

## 学位論文題名

*Arthrobacter nicotinovorans* GS-9株によるレバン  
からの DFAIV 生産とその生理的機能に関する研究

## 学位論文内容の要旨

レバンは、 $\beta$ -2,6結合のポリフラクタンであり単子葉植物の貯蔵多糖として天然に存在する。またレバンは、*Bacillus subtilis*や*Serratia levanicum*などのレバンスクララーゼの作用によりスクロースからも容易に調製できる未利用多糖資源である。また、これまで様々なオリゴ糖で新機能性糖質としての生理作用などが調べられてきたが、オリゴ糖は化学的に様々な構造が考えられ、それだけその機能・生理作用も多様性に富む可能性を秘めており、その機能性評価のため、そしてその実用のために安価かつ安定した大量調製法の確立、新規オリゴ糖の機能性の解明が今後も期待されている。

このような背景のもと、未利用多糖資源としてその有効利用が求められるレバンを原料に、その構造のユニークさから新機能性オリゴ糖として期待される非還元性・環状二糖類ダイフラクトース・アンハイドライドIV (di-D-fructose-2,6':6,2'-dianhydride: DFAIV) の生産とDFAIVの生理機能解明を目的とした研究を行った。

本研究の結果を要約すると以下の通りである。

## 1. DFAIV生産菌の探索とDFAIVの生産

土壌中よりレバン資化菌の探索を行い、DFAIV生成酵素生産能の高いGS-9株を分離した。本菌はグラム陽性のコリネ型細菌であり、詳細な生理試験とリボソーム蛋白質の二次元電気泳動による分析から、*Arthrobacter nicotinovorans* GS-9株と同定した。

GS-9株は、レバンを単一炭素源としたときにのみ培養上清中にDFAIV生成酵素を生じ、培養上清粗酵素の活性は最高3.3 U/mlであった。その培養上清粗酵素液によるレバンからの生成物はDFAIVとフラクトースのみであり、その時のDFAIVの収率は75%であった。

## 2. LFTaseの精製と諸性質

DFAIV生成酵素の酵素化学的特性とDFAIV生産における反応特性を知るため、GS-9株の培養液よりDFAIV生成酵素の酵素精製を行い、諸特性の検討を行った。

本酵素は、exo型にレバンを分解し、分子内転移反応によりDFAIVを生成するレバンフルクトトランスフェラーゼ (LFTase) であり、分子量約52,000の単量体からなる新規なLFTaseであると確認できた。レバンからの酵素反応の最終産物はDFAIV、フラクトース、レバンビオースと2種類の未知オリゴ糖であり、フラクトース、DFAIV、レバンビオースは重量比で6:75:15であった。

本酵素は、 $\beta$ -2,6フラクトシル結合を持つレバンやレバンオリゴ糖にのみ作用しDFA IVを生成した。その最小鎖長は3糖のレバントリオースであり、基質鎖長が長くなるにつれDFA IVの割合が増加する傾向が見られ、高重合、低分岐のレバン、つまり *Serratia levanicum*由来のレバンがDFA IV生産に最適な基質であることが明らかとなった。基質を高濃度とすると、分子間での転移反応が確認でき、DFA IVを基質としたときには、レバンからの2種の未知オリゴ糖のうち1種と同一と考えられるオリゴ糖が生成され、DFA IVにレバンピオシル基が側鎖として結合した $\beta$ -2,1'-レバンピオシル-DFA IVと考えられた。本酵素によるレバンの酵素反応生成物に乾燥酵母を添加したところ、DFA IV以外すべての糖質が発酵を受けて消滅し、DFA IV精製の効率化がはかれることがわかった。

