

学位論文題名

Brevibacterium fuscum var. *dextranlyticum* 0407株が生産するイソマルトトリオデキストラナーゼに関する研究

学位論文内容の要旨

デキストランは、*Leuconotoc*属や*Streptococcus*属等の細菌が生産する菌体外酵素であるデキストランスクラーゼの α -グルコシル基転移反応によってショ糖から合成される多糖である。多くのデキストランは、主に α -1,6-グルコシド結合を主鎖とするが、 α -1,3-グルコシド結合のみから構成させるものも知られている。デキストランは、古くから製糖工業においてパイプを詰らせるなどの障害物質として知られてきたが、1950年代には代用血漿としての用途が開発され、1960年代以降は虫歯の原因となる物質として注目されてきた。また、近年はゲル濾過剤の原料としても広く利用されている。デキストランをその非還元末端から逐次加水分解してイソマルトトリオースを生成するエキソ型デキストラナーゼの性質や構造についてはほとんど解析がなされていない。

本研究は、コリネ型細菌の一種である*Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株が菌体外に産生するイソマルトトリオデキストラナーゼ(IMTD, EC 3.2.1.95)の精製、その諸性質の検討、本酵素をコードする遺伝子(imtd 遺伝子)のクローニングを行い、大腸菌における発現系の構築を意図してなされたものである。

1. イソマルトトリオデキストラナーゼ(IMTD)の精製と諸性質

B. fuscum var. *dextranlyticum* 0407株の培地上清よりIMTDを硫酸分画、およびDEAE-Sepharose CL-6B (1st)、Bio Gel P-100、DEAE-Sepharose CL-6B (2nd)、Hydroxyapatite等の各カラムクロマトグラフィーにより電気泳動的に均一なタンパク質にまで精製した。SDS-PAGEにおける本酵素の推定分子量は約70,000、至適pHは7.5であった。本酵素は、反応初期にはデキストランからイソマルトトリオースのみを生成したが、最終的にはデキストランを約95%まで分解し、最終分解生成物にはイソマルトトリオース以外のオリゴ糖が含まれていた。本酵素のN末端領域および部分アミノ酸配列を決定した結果、本酵素が

*Arthrobacter*属の細菌が生産するエンド型デキストラナーゼと相同性を持つことが明らかとなった。

2. イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子 (*imtd*遺伝子) のクローニング

本酵素の部分アミノ酸配列を基にプローブを作製し、*imtd*遺伝子のクローニングを行った。本遺伝子は37アミノ酸残基のシグナル配列と604アミノ酸残基の成熟酵素タンパク質をコードしており、上述した部分アミノ酸配列はすべて*imtd*遺伝子の推定アミノ酸配列に見いだされた。

IMTDと他の糖質分解酵素のアミノ酸配列上の相同性を調べた結果、本酵素はエキソ型に属しながら他の2種類のエキソ型酵素（グルコデキストラナーゼおよびイソマルトデキストラナーゼ）とは相同性を示さず、*Arthrobacter*属の細菌および*Penicillium minioluteum*由来のエンド型デキストラナーゼとそれぞれ80%および33%、さらに*Aspergillus niger*由来のイソプルラナーゼと32%の相同性を示した。これらのアミノ酸配列間には高度に保存された領域が存在することが確認された。

3. 大腸菌におけるイソマルトトリオデキストラナーゼの発現

*imtd*遺伝子を発現用大腸菌ベクターのT7ファージプロモーター下流に導入し、IMTDの大腸菌での発現を試みた。*imtd*遺伝子のIMTD成熟酵素に相当する部分のみを導入した場合およびシグナル配列をコードする部分を含めて導入した場合の2種類のプラスミド (pITD-NおよびpITD-S) を構築し、それぞれ大腸菌BL21 (DE3) に導入した後、IPTGによる発現誘導を行った。その結果シグナル配列を有する場合には、培養液 (菌体抽出液を*B. fuscum*培養液に換算) 当たりの活性はオリジナルの1/20にとどまった。一方、成熟酵素部分のみを用いて構築したpITD-Nを用いた場合には、オリジナルの約3倍の活性が得られた。

次に*E. coli*/pITD-N由来のIMTDをSDS-PAGEにおいて単一なバンドとなるまで精製し、オリジナルの酵素と比較した。その結果、得られた発現IMTDは分子量、至適pH、ともにオリジナルの酵素と一致し、デキストラン分解生成物としてイソマルトトリオースを遊離させた。しかしながら、発現酵素の比活性はオリジナルの半分以下となり、 K_m の増加、 V の減少が認められた。

4. *B. fuscum* var. *dextranlyticum* 0407 株におけるデキストラン代謝機構

コロニーハイブリダイゼーションおよびinverse PCRを用いたgene workingを行い、*imtd*遺伝子の5'末端側上流域6,286bpを新たに解析した。その結果、*imtd*遺伝子上流には糖質の膜輸送に関わるタンパク質 (*dexE*、*dexD*および*decC*) および α -グルコシダーゼ (*dexA*) が、さらにアンチセンス鎖側には、糖質代謝に

