

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450133

研究課題名(和文) 澱粉を環状イソマルトオリゴ糖に転換する酵素系の生産・制御機構解明

研究課題名(英文) Cycloisomaltooligosaccharides from starch and their production and control mechanisms

研究代表者

舟根 和美 (FUNANE, Kazumi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門 食品生物機能開発研究領域・主席研究員

研究者番号：90353953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：環状イソマルトオリゴ糖(CI)生産菌であるPaenibacillus sp. 598K株は、自身が持つデキストラングルカナーゼと環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼの2つの酵素の働きで澱粉からCIを生産する。598K株はまず菌体外にこれら2つの酵素を放出してCIを生産し、次にCIを菌体内に取り込み、さらに菌体内のデキストラナーゼで分解して、栄養源として利用することが推定された。もう一方のCI生産菌であるBacillus circulans T-3040株は、CIを分解するデキストラナーゼを持たないことがわかり、CIを利用できないがCIの実用生産には適すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cycloisomaltooligosaccharide (CI)-producing bacteria, Paenibacillus sp. 598K produces CIs from starch with its two enzymes of cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase and dextranoglucanase. The strain 598K release these two extracellular enzymes into the medium to produce CIs, intakes CIs, and then brakes them down with the intracellular dextranase, and finally use them as a source of nutrition. Another CI-producing bacterial strain Bacillus circulans T-3040 does not have dextranase to digest CIs. The strain T-3040 might not be able to utilize CIs, but it may be suitable for commercial CI-producing bacterial strain.

研究分野：酵素科学、微生物学

キーワード：環状イソマルトオリゴ糖 環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ 澱粉 デキストラン

1. 研究開始当初の背景

環状イソマルトオリゴ糖 (CI) は、グルコースが α -1,6 結合した環状糖で (図 1)、微生物により生産される。CI は α -1,6-D-グルカン (デキストラン) を基質として微生物が菌体外に生成する CI グルカノトランスフェラーゼ (CITase) により生産される (文献)。CI の機能性の研究により、歯垢形成阻害作用 (歯垢を作りにくくする作用) 包接作用 (溶けにくい物質を溶かしたり、不安定な物質を安定化させるなどの作用) などを CI が有することが明らかになった (文献)。同時に CI を機能性オリゴ糖として利用するための微生物育種や生産方法の開発などの実用化研究もおこなわれてきた (文献)。しかし、微生物の CI 生産メカニズムや微生物にとっての CI の意義の解明などの研究が立ち遅れていた。

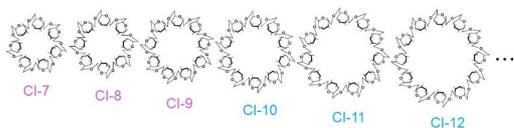


図 1. 環状イソマルトオリゴ糖 (CI) の構造
7 個以上のグルコースが α -1,6 結合で環状に連なった構造である。

2. 研究の目的

CI 生産菌は基質となるデキストラン生産能を持たないため、ショ糖からデキストランを生産する *Leuconostoc* 属菌などの乳酸菌と CI 生産菌との協働でショ糖から CI が生成すると考えてきた (図 2 上)。しかし最近、CI 生産菌を澱粉を含む培地で培養した場合に単独で CI を生産することを見だし (図 2 下)、CITase と協調して澱粉から CI を生産する新規酵素を菌自身が保有することが示唆された (文献)。この新規酵素をデキストラングルカナーゼ (DGase) と名付け、本酵素の諸性質と CI 生産にどのように関与するかを明らかにすることを旨とする。また、CI の酵素生産・制御機構および CI の代謝機構を解明し、菌にとって CI 生産はどのような意義があるのかを明らかにすることを目的とした。

