

学 位 論 文 題 名

Molecular Structures and Catalytic Mechanisms of
Glycosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides*
and Dextranase from *Lipomyces starkeyi*

(*Leuconostoc mesenteroides* グリカン合成酵素と
Lipomyces starkeyi 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

乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* は、ショ糖を多糖類に転換する2つの有用なグルカン合成酵素を菌体外に分泌する。デキストラン合成酵素 (DSase と略) とフラクタン合成酵素 (FSase と略) である。デキストラン (DXT と略) は α -1,6 結合を主鎖とする α -グルカンであるが、 α -1,2、 α -1,3 や α -1,4 結合の分岐を有する。分岐は DXT の物性を決定し、かつその頻度、鎖長や結合は生産する DSase の生成物特異性に起因するが、分子機構の詳細は不明である。一方、本乳酸菌が産する FSase 活性は微量であり、その本体は DSase 由来であると提唱された。フラクタン (FRT と略) は、DXT とともに産業利用が高いため、それらを高生産する菌株や合成酵素は重要である。我々は、軟 X 線を本菌や酵素遺伝子を含むプラスミッドに照射することで、両多糖を高生産する変異株や構造の異なる DXT を与える変異株を取得してきた。それらが生産する FSase や DSase の構造ならびに分子機構の解明は興味深い。本研究では、変異株から FSase および2つの DSase の遺伝子や組換え酵素を単離し、機能解析ならびに触媒アミノ酸の決定を行った。特に、*L. mesenteroides* 由来の FSase は初めての報告であり、微量の活性が本酵素由来であることが究明された。また、DSase に関しては、 α -1,3 や α -1,4 結合の分岐を与える構造エレメントを解明した。

歯垢の除去は、う蝕形成を防止する。歯垢を構成する多糖類の分解は、効果的な手法の1つである。本多糖の1つである α -グルカンは α -1,6 や α -1,4 結合を有する。従って、両結合を効率良く分解する酵素は、利用価値が高い。従来、 α -1,6 結合を分解するデキストラナーゼ (DXase と略; カビ由来) が用いられてきたが、より安全性の高い微生物からの酵素が要求された。我々は酵母 (*Lipomyces starkeyi*) が生産する DXase を発見した。 α -1,6 結合の他に α -1,4 結合をよく分解する点が他の酵素にない優れた性質である。本研究では、異種宿主発現による本 DXase の大量生産を行い、組換え酵素の性質を明らかにした。

(1) *L. mesenteroides* B-512 FMC 由来 FSase の解析

FSase の高発現株 (B-512 FMC 株) からショットガンクローニング法で形質転換体 (大腸菌) を

得た。選抜は、菌体外における FRT 形成を指標に行った。424 アミノ酸からなる推定配列はレバンスクララーゼと高い相同性を示した。組換え酵素の至適 pH や温度はそれぞれ pH 6.2 と 37 °C であり、pH 4.5-7.0 および 37 °C で安定であった。1 mM の Ag^+ と Hg^+ は強い阻害を与えた。生成された多糖は NMR および抗体の解析からレバンであり、本酵素はレバンシュクララーゼと決定された。本多糖合成の他にケストオリゴ糖を生産した。キシロース、セロビオース、ラクトース、マルトースとメリビオースが糖転移の受容体となり、それぞれの還元末端残基の C1-OH に Fru が β 型で結合した非還元オリゴ糖を与えた。これらのオリゴ糖は還元力がないため反応性が低い。すなわち、還元糖をより反応性に乏しい非還元糖に導くことができ、食品などに添加した場合に有用成分を損なわず安定性が高い。触媒残基と予想される D53、D216 と E294 に点突然変異を与えた酵素は活性を消失した。D210 を含む保存配列 (208-FRDP-211) が 214-FRDP-217 に認められたが、D216A が約 10% の活性を示したことから D216 は触媒残基ではないと判断した。

(2) *L. mesenteroides* B-742CB 由来 DSase の軟 X 線照射変異体の解析

B-742CB 株の DSase 遺伝子を含むプラスミッドに軟 X 線照射を行い、大腸菌に導入した。DXT 生産で選抜し、構成的過剰発現株の取得に成功した。精製した組換え酵素が生産する DXT の構造を調べた。NMR 分析で α -1,3 結合の存在が見出された。エンド型 DXase 消化で分岐型オリゴ糖が確認され、親酵素の DXT より α -1,3 結合の度合いが高いことが判明した。本組換え酵素遺伝子のプロモーター領域に塩基置換があり、高発現に関与すると推測された。構造遺伝子にも 2 つの塩基置換が見出されたがサイレント突然変異であり、親酵素との生成物特異性の相違は、翻訳後修飾や三次構造の違いによると考えられた。

(3) *L. mesenteroides* B-1299CB4 由来 DSase の解析

B-1299CB4 株から DSase 遺伝子 (1,505 アミノ酸をコード) を単離し、大腸菌で発現させた。精製した組換え酵素は、至適 pH 5.2 および 30 °C 以下および pH 5.2 から 6.0 の安定域を示した。活性は 1 mM Fe^+ と Hg^+ で強く阻害され、 Ca^{2+} により約 2 倍に増加した。点置換法で触媒残基を D530、E568 と D641 と推定した。DSase が属すグリコシドヒドラーゼファミリー 70 の酵素には 6 つの保存領域があり、DSase で高く保存された領域 II の 2 アミノ酸 (V532 と V535) と領域 IV の 3 アミノ酸 (S642、E643 と V644) をレウテランスクラーゼ (α -1,4/1,6-グルカンを生産) 型に変異させた。すなわち、2 重置換体 (V532P/V535I)、3 重置換体 (S642N/E643N/V644S) およびそれらを併せた 5 重置換体 (V532P/V535I/S642N/E643N/V644S) を作製し、転移反応と DXT 合成を行った。親酵素と 2 重置換体は同様なオリゴ糖 (α -1,6 結合) や DXT (水溶性) を与えた。3 重および 5 重置換体は α -1,6 や α -1,4 結合からなるオリゴ糖を生成した。両変異酵素は難溶性 DXT を生産し、前者は α -1,3 結合を有し後者はさらに α -1,4 結合も含むことが認められた。領域 II と IV に生成物特異性を決定する構造エレメントが存在すると推定した。

(4) *L. starkeyi* KSM22 由来 DXase の解析

cDNA ライブラリーから DXase 遺伝子 (608 アミノ酸をコード) を単離した。サザン解析で染色体に単一に存在することがわかった。異種宿主発現で得られた組換え酵素の性質を調べた。pH 6.0 と 37 °C に反応の至適を示し、安定域は pH 5.0 から 7.0 および 37 °C 以下であった。用いた全ての重金属イオン (1 mM Ag^+ 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} と Mn^{2+} で 70%~90%の残存活性、1 mM Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Sn^{2+} と Zn^{2+} では活性低下なし) や SDS (1 mM) に対し安定であった。DXT の他に可溶性澱粉やムタンにも分解活性を示した。異種宿主発現に成功し、 α -1,4 結合と α -1,6 結合に作用できる DXase の大量供給が可能になった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 村 淳 夫
副 査 教 授 伴 戸 久 徳
副 査 教 授 横 田 篤
副 査 助教授 森 春 英

学 位 論 文 題 名

Molecular Structures and Catalytic Mechanisms of Glycosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* and Dextranase from *Lipomyces starkeyi*

(*Leuconostoc mesenteroides* グリカン合成酵素と
Lipomyces starkeyi デキストラナーゼの構造と機能に関する研究)

本論文は、英文 179 頁、図 42、表 32、6 章からなり、参考論文 3 編が添えられている。

Leuconostoc mesenteroides は、ショ糖を多糖類にする 2 つの有用なグルカン合成酵素を生産する。デキストラン合成酵素 (DSase) とフラクタン合成酵素 (FSase) である。デキストラン (DXT) は α -1,6 結合を主鎖とする α -グルカンであるが、 α -1,4 結合などの分岐を有する。DXT の物性を決定する分岐構造は、DSase の生成物特異性に因るが、分子機構の詳細は不明である。一方、本菌が産する FSase 活性は微量であり、DSase 由来であると提唱された。フラクタン (FRT) は、DXT とともに産業利用が高いため、高生産株や合成酵素は重要である。我々は、本菌や酵素遺伝子を含むプラスミッドに軟 X 線照射し、両多糖の高生産変異株や構造の異なる DXT を与える変異株を取得した。本研究では、変異株から FSase および 2 つの DSase の遺伝子や組換え酵素を単離し、機能解析ならびに触媒残基の決定を行った。特に、*L. mesenteroides* 由来の FSase は初めての報告であり、微量活性が本酵素由来であることを究明した。DSase に関し α -1,3 や α -1,4 結合の分岐を与える構造エレメントを解明した。

