

Bacillus sphaericus E-244株の生産する
サイクロデキストリナーゼに関する研究

学位論文内容の要旨

マルトオリゴ糖は、グルコースが α -1,4結合したホモオリゴマーで、澱粉の α -アミラーゼ分解産物として古くから知られている物質群であり、食品分野においては甘味料、医薬品の分野においては、輸液の一成分として主に利用されている。また、マルトオリゴ糖の一種であるサイクロデキストリン(CD)は、環の中央部分が疎水性を示す環状構造であることから、種々の疎水性低分子化合物を補足することにより包接化合物を形成することが知られており、この性質を利用して食品あるいは医薬品における色、臭い等の安定化および除去、疎水性低分子医薬品の可溶化および安定化への応用開発が数多く試みられている。このように、マルトオリゴ糖は、我々の生活に密接に関わっている物質群である。さらに、近年、臨床診断薬の分野において、膵臓の炎症マーカーとして測定されている血液及び尿中の α -アミラーゼ活性の基質として澱粉の代わりにマルトペンタオース(G_5)、マルトヘプタオース(G_7)等の誘導体が使用されるようになってきた。

マルトオリゴ糖のうちマルトース(G_2)からマルトヘキサオース(G_6)までおよびCDは、澱粉を原料として各種オリゴ糖生成アミラーゼの作用により生産されてきた。しかしながら、重合度が7の G_7 およびそれ以上の直鎖マルトオリゴ糖を澱粉から特異的に生成するアミラーゼは、現在までのところ全く知られておらず、特に G_7 はアミラーゼ基質の原料として需要があるにもかかわらず、高純度の製造法が確立されていない状況にあった。

本論文は、このような現状に鑑み、有用な G_7 を澱粉からではなくグルコースの重合度が7の環状オリゴ糖である β -CDから生産する方法を企て、 β -CDから著量の G_7 を生成蓄積するサイクロデキストリナーゼ(EC 3.2.1.54)の検索を試み、本方法による G_7 の大量製造の道を拓いた新規なサイクロデキストリナーゼを生成する *Bacillus sphaericus* E-244株を土壌から分離し、次に本菌の生成するサイクロデキストリナーゼの実用性を確認し、さらに本酵素の精製および酵素化学的諸性質の検討、並びに本酵素の構造遺伝子のクローニングおよび発現に関して検討したことをまとめたものである。

まず、第一章において、本研究の大まかな研究背景について記載し、続いて第二章において、 β -CD、グルコアミラーゼおよびグルコース測定試薬を含有したプレート培地を作成することにより、サイクロデキストリナーゼの検索をプレート上で行えるスクリーニング系を構築し、本スクリーニングプレートを用いて四国、沖縄の土壤からサイクロデキストリナーゼ生産菌の検索を行い、約5万個のコロニーの中から、 β -CD から G_7 を顕著に生成蓄積する一菌株を単離し、本菌が、Bacillus sphaericus に属することを確認し、Bacillus sphaericus E-244 と命名した。

次に第三章において、本菌株によるサイクロデキストリナーゼの生産条件について検討し、本酵素生産のための最適培地組成を構築すると共に、本菌は、グルコースも含めたマルトオリゴ糖を炭素源として資化することから、CDを炭素源とした場合のみサイクロデキストリナーゼを誘導生産して β -CD および γ -CD を水解してマルトオリゴ糖を得ていることを明らかにした。また、本菌の生産するサイクロデキストリナーゼは、既知の酵素と同様に菌体外よりは、むしろ菌体内画分に圧倒的に多く存在していることを確認した。

続いて第四章において、本菌株の菌体より調製したサイクロデキストリナーゼの粗酵素液を用いて、基質2kg 仕込み100L反応の規模で β -CD からの G_7 の試験製造を実際に行い、純度98% 以上の G_7 が収率約35% で生産可能であることを明らかにした。

