

# 博士學位論文

内容の要旨

及び

審査の結果の要旨

第 12 集

平成 27 年度  
(2015 年度)

実践女子大学

## は し が き

本篇は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条による公表を目的として、平成28年3月20日日本学において学位を授与した者の、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を収録したものである。

学位記番号に付した甲は、学位規則第4条第1項（いわゆる課程博士）によるものであることを示す。

## 目 次

課程の修了によるもの（課程博士）

甲第6号 博士(食物栄養学) 荒 木 紀 美 . . . . . 3

*Bacillus circulans* G22-10 変異株による  $\alpha$ -グルカナーゼの生産と  
その精製および作用特異性に関する研究

課程の修了によるもの  
(課程博士)

氏名（本籍）	荒木 紀美（神奈川県）
学位の種類	博士（食物栄養学）
学位記番号	甲第 6 号
学位所授与年月日	平成 28 年 3 月 21 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項 該当
論文題目	Bacillus circulans G22-10 変異株による $\alpha$ -グルカナーゼの 生産とその精製および作用特異性に関する研究
論文審査委員	主査 教授 小 林 幹 彦 副査 教授 秋 田 修 副査 渡 部 一 穂（実践女子大学名誉教授）

## 内容の要旨

### 【緒言】

サイクロデキストラン (CI) は、 $\alpha$ -1,6 結合の環状オリゴ糖であり、*Bacillus circulans* T-3040 株の酵素、サイ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 (サイクロデキストラン合成酵素・CITase, EC2.4.1.248) をデキストラン (DX) に作用させて合成される<sup>1,2)</sup>。グルコースが $\alpha$ -1,6 結合により環状に結合し、グルコース単位が 7 個のものを CI-7, 8 個を CI-8, 9 個を CI-9 とよぶ。この酵素と酵素が生成する環状オリゴ糖は新規に発見されたものであり、これまでに精製法やその特性などが研究され、明らかにされている<sup>3-5)</sup>。CI とサイクロデキストリン (CD) はよく似た性質を持つが、CI は CD よりも水溶性が高く、抗う蝕能を始め多くの機能性を持っている<sup>6-8)</sup>。

一方、CD は環状構造を持つ非還元性のマルトオリゴ糖で、 $\alpha$ -1,4 結合の D-グルコース残基が 6 個のものを  $\alpha$ -CD, 7 個のものを  $\beta$ -CD, 8 個のものを  $\gamma$ -CD とよぶ<sup>9)</sup>。CD は、可溶性デンプン (SST) に *Bacillus macerans* などの細菌から抽出される酵素、サイクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ (CGTase, EC2.4.1.19) を作用させて生産される。おもな特徴として、CD は環状分子内に空洞を有し、空洞の内側は疎水性を、外側は親水性を示す性質がある。そのため、空洞径に応じて空洞内部に様々な物質をゲスト分子として取り込み、安定化する作用を持つ。これを利用して、疎水性の物質を包接させ水に対する溶解を高めたり、酸化反応からの保護、香りの維持、異臭のマスキング、乳化剤などに利用されている。

最近、舟根らは、親株 *B. circulans* T-3040 から SST を基質にして CI を生産する酵素系を新たに見出し<sup>10)</sup>、さらに、*Paenibacillus* sp. 598K 由来のデキストラングルカナーゼがデンプンやマルトオリゴ糖からイソマルトオリゴ糖を生成し、同菌の CITase の作用を受けて CI に変換されることを報告している<sup>11-13)</sup>。

### 【研究目的】

本研究では、DX から CI を生成する CITase の生産菌株 *B. circulans* T-3040 株を NTG(ニトロソグアニジン)処理により調製された G22-10 変異株を使用した<sup>14)</sup>。これは T-3040 株にストレプトマイシン耐性を付与してタンパク合成能を高めることにより CITase 生産性を高めた菌株である。従って CITase 以外の酵素についても生産量が増加して検出が容易になっている可能性が高いことが考えられる。そこで本研究ではまず、この G22-10 変異株が生産する酵素について SST や DX などの基質を用いて作用性を調べたところ、 $\alpha$ -1,4 結合と  $\alpha$ -1,6 結合を有する基質を分解して還元糖を生成する活性が認められた。すなわち、CITase とは異なる作用を持つ酵素の存在が示唆されたため、この G22-10 変異株が生産す

る酵素について酵素の多形性や精製法に関して検討した。また酵素と基質との反応により生じた反応生成物の分析を行い、転移反応性に関する考察を加えた。

#### 【実験方法】

・菌株 デキストラン (DX) からサイクロデキストラン (CI) を生成するサイクロデキストラン合成酵素 (CITase) の生産菌株 *B. circulans* T-3040 株を NTG(ニトロソグアニジン) 処理で調製して得た G22-10 変異株を用いた。この菌株は、農研機構 食品総合研究所の舟根和美博士より譲っていただいた。

##### 1) 酵素の調製

酵素液の調製のために、1 %ポリペプトン、0.5 %酵母エキス、1 %塩化ナトリウムおよび、炭素源として 2 %可溶性デンプン (SST)、デキストリン (SDX)、以上、和光純薬工業 (株)、大阪) およびデキストラン (DX, MW 15,000~20,000, 名糖産業 (株)、名古屋)) を含む Luria-Bertani 培地を調製した。これに *B. circulans* G22-10 変異株を植菌して 30 °C、80~90 rpm で 7 日間振とう培養した。培養液を高速冷却遠心分離 (22,500 *xg*, 4 °C、20 min) により上清と菌体を含む沈殿に分け、上清は 100 ml ずつ透析チューブに移し、ポリビニルピロリドン K90 (和光純薬工業 (株)) で濃縮後に冷凍保存した。

##### 2) 各種測定法

酵素活性は、2 %に調製した基質 SST または DX と酵素液を等量混合し 30 °C で 20 h 反応後に、生じた還元力を Somogyi-Nelson 法を用いて波長 500 nm (以下、A500 と表示) で測定した。この反応系で 1 min に 1  $\mu$  mol のグルコース相当の還元力を生成する酵素量を 1 U とした。全糖量はフェノール硫酸法を用いて波長 490 nm (A490 と表示) で測定した。タンパク質量は 280 nm (A280 と表示) の吸光度測定、または Bradford 法により測定した。

##### 3) 酵素の多形性の解析

酵素タンパク質の分析にはポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を用いた。泳動用スラブゲルプレートは 10 %ゲルを使用し、泳動バッファーはトリス-グリシン緩衝液、または SDS トリス-グリシン緩衝液 (すべてコスモ・バイオ (株)、東京) 製を使用した。

