

(第5号様式)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Sirinan Shompoosang
審査委員	主査 麻田 恭彦 副査 森本 兼司 副査 高田 悟郎 副査 岸田 太郎 副査 永田 信治

論文名

### Enzymatic Production of Rare 6-Deoxyhexoses from L-Rhamnose and L-Fucose and Characterization of Rare Sugar Producing Enzymes

(L-ラムノースおよびL-フコースからの希少6-デオキシヘキソースの酵素的生産とそれらを生産する酵素の性質に関する研究)

#### 審査結果の要旨

希少糖は天然にほとんど存在しない単糖とその誘導体と定義されている。その希少糖の中にはD-アルロースのように生理活性作用を有するものが存在する。全希少糖を安価な単糖から生産するための戦略として微生物酵素を用いる方法が確立され、それはイズモリングと呼ばれている。一方、天然に存在する炭素第6位がデオキシ化された6-デオキシ糖としては、L-ラムノースやL-フコースなどがよく知られており、いずれも生理活性作用があり、その応用研究が進んでいる。6-デオキシ糖には上記2種以外にも多数の構造異性体の存在が考えられているが、希少もしくは存在しないとされており、研究されていないのが実状である。

そこで申請者は、6-デオキシ糖の体系的な生産経路を確立するために、希少糖の生産戦略イズモリングを応用したデオキシイズモリングを基にL-ラムノースおよびL-フコースを出発物質として、以下に示す複数種の6-デオキシ糖（デオキシ希少糖）の生産について検討を行った。本論文はそれらの成果をまとめたものである。

#### 1. L-ラムノースからの3種類の6-デオキシアルドヘキソースの生産

当研究室では、L-ラムノースイソメラーゼおよびD-タガトース3-エピメラーゼを用いて、L-ラムノースからL-ラムニュロースを中間体として6-デオキシ-L-アルロースの生産に成功している。しかしながら、L-ラムノースとL-ラムニュロースの分離が困難であったことや個々の反応の平衡比が不明瞭であったため、申請者は6-デオキシ-L-アルロースを精製し、逆反応させることにより、L-ラムノース:L-ラムニュロースが60:40、およびL-ラムニュロース:6-デオキシ-L-アルロースが67:33の平衡比であることを明らかにした。さらに高純度L-ラムニュロースの調製にはじめて成功した。また、調製したL-ラムニュロースを用いて、D-アラビノースイソメラーゼ反応により、L-ラムニュロースから6-デオキシ-L-グルコースを27:73

の平衡比で生産できることを明らかにした。さらに6-デオキシ-L-アルロースから、L-アラビノースイソメラーゼ反応により6-デオキシ-L-アルトロースが60：40の平衡比で、またL-リボースイソメラーゼ反応により6-デオキシ-L-アロースが40：60の平衡比で得られることが判明した。上記の研究において調製した新規デオキシ希少糖をNMRおよび比旋光度より同定した。

## 2. L-フコースからの4種類の6-デオキシヘキソースの生産

申請者は、L-ラムノースと並んで市販されているL-フコースを出発物質として、1と同様に種々の酵素を用いて4種類の6-デオキシヘキソースの生産に成功した。まず、D-アラビノースイソメラーゼ反応により、L-フコースからL-フクロースを88：12の平衡比で生産できることを明らかとした。さらに、L-ラムノースイソメラーゼをこの反応系に添加することにより、L-フコースからL-フクロースを介する6-デオキシ-L-タロースの生産を可能とした。この反応における平衡比はL-フコース：L-フクロース：6-デオキシ-L-タロース=88：9：11であった。なお、L-フクロース：6-デオキシ-L-タロースの平衡比は45：55であった。また、L-フクロースを基質として、ケトース3-エピメラーゼの一種であるD-アルロース3-エピメラーゼ反応を行うことにより、6-デオキシ-L-ソルボースを40：60の平衡比で生産できること、さらに得られた6-デオキシ-L-ソルボースを基質とすると、L-リボースイソメラーゼ反応により6-デオキシ-L-グルコースを40：60の平衡比で、また、D-グルコースイソメラーゼ反応により6-デオキシ-L-イドースを73：27の平衡比で得られることを明らかにした。上記の研究において調製した新規デオキシ希少糖をNMRおよび比旋光度より同定した。

3. 申請者は、2. で用いた新規D-アルロース3-エピメラーゼの諸性質について解析を行った。その結果、本酵素の分子量はSDS-PAGEにより34kDa、反応の至適pHは酢酸緩衝液pH5.5、至適温度は80℃であることが明らかとなった。コバルトイオンを反応液に添加することにより本酵素は最も高い活性を示した。コバルトイオンを添加しても70℃以上における本酵素の熱安定性は無添加と比較して同程度であったことから、コバルトイオンは本酵素の熱安定性には寄与していないことが示唆された。また、本酵素の基質特異性および反応速度を検討した結果、ケトヘキソースの中ではD-アルロースに最も高い活性を示すことが判明した。さらに、一部の6-デオキシ-ケトヘキソースに対する活性についても解析したところ、L-フクロースが本研究で使用した全ケトースの中で最も高いkcat/Km値を示すことが明らかとなった。これまでに、既知のケトース3-エピメラーゼにおいて6-デオキシ-ケトヘキソースに対する反応速度に関する知見はなく、本研究成果が初めての報告となる。

以上のように、本研究は知見の乏しかった6-デオキシ希少糖（全34種類）に関して、①微生物由来の種々の酵素を利用して7種類の6-デオキシ希少糖の生産法を確立し、各酵素反応における平衡比を明確にした点、②これまで未検討であった、6-デオキシ希少糖の生産に有効なD-アルロース3-エピメラーゼの特性を解明した点、において高く評価できる。

本論文に関する学位論文公開審査会は平成27年8月1日に高知大学農学部で開催され、論文発表と質疑応答が行われた。引き続き開催された学位論文審査委員会において、本論文の内容を慎重に審査した結果、審査委員全員一致して、本論文が博士（学術）の学位を授与するに値するものと判定した。