

研究ノート

大腸菌組換え型環状イソマルトオリゴ糖合成酵素(CITase)の調製と反応特性

川端康之^{1*}、舟根和美²、北尾悟¹

1 大阪樟蔭女子大学学芸学部食物栄養学科 (577-8550 東大阪市菱屋西 4-2-26)

2 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
(305-8642 つくば市観音台 2-1-21)

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

(受取日: 2007年3月1日、受理日: 2007年4月20日)

要旨: 環状イソマルトオリゴ糖合成酵素(CITase)高生産菌 *Bacillus circulans* G22-10 より同酵素遺伝子をクローニングし、大腸菌で大量発現させた。組換え型 CITase は N 末端に 6×His タグを含む 21 アミノ酸の付加配列を持つが、機能的には天然型 CITase と同じであった。組換え型 CITase は 10 mM Ca²⁺の添加により活性化されるとともに、温度安定性も向上した。一方、1 mM EDTA の添加により酵素活性が低下し、温度安定性も低下した。組換え型 CITase によってデキストランから作られる環状オリゴ糖を高性能陰イオン交換クロマトグラフィーで分析したところ、CI-7、CI-8、CI-9 だけでなく、CI-10 および、これより高重合度の環状オリゴ糖を検出した。

キーワード: 環状イソマルトオリゴ糖合成酵素、CITase、クローニング、発現、温度安定性
環状イソマルトオリゴ糖、サイクロデキストラン

1. 緒言

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、グルコースが α 1→6 結合で結合した環状オリゴ糖である (Fig. 1) [1]。デキストランを原料に環状イソマルトオリゴ糖合成 (CITase) を作用させることで得られ、重合度 7~9 のものが知られていた。最近 Funane らは重合度 10~12 のものも存在することを報告している [2]。CI は抗う蝕作用、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 [3]。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 [4]。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 [5]、実用化が期待されているオリゴ糖の一つである。

我々は、ニトロソグアニジン (*N*-methyl-*N*'nitro-*N*-nitrothoguanidine, NTG) 変異とストレプトマイシン耐性変異による育種によって CITase 高生産菌 *Bacillus circulans* G22-10 を得た [6]。本研究では、同

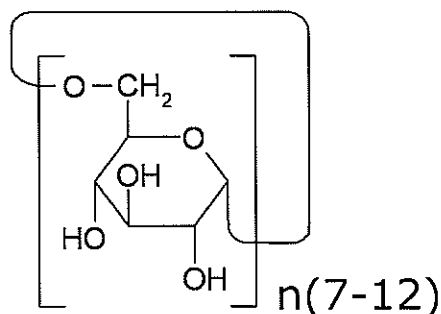


Fig. 1. Structure of Cycloisomaltoligosaccharides.

株からクローニングした CITase 遺伝子の大腸菌での発現および、組換え型 CITase の性質について報告する。

2. 実験方法

2.1. 使用した菌株およびプラスミド

B. circulans G22-10 は、野生株 (T-3040 株) の CITase 生産能を約 100 倍向上させた変異株である [6]。大腸菌 DH5 α 及び BL21(DE3) (TaKaRa)、ベクターとして用いたプラスミド pET-15b (Novagen) は市販のものを購入した。

2.2. CITase 遺伝子のクローニング

B. circulans T-3040 由来 CITase 遺伝子の塩基配列 (GenBank Accession No. D61382) を入手し、CITase コード領域の N 末端シグナル配列を除いた部分に、制限酵素サイトを付加したセンスプライマー CIT01 (5'-GGTGGTCATATGTCAGGCTCTGGCGGCATCGAG-3') とアンチセンスプライマー CIT02 (5'-GCGGGATCC CACGCTAGCTCACATTGATCC-3') を設計した (下線部はそれぞれ *Nde*I と *Bam*HI サイト)。アルカリプレップ法で調製した G22-10 株のゲノム DNA をテンプレートに KOD-DNA ポリメラーゼ (TOYOBO) を用いて推奨条件で PCR 反応を行った。増幅断片を *Nde*I と *Bam*HI で消化後、アガロース電気泳動を行い、2.9 kbp の断片を切り出し、キットを用いて精製し、pET-15b の *Nde*I-*Bam*HI 消化物とライゲーションした (Takara DNA Ligation kit ver. 1)。ライゲーション産物を用いて *E. coli* DH5 α を形質転換し、アンピシリン (100 μ g/ml) を含む LB 寒天培地で選択を行った。得られた形質転換体より CITase 遺伝子が組込まれたプラスミド pCIT を調製し、挿入された塩基配列を DNA シークエンシングにより確認した。

