

| | |
|---------|---|
| 称号及び氏名 | 博士（応用生命科学） 藤井 和 俊 |
| 学位授与の日付 | 平成19年2月20日 |
| 論文名 | 「Improving the properties of enzymes for glucose-polymer production (グルコースポリマー製造に使われる酵素の機能改良)」 |
| 論文審査委員 | 主査 北村 進一 副査 川崎 東彦 副査 川口 剛司 |

論文要旨

序論

天然には、グルコースのみを構成糖とする多糖が数多く存在しており、古くから産業利用されている。グルコースが β -1,4 グルコシド結合により直鎖状に連なったセルロースは、植物細胞壁の主成分として広範囲にかつ大量に分布している。セルロースは、製紙に利用される以外に、フィルム、ファイバーなどの化学製品、食物繊維として食品にも利用されている。同じくグルコースを構成糖とするデンプンは、植物の貯蔵多糖として大量に存在しており、グルコースが α -1,4 グルコシド結合を介して直鎖状に連なったアミロースと、アミロースが α -1,6 結合により分岐した構造を持つアミロペクチンから構成される。デンプンは、食品での利用をはじめ、接着剤、塗料などの化学製品、医薬品、飼料などに幅広く利用される素材である。セルロース、デンプンの他にも、動物や細菌の貯蔵多糖であるグリコーゲンや、酵母により産生されるプルラン、乳酸菌の産生するデキストランなどが知られている。

これらのグルコースポリマーにおいては、分子の大きさや結合様式などの構造の相違が、その物性に大きく影響することが良く知られている。しかしながら、それらの構造は産生する植物や微生物により決定されるために、構造を任意に制御することは困難である。本研究においては、グルコースポリマーの構造を任意に制御することを目的に、セロビオースからアミロースの酵素合成について検討した。また、グルコースポリマーの製造に関わる酵素である sucrose phosphorylase および amyloamylase の改良についても試みた。

第1章 酵素を利用したグルコースポリマーの合成

1. 目的

直鎖状 α -1,4 グルコースポリマーであるアミロースに、枝づくり酵素(branching enzyme: EC 2.4.1.18) を作用させることで、グリコーゲン、アミロペクチン様の分岐多糖を、amyloamylase (EC 2.4.1.25) を作用させることで、環状多糖であるシクロアミロースをそ

れぞれ合成できる。したがって、任意の構造を有するアミロースの酵素合成が可能になれば、多様な構造を持つ α グルコシド結合型グルコースポリマーの合成が可能になると考えられる。スクロースに sucrose phosphorylase (SP : EC 2.4.1.7) と glucan phosphorylase (GP : EC 2.4.1.1) を作用させる方法 (SP-GP 法) により、アミロースの量産化を実現したが、本研究では、セルロース分解物であるセロビオースを基質としたアミロースの酵素合成について検討した。

2. 方法および結果

セロビオースに *Clostridium thermocellum* 由来 cellobiose phosphorylase (CBP : EC 2.4.1.20) と馬鈴薯由来 GP を作用させた。CBP の作用によりセロビオースから G-1-P が生成され、GP の作用によりグルコース鎖が伸長されアミロースが合成される。この場合の収率は対セロビオース収率で 19%程度と低いものであった。各酵素反応の平衡収率を測定した結果、CBP による平衡反応が G-1-P 合成側に不利であることが、収率の低い原因であることが示唆された。そこで、反応副産物であるグルコースの濃度を下げ、CBP の平衡反応をシフトさせることを試みた。反応開始時にグルコースイソメラーゼを共存させてアミロースを合成したところ、若干の収率改善が見られた。またこれとは別に、ムタロターゼならびにグルコースオキシダーゼを共存させ、反応液中のグルコースを除去しながらアミロース合成を行うことで、対セロビオース収率 33%程度まで向上させることができた。

第2章 Sucrose phosphorylase の耐熱化

1. 目的

スクロースからアミロースを合成する際に用いる SP を工業的に利用する場合には、大腸菌などを宿主とした組み換え酵素として製造する。この際、酵素に反応中間体である G-1-P を分解するホスファターゼや、合成したアミロースを分解するアミラーゼなどが混入していると、産物であるアミロースの収率低下をまねく。宿主菌由来のこれらの酵素は加熱により容易に除去することができるが、SP の耐熱性が低いため熱処理を行うことができない。そこで、遺伝子工学的手法を用いて SP の耐熱化に取り組んだ。

