

配糖体合成における新規グルコース縮合酵素の探索と  
有用配糖体の生産研究

(研究課題番号 12650792)

平成12年度 日本学術振興会科学研究補助金 (基盤研究C (一般)) (2)  
研究成果報告書

平成15年4月

研究代表者 木野 邦器  
(早稲田大学理工学部 教授)

## 目次

### はじめに

### 発表リスト

### 研究成果

1	<i>X. campestris</i> WU-9701の酵素を用いた(+)-カテキンの $\alpha$ -アノマー選択的グルコシル化	1
1.1	緒言	1
1.2	実験結果	1
1.2.1	WU-9701の凍結乾燥酵素による(+)-カテキン $\alpha$ -グルコシドの合成	1
1.2.2	$\alpha$ -C-G合成条件の検討	3
1.2.3	$\alpha$ -C-G合成の経時変化	4
1.2.4	$\alpha$ -C-Gの安定性	5
1.3	まとめ	6
1.4	参考文献	7
2	<i>X. campestris</i> WU-9701の凍結乾燥菌体を用いたヒドロキノンの $\alpha$ -アノマー選択的グルコシル化による $\alpha$ -アルブチン合成	8
2.1	緒言	8
2.2	実験結果	8
2.2.1	WU-9701の凍結乾燥菌体による $\alpha$ -アルブチンの合成	8
2.2.2	$\alpha$ -アルブチン合成条件の検討	11
2.2.3	$\alpha$ -アルブチン合成の経時変化	12
2.3	まとめ	13
2.4	参考文献	13

3	<i>X. campestris</i> WU-9701のグルコース転移酵素の精製 および酵素的諸性質の検討	14
3.1	緒言	14
3.2	実験結果	14
3.2.1	グルコース転移酵素の精製	14
3.2.2	グルコース転移酵素の酵素的諸性質の検討	17
3.2.2.1	金属イオンの影響	18
3.2.2.2	基質特異性転移反応における糖供与体	18
3.2.2.3	加水分解活性とグルコース転移活性	19
3.3	まとめ	21
3.4	参考文献	23
4	<i>X. campestris</i> WU-9701のグルコース転移酵素をコードする 遺伝子 ( <i>xgtA</i> ) のクローニングと大腸菌における高発現	23
4.1	緒言	23
4.2	実験結果	23
4.2.1	グルコース転移酵素に対するオリゴヌクレオチドプローブの合成	23
4.2.2	グルコース転移酵素をコードする遺伝子 ( <i>xgtA</i> ) のクローニング	24
4.2.3	<i>xgtA</i> の塩基配列の決定	24
4.2.4	グルコース転移酵素と他酵素との相同性	24
4.2.5	グルコース転移酵素の立体構造予測	27
4.2.6	<i>xgtA</i> の大腸菌における高発現	30
4.3	まとめ	33
4.4	参考文献	33
5	<i>X. campestris</i> WU-9701の凍結乾燥菌体を用いた1-プロパンチオール の $\alpha$ -アノマー選択的グルコシル化	34
5.1	緒言	34
5.2	実験結果	34
5.2.1	精製酵素を用いた1-プロパンチオール の $\alpha$ -アノマー選択的	

グルコシル化	34
5.2.2 生成物の構造決定	35
5.3 まとめ	37
6 市販酵素を用いた縮合反応によるアルブチン合成の検討	38
6.1 緒言	38
6.2 実験結果	38
6.2.1 市販酵素を用いたアルブチン合成	38
6.2.2 効率的なアルブチン合成の検討	41
6.3 まとめ	42
6.4 参考文献	42
7 グルコース縮合酵素の探索	43
7.1 緒言	43
7.2 実験結果	43
7.2.1 $\beta$ 型配糖体合成酵素のスクリーニング	43
7.2.2 YS003株を用いたアルブチンの合成	46
7.3 まとめ	49
8 マルトースホスホリラーゼを用いた配糖体合成の検討	50
8.1 緒言	50
8.2 実験結果	50
8.2.1 市販マルトースホスホリラーゼ (MPase) による配糖体合成の検証	50
8.2.2 生成物の構造決定	52
8.3 まとめ	54
8.4 参考文献	54

おわりに

## はじめに

本研究書は日本学術振興会科学研究費基盤研究C（一般）（研究課題番号12650792）によって、平成12、13、14年度の3年間にわたって得られた研究成果を取りまとめたものである。

香料や清涼剤として広く利用されているメントールは溶解性を改善することでさらなる需要の増大が期待できる。本課題に対して、メントールの配糖化に着目し、苦味を呈す天然型の $\beta$ 型ではなく、非天然型の $\alpha$ 型-グルコシド（ $\alpha$ -MenG）を高生産可能な酵素を有する*Xanthomonas campestris* WU-9701の取得に成功し、諸条件を検討した。その結果、水系反応においてもマルトースとWU-9701株の凍結乾燥菌体を用いることで、供与メントール当たりのモル変換収率99%で $\alpha$ -MenGの選択的合成に成功した。本研究では、この $\alpha$ -MenG高生産に関わる、WU-9701の新規なグルコース転移酵素に着目し、当該酵素のフェノール性水酸基のグルコシル化の検討、当該酵素の諸性質の検討および当該酵素をコードする遺伝子のクローニングと大腸菌における当該酵素遺伝子の高発現を行った。

一方、有用配糖体合成プロセスを工業化するにあたり、より安価で効率的な配糖体生産プロセスの開発が必要とされる。酵素を用いてグルコースの縮合による効率的な配糖体生産が可能となれば、配糖体の立体選択的かつ安価な生産技術が提供できる。本研究では、美白作用を示す天然型アルブチン（ $\beta$ -アルブチン）合成を目的として、新規なグルコース縮合酵素の探索を行った。

## 研究組織

研究代表者 木野 邦器 （早稲田大学理工学部 教授）  
研究分担者 桐村光太郎 （早稲田大学理工学部 教授）  
研究分担者 宇佐美昭次 （早稲田大学名誉教授、平成14年3月退任）

## 研究経費

平成12年度 1,700 千円  
平成13年度 1,000 千円  
平成14年度 500 千円  
計 3,200 千円

## 発表リスト

### 論文

1. Sato, T., Nakagawa, H., Kurosu, J., Yoshida, K., Tsugane, T., Shimura, S., Kirimura, K., Kino, K., and Usami, S.:  $\alpha$ -Anomer-Selective Glucosylation of (+)-Catechin by the Crude Enzyme, Showing Glucosyl Transfer Activity, of *Xanthomonas campestris* WU-9701, *J. Biosci. Bioeng.*, 90 (6), 328-330 (2000年12月).
2. Kurosu, J., Sato, T., Yoshida, K., Tsugane, T., Shimura, S., Kirimura, K., Kino, K., and Usami, S.: Enzymatic Synthesis of  $\alpha$ -Arbutin by  $\alpha$ -Anomer-Selective Glucosylation of Hydroquinone Using Lyophilized Cells of *Xanthomonas campestris* WU-9701, *J. Biosci. Bioeng.*, 93 (3), 328-330 (2002年3月).
3. Do, H., Sato, T., Kirimura, K., Kino, K., and Usami, S.: Enzymatic Synthesis of *l*-Menthyl  $\alpha$ -Maltoside and *l*-Menthyl  $\alpha$  Maltooligosides from *l*-Menthyl  $\alpha$ -Glucoside by Cyclodextrin Glucanotransferase, *J. Biosci. Bioeng.*, 94 (2), 119-123 (2002年9月).

### 学会発表

1. 熊田有未、佐藤利行、吉田圭司郎、津金貴則、志村進、桐村光太郎、木野邦器、宇佐美昭次: *Xanthomonas campestris* WU-9701由来の $\alpha$ -アノマー選択的グルコシル化を触媒する $\alpha$ -glucosidaseの精製および諸性質の検討、日本生物工学会、札幌、2000年8月（講演要旨集p. 231）。
2. 黒須潤、佐藤利行、桐村光太郎、木野邦器、宇佐美昭次: *Xanthomonas campestris* WU-9701由来の酵素を用いたヒドロキノンの $\alpha$ -アノマー選択的グルコシル化による $\alpha$ -アルブチンの合成、日本生物工学会、札幌、2000年8月（講演要旨集p. 231）。
3. 桐村光太郎、黒須潤、佐藤利行、木野邦器、宇佐美昭次: *Xanthomonas campestris* WU-9701由来のグルコース転移酵素を用いたヒドロキノンの $\alpha$ -アノマー選択的グルコシル化による $\alpha$ -アルブチンの高収率合成、日本化学会第79春季年会、神戸、2001年3月（講演要旨集p. 893）。

4. 佐藤利行、熊田有未、桐村光太郎、木野邦器、宇佐美昭次: *Xanthomonas campestris* WU-9701由来の $\alpha$ -アノマー選択的グルコシル化を触媒するグルコース転移酵素の精製および酵素的諸性質の検討、日本化学会第79春季年会、神戸、2001年3月（講演要旨集p. 893）。
5. 佐藤利行、齋藤淳、吉田圭司郎、津金貴則、志村進、桐村光太郎、木野邦器、宇佐美昭次: *Xanthomonas campestris* WU-9701由来の新規なグルコース転移酵素をコードする遺伝子のクローニング、日本農芸化学会、仙台、2002年3月（講演要旨集p. 34）。
6. 佐藤利行、齋藤淳、桐村光太郎、木野邦器、宇佐美昭次: *Xanthomonas campestris* WU-9701が生産する新規グルコース転移酵素の遺伝子クローニング、日本化学会第81春季年会、東京、2002年3月（講演要旨集p. 900）。
7. 長谷川敦一、佐藤利行、吉田圭司郎、津金貴則、志村進、木野邦器、桐村光太郎: *Xanthomonas campestris* WU-9701由来の新規 $\alpha$ -グルコース転移酵素遺伝子 (*xgtA*) と周辺領域遺伝子の解析、日本生物工学会、大阪、2002年10月（講演要旨集p. 86）。
8. 佐藤利行、齋藤淳、吉田圭司郎、津金貴則、志村進、木野邦器、桐村光太郎: *Xanthomonas campestris* WU-9701由来の新規 $\alpha$ -グルコース転移酵素遺伝子 (*xgtA*) の発現と $\alpha$ -グルコシド生産への応用、日本生物工学会、大阪、2002年10月（講演要旨集p. 86）。
9. 清水木綿、桐村光太郎、木野邦器: マルトースホスホリラーゼを用いた配糖体合成、日本農芸化学会、神奈川、2003年4月（講演要旨集p. 86）。

# 1. *X. campestris* WU-9701の酵素を用いた(+)-カテキンの $\alpha$ -アノマー選択的グルコシル化

## 1.1. 緒言

(+)-カテキン (Fig. 1.1) は一種のタンニンでフラボノイドのひとつであるフラバノールの誘導体で、A環とB環に水酸基を持ち、ジヒドロフラン環上の2位と3位の炭素が不斉炭素原子であるために光学活性となる。カテキンは抗酸化作用などを有し<sup>1)</sup>、とくに病原性大腸菌O-157に対するカテキンの効果は広く知られている。近年カテキンは、脱臭剤などにも使用されている。

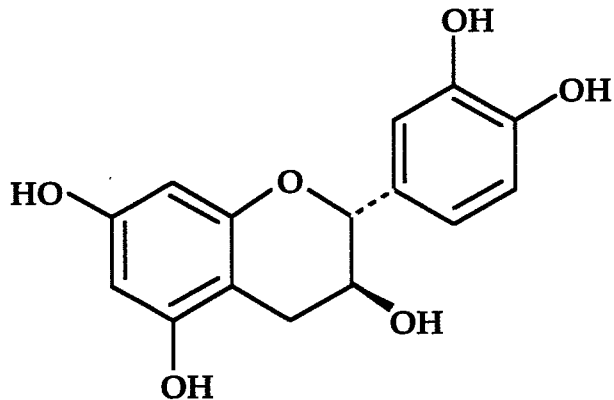


Fig. 1.1. (+)-catechin.

天然に存在するカテキン類は無色であるが、ポリフェノールであるため酸化を受けて変化しやすいことが知られている。紅茶発酵中に酸化されて赤色色素を生じる酸化反応がその代表的な例である。この欠点の改善として、配糖化は有用であると考えられる。一方、(+)-カテキンは分子内に5つの-OH基を有しており、酵素の位置選択性を検討するにあたり、モデル基質と考えられる。

以上の点から、カテキンの配糖化は工業的に有用であると考えられ、当研究室保有のグルコース転移活性が強力な酵素を有する*X. campestris* WU-9701を用いた(+)-カテキンのグルコシル化を検討した。

## 1.2. 実験結果

### 1.2.1. WU-9701の凍結乾燥酵素による(+)-カテキン $\alpha$ -グルコシドの合成



WU-9701の粗酵素と(+)-カテキン、マルトースを反応させると、(+)-カテキン由来の新規生成物がHPLCにて確認された。その際、マルトトリオースなどの反応副成物は確認されなかった。反応生成物を精製したのち、HMBC (Heteronuclear-Multiple Bond Coherence) スペクトルを測定し、構造決定を行った。その結果により、(+)-カテキンの3'位の炭素とグルコースの1位とのC-Hカップリングが検出され、(+)-カテキンの3'位とグルコースの1位との炭素が酸素を介して結合していることが確認された。また<sup>1</sup>H-NMRスペクトルでグルコースの1位の水素が2位の水素とカップリングし、ダブルットを形成している。そのカップリング定数はJ=2.7 Hzである。α結合しているときはJ=2~4 Hz、β結合しているときはJ=7~9 Hzであるので反応生成物はα体であることが確認された。よって、反応生成物は(+)-catechin 3'-O-α-D-glucosyranoside (これをα-C-Gと名付けた) であると確認された。

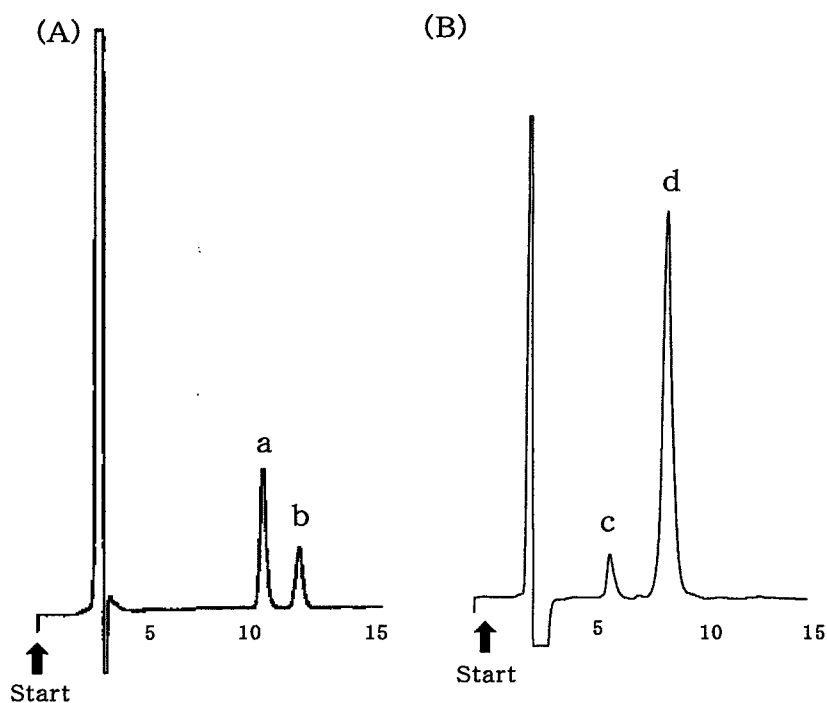


Fig. 1.2. HPLC of the reaction products from (+)-catechin and maltose using the crude enzyme of *X. campestris* WU-9701. The reaction mixture was loaded onto (A) a TSK-Gel ODS-80TS column and (B) an Asahipak NH2P-50 4E column, details having been described in Materials and Methods. Peaks: a, (+)-catechin; b, α-C-G; c, glucose; and d, maltose.

