

細菌によるオリゴ糖生産の機構の研究

Study of production of oligosaccharides by bacteria

研究代表者 東京農工大学農学部応用生物科学科 助手 殿塚隆史

Instructor, Department of Applied Biological Science, Tokyo University of
Agriculture and Technology Takashi TONOZUKA

Numerous oligosaccharides are reported to maintain human health, and various oligosaccharide-producing enzymes such as pullulan-hydrolyzing enzymes are essential for industry. *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 produces two α -amylases, TVA I and TVA II, both of which efficiently hydrolyze pullulan to produce panose and also hydrolyze cyclodextrins. To investigate the metabolic systems in which these enzymes participate, the flanking regions of the genes were analyzed. In the flanking region of the TVA I gene, genes related to the poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) metabolic system of *Alcaligenes eutrophus* were found. On the other hand, genes homologous to the maltose system of *Escherichia coli* and the cyclodextrin metabolic (cym) system of *Klebsiella oxytoca* were located upstream of the TVA II gene, suggesting the role of the metabolic system in which TVA II participates resembles those of maltose system of *E. coli* and cym system of *K. oxytoca*. The striking feature is that a glucoamylase gene, which has been reported only a few in bacteria and archaea, was located downstream of the TVA II gene, and this glucoamylase hydrolyzed oligosaccharides more efficiently than those from other sources.

1. 研究目的

機能性オリゴ糖が、人の健康増進に寄与すると報告され、さまざまなタイプのオリゴ糖製造酵素が囑望されている。遺伝子工学により生体内に微量に生産されている酵素を大量生産する技術が確立された今日、さまざまな細菌のオリゴ糖生産に関連する一連の酵素および代謝系の知見を得ることは、新規な機能性オリゴ糖の開発につながると考えられる。

最近の研究によって、細菌はいったん取り込んだマルトースを生体内で、大腸菌の場合 6~7 糖程度の直鎖のオリゴ糖を、*Klebsiella oxytoca* の場合は環状のオリゴ糖であるサイクロデキストリンなどを生産した後、分解するという経路を持っていることが分かった。好熱性放線菌 *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 は、 α -アミラーゼが通常あまり分解することのできない、環状オリゴ糖のサイクロデキストリンや多糖プルランを効率的に分解する酵素を二種類 (TVA I および TVA II) 生産しており、本菌のオリゴ糖代謝系に関連する酵素およびタンパク質は特徴的な性質を有するものであることが期待

される。本研究は、*T. vulgaris* のオリゴ糖生産に関連する一連の酵素の遺伝子を取得し酵素の性質を解析することによって、特徴的な本菌のオリゴ糖の生産機構の解明を目的とするものである。

2. 研究経過

2.1. TVA I および TVA II 遺伝子の周辺領域の解析

TVA I および TVA II の関与する代謝系に関連する一連のタンパク質遺伝子を取得する目的で、TVA I 遺伝子および TVA II 遺伝子の周辺領域の塩基配列の解析を行った。TVA II 遺伝子については、今までに得られていたゲノム断片は約 4 kb と短いものであったので、TVA II 遺伝子をプローブとしたハイブリダイゼーションを行い、*T. vulgaris* を *Hind*III で分解して構築したライブラリから TVA II を含む 7 kb のクローンを取得したのち解析を行った。塩基配列の解析は Applied Biosystems 377 DNA Sequencer を用いた。

2.2. タンパク質の大量生産と性質の解析

後述する ORF +2 産物の解析を行うため、大腸菌における大量発現ベクターの構築を行った。得られた発現ベクターで組換え大腸菌を用いてタンパク質を生産させたのち、菌体を破碎することによって抽出し、精製し性質の解析に供した。グルコアミラーゼ活性の解析は薄層クロマトグラフィーおよびグルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼを用いた活性測定によって行った。

3. 研究成果

3.1. TVA I 遺伝子の周辺領域の解析

TVA I 遺伝子の下流域数百ベース以内に、ORF と考えられる領域は見あたらなかったが、TVA I 遺伝子の上流にはオープンリーディングフレーム (ORF) がいくつか連続して存在することが分かり、今回解析した二つの ORF をそれぞれ ORF- α 、ORF- β と表わし、これらの遺伝子産物のアミノ酸配列のホモロジー検索を行った。(Fig. 1A)