おける発現制御タンパク質と考えられるORF (*dexR*)が見いだされた。さらに本菌の無細胞抽出液に α -グルコシダーゼ活性が存在すること、*imtd*遺伝子の発現を行うと考えられるプロモーター領域が*dexA*および*dexC*を挟んで存在することなどから、IMTDによるデキストラン分解とイソマルトトリオースの生成、菌体内への生成イソマルトトリオースの輸送、細胞内における α -グルコシダーゼによるグルコースへの分解が、一つのオペロンにより制御された連続した反応であることが示唆された。さらに、本菌の無細胞抽出液からの α -グルコシダーゼを、DEAE-Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィー、PAGEによる分離、およびBio Gel P-100カラムクロマトグラフィーにより精製した。本酵素はpH7.5において最大活性を示し、イソマルトトリオースに対する K_m および V はそれぞれ7.1mMおよび1.0 μ mole/min/mgであった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 千 葉 誠 哉
副 査 教 授 本 間 守
副 査 助 教 授 松 井 博 和
副 査 助 教 授 木 村 淳 夫

学 位 論 文 題 名

Brevibacterium fuscum var. *dextranlyticum* 0407株が生産するイソマルトトリオデキストラナーゼに関する研究

本論文は、和文149頁、図62、表9、7章からなり、ほかに参考論文2篇が付されている。

デキストランは、主に α -1,6-グルコシド結合を主鎖とする多糖である。古くから製糖工業においてパイプを詰らせる障害物質、虫歯の原因となる物質として知られてきたが、代用血漿やゲル濾過剤等の原料としても広く利用されている。

デキストランをその非還元末端から逐次加水分解してイソマルトトリオースを生成するエキソ型デキストラナーゼの性質や構造については従来ほとんど解析がなされていない。

本研究は、コリネ型細菌の一種である *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株が菌体外に産生するイソマルトトリオデキストラナーゼの精製、その諸性質の検討、本酵素をコードする遺伝子 (*imtd*遺伝子) のクローニング、大腸菌での発現系の構築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. イソマルトトリオデキストラナーゼ (IMTD) の精製と諸性質

B. fuscum var. *dextranlyticum* 0407 株の培地上清より IMTD を硫酸分画、DEAE-Sepharose CL-6B、Bio Gel P-100 および Hydroxyapatite 等のカラムクロマトグラフィーにより電気泳動的に均一なタンパク質にまで精製した (SDS-PAGE による分子量約 70,000、至適 pH は 7.5)。本酵素はデキストランを約 95% まで分解し反応初期にはイソマルトトリオースのみを生成したが、最終分解生成物にはイソマルトトリオース以外のオリゴ糖も認められた。

2. イソマルトトリオデキストラナーゼ遺伝子 (*imtd*遺伝子) のクローニング

本酵素の部分アミノ酸配列を基にプローブを作製し、*imtd* 遺伝子のクローニ

ングを行った。本遺伝子は37アミノ酸残基のシグナル配列と604アミノ酸残基の成熟酵素タンパク質をコードしており、決定された部分アミノ酸配列はすべて *imtd* 遺伝子の推定アミノ酸配列上に見いだされた。

IMTDと他の糖質分解酵素とのアミノ酸配列上の相同性を調べた結果、本酵素はエキソ型に属しながら他の2種類のエキソ型酵素(グルコデキストラナーゼおよびイソマルトデキストラナーゼ)とは相同性を示さず、*Arthrobacter* 属の細菌および *Penicillium minioluteum* 由来のエンド型デキストラナーゼとそれぞれ80%および33%、さらに *Aspergillus niger* 由来のイソプルラナーゼと32%の相同性を示した。

3. 大腸菌におけるイソマルトトリオデキストラナーゼの発現

imtd 遺伝子を発現用大腸菌ベクターのT7ファージプロモーター下流に導入し、IMTDの大腸菌での発現を試みた。*imtd* 遺伝子のIMTD成熟酵素に相当する部分のみを導入した場合およびシグナル配列をコードする部分を含めて導入した場合の2種類のプラスミド(pITD-NおよびpITD-S)を構築し、それぞれ大腸菌BL21(DE3)に導入した。成熟酵素部分 *imtd* 遺伝子のみにより構築したpITD-Nを用いた場合に、オリジナルの約3倍(菌体抽出液を *B. fuscum* 培養液に換算)の活性が得られた。

E. coli/pITD-N由来の精製IMTDは、分子量、至適pHともにオリジナル酵素と一致し、デキストランからイソマルトトリオースを遊離させた。

4. *B. fuscum* var. *dextranlyticum* 0407株におけるデキストラン代謝機構

imtd 遺伝子の5'末端側上流域6,286bpを解析した結果、*imtd* 遺伝子の上流には糖質の膜輸送に関わるタンパク質(*dexE*、*dexD*および*dexC*)および α -グルコシダーゼ(*dexR*)が、さらにアンチセンス鎖側には、糖質代謝における発現制御タンパク質と考えられるORF(*dexR*)が見いだされた。さらに、本菌の無細胞抽出液に α -グルコシダーゼ活性が存在すること、*imtd* 遺伝子の発現を行うと考えられるプロモーター領域が*dexA*および*dexC*を挟んで存在することなどから、IMTDによるデキストラン分解とイソマルトトリオースの生成、菌体内への生成イソマルトトリオースの輸送、細胞内における α -グルコシダーゼによるグルコースへの分解が、一つのオペロンにより制御された連続した反応であることが示唆された。

以上のように本研究は、*B. fuscum* 由来のイソマルトトリオデキストラナーゼの諸性質を明らかにし、その一次構造を決定したものであり、学術的に貴重な知見を提供している。

よって審査員一同は、水野隆文が博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。