



Title	環状四糖を生成する新規酵素及びデンプンからの環状四糖製造法に関する研究
Author(s)	阿賀, 創
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44718
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	阿 賀 創 ^{はじめ}
博士の専攻分野の名称	博 士（工 学）
学 位 記 番 号	第 1 8 2 4 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 1 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 名	環状四糖を生成する新規酵素及びデンプンからの環状四糖製造法に関する研究
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授 卜 部 格 （副査） 教 授 室 岡 義 勝 教 授 小 林 昭 雄 教 授 清 水 浩

論文内容の要旨

本論文は、デンプンから環状四糖 (*cyclo*{ $\rightarrow 6$)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow) を生成する微生物の単離、環状四糖生成に関与する 2 種の新規酵素の発見、酵素の精製と性質調査、環状四糖生成機構の解明、酵素遺伝子のクローニング、工業的に有用な耐熱性酵素の取得、デンプンからの工業的製造法の確立と実証、さらに応用の一例として分岐環状四糖の合成についてまとめたものである。

緒論では、本研究の背景をなす知見を概説し、本論文の目的と意義について述べている。

第1章では、土壤中の微生物を検索し、培養液中に環状四糖を産生する *Bacillus globisporus* C11 株を取得している。C11 株の培養上清から環状四糖の生成に関与する2種の新規酵素、6- α -グルコシルトランスフェラーゼ (6GT) と 3- α -イソマルトシルトランスフェラーゼ (IMT) を発見している。6GT の分子間 α -1,6 グルコシル転移反応、IMT の分子間 α -1,3 イソマルトシル転移反応、IMT の分子内環状化反応の3段階の反応で環状四糖が生成することを明らかにしている。

第2章では、*B. globisporus* C11株の6GT遺伝子及びIMT遺伝子のクローニングを行っている。両酵素のアミノ酸配列には、シグナルペプチド様配列が存在し、糖加水分解酵素ファミリー31に属する α -グルコシダーゼに共通する保存領域と推定触媒残基の2つのアスパラギン酸が保存されていることを明らかにしている。両酵素遺伝子は、染色体上で隣接して存在し、さらに環状四糖の菌体内への取込に関与すると推定される蛋白質遺伝子などと遺伝子クラスターを形成していることを見出している。

第3章では、環状四糖の工業的製造のために、液化デンプンを原料とする糖化反応に使用可能な、C11 株酵素より耐熱性の高い酵素生産菌を土壌より検索し、*B. globisporus* N75 株を単離している。粗酵素による環状四糖生成試験では C11 株酵素と比べて 10℃ 高い温度での反応が可能であることを明らかにしている。本菌株の 6GT と IMT について酵素の精製と性質調査、酵素遺伝子のクローニングと塩基配列決定を行っている。両酵素のアミノ酸配列は、N75 株と C11 株で高度に保存されており、両酵素遺伝子のゲノム上での配置も似ていることを明らかにしている。

第4章では、デンプンからの環状四糖の製造法の検討を行っている。デンプン部分分解物からの環状四糖生成率は62%に達することを示している。高濃度基質での反応では、シクロデキストリン合成酵素との併用で環状四糖生成率を高めることができています。液化デンプンを原料にトンスケールで環状四糖5含水結晶を製造している。

第5章では、環状四糖の利用や、環状四糖への機能性付加を目的に、リゾチームによる新規分岐環状四糖の合成を

行っている。新規ヘテロ分岐環状四糖が反応収率9%で合成できている。

総括では、本研究で得られた成果をまとめて述べている。

論文審査の結果の要旨

様々な分野で、新しい機能性を持った素材の開発が望まれている。本論文は、デンプンを原料とした糖質の新しい製造法を目指して、自然界から環状四糖 ($\text{cyclo}\{\rightarrow 6\}\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-}\{\rightarrow 3\}\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-}\{\rightarrow 6\}\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-}\{\rightarrow 3\}\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-}\{\rightarrow 1\}\}$) を生成する微生物を単離し、環状四糖生成に関与する2種の新規酵素を発見している。これら酵素の精製と性質調査、環状四糖生成機構の解明、両酵素遺伝子のクローニング、工業的に有用な耐熱性酵素の取得を行い、デンプンからの環状四糖の工業的製造法の確立と実証を行っている。さらに環状四糖の応用の一例として分岐環状四糖の合成を試みている。

これらの成果を要約すると以下のとおりである。

- (1) 土壌から培養液中に環状四糖を産生する *Bacillus globisuporus* C11 株を取得し、C11 株の培養上清から環状四糖の生成に関与する2種の新規酵素、6- α -グルコシルトランスフェラーゼ (6GT) と 3- α -イソマルトシルトランスフェラーゼ (IMT) を発見している。6GT と IMT が触媒する3段階の反応でマルトオリゴ糖から環状四糖が生成することを明らかにしている。
- (2) C11 株の 6GT 遺伝子及び IMT 遺伝子をクローニングしてその塩基配列を決定し、糖加水分解酵素ファミリー31に属する α -グルコシダーゼと共通する保存領域と推定触媒残基を見出している。両酵素遺伝子が染色体上で隣接して存在し、さらに環状四糖の菌体内への取込に関与すると推定される蛋白質遺伝子などと遺伝子クラスターを形成していることを見出している。
- (3) C11 株酵素と比べて 10℃高い温度での反応が可能である、工業的な利用価値が高い耐熱性酵素を生産する *B. globisuporus* N75 株を土壌より単離している。
- (4) デンプンからの環状四糖の製造法の検討を行い、液化デンプンを原料にトンスケールで環状四糖 5 含水結晶を製造している。
- (5) 環状四糖への機能性付加を目的に、リゾチームにより新規分岐環状四糖を合成し、その構造を明らかにしている。

以上のように、本論文は、2種の新規酵素の発見によって、様々な分野での利用が期待される環状四糖の大量・安価な製造法を確立しており、酵素工学ならびに応用生物工学の発展に寄与するところが多い。

よって本論文は博士論文として価値があるものと認める。