Native-PAGE は Davis 法、SDS-PAGE は Laemmli 法を用いた。

##### 4) 酵素の精製

酵素の精製の前処理として、まず粗酵素を少量の 0.2 M ホウ酸ナトリウム緩衝液で溶解し、4 °C、一晚透析した。遠心分離後の上清にヒト由来の  $\alpha$ -amylase (35.3 U/150  $\mu$ l) を混合し、再度、30 °C で 6 h 透析処理を行い、遠心分離後の上清をカラムに供した。10 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液、pH 8.3 で平衡化した QAE-Toyopearl (TOSOH (株)、東京) カラム ( $\phi$  2.5  $\times$  40 cm) に試料を供し、前半は同緩衝液で、後半は 0 M~0.5 M 食塩のグラジエントで溶出し 6 ml ずつ 100 本を分画した。酵素活性とタンパク質量を測定した後、活

性画分を回収し、Centricon Plus-20 (MILLIPORE, cut off MW 30,000, メルク (株), 東京) を用いて濃縮した。この酵素を Sephacryl S-200 (日本 GE (株), 東京) カラム ( $\phi$  1.5×30 cm) に供し、40 mM 酢酸緩衝液, pH 5.2 で溶出し 1 ml ずつ 50 本を分画した。酵素活性とタンパク質を測定した後、活性画分を回収し、先と同様の方法で濃縮した。

#### 5) 反応生成物の調製および分析

酵素作用による反応生成物の調製には、基質として 2% に調製した SST, DX, マルトヘキサオース (M6), イソマルトヘキサオース (IM6) (以上, DX 以外は和光純薬工業 (株) 製),  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD (塩水港精糖 (株), 東京), CI-7, CI-8, CI-9 (野田産業科学研究所, 千葉, 小熊哲哉博士が調製したもの) を用いた。酵素は QAE-Toyopearl カラム分画で得られた酵素の活性画分の膜濃縮品を使用した。常法を用いて活性を測定 (A500) し、反応生成物は HPLC 分析に供した。HPLC 分析に用いた分離カラムは TSK-GEL Amide-80,  $\phi$  4.6×250 mm (TOSOH (株)) を用い、装置は高速液体クロマトグラフ、検出器は RI 示差屈折計 (日本分光 (株), 東京) を使用した。試料はフィルター処理を行ったものを 10  $\mu$ l 供し、溶媒に 55% アセトニトリルを用いて、カラム温度 25  $^{\circ}$ C, 流速 1 ml/min で溶出した。

#### 6) 至適作用 pH, pH 安定性

緩衝液はマッキルヴェイン緩衝液とリン酸緩衝液を用い、pH 2.2 から pH 10.8 の範囲の酵素活性測定を行った。安定性については、活性最大残存値を 100% とし、残存活性を求めた。

#### 7) 至適作用温度, 温度安定性

15  $^{\circ}$ C から 60  $^{\circ}$ C までの各温度の水槽を用いて、酵素活性測定を行った。pH 安定性と同様に、温度安定性については、活性最大残存値を 100% とし、残存活性を求めた。

#### 8) 基質特異性の検討

酵素は、大量培養後ポリビニルピロリドンで浸透膜濃縮し、凍結保存していたものを透析し、得られた上清を用いた。基質は  $\alpha$ -1,6 結合型の基質 7 種,  $\alpha$ -1,4 結合型の基質 10 種の糖を用いた。2% に調製した基質 90  $\mu$ l と酵素 10  $\mu$ l を混合し、30  $^{\circ}$ C で 16 h 反応させた後、生じた還元力を測定した。また、基質として SST, DX を用いて  $K_m$  値を測定した。

#### 9) 重金属, 化学修飾試薬による阻害

終濃度 1 mM に調製した 9 種の重金属, 化学修飾試薬を使用した。阻害剤を加えなかったものの活性の値を 100% とし、阻害剤を加えたときの値を残存活性 (%) で表した。

#### 10) 反応生成物の酵素分解と分析

2% に調製した SST, DX, 日食フジオリゴ G67 (以降 FG67 と記す。セントリコン膜濃縮により高分子画分を取り除いたもの, 日本食品化工 (株)) をそれぞれ基質として使用し、常法により活性測定 (A500) 後、 $\alpha$ -Amylase による前処理を行い、エタノール沈殿法により反応生成物 (高分子画分) とオリゴ糖 (低分子画分) とを分離し、再度、活性を測定した。また、GlcAmylase (pure) 用いて経時的に分解率を求めた。その後、高分子画分



について各種酵素分解を行い、再度、活性測定後に HPLC により反応生成物の分析を行った。分解に使用した各種酵素は、 $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、デキストラナーゼ、CGTase、トランスグルコシダーゼ（以上、天野エンザイム（株））、グルコアミラーゼ（pure、生化学工業（株））、プルラナーゼ、イソアミラーゼ（シグマ アルドリッチ ジャパン（株））、CITase、CITase（pure）、グルコデキストラナーゼ（食総研 舟根和美博士、北海道大学 木村敦夫教授より譲っていただいたもの）を用いた。反応生成物の NMR 分析には Bruker AVANCE 500 Ultra Shield（ブルカー・ジャパン、横浜）を用いて行い、 $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, および二次元 NMR について、国立研究開発法人 農業・食品総合産業技術総合研究機構 食品総合研究所（茨城県）の舟根和美博士、小野裕嗣博士に依頼した。

## 【結果】

### 1) *B. circulans* G22-10 変異株による酵素の生産

*B. circulans* G22-10 変異株を 3 種類の炭素源を用いて培養し、得られた培養液について遠心分離後の上清中のタンパク質、酵素活性を測定した。培養の炭素源の違いにより酵素生産量に差異が見られ、酵素の誘導性に違いがあることが分かった(表 1)。しかし、どの炭素源を用いても活性測定用の基質である SST と DX に対する作用性の比率（約 1 : 1）には大きな違いは見られず、両基質に対して同程度に作用し還元力を生成する 2 つの酵素の存在が認められた。

表 1. 粗酵素液の酵素活性

	Enzyme activity ( $\text{U} \times 10^{-4}/\text{mL}$ )		Total protein ( $\text{mg}/\text{mL}$ )	
	Substrate	Substrate	A280	
	SST	DX		
	SST	0.37	0.34	4.97
Carbon sources	SDX	0.23	0.33	15.32
	DX	0.10	0.12	3.84

The G22-10 strain was cultured with three different carbon sources, *i.e.* SST, SDX and DX. Assay of the enzyme activity was done with SST or DX as the substrate.

SST, Soluble starch; SDX, Dextrin; DX, Dextran.

