

Bacillus circulans G22-10 由来環状イソマルトオリゴ糖合成

酵素(CITase)遺伝子のクローニングと大腸菌発現系の作成

川 端 康 之

要旨

Bacillus circulans G22-10 由来環状イソマルトオリゴ糖合成酵素(CITase)の大量調製を目的として、同酵素遺伝子のクローニングと大腸菌を宿主とする高発現系の構築を試みた。

B. circulans G22-10 のゲノムから PCR 法により増幅した CITase 遺伝子を、pET-15b の *Nde*I-*Bam*HI サイトに組込み、同遺伝子クローニングベクター-pCIT を構築した。pCIT を用いて発現用宿主 *E. coli* BL21(DE3)pLysS を形質転換し、CITase を生産する BL21(pCIT)を得た。BL21(pCIT)をインスタント TB 培地で培養することで、著量の CITase が菌体内に可溶性タンパク質として発現された。菌体を破碎し粗酵素液を調製後、Ni-NTA アガロースカラムクロマトグラフィーで精製した。精製酵素は SDS-PAGE でシングルバンドとして検出され、ザイモグラフィーの酵素活性と一致した。大腸菌組換え型 CITase と G22-10 由来の非組換え型 CITase の諸性質の検討したところ、至適温度、至適 pH、温度安定性、pH 安定性は同様であった。また、デキストランを基質としたときの生産物特異性についても、同様であった。大腸菌組換え型には N-末端に 21 アミノ酸の付加配列が存在するが、酵素の性質には全く影響がないと結論した。

1. 緒言

デキストランはグルコースが α -1,6 結合からなる多糖で主に *Leuconostoc mesenteroides* の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、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¹⁾によりはじめて報告された酵素である。CITase 生産菌としては *Bacillus circulans* T-3040¹⁾、*Bacillus* sp. U-155²⁾、*Paenibacillus* 属³⁾のみが報告されており、その数は極めて少ない。

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⁶⁾、実用化が期待されているオリゴ糖の一つである。しかし、*B. circulans* T-3040 の CITase 生産量は 0.0035 units/ml¹⁾と極めて低く、実用化できるレベルになか

った。

私は、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報告した⁷⁾。そのとき取得した高 CITase 生産株 G22-10 は 0.10 units/mL の CITase を培養液に生産し、現在実用株として使われている。

しかし、その生産量は他の工業化されている酵素製剤（アミラーゼやグルコースイソメラーゼなど）に比べると高いレベルとはいえなかった。そこで、遺伝子工学的手法を用いて G22-10 株の CITase 遺伝子を PCR クローニングにより取得し、大腸菌の組換え系を用いた高 CITase 発現系の構築について検討した。

2. 実験材料と方法

2.1. 使用した菌株およびプラスミド

B. circulans G22-10 は、舟根和美博士（独立行政法人食品総合研究所）から分譲された T-3040 株を私の研究室で育種し、CITase 生産能を約 100 倍向上させた変異株である⁷⁾。大腸菌 DH5 α 及び BL21(DE3)pLysS、ベクターとして用いたプラスミド pET-15b(Novagen)は小笠原直毅研究室（奈良先端科学技術大学院大学（NAIST））から分譲いただいた。

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プライマー CIT01(5'-GGTGGTCATATGTCAGGCTCTGGCGGCATCGAG-3')と CIT02

(5'-GCGGGATCCCACGCTAGCTCACATTGATCC-3') を設計した（下線部はそれぞれ *Nde*I と *Bam*HI サイト）。アルカリブレップ法で調製した G22-10 株のゲノム DNA 27 ng をテンプレートに KOD-DNA ポリメラーゼ(ROYOBO)を用いて PCR 反応を行った(10x buffer 5 μ L, dNTP 5 μ L, 25 mM MgSO₄ 2 μ L, 2 pmol/ μ L primer F & R 7.5 μ L each, template DNA 5 μ L, KOD-plus 1 μ L / 50 μ L of reaction mixture)。PCR 反応条件は、94°C2 分間の熱変性後、94°C15 秒-68°C3 分を 30 サイクルで行った。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-BamHI 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い、生育したコロニーをコロニー-PCR により挿入断片の有無を調べた。目的の長さの DNA が増幅されたコロニーを用いてプラスミドを調製し、DNA シーケンシングにより挿入配列を確認した。得られたプラスミド pCIT の構造を図 1 に示した。

