



HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---------------------|--|
| Title | Discovery of bacteria producing a novel cycloisomaltotetraose and identification of novel enzymes involved in cycloisomaltotetraose production and metabolism pathway [an abstract of entire text] |
| Author(s) | 藤田, 章弘 |
| Description | この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/ |
| 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/2115/87289 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Fujita_Akihiro_summary.pdf |



博士論文の要約

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）

第1章 序論

澱粉は、多数の D-グルコース(Glc)が α -(1→4)-グルコシド結合で重合したアミロースと、複数のアミロースが α -(1→6)-グルコシド結合による分岐で結合したアミロペクチンの混合物である。澱粉に作用する酵素を用いて、各種のオリゴ糖が工業生産されている。 α -amylase (EC 3.2.1.1)は、澱粉中の α -(1→4)-グルコシド結合を *endo* 型に加水分解し、マルトオリゴ糖を生成する。 β -amylase (EC 3.2.1.2)と glucoamylase (EC 3.2.1.3)は、澱粉を *exo* 型に加水分解し、それぞれマルトースと β -D-グルコースを生成する。 α -glucosidase (EC 3.2.1.20)は、加水分解反応では α -D-グルコースを生成し、分子間糖転移反応ではイソマルトオリゴ糖やニゲロオリゴ糖を生成する。分子間糖転移反応は高重合度の糖質の生成にも利用され、*Gluconobacter oxydans* ATCC11894 由来 dextran dextrinase (EC 2.4.1.2)は、デキストリン中の非還元末端グルコシル残基の α -(1→4)-グルコシド結合を切断、他のデキストリン分子中の非還元末端グルコシル残基に対して α -(1→6)-転移を触媒する。本反応は連続的に触媒され、 α -(1→6)-グルカンであるデキストランがデキストリンから合成される。*Paenibacillus alginolyticus* 由来の 2 種の酵素、6- α -glucosyltransferase (EC 2.4.1.24, 6GT)と α -amylase、は液化澱粉に作用し、 α -(1→3)-、 α -(1→4)-および α -(1→6)-グルコシド結合と分岐構造を有するイソマルトデキストリンを生成する。

分子内糖転移反応により環状糖を生成する酵素も知られる。cyclomaltodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19)は、澱粉からシクロデキストリン (CDs, 重合度=6, 7 または 8)を生成する。CDs は疎水性低分子を包接し、難水溶性分子の可溶化や揮発性分子の揮発抑制に利用される。2 種の環状四糖、cyclobis-(1→6)-nigerosyl と cyclobis-(1→6)-maltosyl、も澱粉を原料として酵素的に生成される。これらの環状糖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。

澱粉のほか、デキストランからオリゴ糖を生成する酵素も知られる。glucodextranase (EC 3.2.1.70), isomaltodextranase (EC 3.2.1.94), dextran 1,6- α -isomaltotriosidase (EC 3.2.1.95)は、デキストランに対して非還元末端から作用し、それぞれ Glc, イソマルトース (IG2) およびイソマルトトリオース (IG3)を生成する。cycloisomaltoooligosaccharide glucanotransferase (EC 2.4.1.248, CITase)は、デキストランから重合度 7 から 20 の環状イソマルトオリゴ糖 (CIs)を生成する。これまでに 3 種の CITase, *Bacillus circulans* T-3040 由来 CITase-T-3040, *B. circulans* U-155 由来 CITase-U-155 および *Paenibacillus* sp. 598K 由来 CITase-598K, が報告されており、それぞれの主生成物はシクロイソマルトオクタオース (CI8), CI8 およびシクロイソマルトヘプタオース (CI7)である。CIs には高い水溶性や包接能等の有用な性質があり、包接能を活用して色素の安定化に用いられている。また、*Streptococcus mutans* によるバイオフィルム形成を抑制することで、抗齲蝕効果を示す。

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、オリゴ糖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。

