

称号及び氏名 博士（応用生命科学） 掃部 正浩

学位授与の日付 平成27年3月31日

論文名 マルトオリゴ糖生成アミラーゼに関する研究

論文審査委員 主査 川口 剛司

副査 乾 隆

副査 北村 進一

副査 炭谷 順一

論文要旨

序論

アミラーゼは作用形式によって、エンドアミラーゼとエキソアミラーゼに分類される。 α -アミラーゼはエンドアミラーゼとして知られており、アノマー保持機構によって澱粉のグルコース鎖をランダムに加水分解する。一方、 β -アミラーゼやグルコアミラーゼはエキソアミラーゼとして知られており、澱粉を非還元末端からマルトースまたはグルコース単位で分解するアノマー反転型酵素である。さらに、 α -アミラーゼの中には、エキソ様形式で澱粉からある重合度のオリゴ糖を生成するエキソ α -アミラーゼが存在する。エキソ α -アミラーゼは、 β -アミラーゼやグルコアミラーゼとは異なり、エキソおよびエンドの両方の活性を示すことがわかっている。しかしながら、エキソ α -アミラーゼはプロセシブ活性が一般的に知られている α -アミラーゼよりも非常に強く、これによりマルトオリゴ糖を大量に生成出来ることが言われている。 β -アミラーゼやエキソ α -アミラーゼは副産物が少なく、マルトオリゴ糖の製造に極めて有用な酵素であることが考えられる。さらに、エキソ α -アミラーゼは澱粉を分解しオリゴ糖を生成する活性に加え、水酸基を有する化合物に対してオリゴ糖を転移さ

せる活性も有している。特にマルトース生成アミラーゼの報告は多く、糖だけでなく糖アルコールやアスコルビン酸にマルトースを転移させることができる。また、マルトトリオース生成アミラーゼやマルトテトラオース生成アミラーゼも糖の水酸基にオリゴ糖を転移させることが報告されている。これより、エキソ α -アミラーゼは加水分解活性を利用したマルトオリゴ糖製造に加えて糖転移活性を利用したマルトオリゴ糖配糖体製造にも利用できる可能性が期待される。

本研究では、マルトオリゴ糖に製造に有用なエキソアミラーゼ生産菌を土壌から探索し、酵素の精製、酵素学的特性を調べ、遺伝子の取得を目指した。取得酵素の中でも報告例が極めて少ないマルトトリオース生成エキソアミラーゼについては詳細に酵素学的特性を調べ、本酵素の触媒ドメインの立体構造を X線結晶構造解析により明らかにした。

第 1 章 β -アミラーゼ生産菌の探索

全国各地の土壌を分離源、澱粉を単一炭素源としてスクリーニングを行った結果、 β -アミラーゼ生産菌 *Paenibacillus* sp. MK-808, *Brevibacillus* sp. TMK-673 の 2 株の単離に成功した。これら 2 株が生産する酵素 (Amy14A と TBAmy) の精製を行い、酵素活性および安定性に及ぼす温度および pH の影響を調べた。その結果、TBAmy は既報の β -アミラーゼよりも温度安定性に優れ、産業応用する上で非常に有用な酵素となることが期待された。次に、2 種の酵素の N 末端アミノ酸配列を決定し、常法に従い、アミラーゼ遺伝子全長を含む DNA 断片を取得した。取得 DNA 断片の全塩基配列を決定し、推定されるアミノ酸配列を解析したところ、Amy14A は、N 末端側に Glycoside Hydrolase Family 14 (GH14) に分類される β -アミラーゼ触媒領域、C 末端側に Carbohydrate-Binding Module Family 25 (CBM25) に分類される澱粉結合領域が 3 コピー存在し、TBAmy は N 末端側に GH14 に分類される β -アミラーゼ領域、C 末端側に CBM20 に分類される澱粉結合領域が存在することがわかった。

第 2 章 エキソ α -アミラーゼ生産放線菌の探索

約 2000 株の放線菌をスクリーニングした結果、マルトトリオース生成アミラーゼ生産菌 *Kitasatospora* sp. MK-1785 株の単離に成功した。MK-1785 株が生産する酵素 (G3Amy) の精製を行い、詳細に特性を調べた。いくつかの基質を用いて基質特異性を調べたところ、シクロデキストリンを分解する活性を有しており、エンド活性を示すことがわかった。また、生成物であるマルトトリオース (G3) も低いながら分解

