

学位論文題名

Catalytic Mechanism and Molecular Structure of
Dextranase Having Intramolecular Transglycosylation
Activity from *Paenibacillus* sp.

(*Paenibacillus* sp. 分子内転移活性を持つ
Dextranaseの構造と機能に関する研究)

学位論文内容の要旨

デキストラナーゼは、 α -1,6 グルカンであるデキストラン（分岐構造を持つものもある）を加水分解する酵素の総称である。エンド型とエキソ型の反応を触媒するものに大別されるが、本酵素は前者の分解様式を示す。最終生成物が4糖や5糖からなる α -1,6 グルコースオリゴマー（イソマルトオリゴ糖）を与える点はユニークな性質である。さらに、本研究から同酵素が分子内転移活性を示すことが解明され、デキストランから環状のイソマルトオリゴ糖（CIと略）を生産することが見出された。グルコース残基からなる環状オリゴ糖としては、 α -1,4 結合のシクロデキストリンが最もよく知られ、包接能を有するため産業分野での需要が高い。本酵素と同様な環状化反応を触媒する酵素は、既に報告されているが、包接能がない7～9糖のCI（CI-7～CI-9）を与える。本酵素が示すもう1つの特徴は、包接能があるCI-10を主に生成することである。本研究は、*Paenibacillus* sp.デキストラナーゼの構造と機能を解明することにより、同酵素が属するGHファミリー66酵素の新たな分類を提唱し、その触媒残基を初めて明らかにした。

(1) *Paenibacillus* sp.デキストラナーゼの精製と性質解明、遺伝子の単離

酵素活性は主に菌体表面に見出された。精製は、破碎した本菌の上清を硫酸分画、イオン交換、疎水吸着とゲル濾過のクロマト操作で行い、電気泳動的に単一な標品を得た。分子量および活性に対するpHや温度の影響を調べた。細菌由来でありながら、主にガラクトースが結合した糖蛋白質であることが明らかになり、本菌が糖鎖付加システムを持つことが判明した。イソマルトオリゴ糖の α -メチル配糖体（DP=3～7）を合成し、酵素を作用させた。非還元末端から4残基と5残基のグルコースを認識し切断する様式であった。N末端と内部のアミノ酸配

列からオリゴヌクレオチドを合成し、PCR法で酵素遺伝子（ORFは5,091bpで1,696アミノ酸をコード）を単離した。N末構造はGHファミリー66酵素に似ており触媒ドメインの存在が考えられた。C末構造には菌体表層結合に関与するSLHモチーフを含む領域（SLH含有ドメイン）が認められ、両者をリンカーで繋げたドメイン構造が予想された。本酵素は菌体表面にあるため、SLH含有ドメインの存在は支持された。N末構造は、GHファミリー66酵素の中で特にCIを生成するシクロイソマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ（CITaseと略）に類似した。精製酵素を用いて環状化活性を調べると、7~14残基のグルコースからなるCI（CI-7~CI-14）を生成することが認められた。なお、これらのCIの構造決定はNMRとMSを用いて行った。特に包接能があるCI-10の合成量が高かった。本反応は、デキストランを切断後に、生成したオリゴ糖をそれ自身の非還元末端のグルコース残基のC6水酸基に転移させる「分子内転移作用」と考えられた。

（2）環状化反応の分子解析

GHファミリー66には、加水分解反応を触媒するデキストラナーゼと環状化反応を触媒するCITaseが属する。CITaseは僅かではあるが加水分解活性を示し、さらにデキストラナーゼは糖転移活性を有することから、全てのGHファミリー66酵素が分子内転移を行う可能性が考えられた。この仮説を検証するため、2つの酵素遺伝子（*Bacterioides thetaiotaomicron*のCITaseホモログならびに*Streptococcus mutans*デキストラナーゼ）を大腸菌で発現させ、環状化反応を調べた。CITaseホモログはCIを生成したが、本酵素と同様に顕著な加水分解活性を示した。*S. mutans*デキストラナーゼには、CI合成能が認められなかった。従って、GHファミリー66は、環状化反応を行う酵素群ならびに加水分解反応を行う酵素群の他に、両反応を行う酵素群の計3グループから構成されていることを見出した。本分類（サブファミリーへの分類）は、アミノ酸一次配列の類似性からも支持された。

本酵素遺伝子ならびにリンカーとC末端領域を欠損させた酵素遺伝子の発現実験に成功した。精製酵素の活性を比較すると、欠損型の方が高かった。両酵素ともに環状化反応を触媒することから、リンカーとC末端領域は本反応に関与しないことが判明し、N末構造に活性部位が存在することを支持する結果が得られた。GHファミリー66酵素の触媒残基は明らかにされていないので、本酵素を用いて決定を行った。反応速度論的解析、カルボキシル基に特異的な水溶性カルボジイミドによる化学修飾実験および自殺基質である ω -エポキシアルキル α -グルコシドを用いた標識実験の結果から、酸性アミノ酸が触媒残基であることを推定した。本ファミリー酵素に完全に保存された酸性アミノ酸は4残基あり、本酵素ではAsp189、Asp340、Glu412

と Asp1252 が該当する。これら 4 アミノ酸に部位特異的変異を導入した。Asp1252 置換酵素は、親酵素の約 40% に相当する活性を示した。Asp189、Asp340 と Glu412 の変異酵素は活性を完全に失ったため、これらの 3 アミノ酸が触媒残基と推定した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 村 淳 夫

副 査 教 授 横 田 篤

副 査 助 教 授 森 春 英

学 位 論 文 題 名

Catalytic Mechanism and Molecular Structure of Dextranase Having Intramolecular Transglycosylation Activity from *Paenibacillus* sp.

