



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

洗剤用アルカリ液化型 α -アミラーゼ (LAMY)
に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 五十嵐, 一暁 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2292

氏名（本籍）	五十嵐 一 暁（神奈川県）
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	農博乙第47号
学位授与年月日	平成12年9月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	洗剤用アルカリ液化型 α -アミラーゼ(LAMY)に関する研究
審査委員	主査 岐阜大学 教授 河合 啓 一 副査 信州大学 教授 入江 鏡 三 副査 静岡大学 教授 田原 康 孝 副査 岐阜大学 教授 山 縣 修 造 副査 岐阜大学 助教授 鈴木 徹

論 文 の 内 容 の 要 旨

本論文は、自動食器洗浄機用洗剤や衣料用洗剤に、酵素剤として澱粉質の汚れに対し効果的な洗浄が期待される α -アミラーゼを配合するために、高いアルカリ領域(pH10~11)において安定に作用する液化型 α -アミラーゼ(LAMY)を生産分泌する微生物の探索を行ない、得られたLAMYの諸性質の把握、遺伝子組換え技術による大量生産系の確立並びに蛋白質工学による酵素の熱安定性の向上を目的に行なわれたものである。

アルカリ領域で作用するLAMYを生産する*Bacillus*属細菌の探索を行ない、土壌よりpH10において最適な増殖を示す好アルカリ性細菌を分離した。その菌学的特徴から、*Bacillus firmus*に近い新種と認め、分離菌を*Bacillus* sp. KSM-1378と命名した。次いで、本菌の培養上清から α -アミラーゼをポリアクリルアミドゲル電気泳動的に単一にまで精製し、その物理化学的及び酵素学的性質を明らかにした。分子量は約53kDa、等電点は9付近、N-末端アミノ酸配列はHHNGTNGTMMQYFEWと決定された。この配列の中に、他の*Bacillus*属由来の液化型 α -アミラーゼに認められている共通配列(NGTMMQYF)を有していたことから、本 α -アミラーゼも液化型であることを認めた。最適pH8~8.5で、安定pH域は6~10であり、最適温度は50℃付近、45℃で60分間熱処理しても失活しないことを明らかにした。さらに本 α -アミラーゼが Ni^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} などの重金属のほか、EDTAやEGTAなどのキレート剤やN-プロモコハク酸イミドにより強く阻害されることを明らかにした。これらの阻害結果から、酵素の安定性における Ca^{2+} イオンの関与や基質結合部位におけるトリプトファン残基の関与が示唆されている。この酵素の基質分解パターンを検討したところ、マルトース(G2)からマルトヘキサオース(G6)までのマルトオリゴ糖には作用せず、マルトヘプタオース(G7)以上に対して分解活性を示し、最終産物として主にマルトペンタオース(G5)とマルトトリオース(G3)を生成したことから、本酵素がエンド型であることを明らかにした。また、還元末端をp-ニトロフェニル化したマルトオクタオース(G8)に作用させると非

還元末端からG5を認識して切断することから、液化型の切断様式をとっていることを明らかにした。

以上述べた結果から、本酵素は液化型 α -アミラーゼに分類されるものであり、特にアルカリ側に最適pHを持つ極めてユニークな酵素であることを認め、液化型 α -アミラーゼでは初めてのアルカリ酵素であることを指摘している。

