

研究ノート

ニトロソグアニジン変異およびストレプトマイシン耐性変異による環状イソマルトオリゴ糖合成酵素 (CITase) 生産菌 *Bacillus circulans* の育種

川端康之<sup>1,\*</sup>、北尾悟<sup>1</sup>、舟根和美<sup>2</sup>、渡嘉敷唯章<sup>3</sup>、儀部茂八<sup>4</sup>、宮城貞夫<sup>4</sup>

<sup>1</sup> 大阪樟蔭女子大学食物栄養学科 (577-8550 大阪府東大阪市菱屋西 4-2-26)

<sup>2</sup> 独立行政法人食品総合研究所 (305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12)

<sup>3</sup> 株式会社トロピカルテクノセンター (904-2234 沖縄県うるま市州崎 5-1)

<sup>4</sup> 翔南製糖株式会社 (901-0203 沖縄県豊見城市長堂 415-1)

\*著者連絡先 E-mail : kawabata.yasuyuki@osaka-shoin.ac.jp

(受取日 : 2006 年 3 月 7 日、受理日 : 2006 年 4 月 16 日)

要旨 : 環状イソマルトオリゴ糖合成酵素 (CITase) 生産菌である *Bacillus circulans* T-3040 の育種について検討した。T-3040 株をニトロソグアニジンによる変異処理を 10 回繰り返すことで生産量を 44 倍向上させた。さらにストレプトマイシン耐性付与による変異処理を 12 回繰り返すことで、親株の 110 倍の CITase を生産する G22-10 株を取得した。G22-10 株の CITase 生産量は、環状イソマルトオリゴ糖の工業的生産が可能なレベルに達したと考えられた。

キーワード : 環状イソマルトオリゴ糖、サイクロデキストラン、環状イソマルトオリゴ糖合成酵素、サイクロデキストラン合成酵素、ストレプトマイシン

1. はじめに

デキストランはグルコースの  $\alpha$ -1,6 結合からなる多糖で、主に *Leuconostoc mesenteroides* が生産するデキストランスクラーゼの作用で蔗糖から生成される。このデキストランに作用し、 $\alpha$ -1,6 結合からなるグルコースの 7 量体、8 量体、9 量体を切り出し、環状化反応を触媒する酵素が環状イソマルトオリゴ糖合成酵素 (cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase; CITase) である。CITase は小熊らによりはじめて報告された酵素である [1]。CITase 生産菌としては *Bacillus circulans* T-3040、*Bacillus* sp. U-155、*Paenibacillus* 属のみが報告されており、その数は極めて少ない [1-3]。

環状イソマルトオリゴ糖 (CI) はサイクロデキストランとも呼ばれ、抗う蝕作用、難溶性物

質可溶化作用などの機能を有することが報告されている [4]。特に、抗う蝕作用は、虫歯菌のグルカン合成酵素を蔗糖存在下でも阻害することができ、既知の抗う蝕性糖アルコールやオリゴ糖に比べ格段に強いことが Kobayashi らにより示されている [5]。また、ラットを使った *in vivo* での抗う蝕作用についても確認されており、実用化が期待されているオリゴ糖の一つである [6]。しかし、*B. circulans* T-3040 の CITase 生産量は 0.0035 units/ml と極めて低く、実用化できるレベルになかった [1]。

微生物が生産する酵素の生産性を向上させる目的での突然変異株の作出には、紫外線処理や化学変異剤処理によるのが一般的である。しかし、これらの方法で高生産株を得るには、1 回の変異操作で 2~3 倍の生産性を持った株が

0.1~0.5%の頻度で得られるのが一般的であり効率がよいとは言えない。最近、食品総合研究所の越智らのグループによって報告された「リボゾーム工学」による物質生産の向上手法によれば、対象とする菌株に抗生物質耐性を付与することにより抗生物質などの二次代謝物質の生産効率をより効率的に上昇させることが可能であると報告されている[7]。さらに本手法を応用して、ストレプトマイシン(ST)耐性を付与することで *B. subtilis* 168 株のプロテアーゼ (bacillopeptidase) 生産量を約 8 倍に向上させた報告があり、二次代謝物質のみならず酵素生産にも応用が可能であることを示唆している[8]。

そこで我々は、従来法のニトロソグアニジン変異とリボゾーム工学に基づくストレプトマイシン耐性変異を組み合わせた効率的な CITase 生産菌の育種改良について検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1. 実験材料