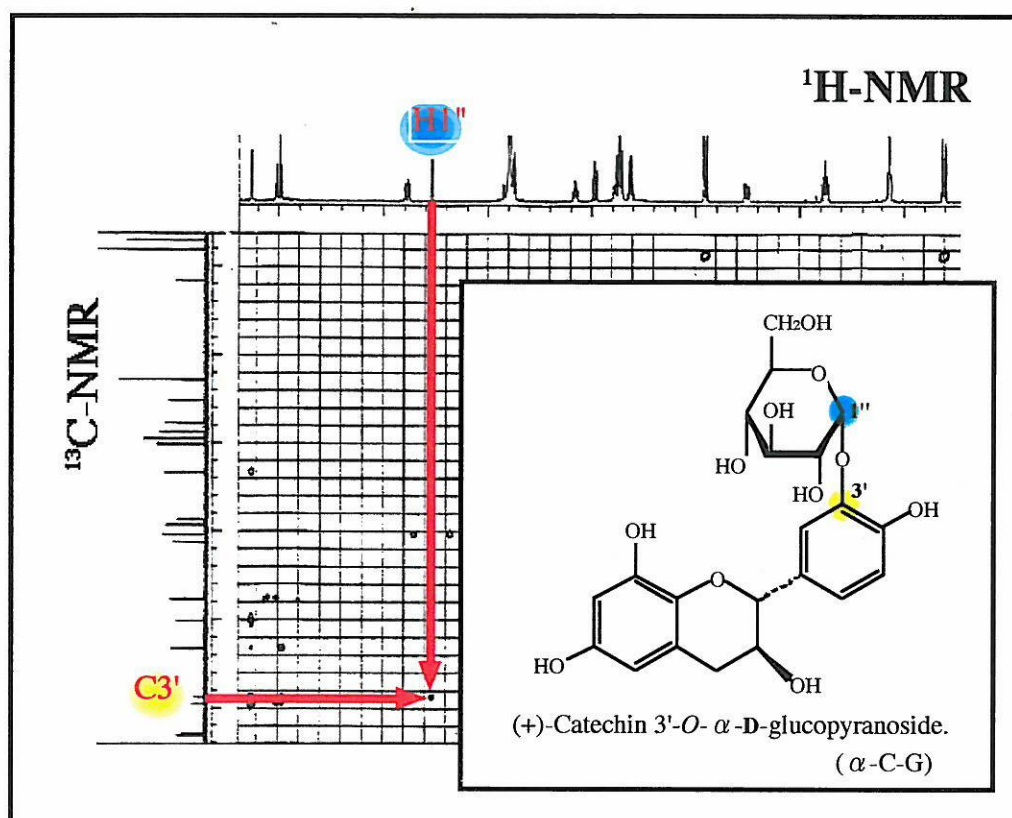


Fig. 1.3. Two-dimensional HMBC spectrum of the isolated product.

### 1.2.2. $\alpha$ -C-G 合成条件の検討

$\alpha$ -C-G の合成基本条件として、マルトース濃度 1.2 M、pH 6.5 の 10 mM クエン酸-10 mMリン酸緩衝液10 ml に(+)-カテキン60 mg と WU-9701 の凍結乾燥酵素50 mg（グルコース転移活性として、 $6.5 \times 10^{-1}$  unitに相当）を添加し、45℃、180 rpm で 24時間往復振とう反応を行った。

pH の影響について調べた結果を Fig. 1. 4 (A) に示す。 $\alpha$ -C-G の生成量は pH 6.0~7.5 の範囲で高く、pH 6.5 で最高値に達し、モル変換収率は51.4%に達した。また、酸性や強アルカリ条件下では生成量は急激に減少した。これは、カテキンの構造がpH 6.0~7.0 の中性付近で最も安定し、酸性や強アルカリ条件下では構造の

異性化がおこってしまうためである。よって最適 pH は6.5と決定した。

温度の影響について調べた結果を Fig. 1.4 (B) に示す。α-C-G の生成量は温度の上昇とともに増大し、45℃で最大値を示した。一方、50℃では生成量が減少したが、これはα-C-G の合成に関与する酵素の失活によると思われる。

マルトース濃度の影響について調べた結果を Fig. 1.4 (C) に示す。α-C-G の合成はマルトース濃度に比例して増加し、生成量は 1.2 M で最高値に達した。また、マルトースが高濃度な理由としては、温度による酵素の失活の抑制が考えられるこれは、通常の酵素の性質として観察される現象である。

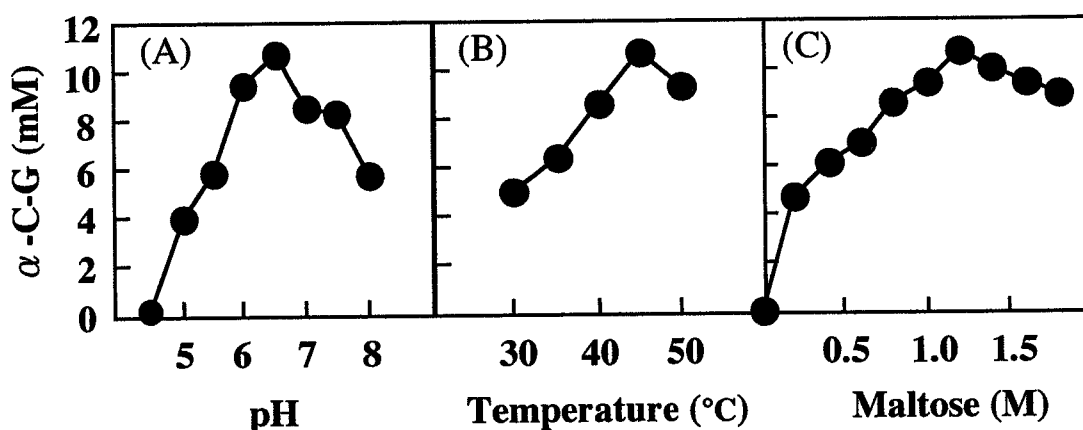


Fig. 1.4. Effects of pH (A), temperature (B), and maltose concentration (C) on the synthesis of α-C-G.

### 1.2.3. α-C-G合成の経時変化

WU-9701 の凍結乾燥酵素を使用した α-C-G 合成反応の最適条件は、(+)-カテキン 20.6 mM (60 mg)、酵素 50 mg ( $6.5 \times 10^{-1}$  unit、データ未提示)、pH 6.5、温度 45℃、マルトース濃度 1.2 M と決定した。最適条件下での反応の経時変化を調べた結果を Fig. 1.5 に示した。α-C-G の生成量は反応時間の経過とともに増大し、

36時間後に最大値 54.1mgに達し、供与(+)-カテキン当たりのモル変換収率では57.1%に相当した。また、 $\alpha$ -C-G 以外の生成物としてはグルコースのみが検出され、マルトトリオースなどのオリゴ糖は検出はされなかった。

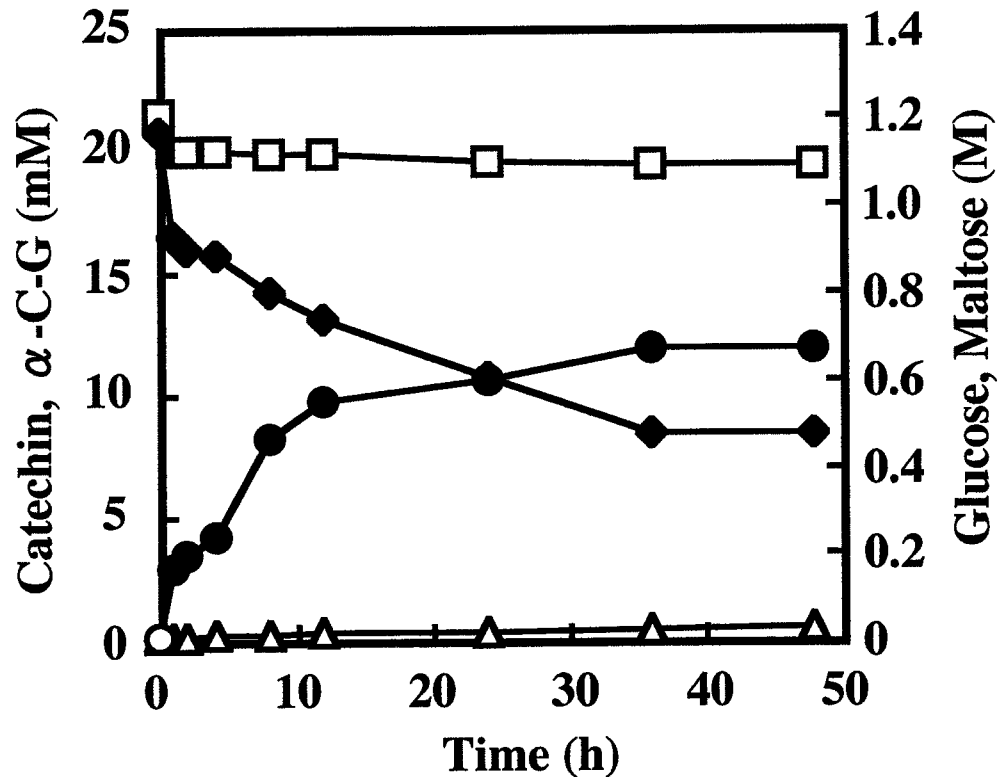


Fig. 1.5. Time course of  $\alpha$ -C-G synthesis by the crude enzyme of *X. campestris* WU-9701. The reactions were carried out under the standard reaction conditions: maltose 1.2 M, pH 6.5, temperature 45°C and (+)-catechin, 20mM.

Symbols: ●,  $\alpha$ -C-G; ◇, (+)-catechin; △, glucose; □, maltose.

#### 1.2.4. $\alpha$ -C-Gの安定性

基質である(+)-カテキンと $\alpha$ -C-Gの安定性を比較した。その結果、20°CのpH

7.0の緩衝液中において24時間後に(+)-カテキンが褐変したのに対して、 $\alpha$ -C-Gは安定であった (Fig. 1.6)。この結果から、(+)-カテキンの3'位の-OH基が褐変を起こしやすく、この-OH基のグルコシル化により安定性が増大したといえる。



Fig. 1.6. Stability of (+)-catechin and  $\alpha$ -C-G in solution. (+)-Catechin and  $\alpha$ -C-G were dissolved in 10 mM citrate-10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  buffer (pH 7.0). After 24 h in contact with air at 20°C, the solution containing (+)-catechin (A) turned brown, whereas the one containing  $\alpha$ -C-G (B) did not.

### 1.3. まとめ

*X. campestris* WU-9701 の凍結乾燥酵素を利用して、マルトースを糖基質としたグルコース転移反応により  $\alpha$ -C-G を合成した。この反応で、(+)-カテキンの3'位のみが  $\alpha$ -グルコシル化されたことから、当該酵素は位置選択的に-OH基を  $\alpha$ -グルコシル化した。また、アルコールの-OH基だけでなく、フェノール性の-OH基をグルコシル化可能であることを明らかにした。

$\alpha$ -C-G 合成の最適条件は(+)-カテキン 20.6 mM (60 mg)、マルトース濃度 1.2

M、pH 6.5、温度45℃と決定した。この条件下で、36時間の反応で54.1 mg の  $\alpha$ -C-G が生成し、供与(+)-カテキン当たりのモル変換収率は 57.1%に達した。さらに、 $\alpha$ -C-Gの安定性を検討した結果、 $\alpha$ -C-Gは(+)-カテキンよりも安定性が增大していた (Fig. 1.6) 。この結果から、(+)-カテキンの3'位の-OH基が安定性に関与しており、この-OH基のグルコシル化により安定性が増大したといえる。

#### 1.4. 参考文献

1. Matsuzaki, T. and Hara, Y.: Antioxidative activity of tea leaf catechins. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 59, 129-134 (1985). (in Japanese)

## 2. *X. campestris* WU-9701の凍結乾燥菌体を用いたヒドロキノンの $\alpha$ -アノマー選択的グルコシル化による $\alpha$ -アルブチン合成

### 2.1. 緒言

ヒドロキノンのグルコシドはアルブチンと呼ばれ、植物に存在する皮膚の美白効果の高い化合物であり、化粧品素材として使用されている。自然界に存在するアルブチンは $\beta$ 型のみであるが、近年 $\alpha$ 型のアルブチン ( $\alpha$ -アルブチン、Fig 2.1) が微生物起源 $\alpha$ -アミラーゼの糖転移活性を用いて合成され、高い美白効果を有することが示された<sup>1)</sup>。しかし、その合成収率は低い。

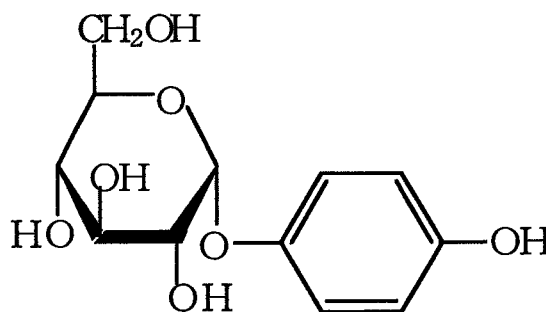


Fig. 2.1.  $\alpha$ -arbutin.

一方、ヒドロキノンは、ベンゼン環に2つの-OH基が対称な位置 (*para*位) に存在しており、糖転移酵素の位置選択性を解析検討する上で、適当なモデル基質になるものと考えられる。

以上の点から、ヒドロキノンのグルコシル化は工業的に有用であると考えられ、*X. campestris* WU-9701を用いた $\alpha$ -アルブチンの合成を検討した。

### 2.2. 実験結果

#### 2.2.1. WU-9701の凍結乾燥菌体による $\alpha$ -アルブチンの合成

マルトースを糖基質として、ヒドロキノンをWU-9701の凍結乾燥菌体と反応させた後、TLCによる分析を行った結果、グルコシドと考えられる一種類の生成物のスポットが検出された。さらに、HPLC分析を行った結果 (Fig. 2.2)、基質のヒドロ

キノンとグルコシドと考えられる一種類の生成物のピークが検出された。一方、反応液の糖のHPLC分析では、生成物としてグルコース、にマルトースのピークがそれぞれ検出され、マルトトリオースやマルトテトラオースのようなオリゴ糖類のピークは検出されなかった。

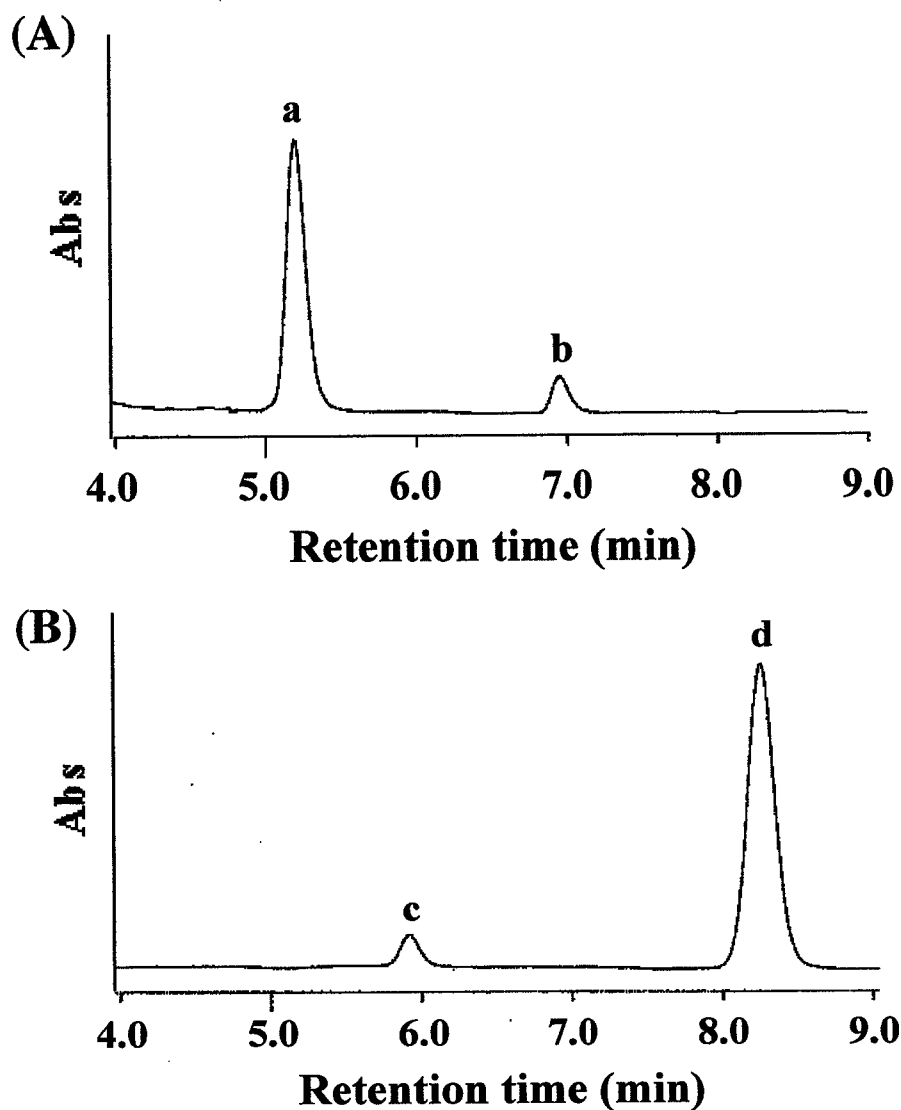


Fig. 2.2. HPLC chromatograms of the reaction products from hydroquinone and maltose using lyophilized cells of *X. campestris* WU-9701. The reaction mixture was loaded onto (A) a TSK-Gel ODS-80TS column and (B) an Asahipak NH2P-50 4E column. Peaks: a,  $\alpha$ -arbutin; b, hydroquinone; c, glucose; and d, maltose.