ORF- α 産物は、さまざまな生物種起源の UDP-グルコース 4-エピメラーゼと相同性がみられることが分かった。しかしながら ORF- α 産物と、UDP-グルコース 4-エピメラーゼとの相同性は N 末端の領域を除いて低く、ORF- α 産物は、新規の糖ヌクレオチド関連酵素である可能性が高いと考えられる。ORF- α 産物とアミノ酸配列全体にわたって相同性があったものは、*Alcaligenes eutrophus* が生産する生分解性プラスチックとして知られている poly (3-hydroxybutyrate- ω -4-hydroxybutyrate) の代謝系オペロンを構成するタンパク質 (ORF 5 産物) で、また、ORF- β 産物も同じく *A. eutrophus* の本オペロン構成タンパク質 (ORF 4 産物) と関連があることが分かった。

A. eutrophus の poly (3-hydroxybutyrate- ω -4-hydroxybutyrate) 代謝系オペロンを構成するタンパク質 ORF 7 産物は、*Bacillus acidocaldarius* のプルラン分解アミラーゼ遺伝子近傍に存在する遺伝子産物と相同性が高いことがすでに報告されている。このような結果から、TVA I は *A. eutrophus* の poly (3-

hydroxybutyrate- ω -4-hydroxybutyrate) 代謝系と類似な代謝系を構成するタンパク質の一つであると考えられる。

3.2. TVA II 遺伝子の周辺領域の解析

TVA II 遺伝子周辺の塩基配列の解析を行い、上流域に存在するオープンリーディングフレームをそれぞれ ORF -1、-2、-3、下流域に存在するオープンリーディングフレームを、それぞれ ORF +1、+2 と命名し、それぞれホモロジー検索を行った (Fig. 1B)。

TVA II 遺伝子の上流域に存在する遺伝子の産物は、大腸菌のマルトース代謝系や *Klebsiella* のサイクロデキストリン代謝系において、オリゴ糖の菌体内取り込みや、オリゴ糖輸送に関与すると報告されているタンパク質とホモロジーの高い配列を持ち、それぞれ、ORF -1 は *Klebsiella* の CymG および大腸菌の MalG、ORF -2 は *Klebsiella* の CymF および大腸菌の MalF、ORF -3 は *Klebsiella* の CymE および大腸菌の MalE と、それぞれ類似することが分かった。

一方、TVA II 遺伝子の下流域に存在する ORF +1 の産物はグルコアミラーゼ、ORF +2 の産物は糖代謝系オペロンに共通して見られるリプレッサータンパク質と相同性が見られることがあることが分かった。ORF +2 産物については、大腸菌のマルトース代謝系においても、これに相当するタンパク質である MalI が存在する。一方、ORF +1 産物であるグルコアミラーゼは、*Aspergillus* 属などの糸状菌由来のものがよく知られているが、細菌および古細菌での報告例は少ない。

グルコアミラーゼは、大腸菌のマルトース代謝系や *Klebsiella* のサイクロデキストリン代謝系では存在しておらず、細菌由来では *Clostridium* sp. G0005、および *Thermoanaerobacterium* 属について酵素の研究がなされており、また超好熱性古細菌については、ゲノム解析により *Methanococcus jannaschii* においてグルコアミラーゼ遺伝子と考えられている配列が最近報告されている程度である。今回得られた *T. vulgaris* 由来のグルコアミラーゼ (以下

