総説

Molecular Analysis of Cycloisomaltooligosaccharide Glucanotransferase and Novel Pathway for Cycloisomaltooligosaccharide Production in *Bacillus circulans* T-3040*

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分子解析と *Bacillus circulans* T-3040 株における環状イソマルトオリゴ糖の新規な生合成経路の発見*

(2010 年 12 月 16 日受付, 2011 年 1 月 24 日採択)

舟根和美^{1,**}, 川端康之², 鈴木龍一郎¹, 藤本 瑞³,
北岡本光⁴, 木村淳夫⁵, 小林幹彦⁶

(ふなね かずみ, かわばた やすゆき, すずき りゅういちろう, ふじもと ずい,
きたおか もとみつ, きむら あつお, こばやし みきひこ)

Kazumi Funane,^{1,**} Yasuyuki Kawabata,² Ryuichiro Suzuki,¹ Zui Fujimoto,³
Motomitsu Kitaoka,⁴ Atsuo Kimura⁵ and Mikihiro Kobayashi⁶

¹ 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所微生物利用研究領域
305-8642 つくば市観音台 2-1-12

² 大阪樟蔭女子大学健康栄養学科
577-8550 大阪府東大阪市菱屋西 4-2-26

³ 農業生物資源研究所タンパク質機能研究ユニット
305-8602 つくば市観音台 2-1-2

⁴ 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
食品総合研究所食品バイオテクノロジー研究領域
305-8642 つくば市観音台 2-1-12

⁵ 北海道大学大学院農学研究院
060-8589 札幌市北区北 9 条西 9 丁目

⁶ 実践女子大学生生活科学部
191-8510 東京都日野市大坂上 4-1-1

¹ Applied Microbiology Division, National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization
2-1-12 Kannondai, Tsukuba 305-8642, Japan

² Faculty of Food Science and Nutrition, Osaka Shoin Women's University
4-2-26 Hishiyaniishi, Higashiosaka 577-8550, Japan

³ Protein Research Unit, National Institute of Agrobiological Sciences
2-1-2 Kannondai, Tsukuba 305-8602, Japan

⁴ Food Biotechnology Division, National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization
2-1-12 Kannondai, Tsukuba 305-8642, Japan

⁵ Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University
Kita-9 Nishi-9, Kita-ku, Sapporo 060-8589, Japan

⁶ Department of Food and Health Science, Jissen Women's University
4-1-1 Osakaue, Hino 191-8510, Japan

要旨: *Bacillus circulans* T-3040 株由来の環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ (CITase, EC 2.4.1.248) は、デキストランから環状イソマルトオリゴ糖および環状イソマルトメガロ糖 (両者あわせてサイクロデキストラン, CI) を合成する酵素であり, 中でもグルコース 8 分子から成る CI-8 を最も多く生産する。部位特異的変異導入により N 末端領域 (Ser 1-Gly 403) に在る Asp 145, Asp 270, Glu 342 が触媒活性に重要な役割を果たすことが示唆された。C 末端領域を 4 つ (R 1, Tyr 404-Tyr 492; R 2, Glu 493-Ser 596; R 3, Gly 597-Met 700; R 4, Lys 701-Ser 934) に分け欠失変異導入を行った結果, R 2 および R 3 は CITase に必須, R 1 および R 4 は糖質結合モジュールであり, R 1 は CI-8 生産特異性と酵素の安定化にも関与することが示唆された。CI-Tase は, 生産菌をデキストランを炭素源として培養した場合に生産誘導されると考えられていたが, T-3040 株の CITase はデンプンを炭素源として培養した場合にも生産誘導された。これまでの CI 生産にはショ糖からデキストランを生産する菌株を必要としていたが, 1 菌株でデンプンから CI を生産する系が存在することが示唆された。

* 本原稿は, 日本応用糖質科学会平成 22 年度大会の糖質関連酵素化学シンポジウムで一部発表された。

** 連絡先(Tel. 029-838-8075, Fax: 029-838-8122, E-mail: funane@affrc.go.jp)

キーワード：環状イソマルトオリゴ糖，環状イソマルトメガロ糖，サイクロデキストラン，環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ，*Bacillus circulans****