得られた反応生成物について $^{13}\text{C}$ -NMRと $^1\text{H}$ -NMRを測定し、さらにHMBC スペクトルの測定した。その結果により、ヒドロキノンの1位の炭素とグルコースの1位とのC-Hカップリングが検出され、ヒドロキノンの1位とグルコースの1位との炭素が酸素を介して結合していることが確認された。また $^1\text{H}$ -NMRスペクトルでグルコースの1位の水素が2位の水素とカップリングし、ダブルレットを形成している。そのカップリング定数は $J=3.7\text{ Hz}$ である。 $\alpha$ 結合しているときは $J=2\sim 4\text{ Hz}$ 、 $\beta$ 結合しているときは $J=7\sim 9\text{ Hz}$ であるので反応生成物は $\alpha$ 体であることが確認された。よって、反応生成物はhydroquinone 1-O- $\alpha$ -D-glucosyranside ( $\alpha$ -arbutin) であると確認された。

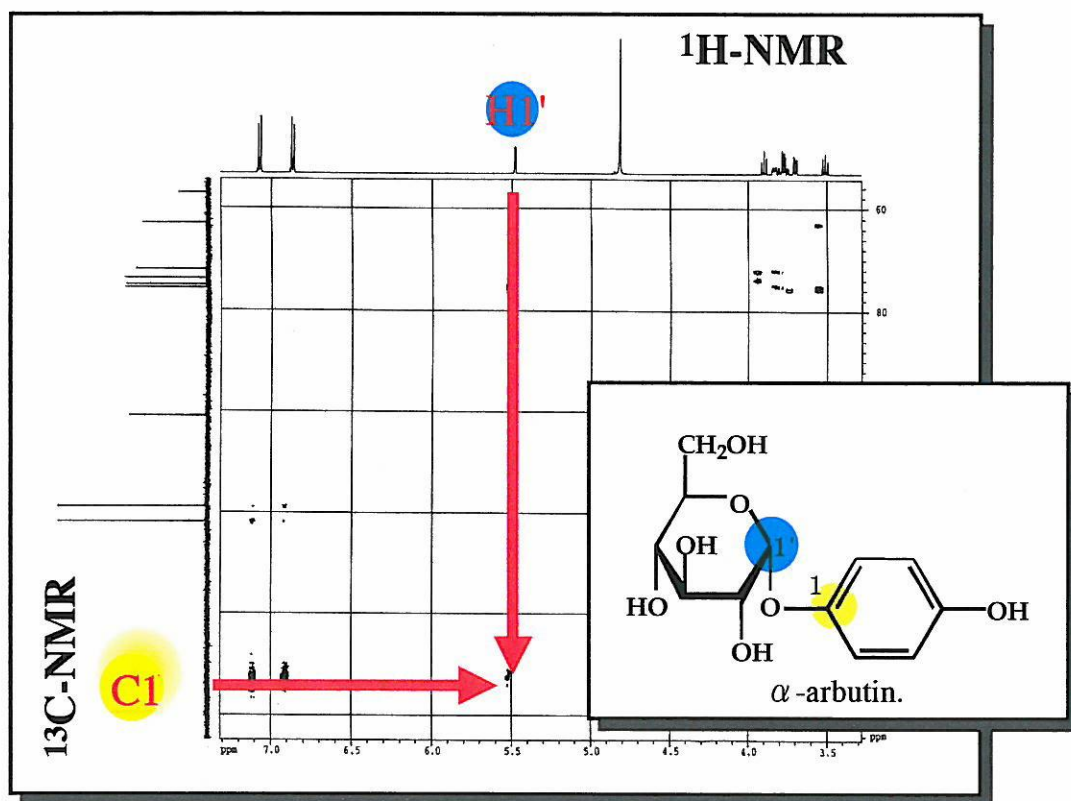


Fig. 2.3. Two-dimensional HMBC spectrum of the isolated product.

### 2.2.2. $\alpha$ -アルブチン合成条件の検討

$\alpha$ -アルブチンの合成基本条件として、マルトース濃度 1.2 M、pH 7.5 の 10 mM ホウ酸緩衝液 2 ml にヒドロキノン 10 mg と WU-9701 の凍結乾燥菌体 10 mg (グルコース転移活性として、 $5.5 \times 10^{-2}$  unit に相当) を添加し、40°C、160 rpm で 24 時間往復振とう反応を行った。

pH の影響について調べた結果を Fig. 1.4 (A) に示す。 $\alpha$ -アルブチンの生成量は pH 6.5~7.5 の範囲で高く、pH 7.5 で最高値に達した。

温度の影響について調べた結果を Fig. 1.4 (B) に示す。 $\alpha$ -アルブチンの生成量は温度の上昇とともに増大し、40°C で最大値を示した。一方、45°C 以上では生成量が減少したが、これは  $\alpha$ -アルブチンの合成に関与する酵素の失活によると思われる。

マルトース濃度の影響について調べた結果を Fig. 1.4 (C) に示す。 $\alpha$ -アルブチンの合成はマルトース濃度に比例して増加し、生成量は 1.2 M で最高値に達した。また、 $\alpha$ -C-G の場合と同様、高濃度のマルトースが必要と考えられた。また、培養菌体を用いた場合でも、高収率に  $\alpha$ -アルブチン合成が可能であった。

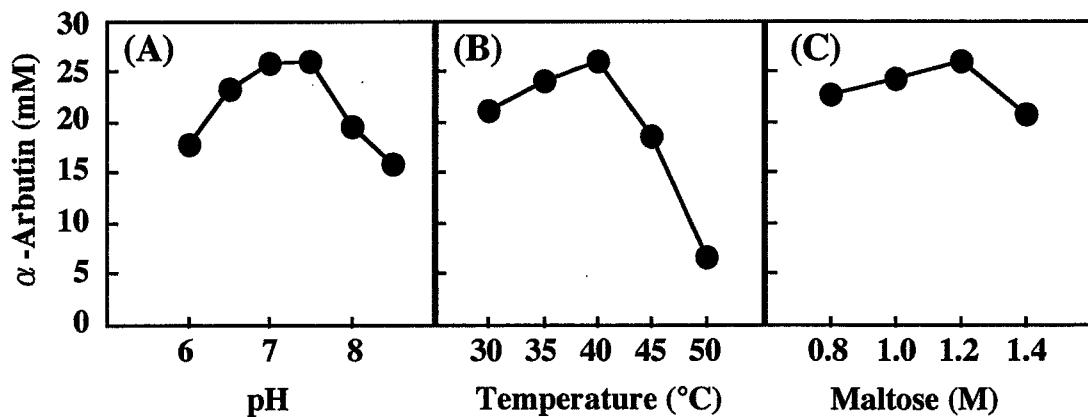


Fig. 2.4. Effects of pH (A), temperature (B), and maltose concentration (C) on the synthesis of  $\alpha$ -arbutin.

### 2.2.3. $\alpha$ -アルブチン合成の経時変化

Fig. 2.5に最適条件下における経時変化を示す。Fig. 2.5より、反応36時間後、45 mMのヒドロキノンから最大42 mMの $\alpha$ -アルブチンを生成し、供与ヒドロキノン当たりのモル変換率は93%に達した。この際マルトオリゴ糖などの反応副生成物は検出されなかった。過去に*Bacillus subtilis* X-23由来の $\alpha$ -アミラーゼ<sup>1)</sup>や*Leuconostoc mesenteroides*由来のスクロースホスホリラーゼ<sup>2)</sup>を用いて、 $\alpha$ -アルブチン合成が行なわれた報告があるが、供与ヒドロキノン当たりのモル変換率はそれぞれ46%と32%であり、本実験結果93%と比較して劣っている。

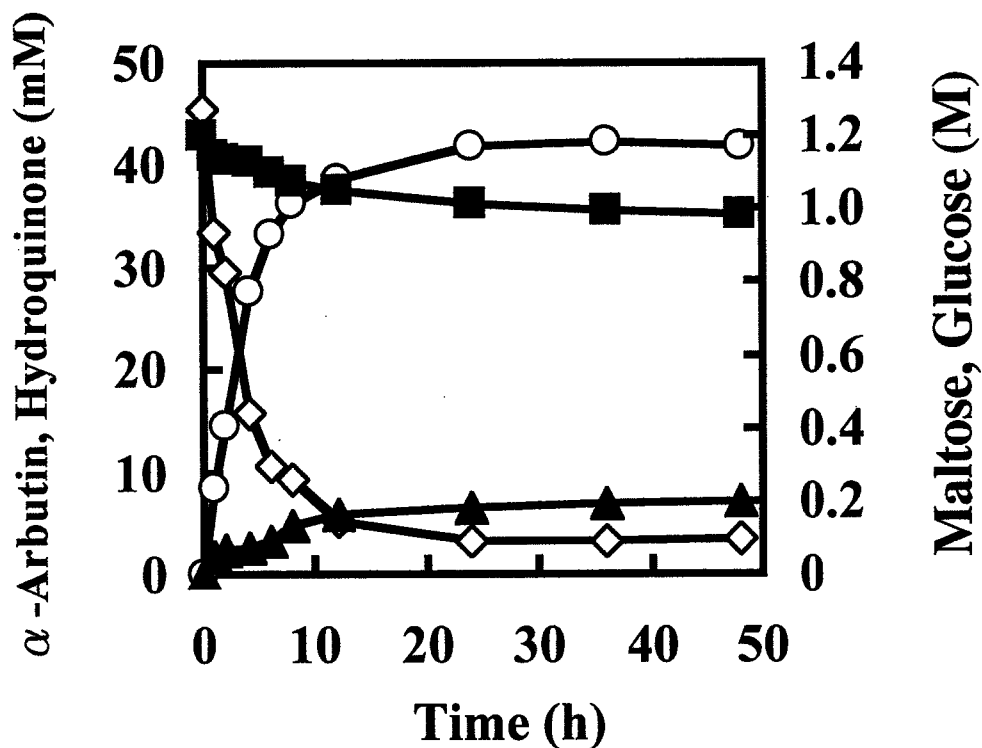


Fig. 2.5. Time course of  $\alpha$ -arbutin synthesis by the lyophilized cells of *X. campestris* WU-9701. The reactions were carried out under the standard reaction conditions: maltose 1.2 M, pH 7.5, temperature 40°C and hydroquinone, 45 mM. Symbols:  $\circ$ ,  $\alpha$ -arbutin;  $\diamond$ , hydroquinone;  $\blacktriangle$ , glucose;  $\blacksquare$ , maltose.

### 2.3. まとめ

*X. campestris* WU-9701の凍結乾燥菌体を利用してマルトースとヒドロキノンから $\alpha$ -アノマー選択的に $\alpha$ -アルブチンを合成した。最適条件下 (pH 7.5、マルトース濃度1.2 M、40℃) では、36時間の反応で45 mMのヒドロキノンから最大42 mMの $\alpha$ -アルブチンを生成し、供与ヒドロキノン当たりのモル変換収率は93%に達した。以上の結果から、 $\alpha$ -アルブチン合成に関して*X. campestris* WU-9701の酵素は適しており、菌体 (細胞) そのものを触媒として利用可能なことは前処理の簡便さとともに極めて有効であると考えられる。

### 2.4. 参考文献

1. Kitao, K., and Sekine, H.:  $\alpha$ -D-Glucosyl transfer to phenolic compounds by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of  $\alpha$ -arbutin. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 38-42 (1994).
2. Nishimura, T., Kometani, T., Takii, H., Terada, Y., and Okada, S.: Purification and some properties of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* X-23 that glucosylates phenolic compounds such as hydroquinone. *J. Ferment. Bioeng.*, 78, 31-36 (1994).

### 3. *X. campestris* WU-9701のグルコース転移酵素の精製および 酵素的諸性質の検討

#### 3.1. 緒言

当研究室では、*X. campestris* WU-9701の凍結乾燥菌体をマルトースと $\beta$ -メントールに作用させることにより、ほぼ100%のモル変換収率で、 $\beta$ -menthyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside ( $\alpha$ -MenG) をアノマー選択的に合成することに成功し<sup>1)</sup>、他にも本報告で明らかにしたように(+)-カテキンやヒドロキノンの $\alpha$ -グルコシル化にも成功している。この反応では、マルトースを糖基質として、 $\beta$ -メントールや(+)-カテキン、およびヒドロキノンの-OH基のみを選択的に $\alpha$ -グルコシル化していた。また、マルトースの加水分解活性は微弱であり、マルトトリオースなどの副生成物は見出されなかった。当該酵素は、従来の酵素に比べマルトースからのグルコース転移活性が強力な酵素と考えられたため、新たに当該酵素を「グルコース転移酵素」と命名した。そこで、本章においては当該酵素をSDS-PAGEで単一バンドとなるまでに精製し、N末端および内部アミノ酸配列を決定し、酵素的諸性質を明らかにした。

#### 3.2. 実験結果

##### 3.2.1. グルコース転移酵素の精製

予備実験により、当該酵素はWU-9701の菌体内に局在することを確認した。マルトースを含む培地で培養したWU-9701の菌体から調製した無細胞抽出液を粗酵素液とし、硫安分画と数種のカラムクロマトグラフィーを用いて当該酵素の精製を行った。その結果、当該酵素は前述の粗酵素液より0.33%の収率で100倍に精製された (Table 3.1)。

Table 3.1. Purification steps of the  $\alpha$ -glucosyl transfer enzyme of *X. campestris* WU-9701.

Step	Total protein (mg)	Specific activity <sup>a)</sup> (unit/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude enzyme	$4.78 \times 10^2$	$3.47 \times 10^{-2}$	$1.00 \times 10^2$	1.00
Ammonium sulfate precipitation (30-60%)	$2.58 \times 10^2$	$4.02 \times 10^{-2}$	$6.30 \times 10$	1.16
DEAE-Toyopearl 650S (Anion-exchange)	$2.30 \times 10$	$2.02 \times 10^{-1}$	$2.80 \times 10$	5.83
Superdex 200 (Gel filtration)	5.19	$4.47 \times 10^{-1}$	$1.40 \times 10$	$1.29 \times 10$
Maltose-agarose (Affinity)	$8.87 \times 10^{-1}$	1.31	6.98	$3.77 \times 10$
1st Q-Sepharose (Anion-exchange)	$3.17 \times 10^{-2}$	3.40	$6.56 \times 10^{-1}$	$9.82 \times 10$
2nd Q-Sepharose (Anion-exchange)	$1.60 \times 10^{-2}$	3.46	$3.30 \times 10^{-1}$	$9.96 \times 10$

<sup>a)</sup>The enzyme activity was estimated as glucose transfer activity of was measured using hydroquinone as a substrate. One unit (U) of  $\alpha$ -glucosyl transfer activity was defined as the amount of enzyme that produces one  $\mu$  mole of hydroquinone  $\alpha$ -glucoside per minute from hydroquinone.

一方、酵素の精製度の確認と分子量測定は Laemmli<sup>2)</sup>の方法に準じて、10%のポリアクリルアミドゲルを用い、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) をすることにより行った。泳動後、Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) 溶液でゲルを染色しタンパク質を可視的に検出し、精製度を確認した。Fig. 3.1の結果より、当該酵素はSDS-PAGEにおいて一本のバンドで検出され、単

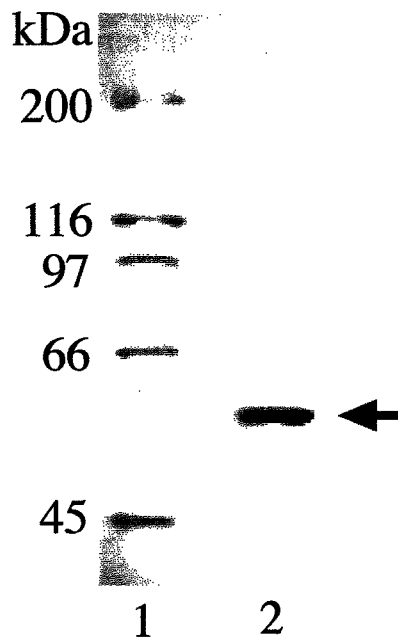


Fig. 3.1. SDS-PAGE of the purified  $\alpha$ -glucosyl transfer enzyme from *X. campestris* WU-9701.

The protein was stained with Coomassie brilliant blue R-250. Myosin (200 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), phosphorylase (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa) and ovalbumin (45 kDa) were used as molecular marker standards. Lanes: 1, molecular weight standards; 2, purified enzyme. The arrow indicates 57 kDa for the molecular weight of  $\alpha$ -glucosyl transfer enzyme.

