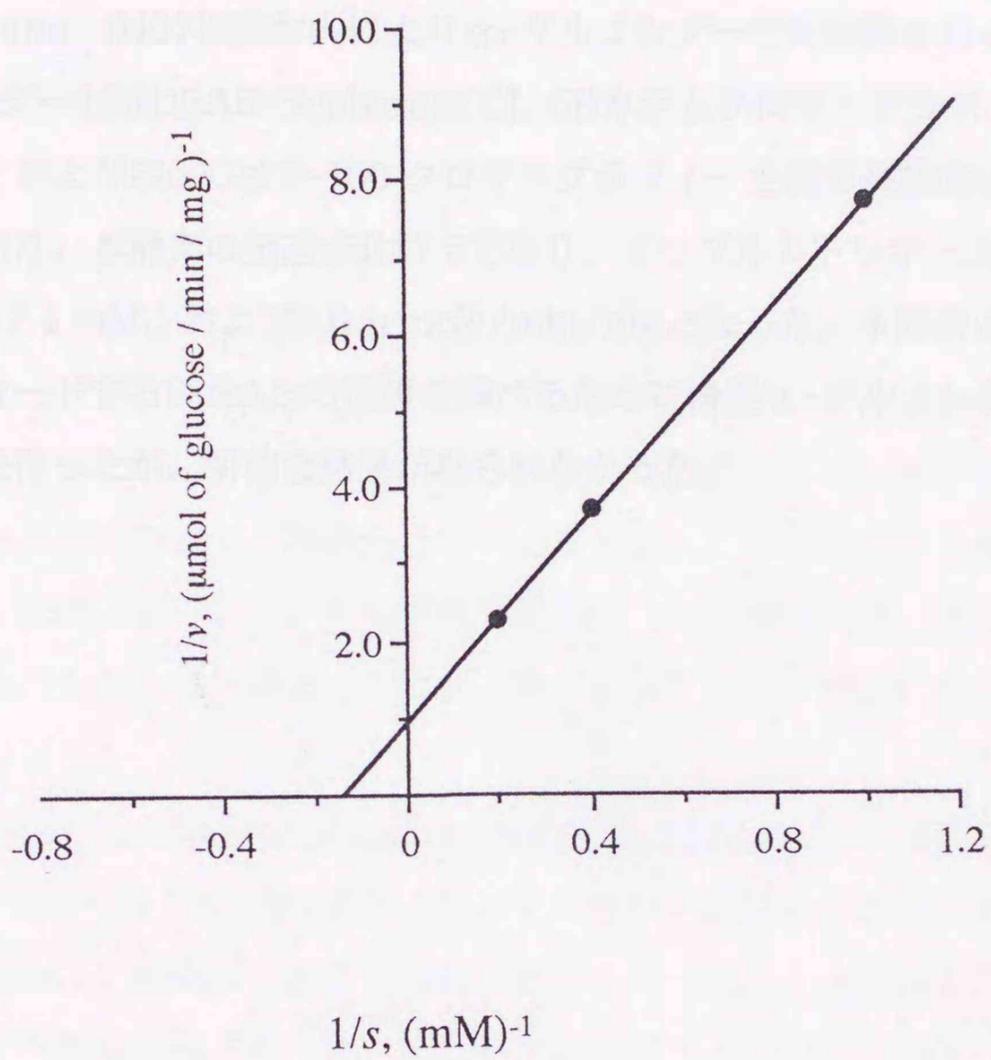


Figure 6-5. Lineweaver-Burk plots of hydrolysis of ismaltotriose α -glucosidase from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum*.

The reciprocal values of substrate concentrations and initial velocities for hydrolysis of isomaltotriose were plotted.

