

氏 名	お お だ ん こ う じ 大 段 光 司
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2385 号
学位授与の日付	平 成 13 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Studies on Improvement of Enzymatic Function in <i>Bacillus subtilis</i> X-23 $\alpha$ -アミラーゼの酵素機能改変に関する研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 熊 谷 英 彦 教 授 井 上 國 世 教 授 江 崎 信 芳

### 論 文 内 容 の 要 旨

$\alpha$ -アミラーゼや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) は、デンプン糖化産業の根幹を成す実用酵素であるとともに、酵素の機能改変といった基礎的研究の対象としても重要である。著者は本研究において、高い転移活性を有する $\alpha$ -アミラーゼにCGTaseの生デンプン吸着能の導入を行い、実用的機能の付加をはかるとともに、酵素分子を設計するという視点から、ドメインレベルで酵素の構造と機能の相関について解析した。その内容を要約すると以下のようになる。

1. *Bacillus subtilis* X-23の培養液中に大きさの異なる2種類の $\alpha$ -アミラーゼ、Ba-LとBa-Sが存在することを見出し、Ba-SはBa-LのC末端側186アミノ酸残基を欠失したものであることを明らかにした。さらに、Ba-Sの分子活性、最適温度、最適pH、転移活性などの諸性質が、Ba-Lのそれらと同じであることを確認し、Ba-LのC末端側186アミノ酸からなるペプチド部分は、 $\alpha$ -アミラーゼの機能に必須ではないことを確認した。このことより、本 $\alpha$ -アミラーゼ活性はC末端側ペプチドの削除や付加によって影響を受けないことが示唆され、活性を保持した状態でそのC末端領域に、機能性ドメインを導入できると考察した。

2. 好アルカリ性 *Bacillus* sp. A2-5a由来CGTase (A2-5aCGTase) の遺伝子をクローン化し、DNA塩基配列を解析した。その結果、C末端領域に典型的な生デンプン吸着モチーフ配列を見出した。さらに、精製酵素を用いて本酵素が生デンプン吸着能を有することを確認した。

3. A2-5a CGTase 遺伝子の周辺領域の塩基配列を解析し、その上流域にサイクロデキストリン (CD) の輸送に関与するタンパク質をコードする遺伝子を、また下流域にCD分解酵素をコードする遺伝子をそれぞれ確認した。このことより、細胞外におけるCDの合成、それに次ぐCDの取り込み、さらに細胞内におけるCD分解という、グラム陰性菌 *Klebsiella pneumoniae* で提唱された新しいデンプン資化経路がグラム陽性菌である本菌にも存在することを示した。

4. 三次元構造の解析から、A2-5a CGTaseの生デンプン吸着ドメイン (Eドメイン) は機能的に独立しており、他の4つのA, B, C, Dドメインから切り離されても元の構造を保持し、生デンプン吸着能を有すると考え、Ba-Sに導入する機能性ドメインとして選んだ。そして、Ba-SのC末端領域にCGTaseのEドメインを融合させたキメラ酵素 (Ch1 Amy) およびD+Eドメインを結合させたキメラ酵素 (Ch2 Amy) の2種類を作製した。両キメラ酵素ともに大腸菌で生産され、精製酵素の分子量とDNA塩基配列からの推定分子量とが一致した。また、作製した酵素がキメラ体であることを、ウエスタン解析により確認した。Ba-Sとキメラ酵素は、可溶性デンプンに対する反応パターン、最適PH、最適温度、熱安定性、転移活性に関して違いがなかった。また、Ba-L, Ba-S, およびCh1 Amyの可溶性デンプンに対する比活性は同じであったが、Ch2 Amyのそれはそれらの約8分の1であった。両キメラ酵素ともBa-Sでは見られなかった生デンプン吸着能および分解能を獲得し、両機能ともにCh2Amyの方がCh1Amyよりも高かった。

5. 本研究において、酵素活性のある形でキメラ酵素を作ることができた理由を、三次元構造を基にした解析により考察した。すなわちBa-Sが $\alpha$ -アミラーゼとしての機能を維持するのに十分に強固な折り畳まれ方をしていること、触媒ドメ

インおよび生デンプン吸着ドメインを橋渡しするいくつかのアミノ酸残基が存在すること、そしてA2-5a CGTaseのEドメインが構造的かつ機能的に他のドメインから独立して存在していることなどを示した。

### 論文審査の結果の要旨

糖質関連酵素の研究は歴史が長く、その情報量は膨大である。また、これらの酵素の工業的利用の研究も多い。しかしながら、ドメインシャフリングによる新規機能の導入研究は、まだ例が少なく、酵素化学の基礎と応用の両面において新しく重要な課題である。

*B. subtilis* X-23の $\alpha$ -アミラーゼは転移活性が高いことが特徴であり、これを利用して新規な機能を持つ糖化合物を合成することができる。そしてその実用的利用には、さらに糖転移効率を上げる必要がある。そのためには、反応系に目的の受容体以外に受容体となりうる分子が少ない方が有利である。糖転移反応では、糖供与体自体が受容体となることが多く、基質は不溶性であることが好ましい。したがって供与体としては可溶性デンプンではなく、生デンプンを使用する方が有利である。

本論文の著者は、 $\alpha$ -アミラーゼに生デンプン吸着能と分解能を導入する目的でタンパク質工学的研究を行った。評価すべき主な点は以下のとおりである。

1. *B. subtilis* X-23が分泌する欠失型 $\alpha$ -アミラーゼ(Ba-S)は、完全長型(Ba-L) $\alpha$ -アミラーゼのC末端側約20kDaポリペプチドが酵素的に切断されることにより生じ、両酵素の酵素的諸性質には違いがないことを明らかにした。
2. 好アルカリ性*Bacillus sp.* A2-5a由来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)遺伝子をクローン化後、塩基配列を決定し、生デンプン吸着モチーフを見出した。また本酵素の生デンプン吸着能を実証した。
3. 本CGTase遺伝子の上流および下流域遺伝子を解析し、特異なデンプン資化経路の存在を示唆した。
4. Ba-SのC末端に、CGTaseのEドメインおよびD+Eドメインを結合したキメラ酵素(それぞれCh1AmyおよびCh2Amy)を作製した。その結果、 $\alpha$ -アミラーゼにデンプン吸着能および分解能を賦与することができ、それらはともにCh2Amyの方がCh1Amyよりも高かった。
5. 本研究において、酵素活性を保持したキメラ酵素を作製することができた理由を三次元構造を基にして考察した。

以上のように、本論文は、高い転移活性を有する $\alpha$ -アミラーゼに生デンプン吸着能の導入を行い、実用的機能の付加をはかるとともに、酵素分子を設計するという視点から、ドメインレベルで酵素の構造と機能の相関について解析したものであり、得られた新知見は酵素化学、構造生物学、応用微生物学分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は、博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、平成13年4月12日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。