1. はじめに

環状イソマルトオリゴ糖 (CI) は、著者らの研究グループが1993年に発見したグルコースの重合度が7から9までのオリゴ糖 (CI-7, CI-8, CI-9) である¹⁾。CIはサイクロデキストリン (環状マルトオリゴ糖, CD)²⁾と同様グルコースが環状に連結した構造であるが、結合様式がCDは α -1,4結合なのに対してCIは α -1,6結合である点異なる。後に、重合度10以上の環状イソマルトメガロ糖 (メガロ糖は重合度が10以上100程度までの、オリゴ糖と多糖の中間サイズの糖質³⁾)が発見され、これまでにCI-10~CI-17が構造決定されている^{4,5)}。CIはきわめて水溶性が高く、う蝕菌のグルカン合成酵素を阻害して歯垢の形成を防ぐ作用をもち⁶⁾、2008年にグルカン合成阻害作用を利用した製品が実用化された。CD同様CIも環の中に分子を取り込む包接機能が期待されていたが、CI-7, -8, -9には強い包接能は見いだされていない⁷⁾。しかし、より高分子のCI-10にビクトリアブルーBの安定化能が見いだされ⁸⁾、環状イソマルトメガロ糖に包接剤としての機能が期待されている。

CIは環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ (CITase, EC 2.4.1.248) によって、デキストランを基質とした分子内転移反応により生産される⁹⁾。CITaseはCAZyデータベース (<http://www.cazy.org/>) では Glycoside Hydrolase family 66 (GH 66) に分類されている。ここに登録されているCITaseは*Bacillus circulans* T-3040株および*B. circulans* U-155株由来のもの2種類のみであり、他はデキストラナーゼである。現在最も良く研究されているT-3040株由来のCITaseはグルコース分子8個から成るCI-8を最も多く生産する。CITaseの主反応はCIを生産する環状化反応であるが、加水分解反応、不均化反応、カップリング反応も触媒することが知られている⁹⁾。しかし、GH 66酵素は3D構造が発表されておらず、酵素の構造と反応機構は未解明の部分が多い。そこで筆者らはCITaseの反応機構について知見を得ることを目的として、CI合成活性に関与する触媒アミノ酸残基の検索を行い、また、酵素のC末端欠変異酵素を作製することにより非触媒

領域の機能解明を試みた。

CITaseはデキストランを炭素源として生産菌を培養した場合に生産誘導される酵素である⁹⁾。すなわち*Leuconostoc*属の乳酸菌がデキストランスクラーゼの働きでショ糖からデキストランを合成し¹⁰⁾、次にCI生産菌がデキストランを原料としてCITaseの働きでCIを合成する2種類の菌株あるいは酵素を必要とする生合成系であり、現在この系を利用してCIの工業生産が行われている。しかし、この方法ではショ糖のフルクトース部分が利用されず、原料からの転換効率が50%を超えない。より効率の良いCI生産法を開発することを目的として、グルコース原料からCIを生産する新たな生合成系を探索した結果、*B. circulans* T-3040株がデンプンからCIを作る新規の酵素生産系を有することが示唆された。

2. 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触媒アミノ酸の検索

CITaseと同じGH 66に属する*Streptococcus mutans*由来のデキストラナーゼでは、活性中心は(379)FDGIHVDQNGQR (390)であり、触媒アミノ酸はAsp 385で、Asp 380は活性発現に関与しないと報告された¹⁰⁾。Fig. 1のGH 66酵素のアミノ酸配列アラインメントを示した図にデキストラナーゼの活性中心と活性中心アスパラギン酸残基の位置を示した。CITaseにおいてもアスパラギン酸などのカルボキシル基をもつアミノ酸が触媒活性に重要な役割を果たすかどうかを明らかにするために、まず、水溶性カルボジイミド (EDC) で化学修飾を行った¹¹⁾。精製した*B. circulans* T-3040株由来の大腸菌リコンビナントCITase約1.5 μ g (約1.4 mU, CITase活性はデキストラン40を基質として生成したCIをHPLCで定量することによって測定した。1 Uは1分間にCI-7, CI-8, CI-9の総和として1 μ molのCIを生産する酵素量とした。)に0~20 mMのEDCと80 mMのグリシンエチルエステル (GEE) を加えてリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.5), 30°Cの条件で化学修飾した。20 mMのEDCでは15分で活性が40%に低下し、60分で活性はほぼ消失した。Fig. 2(a) に示すよう