第5節 要約

イソマルトトリオデキストラナーゼ生産菌である *B. fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株菌体内により α -グルコシダーゼの精製を行った。菌体内 α -グルコシダーゼはDEAE-Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィー、調製用電気泳動法、およびBio-Gel P-100 クロマトグラフィーを経て最終的に約87 倍にまで精製された。本酵素の至適pHは7.5であり、イソマルトトリオースに対する K_m 、 V はそれぞれ7.1 mM、および1.0 μ mole/min/mgとなった。本酵素と α -グルコシダーゼをコードするDexAとの関係を調べるために精製 α -グルコシダーゼのN末端配列解析を行ったが、明確な結果が得られなかった。

第7章 総括

本研究は、デキストラン分解酵素の一形態であるイソマルトトリオデキストラナーゼの構造と機能の相関を解明することを目的として、酵素の諸性質、一次配列および他の糖質関連酵素との相同性、大腸菌での発現および発現酵素の諸性質、デキストラン代謝に関わる遺伝子群の解明、およびデキストラン分解物の代謝に関わる α -グルコシダーゼに関して検討したものである。

まず第2章において酵素生産菌である *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株の培養上清からのイソマルトトリオデキストラナーゼの精製を行い、諸性質について詳細に検討した。さらに部分アミノ酸配列を決定した。

つづいて第3章において、本酵素をコードする遺伝子の単離をおこない、構造遺伝子について詳細に検討した。他の糖質分解酵素との相同性検索の結果、本酵素がエキソ型デキストラナーゼで初めてエンド型デキストラナーゼと相同性を持つことが明らかとなった。

さらに第4章において本酵素遺伝子の大腸菌発現を行った。その結果イソマルトトリオデキストラナーゼの成熟酵素をコードする遺伝子を用いることにより、培地当たりオリジナルの生産菌よりも多くの活性が得られる組換え体を得ることに成功した。発現タンパク質の精製を行い、オリジナルの酵素と比較した結果、急激な発現によると考えられる比活性の低下が認められた。また、本酵素がエキソ型であるにも関わらずブルーデキストランを分解し、ハローを形成する能力があることが明らかとなった。

さらに第5章において、イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の周辺にあるデキストラン代謝に関わる遺伝子群の存在を明らかにした。本酵素遺伝子の5'末端側上流域には α -グルコシダーゼ、糖質の膜輸送タンパク質に関わる二種類のタンパク質、糖質結合タンパク質、および代謝制御に関わるタンパク質をコードすると考えられるORFが存在していた。特に α -グルコシダーゼ遺伝子は相同性検索の結果よりイソマルトオリゴ等分解能が高い種類をコードしていることが判明した。これにより、本酵素生産菌におけるデキストラン代謝機構として、菌体外におけるデキストランの分解とイソマルトトリオースの生成、イソマルトトリオースの膜輸送による菌体内への取り込み、および α -グルコシダーゼによるイソマルトトリオースの分

解とグルコースの生成、グルコース代謝系によるエネルギーの獲得という流れが想定された。

これに伴い、第6章において菌体内に存在する α -グルコシダーゼの精製を行い、諸性質の検討を行った。その結果、本酵素は高いイソマルトトリオース分解能を有しており、本酵素生産菌のデキストラン分解によるエネルギー獲得に直接関与していることが判明した。現在本酵素がイソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子の上流に見いだされた遺伝子産物であることの証明を行っている。

以上に述べたように、本酵素をコードする遺伝子の構造が明らかとなったことにより、すべての種類のデキストラナーゼについて一次構造が解明され、本酵素がエキソ型デキストラナーゼの中で初めてエンド型デキストラナーゼおよびイソプルラナーゼと相同性をもつことが明らかとなった。これらのことより、本論文で構築したイソマルトトリオデキストラナーゼの発現系を用いてアミノ酸変異株を作製することにより、デキストランに対する基質認識および触媒に関わるアミノ酸を推定することが可能となり、基質認識および生成物特異性を決定する因子の解明に大きな手がかりを与えることとなった。

