

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Akkharapimon Yotsombat
審査委員	主査 高田 悟郎 副査 櫻庭 春彦 副査 渡邊 誠也 副査 芦内 誠 副査 森本 兼司

### 論文名

Cloning and functional expression of the D-glucoside 3-dehydrogenase complex from *Rhizobium* sp. S10 in *Escherichia coli* and its application for rare sugars production.  
(*Rhizobium* sp. S10由来D-グルコシド3-デヒドロゲナーゼ遺伝子複合体のクローニングと大腸菌内での組換え酵素生産および希少糖生産への応用)

### 審査結果の要旨

希少糖は、天然にはまったく存在しないかごくわずかにしか存在しない単糖類、およびその誘導体の総称であり、大量に得るのが難しい糖が多く、きわめて高価な糖がほとんどである。一方、近年、さまざまな機能性が見出されるようになり、生理活性物質として注目されている。希少糖は、低カロリーの甘味料や虫歯予防に効果的な食品添加物として実用化されつつあるのをはじめ、自身の持つ抗酸化作用による臓器虚血保護作用、老化防止、抗がん、抗免疫物質として、あるいは抗菌作用や基質アナログ、グリコシダーゼ阻害剤の前駆物質といった広範囲の応用が期待される夢の糖であるといえる。

われわれは、希少糖を低コストで大量に生産するための研究を進めている。すでに、全希少糖の生産手順が明らかとなっているが、短い反応ステップでより希少性の高い糖の生産は困難である。本研究では、新たに土壤中から分離した *Rhizobium* sp. の生産する D-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼの遺伝子クローニングと組換え酵素生産に成功するとともに、本酵素の新規性、希少糖生産に対する優位性を明らかにした。本学位論文における研究成果の概要は以下のとおりまとめることができる。

まず、土壤中よりD-グルコシド3-デヒドロゲナーゼを生産する新規の微生物を分離した。本酵素はグリコシドの炭素第3位を特異的に脱水素し、3-ケトグリコシドを生成する酵素である。ラクチトールに対して最も触媒能力の高い酵素の選抜を行い、微生物の同定を行ったところ、*Rhizobium* sp.であることが分かり、S10株と命名した。本酵素を精製し諸性質の検討を行った。単量体の分子量は67,000、最大活性は40℃、pH7.5、安定性は40℃以下、pH6.0~11.0であった。本酵素は単糖からオリゴ糖まで幅広い基質特異性を示し、特に、 $\beta$ -1,4結合をもつセロビオースやラクトースに対して高い酵素活性を示すことが分かった。

次に、本酵素の遺伝子を大腸菌にクローニングし、組換え酵素の活性発現に成功した。本酵素はFAD結合型酵素であり、触媒サブユニットの遺伝子配列は、561アミノ酸をコードする1,686

塩基対からなっていた。組換え酵素を精製し諸性質を調べたところ、比活性、酵素生産量ともに顕著に増加し、オーセンティックの酵素と同様の諸性質を示した。このことより、組換え酵素を用いることで、安価な糖から様々な3-ケトグリコシドの大量生産が可能になると考えられた。また、3-ケトグリコシドを化学的に還元することで、出発物質の糖の3-エピマーとなる希少糖の生産も可能であると考えられた。

最後に、セロビオース及びラクチトールを出発物質に用いて希少糖生産への応用を検討した。組換え酵素を用い、セロビオースから3-ケトセロビオースをへて、希少オリゴ糖のアロシルグルコース、さらに加水分解により希少糖D-アロースが約30%の収率で得られた。また、組換え微生物菌体を用い、ラクチトールから3-ケトラクチトールをへて、希少オリゴ糖のグロシルソルビトール、さらに加水分解により、希少糖D-グロースが約8%の収率で得られた。

本研究では、*Rhizobium* sp.由来 D-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼ遺伝子を大腸菌に組換えることにより、組換え酵素を大量に獲得できた。酵素学的諸性質を詳細に検討するとともに、安価な二糖から希少糖 D-アロースおよび D-グロースの生産を行った。これらの希少糖は、従来の異性化酵素を用いる希少糖の生産方法(イズモリング)では多くの反応ステップが必要で収率が低く、大量生産が難しい。一方、本酵素を用いた酸化還元による生産方法は、反応ステップが少なく収率も高い。このように希少糖の生産性を向上させ、生産コストを下げることによって、希少糖をもっと広く普及させるための優れた基盤的研究成果を得ることができた。

本論文の学位論文公開審査会は、平成31年2月9日に愛媛大学農学部において開催され、論文発表と公開審査会が行われた。引き続き、学位論文審査委員会が開かれ、論文の内容について審査した結果、審査委員全員一致して、本論文は博士(農学)の学位を授与するに値するものと判定した。