*B. circulans* T-3040 及びグルコース重合度が異なる 3 種類の環状イソマルトオリゴ糖 (CI-7, 8, 9) は、小熊哲哉博士 (キッコーマン株式会社) より分譲いただいた。ニトロソグアニジン (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrothoguanidine)、ストレプトマイシン(ST)はシグマ社より購入した。ブルーデキストラン 2000、デキストラン 40 はアマシャムバイオサイエンス社より購入した。その他の試薬は、市販の特級試薬を用いた。

CITase 生産用液体培地として、LB-Dex 培地 (10 g ポリペプトン、5 g 酵母エキス、5 g 塩化ナトリウム、20 g デキストラン 40/1.0 l、pH 8.0) を用いた。

変異株分離用の固形培地には、LB-Dex 培地にブルーデキストラン 2000 (2.0 g/l) と寒天(15 g/l)を添加したもの (BD-agar 培地) を用いた。

### 2.2. 変異株の取得方法

#### 2.2.1. NTG 処理による変異株の取得方法

LB-Dex 培地(2.0 ml)で 30°C、2 日間振盪培養し、菌体を回収した。得られた菌体を生理食塩水 1.0 ml に懸濁し、NTG 溶液 (終濃度 50~600 µg/ml) を添加し、室温で 25 分間放置した。5 分間遠心分離し上澄みを捨て、菌体を再び生理食塩水に懸濁し、生理食塩水で段階希釈し、BD-agar 培地に塗抹し、30°C で 5~7 日間培養した。ハローを形成した 50 株を選抜し、LB-Dex 培地へ植菌後 30°C で 3 日間振盪培養を行い、培養上清に生産された CITase 活性を測定した。1 回の変異ごとに最も生産性の良いものを選抜し、繰り返し変異操作を行った。

#### 2.2.2. ストレプトマイシン(ST)耐性変異株の取得方法

プレート培地上に生育した菌体を白金耳でかきとり、LB-Dex 培地 1.0 ml (φ 16.5 mm 試験管) に十分懸濁し菌体懸濁液を調製した。別の試験管に LB-Dex 培地 2.0 ml をとり、ST を終濃度で 200~2000 µg/ml 含むように添加し、菌体懸濁液を 50 µl 加え、30°C で 3~5 日振盪培養した。ST 濃度は、100~200 µg/ml 刻みに 3~5 試験区を準備し、2~3 連で培養を行った。OD 660 nm で 1.0 以上に増殖したところで菌体を回収し、生理食塩水で段階希釈後、変異操作に用いた液体培地と同じ濃度の ST を含む BD-agar 培地に塗抹した。30°C で 5~10 日培養後 (コロニーの大きさが直径で 1~2 mm 程度に達したころ)、ハローを形成したコロニーをランダムに 50 株選抜し、LB-Dex 培地 2.0 ml に植菌し、30°C で 3 日間振盪培養後、培養上清に生産された CITase の活性を測定した。1 回の変異ごとに最も生産性の良いものを選抜し、ST 濃度を上げながら繰り返し変異操作を行った。

### 2.3. CITase の活性測定法

培養上清 50  $\mu$ l を 2%デキストラン溶液(0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 pH5.5 と 25 mM 塩化カルシウムを含む) 450  $\mu$ l に加え、40°Cで 2 時間反応させた。酵素反応後、沸騰浴中で 10 分間処理し酵素活性を失活させ、遠心分離により不溶物を除いた後、上清に生産された CI-7・8・9 の量を糖分析装置 (DX-500、ダイオネクス社製) で測定し、CITase 活性を算出した。CITase 活性は 1 分間に CI-7~9 を 1  $\mu$ mol 生成する量を 1 unit とした。

### 2.4. CI の定量方法

CI の定量は糖分析装置(DX-500、ダイオネクス社製、パルスドアンペロメトリック検出器を備えた高性能陰イオン交換クロマトグラフィシステム)で行った。カラムは CarboPac PA-1 ( $\phi$  4.0 mm $\times$ 250 mm) を使用した。0.1 M 水酸化ナトリウム存在下で酢酸ナトリウムの濃度勾配により溶出した。溶出条件は、0 から 15 分、2.0 から 8.0 mM; 15 から 20 分、8.0 から 40 mM の直線濃度勾配とした。標準品の CI-7、CI-8、CI-9 を用いて検量線を作成し、試料の CI 濃度を求めた。