次に、*Bacillus* sp. KSM-1378株の染色体DNAよりPCR法にてLAMYの遺伝子をクローニングし、その解析を行ったところ、本遺伝子は516アミノ酸残基からなることが明らかとなりうちN末端の31アミノ酸残基がシグナルペプチドとして機能し、残りの485アミノ酸残基が成熟酵素として分泌生産されていることを認めた。次に、これらの知見を基に、高発現ベクターとしてpHS64を、宿主菌として*Bacillus subtilis* ISW1214をそれぞれ用い、シグナルペプチド認識領域(AQAの3アミノ酸残基)並びにLAMY構造遺伝子(485アミノ酸残基)を挿入した組換えプラスミド(pHSPLAMY)を構築した。このプラスミドを*B. subtilis* ISW1214に導入した形質転換株によるLAMYの大量生産について検討した。その結果、約 5×10^6 U/1 (1g/l)の酵素の生産に成功、また、この組換えLAMYは野生型酵素と同様の性質を有していることを明らかにしている。野生型LAMYは50~60℃で徐々に熱失活を受けるので、自動食器洗浄機の洗浄温度条件(50~60℃)で使用することは不適であった。そこで、この温度条件に本LAMYを適応させるため、蛋白質工学的に改変し、熱安定性の向上を図った。その結果、Arg181-Gly182を欠失させたARG-LAMYが熱安定性とキレート剤耐性共に向上していることを明らかにした。次に、プロリンの導入による蛋白質骨格の安定化を図るためArg 124をプロリンに置換した変異(R124P)と上記のARG変異を導入した二重の変異を行った。その結果、この変異LAMYは相加的に安定性が向上しており、10分間処理における酵素活性の半減温度は野生型酵素が47.4℃であるのに対し、二重変異酵素では62.5℃となりかなり上昇していた。これらの変異により、比活性を下げることなく、自動食器洗浄機の洗浄温度である50~60℃で安定に作用するアルカリLAMYの供給が可能となった。

審 査 結 果 の 要 旨

平成12年8月17日13時より、審査委員全員出席のもとに公開論文発表会が開かれ、約30分間にわたる発表と、約30分間の質疑応答が行われた。研究内容は完成度が高いものと評価され、また、審査委員等の質問にも的確に答えた。

本論文は、自動食器洗浄機用洗剤及び衣料用洗剤に配合する酵素剤として適したアルカリ液化型 α -アミラーゼ(LAMY)の開発を目指したもので、目的微生物の探索、生産された α -アミラーゼの精製と諸性質の解明、LAMY遺伝子の取得とその解析、遺伝子組換えによる酵素大量生産技術の確立、並びに蛋白質工学による熱安定性の向上について検討したもので以下に示す研究成果を得ている。

(1)アルカリ側で旺盛な増殖を示し、かつ液化型 α -アミラーゼを生産する*Bacillus*属細菌を分離、この菌が分泌生産する液化型 α -アミラーゼを均一にまで精製し、物理化学的及び酵素学的性質を明らかにした。その結果、この α -アミラーゼがアルカリ酵素であることを初めて発見した。最適pHは8~8.5、pH安定性は6~10の範囲で安定であること、最適温度は50℃、45℃60分間の熱処理では失活しないこと、またNi, Cd, Zn, Hg等の重金属やEDTA, EGTA

等のキレート剤により強い阻害を受けることなどを明らかにした。

(2) LAMY遺伝子を含む1.8kbのDNA断片をpUC19のSmaIサイトに挿入したpAMYL100を構築し、*Escherichia coli* HB101に導入、その無細胞抽出液中にアミラーゼが発現されていることを確認した。この1.8kb-DNA断片に516アミノ酸をコードしているオープンリーディングフレームを認め、N-末端に31アミノ酸残基からなるシグナルペプチドが存在していること及び485アミノ酸残基からなる成熟酵素の分子量計算値55,391DaがSDS-PAGEで求めた値53kDaとほぼ一致していることを明らかにした。さらに、LAMYの推定アミノ酸配列のアラインメントによる三次元構造予測から、A, B, Cの3つのドメイン構造を有すること、活性中心クレフトを構成する4つの保存領域(I~IV)とその中に3つの活性触媒残基(Asp235, Glu266, Asp333)が存在していること、及び液化型 α -アミラーゼに特徴的なBドメインのループ構造も存在していることを指摘した。

(3) LAMYの大量生産を目指し、高発現系ベクターpHSP64にシグナルペプチダーゼ認識配列及びLAMYの構造遺伝子を挿入したpHSPLAMYを用いて、*B. subtilis* ISW1214を形質転換した結果、およそ 5×10^6 U/l(1g/l)の高生産が可能となった。この組換え型LAMYを精製しその性質を調べ、分子量、等電点、最適pH、最適温度等は野生型酵素と同様であることを認めた。また、硫酸アンモニウム法により本酵素の結晶化にも成功している。

(4) LAMYは自動食器洗浄機の洗浄温度である55℃から60℃で徐々に失活するため、蛋白質工学による酵素の熱安定性の向上を図った。すなわち、Arg181-Gly182の欠失とArg124をプロリンに置換した二重変異を導入した変異酵素を作出したところ、変異酵素の熱安定性とキレート剤耐性が共に向上していることを認め、60℃においても安定に作用する酵素を供給することを可能にした。