## 2) 酵素の多型と夾雑多糖

酵素の精製の実験では、酵素活性が2成分以上に分離されたり、夾雑多糖が酵素活性のピークと分離されにくいなど、酵素の存在の特定の妨げとなる幾つかの障害に直面した。夾雑多糖はG22-10株の培養に用いた炭素源のSSTあるいはDXが菌による資化あるいは酵素の転移反応を受けてもとの構造が変化したものである可能性が別の実験から示唆されている。そこで、本酵素の存在形態に関する知見を得るために電気泳動による分析を行った。ホウ酸緩衝液が糖質と複合体を形成することを利用して本酵素と挙動を同じくする糖質（夾雑多糖）との分離を試みた。すなわち、0.2 M ホウ酸緩衝液に溶解した粗酵素をNative-PAGEに供した結果、複数のタンパク質バンドが得られた（図1a）。泳動したゲルを切片に切り出して酵素活性を測定したところ、基質SST、DXに作用して還元糖を生成する活性ピークが複数成分検出され、基質の種類に関わらずほぼ同位置に同程度の活性を示すことが分かった（図1b）。このように、同一の作用を示す酵素が複数成分存在し、分子量が異なることから、酵素タンパク質と上述の夾雑多糖が結合して複合体を形成し、見かけの分子量を大きくしている可能性が示唆された。そこで本酵素を、唾液 $\alpha$ -Amylaseで経時的に処理したものをSDS-PAGEに供した。その結果、高分子画分のタンパク質バンドは $\alpha$ -Amylase処理の反応時間に応じて徐々に減少し、低分子画分のバンドが増加してくることが認められた。これは、 $\alpha$ -Amylaseによって酵素タンパク質に結合していた夾雑多糖が分解され、徐々に低分子化するためと推測した。（図1c）

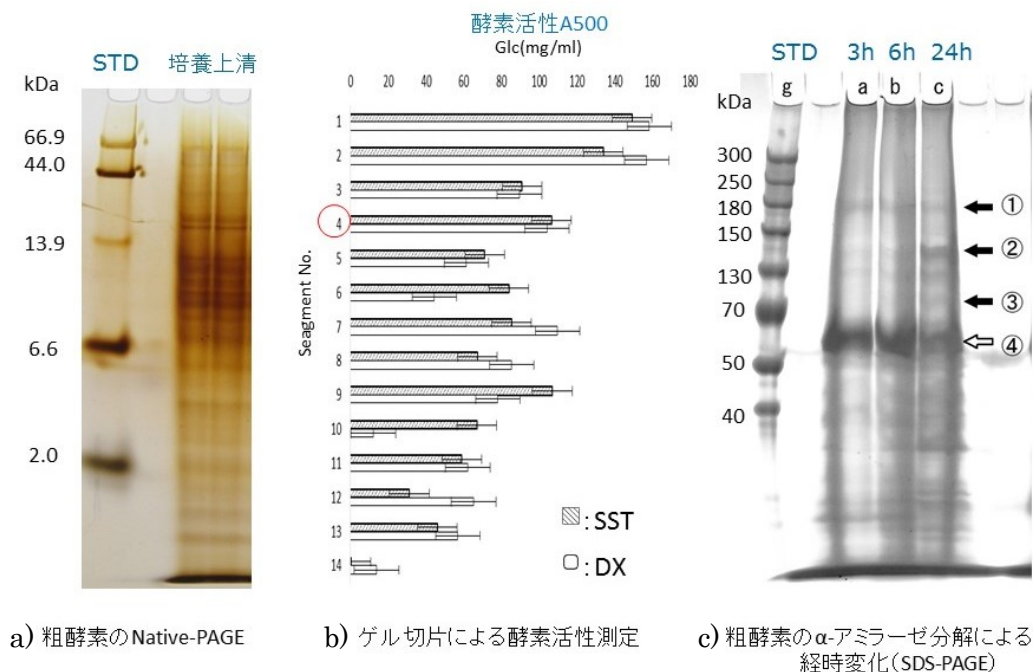


図1. 電気泳動法による酵素の多形性の分析

### 3) 酵素の精製法

本酵素を精製するために、各種のカラムクロマトグラフィーを検討した。まず、Sephadex G-25 ゲル、エピクロルヒドリンで架橋したコーンデンブングルを用いたアフィニティーカラムを行ったが、両カラムともに活性はカラムに吸着されたが、カラムの前半の素通り部分に最も大きく活性が現れており、活性画分の回収率が小さいことがわかった。ヒドロキシアパタイトのカラムで分画した実験では、SST, DX ともに同等の強さの活性ピークが得られた。これまでのカラムと比較して、活性画分の分散やロスが少なく吸着が良いといえるが、夾雑タンパク質と活性画分の分離が難しかった。疎水クロマトの Hexyl-Toyopearl で分画した結果は、先のアフィニティーカラムと同様に後半に活性が検出されたが、前半の素通り画分に、より高い活性が検出されたため、これらの精製法はさらなる検討が必要であると考えられた。DEAE-Toyopearl ゲルでは、活性ピークは素通り部分に溶出され、夾雑タンパク質との分離もできたが、メインの活性画分に見られる大量の夾雑多糖との分離は困難であった。そこで、粗酵素について、先に述べた方法でホウ酸緩衝液処理や唾液  $\alpha$ -amylase による前処理を行ったものについて QAE-Toyopearl ゲルで分画を試みた。その結果、メインの活性ピークは前半のフラクション #20 から 30 に溶出され、その他の夾雑タンパク質はカラムに吸着し、食塩を含んだ溶媒により後半部分に溶出された (図 2a)。前処理によってこれまで分離が困難であった夾雑多糖の影響も少なくなったため、活性画分を peak1 として回収、濃縮し、これをさらに Sephacryl カラムによるゲル濾過で精製した (図 2b)。メインの活性ピークはフラクション #30 前後に検出され、基質 SST, DX ともにほぼ同等の活性を示した。

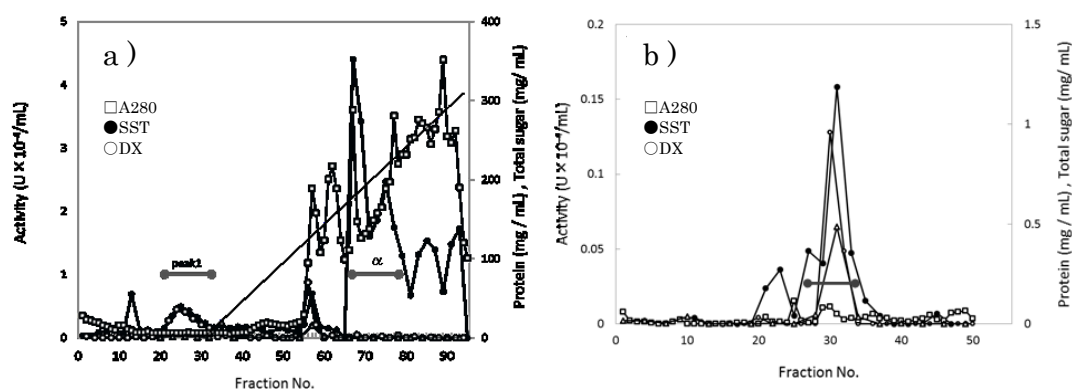


図 2. 酵素の精製カラムパターン : a) QAE-Toyopearl, b)Sephacryl S-200

### 4) 酵素の精製と純度

これまでの精製の過程を表 2 にまとめた。この表では基質 SST と DX に作用させた結果を別に表示した。G22-10 株由来の  $\alpha$ -グルカナーゼは両基質について活性収率が約 3 % となり、およそ 75 倍に精製された。基質 SST, DX の両方に同等に作用して還元糖を生成する