さらに遺伝子工学を用いたイソマルトトリオデキストラナーゼの大量発現系の確立はイソマルトオリゴ糖（主にイソマルトース）の工業レベルでの生産にデキストランからの分解反応による生産法という新しい、かつ目的のイソマルトオリゴ糖を高い比率で得ることができる方法に路を開くものである。イソマルトオリゴ糖は保湿性、味質、改善効果に優れていることより広範囲な食品に利用されているが¹⁰⁷⁾、その調製法は転移反応を用いるため、特定のイソマルトオリゴ糖のみを純品として獲得することが困難な状態である。これに対し、イソマルトトリオデキストラナーゼを用いた方法はイソマルトトリオースを大量かつ安価に、純粋な状態で得ることが可能であり、さらにイソマルトトリオースを単体で用いても、これまでイソマルトオリゴ糖として食品に利用されてきた利点（保湿性など）が保持されることが考えられ、安定した品質の食品添加物としてのイソマルトトリオースの供給ができるようになる。これらのことを現実に行う場合、基質であるデキストランの大量かつ安価の供給が必要となるが、これについても現在デキストランをシュクロースより高度に生産する変異株の研究¹⁰⁸⁾が進んでいる。よって、エキソ型デキストラナーゼを用いたイソマルトオリゴ糖の生産は、工業レベルでの生産も十分行える段階に

まで来ていると考えられる。

以上のことより、本論文で記述した研究内容はデキストラナーゼの機能解析およびイソマルトトリオースの大量生産に大きく貢献するものである。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇切なる御指導と御高配を賜りました北海道大学農学部・千葉誠哉教授、本間 守教授に心より篤く御礼を申し上げます。また、本研究を開始するにあたり、実験の立案、菌の入手、研究全般にわたる御教示を賜りました北海道大学・農学部 松井博和助教授、本論文の御校閲を始め、有益な御助言、ご指導を戴きました北海道大学・農学部、木村淳夫教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究を遂行するに当たり終始、直接の御指導、御鞭撻を戴き、本論文の完成に多大なる御協力を賜りました北海道大学・農学部 森 春英助手、伊藤浩之助手に心より感謝いたします。

さらに、本研究で用いた *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株を分譲していただき、さらに本研究の発表を快く許可していただきました旭化成工業株式会社・ライフサイエンス総合研究所 高田正樹博士、柳沼 慧博士に篤く御礼申し上げます。

最後になりましたが、本研究にご協力を戴きました北海道大学・農学部・応用生命科学科・蛋白質機能工学講座および北海道大学・農学部・生物機能化学科・生物化学講座の皆様心より感謝いたします。

