

内22-26

早稲田大学大学院理工学研究科

博 士 論 文 概 要

論 文 題 目

Identification of the Gene Encoding Novel
 α -Glucosyl Transfer Enzyme and Its Application
to Production of Valuable α -Glucosides

新規 α -グルコース転移酵素の遺伝子解析と
有用物質生産への応用

申 請 者

佐 藤 利 行

TOSHIYUKI SATO

応用化学専攻 応用生物化学研究

香気成分や生理活性物質など有用な機能を示す化合物には水酸基を有するものが多い。これらを配糖化することにより、水溶性や安定性を向上させることが可能なため、配糖体についてはもとの化合物に比べて使用範囲の拡大が期待できる。配糖体合成で重要なことは機能の合目的設計であり、食品への応用を目標とした場合には、グルコシドの合成反応において苦味を示す β -グルコシド体の形成は望ましいものではない。すなわち、ある基質を α -アノマー選択的にグルコシル化して、一段階で目的とする α -グルコシド体のみを選択的に生産することが可能になれば実用的に大きな意義がある。

Xanthomonas campestris WU-9701 は α -アノマー選択的にグルコース転移を行う新規な酵素を生産する。当該酵素は、マルトースをグルコース供与体、水酸基を有する化合物を受容体として、選択的に α -グルコシル化するため、目的の α -グルコシドの選択的生産が可能である。さらに、加水分解活性が低く、マルトースに対してグルコースを転移せず、従来の酵素にはみられない新規な活性を有した。したがって、新規かつ産業上有用な当該酵素の性質をタンパク質さらには遺伝子のレベルで解析し、位置選択的かつ立体選択的な反応を可能にする生体触媒としての機能を解明することは、基礎と応用の両面において極めて重要である。

本論文では、当該 α -グルコース転移酵素の精製および諸性質の検討を行い、とくにマルトースの加水分解活性と α -グルコシド合成活性(マルトースからの α -グルコース転移活性)の関係を調べ、 K_m や V_{max} などの酵素的パラメータを決定して加水分解活性と α -グルコース転移活性の反応特性を明らかにした。また、当該酵素遺伝子をクローニングして、その塩基配列情報から他の類似糖加水分解酵素との相同性を調べて特徴を明らかにするとともに、立体構造を推定するに至った。当該酵素遺伝子を大腸菌で高発現させることに成功し、組換え酵素を利用して α -グルコシドを短時間で効率良く生産可能な反応プロセスを構築した。

本論文は 8 章より構成されている。

第 1 章では、酵素反応を利用した有用グルコシドの生産および *X. campestris* によるキサントガム生産について概説し、酵素反応による α -アノマー選択的なグルコシド生産の有用性を示した。さらに、これらを背景として、本研究の意義と目的を明らかにした。

第 2 章では、本研究に用いた基本的な実験方法について記述した。すなわち、当該 α -グルコース転移酵素による有用 α -グルコシドの合成方法と定量方法、構造決定法を中心に、供試菌 *X. campestris* WU-9701 の培養方法、酵素の精製方法、酵素活性の測定法、ならびに遺伝子工学的手法などを記述した。また、*X. campestris* WU-9701 の菌学的性質についても合わせて記述した。

第 3 章では、 α -グルコース転移酵素による(+)-カテキンの α -アノマー選

択的グルコシル化を行った。(+) -カテキンは抗酸化作用や抗菌作用などの有用な性質を示す。しかし、(+) -カテキンは酸化されやすいため、構造的に不安定である。そこで、*X. campestris* WU-9701 の粗酵素を利用し、(+) -カテキンとマルトースの反応を行った。薄層クロマトグラフィー(TLC)および高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により選択的に唯一の生成物が得られることを確認し、 ^1H -NMR や ^{13}C -NMR、heteronuclear multiple-bond coherence (HMBC) 分析により生成物を (+) -catechin 3'-O- α -D-glucopyranoside と同定し、(+) -カテキンの 3'位の水酸基のみが位置選択的に α -グルコシル化されたことを明らかにした。 α -C-G の合成最適条件を決定し、マルトース 1.2 M を含む 10 mM クエン酸-10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 10 ml に凍結乾燥酵素 50 mg (28 nkat) を添加し、(+) -カテキン 60 mg、45℃、180 rpm の条件下で 36 時間反応を行うことで、 α -C-G 54 mg の生産に成功した。供与カテキン当たりのモル変換効率は 57% に達した。