2.3. DNA シークエンシング

DNA シークエンシングは ABI 371 シークエンサー (Applied Biosystems) を用い、ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を使った。

2.4. 組換え型 CITase の生産と精製

pCIT を大腸菌 BL21(DE3) に導入し、アンピシリン (100 μ g/ml) を含む LB 寒天培地で選択した。得られた形質転換体をアンピシリン (100 μ g/ml) を含むインスタント TB 培地 (Novagen) に植菌し、30°C で 24 時間好氣的に培養した。培養液 30 ml を遠心分離し、菌体を回収した。得られた菌体に、菌体溶解試薬 バグバスター (BugBuster, Novagen) を 3 ml と DNase I (1 mg/ml, TaKaRa) を 300 μ l 加え、37°C で 10 分間反応させた。得られた溶液を遠心分離により不要物を除去し、粗酵素液とした。粗酵素液をニッケルレジジンカラム (Ni-NTA, QIAGEN) 3.0 ml に負荷した。20 mM トリス緩衝液 (pH 7.0) で洗浄後、100 mM イミダゾールを含む同緩衝液を通液し、組換え型 CITase を溶出し、精製酵素標品を得た。

2.5. CITase の活性測定法

酵素液 50 μ l を 4% デキストラン 40 (GE ヘルスケア バイオサイエンス) 250 μ l と 25 mM CaCl₂ を含む 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 200 μ l の混合液に加え、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、CI-8、CI-9 の量を糖分析装置 (Dionex DX-500) で測定し、CITase 活性を算出した。CITase 活性は 1 分間に CI-7~9 を合計 1 μ mol 生成する量を 1 unit とした。タンパク質は、牛血清アルブミンを標準物質として Bradford 法 (Protein Assay,

Bio-Rad)で測定した。

2.6. 酵素反応生産物の分析

精製した組換え型 CITase (0.5 units/ml)とデキストラン (2%) を 0.1 M 酢酸緩衝液(pH 5.5、10 mM CaCl₂を含む)中で、40°Cで2時間反応させた。沸騰浴中で10分間処理し酵素活性を失活させた。次に未反応のデキストランと副産物の直鎖オリゴ糖を消化するために、多分岐デキストラン水解酵素 (HBDase, 1 unit, キッコーマン(株)小熊哲哉博士より啓与された)とグルコアミラーゼ (1 unit, TOYOBO) を加え、40°Cで18時間反応させた[2]。沸騰浴中で10分間加熱し酵素を失活させ、残留する環状オリゴ糖の組成を糖分析装置で分析した。グルコアミラーゼ活性は、0.25 mM デキストラン 40 を基質として 40 mM 酢酸緩衝液中 40°Cにおいて1分間あたり1 μmol のグルコースを生成する量を1 unitと定義した。HBDase活性は、100 mM マルトースを基質として 40 mM 酢酸緩衝液中 40°Cにおいて1分間あたり1 μmol のグルコースを生成する量を1 unitと定義した[2]。

2.7. 糖分析装置による CI の定量と分析

CITase 反応によって生成する CI は、糖分析装置(パルスドアンペロメトリック検出器付き高性能陰イオン交換クロマトグラフィー法、HPAEC-PAD 法, Dionex DX-500 system)で分析・定量した。標準物質には、精製 CI 標品