一に精製されていることを確認した。SDS-PAGEでの分子量は、57 kDaと推定された。また、ゲルろ過での分子量測定の結果、本酵素は60 kDaと概算され、当該酵素はモノマー酵素であると推定された。

さらに、得られた精製酵素を用いてN末端アミノ酸配列分析を行った。N末端アミノ酸配列が19個 (Ser-Gln-Thr-Pro-Trp-Trp-Arg-Gly-Ala-Val-Ile-Tyr-Gln-Ile-Tyr-Pro-Arg-Ser) と、内部アミノ酸配列が12個 (Val-Met-Ile-Asp-Gln-Val-Leu-Ser-His-Thr-Ser-Ile) が決定された。この結果をふまえて、データベースによる、既知酵素のアミノ酸配列とのホモロジー検索を行った。相同性の高かつ

Table 3.2. N-terminal and internal amino acid sequences of  $\alpha$ -glucosyl transfer enzyme from *X. campestris* WU-9701 compared with other enzymes.

Origin and enzyme	N-terminal	Internal
$\alpha$ -Glucosyl transfer enzyme from <i>X. campestris</i> WU-9701	SQTP <b>WWRGAVIYQIYPRS</b>	<b>VMIDQVLSHTSI</b>
$\alpha$ -Glucosidase from <i>Sinorhizobium meliloti</i>	ADRD <b>WRRPVIYQIYPRS</b>	<b>VMIDLVLSTSD</b>
Oligo-1,6-Glucosidase from <i>Bacillus cereus</i>	MEKQ <b>WVKESVYQIYPRS</b>	<b>LMMDLVVNHTSD</b>
$\alpha$ -Glucosidase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TEPK <b>WKEATYQIYPAS</b>	<b>FITDLVINHCST</b>

たものをTable 3.2に示した。その結果、*X. campestris* WU-9701 のグルコース転移酵素は*Sinorhizobium meliloti* 由来のputative  $\alpha$ -グルコシダーゼ<sup>3)</sup>などの酵素の配列と高い相同性を示した。しかし、*S. meliloti* と*Escherichia coli*の菌体および無細胞抽出液には、 $\beta$ -メントールのグルコシル化 ( $\alpha$ -MenG合成) 活性は認められなかった。我々は、酵母*Saccharomyces cerevisiae*の $\alpha$ -グルコシダーゼを用いて、 $\beta$ -メントールの $\alpha$ -グルコシル化にも成功しているが<sup>4-6)</sup>、 $\alpha$ -MenGの合成収率が低いことやマルトトリオース副生など、WU-9701を用いた場合と異なる反応特性を示した。したがって、WU-9701由来の当該酵素の新規性が強く示唆された。

### 3.2.2. グルコース転移酵素の酵素的諸性質の検討

精製した*X. campestris* WU-9701由来のグルコース転移酵素について基本的な酵



素の諸性質の検討を行った。本酵素の $\alpha$ -アルブチン合成活性における最適マルトース濃度、最適pH、最適温度、金属イオン、加水分解における基質特異性、酵素的速度論およびグルコース受容体の存在によるマルトースについても調べた。精製酵素は $\alpha$ -アルブチン合成活性 $9.5 \times 10^{-2}$  Uを添加した。

#### 3.2.2.1. 金属イオンの影響

まず、 $\alpha$ -アルブチン合成活性における金属イオン及び試薬の影響を調べた。10 mMの金属イオンまたはパラメルクリ安息香酸 (pCMB) を1.2 Mマルトースを含む10 mMアンモニア-塩化アンモニウム緩衝液 (pH 8.5) に加え、精製酵素と40°Cで24時間、180 rpmで振盪反応を行い、生成した $\alpha$ -アルブチン量をHPLCで定量した。金属イオンやその他の試薬を入れない時の活性を100%とした。

金属イオンの影響を調べるためには金属イオンを含まない緩衝液を選ぶ必要があるため、アンモニア-塩化アンモニウム緩衝液を用いた。結果をTable 3.3に示した。1価の金属イオンである $K^+$ 、 $Na^+$ では活性化された。2価の金属イオンである $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ で著しく阻害された。また、3価の $Fe^{3+}$ でも阻害された。これは、酵素の親核的なアミノ酸側鎖が金属に対して配位子として働き、錯体を形成したために、活性部位がふさがれたためと考えられる。またpCMBで阻害されたことから、グルコース転移活性にシステイン残基が関与していると推測された。

#### 3.2.2.2. 基質特異性と転移反応における糖供与体

まず、加水分解活性における基質特異性を調べた。1.5 mlのチューブにTable 3.4に示す濃度の各多糖類をそれぞれ含むホウ酸-KCl緩衝液 (pH 8.5) 500  $\mu$ lを入れ、精製酵素と40°Cで20時間反応させた後、10分間煮沸して反応を停止し、遊離したグルコース量をHPLCで定量することで基質の加水分解量を測定した。

Table 3.4に結果を示す。当該酵素は $\alpha$ -1, 4 結合に特異的に作用したことから、

Table 3.3. Effects of various metal ions on  $\alpha$ -arbutin synthesis activity of the purified enzyme.

Reagents	Relative activity (%)
None	100
KCl	194
LiCl	149
NaCl	181
CaCl <sub>2</sub>	81
CuCl <sub>2</sub>	0
HgCl <sub>2</sub>	0
MgCl <sub>2</sub>	56
MnCl <sub>2</sub>	29
ZnCl <sub>2</sub>	0
<i>p</i> CMB*	0

\**p*-chloromercuribenzoic acid.

Effects of various reagents were examined under the standard assay conditions the addition of various reagents at final concentration of 10 mM, in 10 mM NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>Cl buffer (pH 8.5).

$\alpha$ -グルコシダーゼに分類される。さらに、マルトトリオースなどにはほとんど作用せず、2糖のマルトースのみに特異的に作用したことから、 $\alpha$ -グルコシダーゼの中でもマルトースに特異的に作用するマルターゼであると考えられる。

次に、糖転移活性における糖供与体を検討した。ヒドロキノンを経受容体として検討した結果、当該酵素はマルトースを経供与体とした時のみ、グルコース転移反応が確認された (Table 3.5)。

### 3.2.2.3. 加水分解活性とグルコース転移活性

当該酵素は、ヒドロキノンなどのグルコース受容体が存在する場合におけるグル

Table 3.4. Reaction of the purified enzyme toward various saccharides.

Saccharide	Concentration	Hydrolysis (mM)
Trehalose	100 mM	0
Kojibiose	100 mM	0
Nigerose	100 mM	4.71
Maltose	100 mM	$1.99 \times 10^{-1}$
Isomaltose	100 mM	$3.10 \times 10^{-1}$
Cellobiose	100 mM	0
Maltotriose	100 mM	$3.81 \times 10^{-1}$
Amylose	3.6% (w/v)	$6.44 \times 10^{-1}$
<i>p</i> NPG*	25 mM	$1.75 \times 10^{-1}$
Sucrose	100 mM	0

\**p*-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside

Effects of various saccharides were examined under the standard assay conditions the addition of various saccharides at final concentration, in 10 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-NaOH-KCl buffer (pH 8.5).

コース転移活性が微量な酵素でもスムーズに行われるのに対して、マルトースのみに作用させた時の加水分解活性は非常に弱いと考えられる。そこで、グルコース受容体としてヒドロキノンを添加した場合の本酵素の加水分解活性と糖転移活性を調べた。1.2 Mのマルトースを含むホウ酸-KCl緩衝液 (pH 8.5) 900  $\mu$ lと酵素溶液 100  $\mu$ lを1.5 mlチューブに入れ混合し、40 $^{\circ}$ C、180 rpmにて反応させた。1時間後、2時間後にそれぞれ20  $\mu$ lのヒドロキノン添加した反応液とヒドロキノン添加しない反応液を用意し、1時間ごとに10分間煮沸し、反応停止後、HPLCにてマルトース濃度を測定した。

結果をFig. 3.3に示す。ヒドロキノン非存在下では、マルトース減少量が少ないのに対し、ヒドロキノン添加を1時間後、2時間後にそれぞれ添加すると、マルトース量が急激に減少した。このことから、マルトースのみが存在する場合の加水分解活性は

Table 3.5.  $\alpha$ -Glucosyl transfer reaction toward hydroquinone by the purified enzyme using various saccharides as  $\alpha$ -glucosyl donors.

Saccharide	Concentration	$\alpha$ -Arbutin (mM)
Trehalose	1.2 M	0
Kojibiose	1.2 M	0
Nigerose	1.2 M	0
Maltose	1.2 M	$2.5 \times 10$
Isomaltose	1.2 M	0
Cellobiose	300 mM	0
Maltotriose	300 mM	0
Maltotetraose	300 mM	0
Amylose	3.6% (w/v)	0
<i>p</i> NPG*	300 mM	0
Sucrose	1.2 M	0

\**p*-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside

$\alpha$ -Glucosyl transfer reaction was examined under the standard assay conditions with the addition of various saccharides at a final concentration, in 10 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-NaOH-KCl buffer (pH 8.5).

弱く、グルコース受容体が存在する場合にグルコース転移活性が強力であることがわかった。したがって、本酵素は加水分解を主に行う通常の $\alpha$ -グルコシダーゼとは性質が異なり、この点においても新規な酵素であると考えられた。

### 3.3. まとめ

*X. campestris* WU-9701由来の $\alpha$ -アノマー選択的グルコシル化を触媒する酵素をSDS-PAGEで単一となるまで精製した。本酵素の分子量は57 kDaと概算され、

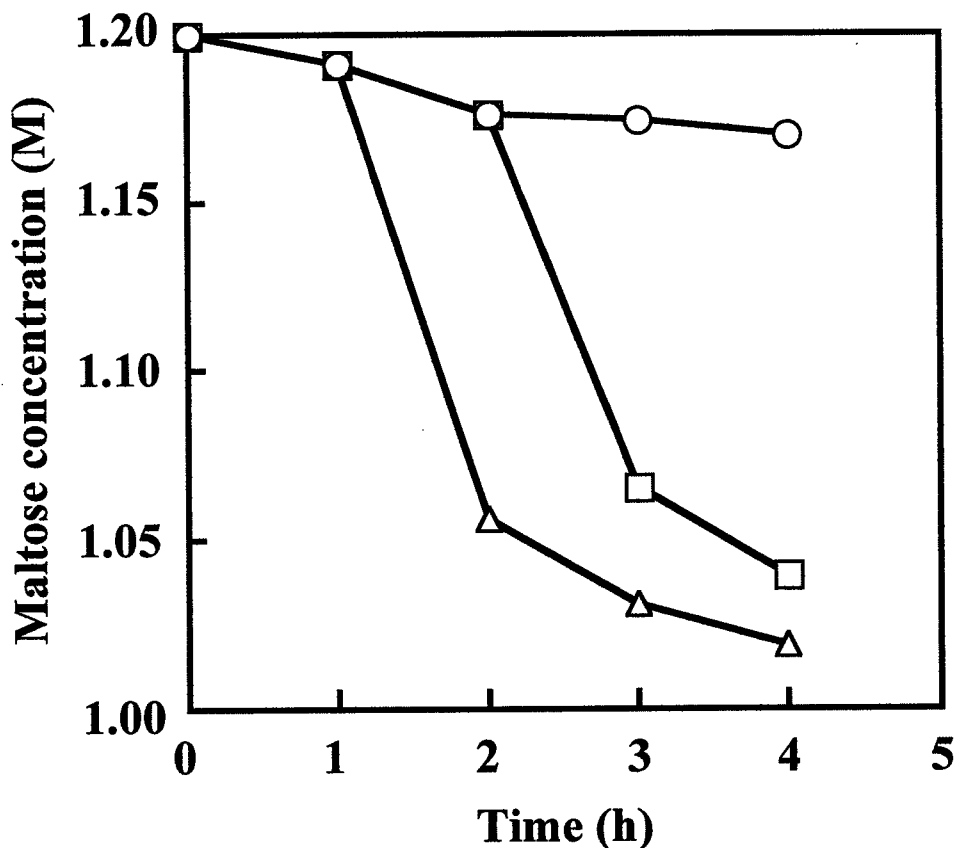


Fig. 3.3. Time course of  $\alpha$ -glucosyl transfer and hydrolysis reactions using purified  $\alpha$ -glucosyl transfer enzyme. The reaction mixture, containing the purified enzyme 0.1 ml ( $9.5 \times 10^{-5}$  U) and 0.9 ml of 10 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ -NaOH-KCl buffer (pH 8.5) containing 1.2 M maltose, was shaken at 180 rpm at  $40^\circ\text{C}$ . Then, hydroquinone 10 mg was added to the reaction mixture after 1 h or 2 h incubation. The amount of maltose, by every 1 h, was measured by HPLC under the conditions (B) as described in Materials and Methods. Symbols: ○, without hydroquinone; △, hydroquinone added after 1 h incubation; □, hydroquinone added after 2 h incubation.

ゲルろ過の結果もあわせて当該酵素はモノマー酵素と考えられる。本酵素のN末端および内部アミノ酸配列を決定したところ、他の微生物由来の $\alpha$ -グルコシダーゼと高い相同性が認められた。また、当該酵素の酵素的諸性質を検討したところ、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、O-phenanthroline で活性化、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、pCMBで著しく阻害

された。マルトースを含め数種類の糖に対する加水分解活性は認められたが、糖転移活性はマルトースを糖供与体とした場合にのみ認められた。しかも従来酵素に比べ、そのグルコース転移活性が強力なことから新規な酵素であると考えられた。

### 3.4. 参考文献

1. Nakagawa, H., Dobashi, Y., Sato, T., Yoshida, K., Tsugane, T., Shimura, S., Kirimura, K., Kino, K., and Usami, S.:  $\alpha$ -Anomer-selective glucosylation of menthol with high yield through a crystal accumulation reaction using lyophilized cells of *Xanthomonas campestris* WU-9701. *J Biosci. Bioeng.*, 89, 138-144 (2000).
2. Laemmli, U. K.: Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680-685 (1970).
3. Willis, L. B., and G. C. Walker.: A novel *Sinorhizobium meliloti* operon encodes an  $\alpha$ -glucosidase and a periplasmic-binding-protein-dependent transport system for  $\alpha$ -glucosides. *J. Bacteriol.*, 181, 4176-4184 (1999).
4. Nakagawa, H., Yoshiyama, M., Shimura, S., Kirimura, K., and Usami, S.: Anomer selective formation of  $\beta$ -menthyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside by  $\alpha$ -glucosidase-catalyzed reaction. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 1914-1915 (1996).
5. Nakagawa, H., Yoshiyama, M., Shimura, S., Kirimura, K., and Usami, S.: Anomer-selective glucosylation of  $\beta$ -menthol by yeast  $\alpha$ -glucosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 1332-1336 (1998).
6. Noguchi, K., Nakagawa, H., Yoshiyama, M., Shimura, S., Kirimura, K., and Usami, S.: Anomer-selective glucosylation of  $\beta$ -Menthol using lyophilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.*, 85, 436-438 (1998).

