HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Discovery of bacteria producing a novel cycloisomaltotetraose and identification of novel enzymes involved in cycloisomaltotetraose prodciton and metabolism pathway [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	藤田, 章弘
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第7160号
Issue Date	2022-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87288
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Fujita_Akihiro_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博　士（農学）　　氏名　　藤田　章弘

学 位 論 文 題 名

Discovery of bacteria producing a novel cycloisomaltotetraose and identification of novel enzymes involved in cycloisomaltotetraose production and metabolism pathway
(新規シクロイソマルトテトラオースを生産する微生物の発見とシクロイソマルトテトラオース生成・代謝経路に関与する新規酵素の同定)

澱粉は，α-1,4 グルコシド結合を主体とする多糖である．澱粉に作用する酵素が多数発見され，各種糖質の工業生産に利用されている．α-アミラーゼは，澱粉中の α-1,4 グルコシド結合をエンド型で加水分解し，マルトオリゴ糖製造に利用される．α-グルコシダーゼによる糖転移反応はイソマルトオリゴ糖やニゲロオリゴ糖の製造に利用される．分子内糖転移反応により，シクロデキストリン，環状ニゲロシルニゲロース(CNN)，環状マルトシルマルトース(CMM)等の環状糖が澱粉から合成され，産業利用が進んでいる．その分解酵素も報告があり，澱粉関連酵素について学術面・産業面で多くの知見がある．

α-1,6 グルコシド結合を主体とする多糖デキストランに作用する加水分解酵素として，デキストラナーゼやグルコデキストラナーゼ等が知られる．分子内糖転移反応により重合度 7 以上の環状イソマルトオリゴ糖(CIs)を生成する酵素として，シクロイソマルトオリゴサッカイライドグルカノトランスフェラーゼ(CITase)が知られている．澱粉に作用する酵素と比べ，デキストランに作用する酵素は種類が限られ，産業利用も限定的である．新規デキストラン関連酵素の取得は，糖質生産技術を拡大する．そこで本研究では，デキストランに作用し，新規糖質を生成する新規酵素を土壌細菌より探索した．本論文では，以下 4 点を報告する．

1．デキストランから酵素的に生成される新規環状四糖の構造と機能

約 2000 株の微生物を土壌から単離，その粗酵素液をデキストランに作用させ，生成オリゴ糖の化学構造を解析した．*Agreia* sp．D1110 株と *Microbacterium trichothecenolyticum* D2006 株の粗酵素液が，新規 CI のシクロイソマルトテトラオース(CI4)をデキストランから生成した．局在解析では，CI4 生成活性は両株の培養上清に認められた．CI4 は既知 CIs の中で最小である．結晶化により，CIs で初の結晶である CI4 単結晶を得た．単結晶 X 線構造解析により，当該結晶は 5 含水結晶であること，既知環状四糖 CNN や CMM と異なり 2 つの空孔を持つ立体構造を示すことを明らかにした．*in vitro* 消化性試験では，CI4 が難消化性であることが示された．

2．CI4 生成酵素の精製と酵素学的諸性質解析

D1110 株と D2006 株の培養上清より CI4 生成酵素を精製，酵素学的諸性質を解析した．両 CI4 生成酵素は重合度 5 以上のイソマルトオリゴ糖を基質とした環化反応と不均化反応を触媒し，CI4 を基質として加水分解反応とカップリング反応を触媒した．CITase も環化，不均化，加水分解，カップリングの 4 反応を触媒し，CI4 生成酵素と CITase は類似した反応特異性を示す．一方，CITase は重合度 7~20 の CI を生成し，CI4 生成酵素は環状糖としては CI4 を特異的に生成した．この生成物特異性により，CI4 生成酵素は CITase と異なる酵素と考え，本研究で取得した CI4 生成酵素をシクロイソマルトテトラオースグルカノトランスフェラーゼ(CI4Tase)と命名した．