### 2.5. SDS-PAGE とザイモグラフィ

SDS-PAGE は、10%アクリルアミドゲルを用いて Laemmli の方法で行った[9]。染色には CBB-R250(Sigma)を用いた。

ザイモグラフィは、Shiroza *et al.*らの方法を改変して次のように行った[10]。0.5%ブルーデキストラン2000を含む9.5%アクリルアミドゲルを作成し、Laemmli 法と同様に電気泳動した。泳動後のゲルをよく水洗後、さらに 30°C に加温しながら水で 30 分 $\times$ 2 回洗浄し SDS を除いた。次にゲルを 20 mM 塩化カルシウムを含む 10 mM 酢酸緩衝液(pH 5.5)に浸漬し、30°C で 2~3 時間穏やかに振盪した。CITase 活性はデキストラン分解活性として検出され、青いゲルに透明なバンドとして検出された。

## 3. 結果と考察

### 3.1. NTG 処理による CITase 高生産株の取得

NTG 処理による CITase 高生産株の取得経過を Fig. 1A に示した。親株とした T-3040 株は LB-Dex 培地で 0.0010 units/ml の生産量しか得られなかった。およそ 1-10%の生存率で NTG 変異処理を繰り返し行ったところ、10 世代で

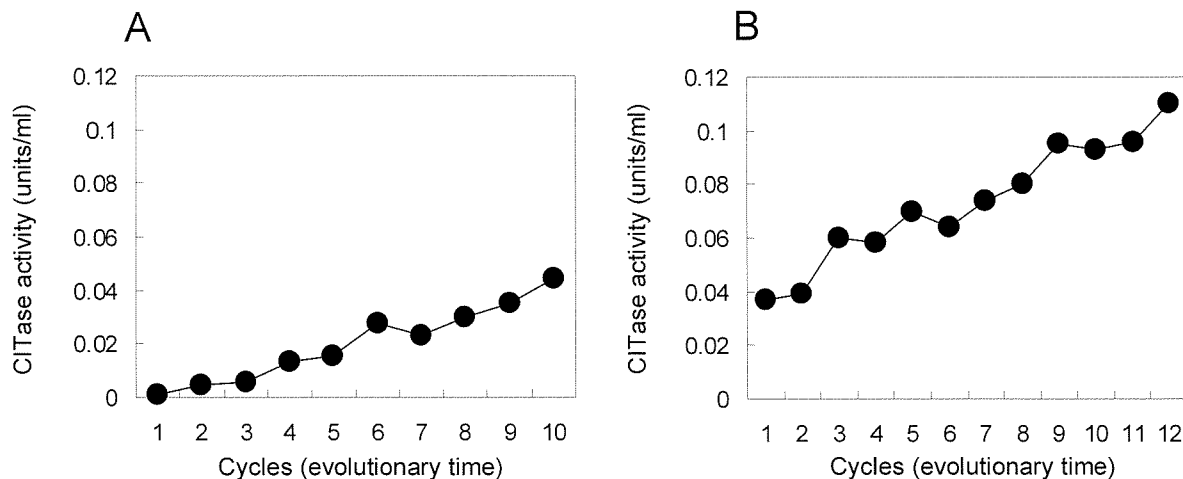


Fig. 1. Strain improvement of CITase producing *B. circulans* by nitrothoguanidine mutagenesis (A) and by streptomycin-resistance mutagenesis (B).

0.044 units/ml まで 44 倍に向上させることができた。この後、数度変異処理を重ねたが、生産量が頭打ちとなったことや、得られた株の生産量に再現性が得られなかったことから、ST 耐性付与による選抜に移行した。

### 3.2. ST 耐性付与による CITase 高生産株の取得

ST 耐性付与による CITase 高生産株の取得は、当初培養菌体を適当な濃度の ST を加えた BD-agar 培地に塗抹し、生育してくるコロニーを選択することで取得していた。しかし ST 濃度が 200  $\mu\text{g/ml}$  を越えた辺りから、生育してくるコロニーが全く得られなくなった。そこで、ST を加えない培地で生育させた菌体を、高濃度に ST を含む培地に摂取し培養を行い、ST 存在下で増殖した菌体を同じ濃度の ST を添加した BD-agar 培地に塗抹することで、高濃度の ST に耐性を持つ株を得ることができた。これらの株は、継代する時も ST を加えた BD-agar 培地で培養することで再現性の良い株が得られた。最終的に得られた G22-10 株は、12 世代の変異処理を重ねた結果、0.110 units/ml の CITase を生産した(Fig. 1B)。Oguma らが報告した精製 CITase の比活性 (2.18 units/mg) から、G22-10 株は培養上清に 50  $\mu\text{g/ml}$  の CITase を生産したと見積もられた[1]。また、NTG 処理と ST 耐性付与を組み合わせることで、親株である T-3040 株から 110 倍に CITase の生産量を向上させることができた。