## 4. *X. campestris* WU-9701のグルコース転移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高発現

### 4.1. 緒言

前章までに、WU-9701のグルコース転移酵素をSDS-PAGEで単一バンドとなるまでに精製し、その酵素的諸性質を明らかにした。当該酵素を工業的に利用することや酵素特性の遺伝子レベルにおける解析は酵素工学の観点からも極めて重要であると考えられる。本章では当該酵素をコードする遺伝子（これを、*xgtA*と名付けた）をクローニングして遺伝子解析を行い、さらに大腸菌での高発現を検討し、さらに効率的な $\alpha$ -グルコシド生産を試みた。

### 4.2. 実験結果

#### 4.2.1. オリゴヌクレオチドプローブの合成

まずPCRを利用して、当該酵素のアミノ酸配列をもとに、オリゴヌクレオチドプローブを作製した。PCRのプライマーは、当該酵素のN末端および内部アミノ酸配列から次のように作製した。

センスプライマー ; 5'-CARACICCCITGGTGGMG-3'

アンチセンスプライマー ; 5'-AGIACYTGRTCKATCAT-3'

なお、I、R、M、Y、Kはそれぞれdeoxyinosine、A+G、A+C、C+T、G+Tを表す。抽出したWU-9701の全DNAを鋳型として、これらのプライマーと組み合わせPCR増幅を行った。その結果、約200 bpの増幅産物が得られた。この増幅産物の塩基配列を決定したところ、当該酵素のN末端および内部アミノ酸配列に相当する配列が存在した。以上から、得られた増幅産物はプローブとして利用可能と判断し、以後の実験で用いた。

#### 4.2.2. グルコース転移酵素をコードする遺伝子 (*xgtA*) のクローニング

WU-9701の培養菌体から抽出した全DNAを制限酵素*Sa*IIで完全消化して、4~7 kbのDNA断片をプラスミドベクターpUC18の*Sa*IIサイトにライゲーションした。そのプラスミドを用いて、大腸菌*E. coli* JM109を形質転換し、部分DNAライブラリーを構築した。得られた部分DNAライブラリーに対して、前述のプロープを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行ったところ、2個の陽性クローンを取得した。2個のクローンには、約4.4 kbの同一のDNA断片が*lac*プロモーターに対して、それぞれ同方向と逆方向に挿入されていた。得られたクローンが保持するプラスミドをそれぞれ、pUGTF-7、pUGTF-64と命名した (Fig. 4.1)。D-メントールのグルコシル化を指標としたグルコース転移活性試験を行ったところ、pUGTF-7を保持した大腸菌において、 $\alpha$ -MenGの合成が確認されたため、以後の実験はpUGTF-7を用いて行った。

#### 4.2.3. *xgtA*の塩基配列の決定

pUGTF-7を用いて、*xgtA*の塩基配列の決定を行った。pUGTF-7に挿入された約4.4 kbの断片において、*xgtA*は5'側に存在していた。塩基配列をFig. 4.2に示す。*xgtA*は1,617 bpで構成され、539個のアミノ酸をコードしていた。また、*xgtA*の上流にはプロモーターと予測される配列またリボソーム結合配列と予測される配列が存在した。

#### 4.2.4. グルコース転移酵素と他酵素との相同性

推定された*xgtA*と既知の他酵素遺伝子のアミノ酸配列を比較した。その結果をTable 4.1に示す。数種の加水分解酵素と相同性を示し、最も相同性が高かったのは*Sinorhizobium meliloti*のputative  $\alpha$ -グルコシダーゼ<sup>1)</sup>で、56.2%の相同性を示し



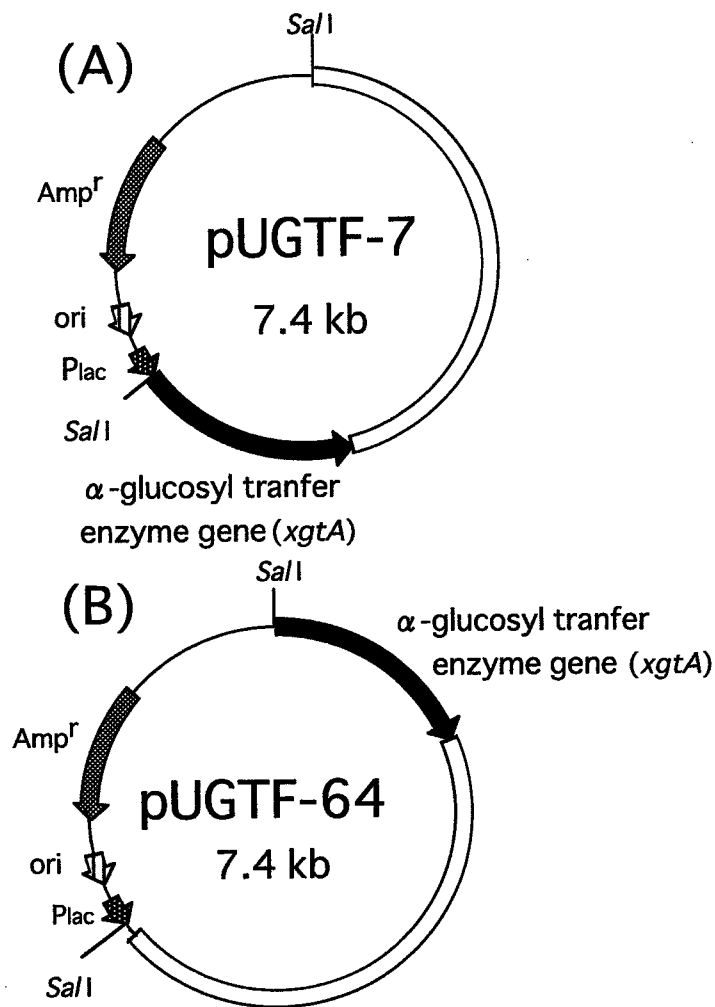


Fig. 4.1. Physical maps of (A) pUGTF-7 and (B) pUGTF-64.

た。とくに、oligo-1,6-グルコシダーゼと相同性を示した。

また、推定された *xgtA* と既知の他酵素遺伝子とのアミノ酸配列のアラインメントを調べた。その結果を Fig 4.3 に示す。当該酵素は数種の加水分解酵素と N 末端側で相同性の高い領域が存在した。また、 $\alpha$ -アミラーゼファミリーと称される加水分解酵素群に特徴的に認められる、加水分解活性に関与する必須アミノ酸残基 Asp199、Glu255、Asp329 が存在した。



Table 4.1. Comparison of a gene encoding  $\alpha$ -glucosyl transfer enzyme from *X. campestris* WU-9701 with other enzyme genes.

Enzyme	Identity (%)	
	Amino acid	Nucleotide
$\alpha$ -Glucosidase from <i>Sinorhizobium meliloti</i>	56.2	62.6
Trehalose-6-phosphate hydrolase from <i>Escherichia coli</i>	35.0	51.8
$\alpha$ -Glucosidase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33.3	47.0
Oligo-1,6-glucosidase from <i>Bacillus cereus</i>	31.6	47.9
Dextran glucosidase from <i>Streptococcus mutans</i>	30.4	47.3

#### 4.2.5. グルコース転移酵素の立体構造予測

当該酵素は $\alpha$ -アミラーゼファミリーに属すると考えられるが、 $\alpha$ -アミラーゼファミリーに属する酵素は加水分解を主反応とするものが多く、転移反応を主とする当該酵素は $\alpha$ -アミラーゼファミリーの中でも、性質を異にしている。そこで、XgtAの立体構造を予測して、構造上の特徴を調べた。まず、XgtAの一次配列から既知の酵素の中で構造が最も類似しているものを調べた。用いたプログラムは日本DNAデータバンクのLIBRAで、タンパク構造内の疎水性相互作用や水素結合などの構造構成における要素を考慮して、目的酵素が既知のどの酵素と構造が最も類似しているかを算出するものである。数値は-（マイナス）で示され、絶対値が大きいほ



Table 4.2 Compatible structures of the enzymes with XgtA using LIBRA.

Enzyme and its source	Score
Oligo-1,6-glucosidase from <i>Bacillus cereus</i>	-5.44
$\alpha$ -Amylase II from <i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	-4.69
Cyclodextrin glycosyltransferase from <i>Bacillus circulans</i>	-3.72
Glycosyltrehalose trehalohydrolase from <i>Sulfolobus solfataricus</i>	-3.46
$\alpha$ -Amylase from Boar	-3.40

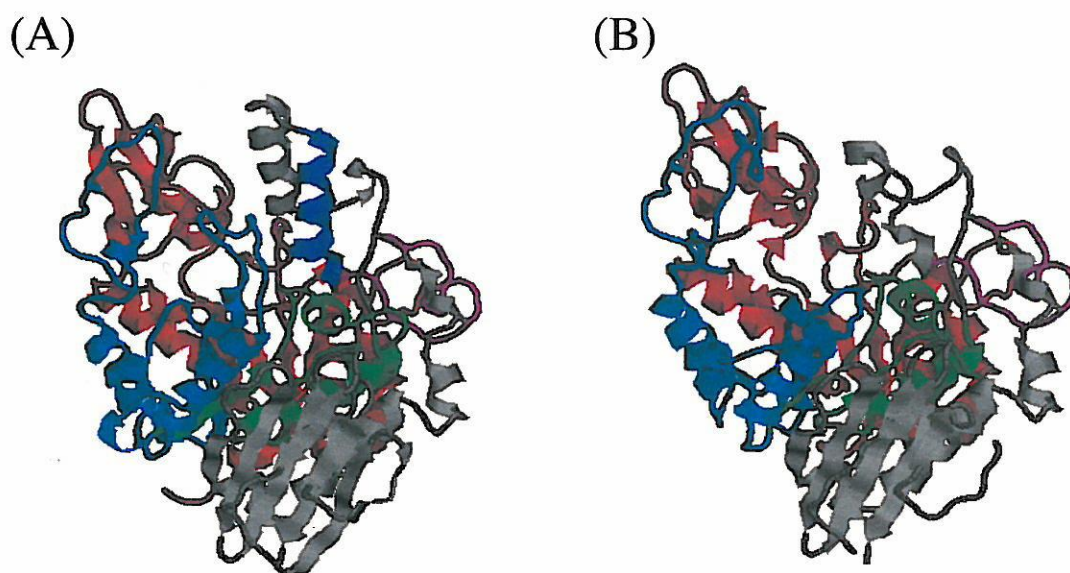


Fig. 4.4. Stereoview of the predicted structure of  $\alpha$ -glucosyl transfer enzyme (XgtA), from *X. campestris* WU-9701, overlaid with the crystal structure of oligo-1, 6-glucosidase of *Bacillus cereus*. (A), oligo-1, 6-glucosidase of *B. cereus*; (B), XgtA. Molecular modeling of XgtA was performed using 3D-DIGSAW software.



ど構造の類似性が高いと判断する。その結果をTable 4.2に示す。最も構造が類似していると考えられた酵素は*Bacillus cereus*のoligo-1,6-グルコシダーゼ<sup>2)</sup>であった。

この結果をもとに、XgtAの構造をICRF (Imperial Cancer Research Fund, London, UK) の3D-JIGSAWを利用して推定した。その結果をFig. 4.4に示す。とくに、*B. cereus*のoligo-1,6-グルコシダーゼと比較して、アミノ酸において372-401にあたる構造が大きく異なった。Watanabeらの*B. cereus*のoligo-1,6-グルコシダーゼの構造解析結果では、この部分がタンパク構造の安定性に関与しているとの報告している<sup>2)</sup>。XgtAは熱安定性が低く(データ省略)、この部分の欠落が、XgtAの熱安定性に関与しているのではないかと考えられた。

#### 4.2.6. *xgtA*の大腸菌における高発現

これまでに、WU-9701を用いて $\alpha$ -MenGや $\alpha$ -アルブチンの合成を行ってきたが、最高収率に達するまでに48時間や36時間と長時間を要している。これは、添加するタンパク量の不足とタンパクとしての比活性が低いことに原因があると考えられた。WU-9701を用いてこの点の改善を試みたが、タンパクの生産量に限界があり実現が困難と考えられた。そこで、クローニングした*xgtA*を大腸菌内で高発現させることが可能となれば、短時間での $\alpha$ -グルコシド生産が実現可能と考え、*xgtA*の大腸菌での高発現を試みた。

大腸菌内での*xgtA*の高発現のため、数種の発現用ベクターを試したが、その中でもpKK223-3を用いた場合が発現量が最も高かった。そこで以後の実験は、*xgtA*をpKK223-3に挿入したキメラプラスミドpKKGTF (Fig. 4.5) を保持した大腸菌*E. coli* JM109/pKKGTFを用いて行った。

グルコース転移活性を調べた結果をTable 4.3に示す。*E. coli* JM109/pKKGTFの無細胞抽出液は、原株WU-9701の無細胞抽出液と比べ、タンパク1 mg当たりの比活性が140倍のグルコース転移活性に達した。

以上のことから、実際に*E. coli* JM109/pKKGTFの無細胞抽出液を用いた $\alpha$ -アル

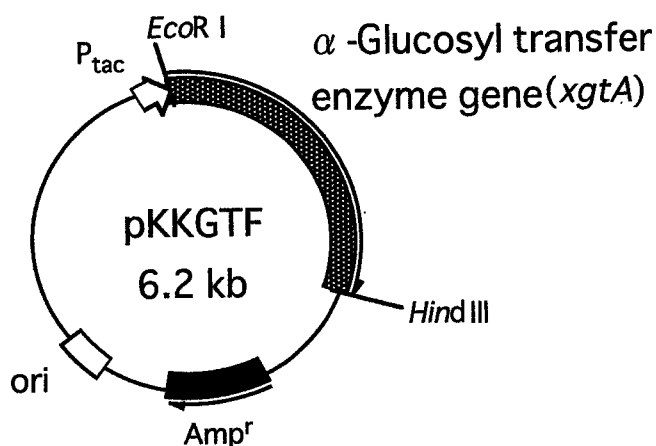


Fig. 4.5. Physical map of pKKGTF.

Table 4.3.  $\alpha$ -Glucosyl transfer activity of *E. coli* JM109/pKKGTF.

Origin	Specific activity (U/mg) <sup>a)</sup>	Relative
<i>X. campestris</i> WU-9701 <sup>b)</sup>	$3.5 \times 10^{-1}$	1
<i>E. coli</i> JM109/pKKGTF <sup>c)</sup>	4.8	140

<sup>a)</sup>One unit (U) of  $\alpha$ -glucosyl transfer activity was defined as the amount of enzyme that transfers one  $\mu$  mole of  $\alpha$ -glucose to hydroquinone from maltose per minute.

<sup>b)</sup>Cells of *X. campestris* WU-9701 were grown under aerobic conditions with shaking at 30°C for 48 h.

<sup>c)</sup>Cells of *E. coli* JM109/pKKGTF were grown under aerobic conditions with shaking at 37°C for 22 h.

ブチンの合成を試みた。WU-9701と同条件の反応液に*E. coli* JM109/pKKGTFの無細胞抽出液を1.2 unit添加して反応を行った。その結果、反応開始3時間後に供与ヒドロキノン当たり、モル変換収率94%で $\alpha$ -アルブチンが合成された (Fig. 4.6) 。 WU-9701の場合と比べ、反応時間が3分の1に短縮された。

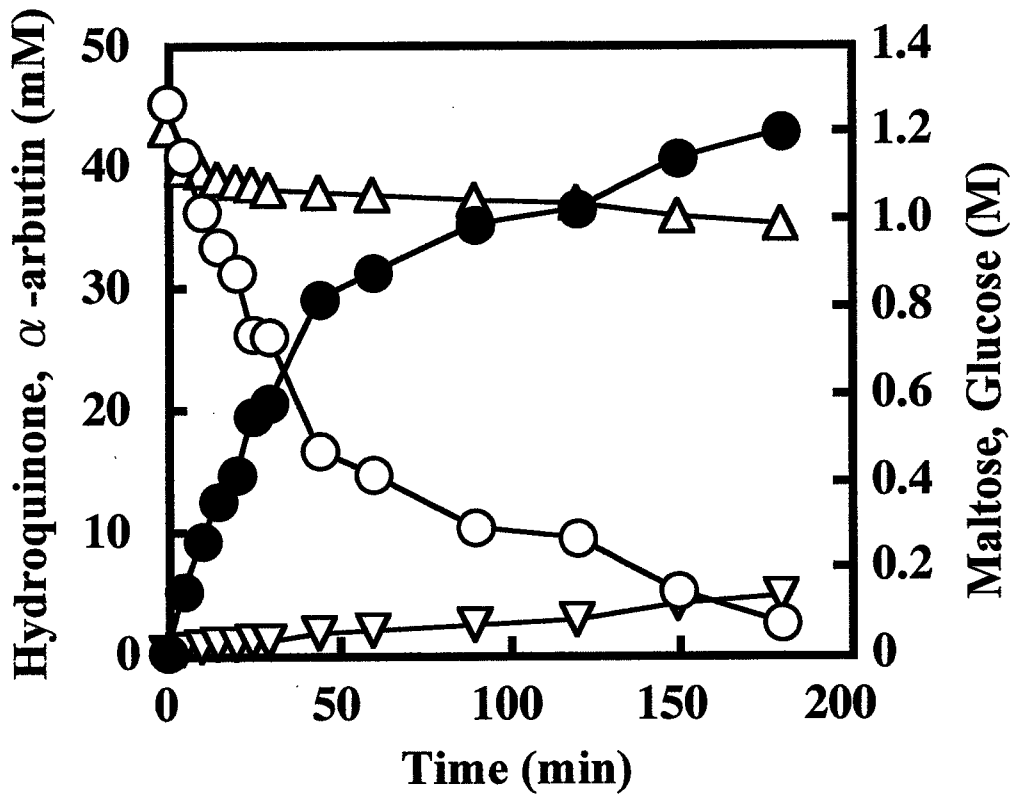


Fig. 4.5. Time course of the synthesis of  $\alpha$ -arbutin using the recombinant enzyme of *E. coli* JM109/pKKGTF. The reactions were carried out under the optimal conditions: Portions of 10 mg hydroquinone and 400  $\mu$ l of cell-free extract of *E. coli* JM109/pKKGTF (1.2 U) were added to 1.6 ml of 10 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-NaOH-KCl buffer (pH 7.5) containing 1.5 M maltose to give finally 1.2 M maltose in 2 ml of the reaction mixture. The reaction mixture was shaken at 180 rpm at 40°C. Symbols: ●,  $\alpha$ -arbutin; ○, hydroquinone; △, maltose; ▽, glucose.