ことがわかり、精製の各段階においても比活性の上昇の割合や、活性収率の値に基質の種類による大きな差は見られなかった。このことから、この酵素は $\alpha$ -1,4 結合型、 $\alpha$ -1,6 結合型の 2 種の基質に対して同等の作用を示すことが明らかになった。

次に、Sephacryl カラムの活性画分を濃縮し、SDS-PAGE により分析した。銀染色により精製酵素は単一のタンパク質バンドを与えた。また、このタンパク質は検量線より分子量 52 kDa と測定された。従って本酵素は、2 つの基質に同等に作用する単一タンパク質であることが明らかになった。

表 2. 精製表 (測定には、a) 基質 SST, b) 基質 DX を用いた)

a) Soluble starch as the substrate						b) Dextran as the substrate					
	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Fold		Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Fold
Culture Supernatant	240	125	0.52	100	1	Culture Supernatant	240	80	0.33	100	1
$\alpha$ -Amylase digest	215	402	1.87	(322)	3.4	$\alpha$ -Amylase digest	215	193	0.9	(241)	2.7
QAE-Toyopearl	0.7	66	94	53	181	QAE-Toyopearl	0.7	40	57	50	172
Sephacryl S-200	0.1	4	40	3	77	Sephacryl S-200	0.1	2.4	24	3	73

##### 5) 基質特異性および酵素の反応生成物の検討

6 種類の $\alpha$ -1,4 結合型の基質 ((a) SST, (b) M6, (c)  $\gamma$ -CD), および $\alpha$ -1,6 結合型の基質 ((d) DX, (e) IM6, (f) CI-8) を用いて精製酵素と反応させ、反応生成物を検討した。生成還元糖量を測定した結果、基質の種類にかかわらず、すべての基質で還元糖を生成する酵素活性が見られた。還元糖量から算出した分解率を比較した結果、基質の種類にかかわらず、多糖、環状オリゴ糖、オリゴ糖でいずれも DH10%程度の分解率が得られた。 $\alpha$ -1,4 結合型、 $\alpha$ -1,6 結合型の基質の比較でも分解率に大きな差異は見られなかったが、 $\alpha$ -1,4 結合型のほうがやや高い値を示した。以上のように、精製酵素を用いた実験でも $\alpha$ -1,4 結合型と $\alpha$ -1,6 結合型の基質に同等に作用する酵素活性が見られたため、本酵素は異なる 2 種の酵素が混在しているのではなく、単一の酵素が 2 種の基質に対して同等に作用する活性を持つことが明らかになった。この試料を HPLC により分析した結果では、すべての基質が精製酵素による加水分解を受け、共通してグルコースのピークが検出された(図 3)。特に SST では基質の著しい低分子化が見られ、グルコースのほかにもマルトース (M2)、マルトヘキサオース (M6) などのオリゴ糖のピークが多数見られた。基質 M6 の場合にも同様に基質が低分子化され、グルコース、マルトースのピークが検出された。 $\alpha$ -1,6 型基質である DX の分解物では、グルコースのピークのほかにもマルトースと見られるピークがあり、 $\alpha$ -1,6 型基質からの生成物として $\alpha$ -1,4 結合のオリゴ糖が検出された。IM6 の分解物も良

く似ており、グルコース、マルトースのピークが検出された。このことより、 $\alpha$ -1,6 型の基質を分解して生産されたグルコースが、 $\alpha$ -1,4 型に再配列されている可能性が示唆された。さらに  $\gamma$ -CD、CI-8 に作用させた結果では、グルコースのほかにマルトオリゴ糖が生成され、本酵素が作用して多様な反応生成物ができていることが示唆された。また、これらの環状オリゴ糖が分解を受けたことから本酵素がエンド型の作用を持つことが分かった。以上の結果から、本酵素は基質として  $\alpha$ -1,4 結合型にも  $\alpha$ -1,6 結合型にも作用することが明らかとなった。そこで本酵素をアミラーゼとデキストラナーゼの性質をあわせ持つ  $\alpha$ -グルカナナーゼと定義した。さらに、本酵素は両結合を水解するだけでなく、転移反応によって新たに  $\alpha$ -1,4、 $\alpha$ -1,6 結合を生成する作用を有することも示唆された。

