

学位論文題名

Biochemical characterization and primary structure analysis of a liquefying α -amylase, AmyL, from thermoalkalophilic bacterium, *Bacillus* sp. AAH-31

(耐熱性アルカリ細菌 *Bacillus* sp. AAH-31 由来 α -アミラーゼ(AmyL)の生化学的諸性質と一次構造の解析)

学位論文内容の要旨

α -Amylase (EC 3.2.1.1) hydrolyzes an internal α -1,4-glucosidic linkage of starch, glycogen, and related glucans with net retention of the anomeric configuration, and this enzyme is widely distributed in microorganisms, plants, and animals. Bacterial α -amylases, which are able to be easily produced in large quantity with low cost, are applied in various areas. Particularly, alkalophilic enzymes are useful as additives in dishwashing and laundry detergents to remove food residues on dishes and food stains on clothes respectively. The demand of α -amylase for automatic dishwashing detergents has been growing for a decade. In contrast to enzymes for laundry detergents, enzymes for automatic dishwashing detergents are required to be fully thermostable at high pH, because an automatic dishwasher operates at high pH at above 60°C. But known liquefying α -amylases are insufficient in terms of thermostability. In this study, we screened a thermostable alkaline liquefying α -amylase with high resistance against chelating reagents from soil bacteria, and successfully obtained an enzyme with required properties from isolated *Bacillus* sp. AAH-31.

1. Screening and isolation of a bacterium producing a thermophilic alkaline liquefying α -amylase.

Twenty colonies of soil bacteria forming pink halos on an alkaline blue starch plate supplemented with phenolphthalein, indicating that the bacteria produce α -amylase, were cultured in alkaline starch medium at 50°C. The starch degrading enzymes in the culture supernatants were assessed by measuring production of reducing sugar and decrease of iodine-staining power. Liquefying type α -amylases were found in the culture supernatants of around half of samples. Activity of the culture supernatant of the AAH-31 strain was the highest of those of the bacteria producing liquefying α -amylases, and was not reduced by the addition of a chelating reagent, sodium tripolyphosphate.

Thus AAH-31 was selected for further analysis. Partial sequence of 16S rDNA of AAH-31 was completely indented to that of *Bacillus* sp. TX3 (Genbank accession, AB043863). Consequently AAH-31 strain was designated as *Bacillus* sp. AAH-31.

2. Purification of α -amylase from *Bacillus* sp. AAH-31 (AmyL).

Bacillus sp. AAH-31 was cultured at 50°C in the alkaline starch medium to produce AmyL. Enzyme activity of the culture supernatant was increased along with bacterial growth up to 65 h, and not changed by further incubation. The culture supernatant was harvested at 72 h, and 1,250 U of enzyme was obtained. AmyL was purified to homogeneity by seven steps. Purified enzyme of 7.6 mg, specific activity of which was 16.7 U/mg, was yielded. Recovery of the purified enzyme from the crude extract was 10%. Purified AmyL gave a single band of 96 kDa on SDS-PAGE. Mobility of the protein band on native PAGE coincided with that of active band in the zymogram. AmyL showed a molecular mass higher than known alkaline liquefying α -amylases from *Bacillus* species.

3. Characterizations of AmyL.

The optimum pH and temperature of AmyL were 8.5 and 70°C respectively. AmyL was stable in a pH range of 6.4-10.3 and below 60°C. Calcium ion did not affect its thermostability unlike typical α -amylase. AmyL retained 85% of activity after incubation at 60°C for 1 h in the presence of EDTA. It was fully stable in 10 mg/mL of Tween 20, Tween 80, and Triton X-100, and 1 mg/mL of SDS. This enzyme had higher activity to amylose than to amylopectin and glycogen. Its hydrolytic activity to γ -cyclodextrin was as high as to short-chain amylose. Maltotriose is the minimum substrate of AmyL, and maltose and maltotriose accumulated in the reaction to maltooligosaccharides longer than maltotriose and soluble starch.

4. Amino acid sequence analysis of AmyL.

The AmyL gene was obtained by PCR method, in which degenerated primers designed from the partially amino acid sequences were used. AmyL contained 821 amino acids including an N-terminal signal sequence consisting of 28 residues. Four conserved regions of glycoside hydrolase family 13, forming the catalytic site, were found. N-terminal region of AmyL showed low similarity to carbohydrate binding module (CBM) 20, involved in binding to starch granule. Tryptophan residues conserved in binding sites 1 and 2 of CBM20 are found in the N-terminal region of AmyL.