#### 4.3. まとめ

*X. campestris* WU-9701の $\alpha$ -グルコース転移酵素をコードする遺伝子 (*xgtA*) を大腸菌を宿主としてクローニングした。*xgtA*は1617bpで構成され、539個のアミノ酸残基から成るタンパク質をコードしていた。*xgtA*の塩基配列をもとに、*Bacillus cereus*のoligo-1,6-glucosidaseの構造をもとにXgtAの構造を予測し、構造を比較したところ、タンパクの構造安定性に関与する領域がXgtAにおいて存在しなかったことを明らかにした。*xgtA*を大腸菌で高発現させ、グルコース転移活性はWU-9701の140倍に達した。高生産されたXgtAを用いて、効率的な $\alpha$ -グルコシドの生産に成功した。

#### 4.4. 参考文献

1. Willis, L. B., and G. C. Walker.: A novel *Sinorhizobium meliloti* operon encodes an  $\alpha$ -glucosidase and a periplasmic-binding-protein-dependent transport system for  $\alpha$ -glucosides. *J. Bacteriol.*, 181, 4176-4184 (1999).
2. Watanabe, K., Hata, Y., Kizaki, H., Katsube, Y., and Suzuki, Y.: The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1, 6-glucosidase at 2.0 Å resolution: Structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization. *J. Mol. Biol.*, 269, 142-153 (1997).

## 5. *Xanthomonas campestris* WU-9701のグルコース転移酵素を用いた1-プロパンチオール $\alpha$ -アノマー選択的グルコシル化

### 5.1. 緒言

酵素を触媒としたチオール化合物の配糖化については、*Aspergillus oryzae* 由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いた2-メルカプトエタノールのチオガラクトシル化が報告されている。2-メルカプトエタノールは、水溶性が高く構造も簡単であり、その配糖体の分析条件も知られている。2-メルカプトエタノールなどの水溶性の高いチオール化合物の配糖化については報告がある。しかし、それらの化合物はチオール基もヒドロキシル基も存在しているため、本章では、ヒドロキシル基が存在しない1-プロパンチオールをモデル基質として選択した。そこで、*X. campestris* WU-9701を用いてS-配糖体の合成が可能であるか調べるために、1-プロパンチオールのグルコシル化を検討した。

### 5.2. 実験結果

#### 5.2.1 精製酵素を用いた1-プロパンチオール $\alpha$ -アノマー選択的グルコシル化

チオール基のグルコシル化においても、ヒドロキシル基の $\alpha$ -グルコシル化を触媒した酵素が関与しているのかを調べるために、精製酵素を用いて反応を検討した。反応は次のようにして行った。マルトース1.2 Mを含む10 mMホウ酸-水酸化ナトリウム-塩化カリウム緩衝液 (pH 7.5) 1 mlに1-プロパンチオール0.5 M、精製酵素200  $\mu$ lを添加し、40 $^{\circ}$ C、120 rpmにて48時間振とう反応を行った。反応液はHPLCを用いて分析した。

反応液のTLC分析の結果をFig. 5.1に示す。R<sub>f</sub>値0.51の位置にグルコシドと考えられるスポットが見られた。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて反応

液を分析した。HPLCの溶出曲線をFig. 5.2.に示す。反応液のHPLC分析を行ったところ、保持時間3.2分の位置に配糖体と考えられる新規なピークが見られた。

### 5.2.2 生成物の構造決定

反応液にブタノールを加え、反応生成物を抽出した。エバポレーターによりブタノールを除去した後、シリカカラムクロマトグラフィーにより反応生成物を単離した。再び、エバポレーターにより溶媒を除去した後、残った反応生成物を重水に溶かし、NMR、HMQC、HMBC測定を実施した。内部標準物質には、3-(トリメチルシリル)-1-プロパンスルホン酸ナトリウム (DSS) を用いた。反応生成物のHMBC(Fig. 5.3)の測定結果を示す。反応生成物の<sup>13</sup>C-NMRと<sup>1</sup>H-NMRのピーク帰属を行い、HMBCスペクトルにおいて、1位の水素と1'位の炭素、または1位の炭素と1'位の水素に相関が見られたことから、1位と1'位の炭素が硫黄を介して結合して、プロパン-1-チオ-グルコピラノシド (Pro-S-G) であることを確認した。

Pro-S-Gの糖の結合様式を調べた。アノメリックプロトンシグナルは普通 $\delta$  4~5 ppm付近に出現することから、他のヒドロキシル基の付け根のプロトンシグナルとの区別は容易である。アノメリックプロトンシグナルのJ値は、アノメリックプロトンが2位のプロトンとゴーシュの配置にある $\alpha$ -アノマーでは2~4 Hz、トランスの配置にある $\beta$ -アノマーでは7~9 Hzである。

Pro-S-Gの<sup>1</sup>H-NMRのアノメリックプロトンシグナルのJ値は5.5 Hzと $\alpha$ 結合と $\beta$ 結合のほぼ中間の値を示した。そこで、*B. stearothermophilus*由来の $\alpha$ -グルコシダーゼとアーモンド由来の $\beta$ -グルコシダーゼによるPro-S-Gの加水分解の様子を見ることにより糖の結合様式の決定を試みた。Pro-S-Gはアーモンド由来の $\beta$ -グルコシダーゼの作用を受けなかったが、*Bacillus stearothermophilus*由来の $\alpha$ -グルコシダーゼによって加水分解された。以上からPro-S-Gは $\alpha$ -体であり、Propane-1-thio- $\alpha$ -D-glucopyranosideであることが確認された。

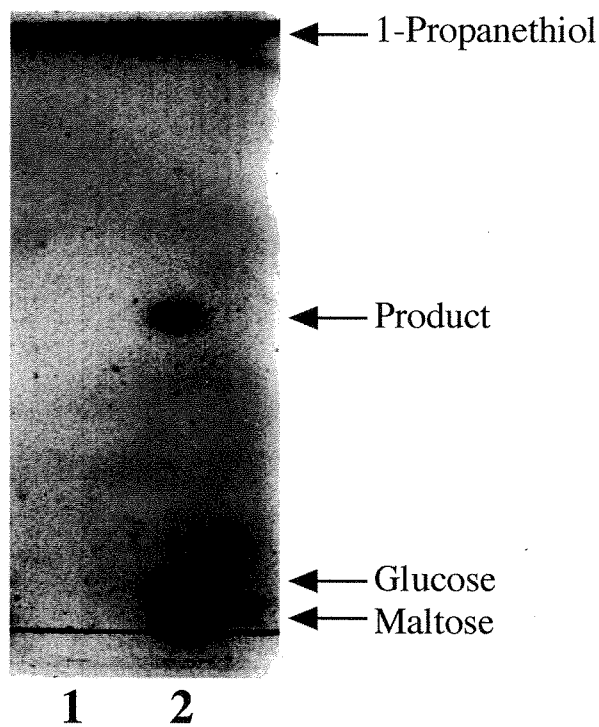


Fig. 5.1. TLC of the reaction products from 1-propanethiol and maltose with  $\alpha$ -glucosyl transfer enzyme of *X. campestris* WU-9701. Lanes: 1, 1-propanethiol; 2, reaction mixture.

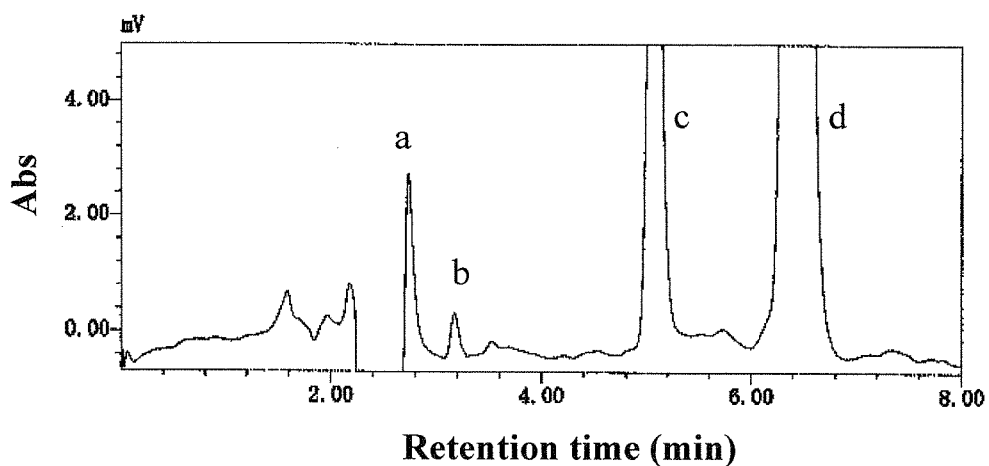


Fig. 5.2. HPLC of the reaction products from 1-propanethiol and maltose with  $\alpha$ -glucosyl transfer enzyme. The reaction mixture was put on an Asahipak NH2P-50 4E column. Peaks: a, 1-propanethiol; b, product; c, glucose; d, maltose.

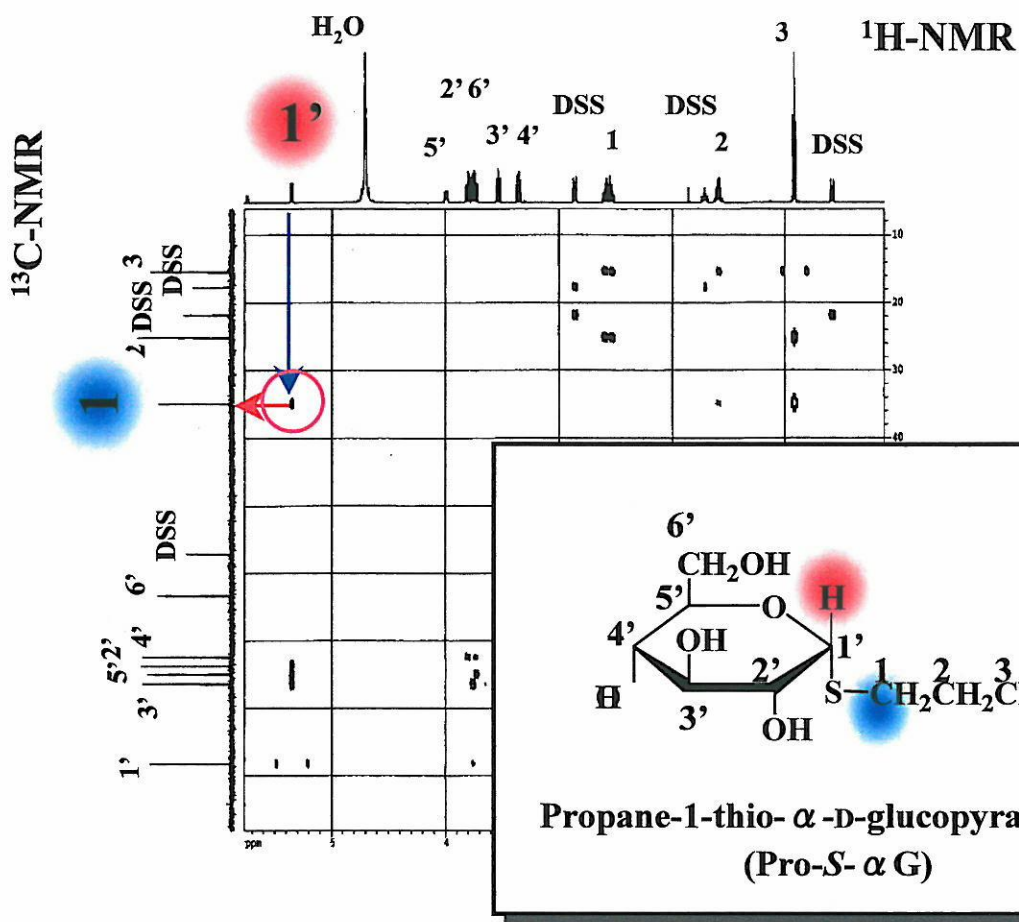


Fig. 5.3. HMBC spectrum of the reaction product.

### 5.3. まとめ

*X. campestris* WU-9701を用いてS-配糖体の合成が可能であるか調べるために、1-プロパンチオールをグルコシル化を検討した。当該精製酵素を用いてマルトースと1-プロパンチオールを反応させたところ、1種類の生成物が確認された。この生成物の構造を各種NMRおよび*B. stearothermophilus*由来の $\alpha$ -グルコシダーゼを用いた生成物の加水分解により検討した結果、Propane-1-thio- $\alpha$ -D-glucopyranosideであることを確認された。当該グルコース転移酵素は、チオール基に対してもグルコシル化を選択的に行うことを明らかにした。

## 6. 市販酵素を用いた縮合反応によるアルブチン合成の検討

### 6.1. 緒言

$\beta$ -グルコシドの酵素的合成においては、セロピオースやセルロースなどからの糖転移反応を利用した例が数多く報告されている。一方、加水分解作用の逆反応で単糖だけからなる溶液からオリゴ糖を得る縮合反応がある<sup>1)</sup>。この方法では、大量の酵素を必要とし、かつ長時間の反応を要するという欠点を持っているが、基質として単糖を利用できコスト削減の長所がある。しかしながら、単糖を基質とした縮合反応によるグルコシドの合成例は少ない。グルコースと基質が有するフェノール性水酸基の縮合反応においては、アーモンド由来の $\beta$ -グルコシダーゼがその反応を触媒することは知られているが、微生物由来の酵素においては報告されていない。

まず、市販されている糖質関連酵素においてグルコースとヒドロキノンからのアルブチン合成活性（縮合活性）を検討し、*Aspergillus niger*由来のグルコシダーゼがその活性を有することを確認した。さらにその酵素の性質、反応機構についても検討を行った。

### 6.2. 実験結果

#### 6.2.1 市販酵素を用いたアルブチン合成

種々の糖質関連酵素（グルコシダーゼ、アミラーゼ等）を用いてグルコースを糖供与体、ヒドロキノンを受容体としてアルブチン合成活性を検討した結果、*Aspergillus niger*由来のグルコシダーゼ（Fluka）においてその活性を見出した。本酵素は $\alpha$ -グルコシダーゼ（マルトース加水分解活性：0.82 U/mg）と $\beta$ -グルコシダーゼ（セロピオース加水分解活性：1.0 U/mg）を含む粗酵素である。

*A. niger*由来のグルコシダーゼにおいてグルコース、セロピオース、マルトース

をそれぞれ糖基質としたアルブチン合成活性を見出した。糖基質、ヒドロキノンにおける最適濃度はそれぞれ10% (w/v)、5% (w/v) と決定した。グルコースを糖基質とした最適条件時のTLC、HPLCの結果をFig. 6.1、Fig. 6.2にそれぞれ示し、また各糖基質における初期添加したヒドロキノンに対するモル転換収率をTable 6.1に示す。



Fig. 6.1. Thin-layer chromatogram of the reaction products.  
Lanes: 1, 10 mM arbutin; 2, glucose and hydroquinone; 3, glucose and glucosidase; 4, glucose, hydroquinone and glucosidase.

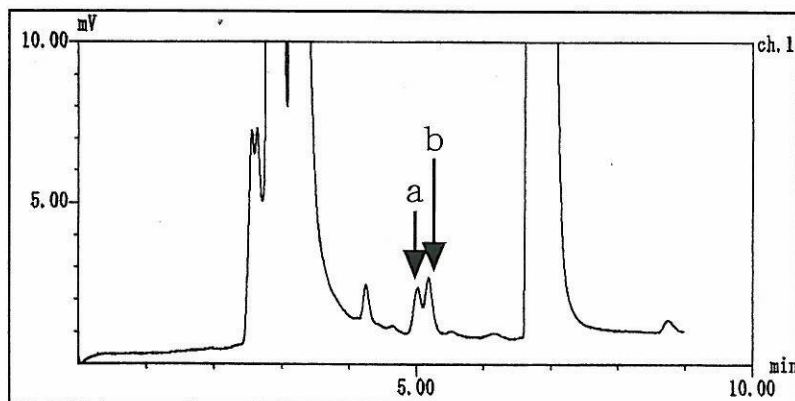


Fig. 6.2. High-performance liquid chromatogram of the reaction products.  
Peaks: a,  $\alpha$ -arbutin; b,  $\beta$ -arbutin.

Table 6.1. Substrate specificity of the glucosidase from *A. niger*.

