

氏名(本籍)	しゅう 周	けん 建	か 華	(中 国)
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	博 甲 第 933 号			
学位授与年月日	平 成 4 年 1 月 31 日			
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当			
審査研究科	農 学 研 究 科			
学位論文題目	Biochemical studies on maltotetraohydrolase from <i>Pseudomonas saccharophila</i> (<i>Pseudomonas saccharophila</i> 由来のマルトテトラオハイドロラーゼに関する 生化学的研究)			
主 査	筑波大学教授	理学博士	新 井	勇 治
副 査	筑波大学教授	農学博士	村 上	和 雄
副 査	筑波大学教授	農学博士	日 下	部 功
副 査	筑波大学助教授	農学博士	田 仲	可 昌
副 査	筑波大学助教授	農学博士	星 野	貴 行

論 文 の 要 旨

マルトテトラオース (G_4) は4分子のグルコースが α -1,4で直鎖状に結合しているオリゴ糖である。 G_4 を含むマルトオリゴ糖は低甘度で粘度が高く、優れた吸保湿性をもつので、食品及び製菓の用途に利用されつつある。従来、マルトオリゴ糖は澱粉を酸あるいは α -アミラーゼで水解して得られる水飴からクロマトグラフィーにより精製されていたが、近年発見されたマルトオリゴ糖生成アミラーゼを利用することにより高純度のマルトオリゴ糖をより簡単な方法で大量に精製することが可能になりつつある。

本研究は、マルトオリゴ糖生成アミラーゼ (G_4 酵素) を産生する *Pseudomonas saccharophila* を用いて、まず G_4 酵素遺伝子 (mta) のクローン化とその全塩基配列を決定し、ついでクローン化した遺伝子を大腸菌で発現させて、組換え型酵素と野生型酵素の諸性質を比較検討し、さらに G_4 酵素の構造との相関について検討している。

まず、*P. saccharophila* IAM 1504から染色体DNAを抽出し、それを制限酵素 *Sau 3 AI* で部分分解し、得られたDNA片を λ ファージL47 DNAの *B am HI* siteに連結して組換えファージを作製した。澱粉分解活性を指標として、2つの陽性クローン λ GF101と λ GF102を選抜した。薄層クロマトグラフィーで分析した結果、この2つのクローンからの酵素による澱粉分解産物は G_4 であった。 λ GF102からmtaを含む3.1kbp断片をプラスミドにサブクローン化し、発現した酵素が G_4 酵素抗体と特異的に反応することをWestern blotにより確認した。サブクローンpGF11中の2.3kbp *X ba I*

断片をプローブとしてSouthern blotを行い、この断片が*P. saccharophila*から由来することを確認した。以上の結果から、mtaは大腸菌にクローン化されたことがわかった。この遺伝子を含む3.1kbpのクローン化した断片の塩基配列を決定した。塩基配列からG₄酵素は551個のアミノ酸から成り、分子量が59,987と計算された。野生型酵素のN末端アミノ酸は22残基目から始まっており、その前部はシグナルペプチドであると推定された。推定したG₄酵素のアミノ酸配列を他のアミラーゼのアミノ酸配列と比較したところ、酵素活性に関する4つの共通構造領域がG₄酵素にも存在していた。また、本酵素活性は、遺伝子断片のベクター中での向きや5'-flanking regionの長さにかかわらず大腸菌クローンから検出されており、この発現はmtaプロモーターによるものと考えられる。

組換え型酵素の大腸菌の局在を調べた結果、酵素の約90%がペリプラズムに存在していた。その酵素のN末端アミノ酸、アミノ酸組成、分子量などは野生型酵素の結果とよく一致していた。

大腸菌で発現させたG₄酵素をV8プロテアーゼで部分分解した後、反応生成物をSDS-PAGEで分離し、アミラーゼ活性染色を行った。得られた数本の活性バンドより酵素を抽出し、澱粉と反応させたところ生成物はいずれの画分もG₄であった。ただし、42kDa以下のバンド相当の酵素活性は著しく低かった。43kDa酵素のN末アミノ酸配列は、野生型酵素の配列と同一であった。したがって、43kDa酵素のC末側の約1kDaの部分は酵素活性の強さに関与していることを示唆している。

ついで、G₄酵素のC末端側の機能を調べるために、対応する遺伝子塩基を欠失させたクローンを作成した。C末端から14, 20, 76, および104個のアミノ酸残基を欠失した変異体からは、Western blotと活性染色に陽性を示す46kDaのタンパク質が得られた。しかし、151, 233および295個のアミノ酸残基を欠失したクローンからはG₄酵素活性をもつタンパク質は検出されなかった。4つの変異体で発現した46kDaタンパク質と野生型酵素(56kDa)を比較検討したところ、比活性、温度安定性、澱粉分解産物、N末端アミノ酸配列などはほぼ同じであったが、生澱粉への吸着能が大きく異なっていた。欠失した約10kDaのC末端側ペプチドは生澱粉吸着に関与するドメインを含んでいることが示唆された。またC末端の14残基以上を欠失した4つの変異体タンパク質が、いずれも46kDaタンパク質であることから、この14残基のペプチドは46kDaタンパク質になるプロセッシングを妨げる役割をもつことが推測された。

さらに、C末端から151残基以上を欠失したタンパク質がアミラーゼ活性を示さないことから、この領域の機能を調べるために、C末端より216-152, 218-133および220-130番相当のアミノ酸残基を欠損した変異タンパク質を作出した。いずれもG₄酵素活性は認められず、分子量も23~30kDaと小さかった。G₄酵素はC末端より152-216残基間を欠失することによって不安定な状態となり、分子量の減少や不活性化を誘起することが推測された。

審 査 の 要 旨

本研究は、*P. saccharophila*由来のマルトオリゴ糖生成アミラーゼの遺伝子を大腸菌にクローニングし、その発現に成功している。大腸菌で発現した酵素が野生型酵素と同じであること、反応生成

物特異性、活性の強度、生澱粉吸着能などに関与する領域を明らかにしたことは、独創性のある研究として高く評価できる。また、マルトオリゴ糖を大量に生産することに道を拓いたものとして、醸酵工業、食品工業への貢献が大である。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。