第 4 章では、 α -グルコース転移酵素による α -アルブチンの高収率かつ選択的な酵素合成を行った。ヒドロキノン α -グルコシドは α -アルブチンと呼ばれ、美白作用を示し化粧品素材としての用途がある。そこで、*X. campestris* WU-9701 の凍結乾燥菌体を触媒として利用し、ヒドロキノンとマルトースの反応を行い、TLC および HPLC により、選択的に唯一の生成物が得られることを確認した。また、NMR 分析や HMBC 分析により生成物を hydroquinone 1-O- α -D-glucopyranoside (α -アルブチン) と同定した。 α -アルブチンの合成最適条件を決定し、マルトース 1.2 M を含む 10 mM ホウ酸緩衝液 (pH 7.5) 2 ml にヒドロキノン 10 mg、凍結乾燥菌体 120 mg (11 nkat) を添加し、40℃、160 rpm にて 36 時間反応を行うことで、 α -アルブチン 35 mg の生産に成功した。供与ヒドロキノン当たりのモル変換収率は 93% に達した。

第 5 章では、*X. campestris* WU-9701 から α -グルコース転移酵素を精製し、酵素的諸性質を検討した。本酵素は *X. campestris* WU-9701 のサイトソルに局在した。2 日間培養した細胞から調製した無細胞抽出液を粗酵素液とし、硫酸分画、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、マルトースをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー(2 回)により SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) にて単一バンドとなるまで精製した。当該酵素の分子量は SDS-PAGE で 57,000Da、ゲル濾過では 59,000Da と概算され、モノマー酵素と推定された。 α -グルコース転移活性とマルトース加水分解活性の両者について、当該酵素の最適 pH は 8.5、最適温度は 40℃であった。また、温度安定性、pH 安定性、基質特異性、金属イオンの影響についても検討した。 K_m と V_{max} は α -グルコース転移反応では 4.4×10^2 mM と 5.4×10^{-3} mM/sec、マルトース加水分解反応では 2.1×10 mM と 3.3×10^{-3} mM/sec と決定され

た。すなわち、マルトースのみが存在する場合の加水分解活性は極めて低く、グルコース受容体としてのヒドロキノン 45 mM の存在下ではマルトース分解速度が約 20 倍大きかった。したがって、当該酵素はマルトースの加水分解活性が微弱で、グルコースの転移活性が強力な新規酵素であることを明らかにした。以上より、新規な酵素的性質を確認し、当該酵素を α -グルコース転移酵素(α -glucosyl transfer enzyme)と呼ぶことにした。

第 6 章では、*X. campestris* WU-9701 の全 DNA から α -グルコース転移酵素をコードする遺伝子(*xgtA*)をクローニングし、その塩基配列を決定してタンパク質の 1 次構造および推定される 2 次構造を解析した。*X. campestris* WU-9701 の部分ゲノムライブラリーを作成し、当該酵素の N 末端アミノ酸配列情報をもとにして作成したプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーションを行い陽性クローン *Escherichia coli* JM109/pUGTF-7 を取得した。組換えプラスミド pUGTF-7 上にクローニングされた *xgtA* は 1,617 bp で、57,000 Da のタンパク質をコードしていた。当該酵素のアミノ酸配列は *Sinorhizobium meliloti* 由来の α -グルコシダーゼ(推定)のものと 52% の相同性を示し、加水分解を主反応とする *Saccharomyces cerevisiae* 由来の α -グルコシダーゼなどとの相同性は 30~35% と低かった。また、当該酵素の N 末端側の領域には、 α -アミラーゼファミリーの酵素に共通するグルコシドの α -1, 4 結合を加水分解する活性に関与している必須アミノ酸残基 Asp201、Glu253、Asp331 が存在した。一方、116 個のアミノ酸から成る C 末端側の領域については他の酵素との相同性は見出されなかった。

第 7 章では、前章でクローニングした *xgtA* を大腸菌で高発現させ、大量生産した組換え酵素を用いて β -メントールの α -アノマー選択的グルコシル化を行った。当該酵素遺伝子をプラスミド pKK223-3 の *tac* プロモーターの下流に連結し、そのキメラプラスミド pKKGTF を用いて大腸菌 JM109 を形質転換した。得られた形質転換体 *E. coli* JM109/pKKGTF を、0.8 mM の IPTG を添加した条件下で 22 時間培養した場合、無細胞抽出液の比活性は 8.0×10 nkat/mg となり、*X. campestris* WU-9701 のものと比較して約 140 倍に達した。マルトース 1.2 M を含む 10 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) 2 ml に β -メントール 20 mg、*E. coli* JM109/pKKGTF の無細胞抽出液 400 μ l (3.8×10 nkat) を添加し、40℃、160 rpm にて反応を行った。 β -menthyl α -D-glucopyranoside(α -MenG)は反応 1 時間後から反応液中に結晶として蓄積し、反応 3 時間後には α -MenG が 42 mg 生成、供与 β -メントール当たりのモル変換効率は 99% に達した。この結果から、WU-9701 の凍結乾燥菌体を用いた場合に比べ、同収率を維持したまま反応時間の短縮に成功した。なお、この反応系は α -C-G や α -アルブチンの生産にも利用可能なことを確認した。

第 8 章では、前章までの研究成果を総括した。