2. 方法および結果

Streptococcus mutans の SP をコードする遺伝子に、error-prone PCR を用いてランダム変異を導入した。変異導入遺伝子を発現ベクターに組み込み、宿主である大腸菌 TG-1 内で発現させた。得られた変異酵素に加熱テスト (55°C 20 分間の加熱) を行い、耐熱性の向上した変異酵素をスクリーニングした。スクリーニングの結果、耐熱性の向上に寄与した 8 種類の変異を確認した。これらの変異を組み合わせることで耐熱性は向上し、8 種すべての変異を導入した変異酵素は、20%スクロース存在下において 65°C 20 分間の加熱後も加熱前の 80%以上の活性を維持していた。この変異酵素を含む菌体抽出液を熱処理した酵素は、スクロースからのアミロース合成において精製酵素と同等であった。

第3章 *Thermus aquaticus* amyloamylase の改変による加水分解活性の抑制

1. 目的

T. aquaticus 由来の amyloamylase はシクロアミロースの工業的生産に利用されているが、本酵素は目的とするグルカン鎖転移活性とともに微弱ながら加水分解活性も有してい

る。この加水分解活性は、産物であるシクロアミロースを分解し収率の低下を引き起こす。そこで、遺伝子工学的手法を用いて加水分解活性の低下した amyloamylase 変異酵素の取得を試みた。

2. 方法および結果

T. aquaticus の amyloamylase をコードする遺伝子に、error-prone PCR を用いてランダム変異を導入した。変異導入遺伝子を発現ベクターに組み込み、宿主である大腸菌 MC1061 内で発現させた。得られた変異酵素をシクロアミロースに作用させ、還元糖量を定量することで加水分解活性を測定し、野生型酵素に比べ加水分解活性の低下した変異酵素をスクリーニングした。スクリーニングの結果、加水分解活性の低下した変異酵素を 3 種確認した。塩基配列から、これらの変異酵素には、N 末端から 54 番目のチロシン残基 (Y54) に変異が導入されていることが確認された。Y54 を他のすべてのアミノ酸に置換した変異酵素を作製し、アミロースの環状化活性およびシクロアミロースの加水分解活性を測定したところ、Y54 をグリシンに置換した Y54G 変異酵素において、野生型酵素に比べ環状化活性は約 2 倍に向上し、加水分解活性は 1/10 に低下した。Y54G 変異酵素を用いたシクロアミロースの合成では、24 時間の反応においても 90%以上の収率を維持することができた。

第 4 章 *T. aquaticus* amyloamylase の 2nd glucan binding site の機能

1. 目的

第 3 章において Y54 が *T. aquaticus* amyloamylase の性質に大きな影響を与えていることが示唆された。すでに報告されている本酵素の結晶構造から、Y54 は触媒活性中心から 14Å離れた位置にあることが知られている。また、本酵素と基質アナログであるアカボースとの複合体の結晶構造解析から、触媒部位とは異なる Y54 を含む領域でも基質と相互作用することが示唆されている。そのため、Y54 を含むこの領域 (2nd glucan binding site) がどのような機能を果たしているのか興味を持たれた。そこで、2nd glucan binding site の機能を推測するために、Y54 とともにこの領域に存在し、基質との相互作用が示唆されている Y101 についても変異酵素を作製し活性を測定した。

2. 方法および結果

T. aquaticus の amyloamylase の Y101 をグリシンに置換した Y101G 変異酵素を作製し、本酵素が触媒する 4 つの活性 (環状化、不均化、カップリング、加水分解) を測定した。Y101G 変異のこれらの活性に対する影響は Y54G 変異と同様であり、環状化の活性は増加したが、他の 3 つの活性は低下傾向にあった。これらの変化は、2nd glucan binding site において酵素と基質が相互作用できなくなったために生じたものと考えられた。この領域での酵素と基質の相互作用が構造上でどのような変化をもたらしているかを確認するため、本酵素の結晶構造および酵素-アカボース複合体の結晶構造を比較した。両結晶構造は全体的に大きな相違はないものの、アクセプター結合領域と推測される部位がより開放的に変化していることが確認された。この結果から、本酵素の 2nd glucan binding site の機能は、基質との相互作用により立体構造を active form に変化させることであると推測した。

審査結果の要旨

天然には、グルコースのみを構成糖とする多糖が数多く存在しており、古くから産業利用されている。とくに、デンプンとセルロースは、食品での利用をはじめ、接着剤、塗料などの化学製品、医薬品、飼料などに幅広く利用される素材である。この他にも、動物や細菌の貯蔵多糖であるグリコーゲンや、酵母により産生されるプルラン、乳酸菌の産生するデキストランなどが知られている。