する活性を有していた。アミロースの分解形式を調べた結果、**G3Amy** は他に報告のあるエキソ α -アミラーゼとは異なり、プロセシブ活性は低く、非還元末端の数の増加に伴い、エンド型からエキソ型にシフトすることがわかった。また、各種マルトオリゴ糖 (**DP = 3-6**) およびアミロース (**DP = 18**) を用いてカイネティックパラメーターを測定したところ、重合度が大きくなるに伴い、 k_{cat}/K_m の増加が確認された。**G3Amy** をアルコールやフェノール系化合物存在下で澱粉と反応させた結果、**G3** 転移産物が確認され、本酵素は配糖体合成活性を有していることがわかった。次に**G3Amy** の N 末端アミノ酸配列を決定し、常法に従い、アミラーゼ遺伝子全長を含む DNA 断片を取得した。取得 DNA 断片の全塩基配列を決定し、推定されるアミノ酸配列を解析した結果、**G3Amy** は、N 末端側に **GH13** に分類される α -アミラーゼ触媒領域、C 末端側に **CBM20** が 2 コピー存在することがわかった。また、アミノ酸配列から計算される分子量は **71,800** であり、精製酵素 (**57,000**) と比較して大きいため、精製酵素は C 末端の領域でプロセシングを受けていることが示唆された。さらに大腸菌での発現、組み換え酵素の精製を行った。組み換え **G3Amy** は元株由来の酵素と同様に **G3** 生成活性および **G3** 転移活性を有していることが確認された。

第 3 章 **G3Amy** の X 線結晶構造解析

分泌シグナル (**Met1 - Ala33**) および触媒ドメイン (**Ala34 - Tyr489**) をコードする **G3Amy** 遺伝子が大腸菌で発現させ、ペリプラズム画分より **G3Amy** 触媒ドメイン (**G3Amy-CD**) を精製した。精製標品をポリエチレングリコール含有の沈殿剤によって結晶化を行い、大型放射光施設 **SPring-8 BL38B1** にて X 線回折データを収集し、解析することで **G3Amy-CD** のアポ型の構造を決定した。触媒ドメインは一般的な α -アミラーゼ同様に $(\beta/\alpha)_8$ -バレル構造をとり、活性部位はクレフト中に存在していた。また、触媒残基は **Asp225, Glu256, Asp319** であることが推測された。次に、生成物である **G3** との複合体を決定するために、**G3Amy-CD** の結晶を **G3** を含む抗凍結剤 (グリセロール/沈殿剤 = **2/8**) に 1 分間浸透後、**BL38B1** にてデータを収集し、複合体の構造を決定した。その結果、活性部位に **G3** と考えられる電子密度が確認され、サブサイトマイナス部位を明らかにした。サブサイト-3 に存在する 2 個の極性アミノ酸 (**Asn134, Gln192**) が非還元末端のグルコース残基と水素結合を形成していることが推測され、本酵素のエキソ活性に重要であることが予想された。そこで、これらのアミノ酸を **Ala** に置換した変異酵素を作製し、アミロースと反応させたところ、エンド型酵素と同様に **G3** 以外のオリゴ糖を多く生成することが確認されたため、これらのアミノ酸がサブサイト-3 において非還元末端のグルコース残基の認識に重要であることが明らかとなった。

総括

本研究では、マルトオリゴ糖製造に有用であると考えられる **3** 種のエキソアミラーゼの単離に成功し、さらに、今までに報告のないマルトトリオース生成エキソアミラーゼの立体構造を明らかにすることで、エキソ活性に重要なアミノ酸を同定した。**G3Amy** のように非還元末端から **G3** を特異的に生成するものは大変珍しく、本酵素の触媒機構の解明は、アミラーゼの分野に新しい知見を与えることから、本研究は学術的にも極めて重要な意義を持つと考えられる。また、**G3Amy** は **G3** 配糖体合成酵素として応用が期待されるが、工業的に利用するにはアグリコンに応じて糖転移活性を高めるような、さらなる機能改変が必要であると考えられる。本研究で得られた構造情報を基に本酵素の機能向上をさらに行い、効率良く **G3** 配糖体を合成できる酵素の創製に成功すれば、高い機能性を持つ配糖体の発見につながり、多くの分野で貢献できることが期待される。