***Key words: cycloisomaltooligosaccharide, cycloisomalto megalosaccharide, cyclodextran, cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase, *Bacillus circulans*

注記: CBM, 糖質結合モジュール, carbohydrate-binding module; CD, サイクロデキストリン, cyclomaltodextrin; CGTase, サイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ, CD glucanotransferase; CI, 環状イソマルトオリゴ糖, cycloisomaltooligosaccharide; CITase, 環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ, CI glucanotransferase; EDC, 水溶性カルボジイミド, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide; GEE, グリシンエチルエステル, glycine ethyl ester; GH, 糖質加水分解酵素ファミリー, glycoside hydrolase family; HPLC, 高速液体クロマトグラフィー, high-performance liquid chromatography; IG, イソマルトオリゴ糖, isomaltooligosaccharide; R1, R2, R3, R4, *Bacillus circulans* T-3040株由来CITaseの順にTyr 404-Tyr 492, Glu 493-Ser 596, Gly 597-Met 700 およびLys 701-Ser 934領域; TIM, トリオースリン酸イソメラーゼ, triosephosphate isomerase.

Fig. 1. Amino acid sequence alignment of GH 66 enzymes.

BciTCIT, CITase from *B. circulans* T-3040 (GenBank ID: D 61382); BciUCIT, CITase from *B. circulans* U-155 (D 88360); BthDXA, dextranase from *Bacterioides thetaiotaomicron* VPI-5482 (AE 016938); PspDXA, dextranase from *Paenibacillus* sp. (AY 326313); SmuDXA, dextranase from *Streptococcus mutans* Ingbritt dexA (D 49430); SdoDXA, dextranase from *S. downei* (AB 052705); SraDXA, dextranase from *S. rattus* (AB 106112); SsaDXA, dextranase from *S. salivarius* (D 29644). Residues highlighted on a solid background were conserved in all proteins. Residues with closed circles are Asp 270 and Glu 342, and the one with white circle is Asp 145 in T-3040 CITase. A deduced catalytic site of *S. mutans* dextranase⁽¹⁰⁾ is enclosed within a square. The N-terminal conserved region and R 1, R 2, R 3 and R 4 regions of BciTCIT are indicated above the amino sequence of T-3040 CITase.

に修飾時間に対する残存活性を片対数グラフでプロットすると擬一次速度式で表すことができたが、 $\log [\text{EDC (mM)}]$ と $\log [k (\text{min}^{-1})]$ の傾きは0.45となり (Fig. 2 (a) 中図), EDCによる酵素の失活は1:1のモル比では起こっていなかった。Fig. 2 (b) に示すように、イソマルトテトラオース (IG 4) および CI-8 を加えると、EDCによる失活が保護されることがわかった。さらに Fig. 1(c) より EDCは拮抗阻害剤のような挙動を示し、 K_i は5.61 mMであった。以上のことから CITase も GH 66 デキストラナーゼ同様、カルボキシル基が触媒活性に重要な役割を果たすことが示唆された。

次に、GH 66 酵素に保存されているアスパラギン酸またはグルタミン酸を検索し、これらについて1アミノ酸置換させた変異体の性質を調べることによって触媒アミノ酸残基の検索を行った⁽¹¹⁾。T-3040株のCITaseにおいて、GH 66 ファミリーに保存されている Asp 245, Asp 265, Asp 270, Glu 342のうち *S. mutans* のデキストラナーゼにおいて触媒アミノ酸ではないと報告された Asp 265を除いた3つのアミノ酸について、変異酵素 D 145 N, D 270 N, E 342 Q を作製し、野生型 CITase と比較した。Asp 270 が *S. mutans* のデキストラナーゼで推定されている触媒アミノ酸 Asp 385に相当する。野生型 CITase の $V_{\max}$ は $0.872 \text{ pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

min⁻¹ (酵素 1 μg が 1 分間に生産する CI-7 + CI-8 + CI-9 のモル数を示す。)であったが、D 145 N は 0.941×10^{-2} pmol·μg⁻¹·min⁻¹ と 1/100 に低下し、D 270 N は約 1/1,000、E 342 Q は大部分が不溶化し、活性が消失した。さらに D 270 A、E 342 A を作製したところ、D 270 A は活性が消失し、E 342 A も E 342 Q と同様に大部分が不溶化し、活性が消失していた。D 145 N 変異酵素のデキストラン 40 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) に対する K_m 値は

