



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Functions of inulosucrase and novel fructosyltransferase from the inulin-producing bacterium <i>Neobacillus drentensis</i> 57N [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	城戸, 悠輔
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15766号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92642
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KIDO_Yusuke_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 城 戸 悠 輔

学 位 論 文 題 名

Functions of inulosucrase and novel fructosyltransferase from the inulin-producing bacterium

Neobacillus drementensis 57N

（イヌリン合成細菌 *Neobacillus drementensis* 57N 由来イヌロスクラーゼおよび

新規フルクトシル転移酵素の機能に関する研究）

イヌリンは β -(2 $\rightarrow$ 1)-フルクトシド結合からなるフルクタンであり、一般に還元末端にスクロース（Suc: Glc α 1-2 β Fru）構造を有す。イヌリンは貯蔵多糖としてチコリの根等に存在し、プレバイオティクスとして利用される他、有用オリゴ糖合成の原料にもなるため産業利用が広がっている。工業生産では主に植物原料からの抽出法が用いられるが、製造コスト削減や安定供給の観点から、微生物酵素イヌロスクラーゼ（IS）を用いた Suc からの生産が注目されている。IS は、Suc を Fru 供与体として Suc および β -(2 $\rightarrow$ 1)-フルクトオリゴ糖（FOS）への Fru 転移を触媒して β -(2 $\rightarrow$ 1)-フルクトシド結合を生成する酵素である。酵素合成されたイヌリンの構造は酵素に依って異なり、*Bacillales* 目細菌の IS は直鎖の、*Lactobacillales* 目細菌の IS は β -(2 $\rightarrow$ 6)-分岐を含む高分子のイヌリンを生成する。イヌリンおよび関連オリゴ糖の生産効率化および多様化には、有用な IS だけでなく、IS によるイヌリン合成機構への深い理解が求められる。本研究では、土壌から単離したイヌリン合成細菌が生産する IS によるイヌリン合成機構を明らかにすると共に、IS 周辺遺伝子の配列解析と関連酵素の機能解析により本菌におけるイヌリン代謝機構の理解を深めることを目的とした。

1) イヌリン合成細菌 *Neobacillus drementensis* 57N 由来 IS の精製と配列解析およびフルクトシル転移酵素の機能解析

Suc 含有培地におけるイヌリン様多糖（エンドイヌリナーゼ（EI）分解性多糖）の生成を指標に、土壌細菌 57N 株を単離した。本菌は 16S rRNA 配列解析および生理・生化学的性状試験に基づき *N. drementensis* と同定された。本菌培養上清から、Suc 分解活性を指標に IS（NdIS）を精製した。なお、この過程で NdIS とは異なる Suc 分解酵素が分離した。NdIS と Suc の反応では、直鎖イヌリンが生成した。本酵素遺伝子をクローニングした。NdIS は他の *Bacillales* IS と同様に、GH68 触媒ドメインを有す酵素であった。構造既知の古細菌由来 IS（InuHj）と比べ、全体的な配列同一性は低い。基質結合部位であるサブサイト-1 $\sim$ 2 の構成残基の多くが保存されていた。

単離 DNA 断片は、NdIS の他に 4 遺伝子の全長もしくは一部を含んでおり、これらの産物は、菌体内 GH32 EI または環状イヌロオリゴ糖合成酵素（CFT）、菌体外 GH68 酵素（NdFosA）、菌体外 GH68 レバンスクラーゼ、およびリン酸転移酵素系（PTS）輸送体と推定された。単離 DNA 断片の塩基配列はゲノム既読 *Bacillus* 属細菌とよく一致した。本菌には該当塩基配列の上流に更に関連遺伝子群が見られ、推定翻訳産物は、2 つの GH32 CFT（一方は菌体内、もう一方は GH32 ドメインを 2 つ含む菌体外酵素）、および ATP 結合カセット（ABC）輸送体である。 *N. drementensis*

57N でも類似の遺伝子構成が推定された。隣接遺伝子およびゲノム既読 *Bacillus* 属細菌の遺伝子構成に基づき、合成されたイヌリン様多糖は、GH32 ドメインを 2 つ含む菌体外酵素により低分子化され、環状イヌロオリゴ糖またはイヌロオリゴ糖に変換された後に菌体内に取込まれ代謝されると推測された。 *N. drentensis* 57N 培養上清に見られた NdIS と異なる Suc 分解酵素については、部分精製標品の配列解析により NdFosA 遺伝子産物であることが示唆された。組換え NdFosA を用い、本酵素が Suc に作用して 1-Kes と Nys を生成するフルクトシル転移活性を持つことを確認した。

2) 組換え NdIS によるイヌリン合成機構の解析

組換え NdIS は Suc への初期反応にて加水分解と糖転移を触媒した。両速度の Suc 濃度依存性は、加水分解-糖転移反応速度論に従い、低濃度 (20 mM) ではほぼ加水分解のみだが、Suc 濃度依存的に転移反応の速度比 (糖転移率) が増加した。比較的高濃度の 344 mM で糖転移率が 50% に達した。一方、Suc の初期濃度を 20–1,600 mM とした長時間反応では、いずれの濃度でもイヌリンが生成し、平均重合度は 7.2–18.2 であった。800 mM では重合度 42 までの直鎖イヌリンが確認され、既報の *Bacillales* IS が生成する直鎖イヌリンより長鎖であった。1,600 mM ではイヌリンの沈澱が生じた。

1-ケストース (1-Kes, 重合度 3) , ニストース (Nys, 重合度 4) 等の FOS を単一基質とする反応では、不均化反応による FOS の重合度の多様化のみ認められ、長鎖生成物の生成はなかった。1-Kes 単独の反応では、アグリコン遊離により生成した Suc が速やかに消費され、蓄積しなかったことから、1-Kes の供与体特異性は Suc よりも顕著に低いことが示唆された。Suc と FOS の両者を含む 2 基質反応では、各生成物の経時的変化の解析により、Suc を供与体、FOS を受容体とする Fru 転移を主反応とすることが確認された。Suc を単独基質とする反応と比べ、FOS (重合度 3–9) の共存により、糖転移速度は大きく増加した。Suc, FOS および単糖に対する受容体特異性を速度論的に評価した。NdIS の受容体特異性は Suc よりも FOS に対して顕著に高く、FOS の中では Nys に対して最も高かった。Glc に対する受容体特異性は FOS と同等であった。以上より、Suc を単独基質とする反応では、生じた低濃度の FOS が優先的受容体となり、これに対する選択的 Fru 転移により長鎖イヌリンが生成する機構が考えられた。

以上、本研究では土壌単離細菌 *N. drentensis* 57N の菌体外におけるイヌリン様多糖合成に関与する菌体外酵素を明らかにした。 *N. drentensis* 57N のイヌリン代謝機構について、周辺遺伝子を含めて推定した。NdIS による Suc からのイヌリン合成機構を、特に受容体特異性の定量的評価に基づき明らかにした。本研究の応用により、IS による合成イヌリンの平均重合度の制御等、イヌリンとその関連オリゴ糖合成の多様化が期待される。