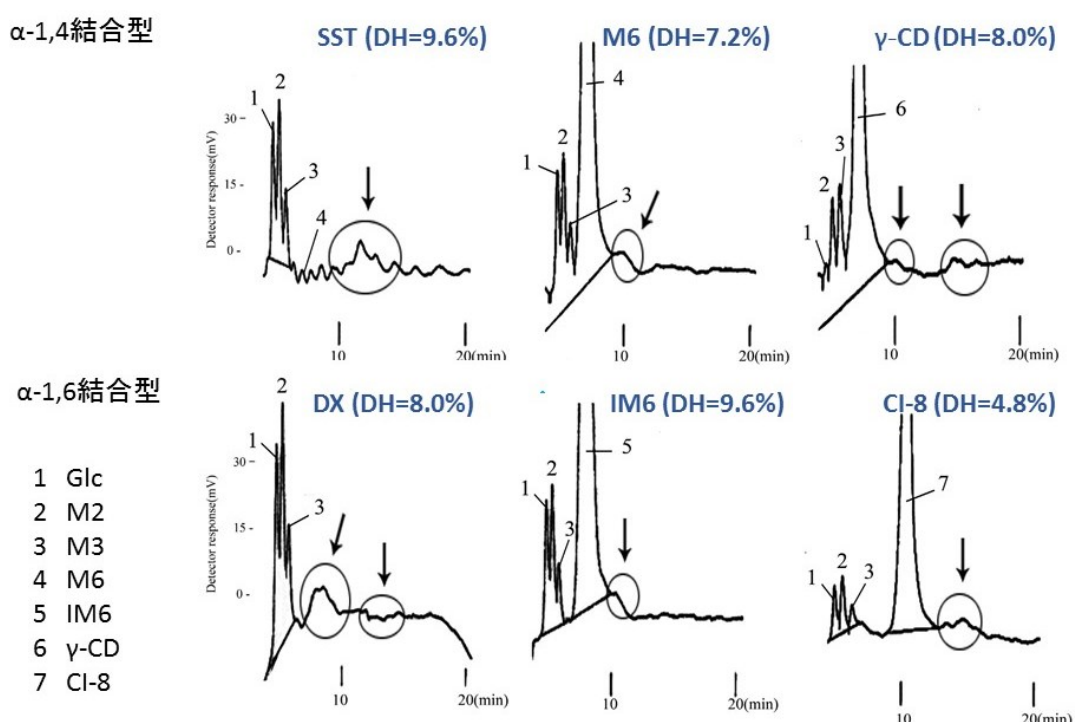


図 3. G22-10 株精製酵素による反応生成物の HPLC 分析

#### 6) 酵素化学的性質

この酵素液の至適作用 pH は pH 7.5 付近であり、pH 安定性は pH 6.5 から pH 7.5 の範囲であった。至適温度は 30 °C、安定温度範囲は 15 °C から 30 °C 付近までは 80 % 程度の活性を保持できるが、それ以上になると急激に活性は失われた。

次に、各種基質と反応させ、その活性を比較した結果、 $\alpha$ -1,6 結合型系、 $\alpha$ -1,4 結合型系ともに還元力を生成する活性が認められた。また、基質として SST、DX を用いて  $K_m$  および最大反応速度 ( $V_{max}$ ) を求めた結果、DX、SST ともに同程度の親和性を示し、FG67 ではやや高い親和性を示した。したがって、本酵素は  $\alpha$ -1,6 結合型の基質と  $\alpha$ -1,4 結合型の

基質に同等の親和性があると考えられる。また、 $V_{max}$ で見ると DX が最も高い値となり、活性が強いことがわかった。重金属、化学修飾試薬による阻害では、SST では硝酸コバルト、硫酸マグネシウム、塩化カルシウムで賦活作用が見られ、硫酸銅、硫酸第一鉄では顕著に活性が失われた。DX では塩化カルシウム、DTT で若干の賦活作用が見られ、EDTA では阻害が見られた。

#### 7) 反応生成物の酵素分解

3種の基質を用いて調製した反応生成物の構造を調べるために各種の加水分解酵素と反応させ、HPLCにて分析した。その結果、基質 FG67 からの反応生成物は  $\alpha$ -Amylase では分解を受けなかったのに対して、デキストラナーゼでは分解され、イソマルトオリゴ糖のピークが検出されたことから、この反応生成物は  $\alpha$ -1,6 結合を含むデキストラン類似の構造を持っていると考えられた。また、この両酵素を同時に作用させた場合は、デキストラナーゼ単独で作用させた場合よりもオリゴ糖が多く検出されたことから  $\alpha$ -1,4 結合が何らかの形で存在している可能性が推測された。グルコデキストラナーゼで分解したチャートは基質の種類に関わらずよく似たピークを示した。このことは基質デキストランの反応生成物に  $\alpha$ -1,4 型が含まれていることを示唆している。プルラナーゼ、イソアミラーゼで分解した結果も同様に、基質デキストランの反応生成物からイソマルトオリゴ糖に相当する多数のピークが検出された。以上の結果から、本酵素が各種の基質に作用して生じた反応生成物は  $\alpha$ -1,6 と  $\alpha$ -1,4 結合が新たに形成された構造を持つことが推定された。

#### 8) 反応生成物の NMR 分析

反応生成物を  $^{13}\text{C}$  NMR にて、STD として  $\alpha$ -1,4 結合型の SDX と  $\alpha$ -1,6 結合型の DX を用いて反応生成物と比較した。その結果、反応生成物のチャートには基質由来の  $\alpha$ -1,4 結合のほかに、デキストランタイプの  $\alpha$ -1,6 結合も含まれていることが分かった(図 4)。

また、 $^1\text{H}$  NMR の結果では、STD のケミカルシフト 5.4 の位置に  $\alpha$ -1,4 結合、ケミカルシフト 4.95 の位置に  $\alpha$ -1,6 結合を示す高いシグナルがそれぞれに現れた。また、2次元 NMR の結果からこの酵素は  $\alpha$ -1,4 結合している基質に作用して、 $\alpha$ -1,6 結合の分岐が生成していることが分かった。しかしながら、 $\alpha$ -1,6 結合の直鎖状構造に相当するスペクトルは確認されなかったため、本酵素は転移反応によって短鎖の  $\alpha$ -1,4、 $\alpha$ -1,6 結合を生成することが推察された(図 5)。二次元 NMR のチャートから、FG67 由来の反応生成物に  $\alpha$ -1,6 結合のピークがあるものの、シグナルとして検出されていないため、 $\alpha$ -1,6 結合の直鎖は 4 個未満であることが分かった。つまり、オリゴ糖分子に  $\alpha$ -1,6 結合の枝がついており、これは直鎖状に伸びてはいない。また、この分岐は還元末端に由来しない、直鎖の途中に結合している可能性が高いといえる。ピークエリアから、 $\alpha$ -1,4 結合と  $\alpha$ -1,6 結合の強度比を算出したところ、5.7 : 1 となった。反応生成物の分子量は大きく、原料の  $\alpha$ -1,4 結合のオリゴ糖分子

がオリゴ糖のまま  $\alpha$ -1,6 結合しており、基質として用いた FG67 よりも高分子になり、糖の数でいうと重合度 15~16 程度のもので生成されていると推察された。