6.02×10^{-2} mM であり、野生型 CITase の 6.30×10^{-2} mM とほぼ同じであった。以上の結果から、T-3040 株 CITase の Asp 270 は GH 66 のデキストラナーゼ同様活性発現に重要な役割を果たすアミノ酸であり、Glu 342 も重要であると推定された。Asp 145 は D 145 N 変異酵素の K_m 値が野生型と変化がないことから、直接触媒活性に関与するアミノ酸ではないと推定できるが、変異酵素活性が 1/100 に低下したことから酵素反応に何らかの関与をしている可能性もあると考えられる。

Fig. 2. Inactivation of CITase by EDC.

(a) Semilogarithmic plots of remaining CITase activity versus incubation time with various EDC concentrations. ●, EDC 0 mM; ○, 2 mM; ■, 5 mM; □, 10 mM; △, 20 mM. The insert shows the relationship between log [EDC (mM)] and log k , where k is a pseudo-first-order rate constant obtained from the slopes of the plots in panel (a). (b), Substrate inhibition of EDC-inactivation of CITase. ●, 0 mM EDC, 15.0 mM IG 4; ○, 0 mM EDC, 7.7 mM CI-8; ▲, 20 mM EDC, 15.0 mM IG 4; △, 20 mM EDC, 7.7 mM CI-8; □, EDC 20 mM. (c), EDC as a competitive inhibitor of the CITase reaction. ○, 0 mM EDC; ●, 5 mM EDC. Yamamoto *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1947–1953 (2006)¹¹⁾より転載。

3. 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C末端領域の解析

1) CITase のC末端領域欠損変異酵素の作製

GH 66 酵素のアミノ酸配列を比較した結果 (Fig. 1) を基に、CITase のアミノ酸配列を N 末端より触媒領域 (403 アミノ酸残基)、R 1 (89 残基)、R 2 (104 残基)、R 3 (104 残基)、R 4 (234 残基) の 5 領域に分けた。触媒領域と R 2、R 3 領域はすべての GH 66 酵素に存在したが、R 1 領域はデキストラナーゼにはみられず、CITase 特有の領域 (CITase-specific insertion) と考えられた¹²⁾。R 4 領域はデキストラナーゼではほとんどないものから長いものまで大きさがまちまちであった。

Fig. 3 に示すように C 末端から順に R 4 を欠失した M

Fig. 3. Construction maps of the deletion mutants of CITase.

The primary structures of (His)₆-tagged CITase and 15 C-terminal deletion mutant enzymes are depicted. The original N-terminal signal sequence of CITase was replaced with (His)₆-tag and thrombin site sequences. Generation of the (His)₆-tag sequence introduced an additional amino acid sequence of MGSS-. Asp 145, Asp 270 and Glu 342 are indicated with arrows. CITase activity of the enzymes is indicated as + (active) or - (inactive). (a) Deletion mutants from the C- to N-terminal end. (b) One site-deletion mutants. (c) Two sites-deletion mutants. (d) Three sites-deletion mutants.

Table 1. Characteristics of wild-type CITase and its C-terminal deletion mutants.

CITase	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	CI/IG (% w/w)	pH opt.	Temp. opt. (°C)	pH stability	Temp. stability (°C)	Effects of divalent cations (%)				Relative amounts of produced CIs (%)					
								CaCl ₂	MgCl ₂	CuCl ₂	ZnCl ₂	CI-7:	CI-8:	CI-9:	CI-10:	CI-11:	CI-12
Wild-type	6.30×10^{-2}	3.03	95/5	5.5	40	5.0–10.0	≤ 50	140	105	37	62	48	100	50	30	36	33
M 123 Δ	2.17×10^{-1}	2.92	90/10	5.5	40	5.0–10.0	≤ 50	120	93	27	45	32	100	41	35	38	35
M Δ 234	9.20×10^{-2}	1.70×10^{-1}	86/14	6.0	30	5.5–10.0	≤ 40	154	154	21	0	110	100	129	89	126	114
M Δ 23 Δ	9.70×10^{-1}	1.62×10^{-1}	84/16	6.5	25	6.0–8.5	≤ 35	201	150	0	0	96	100	104	99	124	114