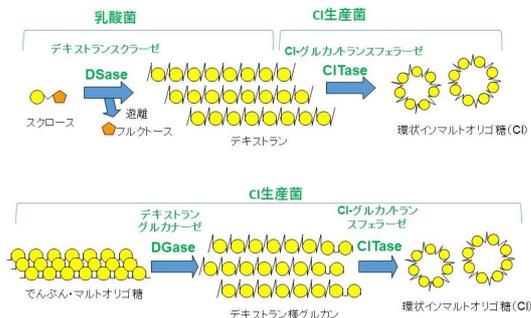


図 2. 環状イソマルトオリゴ糖の生産経路
上：スクロースを原料とした場合。下：澱粉を原料とした場合。

3. 研究の方法

- (1) CI 生産菌である *Bacillus circulans* T-3040 株および *Paenibacillus* sp. 598K 株の DGase の性質を明らかにするために、ネイティブ酵素を単離して諸性質を解明し、N 末端アミノ酸配列情報からコードする遺伝子配列を明らかにし、組換え酵素を用いて、さらに酵素の諸性質を詳細に調べる。酵素の結晶化を試み、X 線結晶構造解析も試みる。
- (2) 組換え DGase の生産物を薄層クロマトグラフィー (TLC) や高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で解析する。さらに反応生成物を HPLC を用いて単離精製し、NMR および質量分析によって構造を明らかにする。
- (3) *B. circulans* T-3040 株および *Paenibacillus* sp. 598K 株のゲノム配列を明らかにし、特に CITase・DGase 周辺、CI の取り込み、分解などに関与すると推定される DNA 塩基配列を探索する。
- (4) 炭素源による CITase、DGase の生産誘導の解析と、これらの酵素と同時に生産誘導される蛋白を二次元電気泳動で探索する。CITase の活性は、デキストランから生産される CI を HPLC で定量し、DGase の活性は、TLC で検出、ネルソン・ソモギー法で還元糖の測定を行い、詳細な生産物の定量は HPLC で行う。
- (5) CI の分解に関与すると考えられる CI 分解酵素遺伝子をクローニング、発現し、コードする蛋白を同定、解析して諸性質を明らかにする。特に様々な重合度のイソマルトオリゴ糖や CI を基質として重合度依存性について調べる。デキストランや CI を加えて培養試験を行い、菌体内に CI の取り込みが起こるかどうかが菌体内 CI の濃度を HPLC で定量する。これらの結果から CI 生産菌の CI 生産・代謝機構を推定する。

4. 研究成果

Paenibacillus sp. 598K 株由来 DGase 遺伝子を大腸菌および枯草菌の宿主 - ベクター系で発現を試みた結果、大腸菌組換えデキストラングルカナーゼ蛋白の大量生産に成功し、精製酵素を結晶化に供した。本酵素は 3 つの糖結合モジュールを有することが明らかになった。598K 株の DGase は CITase のすぐ下流に存在し、両酵素は同一の制御を受け、同時に生産されることが明らかになった。*B. circulans* T-3040 株の DGase の検索も行ったが、本菌株はデキストランからの CI 生産活性が発現する時期と澱粉からの同生産活性が発現する時期に時間差が見られたことから、598K 株とは異なり、CITase と DGase は異なる生産制御を受けていることが示唆された (成果 [雑誌論文])。

Paenibacillus sp. 598K 株由来の DGase が有する 3 つの糖結合モジュールは 2 つの CBM35 と 1 つの CBM61 であることが明らかになった。触媒残基アミノ酸は 2 つのアスパラギン酸であることが明らかになった。これらのア

スパラギン酸をアラニンに置換すると活性が消失した。598K 株の DGase は *B. circulans* T-3040 株における DGase と同様にマルトオリゴ糖分子を分解し、 α -1,6 グルコシド結合を伸張する活性を有した。しかも、 α -1,6 グルコシド結合を 4 分子以上伸張することが確認できた。DGase は Glycoside hydrolase family 31 に属する高転移性 α -グルコシダーゼであることが解明された。他の GH31 酵素でも α -1,6 グルコシド結合転移活性を有するものが知られているが、転移されるグルコースは 1 ないしは多くとも 2 残基であり (文献)、DGase は長鎖 α -1,6 結合鎖を作る特徴を有する新規の酵素であることが示唆された。T-3040 株および 598K 株について、CITase および DGase の誘導条件で培養し、二次元電気泳動を行った。T-3040 株は CITase とフラジェリンが生産誘導された。598K 株は CITase と DGase とフラジェリンおよび GH family 66 に属するデキストラナーゼが生産誘導された。また、T-3040 株はデキストラナーゼを持たないことが明らかになった。598K 株において培養時の糖質の種類がデキストラナーゼ生産に影響を及ぼすかどうか解析したところ、デキストラン含有培地および CI 含有培地で培養した際の菌体抽出液のみでデキストラナーゼ活性が確認された。598K 株をデキストラン培地で培養すると CI が同時に生産される。培地中の CI が菌体内へ取り込まれることも明らかになった。598K 株は、デキストラン培養時に菌体外に CITase を放出して CI を生産し、ついで CI が菌体内に取り込まれ、さらに取り込まれた CI によって菌体内デキストラナーゼが生産誘導されることが推定された。598K 株の CITase が最も多く生産する CI はグルコース 7 分子から成る CI-7 である。CI-7 は市販の真菌類由来のデキストラナーゼではほとんど分解されなかったが、598K 株のデキストラナーゼは CI-7 を効率よく分解した。また、CI-7 を培地に添加して 598K 株を培養した場合、菌体内に CI-7 を取り込むことが明らかになった。598K 株は自身が菌体外に生産する CI を栄養源として利用することが推定された (図 3)。

