

内会22-18

早稻田大学大学院理工学研究科

博士論文審査報告書

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

2003年 2月

香氣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、配糖体については当初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的な設計であり、一段階で目的とする配糖体を選択的生産することは実用的に大きな意義がある。

本論文は、*Xanthomonas campestris* WU-9701 が生産する α -アノマー選択的にグルコース転移を行う新規な酵素についてまとめたものである。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 -グルコシル化を行うため、目的とする 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しないなどの従来の酵素には見られない新規な活性も見出されている。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、新規な生体触媒として機能を解明することは極めて重要である。

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* によるキサンタンガム生産について概説しており、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記述している。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ている。

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ている。すなわち、当該酵素による有用 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がその概要である。また、*X. campestris* WU-9701 の菌学的性質についても合わせて記述している。

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についての結果を記述している。*X. campestris* WU-9701 の粗酵素を利用した (+)-カテキンとマルトースの反応により、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ている。さらに、¹H-NMR や ¹³C-NMR、heteronuclear multiple-bond coherence (HMBC) 分析により生成物を (+)-catechin 3'-O- α -D-glucopyranoside (α -C-G) 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ている。 α -C-G の合成最適条件を決定し、凍結乾燥酵素 50 mg (6.5×10^{-1} unit) を生体触媒として、マルトース 1.2 M と (+)-カテキン 21 mM から 45°C、180 rpm にて、36 時間の反応により、 α -C-G 12 mM の生産に成功している。供与カテキン当たりのモル変換効率は 57% に達しており、 α -C-G の高生産法を確立し、 α -C-G の物理化学的性質を明確にしたことは極めて有意義である。

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についての結果を記述している。*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、一種類の生成物が得られることを確認している。さらに 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)と同定している。 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 45 mM、凍結乾燥菌体 120 mg(6.6×10^{-1} unit)を添加し、40℃、160 rpm にて 36 時間の反応により、 α -アルブチン 42 mM の生産に成功し、供与ヒドロキノン当たりのモル変換効率は 93% に達した。美白作用を示す化粧品素材である α -アルブチンの高生産に成功したことは興味深い知見である。

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結果を記述している。当該酵素は *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当該酵素の試料として、硫酸分画と一連のカラム操作により 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ている。当該酵素の分子量は SDS-PAGE で 57,000 Da、ゲル濾過では 59,000 Da と概算され、モノマー酵素と推定している。さらに α -グルコース転移反応における速度定数 V_{max} と K_{cat} はマルトース加水分解反応におけるものと比べそれぞれ 1.6 倍に達し、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存在下でマルトースに対する反応性が高くなることを明らかにしている。すなわち、当該酵素の新規性と重要性を酵素的諸性質と動力学的定数から明らかにしたことは極めて意義深く高く評価される。

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高次構造を解析した結果を記述している。*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 を取得している。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するものであった。当該酵素のアミノ酸配列は加水分解を主反応とする従来の α -グルコシダーゼなどの酵素との相同性は 30~60% 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な加水分解活性に関与していると想定されるアミノ酸残基 Asp201、Glu253、Asp331 を特定している。また、ファミリー 13 に属することも明らかにしたことは、酵素学的に極めて重要なことである。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認められていない。すなわち、本

酵素の新規性を遺伝子研究の観点から明らかにした重要な成果であり、極めて高く評価される。また、当該酵素の3次元構造を *Bacillus cereus* の oligo-1, 6-glucosidase の構造をもとに予測しており、視覚的に酵素の特徴を考察するための新しい方法を提示したことも波及効果が大きい。

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に応用した結果を記述している。*xgtA* 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。IPTG による誘導条件下での *E. coli* JM109/pKKGTF の無細胞抽出液の比活性は 4.8 unit/mg となり、*X. campestris* WU-9701 のものと比較して約 140 倍に達した。さらに、この無細胞抽出液を α -MenG と α -アルブチンの生産に使用したところ、WU-9701 の α -グルコース転移酵素を用いた場合と比較して、同収率を維持したまま反応時間をそれぞれ 3 時間にまで(約 6%と約 8%に相当)にそれぞれ短縮することに成功した。組換え酵素を用いて α -グルコシドの効率的な生産方法を確立したことは極めて有意義であり、実用への途を拓いた重要な成果として高く評価される。

第8章では、前章までの研究成果が総括されている。

以上のように、本論文は *X. campestris* WU-9701 の α -グルコース転移酵素のグルコース転移活性についてタンパク質さらには遺伝子レベルでの検討を行い、酵素的な新規性と重要性を新たな角度から斬新な方法で明確に示した成果をまとめている。とくに、当該酵素の新規な性質を種々の観点から明らかにしたことが極めて意義深い。また、当該酵素をコードする遺伝子 *xgtA* のクローニングと大腸菌における発現を通して、効率的な α -グルコシド生産を可能にしたことでも生物化学の領域において基礎・応用の両面にわたる大きな成果である。本研究は、今日の合成化学で、重要視されている有用物質の位置選択性かつ立体選択性の合成プロセスを視野に入れて、新しい発想のもとに創造的かつ重要な知見をまとめしており、応用化学の分野において極めて意義深い成果を示している。よって本論文を、博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。

2003年1月

審査員

(主査)	早稲田大学教授	工学博士（早稲田大学）	桐村光太郎
	早稲田大学教授	工学博士（早稲田大学）	西出 宏之
	早稲田大学教授	工学博士（早稲田大学）	木野 邦器
	早稲田大学名誉教授	工学博士（早稲田大学）	宇佐美昭次