

博士（農 学） 森 本 奈保喜

学 位 論 文 題 名

Arthrobacter globiformis I42由来

グルコデキストラナーゼの構造と機能に関する研究

学位論文内容の要旨

グルコデキストラナーゼ (1,6- α -D-Glucan glucohydrolase; EC 3.2.1.70) は、 α -1,6-グルコシド結合を主鎖とし α -1,2、 α -1,3 および α -1,4 などの分岐を有する α -D-グルカンであるデキストランを非還元末端から順次グルコース単位で加水分解し、 β -glucose を遊離するエキソ型の酵素である。本酵素は既に精製法が確立されており、その酵素学的性質が報告されている。本酵素の全一次構造は決定されていないが、全アミノ酸残基の約 18% に相当する部分アミノ酸配列は決定されている。得られた部分アミノ酸配列は、同じエキソ型デキストラナーゼであるイソマルトデキストラナーゼおよびイソマルトトリオデキストラナーゼと相同性は認められず、 α -1,4 グルカンにエキソ型に作用するグルコアミラーゼと類似することが確認された。本研究では、グルコデキストラナーゼをコードする遺伝子を単離し一次構造を明らかにした後、グルコアミラーゼとの類似性を用い本酵素反応における触媒残基を推定した。

(1) *Arthrobacter globiformis* I42 由来グルコデキストラナーゼ遺伝子の単離とアミノ酸配列の推定

グルコデキストラナーゼの部分アミノ酸配列を基に合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用い、*A. globiformis* I42 ゲノム DNA ライブラリーよりグルコデキストラナーゼ遺伝子を単離した。得られたグルコデキストラナーゼ遺伝子の ORF は 3,147 bp からなり、28 アミノ酸残基で構成されるシグナルペプチドを含む 1,048 アミノ酸をコードしていた。推定分子量は 109,135、そのアミノ酸配列は *A. globiformis* T-3044 グルコデキストラナーゼと 79%、*Clostridium* sp. G0005 グルコアミラーゼと 37% 一致し、グルコアミラーゼにおける保存領域を含む配列が確認され、原核生物由来のグルコアミラーゼと一次構造上類似していることが示唆された。

(2) *A. globiformis* I42 由来グルコデキストラナーゼ遺伝子の大腸菌発現

単離したグルコデキストラナーゼ遺伝子において、シグナルペプチドを除く成熟グルコデキストラナーゼをコードする遺伝子を発現ベクター pET-23a(+) に連結し大腸菌

を形質転換した。大腸菌を用いた発現酵素は種々の酵素精製の実験結果から、活性を持つ状態では C 末端に付加したヒスチジンタグが内部に折り込まれた 3 次元構造をとると想定され、ヒスチジンタグを利用して精製は困難であった。2 種のカラムクロマトグラフィーを用いて精製された発現酵素は、SDS-PAGE における移動度および酵素化学的諸性質において *A. globiformis* I42 より精製されたグルコデストラナーゼと同一であることが確認され、大腸菌を用いた発現によりグルコデキストラナーゼを調製することが可能となった。以上の結果から、大腸菌を用いた変異体酵素を作製しそれらを用いグルコデキストラナーゼの機能解析を可能とした。

(3) *Clostridium thermoamylolyticum* 由来グルコアミラーゼの解析

C. thermoamylolyticum よりグルコアミラーゼ遺伝子を単離した。得られたグルコアミラーゼ遺伝子の ORF は 2,133 bp からなり、710 個のアミノ酸残基をコードしていた。推定分子量は 79,920 と算出され、そのアミノ酸配列は *Clostridium* sp. G0005 および *Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum* グルコアミラーゼとそれぞれ 90%、87% の相同性を示し、84%、82% の一致を示した。また、*A. globiformis* I42 由来グルコデキストラナーゼと 59% の相同性を示し、39% の一致を示した。大腸菌発現による組換えグルコアミラーゼを精製し、諸性質を調べた結果、*Clostridium* sp. G0005 由来グルコアミラーゼと同様の酵素化学的性質を示した。*C. thermoamylolyticum* 由来グルコアミラーゼは *A. globiformis* 由来グルコデキストラナーゼと同様の酵素化学的性質を示すグルコアミラーゼと特定され、両酵素を用いた部位特異的変異体酵素の解析等から、グルコデキストラナーゼの反応機構に関する研究が可能になると考えられた。

(4) *A. globiformis* I42 由来グルコデキストラナーゼの触媒残基の推定

グルコデキストラナーゼとグルコアミラーゼの一次構造における類似性およびグルコアミラーゼの触媒残基に関する研究報告から本酵素の触媒残基の推定を行った。*Aspergillus* 由来グルコアミラーゼおよび *Clostridium* sp. G0005 由来グルコアミラーゼにおいて触媒残基と推測されている Glu179、Glu400 および Glu434、Glu632 に相当するグルコデキストラナーゼの Glu458、Glu656 について部位特異的変異導入によりタンパク質中のアミノ酸置換を行った変異体酵素 E458Q、E656Q を作製した。大腸菌を用いて発現したこれら変異体酵素の活性はほぼ完全に失われ、両アミノ酸残基がグルコデキストラナーゼの活性に重要な役割を担っていることが明らかとなった。相同性検索の結果、グルコアミラーゼの触媒残基と推定されているアミノ酸残基に相当するグルコデキストラナーゼのアミノ酸残基は酸および塩基触媒として機能していることが強く示唆された。

