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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博　士（農学）　　氏名　藤田　章弘

審査担当者　主査　教授　森　春英
副査　教授　奥山　正幸
副査　教授　吹谷　智
副査　准教授　佐分利　亘

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）

本論文は英文 151 頁，5 章からなり，図 48，表 22 を含む．参考論文 3 編が付されている．

微生物には，独特な糖質獲得機構を有すものがある．澱粉などから特徴的な糖質を形成し，これを取り込み代謝する．特徴的な糖質として，澱粉から形成される環状デキストリンや環状４糖（cyclo-[-6Glcα1-3Glcα1-]$_2$ など)が挙げられる．これら環状糖には包接能などの独自機能を有すものもあり，澱粉等から比較的容易に酵素合成できるため，産業利用も進められている．

α1-6 グルコシド結合を主体とする微生物多糖デキストランからも環状イソマルトオリゴ糖(CI，重合度 7 以上)が見出されている．CI 合成酵素は，α1-6 グルカンに作用し，分子内転移により CI を合成する酵素であり，デキストラン加水分解酵素などと共通構造を有し，酵素群 GH66 に分類される．

本論文では，デキストラン資化性細菌より新規環状四糖(CI4)の生産菌を見出し，CI4 の化学構造・立体構造ならびに新規 CI4 生成酵素の構造と機能を明らかにした．さらに周辺遺伝子群に基づき，新規の CI4 特異的水解酵素の機能同定も含め，CI4 生産菌のデキストラン代謝モデルを提唱している．内容は，以下の 3 点に要約される．

1．CI4 生産菌の発見と CI4 の合成と構造解析

デキストラン資化性の土壌細菌から CI4 生産菌として *Agreia* sp. D1110 株と *Microbacterium trichothecenolyticum* D2006 を見出した．培養上清にデキストランから CI4 を生成する活性が確認され，これを用いて CI4 が合成された．デキストランを出発材料とした酵素反応，限外濾過による少糖画分回収，酵素・アルカリ処理の組合せにより，CI4 合成収率が 31%にまで達した．質量分析および各種 NMR により CI4 の化学構造が，単結晶の調製および X 線構造解析により CI4 の立体構造が決定された．CI4 は，既存 CI（重合度 7 以上）に比べ極端に低重合度の新規環状糖であり，CI として初めて結晶構造が得られた点でも独自性が高い．*in vitro* 消化性試験

により，CI4 が難消化性であることも明らかにされた．

2．CI4 生成酵素の機能と構造

両菌株の培養上清より CI4 生成酵素が精製され，諸性質が明らかにされた．両酵素の性質は良く一致した．重合度 5 以上のイソマルトオリゴ糖に作用して環化反応(CI4 生成反応)と不均化反応を，CI4 に作用して加水分解反応とカップリング反応を触媒した．従来の CI 合成酵素に類似する反応を触媒するが，環状糖として CI4 に特異的な新規酵素である．2 株のドラフトゲノム解析結果から，コードする遺伝子が特定された．推定アミノ酸配列は両酵素間で 71%一致し，既存 CI 合成酵素と同様の，酵素群 GH66 に糖結合モジュールふたつを加えた構造が推定された．大腸菌を用いた組換え酵素の活性試験が無細胞抽出液を用いて行われ，野生型が CI4 生成活性を示すこと，GH66 群酵素に共通する触媒残基の該当残基変異により活性を喪失すること，従来の CI 生成酵素の CI（重合度 7 以上）生成に寄与する Met 残基に該当する Leu 残基の Met 変異が CI4 特異性に影響を与えないことが示された．アミノ酸配列比較とあわせ，既存 CI 生成酵素と類似した触媒残基およびサブサイト（ただし−4 まで）を有し，また CI4 特有の結合部位を有すると予想されている．

3．CI4 生産菌におけるデキストラン代謝機構モデル

CI4 生産菌 2 株いずれでも，CI4 生成酵素遺伝子は，オリゴ-1,6-グルコシダーゼ，GH66 酵素，ABC 輸送体等の推定遺伝子とともにクラスターを形成した．一連の遺伝子はプロモーター配列等の配置からポリシストロニックな転写が予想された．オリゴ-1,6-グルコシダーゼと GH66 酵素の機能は組換え酵素を用いて確認された．このうち GH66 酵素は，CI4 特異的に専ら加水分解を触媒する新規酵素であった．以上に基づき，CI4 生産菌 2 株におけるデキストラン代謝機構モデルが提唱された．すなわち，1)菌体外 CI4 生成酵素がデキストランから CI4 を生成し，2) これを ABC 輸送体が菌体内に取り込み，3) CI4 加水分解酵素が CI4 を加水分解し，4)生成したイソマルトオリゴ糖をオリゴ-1,6-グルコシダーゼがグルコースにまで加水分解して資化する．本代謝系は両株の独占的糖質獲得機構と考えられる．同様の遺伝子クラスターは両菌株を含む *Microbacteriaceae* 科に認められ，CI4 を経由するデキストラン代謝機構モデルが共有されるものと予想された．

以上の通り，本論文では新規環状四糖の発見とともに，その合成酵素や加水分解酵素，デキストラン代謝経路モデルを幅広く見出した．学術的にもまた産業への応用面でも重要な知見を与える研究として評価できる．

よって，審査員一同は、藤田章弘が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた．