

学位論文題名

Studies on  $\beta$ -fructofuranosidase from  
*Arthrobacter globiformis* IFO 3062

(*Arthrobacter globiformis* IFO 3062 の生産する  
 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼに関する研究)

学位論文内容の要旨

フルクトースを含むオリゴ糖(フルクトオリゴ糖, FOS)は難消化性糖質であり、天然には、アスパラガスやキクイモなどの根に蓄積していることが知られている。FOSは、整腸作用、ミネラル吸収促進、血中脂質低減などの機能を有することが報告されており、近年、腸内環境を整えるプレバイオティクスとしても注目されている。工業的には、スクロースにフルクトースを転移する酵素(フルクトシルトランスフェラーゼ; EC 2.4.1.9 and 2.4.1.10; FTase)を作用させて製造している。この場合、FTase反応の受容体はフルクトースを含む糖に限られる。そこで本研究では、様々な糖を受容体として利用できる可能性をもつフルクトース転移酵素として、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ(EC 3.2.1.26; FFase)に着目した。本酵素はスクロースの $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-グルコシド結合に作用し、 $\alpha$ -グルコースおよび $\beta$ -フルクトースを反応産物として与えるアノマー保持型の加水分解反応を触媒するが、高濃度の受容体となる糖の存在下ではフルクトース転移反応も触媒する。これまでに種々の原核生物および真核生物からFFaseが精製され、その酵素化学的性質が調べられてきた。しかしながら、FFaseの触媒活性に関わる活性残基やフルクトース転移反応のメカニズムは明らかにされていない。*Arthrobacter globiformis* IFO 3062はグラム陽性細菌であり、菌体外にFFaseを生産することが知られている。本研究では、*A. globiformis* IFO 3062のFFaseを精製し、その酵素化学的特性を検討した。また、FFaseコードする遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いた大量発現系を確立した。さらに部位特異的変異法を用い、活性の保持に重要な3つのアミノ酸残基を同定するとともに、フルクトース転移反応に大きく影響するアミノ酸を見出した。

*A. globiformis* IFO 3062由来FFase(AgFF)は、DEAE-Toyopearl 650Mを用いた一段階の精製により行ない、3 Lの菌体培養上清から53.6 mgの精製酵素を得た。本酵素の比活性は113 U/mg、精製倍率は約100倍であった。SDS-PAGE的に単一にまで精製され、その分子量は約60 kDaであった。pH安定域は5.5 ~ 9.5、および温度安定性は40°C以下で80%以上の活性を保持した。

タンパク質の構造と機能の関係を理解するためには、そのタンパク質をコードする遺伝子のクローニングと異種宿主を用いた大量発現系の確立は不可欠である。本研究においても、活性残基の同定を目的としたクローニングおよび大腸菌発現系の構築を行なった。AgFFをコードする遺伝子(*agff*)のクローニングはPCRを用いて行なった。CAZy(carbohydrate-active enzymes)では、生物界に広く存在する糖質関連酵素をアミノ

酸配列の相同性に基づいて4つのファミリーに分類している。FFase はその中の glycoside hydrolase (GH) family 68 に属している。PCR に用いた Primer は GH family 68 に属する複数の酵素のアミノ酸配列を比較し、高度に保存された領域から設計した。A. globiformis IFO 3062 から抽出したゲノム DNA を鋳型とし、PCR を行なった。得られた *agff* 遺伝子の部分配列をもとに新たに primer を合成し、direct sequence をすることで全塩基配列の情報を得た。クローニングされた DNA 断片は、548 アミノ酸残基をコードする 1647 bp の open reading frame を含んでいた。このアミノ酸配列は、*Arthrobacter* sp. K-1 由来 FFase と 66% の同一性、74% の相同性、*B. subtilis* 由来 levansucrase と 24% の同一性、39% の相同性を示した。A. globiformis IFO 3062 の培養上清から精製された FFase の N 末端アミノ酸配列が確認されたことから本遺伝子が AgFF をコードするものと判断した。大腸菌発現系は、pET システムを用い His-Tag 融合タンパク質として発現し、組換え酵素 (rAgFF) の精製はニッケルアフィニティクロマトグラフィーによって行なった。単一に精製された rAgFF の酵素化学的性質は、菌体より精製された酵素と全く同じ性質を示したことから、His-Tag による構造への影響は限定的なものであり、その後の部位特異的変異等の評価には影響しないと判断した。

AgFF の触媒残基を同定するために部位特異的変異酵素の解析を行なった。これまでに *B. subtilis* 由来 levansucrase において立体構造解析が行なわれており、触媒残基および活性保持に重要なアミノ酸残基 (stabilizer) の同定がなされている。AgFF と複数の levansucrase の相同配列の比較から、levansucrase における活性に重要な残基 D86, D247, および E342 (このうち触媒残基は D86 および E342, stabilizer は D247) に相当するアミノ酸 D130, D306 および E392 が見出された。これら 3 つのアミノ酸をアラニンに置換した D130A, D306A および E392A 変異酵素を作製した。発現酵素の解析から D130A および E392A の活性は完全に失われ、levansucrase と同様に、これらのアミノ酸残基が AgFF において触媒を担うものと判断された。しかしながら、D306A においては、野生型酵素の約 50% の活性を保持していた。このことは levansucrase の D247 に相当する別のアミノ酸が存在することを示唆していた。近年、*Gluconacetobacter diazotrophicus* 由来 levansucrase の立体構造が新たに解析された。この構造をテンプレートにモデル構造解析を行なった結果、触媒残基近傍に新たに D300 を見出した。さらにこのアミノ酸は既知の FFase および levansucrase に完全に保存されていた。アラニン置換体である D300A の解析から、本変異酵素は完全に活性を失うことが明らかとなり、AgFF においては D300 が stabilizer として機能することが示唆された。

また、Chambert と Petit-Glatron は、*B. subtilis* 由来 levansucrase において 331 番目のアルギニン残基にリジン、ロイシン、セリン等の変異を導入することで、フルクトース-酵素複合体形成の効率が低下することを示している。アミノ酸配列の比較から AgFF においては、410 番目のヒスチジンが R331 に相当したことから、当該アミノ酸残基をアルギニンおよびリジンに置換した変異酵素を作製した。両変異酵素はともに、スクロースに対する親和性が野生型酵素と比較し、約 100 倍と大幅な低下を示した。このことは、*B. subtilis* 由来 levansucrase と同様に AgFF の H410 はフルクトース-酵素複合体形成に重要なアミノ酸残基であると考えられる。さらに TLC によるこれら変異酵素の反応産物の解析から、セロビオースを糖受容体として添加した場合、野生型酵素あるいは他の変異酵素には見られない新たな反応産物が確認された。既に、AgFF が生産するセロビオースを糖受容体する新規オリゴ糖として O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-α-D-glucopyranosyl-(1→2)-α,β-D-fructofuranoside を同定しているが、本変異酵素における反応産物はこれとは明らかに異なる移動度を示す結果となった。この化合物については現

在解析中であり同定には至っていないが、新規オリゴ糖が生成されたものと期待される。さらにこの結果は、H410 はフルクトース転移反応様式において鍵となる重要なアミノ酸残基であることを示している。

# 学位論文審査の要旨

|    |     |      |
|----|-----|------|
| 主査 | 教授  | 松井博和 |
| 副査 | 教授  | 木村淳夫 |
| 副査 | 准教授 | 伊藤浩之 |
| 副査 | 助教  | 濱田茂樹 |

学位論文題名

## Studies on $\beta$ -fructofuranosidase from *Arthrobacter globiformis* IFO 3062

(*Arthrobacter globiformis* IFO 3062 の生産する  
 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼに関する研究)

本論文は、図 24、表 7、引用文献 85 を含み、6 章からなる総ページ 86 の英文論文である。別に参考論文 2 編が添えられている。

フルクトオリゴ糖は難消化性糖質であり、整腸作用、ミネラル吸収促進、血中脂質低減などの機能を有することが報告されており、近年、腸内環境を整えるプレバイオティクスとしても注目されている。工業的には、スクロースにフルクトースを転移する酵素（フルクトシルトランスフェラーゼ；EC 2.4.1.9 and 2.4.1.10）を作用させて製造しているが、受容体はフルクトースを含む糖に限られる。そこで本研究では、様々な糖を受容体として利用できる可能性をもつフルクトース転移酵素として、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ（EC 3.2.1.26; FFase）に着目した。これまでに種々の原核および真核生物から FFase が精製され、その酵素化学的性質が調べられてきた。しかしながら、FFase の触媒活性に関わる活性残基やフルクトース転移反応のメカニズムは明らかにされていない。本研究では、*Arthrobacter globiformis* IFO 3062 由来の FFase を精製し、その酵素化学的性質を検討した。また、FFase をコードする遺伝子をクローニングし、活性の保持に重要なアミノ酸残基を見いだした。

*A. globiformis* IFO 3062 由来 FFase (AgFF) の精製は、DEAE-Toyopearl 650M を用いた一段階のカラムクロマトグラフィーにより行い、3 L の菌体培養上清から 53.6 mg の精製酵素を得た。精製酵素の比活性は 113 U/mg、精製倍率は約 100 倍であった。SDS-PAGE 的に均一な標品として精製され、その分子質量は約 62 kDa であった。pH 安定域は 5.5-9.5 であり、また、40°C 以下の温度で 15 分間保持した後も 80% 以上の活性を示した。さらに、スクロース加水分解反応における  $K_m$  および  $V_{max}$  値は、5.2 mM ならびに 256  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$  であった。

これまでに明らかにされた FFase の一次構造から、本酵素は glycoside hydrolase family 68 (GH68) に属することが明らかにされている。AgFF をコードする遺伝子を単

離する目的で、GH68 の複数の酵素の一次構造を比較し、高度に保存された領域から primer を設計した。これを用いて *A. globiformis* IFO 3062 のゲノム DNA を鋳型とした PCR を行った。クローニングした DNA 断片は、548 アミノ酸残基をコードする 1647 bp の open reading frame を含んでいた。この推定アミノ酸配列は、*Arthrobacter* sp. K-1 由来 FFase と 66% の同一性、74% の類似性を、*Bacillus subtilis* 由来 levansucrase (BsLS) と 24% の同一性、39% の類似性を示した。*A. globiformis* IFO 3062 より精製した AgFF の N 末端アミノ酸配列が推定アミノ酸配列に含まれていたことから、単離した遺伝子断片が AgFF をコードするものと判断した。組換え酵素 (rAgFF) は、pET システムを用いた His-tag 融合タンパク質として大腸菌で発現し、ニッケルアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。精製された rAgFF は、AgFF と全く同じ酵素特性を示したことから、His-tag 付加によるタンパク質構造への影響は限定的なものであり、その後の部位特異的変異などの評価には影響しないと判断した。

AgFF の触媒残基を同定するために部位特異的変異酵素の解析を行った。AgFF と複数の levansucrase の一次構造の比較、ならびに BsLS の立体構造を鋳型とした AgFF の構造モデルから、BsLS の触媒活性に重要な 3 つの残基、D86、D247 および E342 (D86 と E342 は触媒残基、D247 は stabilizer) が AgFF の D130、D306 および E392 に相当することが明らかとなった。これらのアミノ酸をアラニンに置換した D130A、D306A および E392A 変異酵素を作製したところ、D130A および E392A は活性は完全に失われ、BsLS と同様にこれらのアミノ酸が AgFF の触媒を担うと考えられた。しかしながら、D306A は野生型酵素の約 50% の活性を示したため、BsLS の D247 に相当する別のアミノ酸残基の存在が示唆された。ごく最近、*Gluconacetobacter diazotrophicus* 由来 levansucrase の立体構造が新たに解析された。この構造を鋳型とした AgFF の構造モデルを作製したところ、BsLS の D247 に相当すると考えられる D300 が新たに見いだされた。アラニン置換体である D300A の解析から、この変異酵素は完全に活性を失うことが明らかとなり、AgFF において D300 は stabilizer として機能することが示唆された。

BsLS では、331 番目のアルギニン残基がフルクトース-酵素複合体形成に関与することが知られている。アミノ酸配列の比較および構造モデルから、BsLS の R331 は AgFF の 410 番目のヒスチジン残基に相当したため、当該アミノ酸残基をアルギニンおよびリジンに置換した変異酵素を作製した。両変異酵素ともに、スクロースに対する親和性が野生型酵素の約 100 分の 1 に低下した。このことから、AgFF の H410 は BsLS R331 と同様の機能をもつと推定された。さらに、両変異酵素の反応産物の解析から、セロビオースを糖受容体として添加した場合、野生型酵素や他の変異酵素では見られない新たな反応産物の生成が認められた。これらのことは、AgFF の H410 がフルクトース転移反応において鍵となるアミノ酸残基であることを示している。

本研究では、*A. globiformis* IFO 3062 より FFase を精製し、本酵素をコードする遺伝子の単離、異種宿主大量発現に成功した。また、部位特異的変異酵素の解析から、FFase における活性残基の同定に初めて成功した。さらに、立体構造モデルの作製と変異酵素の解析から、stabilizer として機能するアミノ酸残基を推定し、実証した。加えて、AgFF のフルクトース転移に重要なアミノ酸残基を同定した。これらの知見は学術的のみならず、本酵素を用いた新規オリゴ糖創製などの応用面においても大いに貢献するものと判断した。

よって、審査員一同は、Yuyus Kusnadi 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。