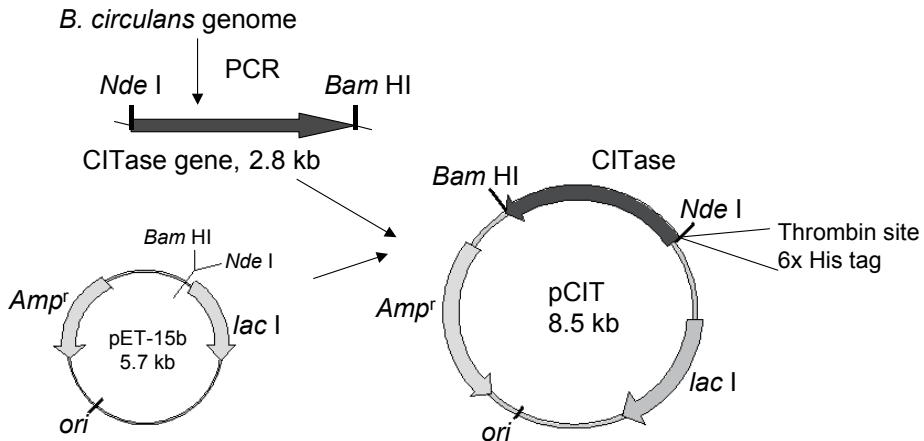


図1 大腸菌発現用プラスミドpCITの構築(模式図)

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. pCIT を用いた大腸菌による組換え型 CITase の生産と精製

プラスミド pCIT を用いて大腸菌 BL21(DE3)pLysS に導入し、アンピシリン(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)とクロラムフェニコール(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)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 $\mu\text{g}/\text{mL}$)とクロラムフェニコール(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)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 10 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 1 mL と DNase I (1 mg/mL) を 50 μL 加え、37°Cで10分間反応させた。得られた溶液を 20mM トリス緩衝液(pH 7)で 10 mL に容量を戻し粗酵素液とした。

粗酵素液 4 mL を遠心分離により不要物を除去後、ニッケルレジジンカラム(Ni-NTA, QIAGEN) 0.5 mL に負荷した。20 mM トリス緩衝液で洗浄後、50 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. SDS-PAGE 及びザイモグラフィー

SDS-PAGE は、10%アクリルアミドゲルを用いて Laemmli の方法⁸⁾で行った。染色には CBB-R250 (Nacalai)を用いた。

ザイモグラフィーは、Igarashi らの方法⁹⁾を改変して次のように行った。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し、30°Cに加温しながら水で 30 分×2 回洗浄し SDS を除くとともにタンパク質の再

生を促した。さらに蒸留水に浸漬し、30℃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。

2.6. 酵素反応生産物の分析

4%デキストラン 250 μL と 25 mM CaCl₂ を含む 0.2 M 酢酸緩衝液(pH 5.5)200 μL に CITase (0.08 units/mL)を 50 μL 加え、40℃で 24 時間反応させた。沸騰湯中で 5 分間処理し酵素活性を失活させ、反応液を 10 倍に希釈し、糖分析装置で分析した。

2.7. CITase の活性測定法

酵素液 50 μl を 4%デキストラン 250 μL と 25 mM CaCl₂ を含む 0.2 M 酢酸緩衝液(pH 5.5)200 μL の混合液に加え、40℃で 2 時間反応させた。酵素反応後、沸騰浴中で 5 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 (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 1 μmol 生成する量を 1 unit とした。