第2章

デキストランを唯一の炭素源とする固体培地に土壌懸濁液を塗布、2,000 コロニーの微生物を土壌から単離した。デキストランを炭素源とする液体培地で単離菌株を培養後、菌体破碎、培養上清と菌体破碎液からなる粗酵素液を調製した。粗酵素液をデキストランに作用させ、生成オリゴ糖を薄層クロマトグラフ

ィー分析に供した. D1110 株と D2006 株由来の粗酵素液において, IG3 (Rf 値=0.75) とイソマルトテトラオース (IG4) (Rf 値=0.67) とは異なる Rf 値=0.70 の未知糖質 A を生成する活性が得られた. 16S rDNA 解析により, D1110 株と D2006 株はそれぞれ *Agreia* sp. および *Microbacterium trichothecenolyticum* と同定された. 両株はともに, *Microbacteriaceae* 科に属する. 未知糖質 A の生成活性は両株の培養上清に認められた. *Agreia* sp. D1110 の培養上清をデキストランに作用させ, 未知糖質 A を生成後, エタノール沈殿と 10 kDa カットオフ膜により未反応デキストランを除去, α -glucosidase/glucoamylase による消化とアルカリ処理により還元糖を分解後, イオン交換樹脂による脱塩, 活性炭による脱色を行い, 未知糖質 A を HPLC 上の純度 99.1% に精製した. HPLC の検出には, 示差屈折率検出器を用いた. 精製糖質 A を $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT135°, $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$, HSQC, HMBC, LC-MS により解析した結果, 未知糖質 A は cyclo-[α -6Glc α 1-] $_4$ であると決定され, cycloisomaltotetraose (CI4) と命名した. CI4 は既知 CIs の中で最小である.

M. trichothecenolyticum D2006 の培養上清をデキストランに作用させ, CI4 溶液を調製後, dextranase 消化, アルカリ処理, イオン交換樹脂による脱塩を行い, CI4 を純度 96.0% に精製した. 60°C の湯浴中でロータリーエバポレーターを用いて Brix 53% に濃縮後, 室温で静置, CI4 結晶を取得した. 取得した結晶を再溶解, 60°C の湯浴とロータリーエバポレーターで Brix 48% に濃縮後, 3 日間室温に静置, CI4 単結晶を取得した. CI4 単結晶の単結晶 X 線構造解析では, 非対称単位内に 2 つの CI4 分子, CI4 分子 1 と CI4 分子 2, 6 つの水分子および 4 分子相当の非化学両論数的な水分子が存在し, 取得された CI4 単結晶は 5 含水結晶であると決定された. CI4 分子内に分子内水素結合が認められ, CI4 分子 1 と CI4 分子 2 の間の分子間水素結合および各 CI4 分子と水分子間の分子間水素結合が認められた. CI4 \cdot 5 含水結晶は, CIs では初の結晶である. 各水素結合が CI4 のコンフォメーションを固定化することで, CI4 の結晶化を促進したと考えられた. *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.

第 3 章

Agreia sp. D1110 と *M. trichothecenolyticum* D2006 の培養上清より CI4 生成酵素を硫酸アンモニウム沈殿, 透析, 2 種のカラムクロマトグラフィーにより電気泳動的に単一に精製した. CI4 生産菌 2 株の培養上清に認められた CI4 生成活性は, 単一酵素による活性であることが示され, CI4 生成酵素を cycloisomaltotetraose glucanotransferase (CI4Tase), *Agreia* sp. D1110 由来 CI4Tase を AgCI4Tase, *M. trichothecenolyticum* D2006 由来 CI4Tase を MtCI4Tase と命名した. 両酵素の分子量は SDS-PAGE 上で 86,000 であった. 酵素量の定義は, 10 mg/mL のデキストラン T70 から 1 分間に 1 μmol の CI4 を生成する酵素量を 1 U とした. *Agreia* sp. D1110 の培養上清 1.8 L から 2.5 mg, 20 U の AgCI4Tase が精製倍率 18 倍, 収率 10% で精製された. AgCI4Tase の比活性は, 8.1 U/mg であり, N 末端アミノ酸配列を解析したところ, ATVGDWTD が得られた. *M. trichothecenolyticum* D2006 の培養上清 1.4 L から 3.0 mg, 11 U の MtCI4Tase が精製倍率 14 倍, 収率 11% で精製された. MtCI4Tase の比活性は, 3.6 U/mg であり, N 末端アミノ酸配列解析では ADLGDAWTD が得られた.