CITase activity was measured by incubating the enzyme at each optimum pH and temperature for 30 min. For the pH-stability test, the remaining CITase activity was measured after incubation of the enzyme for 10 min at pH 3.0–10.0 (40 mM sodium acetate for pH 3.0–5.5 and 40 mM Tris-maleate for pH 5.5–10.0) and room temperature. For the temperature-stability test, the remaining CITase activity was measured after incubation of the enzyme for 10 min at 20–70°C and each optimum pH. Reaction mixture (100 μ L) possessed CITase activity of 1–2 mU (wild-type enzyme and M 123 Δ , 0.5–1.5 μ g; M Δ 234 and M Δ 23 Δ , 10–30 μ g). Concentration of dextran 40 was estimated from its averaged molecular mass of 40 kDa. Effects of divalent cations were measured with and without divalent cations. Activity without divalent cations is expressed as 100%. The concentration of CuCl₂ is 1 mM and that of others is 10 mM. Relative amounts of produced CI-7 : CI-8 : CI-9 : CI-10 : CI-11 : CI-12 were indicated with CI-8 as 100%.

123 Δ , R 3 と R 4 を欠失した M 12 $\Delta\Delta$, R 2, R 3, R 4 を欠失した M 1 $\Delta\Delta\Delta$ および R 1, R 2, R 3, R 4 を欠失した M $\Delta\Delta\Delta\Delta$ を構築した¹³⁾. R 4 を欠損した M 123 Δ は CI 合成活性を有したが, 他は活性がなかった。次に 1 個の領域のみ欠損した変異酵素 M 12 Δ 4, M 1 Δ 34, M Δ 234 を作製したところ R 1 を欠損した M Δ 234 にのみ CI 合成活性が検出された。さらに 2 領域欠損の M 1 Δ 3 Δ , M Δ 23 Δ , M 1 $\Delta\Delta$ 4, M Δ 2 Δ 4, M $\Delta\Delta$ 34 および 3 領域欠損の M Δ 2 $\Delta\Delta$, M $\Delta\Delta$ 3 Δ , M $\Delta\Delta\Delta$ 4 を作製したところ, 活性を有したのは M Δ 23 Δ のみで, 他は不活性型であった。不活性型酵素は CI 合成活性だけでなく, 加水分解活性も検出されなかった。R 2 または R 3 領域の両方, あるいはいずれかを欠損した変異酵素は不活性型となり, R 2 と R 3 領域は酵素活性発現に必須であることが示唆された。一方, R 1 または R 4 領域の両方, あるいはいずれかを欠損した変異酵素は CI 生産活性を有しており, これらの領域は CI 生産反応のために必須な領域ではないことが推定された¹³⁾。

2) 活性型変異酵素 M 123 Δ , M Δ 234, M Δ 23 Δ の解析

R 1, R 4 領域の欠損変異酵素には CI 生産能が保持されていたが, これらの領域が酵素反応に何らかの役割を有することも考えられるため, M 123 Δ , M Δ 234, M Δ 23 Δ の性質を詳しく解析することとした。Table 1 に示すようにデキストラン 40 に対する K_m 値は野生型と比較して M 123 Δ は 3.5 倍, M Δ 234 は 1.5 倍, M Δ 23 Δ は 15 倍となり, R 1 または R 4 欠損変異酵素は基質デキストランに対する親和性が低下した。CITase が 2 カ所に糖質結合モジュール carbohydrate-binding module-35 (CBM 35) を有すると Bolam らが示唆している¹⁴⁾こともあり, R 1 および R 4 領域は基質の結合に関与する CBM であることが推定された。CI とイソマルトオリゴ糖の生産比は野生型酵素よりも変異酵素の方が若干加水分解産物であるイソマルトオリゴ糖の割合が多くなったが, いずれの場合も主生産物が CI であり, R 1, R 2, R 3, R 4 は分子内転移反応を司る部位ではないと推定された。R 4 のみを欠損した M 123 Δ は至適 pH・温度および pH・温度安定性は野生型と変化がなかった。一方, R 1 を欠損した M Δ 234 と M Δ 23 Δ は pH