参考文献

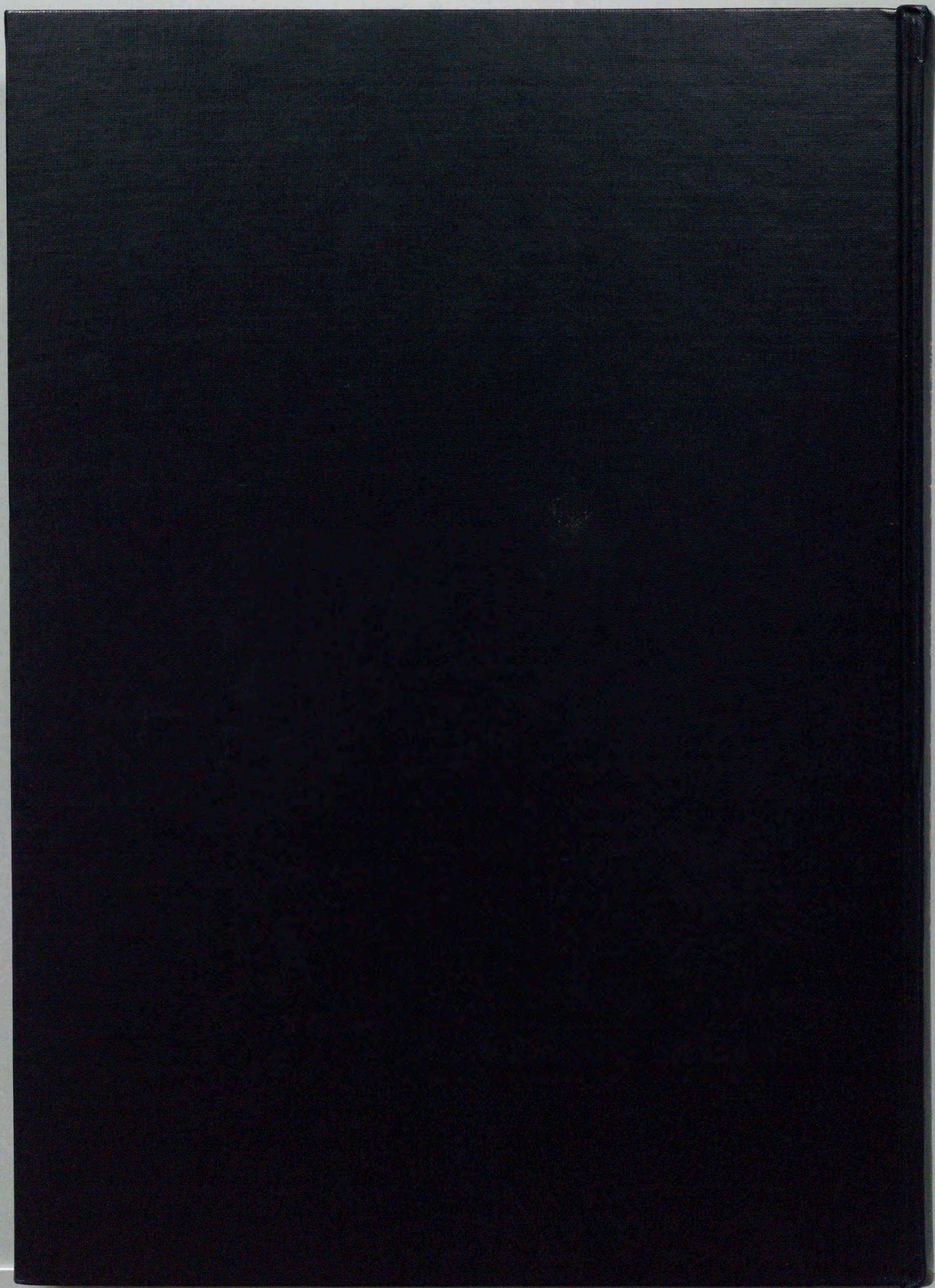
- 1) Anders Lundgren, 蛋白質 核酸 酵素, 34, 235 (1989).
- 2) I. A. Wolff, *Ind. Eng. Chem.*, 46, 370(1954).
- 3) A. M. Chludzinski, *J. Dent. Res. special issue C.*, 55, 75 (1976).
- 4) B. Ingelman, *Acta Chem Scand.*, 1, 731(1947).
- 5) B. Ingelman, *Acta. Chem. Scand.*, 2, 803(1948).
- 6) L. Nordstorm and E. Hultin, *Sven. Kem. Tidskr.*, 60, 283(1948).
- 7) N. Hiraoka, J. Fukumoto and D. Tsuru, *J. Biochem.*, 71, 57(1972).
- 8) H. M. Tsuchiya, A. Jeanes, H. M. Bricker, and C. A. Wilham, *J. Bacteriol.*, 64, 513(1952).
- 9) A. Hattori and K. Ishibashi, *Agric Biol Chem.*, 45, 2347(1981).
- 10) R. H. Staat and C. F. Schachtele, *Infect. Immun.*, 12, 556(1975).
- 11) A. C. Hayward and L. I. Sly, *J. appl. Bact.*, 40, 355(1976).
- 12) R. W. Bailey and R. T. J. Clarke, *Biochem. J.*, 72, 49(1959).
- 13) G. N. Richards and M. Streamer, *Carbohydr. Res.*, 32, 251(1974).
- 14) A. N. J. Heyn, *Science*, 167, 874(1970).
- 15) A. Dahlqvist, *Biochem. J.*, 86, 72(1963).
- 16) R. Ammon, *Enzymologia*, 25, 245(1963).
- 17) R. T. Fitzgerald, R. H. Keyes, T. H. Stoudt, D. H. Spineli, *J. Am. Dent. Assoc.*, 76, 301 (1968).
- 18) D. Tsuru, N. Hiraoka, T. Hirose and F. Fukumoto, *Agric. Biol. Chem.*, 35, 1727 (1972)
- 19) P. A. Inkerman and G. P. James, *Proc. Queensl. Soc. Sugar. Cane Technol.*, 43, 307(1976).
- 20) T. Sawai, K. Toriama and K. Yano, *J. Biochem.*, 75, 105(1974).
- 21) T. Takayanagi, G. Okada and S. Chiba, *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2337(1987).
- 22) T. Yamaguchi and S. Gocho, *Agric. Biol. Chem.*, 37, 11(1973).
- 23) A. Iwai, H. Ito, T. Mizuno, H. Mori, H. Matsui, M. Honma, G. Okada and S. Chiba, *J. Bacteriol.*, 176, 7730(1994).
- 24) 高柳 勉、木村淳夫、松井博和、岡田巖太郎、千葉誠哉、応用糖質科学、42, 381 (1995).

