



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_review.pdf, 審査の要旨



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

学位論文題名

Functions of inulosucrase and novel fructosyltransferase from the inulin-producing bacterium *Neobacillus drentensis* 57N

（イヌリン合成細菌 *Neobacillus drentensis* 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）

本論文は英文 125 頁，図 38，表 11，5 章からなり，参考論文 1 編が付されている。

イヌリンは β -(2 $\rightarrow$ 1)-フルクトシド結合からなる多糖である。水溶性食物繊維として各種機能性を有し，また有用オリゴ糖の合成原料として産業的に利用されている。イヌリンはチコリの根等，植物から抽出調製される他，微生物酵素イヌロスクラーゼ（IS）を用いてスクロースから合成できる。IS は，スクロースからのフルクトシル転移による β -(2 $\rightarrow$ 1)-フルクトシド結合生成を繰り返して多糖イヌリンを生成する。ただし生成イヌリンの構造は酵素により異なり，*Bacillales* 目細菌の IS は直鎖の短鎖イヌリンを，*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傾向にある。これら IS は糖質加水分解酵素群 GH68 に属し，触媒中心はじめ基本構造は一致する。しかし，酵素合成イヌリンの鎖長や分岐に関わる酵素特性は明らかにされていない。本研究は，土壌から単離したイヌリン合成細菌 *Neobacillus drentensis* 57N の IS および IS 関連新規転移酵素の機能解析を通して酵素合成イヌリンの特に鎖長特異性にアプローチしたものである。また，酵素機能と遺伝子構造情報に基づき本菌によるイヌリン代謝の推定機構の提唱も行っている。

1) イヌリン合成細菌 *Neobacillus drentensis* 57N 由来 IS 関連 2 酵素の同定と周辺遺伝子構成

スクロース含有培地でのイヌリン様多糖生成を指標にして，土壌より本菌を単離し，*N. drentensis* と同定した。培養上清には，スクロースから一連の重合度のイヌリンを生成する活性が認められた。スクロース分解活性を指標にして 2 酵素 NdIS

および *NdFosA* が精製された。両酵素はいずれもスクロースに作用して、*NdIS* は直鎖イヌリンを、*NdFosA* は 1-kestose（3 糖）を生成する反応を触媒した。配列解析の結果、両酵素はいずれも GH68 酵素であった。*NdIS* は構造既知の古細菌由来 IS（InuHj）と全体では低同一性ながら、基質結合部位（サブサイト-1〜+2）の構成残基では高い同一性を示した。*NdIS* 遺伝子周辺には隣接する *NdFosA* 遺伝子をはじめ、GH32 イヌリナーゼまたは環状イヌロオリゴ糖合成酵素、GH68 レバンスクララーゼ、および PTS 輸送体を推定翻訳産物とする遺伝子が存在した。当該塩基配列が良く一致する *Bacillus* 属ゲノム既読株の周辺遺伝子情報も含め、スクロースを菌体外でイヌリンに変換し、これを環状イヌロオリゴ糖として菌体内に取り込み代謝する経路が推定された。

2) 組換え *NdIS* によるイヌリン合成機構の解析

NdIS の主要な機能解析は組換え酵素を用いて行われた。*NdIS* は初期濃度 20–1600 mM のスクロースから直鎖イヌリンを生成し、42 糖までが検出され、また一部の条件下では不溶性生成物も認められた。しかし初期反応速度の解析では、本酵素はスクロースをフルクトシル転移反応における良い受容体とはせず、転移定数 K_{TG} 344 mM 以下のスクロース濃度では加水分解速度が転移速度を上回った。ここに 1-kestose や nystose 等のフルクトオリゴ糖(FOS)を共存させると、供与体をスクロース、受容体を FOS とする転移反応が優先し、反応速度が大幅に増加した。この反応速度に基づき、転移反応の受容体特異性の定量的評価を行った。受容体としての特異性定数は、FOS(3 糖~9 糖)ではスクロース比 37–243 倍であること、単糖のグルコース、キシロースでもこれらと同程度であることを明らかにした。この結果により、転移反応において FOS のモル濃度をほぼ抑制する FOS とスクロース濃度比が求められる。これを利用して、スクロースと FOS の濃度比に応じて生成イヌリンの鎖長を制御できることを実証した。

以上、本論文は、新たに単離したイヌリン生成細菌から GH68 フルクトシル転移酵素 2 種を見出し、特に GH68 IS の転移反応による生成イヌリン鎖長制御に必須な受容体特異性の定量化を達成し、一定条件下でのイヌリン鎖長制御を実証したものである。今後の酵素合成イヌリンの多様化および厳密制御の基盤となる研究である。

よって審査員一同は、城戸悠輔氏が博士（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。