これらのグルコースポリマーは、分子の大きさや結合様式などの構造の相違が、その物性に大きく影響することが良く知られている。しかしながら、天然のグルコースポリマーは、植物や微生物によって産生されるのでその構造を任意に制御することは困難である。そこで、本研究においては、グルコースポリマーの構造を *in vitro* で任意に制御することを目的にグルコースポリマー製造に使われる酵素の機能改良に取り組んだ。その結果、グルコースポリマーの製造に関わる酵素である sucrose phosphorylase (SP: EC 2.4.1.7) の耐熱化および amyloamylase (EC 2.4.1.25) の触媒能の改良について研究をおこない、工場規模でのグルコースポリマーの製造を可能にした。また、セロビオースからアミロースを酵素合成する方法についても検討している。

第一章の緒論につづく第二章では、セルロース分解物であるセロビオースを基質としたアミロースの酵素合成について検討している。セロビオースに *Clostridium thermocellum* 由来 cellobiose phosphorylase (CBP: EC 2.4.1.20) と馬鈴薯由来 glucan phosphorylase (GP : EC 2.4.1.1) を作用させた。この反応では、CBP の作用によりセロビオースから G-1-P が生成され、GP の作用によりグルコース鎖が伸長されアミロースが合成される。収率は対セロビオース収率で 19%程度と低いものであった。各酵素反応の平衡収率を測定した結果、CBP による平衡反応が G-1-P 合成側に不利であることが、収率の低い原因であることが示唆された。そこで、反応副産物であるグルコースの濃度を下げ、CBP の平衡反応をシフトさせることを試みた。反応開始時にグルコースイソメラーゼを共存させてアミロースを合成したところ、若干の収率改善が見られた。またこれとは別に、ムタローターゼならびにグルコースオキシダーゼを共存させ、反応液中のグルコースを除去しながらアミロース合成を行うことで、対セロビオース収率を 33%程度まで向上させることができた。

第三章では、sucrose phosphorylase の耐熱化を目的に研究を行った結果について示している。まず、*Streptococcus mutans* の SP をコードする遺伝子に、error-prone PCR を用いてランダム変異を導入した。変異導入遺伝子を発現ベクターに組み込み、宿主である大腸菌 TG-1 内で発現させた。スクリーニングの結果、耐熱性の向上に寄与した 8 種類の変異を確認した。これらの変異を組み合わせることで耐熱性は向上し、8 種すべての変異を導入した変異酵素は、20%スクロース存在下において 65°C 20 分間の加熱後も加熱前の 80%以上の活性を維持していた。この変異酵素を含む菌体抽出液を熱処理した酵素は、スクロースからのアミロース合成において精製酵素と同等であることを明らかにした。

第四章では amyloamylase の改変による加水分解活性の抑制を目的に研究を行った結果について示している。まず、*T. aquaticus* の amyloamylase をコードする遺伝子に、error-prone PCR を用いてランダム変異を導入した。変異導入遺伝子を発現ベクターに組み込み、宿主である大腸菌 MC1061 内で発現させた。得られた変異酵素をシクロアミロースに作用させ、還元糖量を定量することで加水分解活性を測定し、野生型酵素に比べ加水分解活性の低下した変異酵素をスクリーニングした。スクリーニングの結果、加水分解活性の低下した変異酵素を 3 種確認した。塩基配列から、これらの変異酵素には、N 末端から 54 番目のチロシン残基 (Y54) に変異が導入されていること

が確認された。Y54 を他のすべてのアミノ酸に置換した変異酵素を作製し、アミロースの環状化活性およびシクロアミロースの加水分解活性を測定したところ、Y54 をグリシンに置換した Y54G 変異酵素において、野生型酵素に比べ環状化活性は約2倍に向上し、加水分解活性は1/10に低下した。Y54G 変異酵素を用いたシクロアミロースの合成では、24 時間の反応においても 90%以上の収率を維持することができた。

第五章では、*T. aquaticus* amyloamylase の 2nd glucan binding site の機能 について、構造生物学的視点から考察を行っている。本酵素の結晶構造および酵素-アカボース複合体の結晶構造を比較した。両結晶構造は全体的に大きな相違はないものの、アクセプター結合領域と推測される部位がより開放的に変化していることが確認された。この結果から、本酵素の 2nd glucan binding site の機能は、基質との相互作用により立体構造を active form に変化させることであると推測した。

本研究の成果は、Sucrose phosphorylase の耐熱化と amyloamylase の改良を行い、グルコースポリマーの効率的な工業的生産への応用を可能にしたことである。また、amyloamylase の転移反応の構造生物学的視点からの考察、セルロースからのアミロースへの酵素変換技術など基礎的研究でも大きな成果をあげている。よって、本論文の審査ならびに学力確認の結果と併せて、博士(応用生命科学)の学位を授与することを適当と認める。