AgCI4Tase は pH 5.2-6.2 の範囲, MtCI4Tase は pH 5.7 で最も高い相対活性が得られた. 4°C, 18 時間の条件下で, AgCI4Tase は pH 4.6-9.9 で静置した際, MtCI4Tase は pH 5.0-6.9 で静置した際に残存活性 80% 以上が得られた. 両 CI4Tase は, 40°C で最も高い相対活性が得られた. 温度安定性については, AgCI4Tase は 40°C 以下, MtCI4Tase は 35°C 以下で 30 分間静置した際に, 80% 以上の残存活性が得られた. 両 CI4Tase 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, CI4Tase と CITase は類似した反応特異性を示す. 一方, CITase は重合度 7 から 20 の CIs を生成し, CI4Tase は環状糖としては CI4 を特異的に生成した. この生成物特異性が, CI4Tase と CITase の差異であると考えられた.

液化澱粉に対して *P. alginolyticus* 由来 6GT を作用させ, 液化澱粉の非還元末端側に α -(1 \rightarrow 6)-グルカン生成し, 6GT を熱失活後, MtCI4Tase を 24 および 72 時間作用させた. 作用後の酵素反応生成物を α -glucosidase と glucoamylase で消化したところ, 糖組成で 6.2% (24 時間作用) と 4.8% (72 時間作用) の CI4 が生成したことが示された. 澱粉を出発原料として CI4 を生成可能であることが示唆された.

第 4 章

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, *Agreia* sp. D1110 の ORF9038 を AgCI4Tase, *M. trichothecenolyticum* D2006 の ORF5328 を MtCI4Tase 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%, CITase-T-3040, CITase-U-155 および CITase-598K との一致率は 35%以下であった. Pfam を用いたドメイン検索では, AgCI4Tase と MtCI4Tase は, Glyco_hydro_66 ドメイン(GH66 ドメイン), GH66 ドメインに挿入された Carbohydrate Binding Module Family 35 ドメイン(CBM35) と C 末端に CBM13 ドメインを有することが示された. 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両 CI4Tase で保存されていた. AgCI4Tase 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-T-3040 において環化反応に重要な Met が両 CI4Tase では Leu に置換されていた. 当該 Leu 残基を Met に置換した AgCI4Tase(L291M)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. 4)CITase-T-3040 のサブサイト形成に関与する残基について, サブサイト-1 から-4 までは概ね両 CI4Tase においても保存されていたが, サブサイト-5 から-8 は保存されていなかった. これらのアミノ残基・配列が CI4 特異的な生成に関与することが示唆された.

CI4 生産菌 2 株の *ci4tase* 遺伝子は, 菌体内 oligo-1,6-glucosidase, 菌体内 GH66 様タンパク質, ABC transporter, 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 cycloisomaltotetraose hydrolase (CI4Hase)と命名した. 組換え発現した oligo-1,6-glucosidase 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 transporter 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 oligo-1,6-glucosidase 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.

AgCI4Tase, MtCI4Tase, *Agreia* sp. D1110 由来 CI4Hase, *M. trichothecenolyticum* D2006 由来推定 CI4Hase のアミノ酸配列をクエリ配列として BLASTP 検索したところ, *Microbacteriaceae* 科の微生物がこれらのホモログを有することが示された. *Microbacterium* sp. YMB-B2, *Leifsonia* sp. ZF2019 においては, CI4Tase, CI4Hase, oligo-1,6-glucosidase のホモログと推定される酵素の遺伝子と, ABC transporter と solute-binding protein とアノテーションされるタンパク質の遺伝子が, 遺伝子クラスターを形成していた. *Microbacteriaceae* 科の他の微生物も CI4 生成-代謝系を有している可能性が示唆された.

第 5 章 総括

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.