安定領域が狭まり, 温度安定性が低くなり, 至適 pH がややアルカリ側にシフト, 至適温度も低下した。このことから R 1 は酵素の安定性にも寄与していると考えられた。CITase は Ca²⁺により活性化されると報告されている¹⁵⁾。2 価カチオンの効果を調べた結果, M Δ 234 と M Δ 23 Δ は野生型よりも CaCl₂ や MgCl₂ による活性化や CuCl₂ や ZnCl₂ による阻害がより顕著に現れた。CITase は立体構造が未だ明らかにされていないが, 1 つの可能性として, R 1 領域は活性中心付近にあって触媒部位を覆う形になっており, これが取り除かれた M Δ 234 と M Δ 23 Δ が 2 価カチオンの影響をより強く受けることも考えられる。次に, 野生型と変異酵素 M 123 Δ , M Δ 234, M Δ 23 Δ が生産した CI を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定量した。M 123 Δ 変異酵素は野生型同様 CI-8 を最も多く生産したが, R 1 を欠損した M Δ 234, M Δ 23 Δ は CI-8 を特異的に生産する性質が消失し, CI-8 も他のサイズの CI とほぼ同程度の生産量しかみられなかった。R 1 は活性中心の近傍にあって活性クレフトを狭めるか, あるいは特異的に 8 連のグルコースを進入しやすくする性質があつて CI-8 ができやすくなるのではないかと考えられた。

以上の結果から R 1 は基質との結合に加えて CI-8 を選択的に生産する生産物特異性と酵素の安定化に関与すること, R 2 と R 3 は活性の発現と構造の維持に必須の領域で CITase としての最小単位は「触媒領域 + R 2 + R 3」であること, R 4 は基質と結合する部位であることが示唆された¹³⁾。

4. デンプンを原料とするサイクロデキストランの新規な生合成経路

B. circulans T-3040 株はデキストランを炭素源として培養した場合に CITase が生産誘導されて菌体外に分泌され, 同時に培養液中に CI が蓄積される⁸⁾。微生物が, デキストラン以外の炭素源から CI を合成する経路をもつ可能性を考え, グルコース, マルトオリゴ糖, イソマルトオリゴ糖, デンプンなどの炭素源で T-3040 株を培養し, 培養液

Fig. 4. HPLC analysis of oligo- and megalosaccharides produced by T-3040 strain cultured with various carbon sources.

B. circulans T-3040 was cultured with 2% of each carbon source in Luria-Bertani medium (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD) at 30°C for 3 d with shaking. Oligo- and megalosaccharides produced in culture supernatants were detected using the TSKgel Amide-80 column (4.6 × 250 mm; Tosoh Corporation, Tokyo, Japan). (1) Standard CI-7, CI-8, CI-9, CI-10, CI-11 and CI-12 (C-I Bio Ltd. Nishihara, Okinawa, Japan). Culture supernatant grown with dextran 40 (2), soluble starch (3), glucose (4), isomaltooligosaccharides (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) (5) and Fujioligo G 67 (maltooligosaccharides) (Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd., Fuji, Japan) (6).