(CI-7, CI-8, CI-9、キッコーマン(株)小熊哲哉博士より啓与された)を用いた。カラムは PA-1 (4×250 mm)を用いた。溶離液 A (0.1M NaOH) と溶離液 B (0.1M NaOH + 1.0 M NaOAc)を用い、次のように B の濃度を2段階で直線的に増加させた。0→15分, 4→12%; 15→22分, 12→40%。流速は 1.0 ml/min とした。

3. 結果と考察

3.1. CITase 遺伝子のクローニング

CITase 高生産株 *B. circulans* G22-10 からゲノムを調製し、これをテンプレートに PCR を行い、CITase 遺伝子を増幅した。次に、増幅断片を pET15-b の *NdeI*-*BamHI* サイトに組み込んだ。得られたプラスミド(pCIT)の挿入断片部分の塩基配列を確認したところ、シグナル配列を除く CITase 遺伝子中に変異はなく、既報の T-3040 株由来の塩基配列と完全に一致した[7]。組換え型 CITase の構造を Fig. 2 に示した。N 末端に 6x His タグとスロンビンサイトを含む 21 アミノ酸の付加配列を持ち、955 アミノ酸からなり、アミノ酸配列から予想される相対分子量は、105.4 kDa であった。

3.2. 組換え型 CITase の生産と精製

pCIT を発現用 *E. coli* BL21(DE3)に形質転換した。得られた形質転換体をインスタント TB 培地に植菌し、37°Cで24時間好氣的に培養した。インスタント TB 培地は、従来必要であった発現誘導剤である IPTG の添加の必要

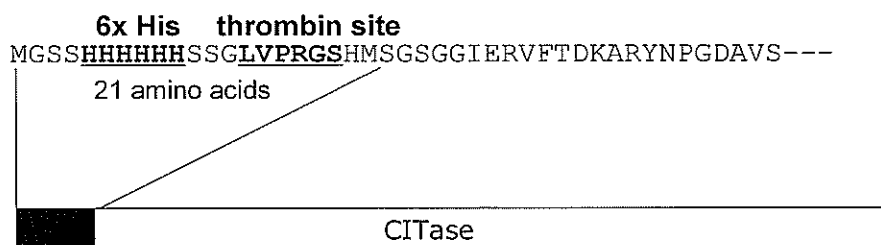


Fig. 2. Structure of recombinant CITase.
 ■, additional amino acids; □, intact CITase

がなく、18 から 24 時間普通に培養するだけで、ラクトースオペロン制御下にある遺伝子が効率よく発現する培地である。培養液から遠心分離により菌体を回収し、菌体溶解剤で菌体を溶解し、遠心分離により不溶物を除いて、粗酵素液を得た。粗酵素液の CITase 活性は 11.3 units/ml だった。

粗酵素液をニッケルレジンカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製した。最終的に 30 ml の培養液から 13.9 units, 8.5 mg の精製酵素を得た。精製酵素は、SDS-PAGE でシングルバンドとして検出された。また、ブルーデキストラン含有ゲルを用いてザイモグラフィーを行い、CITase 活性をデキストラン分解活性として検出したところ、同様にシングルバンドが検出された(データ示さず) [6]。

3.3. 大腸菌組換え型 CITase の非組換え型との比較

精製した大腸菌組換え型 CITase について、諸性質を調べ、非組換え型との異同について検討した。至適温度、至適 pH、温度安定性、pH 安定性について検討したところ、10 mM Ca²⁺ 存在下で至適温度は 50°C、至適 pH は 5.5 であり、50°C 以下 pH 5-7 の範囲で安定であった。いずれも組換え型と非組換え型の間で目立った差は見られなかった。また 2% デキストランに 24 時間反応させた生成物パターンは完全に一致した(データ示さず)。以上の結果から、大腸菌に組換えられたときに付加されたアミノ末端の配列は、酵素の諸性質に影響を与えないと結論した。

