

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	高度好塩性古細菌 <i>Haloarcula japonica</i> が生産する多分岐グルカンとその生合成に關与する GlgC ホモログの研究
Title(English)	
著者(和文)	末田 凜
Author(English)	Rin Sueda
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12039号, 授与年月日:2021年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:八波 利恵,和地 正明,福居 俊昭,蒲池 利章,平沢 敬,中村 聡
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12039号, Conferred date:2021/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

## 論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	末田 凜		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	八波 利恵	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

### 要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters )

#### 【背景】

高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* 由来枝作り酵素 MalA は高塩濃度下で、従来の枝作り酵素が基質としないマルトオリゴ糖から高重合度の枝分かれグルカンを合成した。MalA が合成したグルカンはグリコーゲンに比べて高度な枝分かれを有していたことから、*Ha. japonica* 菌体内にも高度な枝分かれを有する“多分岐グルカン”存在すること示唆された。グリコーゲンは分岐を増やすことで水の溶解度を高めるが、多分岐グルカンはさらに短いグルカン鎖の分岐を増やすことで高塩濃度下での溶解度を高めていると推測される。しかしながら、*Ha. japonica* 野生株の生産する多分岐グルカンの構造は未知である。本研究では、グルカンの抽出方法とその解析方法を確立し、多分岐グルカンの解析を行うこととした。

また、*Ha. japonica* ゲノム上の *malA* 遺伝子の下流に各種糖質関連酵素をコードする遺伝子が連なって見出され、その一部が大腸菌のグリコーゲン生合成系遺伝子群 (*glgBX*, *glgCAP* オペロン) と相同性を示した (Fig. 1)。これより、*Ha. japonica* の糖質関連酵素遺伝子群が、多分岐グルカンの生合成系遺伝子群であることが示唆された。本研究では、多分岐グルカンの前駆体合成を担うと推測される、*c1183* 遺伝子がコードする *GlgC* ホモログに注目した。すなわち、*GlgC* ホモログの親株における発現を行い、組換え酵素の酵素学的性質検討を行うこととした。

#### 【方法、結果および考察】

##### *Ha. japonica* 野生株由来多分岐グルカンの解析

1.0% グルコース添加栄養培地を用いて、*Ha. japonica* 野生株を OD<sub>600</sub> が 3.0 以上になるまで培養し、遠心により集菌した。菌体を 1.0 M NaCl に懸濁し、超音波破碎を行った後、遠心して得られた上清に対して TCA 沈殿による除タンパク質を行った。エタノールを加えて生じた沈殿を蒸留水に懸濁し、脱イオン樹脂を用いて脱塩した後に、凍結乾燥によって多分岐グルカン標品を得た。得られた標品に対して、グルカンの  $\alpha$ -1,6 結合を特異的に切断する各種枝切り酵素による処理を行い、TLC および FACE 法 (糖の還元末端に蛍光標識を施しキャピラリー電気泳動を行う分析法) によって、多分岐グルカンの鎖長分布を調べた。その結果、3 種類の枝切り酵素 (イソアミラーゼ、プルランナーゼ、オリゴ- $\alpha$ -1,6-グルコシダーゼ) を併用した場合に最も多くの分岐鎖を遊離し、短鎖の分岐を多くもつ鎖長分布パターンを示すことがわかった。また、<sup>1</sup>H-NMR によって  $\alpha$ -1,4 結合と  $\alpha$ -1,6 結合の比率を調べた結果、多分岐グルカンはカキグリコーゲンに比べて  $\alpha$ -1,6 結合の分岐が顕著に多いことが示唆された。

##### *Ha. japonica* 由来 *GlgC* ホモログの組換え酵素の性質検討

*c1183* 遺伝子発現型プラスミド、pJc1183 を導入した *Ha. japonica* 形質転換体から細胞質画分を回収し、ニッケル固定化担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーに供することより、SDS-PAGE において単一タンパク質バンドを示す *GlgC* ホモログ (HjGlgC) の組換え酵素の精製標品を得た。