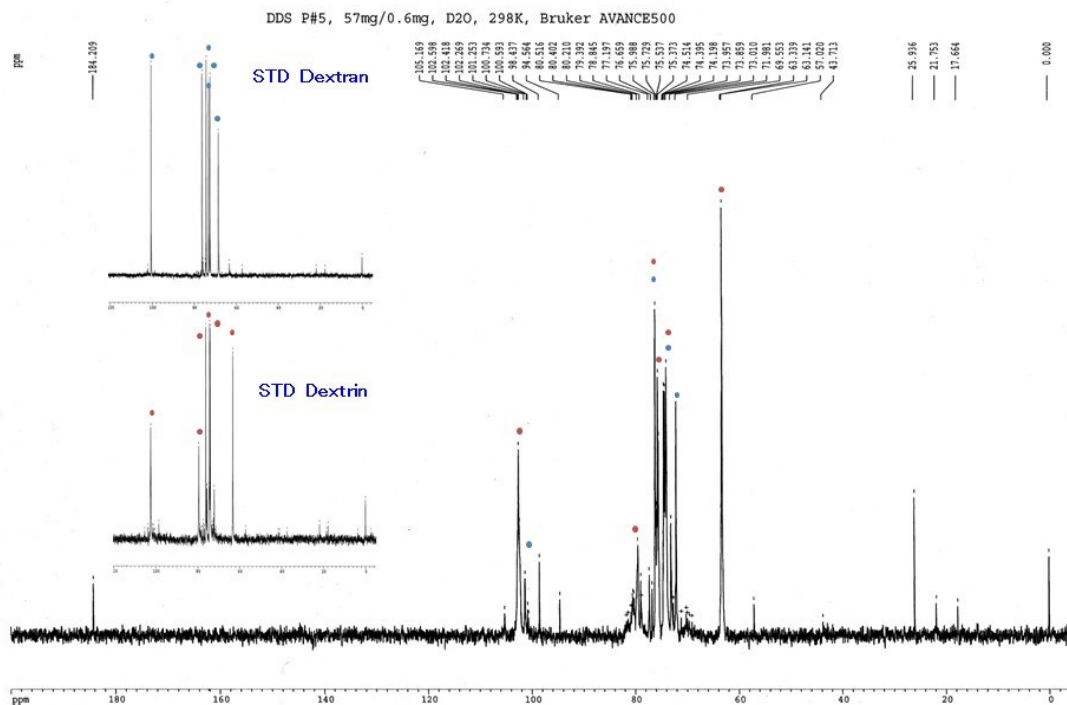


図 4. 反応生成物の  $^{13}\text{C}$  NMR

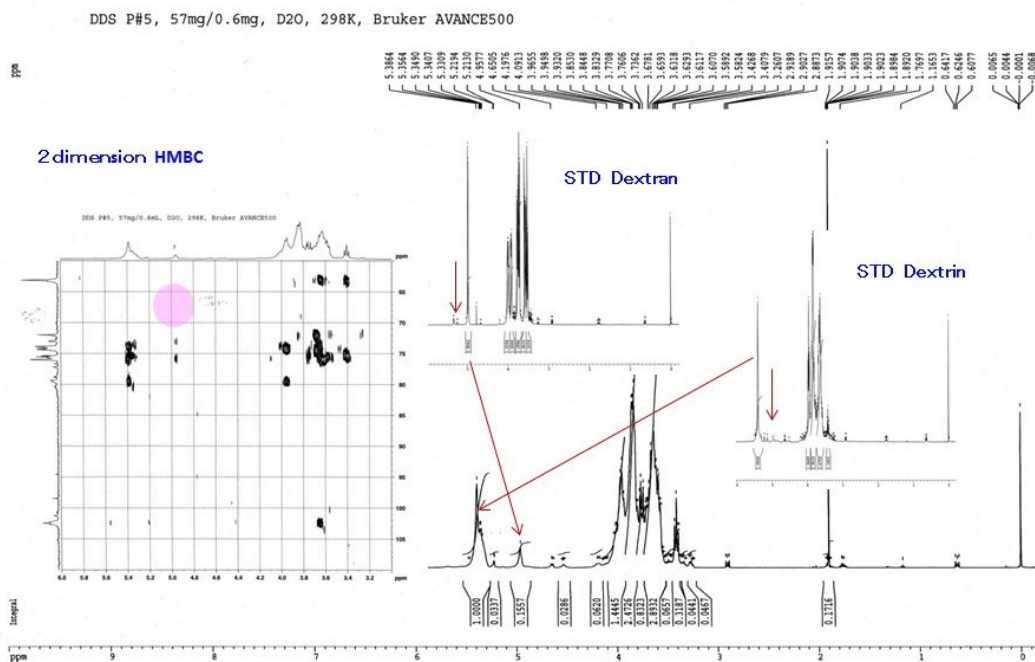


図 5. 反応生成物の  $^1\text{H}$  NMR

## 【考察】

本研究は当初, G22-10 変異株の親株である *B. circulans* T-3040 が持つ性質を踏まえて, 澱粉から CI を産生する酵素が存在する可能性が示唆されたことから, 1949 年に Hehre が報告したデンプンからデキストランを生成する酵素, デキストリンデキストラナーゼを想定して研究を始めた<sup>15)</sup>。デキストリンデキストラナーゼに関してはこれまでも報告が 1990 年代にある<sup>16-19)</sup>。しかし, 酵素反応生成物の構造解析の結果からこの酵素の可能性は否定的と結論され, さらに新たな酵素の作用を想定して研究を進めた。

最近の研究では, デンプンに作用して  $\alpha$ -1,4 結合の他に  $\alpha$ -1,6 結合の直鎖と  $\alpha$ -1,3 結合で分岐したグルカンを生成する *Paenibacillus* 由来の 2 種類の酵素の存在が報告されている<sup>20)</sup>。G22-10 変異株の CITase は弱く, CI の生産量は少なかったが, 基質の SST, DX に対して共に同程度の加水分解活性を示した。そこで, この酵素溶液を QAE-Toyopearl および Sphacryl S-200 カラムを用いて精製し, 精製酵素標品を用いて基質 SST, DX について酵素活性を測定して精製表を作成した。その結果, 本酵素は精製の段階が進んでも両基質に対する活性の比率はほぼ同等であり, 両活性ともに約 75 倍に精製された。SDS-PAGE の結果から精製酵素は単一のタンパク質バンドを与えた。また, このタンパク質は検量線より分子量 52 kDa と測定された。この結果は本酵素が 2 つの基質に作用できる単一タンパク質であることを示している。

得られた精製酵素が  $\alpha$ -1,4 結合型の SST と,  $\alpha$ -1,6 結合型の DX に同程度に作用することは, 酵素の持つ基質特異性の面から見ても興味深い。さらに, 反応生成物の HPLC 分析により  $\alpha$ -1,6 結合型の IM6 を基質にした場合の反応生成物として, マルトースの溶出位置にピークが現れ, 基質の加水分解と糖転移の作用により新たに  $\alpha$ -1,4 結合のマルトースが生成されることがわかった。また, 基質として用いた原糖よりも重合度の大きいオリゴ糖も少量ながら生成していることがわかり転移反応が起こっていることも確認され, 環状オリゴ糖の CD, CI を分解することからエンド型の作用様式を持つことも明らかになった。