Substrate	Yield (%)	
	$\alpha$ -arbutin	$\beta$ -arbutin
Glucose	0.26	0.32
Cellobiose	0.27	0.28
Maltose	0.33	0.29

Fig. 6.2から $\alpha$ -アルブチン、 $\beta$ -アルブチンの両者が生成していることを確認した。単糖、二糖どちらを用いてもアルブチンが合成されていることから、本酵素に含まれる $\alpha$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼがグルコース縮合活性、グルコース転移活性を有していると考えられた。

しかしながら、*Trichoderma viride*、*Aspergillus niger*等の微生物由来の $\beta$ -グルコシダーゼを作用させ、縮合反応により重合度3以上の $\beta$ -グルコオリゴ糖を合成し、 $\beta$ -グルコオリゴ糖と水酸基を有する化合物とに同じ酵素を作用させ転移反応により $\beta$ -グルコシドを合成する例が報告されている<sup>2)</sup>。今回の実験においてもグルコースを糖基質とした際に、二糖の生成を確認した (Fig. 6.3)。さらに単糖、二糖どちらを用いてもアルブチンの収率に差が無いことから、アルブチン合成時にはグルコース縮合反応で生成した二糖を糖基質として、グルコース転移が起こりアルブチンが生成することが予想された。以上の実験結果、考察から推測される全ての反応機構についてまとめた (Fig. 6.4)。



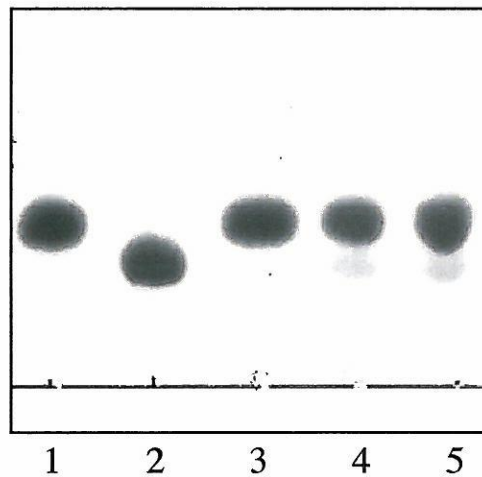


Fig. 6.3. Thin-layer chromatogram of the reaction products. Lanes: 1, 10 mM glucose (standard); 2, 10 mM cellobiose (standard); 3, glucose and hydroquinone (control); 4, glucose, hydroquinone and glucosidase; 5, cellobiose, hydroquinone and glucosidase.

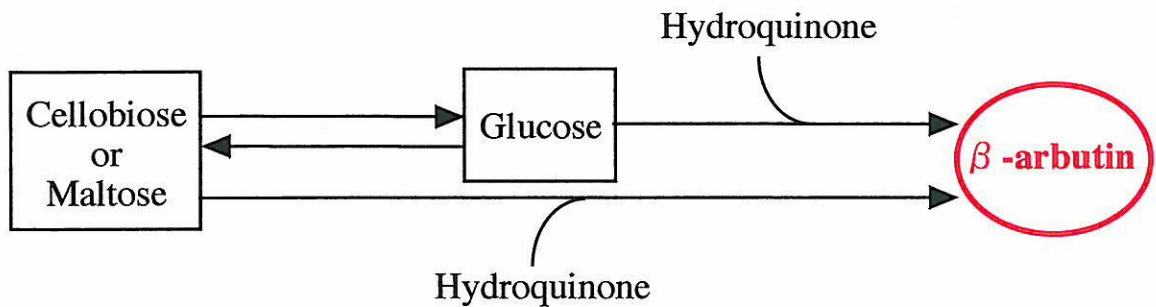


Fig. 6.4. Proposed synthesis scheme of  $\beta$ -arbutin with glucosidase from *A. niger*.

### 6.2.2 効率的なアルブチン合成の検討

本酵素における $\beta$ -アルブチン加水分解活性は極めて高いことを確認した（データ省略）。縮合活性を有する酵素は、当然のことながら逆反応である加水分解活性

をも有する。その反応平衡を偏らせる系を構築することで合成収率を高めることが必要である。

反応平衡を偏らせる方法としては、疎水系での合成反応や、生成物を反応系から除外する方法などがある。そこで、アセトニトリルやアセトン、エタノールなどの有機溶媒を用いて2相系での反応を種々試みたが、水系以上に収率を高めることはできなかった。

### 6.3. まとめ

酵素反応によるアルブチン合成の中でも、グルコースの縮合による合成を目的として、市販酵素を用いたアルブチン合成を試みた。その結果、*Aspergillus niger*由来のグルコシダーゼを用いた場合にのみ、グルコースとヒドロキノンからのアルブチン合成を確認した。しかし、単糖、二糖どちらを用いてもアルブチンが合成されていることから、本酵素に含まれる $\alpha$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼがグルコース縮合活性、グルコース転移活性を有していると考えられた。しかしながら、グルコースを糖基質とした際に、二糖の生成を確認し単糖、二糖どちらを用いてもアルブチンの収率に差が無いことから、アルブチン合成時にはグルコース縮合反応で生成した二糖を糖基質として、グルコース転移が起こりアルブチンが生成することが予想された。

### 6.4. 参考文献

1. 中野博文、橋本博之、栗木隆編、工業用糖質酵素ハンドブック、講談社(1999)
2. 特開2000-23692：日本食品化工株式会社.

## 7. グルコース縮合酵素の探索

### 7.1. 緒言

自然界に存在し、生理活性を示す配糖体には $\beta$ 型が多い。ウワウルシやコケモモなどの植物に存在するアルブチン(ヒドロキノン $\beta$ -グルコシド、Fig. 7.1)は美白剤として化粧品に、また医薬品やカラー写真安定化剤として用いられている。製法としては、天然植物からの抽出法、有機化学的合成法、植物培養細胞や酵素を利用した合成法が知られているが、生産性、コスト面で課題が多く、より安価な生産が望まれている。

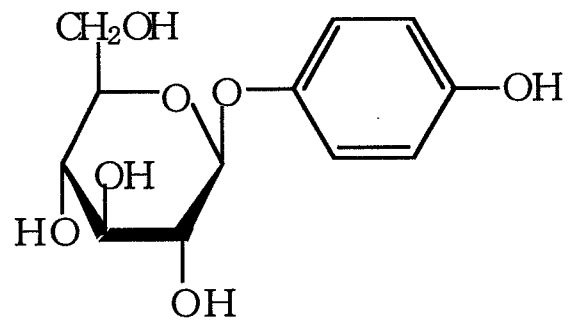


Fig. 7.1. Arbutin.

現在までに、微生物酵素を用いたアルブチンの合成に関して数件の報告があるが、どれも高収率には至っていない。そこで、 $\beta$ 型配糖体生産プロセスの構築において、アルブチン合成活性を有する微生物の探索を目的として研究を行い、実際の工業プロセスを考慮して、効率の良いアルブチン合成可能なグルコース縮合酵素を有する微生物をターゲットとした探索を行った。

### 7.2. 実験結果

#### 7.2.1. $\beta$ 型配糖体合成酵素のスクリーニング

$\beta$ 型配糖体合成において、 $\beta$ -グルコシダーゼを用いた報告が多くなされている。本研究においても $\beta$ -グルコシダーゼを用いることが有効であると考え、以下の3段階のスクリーニングを考案した。

第一段階：アルブチンを唯一の炭素源として生育可能な菌株の選択

第二段階：呈色反応を用いたβ-グルコシダーゼ活性を示す菌株の単離

第三段階：得られた菌株を用い、グルコースまたはセロビオースを糖基質とした

反応系におけるアルブチン合成の検討

という3段階のスクリーニングを行った。

スクリーニングの第一段階に用いた培地 (ArbS培地) の組成をTable 7.1 に示す。培地は唯一の炭素源をアルブチンとしたものである。アルブチンを唯一の炭素源とする理由としては、ターゲットとする縮合反応が、一般的に酸性側で起こりやすいため、培養系において直接アルブチン合成活性を確認することが困難であると考えたからである。β-グルコシダーゼ活性を誘導するという意味では、セロビオースを用いることも考えられるが、フェノール性配糖体を基質とするβ-グルコシダーゼを選択的に得るため、アルブチンを炭素源とすることが適当であると考えた。

Table 7.1. ArbS medium.

Arbutin	5.0	g/l
NaNO <sub>3</sub>	2.0	g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0	g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5	g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5	g/l
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.07	g/l
Metal solution	2.0	ml
Vitamin mixture	1.0	ml
Initial pH	7.0	

培養は、20 ml容試験管にArbS培地 (Table 7.1) を5 ml分注し、サンプルの懸濁液100 μlを加えて30℃、120 rpmで往復振盪培養を行った。72時間培養して白濁が確認できたサンプルに対しては、再びArbS培地に100 μl加えて継代培養した。3回継代培養した後も白濁が確認できたサンプルに対しては、薄層クロマトグラフィー (以下、TLC) によって、ヒドロキノンの遊離の有無を確認した。

第一段階でヒドロキノンの遊離が認められたサンプルに対して、β-グルコシダーゼ存在下においてインジゴ誘導体を形成して青く呈色する5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucopyranoside (以下、X-Glc) を40 mg/l添加したArbS培地の2%寒天プレートを作成し、そこに培養系で生育し、TLCによってヒドロキノンの遊

離を確認した菌株を植菌した。X-Glcの呈色する機構をFig. 7.2 に示す。

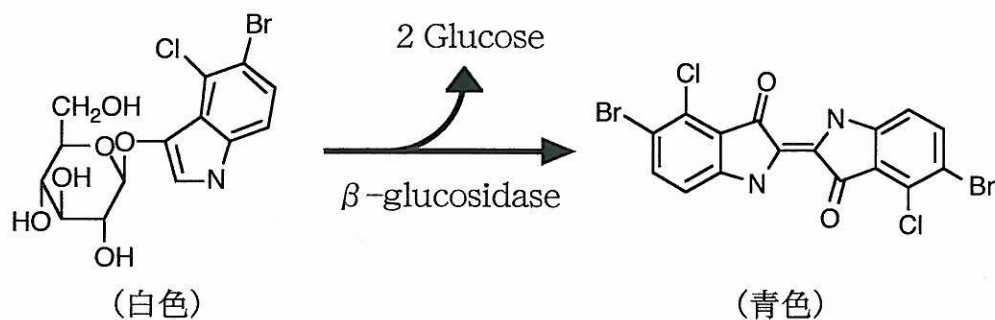


Fig. 7.2. Mechanism of color detection using X-Glc.

その結果、このスクリーニング系において、アルブチンを合成すると思われる候補株 (YS003と命名) を取得した。この菌は沖縄県の土壌から単離し、その形状から糸状菌と考えられる。プレートの写真および顕微鏡写真をFig. 7.3 および Fig. 7.4 に示す。

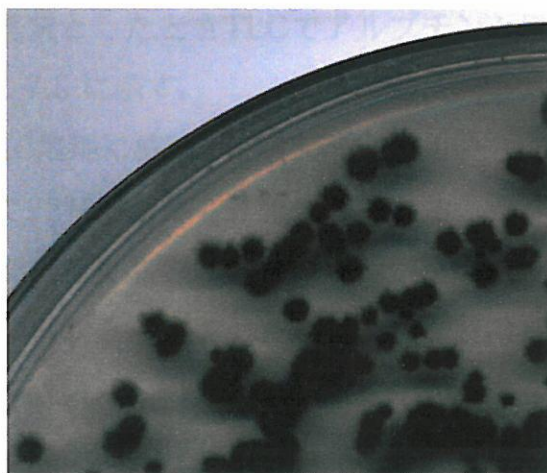


Fig. 7.3. Photomicrograph of strain YS003.

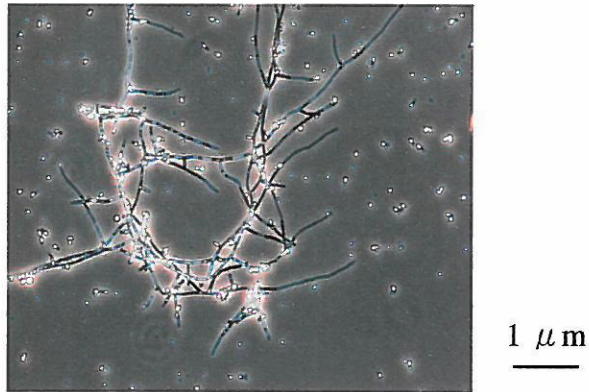


Fig. 7.4. Transmission electron micrograph of strain YS003.

#### 7.2.2. YS003株を用いたアルブチンの合成

次に、YS003株の $\beta$ -アルブチン合成活性を確認した。ArbS培地の炭素源をグルコースまたはセロビオースにした培地（それぞれ、AG培地、AC培地とする）に植菌し、72時間培養した培養液に、ヒドロキノン（25 mg/5 ml培養液）を添加した。72時間往復振盪し、アルブチン合成の有無をTLCによって確認した。その結果、セロビオースを糖基質としたときTLCでアルブチンと思われるスポットが検出された。そのTLCをFig. 7.5 に示す。

ここで、培養液とはAC培地に植菌して72時間培養したもの、反応液とは培養液にヒドロキノンを添加して72時間反応させたものである。標準のアルブチンとほぼ同じR<sub>f</sub>値で、培地、培養液では見られないスポットが反応液で検出されたことから、これはアルブチンではないかと予想された。そこで、HPLCによる分析も行い、アルブチン生成の有無を確認した。HPLCの結果をFig. 7.6 ~ Fig. 7.8 に示す。

Fig. 7.6 より、保持時間が約5.07分のピークがアルブチンである。Fig. 7.7 の培養液のHPLCで検出されていないアルブチンのピークが、Fig. 7.8 の反応液のHPLCで検出されている。

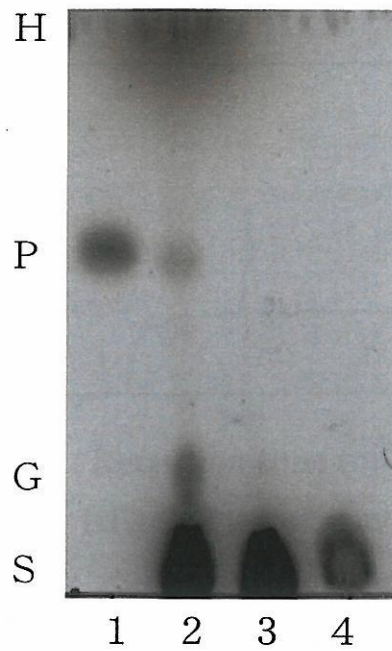


Fig. 7.5. TLC of the reaction products from hydroquinone and cellobiose with YS003.

H, hydroquinone; P, product (arbutin); G, glucose; S, saccharides. 1, arbutin; 2, reaction mixture ; 3, culture with YS003; 4, medium. The  $R_f$  values of hydroquinone, the product (arbutin), and glucose are 0.7, 0.6, and 0.3, respectively.

以上の結果より、この微生物（YS003株）は、アルブチンを生成していると考えられる。今後、反応条件などを詳細に行う。

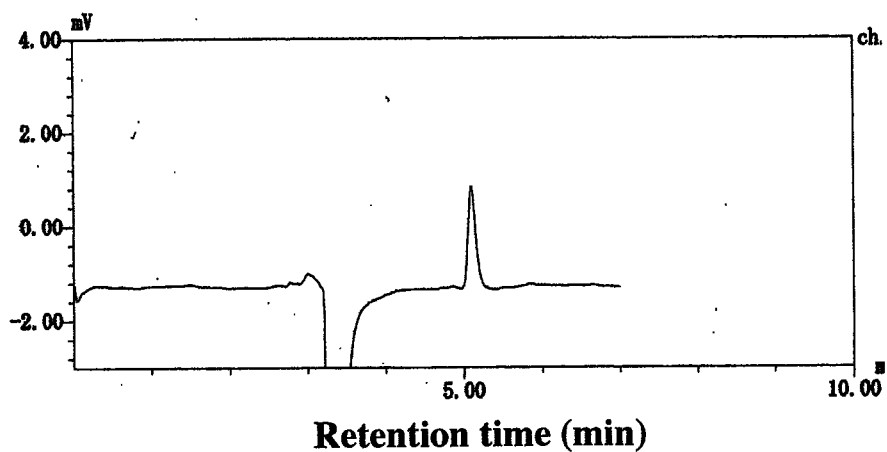


Fig. 7.6. HPLC of the of standard arbutin.

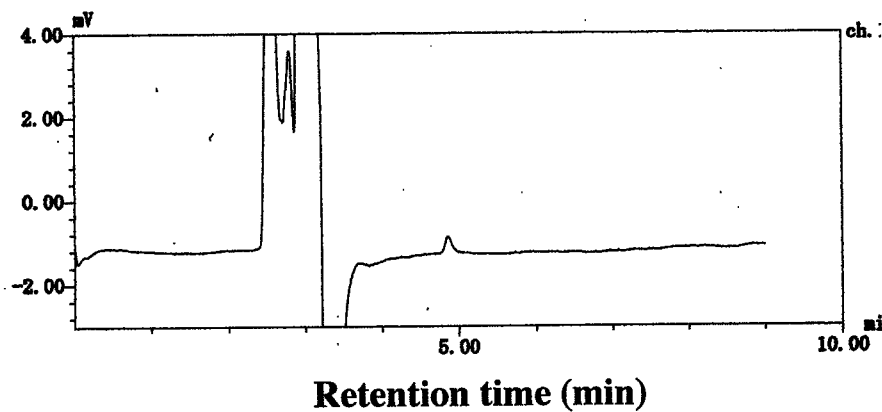


Fig. 7.7. HPLC of the culture of YS003.