- 25) Y. Kim and Y. Sakano, *J. Appl. Glycosci.*, 43, 35 (1996).
- 26) Y. Suzuki, Ito N, T, Yuuki, H. Yamagata and S, Udaka, *J. Biol. chem.*, 264, 18993 (1989).
- 27) H. M. Jephason, E. A. MacGregor, B. Henrissat, M. R. Sierks and B. Svensson, *Biochem. J.*, 280, 51(1991).
- 28) H. Takata, T. Kuriki, S. Okada, Y. Takesada, M. Iizuka, N. Minamiura and T. Imanaka, *J. Biol. Chem.*, 267, 18447 (1992).
- 29) H. Takata, T. Takaha, T. Kuriki, S. Okada, M. Takagi and T. Imanaka, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3069 (1994).
- 30) T. Kuriki, H. Kaneko, M. Yanase, H. Takata, J. Shimada, S. Handa, T. Takada, H. Umeyama and S. Okada, *J. Biol. Chem.* 271, 17321 (1996).
- 31) M. Okushima, D. Sugino, Y. Kouno, S. Nakano, J. Miyahara, H. Toda, S. Kubo and A. Matsushiro, *Jpn. J. Genet.*, 66, 173(1991).
- 32) T. Oguma, T. Kurokawa, K. Tobe, S. Kitao and M. Kobayashi, Unpublished (1996).
- 33) B. Garcia., E. Margolles, H. Roca, D. Mateu, M. Raices, M.E. Gonzales, L. Herrera and J. Delgado, *FEMS. Microbiol. Lett.* 143, 175 (1996).
- 34) H. Aoki and Y. Sakano, *Biochem. J.* 323, 757 (1997).
- 35) H. Ohnishi, H. Kitamura, T. Minowa, H. Sakai and T. Ohta, *Eur. J. Biochem.*, 207, 413 (1992)
- 36) M. Sugiura, A. Ito and T. Yamaguchi, *Biochem. Biophys. Acta.*, 305, 61(1974).
- 37) M. Sugiura and A. Ito, *Chem. Pharm. Bull.* 23, 1593 (1973).
- 38) M. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, 195, 19 (1952).
- 39) N. Nelson, *J. Biol. Chem.*, 153, 375 (1944).
- 40) U. K. Laemmli, *Nature*, 277, 680 (1970).
- 41) K. M. Zacharius, T. E. Zell, T. H. Morrison and J. J. Woodlock, *Anal Biochem.*, 30, 148 (1969).
- 42) E. Stahl, U. Kaltenbach, *J. Chromatogr.*, 5, 351(1961)
- 43) H. T. S. Britton and R. A. Robinson, *J. Chem. Soc.*, 1931, 458, 1456 (1931).
- 44) H. Lineweaver and D. Burk, *J. Amer. chem. Soc.*, 56, 658 (1934).
- 45) G. N. Wilkinson, *Biochem. J.*, 80, 324 (1961).
- 46) A. McPherson, *Method in Enzymol.*, 114, 112 (1985).