学位論文審査の要旨

主査 教授 松井博和
副査 教授 浅野行蔵
副査 助教授 伊藤浩之
副査 助教授 和田大

学位論文題名

Arthrobacter globiformis I42由来

グルコデキストラナーゼの構造と機能に関する研究

本論文は、図 36 枚、表 9 枚、引用文献 81 を含み、6 章からなる総ページ 113 の和文論文である。別に参考論文 4 編が添えられている。

グルコデキストラナーゼ (1,6- α -D-Glucan glucohydrolase; EC 3.2.1.70) は、 α -1,6-グルコシド結合を主鎖とし α -1,2、 α -1,3 および α -1,4 などの分岐を有する α -D-グルカンのデキストランを非還元末端から順次グルコース単位で加水分解し、 β -glucose を遊離するエキソ型の酵素である。本研究では、グルコデキストラナーゼをコードする遺伝子を単離し一次構造を明らかにした後、グルコアミラーゼとの類似性を用い本酵素反応における触媒残基を推定した。

(1) *Arthrobacter globiformis* I42 由来グルコデキストラナーゼ遺伝子の単離とアミノ酸配列の推定

A. globiformis I42 ゲノム DNA ライブラリーよりグルコデキストラナーゼ遺伝子を単離した。得られたグルコデキストラナーゼ遺伝子の ORF は 3,147 bp からなり、28 アミノ酸残基で構成されるシグナルペプチドを含む 1,048 アミノ酸をコードしていた。推定分子量は 109,135、そのアミノ酸配列は *A. globiformis* T-3044 グルコデキストラナーゼと 79%、*Clostridium* sp. G0005 グルコアミラーゼと 37%一致し、グルコアミラーゼにおける保存領域を含む配列が確認され、原核生物由来のグルコアミラーゼと一次構造上類似していることが示唆された。

(2) *A. globiformis* I42 由来グルコデキストラナーゼ遺伝子の大腸菌発現

シグナルペプチドを除く成熟グルコデキストラナーゼをコードする遺伝子を発現ベクター pET-23a(+) に連結し大腸菌を形質転換した。2 種のカラムクロマトグラフィーを用いて精製された発現酵素は、SDS-PAGE における移動度および酵素化学的諸性

質において *A. globiformis* I42 より精製されたグルコデストラナーゼと同一であることが確認され、大腸菌を用いた発現によりグルコデキストラナーゼを調製することが可能となった。以上の結果から、大腸菌を用いた変異体酵素を作製しそれらを用い グルコデキストラナーゼの機能解析を可能とした。

(3) *Clostridium thermoamylolyticum* 由来グルコアミラーゼの解析

C. thermoamylolyticum よりグルコアミラーゼ遺伝子を単離した。得られたグルコアミラーゼ遺伝子の ORF は 2,133 bp からなり、710 個のアミノ酸残基をコードしていた。推定分子量は 79,920 と算出され、そのアミノ酸配列は *Clostridium* sp. G0005 および *Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum* グルコアミラーゼとそれぞれ 90%、87% の相同性を示し、84%、82% の一致を示した。また、*A. globiformis* I42 由来グルコデキストラナーゼと 59% の相同性を示し、39% の一致を示した。大腸菌発現による組換えグルコアミラーゼを精製し、諸性質を調べた結果、*Clostridium* sp. G0005 由来グルコアミラーゼと同様の酵素化学的性質を示した。*C. thermoamylolyticum* 由来グルコアミラーゼは *A. globiformis* 由来グルコデキストラナーゼと同様の酵素化学的性質を示すグルコアミラーゼと特定され、両酵素を用いた部位特異的変異体酵素の解析等からグルコデキストラナーゼの反応機構に関する研究が可能になると考えられた。

(4) *A. globiformis* I42 由来グルコデキストラナーゼの触媒残基の推定

グルコデキストラナーゼとグルコアミラーゼの一次構造における類似性およびグルコアミラーゼの触媒残基に関する研究報告から本酵素の触媒残基の推定を行った。*Aspergillus* 由来グルコアミラーゼおよび *Clostridium* sp. G0005 由来グルコアミラーゼにおいて触媒残基と推測されている Glu179、Glu400 および Glu434、Glu632 に相当するグルコデキストラナーゼの Glu458、Glu656 について部位特異的変異導入によりタンパク質中のアミノ酸置換を行った変異体酵素 E458Q、E656Q を作製した。大腸菌を用いて発現したこれら変異体酵素の活性はほぼ完全に失われ、両アミノ酸残基がグルコデキストラナーゼの活性に重要な役割を担っていることが明らかとなった。相同性検索の結果、グルコアミラーゼの触媒残基と推定されているアミノ酸残基に相当するグルコデキストラナーゼのアミノ酸残基は酸および塩基触媒として機能していることが強く示唆された。

以上のように、本研究では α -グルカンの非還元末端の α -1.6 結合を主として加水分解しグルコースを生成する酵素（グルコデキストラナーゼ）と、 α -1.4 結合を主として加水分解しグルコースを生成する酵素（グルコアミラーゼ）の 2 種類の一次構造を明らかにし、その類似性から前者の活性発現に関わる部位を特定したものであり、酵素化学的領域における学術的価値は大きいにあると判断される。

よって審査員一同は、森本奈保喜が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。