タンパク質は、280 nm の吸光度 1.0 を 1.0 mg/mL として測定した。

3. 結果と考察

3.1. CITase 遺伝子のクローニング

高 CITase 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 N 末端に 6x His タグ配列を持つよう設計された pET15-b の *NdeI*-*Bam*HI 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¹⁾の T-3040 株由来の塩基配列と完全に一致した。組換え型 CITase(*CIT*)の構造を図 2 に示した。N 末端に 6x His タグとスロンビンサイトを持ち、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。

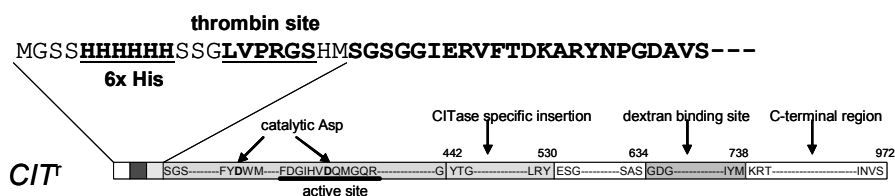


図2 大腸菌組換え型CITase(*CIT*)の構造

3.2. 大腸菌を用いた CITase 遺伝子の発現と組換え型 CITase の精製

pCIT を発現用 *E. coli* BL21(DE3)pLysS に形質転換した。得られた BL21(pCIT)をインスタント TB

培地に植菌し、37℃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。最終到達 OD が 20~30 と高濃度の培養が可能であることも利点である。これを用いた培養液から遠心分離により菌体を回収し、菌体溶解剤(BugBuster, Novagen 社製)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 2.36 units/mL 培養液だった。これは IPTG 誘導で調製したときの約 10 倍であった。

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。精製ステップを表 1 に示した。10 mL の培養液から 11.5 mg の精製酵素標品を回収率 82% で得ることができた。精製酵素標品の SDS-PAGE とザイ

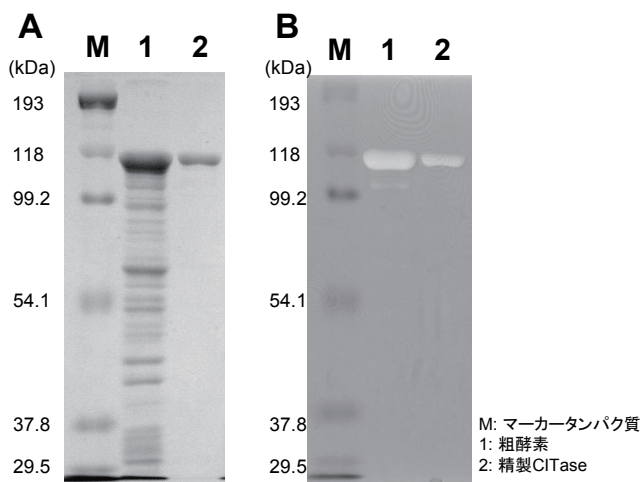


図3 粗酵素及び精製CITaseのSDS-PAGE(A)とザイモグラフィー(B)

モグラムを図 3 に示した。精製酵素は、SDS-PAGE でシングルバンドとして検出され、ザイモグラフィーのデキストラン分解活性を示すバンドと移動度が一致した。精製酵素の分子量は 114 kDa と見積もられた。

表1 大腸菌組換え型CITaseの精製

| | 容量 (mL) | CITase活性 (units) | タンパク質 (mg) | 比活性 (units/mg) | 収率 (%) |
|---------------------------|------------|---------------------|---------------|-------------------|-----------|
| 粗酵素液 | 10 | 23.6 | 89.0 | 0.27 | |
| Ni-NTA アガロース クロマトグラフィー | 2.5 | 19.5 | 11.5 | 1.7 | 82.3 |