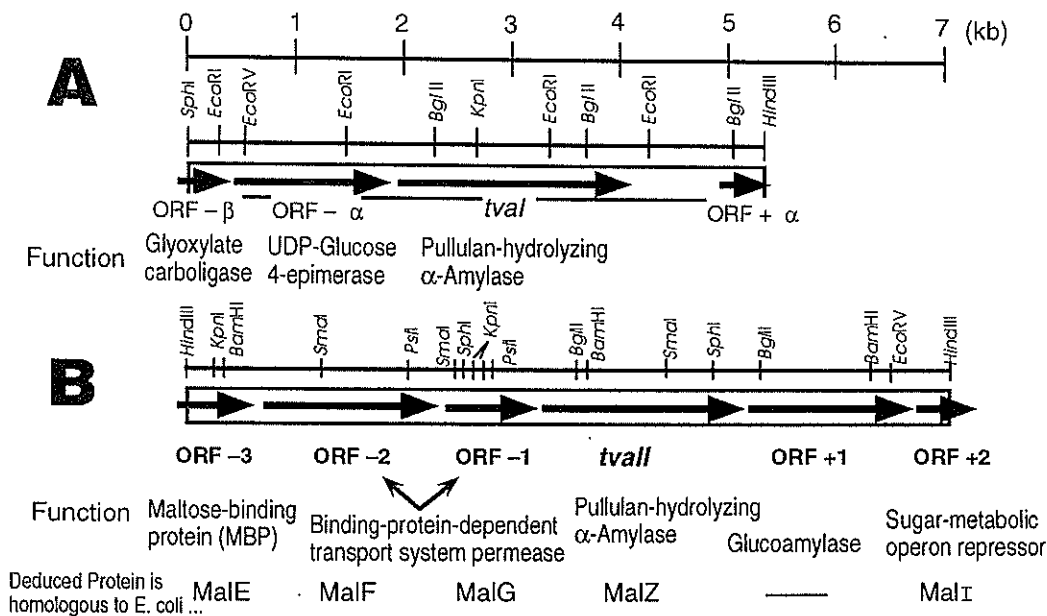


Fig. 1. TVA I および TVA II 遺伝子の周辺領域の解析
制限酵素地図および遺伝子産物の推定される機能を示した。(A) TVA I 遺伝子 (*tvaI*) の周辺領域。オープンリーディングフレームを ORF- α 、ORF- β 、ORF+ α で示した。(B) TVA II 遺伝子 (*tvaII*) の周辺領域。オープンリーディングフレームを ORF-1、ORF-2、ORF+1 および ORF+2 で示し、アミノ酸配列において相同性の高い大腸菌由来のタンパク質を示した。

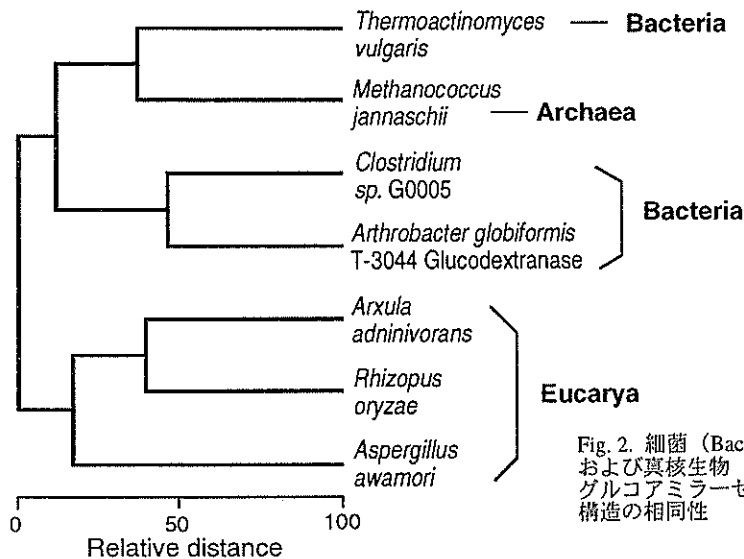


Fig. 2. 細菌 (Bacteria) 古細菌 (Archaea) および真核生物 (糸状菌、Eucarya) 由来グルコアミラーゼおよび関連酵素の一次構造の相同性

TV	407	L	P	L	-	P	S	R	D	L	W	E	E	R	E	G	E	H	T	Y	S	A	S	A	V	C	G	L	D	A	-	A	A	-	-	-	-	-	437		
MJ	396	L	N	F	T	P	C	F	D	L	W	E	E	R	F	G	V	F	A	Y	T	M	G	A	T	Y	A	G	L	K	C	-	A	Y	-	-	-	-	427		
CS	445	M	G	P	K	T	G	Q	E	R	W	E	E	I	G	G	S	P	A	T	M	A	A	E	V	A	G	L	T	C	A	A	Y	I	A	E	Q	N	K	483	
AA	169	Y	W	N	Q	T	G	V	D	L	W	E	E	V	N	G	S	S	F	F	T	I	A	V	Q	H	R	A	L	V	E	G	S	A	F	A	T	A	V	G	207