3.4. 組換え型 CITase の Ca²⁺ による活性化と EDTA による阻害

Kawamoto らは、固定化 CITase を用いた CI 生産を検討する過程で、Ca²⁺ の添加により

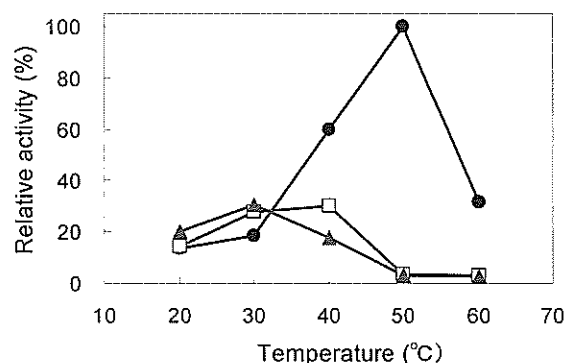


Fig. 3. Optimum temperature of CITase reaction with 10 mM Ca²⁺ (●) and 1 mM EDTA (▲) and without additives (□).

固定化酵素および非固定化酵素の熱安定性が向上することを報告している[8]。そこで組換え型 CITase を用いた CI の工業的生産に関する基礎的知見を得る目的で、Ca²⁺ が酵素反応に与える影響について検討した。同時に EDTA の添加による阻害についても検討した。

Ca²⁺ 存在下 (10 mM) および非存在下と EDTA (1 mM) 存在下における、組換え型 CITase の温度特性を Fig. 3 に示した。

組換え型 CITase は 10 mM Ca²⁺ 存在下 50°C で最も高い活性を示した。一方、Ca²⁺ 非存在下では 40°C、EDTA 存在下では 30°C でそれぞれ最高活性を示したが、その力価は至適条件の約 1/4 であった。50°C においては、Ca²⁺ 非存在下や EDTA 存在下ではほぼ失活したが、Ca²⁺ 存在下では最高活性を示した。このことから、Ca²⁺ の存在は CITase の熱安定性を向上させると考えられた。また 40°C において、Ca²⁺ 存在下の活性は、非存在下や EDTA 存在下 2 倍であった。このことから、Ca²⁺ の存在により CITase の酵素反応は促進されると考えられた。さらに、EDTA の添加により Ca²⁺ 非存在下よりも至適温度の低下が観測されたことから、金属イオンの除去によりさらに不安定化することがわかった。

3.5 組換え型 CITase の生産物

デキストランを基質とし、CITase 反応を行い、生成物を HBDase とグルコアミラーゼで処理し、未反応のデキストランと副生成物の直鎖オリゴ糖を消化後、HPAEC-PAD 法で分析した (Fig. 4)。CI-7, CI-8, CI-9 はそれぞれ 7.9 分、8.7 分、11.0 分に溶出した。その後、12 分以降にいくつかの環状オリゴ糖と予想されるピークを検出した。Funane らは天然型 CITase を用いて同様の産物から CI-10, CI-11, CI-12 を精製し、NMR と質量分析を行いその構造を同定している。Fig. 4 において 12.0 分、13.3 分、14.8 分のピークはそれぞれ CI-10, CI-11, CI-12 と予想される。また、15 分以降にも周期的なピークが観察されることから重合度 13 以上のオリゴ糖についてもその存在が示唆された。

今後、重合度のより大きな CI についても精製を行い、構造の同定と新規な機能の探索を行う予定である。

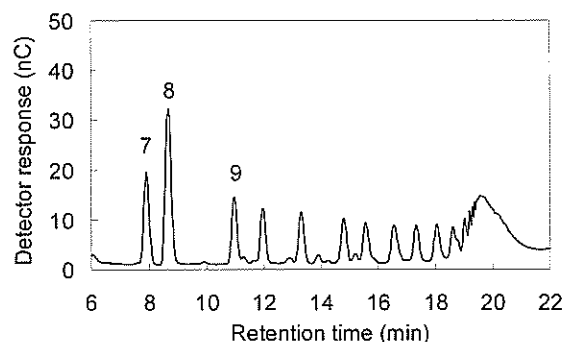


Fig. 4. HPAEC-PAD analysis of cyclic oligosaccharides produced by the recombinant CITase.