### 3. LFTase遺伝子のクローニングと大量発現

LFTaseの分子レベルでの性質を明らかにすること及びLFTaseの生産性を高めることを目的に、本酵素の遺伝子クローニングと大腸菌での大量発現を試みた。

LFTaseのアミノ酸配列を基に作製したオリゴヌクレオチドプローブによりプラークハイブリダイゼーション法によるスクリーニングを行い、得られた陽性クローンの約3.6 kbp *Bam*H I断片をpUC19にサブクローニングしpLFT-7Cを構築した。pLFT-7Cを保持する大腸菌中にLFTase活性が発現し、レバンからDFA IVの生成も確認した。

pLFT-7C中には、1,554 bpからなる精製酵素標品から決定したアミノ酸配列すべてを含んだLFTaseをコードする *lft* 遺伝子が存在した。 *lft* 遺伝子は、33残基からなるシグナルペプチドを含む517のアミノ酸をコードし、推定される分子量53,152がGS-9株の精製酵素標品とほぼ一致した。本酵素のアミノ酸配列は、イヌリンよりそれぞれDFA I、DFA IIIを生成する2種類のイヌラーゼIIとは相同性がなく、レバナーゼ、インベルターゼなどのインベルターゼファミリーの共通配列に類似する配列を有していた。即ち本酵素が新規なものであることが確認された。

得られたpLFT-7CをもとにLFTase高発現プラスミドの構築を試みた。シグナルペプチドの一部を削除しpUC18の *lacZ* に融合したpLFT-BB1では、そのクローン化LFTaseのN末端アミノ酸配列がGS-9株のLFTaseのN末端配列と1個のアラニン残基の付加以外一致し、LFTaseが大腸菌中で発現しシグナルペプチドの切断も確実に行われていることが確認できた。またGS-9株の6倍となる高活性が得られ、このpLFT-BB1により大腸菌中で容易にLFTaseを大量調製することができた。

### 4. DFA IVの生理的機能の解明

これまでの検討により大量調製が容易となったDFA IVを用いて、その生理的機能の解明を試みた。

DFA IVは、非う蝕性、非消化性の糖質でスクロースの40-50%の甘味度がある。ラットでのDFA IV摂食効果の検討により、DFA IVのカルシウム、マグネシウム吸収促進効果が確認できた。DFA IVは小腸部位ですべての群中最も高い約90%のカルシウム吸収率を示し、ラット反転サックを用いた検討からも、DFA IVの高いカルシウム吸収促進効果が確認できた。一方、小腸部位での高いカルシウム吸収促進効果のため、大腸部位への到達カルシウム量が微量と考えられたことから、大腸でのカルシウム吸収促進効果は確認できなかった。

DFAIVは、*in vivo*において大腸部位で腸内細菌により主に酢酸、酪酸、乳酸に転換されており、腸内細菌による発酵を受けることが確認できた。しかし、*in vitro*での腸内細菌による資化性は確認できなかった。DFAIVは各消化管内容物中そして糞中にも残存しており、DFAIVの腸内細菌による発酵は穏やかに進むことが明らかとなった。このようにラット腸内細菌によるDFAIVの資化性は他のオリゴ糖とは異なる非常に特徴的なものであり、DFAIVが他のオリゴ糖とは異なる新たな効果をもたらすことが期待できる。

以上により、これまで大量調製が困難であったDFAIVの大量調製法の確立と更なる生産性の向上を成し得た。また、DFAIVがその生理機能としてカルシウム吸収促進効果を有する甘味糖質であり、新たな生理機能が期待できることを見いだした。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男  
副 査 教 授 青 山 頼 孝  
副 査 助 教 授 横 田 篤

学 位 論 文 題 名

## *Arthrobacter nicotinovorans* GS-9 株によるレバン からの DFAIV 生産とその生理的機能に関する研究

本論文は、和文 120 頁、図 36、表 17、引用文献 136、5章からなり、ほかに参考論文 4 編が付されている。

未利用多糖資源であるレバンの有効利用とその構造のユニークさから新機能性オリゴ糖として期待される環状二糖類ダイフラクトース・アンハイドライドIV (DFAIV) の生産とDFAIVの生理機能解明を目的として研究を行った。

### 1. DFAIV生産菌の探索とDFAIVの生産

土壌中よりレバン資化菌の探索を行い、DFAIV生成酵素生産能の高いGS-9株を分離した。本菌はグラム陽性のコリネ型細菌であり、詳細な生理試験とリボソーム蛋白質の二次元電気泳動による分析から、*Arthrobacter nicotinovorans* GS-9株と同定した。