### 3.3. G22-10 株が生産する CITase の同定

得られた高生産株を用いて培養後、上清に生産された CITase を SDS-PAGE とザイモグラフィーにより同定した(Fig. 2)。G22-10 の培養上清には 4 つの主要なタンパク質が検出された (Fig. 2A)。このうち、115 kDa のバンドがザイモグラフィーにおいてデキストラン加水分解活性を示した (Fig. 2B)。CITase の既報の塩

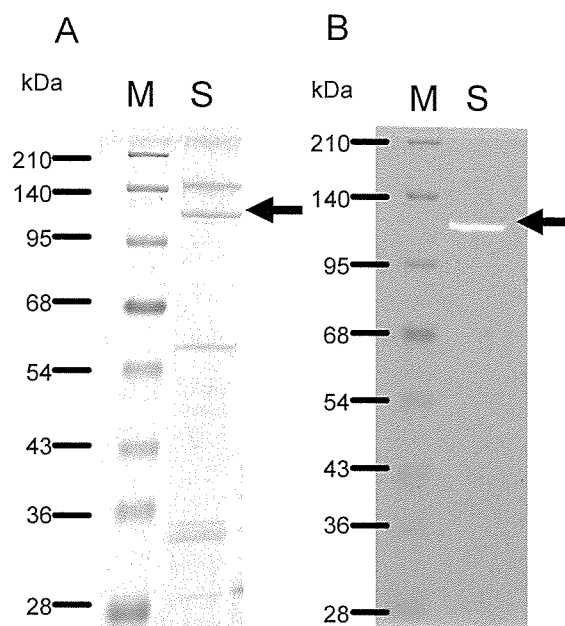


Fig. 2. Identification of CITase from culture filtrates of G22-10 by SDS-PAGE (A) and zymography (B).

SDS-PAGE was done by the method of Laemmli with 10% acrylamide gel. The gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250.

Zymography was done with SDS-PAGE gel (9.5% acrylamide) containing 0.5% blue dextran. After SDS-PAGE was done, the gel was washed with water twice for renature of CITase. Then the gel was immersed into 10 mM sodium acetate pH 5.5 containing 25 mM calcium chloride and incubated at 30°C for 3 hr. Lane M, prestained molecular mass marker; lane S, 15  $\mu\text{L}$  of culture filtrate of G22-10 (48 hr culture). The position of CITase was marked by arrow.

基配列データ(GenBank D61382)から CITase の相対分子量は 103 kDa と計算される。従って、115 kDa のバンドが CITase であると結論した。

### 3.4. 考察

CITase 生産菌 *B. circulans* T-3040 を NTG 変異と ST 耐性変異を組み合わせた育種により、

CITase 生産量が 110 倍向上した G22-10 株を取  
得した。NTG 変異のみでは育種が進まなかつ  
たところで ST 耐性変異を導入することで、さ  
らに CITase 生産性を上げることができ、ST 耐  
性付与が酵素生産菌の育種に有効であると考  
えられた。ST 耐性付与による変異により、酵  
素の生産性が向上することの詳細なメカニズ  
ムは不明である。Okamoto-hosoya らは、ST 耐  
性付与による変異がリボゾーム S12 タンパク  
質中に数種類存在し、そのうちいくつかの特定  
の部位に起こる変異が翻訳活性を変化させる  
効果があると報告している[11]。このような翻  
訳活性の変化、特に翻訳精度の向上が二次代謝  
産物生産性の向上に影響を与えているといわ  
れている。我々は確認していないが、本報にお  
ける育種においても同様な変異の導入が予想  
される。

最近、新しい微生物育種の方法として、プロ  
トプラスト融合を繰り返すことでゲノムの組  
換えをランダムに起こさせ、有用な形質を持つ  
株を選抜する「ゲノム・シャッフリング」が報  
告された[12]。今後、このような育種方法につ  
いても検討し、さらなる CITase 生産量の向上  
を図り、CI の実用化に寄与したい。

#### 謝辞

本研究は、平成 14~16 年度沖縄産学官共同  
研究推進事業「甘蔗汁及び廃糖蜜を利用したサ  
イクロデキストランの製造技術開発」の一部と  
して行われた。また、研究遂行にあたり平成  
15 年度大阪樟蔭女子大学特別研究費より一部  
補助を受けた。ここに関係各位に感謝申し上げ  
ます。