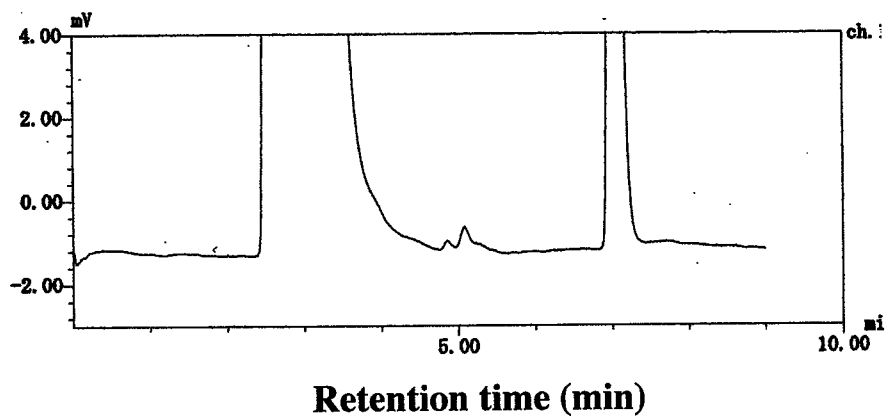


Fig. 7.8. HPLC of the reaction mixture.



### 7.3. まとめ

アルブチン合成活性を有する微生物の取得を目的として、スクリーニングを行った。スクリーニングのサンプル採取にあたっては、全国各地の土壌、植物、海水、河川の水、温泉などさまざまなものを採取した。

まず、アルブチン合成活性を保持する微生物をターゲットとした3段階のスクリーニング系で310サンプル試したところ、候補株であるYS003株を単離した。YS003株は、沖縄県で採取した土壌から単離したものであり、プレートに生えたコロニーの形状および顕微鏡で観察した結果から、糸状菌であると考えられた。YS003株は、グルコース縮合活性を有してはいなかったが、炭素源をセロビオースにした場合、ヒドロキノンを $\beta$ -アノマー選択的にグルコシル化する酵素を生産することを確認した。TLCおよびHPLCによりアルブチン合成を確認した。今後、反応条件などを詳細に行う。

## 8. マルトースホスホリラーゼを用いた配糖体合成の検討

### 8.1. 緒言

マルトースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.8) は、マルトースの加リン酸分解反応を触媒し、可逆的に $\beta$ -1-リン酸を生産する酵素として知られている。本研究では、MPaseについて糖受容体存在下で、スクロースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.7) で報告されているような配糖体合成活性<sup>1)</sup>の有無を検証した。

### 8.2. 実験結果

#### 8.2.1 市販マルトースホスホリラーゼによる配糖体合成の検証

市販されている乳酸菌由来のマルトースホスホリラーゼを使用して、配糖体の生産を試みた。糖受容体としては、アルコールを選択した。アルコールとマルトース 100 mMを含む10 mMホウ酸-水酸化ナトリウム-塩化カリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.2 mlにMPase 20  $\mu$ lを添加し、40 $^{\circ}$ C、160 rpmにて24時間振とう反応を行った。反応液はHPLCを用いて分析した。

数種のアルコールを用いて反応させたところ、プロパノール、ブタノールを基質とした場合、配糖体の合成が認められ (Table 8.1)、とくにアルコールに対する配糖体合成活性が認められた。1-ブタノールを基質とした場合、生成物の量が最も多かったため、その後の実験は1-ブタノールをモデル基質として行った。反応液のTLC分析の結果をFig. 8.1.に示す。糖基質以外にグルコシドと考えられるスポットが見られた。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて反応液を分析した。HPLCの溶出曲線をFig. 8.2.に示す。Aは反応液、Bは1-ブタノールのみのものである。その結果、反応液のHPLCに配糖体と考えられる新規なピークが見られた。

Table 8.1. Synthesis of glucosides with MPase.

Substrate	Glucoside synthesis
Methanol	—
Ethanol	+
1-Propanol	+
2-Propanol	+
1-Butanol	+++
<i>t</i> -Butanol	+
<i>n</i> -Pentanol	++
<i>t</i> -Hexanol	+
<i>t</i> -Heptanol	+
Hydroquinone	—

+ and ++, glucoside synthesized;  
 -, glucoside not synthesized

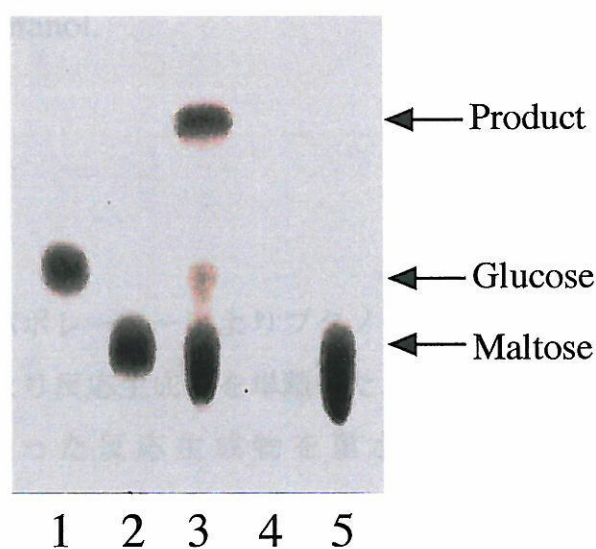


Fig. 8.1. Fig. Thin-layer chromatogram of the reaction mixture (substrate : 1-butanol).  
 Lanes: 1, glucose; 2, maltose; 3, the reaction mixture with MPase 1;  
 4, MPase 1; 5, the reaction mixture without MPase.

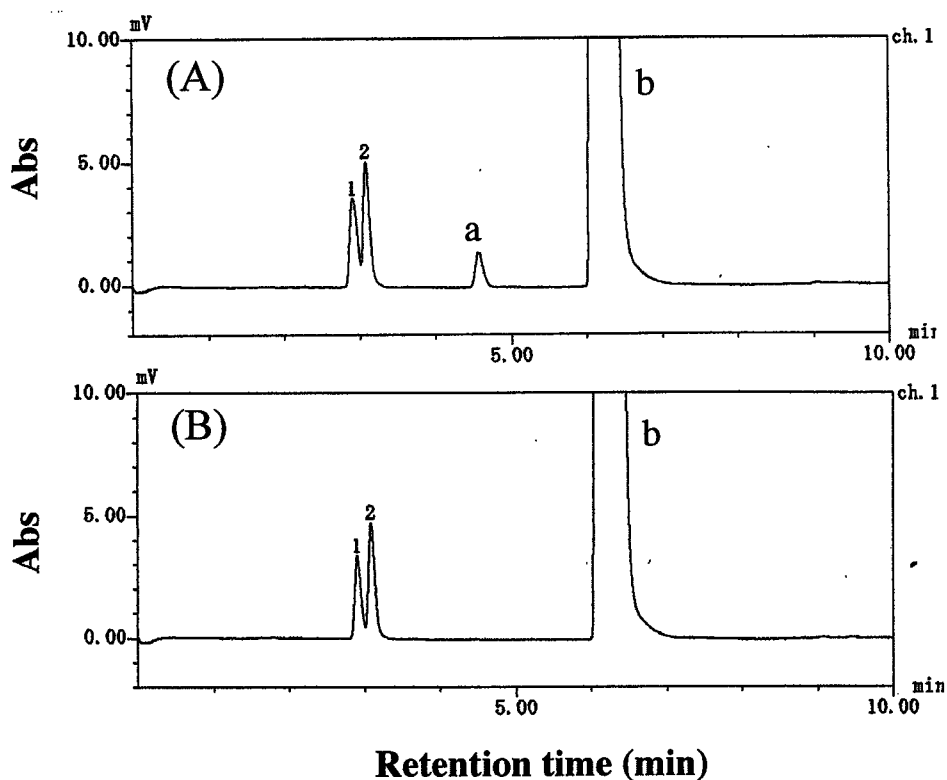


Fig. 8.2. HPLC chromatograms of the reaction mixture (substrate : 1-butanol) (A) reaction mixture with MPase, (B) reaction mixture without MPase. Peaks: a, product; b, 1-butanol.

### 8.2.2 生成物の構造決定

反応生成物を抽出し、エバポレーターによりブタノールを除去した後、シリカカラムクロマトグラフィーにより反応生成物を単離した。再び、エバポレーターにより溶媒を除去した後、残った反応生成物を重水に溶かし、NMRの測定を行った。 $^{13}\text{C}$ -NMRの結果から、生成物にはブタノールとグルコースのピークが認められ、生成物はグルコシドであることを確認した。さらに $^1\text{H}$ -NMRの結果から、アノメリックプロトンシグナルのJ値が3.9 Hzであったことから、 $\alpha$ -体であることを確認した。したがって、生成物はbutyl O- $\alpha$ -D-glucosideであった。

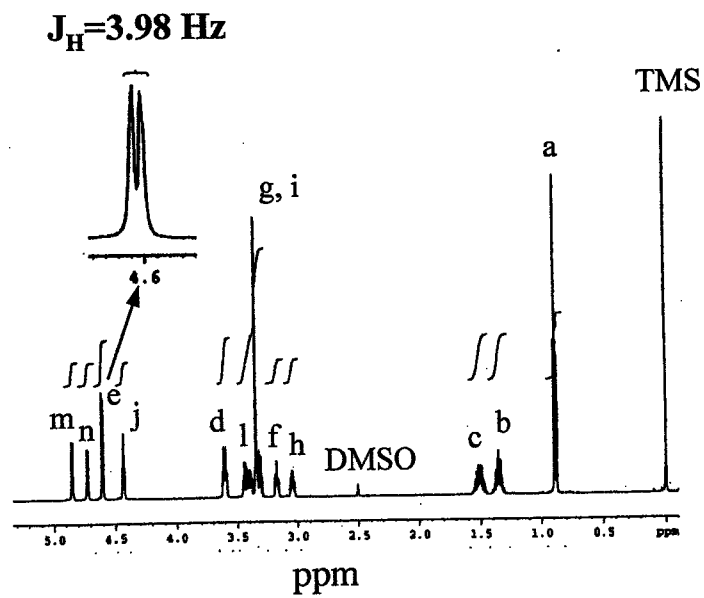
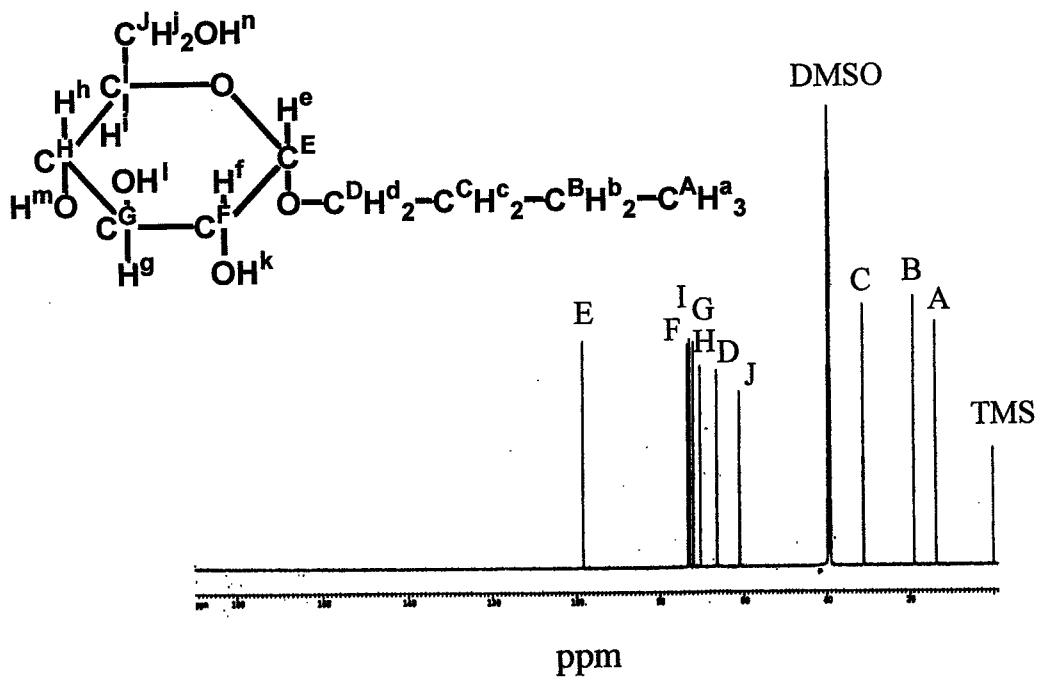


Fig. 8.3.  $^{13}\text{C}$ -NMR and  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of the reaction product.

### 8.3. まとめ

本研究では、マルトースホスホリラーゼについて糖受容体存在下での配糖体合成活性の有無を検証した。

市販されている乳酸菌由来のMPaseを使用して、アルコールの配糖化を検討した。アルコールとマルトース100 mMを含む10 mMホウ酸-水酸化ナトリウム-塩化カリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.2 mlにMPase20  $\mu$ lを添加し、40°C、160 rpmにて24時間振とう反応を行った。とくに1-ブタノールを基質とした場合、生成物の量が最も多かった。構造決定を行ったところ、butyl O- $\alpha$ -D-glucoside ( $\alpha$ -BtGlu)であった。マルトースホスホリラーゼを用いた $\alpha$ -グルコシド合成に初めて成功した。さらに、ヘキサン-水の二相系において反応を行ったところ、 $\alpha$ -BtGluの合成収率の向上が見られ、二相系における合成最適条件の検討を行ったところ、pH 6.0、マルトース1.8 M、酵素169 U/mlの条件で24時間反応させたところ、供与1-ブタノール当たり24.7%のモル変換収率でbutyl O- $\alpha$ -D-glucosideを合成可能であった。この反応では、生成物が加水分解されず効率的に $\alpha$ -グルコシドを合成可能と考えられ、今後他の有用なグルコシドの合成に適用することが可能と考えられる。

### 8.4. 参考文献

1. Kitao, S. and Sekine, H.:  $\alpha$ -D-Glucosyl Transfer to phenolic compounds by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of  $\alpha$ -arbutin. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 38-42 (1994).

## おわりに

本研究では、微生物酵素を用いた配糖体の新規合成方法に関する研究を行った。

*Xanthomonas campestris* WU-9701 は  $\alpha$ -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。これまでに当該酵素を利用したアルコール性の-OH基のグルコシル化を行ってきたが、今回新たな試みとしてフェノール性の-OH基を行った。また、これまでに報告のないチオール基の  $\alpha$ -グルコシル化が可能であることを明らかにした。さらに、当該  $\alpha$ -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  $\alpha$ -グルコシド合成活性の関係を調べ、当該  $\alpha$ -グルコース転移酵素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も成功し、組換え酵素を利用して  $\alpha$ -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。

また、グルコースの縮合によるグルコシド生産を可能とする合成方法を確立するため、市販酵素および目的酵素を生産する微生物のスクリーニングを行った。市販酵素では、*Aspergillus niger*由来のグルコシダーゼを用いた場合にのみ、グルコースとヒドロキノンからのアルブチン合成を確認した。しかしながら、グルコースを糖基質とした時に二糖の生成を確認し、単糖、二糖どちらを用いてもアルブチンの収率に差が無いことから、アルブチン合成時にはグルコース縮合反応で生成した二糖を糖基質として、グルコース転移が起こりアルブチンが生成することが予想された。またスクリーニングにおいては、目的酵素の生産候補株であるYS003株を単離した。YS003株は、グルコース縮合活性を有してはいなかったが、炭素源をセロビオースにした場合、ヒドロキノン  $\beta$ -アノマー選択的にグルコシル化する酵素を生産することを確認した。

また、新たな試みとして、市販されている乳酸菌由来のMPaseを使用して、アルコールの配糖化を検討した。その結果、アルコール性の-OH基をグルコシル化する活性を見出し、とくに1-ブタノールを基質とした場合、生成物の量が最も多く、マルトースホスホリラーゼを用いた  $\alpha$ -グルコシド合成に初めて成功した。

本研究で用いた方法は、これまでの酵素反応によるグルコシド合成とは一線を画す新規手法であり、今後実用化を含めた合成方法の応用が期待される。