中のオリゴ糖やメガロ糖を HPLC で分析した (Fig. 4)。グルコース、マルトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖を炭素源とした場合は基質とその分解物のピークしか観察できず、顕著な CI の生産は観察できなかったが (Fig. 4 (4), (5), (6)), 可溶性デンプンで培養した場合にはデキストランで培養した場合に生成する CI-7~CI-12 と同じ保持時間に溶出するピーク a, b, c, d, e, f が観察された (Fig. 4 (3))。これらのピークを分離精製して ^{13}C NMR を行った結果、すべてグルコースが α -1,6 結合した構造であることがわかり、質量分析を行った結果、ピーク a, b, c, d, e, f は順にグルコースが 7, 8, 9, 10, 11, 12 個環状に結合した場合の分子量と一致した。よって、ピーク a, b, c, d, e, f は順に CI-7, CI-8, CI-9, CI-10, CI-11, CI-12 であると同定された。次に、T-3040 株を可溶性デンプンを炭素源として培養し、培養液中の CITase 活性および CI の生産量を測定した (Table 2)。増殖については、培養 1 日目で培養液の 600 nm の吸光度は 1.56 とほぼ定常期に達したが、CITase 活性は 2 日目から観察され、CI 生産が観察されたのは培養 3 日目からであった。培養 4 日目では CI-7~CI-12 の合計がデンプン 1 g 当たり 201.6 mg と、約 20% のデンプンが CI に転換した。CITase 活性は培養 4 日目で 0.128 U/mL に達し、これはデキストランで培養した場合とほぼ同じ強さの酵素活性であった。精製した CITase にはデンプンから CI を合成する活性がないことから、本菌株はデンプンをデキストラン様の連続した α -1,6 グルコシド結合をもつ糖質に転換する酵素系をもち、これが CITase の基質となって CI を培地中に蓄積すると示唆された。デンプンをデキストラン様の糖質に転換する作用から考えられる酵素としては *Acetobacter capsulatum* ATCC

Table 2. Production of CI in the culture supernatant of T-3040 strain grown with 2% soluble starch.

Day	OD (600 nm)	CITase activity (U/mL)	Produced CI (mg/g soluble starch)						
			CI-7	CI-8	CI-9	CI-10	CI-11	CI-12	Total
1	1.56	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1.63	0.04	0	0	0	0	0	0	0
3	1.66	0.03	1.9	2.6	2.2	0.8	2.0	0.9	10.4
4	1.63	0.13	36.4	54.5	48.5	27.3	23.1	11.8	201.6

11894 および *A. viscosum* で発見されたデキストリンデキストラナーゼ (Dextrin dextranase, EC 2.4.1.2) がある¹⁶⁾。T-3040 株がデキストリンデキストラナーゼを有するのか、あるいは新規の酵素が存在するかどうかについては今後の研究の進展を待ちたい。

5. おわりに

CI はグルカン合成阻害効果を利用した甘味料などが最近実用化されたが、発見当初より CI に期待されてきたのは包接能である。しかし、CI のうち環状イソマルトオリゴ糖 CI-7~CI-9 には顕著な包接能が見いだされず、CI-10 以上の環状イソマルトメガロ糖に包接能が観察された。CITase は環状イソマルトオリゴ糖を多く生産するが、環状イソマルトメガロ糖の生産量が少ない性質をもち、これが包接能の高い CI の生産を困難にしてきた一因である。本研究で生産物のサイズを制御する酵素の部位が推定できたことから、さらに発展させてメガロ糖領域の CI を生産する方向で酵素の改良を進めていきたい。一方 CI をデキストランから生産する場合、残存するデキストランを取り除くためには。現在のところ 70% 程度のエタノールでデキストランを沈殿させる方法しかなく、これでは環状イソマルトメガロ糖も沈殿して回収率が非常に悪くなるのが欠点であった。デンプンから生産する系が実用化すれば、未反応のデンプンの水溶性が CI に比して低いことを利用して取り除くことや、安価なデンプン分解酵素が利用できることから、環状イソマルトメガロ糖を効率よく回収できることが期待される。現在筆者らは CITase の分子改良とデンプンからの CI 生産法を進展させ、環状イソマルトメガロ糖の生産法の開発を目指しているところである。

謝辞

本研究は、生研センターイノベーション創出事業ならびに戦略的基盤技術高度化事業の支援のもとで行われました。

文献

- 1) T. Oguma, T. Horiuchi and M. Kobayashi: Novel cyclic dextrans, cycloisomaltooligosaccharides, from *Bacillus* sp. T-3040 culture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1225-1227 (1993).
- 2) E.B. Tilden and C.S. Hudson: Conversion of starch to crystalline dextrans by the action of a new type of amylase separated from cultures of *Aerobacillus macerans*. *J. Am. Chem. Soc.*,