Fig. 3. グルコアミラーゼの保存配列 (トリプトファン-グルタミン酸-グルタミン酸、WEE) 配列およびその周辺のアミノ酸配列の相同性
TV, *Thermoactinomyces vulgaris*; MJ, *Methanococcus jannaschii*; CS, *Clostridium sp. G0005*; AA, *Aspergillus awamori* を表す。アミノ酸残基の番号は成熟酵素のものを示した。

TGA と略す) のアミノ酸配列のホモロジー検索を行ったところ、細菌由来である *Clostridium* あるいは *Thermoanaerobacterium* の酵素より、超好熱菌 *M. jannaschii* のグルコアミラーゼと推定されるタンパク質との相同性が高いことが明らかとなった (Fig. 2)。また、グルコアミラーゼの活性中心付近に共通してみられる配列であるトリプトファン-グルタミン酸-グルタミン酸 (WEE) という配列が TGA にも保存されていることが分かった (Fig. 3)。

3.3. *T. vulgaris* グルコアミラーゼ (TGA) の精製と性質

今回得られた ORF +2 産物である TGA は、どのような特徴があるか明らかにするため、大腸菌での大量発現ベクターの構築を pUC119 を用いて行い、培養液 1 リットルあたり 100 mg 以上で得られる生産系を確立した。得られた酵素を、50 °C の熱処理および HiLoad Q-Sepharose 16/10 FF による陰イオン交換クロマトグラフィーによって電気泳動的に均一な標品に精製することができた。精製酵素を可溶性デンブリンに作用させた後、薄層クロマトグラフィーによって解析したところ、反応液からグルコースのみが得られることがわかり、本酵素はグルコアミラーゼ活性を持つことが確認された。

他のグルコアミラーゼとの基質特異性を比較するため、TGA および *Clostridium* sp. G0005 由来のグルコアミラーゼを用い、1% デンブリンおよび 1% マルトースに対し活性測定を行ったところ、*Clostridium* sp. G0005 由来のグルコアミラーゼではデンブリン分解活性とマルトース分解活性の比が 1:0.28 なのに対し、TGA では 1:4 であることが分かった。このことから、TGA はこれまでに知られているグルコアミラーゼに比べ、オリゴ糖の分解活性が高いという特徴的な性質を有することが分かった。

4. 今後の課題と発展

これまで、プルランを分解する酵素の生体内での役割はほとんど解明されていなかったが、

本研究でプルラン分解酵素 TVA I と TVA II の関与する代謝系はそれぞれ異なる特徴的なものであるということを示すことができた。

TVA I は、*A. eutrophus* の poly (3-hydroxybutyrate- ω -4-hydroxybutyrate) 代謝系と類似な代謝系を構成するタンパク質の一つであることが示唆された。近年、生分解性プラスチックを酵素的に合成するというような、環境保全に配慮した素材や手法の需要が高まっていることから、本研究をさらに進め、TVA I の関与する代謝系の機能を明らかにしたいと考えている。

また TVA II 遺伝子周辺の解析から、TVA II の関与するオリゴ糖代謝系は、大腸菌や *Klebsiella* のオリゴ糖代謝系と類似する機能を持つものと考えられるが、*T. vulgaris* は、細菌では報告例の少ないグルコアミラーゼを有しており、また本グルコアミラーゼはオリゴ糖分解活性が高いというような特徴的な酵素であるということから、オリゴ糖代謝系も他の細菌とは異なる特徴的なものであると考えられる。

T. vulgaris のグルコアミラーゼは超好熱菌 *M. jannaschii* のグルコアミラーゼとの相同性が高いことから、*T. vulgaris* および *M. jannaschii* 由来のグルコアミラーゼを比較・研究することは、酵素の耐熱化およびオリゴ糖代謝系の分子進化の機構を明らかにするよい材料になると考えられる。現在、*M. jannaschii* グルコアミラーゼの大腸菌での発現系の構築を行っており、両酵素の構造および性質を比較を行いたいと考えている。

5. 発表論文リスト

学会発表：殿塚隆史、富田理映、酒井坦、坂野好幸、細菌および古細菌由来グルコアミラーゼの一次構造と性質、第 47 回日本応用糖質科学学会大会、1998 年 10 月、札幌 (予定)