- 47) A. Hattori, K. Ishibashi and S. Minato, *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2409 (1981).
- 48) J. F. Barrett, T. A. Barrett and R. Curtiss III, *Infect. Immun.*, 55, 792 (1986).
- 49) Y. Ohnishi, S. Kubo, Y. Ono, M. Nozaki, Y. Gonda, H. Okano, T. Matsuya, A. Matsushiro and T. Morita, *Gene*, 156, 93 (1995).
- 50) T. Igarashi, A. Yamamoto and N. Goto, *Microbiol. Immunol.*, 39, 853 (1995).
- 51) C. Yanisch-Perron, J. Vieira and J. Messing, *Gene*, 33, 103 (1985).
- 52) D. Hanahan, *J. Mol. Biol.*, 166, 557 (1983).
- 53) F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl, "Current Protocols in Molecular Biology", Wiley, New York, (1987).
- 54) J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, "Molecular cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, New York (1989).
- 55) F. Sanger, S. Nicklen and A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463 (1977).
- 56) S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman, *J. Mol. Biol.*, 215, 403 (1990).
- 57) J. D. Thompson, D. G. Higgins and T. J. Gibson, *Nucleic Acids Research*, 22, 4673 (1994).
- 58) R. S. Breed, E. G. D. Murray, N. R. Smith, *et al.*, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th Ed., Williams and Wilkins Co. (1957).
- 59) H. Aoki and Y. Sakano, *Biochem. J.*, 323, 859 (1997).
- 60) 高橋克幸、水野隆文、荒木 修、伊藤浩之、松井博和、本間 守、千葉誠哉、日本農芸化学会 95年度本大会講演要旨集, 69, 201 (1995).
- 61) C. Menendez, G. Igloi and R. Brandsch, *Plasmid*, 37, 35 (1997).
- 62) K. Watanabe, K. Chishiro, K. Kitamura and Y. Suzuki, *J. Biol. Chem.* 266, 24287 (1991).
- 63) B. Svensson, *Plant Molecular Biology*, 25, 141 (1994).
- 64) F. W. Studier and B. A. Moffatt, *J. Mol. Biol.*, 189, 113 (1986).
- 65) A. H. Rosenberg, B. N. Lade, D. S. Chui, S. W. Lin, J. J. Dunn and F. W. Studier, *Gene*, 56, 125 (1987).
- 66) F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, J. W. Dubendorff, *Methods Enzymol*, 185, 60 (1990).
- 67) J. K. Kane and D. L. Hartley, "Purification and Analysis of Recombinant Proteins",

- Marcel Dekker, New York (1991).
- 68) M. Ikeuchi, K. Takio and Y. Inoue, *FEBS Lett.*, 242, 263 (1989).
- 69) M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 72, 248 (1976).
- 70) J. E. Coligan, B. M. Dunn, H. L. Ploegh, D. W. Speicher and P. T. Wingfield, "Current Protocols in Protein Science", Wiley, New York, (1995).
- 71) K. Sahm, M. Matuschek, H. Muller, W. Mitchell and H. Bahl, *J. Bacteriol.*, 178, 1039 (1994).
- 72) M. Matuschek, K. Sahm and H. Bahl, Direct Submission (1996).
- 73) H. Bahl, G. Burchhardt, A. Spreinat, K. Haeckel, A. Wienecke, B. Schmidt and G. Antranian, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1554 (1991).
- 74) M. Matuschek, G. Burchhardt, K. Sahm and H. Bahl, *J. Bacteriol.*, 176, 3295 (1994).
- 75) R. R. B. Russell, J. Aduse-Opoku, I. C. Sutcliffe, L. Tao and J. J. Ferretti, *J. Biol. Chem.*, 267, 4631 (1992).
- 76) M.G. Rees, N.L. Harris and F.H. Eeckman, "Proceedings of the Pacific Symposium on Biocomputing", (1996).
- 77) 島本 功、佐々木卓治："植物のPCR実験プロトコール"、秀潤社、1995年。
- 78) K. Watanabe., K. Kitamura, H. Iha and Y. Suzuki, *Eur. J. Biochem.* 192, 609 (1990).
- 79) A. Puyet and M. Espinosa, *J. Mol. Biol.*, 230, 800 (1993).
- 80) B. C. Locman, M. Heerikhuisen, R. J. Leer, A. Van Der. Broek, Y. Borsboom, A. Chaillon, P. W. Postma and P. H. Pouwels, *J. Bacteriol.*, 179, 5391 (1997).
- 81) B. C. Locman, R. J. Leer, R. van Sorge and P. H. Pouwels, *Mol. Gen. Genet.*, 245, 117 (1994).
- 82) M. Flokin, "Comprehensive Biochemistry Vol. 13, Enzyme Nomenclature", Elsevier Scientific Publishing co., Amsterdam, 215 (1973).
- 83) K. Matsusaka, S. Chiba and T. Shimomura, *Agric. Biol. Chem.*, 41 1917 (1977).
- 84) S. Chiba and T. Shimomura, *Agric. Biol. Chem.*, 37 1831 (1973).
- 85) Y. Yamasaki, T. Miyake and Y. Suzuki, *Agric. Biol. Chem.*, 37 251 (1973).
- 86) Y. Yamasaki, Y. Suzuki and J. Ozawa, *Agric. Biol. Chem.*, 41 1559 (1977).
- 87) T. Kaya, M. Aikawa, T. Matsumoto, *J. Biochem* 82, 1443 (1977).
- 88) Y. Oda, H. Iwamoto, K. Hiromi, K. Tonomura, *Biosci Biotechnol Biochem*, 7, 1902 (1993).