- 61, 2900–2902 (1939).
- 3) J.A. Thoma, H.B. Wright and D. French: Partition chromatography of homologous saccharides on cellulose columns. *Arch. Biochem. Biophys.*, **85**, 452–460 (1959).
 - 4) K. Funane, K. Terasawa, Y. Mizuno, H. Ono, T. Miyagi, S. Gibu, T. Tokashiki, Y. Kawabata, Y.-M. Kim, A. Kimura and M. Kobayashi: A novel cyclic isomaltooligosaccharide (cycloisomaltoodecaose, CI-10) produced by *Bacillus circulans* T-3040 displays remarkable inclusion ability compared with cyclodextrins. *J. Biotechnol.*, **130**, 188–192 (2007).
 - 5) K. Funane, K. Terasawa, Y. Mizuno, H. Ono, S. Gibu, T. Tokashiki, Y. Kawabata, Y.-M. Kim, A. Kimura and M. Kobayashi: Novel bacteria for producing large cyclic isomaltooligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 3277–3280 (2008).
 - 6) M. Kobayashi, K. Funane and T. Oguma: Inhibition of dextran and mutan synthesis by cycloisomaltooligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1861–1865 (1995).
 - 7) T. Oguma and H. Kawamoto: Production of cyclodextran and its application. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **15**, 91–99 (2003).
 - 8) T. Oguma, K. Tobe and M. Kobayashi: 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 (1994).
 - 9) R.L. Sidebotham: Dextran. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **30**, 371–444 (1974).
 - 10) T. Igarashi, H. Morisaki, A. Yamamoto and N. Goto: An essential amino acid residue for catalytic activity of the dextranase of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immunol.*, **17**, 193–196 (2002).
 - 11) T. Yamamoto, K. Terasawa, Y.-M. Kim, A. Kimura, Y. Kitamura, M. Kobayashi and K. Funane: Identification of catalytic amino acids of cyclodextran glucanotransferase from *Bacillus circulans* T-3040. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1947–1953 (2006).
 - 12) H. Aoki and Y. Sakano: A classification of dextran-hydrolysing enzymes based on amino-acid-sequence similarities. *Biochem. J.*, **323**, 859–861 (1997).
 - 13) K. Funane, Y. Kawabata, R. Suzuki, Y.-M. Kim, H.-K. Kang, N. Suzuki, Z. Fujimoto, A. Kimura and M. Kobayashi: Deletion analysis of regions at the C-terminal part of cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase from *Bacillus circulans*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**, 428–434 (2011).
 - 14) D.N. Bolam, H. Xie, G. Pell, D. Hogg, G. Galbraith, B. Henrissat and H.J. Gilbert: X4 modules represent a new family of carbohydrate-binding modules that display novel properties. *J. Biol. Chem.*, **279**, 22953–22963 (2004).
 - 15) H. Kawamoto, T. Oguma, H. Sekine and M. Kobayashi: Immobilization of cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase for the production of cycloisomaltooligosaccharides from dextran. *Enzyme Microb. Technol.*, **28**, 515–521 (2001).

- 16) E.J. Hehre: Enzymic synthesis of polysaccharides: a biological type of polymerization. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.*, **11**, 297–337 (1951).

質疑応答

[質問]

弘前大 吉田

①*B. circulans* T-3040 株を培養する際に、たとえばマルトース、グルコースなど可溶性デンプン以外の糖質を使ってサイクロデキストランの生産性を調べたことはありますか。②*Bacillus* 属菌がつくるデキストラン様多糖について、いままで他に報告はありますか（微生物的に興味があります）。③CIT-specific insertion というのは、触媒ポケット内で糖が環状化するときのコア（核）となる部分に相当するというお話でしたが、そのような構造部分がなくなっても環状化できるのですか。

[回答]

①可溶性デンプン以外の糖質では、グルコース、スクロース、マルトースで培養してサイクロデキストランの生産性を調べましたが、いずれもサイクロデキストランは検出できませんでした。②*Bacillus* 属菌ではレバンなどを生産する菌の報告はありますが、デキストラン様多糖についての報告は知る限りでは無かったと思います。デンプンからデキストランを合成するデキストリンデキストラナーゼは酢酸菌で報告されています。③CIT-specific insertion は触媒ポケットの近傍にあるけれども正に触媒反応を行う部位ではないと考えています。

[質問]

天野エンザイム 森

培養中にデキストランは作られていないか。

[回答]

現在のところデキストランは検出できていません。できてもすみやかに分解されていて検出できない可能性もあるかと思われます。