3.3. 大腸菌組換え型 CITase の非組換え型との異同

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が、いずれも組換え型と非組換え型の間で目立った差は見つからなかった。2%デキストランに 24 時間反応させた生成物の分析結果を図 4 に示した。組換え型と非組換え型の生成物パターンは完全に一致した。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考えられた。

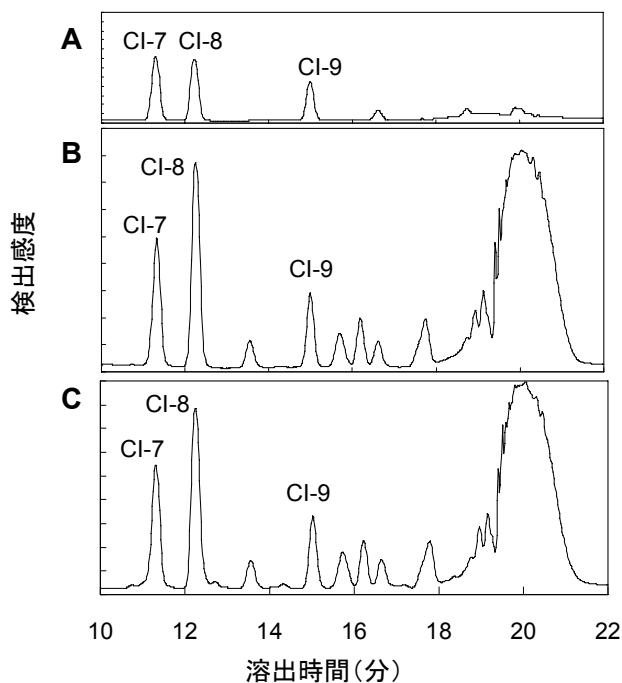


図4 大腸菌組換え型及び非組換え型CITaseの生産物特異性の比較

A, CI-7~9(標準物質); B, 組換え型 CITase; C, 非組換え型 CITase.

遺伝子工学を利用した組換え微生物によるタンパク質生産に関する研究は、多くの成功例が報告されている¹¹⁾。CITaseのクローニングと大腸菌での発現についてはすでに小熊らが報告しているが、その生産量は低く実用的ではなかった¹⁰⁾。また、舟根らはpETベクターを用いてC-末端Hisタグ付きおよびHisタグなしでの発現を検討しているが、タンパク質は可溶性画分に生産されたもののアフィニティーカラムに吸着しなかったことから、通常の前製方法を用いて精製酵素を得ている¹²⁾。この方法では、収率は30%と低く、操作も複雑であった。

今回、私はN-末端にHisタグを導入した組換えCITaseの発現を検討し、良好な結果を得た。また、培地にインスタントTB培地を用いることで多量のCITaseの発現に成功し、培養1 mL当たり2.36 units (CITaseタンパク質として1.4 mg)のCITaseを生産することができた。これは、育種によって得た非組換え菌G22-10株の生産量の24倍であった。今回、タグの位置や培地組成を含む培養条件を検討することで、容易に著量のCITaseを生産できる系を構築できた。また、組換え酵素は、Hisタグを利用することで精製も容易であった。今後、精製酵素を用いて同酵素の反応機構解明や立体構造の解明に取り組みたいと考えている。

謝辞

本研究は、平成 17 年度国内研修中に奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科システム細胞学研究室小笠原直毅教授、小林和夫助手、大島拓助手、石川周助手のご指導のもとに行いました。関係各位に、厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 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、宮城昶、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) 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).
- 8) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 9) Igarashi T, Yamamoto A, Goto N.: Characterization of the dextranase purified from *Streptococcus mutans* Ingbritt. *Microbiol Immunol.*, **36**, 969-76 (1992).
- 10) 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).
- 11) Gerd Gellissen, ed., Production of recombinant proteins, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.
- 12) 平成 15 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」成果報告書、2004.