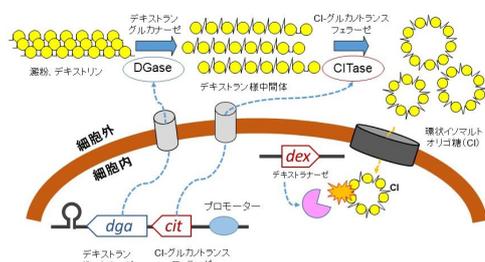


図 3 . *Paenibacillus* sp. 598K 株における澱粉からの CI 生産、取り込み、分解機構モデル

T-3040 株においては、DGase の生産力が低く、

デキストランから CI を生産する速度と比較して、澱粉から CI を生産する速度が非常に遅かった。また菌体内に CI を分解するデキストラナーゼを持たないことが明らかになり、T-3040 株にとっての CI の生理的意義については疑問が残された。しかし、T-3040 株は CI の分解系を持たないために CI 生産実用株としては有用であると考えられる。

< 引用文献 >

Oguma T., Tobe K., Kobayashi M. (1994) Purification and properties of a novel enzyme from *Bacillus* spp. T-3040, which catalyzes the conversion of dextran to cyclic isomaltooligosaccharides. FEBS Lett. 345:135-138.

Funane K., Terasawa K., Mizuno Y., Ono H., Miyagi T., Gibu S., Tokashiki T., Kawabata Y., Kim Y.M., Kimura A., Kobayashi M. (2007) A novel cyclic isomaltooligosaccharide (cycloisomaltodecaose, CI-10) produced by *Bacillus circulans* T-3040 displays remarkable inclusion ability compared with cyclodextrins. J. Biotechnol. 130:188-192.

舟根 和美(2010)微生物酵素による高機能オリゴ糖の生産と応用(サイクロデキストラン合成酵素の構造とメカニズムの解析, および構造・利用技術開発), 食糧 48:45-61.

Funane K., Ichinose H., Araki M., Suzuki R., Kimura K., Fujimoto Z., Kobayashi M., Kimura A. (2014) Evidence for cycloisomaltooligosaccharide production from starch by *Bacillus circulans* T-3040. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98:3947-3954.

Kim Y.K., Kitaoka M., Hayashi K., Kim C.H., Côté G.L. (2003) A synergistic reaction mechanism of a cycloalternan-forming enzyme and a D-glucosyltransferase for the production of cycloalternan in *Bacillus* sp. NRRL B-21195. Carbohydr. Res. 338:2213-2220.

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 1 件)

Ichinose H., Suzuki R., Miyazaki T., Kimura K., Momma M., Suzuki N., Fujimoto Z., Kimura A., Funane K. (2017) *Paenibacillus* sp. 598K 6- α -glucosyltransferase is essential for cycloisomaltooligosaccharide synthesis from α -(1 \rightarrow 4)-glucan., Appl. Microbiol. Biotechnol. 101:4115-4128. (査読有)

(学会発表)(計 4 件)

水島 大貴, 宮崎 剛垂, 木村 啓太郎, 木村 淳夫, 北村 進一, 原 博, 舟根 和美. 環状イソマルトオリゴ糖は *Paenibacillus* sp. 598K 由来 GH family 66 デキストラナーゼの生産に關する. 日本農芸化学会 2017 年度大会 2017.3.18 「京都女子大学 (京都府・京都市)」

水島 大貴, 宮崎 剛亜, 志波 優,
吉川 博文, 木村 啓太郎, 木村 淳夫, 北村 進
一), 原 博, 舟根 和美. *Paenibacillus* sp. 598K
由来 GH66 デキストラナーゼの機能特性. 日
本応用糖質科学会平成 28 年度大会, 2016.9.14
「福山大学宮地茂記念会館 (広島県・福山
市) 」

Funane K., Suzuki R., Ichinose, H.,
Miyazaki T., Mizushima D., Kimura K.,
Fujimoto Z., Suzuki S., Kitamura S., Kimura A.,
Hara H. Enzymatic production of
potential solubilizing agents,
cycloisomaltomegalosaccharide
and α -1,3 branched
cycloisomaltomegalosaccharide
XXIII International Carbohydrate Symposium
(ICS2016), 2016.7.18 [New Orleans Marriott
(New Orleans, LA, USA)]

宮崎 剛亜, 木村 啓太郎, 村上 真,
鏡 朋和, 舟根 和美. 環状イソマルトオリゴ
糖グルカノトランスフェラーゼ生産菌におけ
る培地窒素源の酵素生産への影響. 日本応用
糖質科学会平成27年度大会, 2015.9.16 「奈良
春日野国際フォーラム 薨~I・RA・KA~(奈
良県・奈良市) 」

6 . 研究組織

(1)研究代表者

舟根 和美 (FUNANE, Kazumi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・食品研究部門 食品生物機能開
発研究領域・主席研究員

研究者番号：9 0 3 5 3 9 5 3