

氏名	渡邊 光
授与した学位	博士
専攻分野の名称	工学
学位授与番号	博乙第4208号
学位授与の日付	平成19年 9月30日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第4条第2項該当)
学位論文の題目	Studies of Novel Cyclic Pentasaccharide-Forming Enzymes from <i>Bacillus</i> Strains (<i>Bacillus</i> 属細菌が産生する新規環状五糖生成酵素に関する研究)
論文審査委員	教授 虎谷 哲夫 教授 中西 一弘 教授 酒井 裕

学位論文内容の要旨

澱粉から酵素的に生成するオリゴ糖を広く検索したところ、土壌由来細菌*Bacillus circulans* AM7株の培養上清中に未知糖質を生成する活性を見出した。未知糖質を単離し構造を決定したところ、マルトペンタオースが α -1,6結合で環状化した新規環状五糖、*cyclo*- $\{\rightarrow 6\}$ - α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow)であった。著者は本糖質をイソサイクロマルトペンタオース(ICG5)と命名した。ICG5生成に関与する酵素を精製し、諸性質を調べたところ、本酵素は新規なグルカノトランスフェラーゼであることがわかった。著者は本酵素をイソサイクロマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ(IGTase)と命名した。IGTaseの1次構造を明らかにするため、本酵素遺伝子(*igtI*)をクローニングし塩基配列を決定した。本酵素遺伝子は2,985 bpからなり、シグナルペプチド35残基を含む995アミノ酸からなるタンパク質(分子量105.9 kDa)をコードしていた。本酵素のアミノ酸配列中には α -アミラーゼやCGTaseなどの間で保存されている4ヶ所の共通領域が存在し、本酵素は“ α -アミラーゼファミリー”に属することが示唆された。またC末端領域にはCarbohydrate Binding Module family 25(CBM25)に属する澱粉結合ドメインが2ヶ所存在した。また、本酵素遺伝子の直後に糖質関連酵素をコードすると考えられる遺伝子(*igtZ*)が存在した。*IgtZ*をクローニングし塩基配列を決定したところ、本遺伝子は3,870 bpからなり、1,290アミノ酸からなるタンパク質(IgtZ: 分子量138.8 kDa)をコードしていることがわかった。IgtZの触媒部分と相同性が見られるタンパク質は報告されていなかったが、C末端領域にはIGTaseと同様にCBM25に属する澱粉結合ドメインが2ヶ所存在した。大腸菌を用いて発現させた組換えIgtZを精製し、その諸性質を調べたところ、 α -アミラーゼ活性を有していることがわかった。IGTaseと組換えIgtZを可溶性澱粉または生澱粉に作用させ、ICG5の生成率を検討した。可溶性澱粉に両酵素が作用した場合はIGTase単独に比べて生成率は低下したが、生澱粉に両酵素が作用した場合はIGTase単独に比べて2倍の生成率を示した。このことから、両酵素は生澱粉から効率よくICG5を生成するために宿主菌株に存在していることが示唆された。IGTaseを用いて安価な澱粉からICG5をキログラムスケールで調製し、これを用いることによりICG5の様々な機能性を明らかにした。

論文審査結果の要旨

澱粉から酵素的に生成するオリゴ糖を広く検索し、土壌由来細菌 *Bacillus circulans* AM7 株の培養上清中に未知糖質を生成する活性を見出した。この未知糖質を単離し、その構造はマルトペンタオースが α -1,6 結合で環状化した新規環状五糖、*cyclo*-{ \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow)}であると決定した。本学位申請者はこの糖質をイソシクロマルトペンタオース(ICG5)と命名した。ICG5 生成に関与する酵素を精製し、諸性質を調べ、本酵素が新規なグルカノトランスフェラーゼであることを示した。本申請者はこの酵素をイソシクロマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ(IGTase)と命名した。IGTase の1次構造を明らかにするため、本酵素遺伝子(*igtY*)をクローン化し塩基配列を決定した。本酵素遺伝子は 2,985bp から成り、シグナルペプチド 35 残基を含む 995 アミノ酸から成るタンパク質 (分子量 105.9kDa) をコードしていた。本酵素のアミノ酸配列中には α -アミラーゼやCGTaseなどの間で保存されている4カ所の共通領域が存在し、本酵素は“ α -アミラーゼファミリー”に属することが示唆された。C末端領域には Carbohydrate Binding Module family 25 (CBM25)に属する澱粉結合ドメインが2ヶ所存在した。また、本酵素遺伝子の直後に糖質関連酵素をコードすると考えられる遺伝子 (*igtZ*)が存在した。*IgtZ*をクローン化し塩基配列を決定したところ、本遺伝子は3,870bp から成り、1,290 アミノ酸から成るタンパク質 (*IgtZ*: 分子量 138.8kDa) をコードしていた。*IgtZ*の触媒部位と相同性が見られるタンパク質は報告されていなかったが、C末端領域には IGTaseと同様にCBM25に属する澱粉結合ドメインが2ヶ所存在した。大腸菌を用いて発現させた組換え体 *IgtZ* を精製し、その諸性質を調べたところ、 α -アミラーゼ活性を示した。IGTaseと組換え体 *IgtZ* を可溶性澱粉または生澱粉に作用させ、ICG5の生成率を検討した。可溶性澱粉に両酵素が作用した場合は IGTase 単独に比べて生成率は低下したが、生澱粉に両酵素が作用した場合は IGTase 単独に比べて2倍の生成率を示した。このことから、両酵素は生澱粉から ICG5 をキログラムスケールで調製し、これを用いて ICG5 の様々な機能性を明らかにした。

以上のように本研究では、土壌由来細菌が産生する新規環状五糖生成酵素に関して独創的かつ実用上有用な新知見が得られている。よって、本論文は博士(工学)の学位に値するものと認める。