(*Paenibacillus* sp. 分子内転移活性を持つ

Dextranaseの構造と機能に関する研究)

本論文は、英文 156 頁、図 56、表 23、5 章からなり、他に参考論文 7 編が添えられている。

デキストラナーゼは、 α -1,6 グルカンであるデキストランを加水分解する酵素の総称である。本酵素はエンド型の分解様式を示し、最終生成物が 4 糖や 5 糖からなるイソマルトオリゴ糖を与える点はユニークな性質である。さらに、本研究から同酵素が分子内転移活性を示すことが解明され、環状のイソマルトオリゴ糖 (CI と略) を生産することが見出された。グルコース残基からなる環状オリゴ糖としては、シクロデキストリンが最もよく知られ、包接能を有するため産業分野での需要が高い。本酵素が示すもう 1 つの特徴は、包接能がある CI-10 を主に生成することである。本研究は、*Paenibacillus* sp. デキストラナーゼの構造と機能を解明することにより、同酵素が属する GH ファミリー 66 酵素の分子解析を行ったものである。

(1) *Paenibacillus* sp. デキストラナーゼの精製と性質解明、遺伝子の単離

一連のクロマト操作を行い、電気泳動的に単一な精製標品を得た後に、一般的な諸性質を明らかにした。細菌由来でありながら、主にガラクトースが結合した糖蛋白質であることが明らかにされた。基質の非還元末端から 4 残基と 5 残基のグルコースを切断する様式を明らかにした。PCR 法で酵素遺伝子 (ORF は 5,091bp で 1,696 アミノ酸をコード) を単離した。N 末構造は GH ファミリー 66 酵素に似ており触媒部位の存在が考えられた。C 末構造には菌体表面結合に関与する SLH モチーフを含む領域 (SLH 含有ドメイン) が認められ、両者をリンカーで繋げたドメイン構造が予想された。本酵素は菌体表面にあるため、SLH 含有ドメインの存在は

支持された。N 末構造は、GH ファミリー 66 酵素の中で特に CI を生成するシクロイソマルトデキストリン グルカノトランスフェラーゼ (CITase と略) に類似した。精製酵素を用いて環状化活性を調べると、7~14 残基のグルコースからなる CI (CI-7~CI-14) を生成することが認められた。特に包接能がある CI-10 の合成量が高かった。本反応は、デキストランを切断後に、生成したオリゴ糖をそれ自身の非還元末端のグルコース残基の C6 水酸基に転移させる「分子内転移作用」と考えられた。

(2) 環状化反応の分子解析

GH ファミリー 66 には、加水分解反応を触媒するデキストラナーゼと環状化反応を触媒する CITase が属する。デキストラナーゼは糖転移活性を有することから、全ての GH ファミリー 66 酵素が分子内転移を行う可能性が考えられた。この仮説を検証するため、2つの酵素遺伝子 (*Bacterioides thetaiotaomicron* の CITase ホモログならびに *Streptococcus mutans* デキストラナーゼ) を大腸菌で発現させ、環状化反応を調べた。CITase ホモログは CI を生成したが、本酵素と同様に顕著な加水分解活性を示した。*S. mutans* デキストラナーゼには、CI 合成能が認められなかった。従って、GH ファミリー 66 は、環状化反応を行う酵素群および加水分解反応を行う酵素群の他に、両反応を行う酵素群の 3 グループから構成されていることを見出した。本分類は、アミノ酸一次配列の類似性からも支持された。

本酵素遺伝子ならびにリンカーと C 末端領域を欠損させた酵素遺伝子の発現実験に成功した。両酵素ともに環状化反応を触媒することから、N 末構造に活性部位が存在することが判明した。GH ファミリー 66 酵素の触媒残基は未解明であるので決定を行った。動解析、化学修飾実験および自殺基質実験の結果から、酸性アミノ酸が触媒残基であることを推定した。本ファミリー酵素に完全に保存された酸性アミノ酸は 4 残基 (本酵素では Asp189、Asp340、Glu412 と Asp1252) あり、これらに部位特異的変異を導入した。その結果、Asp189、Asp340 と Glu412 が触媒残基と推定した。

以上のように本研究は、*Paenibacillus* sp. デキストラナーゼを単離し、性質および構造の解析を行い、本酵素が加水分解反応の他に環状化反応を触媒することを明らかにしたものである。さらにドメインの機能解析、同酵素が属する GH ファミリー 66 酵素に対し新たな分類の提唱ならびに触媒残基を初めて究明することなど、糖質酵素に関し学術的に重要な基礎的知見を提供した。特に、包接能を有する CI-10 の生成量が大きいことを明らかにした点は、本酵素の産業利用への道を拓いたものであり、特筆に値する。

よって、審査委員一同は、Young-Min Kim 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。