菌垢を構成する多糖類の分解は、う蝕形成を防止する手法である。菌垢多糖である α -グルカンは α -1,6 や α -1,4 結合を有するため、両結合を分解する酵素は利用価値が高い。従来、デキストラナーゼ (DXase ; カビ由来) が用いられてきたが、より安全性の高い微生物からの酵素が要求された。我々は酵母 (*Lipomyces starkeyi*) が生産する DXase を発見した。 α -1,6 結合の他に α -1,4 結合

を分解する点が優れた性質である。本研究では、異種宿主発現による本 DXase の大量生産を行い、組換え酵素の性質を明らかにした。

(1) *L. mesenteroides* B-512 FMC 由来 FSase の解析

B-512 FMC 株からショットガンクローニング法で本酵素の発現株を得た。組換え酵素に対する pH、温度や重金属イオンの影響を明らかにした。生成多糖の構造から本酵素はレバンスクララーゼと決定された。本多糖合成の際にkestose を生産した。キシロース、ゼロビオース、ラクトース、マルトースとメリビオースが糖転移の受容体となり、それぞれの還元末端残基の C1-OH に Fru が β 型で結合した非還元オリゴ糖を与えた。これらのオリゴ糖は還元力がない。すなわち、還元糖をより反応性に乏しい非還元糖に導くことができ、食品などに添加した場合に有用成分を損なわず安定性が高い。触媒残基を D53、D216 と E294 と推定した。

(2) *L. mesenteroides* B-742CB 由来 DSase の軟 X 線照射変異体の解析

B-742CB 株 DSase の軟 X 線照射変異体（構成的過剰発現株）取得に成功した。組換え酵素が生産する DXT に α -1,3 結合の存在が見出され、親酵素のものより α -1,3 結合の度合いが高かった。本組換え酵素遺伝子のプロモーター領域に塩基置換があり、高発現に関与すると推測された。構造遺伝子にも 2 つの塩基置換が見出されたがサイレント突然変異であり、親酵素との生成物特異性の相違は、翻訳後修飾や三次構造の違いによると考えられた。

(3) *L. mesenteroides* B-1299CB4 由来 DSase の解析

B-1299CB4 株から DSase 遺伝子の単離と発現を行い、組換え酵素の性質（pH、温度や重金属の影響）を解明した。触媒残基を D530、E568 と D641 と推定した。本 DSase に存在する保存領域 II の 2 アミノ酸と領域 IV の 3 アミノ酸をレウテランスクラーラーゼ型に変異させた。S642N/E643N/V644S および V532P/V535I/S642N/E643N/V644S は親酵素と異なる反応を示した。 α -1,6 や α -1,4 結合からなるオリゴ糖や難溶性 DXT を生産した。前者は α -1,3 結合を有し後者はさらに α -1,4 結合も含むことが認められた。領域 II と IV に生成物特異性を決定する構造エレメントが存在すると推定した。

(4) *L. starkeyi* KSM22 由来 DXase の解析

DXase 遺伝子を単離し、染色体に単一に存在することが確認した。異種宿主発現で得られた組換え酵素の性質を調べた。重金属イオンや SDS に対し安定な酵素であった。DXT の他に可溶性澱粉やムタンにも分解活性を示した。異種宿主発現に成功したことから α -1,4 結合と α -1,6 結合に作用できる DXase の大量供給が可能になった。

以上のように本研究は、ショ糖を基質とする多糖合成酵素やその合成多糖である DXT の分解酵素について構造と機能を明らかにしたものである。いずれの酵素もユニークな性質を示しており、ショ糖の利用形態に新たな提案を行っている。特に、微量活性であった FSase をレバンスクララー

ぜと決定し、DSase において分岐型 DXT を与える構造エレメントを明らかにした点は学術的に重要な基礎的知見である。 α -1,4 結合と α -1,6 結合を分解できる DXase などいずれも産業利用に貢献できる酵素について大量供給を可能にした。

よって審査員一同は、Hee-Kyoung Kang 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。