- 89) 木村淳夫、博士論文(北海道大学農学部) (1984) .
- 90) N. Takahashi, T. Shimomura, and S. Chiba, *Agric.Biol. Chem.*, 35, 2015 (1971).
- 91) S. Chiba and T. Shimomura, *Agric.Biol. Chem.*, 39, 1033 (1975).
- 92) K. Kanaya, S. Chiba, T. Shimomura and K. Nishi, *Agric.Biol. Chem.*, 40, 1929 (1976).
- 93) S. Chiba, S. Inomata, H. Matsui and T. Shimomura, *Agric.Biol. Chem.*, 42, 241 (1976).
- 94) N. Hibi, S. Chiba and T. Shimomura, *Agric.Biol. Chem.*, 40, 1805 (1976).
- 95) H. Matsui, T. Yamada, Y. Someya and S. Chiba, *Agric.Biol. Chem.*, 47, 1817 (1983).
- 96) S. Chiba and T. Shimomura, *J. Jap. Soc. Starch. Sci.*, 25, 105 (1978).
- 97) S. Chiba, *J. Jap. Soc. Starch. Sci.*, 27, 138 (1980).
- 98) A. Nakamura, I. Nishimura, A. Yokoyama, D.GLee, M.Hidaka, H.Masaki, A. Kimura, S. Chiba and T. Uozumi, *J. Biotechnol.* 53, 75 (1997).
- 99) J. D. Monroe, B.D. Hall, C. M. Gough and A. L. Stephen, *Plant Physiol.* 115, 863 (1997).
- 100) H. Matsui, S. Iwanami, H. Ito, H. Mori, M. Honma and S. Chiba, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 875 (1997).
- 101) Y. Takii, K. Takahashi, K. Yamamoto, Y. Sogabe and Y. Suzuki, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 629 (1996).
- 102) M. Sugimoto and Y. Suzuki, *J. Biochem.*, 119, 500 (1996).
- 103) K. Ohashi, M. Sawata, H. Takeuchi, S. Natori and T. Kubo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 221, 380 (1996).
- 104) M. Nakao, T. Nakayama, A. Kakudo, M. Inohara, M. Harada, F. Omura and Y. Shibano, *Eur. J. Biochem.*, 220, 293 (1994).
- 105) B. J. Davis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 321 (1964).
- 106) G. J. Walker and Pulkownik, *Carbohydrate Reserch*, 36, 53 (1973).
- 107) 食品と開発編集部、"新甘味料の市場動向"、食品と開発、29, 24 (1994).
- 108) D. Kim and J. F. Robyt, "Enzymes for Carbohydrate Engineering", Elsevier Science (1996).



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