単一酵素が 2 種の異なる基質に対して作用するものとしては, これまでにアルカリ性 *Bacillus* 由来のアミロプurlナーゼについての報告がある<sup>21,22)</sup>。これは, 単一のアルカリ性アミロプurlナーゼのタンパク質がふたつの異なった活性中心を持っていて, ひとつは  $\alpha$ -1,4 結合型基質, もうひとつは  $\alpha$ -1,6 型基質を分解すると報告されている。また, 嫌気性, 高温下において最大活性を示すアミロデキストラナーゼが, 上記のアミロプurlナーゼと同様に  $\alpha$ -1,6 結合と  $\alpha$ -1,4 グルコシド結合に作用し, 加水分解するとの報告もあり<sup>23)</sup>, その精製法や性質などが明らかにされている<sup>24,25)</sup>。本研究で精製した G22-10 変異株の酵素は  $\alpha$ -1,4 型,  $\alpha$ -1,6 型の基質に同等に作用して, 加水分解により低分子化させるとともに, 転移反応も行っていることが明らかになった。また, 環状オリゴ糖をも分解することからエンド型の作用を持つこともわかった。これらの作用は親株の T-3040 株の CITase でも認められている。T-3040 株から新たに見出された酵素は  $\alpha$ -1,4 結合型の SST を基質として  $\alpha$ -1,6 結合型の直鎖構造のオリゴ糖を作り, 同菌の CITase の作用により CI を生産するこ



とが近年、明らかにされた<sup>10)</sup>。また、*Paenibacillus sp.* 598K 変異株の酵素は、基質 SST に作用して、 $\alpha$ -1,6 結合型の環状オリゴ糖を生成することが明らかにされている<sup>11-13)</sup>。どちらの酵素の場合にも、基質を加水分解して分子の再配列を行い、高い糖転移作用を持つ酵素であることが報告されている。

本研究の G22-10 変異株では、親株の T-3040 が持つ  $\alpha$ -1,4 結合から  $\alpha$ -1,6 結合を作る酵素の性質が変異することにより、ひとつの酵素が異なる結合様式の基質に同等に作用する性質を得たのではないかと考えられる。以上のことから、本酵素は  $\alpha$ -1,4 結合型、 $\alpha$ -1,6 結合型の両方の基質に作用する新規の  $\alpha$ -グルカナーゼであることが明らかとなった。本酵素の作用はグルコアミラーゼやアミロプラーゼに類似したものであるとも考えられるが、デンプンを基質として CI を生産する反応に参与して、CI 生産の低コスト化に寄与できる可能性もあり、今後の研究は実用的な面からの解析に進展することが期待される。

#### 【文献】

- 1) T.Oguma, T.Horiuchi, M.Kobayashi : Novel cyclic dextrins, cyclisomaltooligosaccharides, from *Bacillus sp.* T-3040 culture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 1225-1227 (1993).
- 2) T.Oguma, K.Tobe, M.Kobayashi : Purification and properties of a novel enzyme from *Bacillus spp.* T-3040, which catalyzes the conversion of dextran to cyclic isomaltooligosaccharides. *FEBS.*, **345**, 135-138(1994).
- 3) T.Yamamoto, K.Terasawa, Y.M.Kim, A.Kimura, Y.Kitamura, M.Kobayashi, K.Funane : Identification of catalytic amino acids of cyclodextran glucanotransferase from *Bacillus circulans* T-3040. *Biosci. Biotech, Biochem.* **70**, 1947-1953 (2006).
- 4) K.Funane, Y.Kawabata, R.Suzuki, Y.M.Kim, H.K.Kang, N.Suzuki, Z.Fujimoto, A.Kimura, M.Kobayashi : Deletion analysis of regions at the C-terminal part of cyclisomaltooligosaccharide glucanotransferase from *Bacillus circulans* T-3040. *Biochim Biophys Acta*, **1814**, 428-434 (2011).
- 5) N.Suzuki, Z.Fujimoto, Y.M.Kim, M.Momma, N.Kishine, R.Suzuki, S.Suzuki, S.Kitamura, M.Kobayashi, A.Kimura, K.Funane : Structural elucidation of the cyclization mechanism of  $\alpha$ -1,6-Glucan by *Bacillus circulans* T-3040 cyclisomaltooligosaccharide glucanotransferase. *J. Biol. Chem.*, **289**, 12040-12051 (2014).
- 6) C.Y.Jin, D.D.Zhang, T.Oguma and S.X.Qian : Studies on novel cyclodextrins : inclusion of C60 and C70. *J.Inclusion Phenom. Mol. Recognition Chem.*, **24**,301-310(1996).

- 7) M.Kobayashi, K.Funane and T.Oguma : Inhibition of dextran and mutan synthesis by cyclisomaltooligosaccharides. *Biosci. Biotech, Biochem.* **59**, 1861-1865 (1995).
- 8) T.Oguma, H.Kawamoto : Production of cyclodextran and its application. *Trends Glycosci. Glycotecnol.*, **15**, 91-99(2003).
- 9) 中村道徳, 貝沼圭二編 : 生化学実験法 25. 「澱粉・関連糖質酵素実験法」, 瓜谷郁三, 駒野徹, 志村憲助, 中村道徳, 船津勝編集, 学会出版センター, 東京, pp.213-220(1989).
- 10) K.Funane, H.Ichinose, M.Araki, R.Suzuki, K.Kimura, Z.Fujimoto, M.Kobayashi, A.Kimura: Evidence for cyclisomaltooligosaccharide production from starch by *Bacillus circulans* T-3040. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 3947-3954(2014).
- 11) R.Suzuki, K.Terasawa, K.Kimura, Z.Fujimoto, M.Momma, M.Kobayashi, A.Kimura, K.Funane : Biochemical characterization of a novel cyclisomaltooligosaccharide glucanotransferase from *Paenibacillus* sp.598K. *Biochim. Biophys. Acta*, **1824**, 919–924 (2012).
- 12) 舟根和美, 一ノ瀬仁美, 鈴木龍一郎, 木村啓太郎, 齋藤勝一, 藤本瑞, 荒木紀美, 小林幹彦, 木村淳夫 : デキストラングルカナーゼの発見 : 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2C16a01(宮城)2014.
- 13) 一ノ瀬仁美, 木村啓太郎, 齋藤勝一, 荒木紀美, 小林幹彦, 藤本瑞, 舟根和美 : *Paenibacillus* sp. 598K 由来デキストラングルカナーゼの特性解析: 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2C16a02(宮城)2014.
- 14) 川端康之, 北尾 悟, 舟根和美, 渡嘉敷唯章, 儀部茂八, 宮城貞夫 : ニトロソグアニジン変異およびストレプトマイシン耐性変異による環状イソマルトオリゴ糖合成酵素 (CITase) 生産菌 *Bacillus circulans* の育種. 食品・臨床栄養., **1**, 43-48 (2006) .
- 15) E.J.Hehre, D.M.Hamilton : Bacterial conversion of dextrin into a polysaccharide with the serological properties of dextran. *Exp. Biol. Med.*, **71**, 336-339(1949).
- 16) M.Suzuki, T.Unno, G.Okada : Simple purification and characterization of an extracellular dextrin dextranase from *Acetobacter capsulatum* ATCC 11894. *J.Appl. Glycosci.*, **46**, 469-473(1999).
- 17) K.Yamamoto, K.Yoshikawa, S.Kitahata and S.Okada : Purification and some properties of dextrin dextranase from *Acetobacter capsulatus* ATCC 11894. *Biosci.Biotech.Biochem.*, **56**, 169-173(1992).
- 18) K.Yamamoto, K.Yoshikawa and S.Okada : Structure of dextran synthesized ATCC 11894 by dextrindextranase from *Acetobacter capsulatus*. *Biosci.Biotech,Biochem.*, **57**, 1450-1453(1993).
- 19) K.Yamamoto, K.Yoshikawa, S.Okada : Substrate specificity of dextrin dextranase from *Acetobacter capsulatus* ATCC 11894. *Biosci.Biotech, Biochem.*, **58**, 330-333 (1994).