審査結果の要旨

アミラーゼは澱粉やグリコーゲンを加水分解しグルコースやマルトオリゴ糖を生成する酵素であり、製糖、食品加工、胃腸薬、衣料製造、洗剤などに利用されている産業上最も重要な酵素の一つである。アミラーゼは作用形式によって、エンド型とエキソ型に分類される。 β -アミラーゼやグルコアミラーゼがエキソアミラーゼであり、非還元末端からそれぞれマルトース、グルコースを遊離するアノマー反転型酵素である。一方、 α -アミラーゼは一般的にエンド型とされ、不規則に加水分解するアノマー保持型の酵素として知られている。しかし、 α -アミラーゼの中にはエキソ様形式である重合度のオリゴ糖を生成するエキソ α -アミラーゼと呼ばれるものがあり、これらは同時にエンド活性を併せ持っていることが知られているが、プロセッシブな活性が極めて強くある長さのマルトオリゴ糖を大量に生成する。したがって、 β -アミラーゼやエキソ α -アミラーゼは副産物が少なく、決まった長さのマルトオリゴ糖の製造に極めて有用である。さらに、エキソ α -アミラーゼは、オリゴ糖を水酸基に転移する活性も持っているため、これを利用して既存化合物をマルトオリゴ糖配糖体化することによって新たな物性や生理活性の付与が期待できる。

本申請論文では、マルトオリゴ糖製造に有用なエキソアミラーゼ生産菌を新たに土壌から探索し、酵素の精製、酵素学的性質の解明、遺伝子の取得が行われた。見いだした酵素の中でマルト

トリオース生成エキソアミラーゼについてはより詳細に酵素学的特性を調べるとともに、触媒ドメインの立体構造を X 線結晶構造解析により明らかにした。

第 1 章では、スクリーニングによって単離した 2 株の β -アミラーゼ生産菌 *Paenibacillus sp.* MK-808, *Brevibacillus sp.* TMK-673 の生産する酵素 (Amy14A, TBAmy) を対象に研究が展開された。両菌株とも α -アミラーゼを生産せず β -アミラーゼのみを生産しているため、澱粉を基質としたときにマルトースのみからなる糖液を得ることができる。これはマルトース製造において極めて有用である。TBAmy は温度安定性に優れ、現在産業的に利用されている穀物由来の β -アミラーゼと同等かそれ以上であることから、産業応用における有用性に期待が持たれた。さらに両酵素の遺伝子を取得し解析した結果、Amy14A は、N 末端側に糖質分解酵素ファミリー 14 (GH14) に分類される触媒ドメイン、C 末端側に糖質結合モジュール 25 (CBM25) に分類される澱粉結合領域が 3 コピー存在し、TBAmy は N 末端側に GH14 の触媒ドメイン、C 末端側に CBM20 が 1 コピー存在することが明らかとなった。

第 2 章では、放線菌を対象としたスクリーニングにより単離した *Kitasatospora sp.* MK-1785 株の生産するマルトトリオース生成アミラーゼ (G3Amy) に関して展開された。基質特異性を調べた結果、シクロデキストリン分解活性が認められたことからエンド活性を持つことが明らかとなった。また、各種マルトオリゴ糖を基質としたときのカイネティックパラメータを求めたところ重合度に伴って k_{cat}/K_m の増加が確認された。一方、G3Amy をアルコールやフェノール系化合物存在下で澱粉に作用させたときに G3 転移産物が確認されたことから、配糖体合成活性を有していることが示された。また、アミロース鎖の分解パターンから、G3Amy はプロセシブ活性が低く非還元末端に対する親和性が高い新しいタイプのエキソ α -アミラーゼであることが強く示唆された。次に、遺伝子を取得し解析した結果、N 末端側に GH13 の触媒ドメイン、C 末端側に CBM20 が 2 コピー存在することが明らかとなった。

第 3 章では、X 線結晶構造解析による G3Amy のアポ型および G3 との複合体の立体構造の決定が行われた。触媒ドメインは一般的な α -アミラーゼと同様に $(\beta/\alpha)_8$ -バレル構造をとり、活性部位はクレフト中に存在していた。また、触媒残基は Asp225, Glu256, Asp319 であることが推察された。G3 複合体の解析から、マイナスサブサイト部位が明らかとなり、サブサイト-3 に存在する 2 つの極性アミノ酸 (Asn134, Glu192) が非還元末端のグルコース残基と水素結合を形成する距離に位置し、エキソ活性に重要であることが示唆された。このことは、これらのアミノ酸を Ala に置換した変異酵素ではアミロースと反応させたときに G3 以外のオリゴ糖を生成することからも強く支持された。

本申請論文では、3 種のエキソアミラーゼの単離に成功するとともに、今までに報告のないマルトトリオース生成エキソアミラーゼの立体構造を明らかにした。ここで得られた成果は、新たなアミラーゼの産業利用への可能性が期待されるとともに、これまであまり報告のない G3 生成エキソアミラーゼの触媒機構を解明するための基礎を築いたものであり、応用微生物学、応用酵素学分野に大きく貢献するものである。よって、最終試験の結果と併せて、博士 (応用生命科学) の学位を授与することを適当と認める。