また第五章において、本酵素を菌体からTrion X-100 により抽出した後、DEAEセファロースカラムクロマトグラフィー、疎水モードHPLC、およびゲル濾過モードHPLCによる一連の手段により、SDS PAGEで単一なバンドを示す段階にまで精製し、本酵素が約72k ダルトンのサブユニットから構成されるホモダイマーであることを明らかにした。次に精製酵素を用いて本酵素の酵素化学的諸性質について詳細に検討し、本酵素が既知のサイクロデキストリナーゼとは異なり、 β -CD に対して最も高い親和性を持つ新規なサイクロデキストリナーゼであることを明らかにし、次いで、 β -CD に対して最も高い触媒効率を持つことを示すことにより、本酵素が β -CD から著量の G_7 を生成蓄積する理由を明らかにした。また、本酵素の分子間糖転移反応について検討し、本酵素と比較的性質が類似であると思われたCDグルカノトランスフェラーゼ (EC 2.4.1.19; CGTase) との性質の差を確認した。

さらに、第六章において、本酵素の分岐CDに対する作用特性について詳細に検討し、分岐CDからの主要生成物の構造決定を種々のエキソ型糖質分解酵素を利用して行うことにより、本酵素が分岐CDである、グルコシル- α -CD、マルトシル- α -CD を水解して各々、 6^3 -O- α -D-グルコシル- G_6 、 6^3 -O- α -D-マルトシル- G_6 を主に生成し、同様にグルコシル- β -CD、マルトシル- β -CD から各々、 6^4 -O- α -D-グルコシル- G_7 、 6^4 -O- α -D-マルトシル- G_7 を主に生成することを明らかにした。すなわち、本酵素が分岐CDに対しては、分岐の位置と最も離れたところに位置するCD環の α -1,4結合を主に水解していることを明らかにした。また、本酵素と β -アミラーゼを共役させて、グルコシル- β -CD から 6^4 -O- α -D-グルコシル- G_5 を生産し、本物

質がヒト α -アミラーゼによりグルコースと6ⁿ-0- α -D-グルコシル-G_nに水解される性質を利用して、 α -グルコシダーゼ、グルコアミラーゼおよび β -グルコシダーゼ等の共役酵素を必要としないユニークな α -アミラーゼ活性測定法を開発した。

最後に、第七章において、本酵素の構造遺伝子をプローブ法によりクローニングし、また、大腸菌を用いて形質転換を行い、形質転換体において最適pH、比活性、 β -CDに対する親和性が親株のものと同じサイクロデキストリナーゼを親株の30倍量発現させることに成功した。さらに、本酵素の構造遺伝子の全塩基配列の決定を行い、本酵素を構成するサブユニットが、1776塩基のオープンリーディングフレームにコードされた591残基のアミノ酸からなることを明らかにし、かつ、本酵素のアミノ酸一次配列を既知のアミラーゼ関連酵素のものと比較し、本酵素の配列がCGTaseや α -アミラーゼとは僅かな相同性しかないこと、および、意外にも基質特異性が大きく異なるネオプルラナーゼと約50%の相同性があることを明らかにした。

以上に述べたように、土壌より分離同定された*Bacillus sphaericus* E-244株の生産するサイクロデキストリナーゼは、 α -グルカンの中で β -CDに最も良く作用するという点において既知のサイクロデキストリナーゼとは性質が異なった新規な酵素であり、従来確立されていなかったG₇の大量製造を可能にした有用な酵素である。従って、本研究は、臨床診断の分野において、大きく社会に貢献するものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 千 葉 誠 哉
副 査 教 授 匂 坂 勝之助
副 査 教 授 本 間 守