3．CI4Tase の配列解析と CI4Tase の構造的特徴

CI4 生産菌 2 株の全ゲノム配列を次世代シーケンサーMiseq で解析し，ドラフトゲノム配列を得た．精製酵素から得た N 末端アミノ酸配列に基づき，CI4Tase をコードする遺伝子を全推定オープンリーディングフレーム(ORF)から検索し，D1110 株では ORF9038，D2006 株では ORF5328 を CI4Tase の遺伝子候補として見出した．2 遺伝子をそれぞれ発現させた大腸菌無細胞抽出液は，デキストランから CI4 を生成し，2 遺伝子が CI4Tase をコードすることが示された．2 種 CI4Tase 間

のアミノ酸配列の一致率は 71%，既知 CITase との一致率は 51%以下であった．アミノ酸配列に基づき，両酵素とも Glycoside Hydrolase Family 66 ドメイン(GH66)，GH66 に挿入された Carbohydrate Binding Module Family 35 ドメイン(CBM35)と C 末端に CBM13 ドメインを有すると推定された．本ドメイン構成は CITase と類似するが，CITase では C 末端ドメインも CBM35 であり，C 末端領域が異なる．CI4Tase のアミノ酸配列には次の特徴が見られた．1)CITase の一般酸/塩基触媒残基と求核性触媒残基が CI4Tase で保存されていた．D1110 株由来 CI4Tase の二つの推定触媒残基を Ala 置換したところ，一重・二重変異酵素いずれも CI4 生成活性を消失し，両残基は活性に必須であった．2)CITase において環化反応に重要な Met が CI4Tase では Leu に置換されていた．当該 Leu 残基を Met に置換した CI4Tase 変異体は，CI4 生成活性を保持し，他の環状糖を生成しなかった．当該 Leu 残基は CI4Tase の環化反応と生成物の重合度に単独では影響しないことが示された．3)CITase と比較し，CI4Tase に特徴的な挿入配列・欠損配列が見られた．これらの配列が CI4 特異的な生成に関与することが示唆された．

4．CI4 生産菌 2 株におけるデキストラン代謝機構モデル

CI4 生産菌 2 株の *ci4tase* 遺伝子は，菌体内オリゴ-1,6-グルコシダーゼ，菌体内 GH66 様タンパク質，ABC 輸送体，菌体外 solute-binding protein をコードすると推定される遺伝子と遺伝子クラスターを形成し，遺伝子クラスターの上流にプロモーター，下流にターミネーターが存在した．*ci4tase* 遺伝子と本遺伝子クラスター内の遺伝子はポリシストロニックに転写され，CI4 生成と分解に関与すると考えられた．組換え発現した GH66 様タンパク質は CI4 を加水分解しイソマルトテトラオースを生成した．本酵素をシクロイソマルトテトラオースヒドロラーゼ(CI4Hase)と命名した．組換え発現したオリゴ-1,6-グルコシダーゼは，イソマルトテトラオースからグルコースを生成した．以上から，CI4 生産菌 2 株におけるデキストラン代謝機構モデルを提案した．すなわち，1)菌体外で CI4Tase によりデキストランから CI4 を生成，2)solute-binding protein で CI4 を捕捉，ABC 輸送体を介し菌体内に CI4 を取り込み，3)菌体内で CI4Hase が CI4 を加水分解，4)生成したイソマルトテトラオースをオリゴ-1,6-グルコシダーゼがグルコースにまで加水分解，5)生成したグルコースを資化する．両株は，炭素源を独占するために本代謝系を保有していると考えられる．

本論文ではデキストランに作用する新規酵素 CI4Tase を発見し，CI4Tase により生成される新規環状四糖 CI4 を得た．CI4Tase 生産菌のドラフトゲノム解析により，CI4 中の α-1,6 結合を加水分解する新規酵素 CI4Hase を見出した．両酵素の発見は，澱粉関連酵素のように多様なデキストラン関連酵素が自然界にまだ存在することを示唆している．本成果は，デキストランを原料とした糖質生産技術の拡大に繋がると考えられる．