- 20) K.Tsusaki, H.Watanabe, T.Yamamoto, T.Nishimoto, H.Chaen and S.Fukuda :  
Purification and characterization of highly branched  $\alpha$ -glucan-producing enzymes  
from *Paenibacillus* sp. PP710., *Biosci. Biotech. Biochem.* **76**, 721-731(2012).
- 21) Y.Hatada, K.Igarashi, K.Ozaki, K.Ara, J.Hitomi, T.Kobayashi, S.Kawai, T.Watabe,  
S.Ito : Amino acid sequence and molecular structure of an alkaline amylopullulanase  
from *Bacillus* that hydrolyzes  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6 linkages in polysaccharides at  
different active sites. *J. Biol. Chem.*, **271**, 24075-24083 (1996).
- 22) 長瀬産業株式会社・ナガセ生化学工業株式会社, 橘 佳永, 倉村昭子, 白坂直輝, 鈴木  
裕治, 卯津羅健作, 小島岩夫 : 超耐熱耐酸性アミロプルラナーゼ, 特開平 11-318441,  
1999-11-24.
- 23) C.Wynter : Screening method for dextranase and amyloextranases from anaerobic  
thermophiles. *J.Gen.Appl.Microbiol.*, **42**, 213-223 (1996).
- 24) C.V.A.Wynter, M.Chang, J.Jersey, B.Patel, P.A.Inkerman, S.Hamilton : Isolation and  
characterization of a thermostable dextranase. *Enzyme Microb. Technol.*, **20**,  
242-247 (1997).
- 25) C.Wynter : Partial purification of a thermostable dextranase using Sephacryl S-300  
adsorption. *Lett .Appl. Microbiol.*, **25**, 321-324(1997).

#### 【関連する業績】

##### ・学会発表

- 1) 荒木紀美, 太田智子, 後藤智美, 小沢千鶴子, 舟根和美, 小林幹彦 : *Bacillus circulans*  
T-3040 株由来の G22-10 変異株が有する  $\alpha$ -グルカナーゼの作用性 : 日本応用糖質科学会  
第 59 回大会(静岡),2010.
- 2) 荒木紀美, 若菜美和, 延永真実, 舟根和美, 小林幹彦 : *Bacillus circulans* T-3040 株由  
来の G22-10 変異株のデキストリンデキストラナーゼの作用 : 日本応用糖質科学会第 60  
回大会(北海道),2011
- 3) 荒木紀美, 延永真実, 舟根和美, 小林幹彦 : *Bacillus circulans* G22-10 変異株の  $\alpha$ -グ  
ルカナーゼ : 反応生成物の解析および精製法の検討について : 日本応用糖質科学会第 61  
回大会(東京)2012.
- 4) 荒木紀美, 太田智子, 若菜美和, 延永真実, 庄司紗都美, 舟根和美, 小林幹彦 : *Bacillus*  
*circulans* T-3040 由来 G22-10 変異株の  $\alpha$ -グルカナーゼの精製法の検討 : 日本応用糖質  
科学会第 63 回大会,(新潟)2014.

##### ・発表論文

- 1) 荒木紀美, 太田智子, 若菜美和, 延永真実, 小林幹彦 : *Bacillus circulans* G22-10 変異  
株による  $\alpha$ -グルカナーゼの生産と精製 : 応用糖質科学, **5**(4), 237-244 (2015).

## 審査の結果の要旨

*Bacillus circulans* T-3040 株はデキストランを基質として新規な環状オリゴ糖のサイクロデキストランを生産する。この反応を触媒する酵素も新規なものと分かり、サイクロデキストラン合成酵素 cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase (CITase, EC 2.4.1.248) と命名された。

本論文は、この T-3040 株から調製された G22-10 変異株を用いて親株との糖質関連酵素系の差異を検討した結果、 $\alpha$ -1,4 グルコシド結合と  $\alpha$ -1,6 グルコシド結合の両方に作用するエンド型  $\alpha$ -グルカナーゼの存在、精製および作用特異性を明らかにしたものである。

G22-10 変異株を可溶性澱粉 (SST) またはデキストラン (DX) を用いて培養したところ、生産された酵素は SST と DX の両方を加水分解する活性を示し、両活性の比率も同程度であった。この酵素はゲル電気泳動分析で SST と DX を分解する複数の活性ピークを与え、 $\alpha$ -アミラーゼ処理により酵素活性のピークとタンパク質のバンドが低分子側にシフトしたことから、菌の培養中に生成した多糖と酵素が複合体を形成している可能性が示された。そこで、あらかじめ  $\alpha$ -アミラーゼで前処理した酵素溶液を QAE-Toyopearl および Sephacryl S-200 のカラムを用いて精製した。SST と DX の両方の基質で酵素活性を測定し、両者の活性の比率がほぼ同等で、純度約 75 倍の精製酵素標品が得られた。この酵素は SDS-PAGE により分子量約 52 kDa の単一なタンパク質であった。この精製酵素は SST および DX を加水分解するほかに、マルトヘキサオース、イソマルトヘキサオース、サイクロデキストリン、サイクロデキストランをも分解したことから、 $\alpha$ -1,4 結合と  $\alpha$ -1,6 結合の両方に作用するエンド型  $\alpha$ -グルカナーゼであることが明らかにされた。

本論文で証明された  $\alpha$ -グルカナーゼの極めて高い糖転移反応性は、今後のサイクロデキストランの実用的な用途開発に資するものと期待される。

**博士学位論文 内容の要旨及び審査の結果の要旨 第12集 平成27年度**

---

2016年 4月 1日

編集・発行 実践女子大学大学院  
東京都日野市大坂上4-1-1  
〒191-8510 Tel 042(585)8817

機関リポジトリにより公表