学位論文題名

Bacillus sphaericus E-244株の生産する サイクロデキストリナーゼに関する研究

本論文は、和文121頁、図37、表16、10章からなり、ほかに参考論文9篇が付されている。

マルトオリゴ糖は、グルコースの α -1,4結合からなるホモオリゴマーで、澱粉のアミラーゼ分解産物として古くから甘味料や食品添加物として広く利用されてきた。近年は重合度2のマルトース(G_2)は輸液として、また重合度5や7のマルトペンタオース(G_5)およびマルトヘプタオース(G_7)の誘導体は、急性膵炎や耳下腺炎等診断のための血中 α -アミラーゼ測定用基質として利用されている。 G_5 は、澱粉から特異的に G_5 を生成する G_5 生成アミラーゼにより製造されているが、 G_7 については、 G_7 を特異的に生成するアミラーゼが現在までに分離されておらず、高純度の製造法が確立していない。

本研究は、 G_7 を澱粉から直接ではなく、サイクロデキストリン合成酵素により生産されたグルコース重合度7の環状 α -1,4結合オリゴ糖、すなわち β -サイクロデキストリン(β -CD)から効率よく生産する方法の確立を意図してなされたものであり、研究の結果は以下のように要約される。

1. サイクロデキストリナーゼ(CDase)の検索がプレート上で可能なスクリーニング系を考案し、 β -CDから G_7 を顕著に生成、蓄積する一菌株*Bacillus sphaericus* E-244を分離した。

2. 本菌によるCDase生産条件を検討した結果、本菌はCDを炭素源とした場合にのみCDaseを誘導産生し、主に β -CD環を加水分解によって開裂させ G_7 を生成することを明らかにし、その製造法を確立した。

3. 本酵素を菌体から抽出後、DEAE-セファロースカラムクロマトグラフィー、疎水およびゲル濾過モード高速液体クロマトグラフィー等によりSDS-PAGEで単一な標品にまで精製し、本酵素が約72kDaのサブユニットから構成される

ダイマーであることを認めた。本酵素は、既知のCDase とは異なり β -CD に最も高い親和性と触媒効率を持つ新しいタイプのCDase であることを明らかにした。

4. 本酵素の分岐CDに対する作用様式について検討し、分岐CDからの生成物の構造解析を行った。本酵素が分岐CDであるグルコシル- β -CD およびマルトシル- β -CD からそれぞれ6⁺- α -グルコシル-G₇および6⁺- α -マルトシル-G₇を生成し、分岐の位置と最も離れた位置のCD環 α -1,4結合を開裂させることを確認した。

5. 本酵素と β -アミラーゼを共役させてグルコシル- β -CD から6⁺- α -グルコシル-G₅を調製した。ヒト α -アミラーゼがこの分岐オリゴ糖からグルコースを特異的に遊離させることを明らかにし、臨床用試薬に現在用いられている α -グルコシダーゼ、グルコアミラーゼあるいは β -グルコシダーゼ等の共役酵素を必要とする α -アミラーゼ測定法とは異なった新しい α -アミラーゼ測定法を開発した。

6. 本酵素の構造遺伝子をプローブ法によりクローニングし、同時に大腸菌を用いて形質転換を行い、最適pH、比活性および β -CD に対する親和性が親株と同じCDase を親株の30倍発現させることに成功した。本酵素の構造遺伝子の全塩基配列の決定を行い、そのサブユニットが1776塩基のオープンリーディングフレームにコードされた591 残基のアミノ酸からなることを明らかにした。本酵素のアミノ酸配列を既知のアミラーゼ関連酵素と比較した結果、その配列は α -アミラーゼやCD合成酵素とは相同性が少く、基質特異性が全く異なるネオプルナーゼと約50% の相同性のあることを認めた。

以上のように本研究は、 β -CD からのG₇の製造法の確立、CDase の精製と一次構造の解析、分岐 β -CD に対する作用様式の解析と分岐 β -CD からの生成物の応用に基づいた新しい α -アミラーゼ測定法の開発を行った。それらの成果は、学術上のみならず産業的応用面においても寄与するところ大きいと評価される。

よって審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者小熊哲哉は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格あるものと認定した。