GS-9株は、レバンを単一炭素源としたときにのみ培養上清中にDFAIV生成酵素を生産し、最高3.3 U/ml活性を得た。この粗酵素液（培養上清）により、収率75%でDFAIVを生成できた。

### 2. LFTaseの精製と諸性質

DFAIV生成酵素の酵素化学的特性とDFAIV生産における反応特性を調べるため、GS-9株の培養液よりDFAIV生成酵素の酵素精製を行い、諸特性の検討を行った。

本酵素は、exo型にレバンを分解し、分子内転移反応によりDFAIVを生成するレバンフルクトトランスフェラーゼ (LFTase) であり、分子量約52,000の単量体からなる新規なLFTaseであることが明らかとなった。レバンからの酵素反応の最終産物はDFAIV、フラクトース、レバンピオースと2種類の未知オリゴ糖であり、DFAIVの収率は75%であった。

本酵素は、 $\beta$ -2,6フラクトシル結合をもつレバンやレバンオリゴ糖にのみ作用して、DFAIVを生成した。その最小鎖長は3糖のレバントリオースであり、基質鎖長が長くなるにつれDFAIVの割合が増加する傾向が見られ、高重合、低分岐のレバンがDFAIV生

産に好適な基質であることが明らかとなった。本酵素によるレバンの酵素反応生成物に乾燥酵母を添加したところ、DFAIV以外すべての糖質が発酵を受け消滅し、DFAIV精製の効率化がはかれることがわかった。

### 3. LFTase遺伝子のクローニングと大量発現

LFTaseの分子レベルでの性質を明らかにすること、LFTaseの生産性を高めることを目的に、本酵素の遺伝子クローニングと大腸菌での大量発現を試みた。

得られた陽性クローンの約3.6 kbp *Bam*H I断片をpUC19にサブクローニングしpLFT-7Cを構築した。pLFT-7C中には、1,554 bpからなる精製酵素標品から決定したアミノ酸配列すべてを含んだLFTaseをコードする *lft* 遺伝子が存在した。*lft* 遺伝子は、33残基からなるシグナルペプチドを含む517のアミノ酸をコードしており、その配列は、イヌリンよりそれぞれDFA I、DFA IIIを生成する2種類のイヌラーゼ II とは相同性がなく、インペルターゼファミリーの共通配列に類似する配列を有していた。即ち、本酵素は新規な酵素であることが明らかとなった。

得られたpLFT-7CをもとにLFTase高発現プラスミドの構築を試みた。シグナルペプチドの一部を削除し、pUC18の *lacZ* に融合するよう作製したpLFT-BB1では、GS-9株の6倍となる高活性が得られた。このpLFT-BB1により大腸菌中で容易にLFTaseを大量調製することができ、結果としてDFAIVの生産性向上を成し得た。

### 4. DFAIVの生理的機能の解明

これまでの検討により大量調製が容易となったDFAIVを用いて生理的機能の解明を試みた。

DFAIVはスクロースの40-50%の甘味度がある。ラットでのDFAIV摂食効果の検討により、DFAIVのカルシウム吸収促進効果が確認できた。DFAIVは小腸部位ですべての群中最も高い約90%のカルシウム吸収率を示し、ラット反転サックを用いた検討からも、DFAIVの高いカルシウム吸収促進効果が確認できた。一方、このため、大腸部位への到達カルシウム量が微量であることから、大腸でのカルシウム吸収促進効果は確認できなかった。

DFAIVは、*in vivo*において大腸部位で腸内細菌により主に酢酸、酪酸、乳酸に転換されており、確実に腸内細菌による発酵を受けることが確認できた。DFAIVは各消化管内容物中そして糞中にも残存しており、DFAIVの腸内細菌による発酵は穏やかに進むことが明らかとなった。

以上のように本研究は、新規オリゴ糖DFAIVの大量調製法の確立とその生理機能解明に関して実用的、応用的な寄与が大きく、また、その過程で得られた酵素化学的知見や遺伝子情報などの知見も学術的に意義ある大きな成果である。

よって、審査員一同は、齋藤勝一が博士（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。