組換え HjGlgC 精製標品を用い、高塩濃度下でヌクレオチド三リン酸とグルコース-1-リン酸を基質としてヌクレオチド三リン酸グルコースを合成する転移反応を行い、低塩濃度下で反応副産物のピロリン酸に対して無機ピロホスファターゼ処理を行い、遊離した無機リン酸をマラカイトグリーンで検出することで、酵素活性を見積もった。その結果、各種ヌクレオチド三リン酸のうち、GTP を基質とした際に最も高い活性を示した。これより、HjGlgC は *Ha. japonica* 菌体内において、“GDP-グルコースピロホスホリラーゼ”として働くことが考えられた。組換え HjGlgC の反応至適塩濃度は 2.60 M KCl および 3.15 M NaCl であり、比活性はそれぞれ 40.4 U/mg および 15.1 U/mg であった。また、0.2 M KCl 以上、1.0 M NaCl 以上の塩存在下において安定であった。

##### *c1183* 遺伝子破壊株を用いたグルカンの解析

HjGlgC の多分岐グルカン生合成における役割を明らかにするため、HjGlgC をコードする *c1183* 遺伝子の破壊株を調製し、野生株と破壊株が生産するグルカンの解析を行った。その結果、*c1183* 遺伝子破壊株においてもグルカンの生産が確認され、*Ha. japonica* では *c1183* 遺伝子に依らずグルカンの合成が行われることを示した。また、野生株と *c1183* 遺伝子破壊株のグルカン生産量を比較したところ、有意差がないことを明らかとなった。一方で、破壊株に *c1183* 遺伝子発現型プラスミドを導入した *c1183* 遺伝子補完株では野生株に比べ、多量にグルカンが生産されていることが明らかになった。これより、*c1183* 遺伝子が多分岐グルカン生合成へ関与していると考えられた。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

## 論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	( 工学 )
学生氏名： Student's Name	末田 凜		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	八波 利恵	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words )

MalA, branching enzyme of *Haloarcula japonica* produced highly-polymerized glucan from short malto-oligosaccharides. The glucan produced by MalA was highly-branched compared to glycogen. It suggested that “highly-branched glucan” was produced in *Ha. japonica*. Glycogen is produced in various organisms as a storage compound, and its synthesis in bacteria is mainly organized by *glg* operon containing *glgB*, *glgC* and *glgA*. On the genome of *Ha. japonica*, *glg* operon like gene cluster was identified and corresponding genes of *glgBCA* were found. Thus, the system for producing “highly-branched glucan” in *Ha. japonica* was expected. In this study, the highly-branched glucan was extracted from *Ha. japonica* and analyzed in various ways. Additionally, to clarify the synthetic pathway of highly-branched glucan, GlgC homolog of *Ha. japonica* was focused on, and its recombinant enzyme was characterized.

*Ha. japonica* was cultured until OD<sub>660</sub> was over 3.0 on the medium containing 1.0% glucose. Cells were harvested and sonicated in 1.0 M NaCl solution. Cell free extract was collected by centrifugation, and cell-derived proteins were removed by trichloroacetic acid (TCA) precipitation. Ethanol was added to the supernatant, and the pellet was dissolved with deionized water. The solution was applied to the desalination resin and highly-branched glucan was purified. Thin layer chromatography of debranched highly-branched glucan revealed it requires three debranching enzymes (isoamylase, pullulanase and oligo- $\alpha$ -glucosidase) for releasing most of branching chain. The precise chain length distribution was analyzed with fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) and it showed distribution of short chains compared to oyster glycogen.

GlgC homolog, HjGlgC was successfully expressed in *Ha. japonica*. The recombinant HjGlgC was purified by Ni affinity chromatography. It showed a single band at around 50 kDa in SDS-PAGE. Substrate specificity of HjGlgC was assessed in the presence of 2.60 M KCl at pH 7.5 and 37°C. HjGlgC exhibited the highest activity when incubated with GTP among various NTPs and dNTPs. This result suggests that HjGlgC works as GDP-glucose pyrophosphorylase in *Ha. japonica*. The specific activity was higher in the presence of KCl than NaCl.

Deletion variant was created for analyzing the synthetic pathway of highly-branched glucan. Deletion of the gene encoding HjGlgC did not affect production of the glucan. However, over expression of HjGlgC in the deletion variant produced more amount of the glucan compared to wild strain. This implied the involvement of HjGlgC in the synthesis of highly-branched glucan.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).