The CITase (1.0 units) and dextran (2%) was reacted in 50 mM NaOAc buffer within 10 mM CaCl₂ for 2 h at 40°C. After heated at 100°C for 10 min, the reaction mixture was treated with HBDase (1.0 units) and glucoamylase (1.0 units) to digest linear oligosaccharides for 18 h at 40°C. The reaction mixture was analyzed by HPAEC-PAD. The peaks marked 7, 8, and 9 are CI-7, CI-8, and CI-9, respectively.

謝辞

標準物質とした CI と HBDase を恵与いただいた小熊哲哉博士と河本博氏 (榎キッコーマン) に感謝いたします。

本研究の遂行に当たり、平成 18 年度大阪樟蔭女子大学学術研究費補助金の助成を受けました。

文献

- 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).
- Funane K., Terasawa K., Mizuno Y., Ono H., Miyagi T., Gibu S., Tokashiki T., Kawabata Y., Kim Y.M., Kimura A., Kobayashi, M. A novel cyclic isomaltooligosaccharide (cycloisomalto-decaose, CI-10) produced by *Bacillus circulans* T-3040 displays remarkable inclusion ability compared with cyclodextrins, *J. Biotechnol.* (2007), in press.
- Oguma, T., Kawamoto, H.: Production of cyclodextran and its application, *Trends in Glycosci. Glycotechnol.*, 15, 91-99 (2003).
- Kobayashi, M., Funane, K., Oguma, T.: Inhibition of dextran and mutan synthesis by cycloisomaltooligosaccharides, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 1861-1865 (1995).
- Fukushima K, In: *Molecular Biology of Cariogenic Bacteria* (Mukasa H. eds) pp.219-225, (1997) Quintessence book, Tokyo.

6. 川端康之 北尾悟、舟根和美、渡嘉敷唯章、儀部茂八、宮城貞夫: 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、食品・臨床栄養、1, 43-48 (2006).
7. Oguma T., Kurokawa T., Tobe K., Kobayashi: Cloning and sequence analysis of the cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase gene from *Bacillus circulans* T-3040 and expression in *Escherichia coli* cells, *Oyo Toshitu Kagaku*, 42, 415-419 (1995).
8. Kawamoto H., Oguma T., Sekine H., Kobayashi M., Immobilization of cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase for the production of cycloisomaltooligosaccharides from dextran, *Enzyme Microb. Technol.*, 28, 515-521 (2002)

Production of *Escherichia coli* recombinant cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase (CITase) and its properties

Yasuyuki Kawabata^{1,*}, Kazumi Funane², Satoshi Kitao¹

¹ Faculty of Food Science & Nutrition, Osaka-shoin Women's University,
4-2-26 Hishiya-nishi, Higashi-osaka 577-8550, Japan

² National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba 305-8642, Japan

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

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

(Received March xx, 2007; Accepted xx xx, 200x)

ABSTRACT

The cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase (CITase) gene from *Bacillus circulans* G22-10, that was isolated as a hyper CITase producer, was cloned and extremely expressed in *E. coli* BL21(DE3). Comparing the intact CITase, the recombinant CITase had 21 additional amino acids of 6×His tag and thrombin site on the N-terminal, however the recombinant CITase had the same properties as the intact enzyme. By the addition of 10 mM Ca²⁺, the recombinant CITase was activated, and also the thermostability of the enzyme was increased. But the activity of the recombinant CITase was decrease and less thermostable by the addition of 1 mM EDTA. The cyclooligosaccharides from dextran by the recombinant CITase was analyzed by high performance anion-exchange chromatography. We detected not only CI-7, CI-8, and CI-9 but also larger cyclic oligosaccharides, maybe CI-10 and larger ones.

Keywords: cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase, CITase, cloning, expression, thermostability, cycloisomaltooligosaccharide, cyclodextran

責任編集者：土井裕司