また、*B. circulans* T-3040 及び環状イソマル  
トオリゴ糖 (CI-7、8、9) を分譲いただいた小  
熊哲哉博士 (キッコーマン株式会社) に感謝い  
たします。

#### 文献

1. Oguma, T., Tobe, K., Kobayashi, M.: 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). Erratum in: *FEBS Lett.*, **349**, 442 (1994).
2. 小熊哲哉、バチルス属酵素によるオリゴ糖生産に関する研究、応用糖質科学、**44**, 61-67 (1997).
3. 舟根和美、寺澤和恵、宮城赳、宮城貞夫、小林幹彦、新規サイクロデキストラン生産菌の特性、応用糖質科学、**49**, 426 (2002).
4. Oguma, T., Kawamoto, H.: Production of cyclodextran and its application, *Trends in Glycosci. Glycotechnol.*, **15**, 91-99 (2003).
5. Kobayashi, M., Funane, K., Oguma, T.: Inhibition of dextran and mutan synthesis by cycloisomaltooligosaccharides, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1861-1865 (1995).
6. Fukushima K., In: Molecular Biology of Cariogenic Bacteria (Mukasa H. eds) pp.219-225, (1997) Quintessence book, Tokyo.
7. Ochi, K., Okamoto, S., Tozawa, Y., Inaoka, T., Hosaka, T., Xu, J., Kurosawa, K.: Ribosome engineering and secondary metabolite production, *Adv. Appl. Microbiol.* **56**, 155-184 (2004).
8. 岡本 (細谷) 仁子、為広紀正、大橋由明、岡本晋、越智幸三、リボゾーム工学による微生物二次代謝の機能改良とその応用、食品と技術、1-7, 2002-04 (2002).
9. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685 (1970).

10. Shiroza, T., Shinozaki, N., Hayakawa, M., Fujii, T., Oguma, T., Kobayashi, M., Fukushima, K., Abiko, Y.: Application of the resident plasmid integration technique to construct a strain of *Streptococcus godronii* able to express the *Bacillus circulans* cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase gene, and secrete its active gene product, *Gene*, **207**, 119-126 (1998).
11. Okamoto-Hosoya Y., Sato T.A., Ochi K.: Resistance to paromomycin is conferred by rpsL mutations, accompanied by an enhanced antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Antibiot (Tokyo)*, **53**, 1424-1427 (2000).
12. Zhang Y.X., Perry K., Vinci V.A., Powell K., Stemmer W.P., del Cardayre S.B.: Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature*, **415**, 644-6 (2002).

**Strain improvement of cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase (CITase) production in *Bacillus circulans* by nitrothoguanidine and streptomycin-resistance mutagenesis**

Yasuyuki Kawabata<sup>1\*</sup>, Satoshi Kitao<sup>1</sup>, Kazumi Funane<sup>2</sup>, Tadaaki Tokashiki<sup>3</sup>, Shigehachi Gibu<sup>4</sup>, and Sadao Miyagi<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Faculty of food science & nutrition, Osaka-shoin Women's University, 4-2-26 Hishiya-nishi, Higashi-osaka, Osaka 577-8550, Japan

<sup>2</sup> National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

<sup>3</sup> Tropical Technology Center Ltd., 5-1 Susaki, Uruma, Okinawa 904-2234, Japan

<sup>4</sup> Shonan Sugar Co. Ltd., 415-1 Nagado, Tomigusuku, Okinawa 901-0203, Japan

\*Correspondence should be addressed. Tel.:+81-6-6723-8181, Fax: +81-6-6723-8348,

E-mail : kawabata.yasuyuki@osaka-shoin.ac.jp

(Received March 7, 2006; Accepted April 16, 2006)

ABSTRACT

Strain improvement of cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase (CITase) production by *Bacillus circulans* was carried out. Ten cycles of nitrothoguanidine mutagenesis from *B. circulans* T-3040 resulted in 44-fold increase of CITase production. After 12 cycles of streptomycin-resistance mutagenesis, we obtained a high CITase producing strain, G22-10. The CITase productivity of G22-10 was enhanced up to 110-fold compared with that of T-3040. It is thought that the activity of G22-10 might reach the level of industrial production of cycloisomaltooligosaccharides.

Keywords : cyclodextran, cycloisomaltooligosaccharide, cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase, cyclodextran synthase, streptomycin.

責任編集者 : 瀧井 幸男