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	松 井 博 和
副 査	教 授	横 田 篤
副 査	准教授	森 春 英
副 査	助 教	佐分利 亘

学 位 論 文 題 名

Biochemical characterization and primary structure analysis of a liquefying α -amylase, AmyL, from thermoalkalophilic bacterium, *Bacillus* sp. AAH-31

(耐熱性アルカリ細菌 *Bacillus* sp. AAH-31 由来 α -アミラーゼ(AmyL)の
生化学的諸性質と一次構造の解析)

本論文は英文 89 頁, 図 34, 表 12, 5 章からなり, 参考論文 1 編が付されている。

α -アミラーゼは, 澱粉加水分解酵素として古くからよく知られており, 食品, 製紙, 洗剤など様々な分野で広く利用されている。アルカリ細菌が発見されて以来, 当該細菌が生産する α -アミラーゼは, 澱粉汚れを除去する目的で洗剤添加剤として応用されている。一般に α -アミラーゼは構造の維持にカルシウムイオンを要求する金属タンパク質であるため, 洗剤では洗浄効果を高めるためのキレート剤との相性が悪く, キレート剤への高い耐性を持つ酵素が望まれている。

近年, 急速に自動食器洗浄機が急速に普及してきている。当該機器は, 60°C 程度の高温で運転されるため, 使用洗剤に α -アミラーゼを添加する場合, 耐アルカリ性, 耐キレート剤に加えて耐熱性が要求される。このような高い耐性を持つ酵素はこれまでに知られておらず, 既存酵素では対応できない。本研究は, 土壌細菌より上記耐性を併せ持つ酵素を探索し, 諸性質ならびに一次構造を纏めたものである。

1) 土壌細菌からの酵素生産菌のスクリーニング

茨城県内の水田より採取した土壌を 80°C にて 30 分間熱処理した後, フェノールフタレイン, ブルースターチ含有アルカリ性寒天培地に植菌し, 55°C にて培養した。本培地では, 澱粉分解酵素を分泌する細菌のコロニーはハロを形成するが, ハロの色が α -アミラーゼ生産菌ではピンク, シクロデキストリン合成酵素 (CGTase) の場合は無色 (フェノールフタレインがシクロデキストリンによって包接されるため, アルカリ細菌の多くが CGTase を生産する) となる。このように得られた α -アミラーゼ生産菌のうち 20 株を選択し, これらの培養上清を澱粉に作用させた。還元糖生成量とヨウ素価減少量を測定し, 最も酵素活性が高く, かつ液化型酵素 (ヨウ素価減少量が高い) を生産する AAH-31 株を選択した。AAH-31 株の 16S rDNA の部分配列は *Bacillus* sp. TX3 の相当配列と完全に一致したため, *Bacillus* sp. AAH-31 株とした。

2) 酵素の精製と諸性質

Bacillus sp. AAH-31 株の培養上清 8.8 L より酵素の精製を行った。硫酸沈殿を行った後、6 段階のカラムクロマトグラフィーにより回収率 10% で比活性 16.7 U/mg の精製酵素を 7.6 mg 得た (AmyL)。SDS-PAGE の結果から 91 kDa と見積もられ、既知のアルカリ α -アミラーゼより高分子量の酵素であることが判明した。pH 8.5 および 70°C で最大活性を示し、pH 6.4-10.3, 60°C 以下で安定であった。温度安定性にカルシウムイオンは影響しなかった。EDTA、ニトリロ三酢酸およびトリポリリン酸といったキレート剤、SDS, Triton X-100, Tween 20 および Tween80 などの界面活性剤、市販洗剤存在下でも高い安定性を示した。以上のことから AmyL はアルカリ pH で高活性を持ち、高い熱安定性および高いキレート剤耐性を併せ持つ酵素であることが明らかになった。

AmyL は可溶性デンプンに加えて、 γ -シクロデキストリンにも高い活性 (可溶性デンプンの 70% 程度) を示した。当該基質に作用しない既知のアルカリ α -アミラーゼとは、異なる特異性であった。各種重合度のマルトオリゴ糖への反応では、三糖以上の基質を分解すること、加水分解により三糖および二糖が主として生成することが明らかになった。以上のスクリーニングから酵素の精製と諸性質の解析までが *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 誌, 76 巻, pp1378-1383 に掲載された。

3) AmyL 遺伝子のクローニングと一次構造の解析

精製酵素の N 末端配列ならびに内部部分配列を基に設計したプライマーを用いた PCR により AmyL 遺伝子の一部を取得した。本 DNA 断片の配列を用いて逆 PCR を行い、AmyL 遺伝子の全長配列を取得した。AmyL 遺伝子は 2,466 bp からなり 821 アミノ酸をコードしていた。精製酵素で解析した N 末端配列が 29 番目のアミノ酸からの配列に一致したことから、N 末端側 28 残基がシグナルペプチドであると推定された。解析されたすべての内部部分配列も見出された。推定アミノ酸配列にはグリコシドヒドロラーゼファミリー 13 に保存される 4 つの保存領域全てが見出され、当該ファミリー中では *Thermoactinomyces vulgaris* 由来 α -アミラーゼアイソザイム I (TVAI) に高い配列類似性を示した。TVAI はプルランを分解してパノースを生じるネオプルラーゼ活性を示すが、AmyL はプルランを分解しなかった。また、AmyL の N 末端領域には TVAI を含むネオプルラーゼ様 α -アミラーゼとは異なり、炭水化物結合モジュールが見出された。これらのことから、AmyL は既存酵素との類似点は認められるものの、新規なドメイン構成を持つ酵素であることが判明した。

よって審査員一同は、Kim Dae-Hoon 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。