以上、本論文は、自動食器洗浄機洗剤用酵素としてアルカリ側で作用する液化型 α -アミラーゼに着目、その開発、生産プロセスについて、遺伝子操作技術や蛋白質工学技術を駆使して完成させてのものであり、酵素利用学分野に大きく貢献するものと評価された。

審査委員会において、本論文の構成や内容等について慎重に審議した結果、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値のあるものと判定した。

[学位論文の基礎となる学術論文]

1. Igarashi, K., Hatada, Y., Ikawa, K., Araki, H., Ozawa, T., Kobayashi, T., Ozaki, K. and Ito, S. (1998). Improved thermostability of a *Bacillus* α -amylase by deletion of an arginine-glycine residue is caused by enhanced calcium binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248, 372~377.
2. Igarashi, K., Hatada, Y., Hagihara, H., Saeki, K., Takaiwa, M., Uemura, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S., Kobayashi, T. and Ito, S. (1998). Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3282~3289.
3. Ikawa, K., Araki, H., Tsujino, Y., Hayashi, Y., Igarashi, K., Hatada, Y., Hagihara, H., Ozawa, T., Ozaki, K., Kobayashi, T. and Ito, S. (1998). Hyperexpression of the gene for a *Bacillus* α -amylase in *Bacillus subtilis* cells: enzymatic properties

and crystallization of the recombinant enzyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 1720~1725.

4. Igarashi, K., Ozawa, T., Ikawa-Kitayama, K., Hayashi, Y., Araki, H., Endo, K., Hagihara, H., Ozaki, K., Kawai, S. and Ito, S. (1999). Thermostabilization by proline substitution in an alkaline, liquefying α -amylase from *Bacillus* sp. strain KSM-1378. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 1535~1540.

[既発表学術論文]

1. Tomoda, H., Igarashi, K. and Omura, S. (1987). Inhibition of acyl-CoA synthetase by triacsins. *Biochim. Biophys. Acta* 921, 595~598.
2. Tomoda, H., Igarashi, K., Tanaka, Y. and Omura S. (1987). Biosynthetic preparation of labeled cerulenin with high specific radioactivity. *J. Antibiotics* 40, 1457~1460.
3. Tomoda, H., Igarashi, K., Cyong, J-C. and Omura, S. (1991). Evidence for an essential role of long chain acyl-CoA synthetase in animal cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 266, 4214~4219.
4. Ara, K., Igarashi, K., Saeki, K., Kawai, S. and Ito, S. (1992). Purification and some properties of an alkaline pullulanase from alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-1876. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 62~65.
5. Igarashi, K., Ara, K., Saeki, K., Ozaki, K., Kawai, S. and Ito, S. (1992). Nucleotide sequence of the gene that encodes a neopullulanase from an alkalophilic *Bacillus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 514~516.
6. Ara, K., Saeki, K., Igarashi, K., Takaiwa, M., Uemura, T., Hagihara, H., Kawai, S. and Ito, S. (1995). Purification and characterization of an alkaline amylopullulanase with both α -1,4 and α -1,6 hydrolytic activity from alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-1378. *Biochim. Biophys. Acta* 1243, 315~324.
7. Ara, K., Igarashi, K., Saeki, K. and Ito, S. (1995). An alkaline amylopullulanase from alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-1378; kinetic evidence for two independent active sites for the α -1,4 and α -1,6 hydrolytic reactions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 662~666.
8. Ara, K., Igarashi, K., Hagihara, H., Sawada, K., Kobayashi, T. and Ito, S. (1996). Separation of functional domains for the α -1,4 and α -1,6 hydrolytic activities of a *Bacillus* amylopullulanase by limited proteolysis with papain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 634~639.
9. Hatada, Y., Igarashi, K., Ozaki, K., Ara, K., Hitomi, J., Kobayashi, T., Kawai, S., Watabe, T. and Ito, S. (1996). Amino acid sequence and molecular structure of an alkaline amylopullulanase from *Bacillus* that hydrolyzes α -1,4 and α -1,6 linkages in polysaccharides at different active sites. *J. Biol. Chem.* 271, 24075~24083.