

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名：
Name 鈴木 琢磨

学位論文題目：
Title of Dissertation *Shinella zoogloeoides* NN6株由来の希少糖生産酵素4種の諸性質およびそれらを用いた希少糖生産に関する研究

学位論文要約：
Dissertation Summary

[緒言]

希少糖は自然界に存在量の少ない単糖とその誘導体と定義されており、有用な生理活性を有するものがあることから注目を集めている。例えばD-アルロースは食後血糖値上昇抑制効果を、D-アロースはがん細胞の増殖抑制効果を有している^{(1), (2)}。D-アルロースはヒトにとって生理的意義のない糖であると従来考えられていたが、昨今の研究でその評価は覆された。現在は高価であっても安価な生産法が確立されれば機能性の発見や更なる希少糖生産につながる事が十分に期待される。ヘキソースのみならずペントースなどの希少糖も生理活性が期待できるが、希少ペントースの生産に関する研究成果は乏しい。希少糖の生産方法は生産戦略図イズモリング

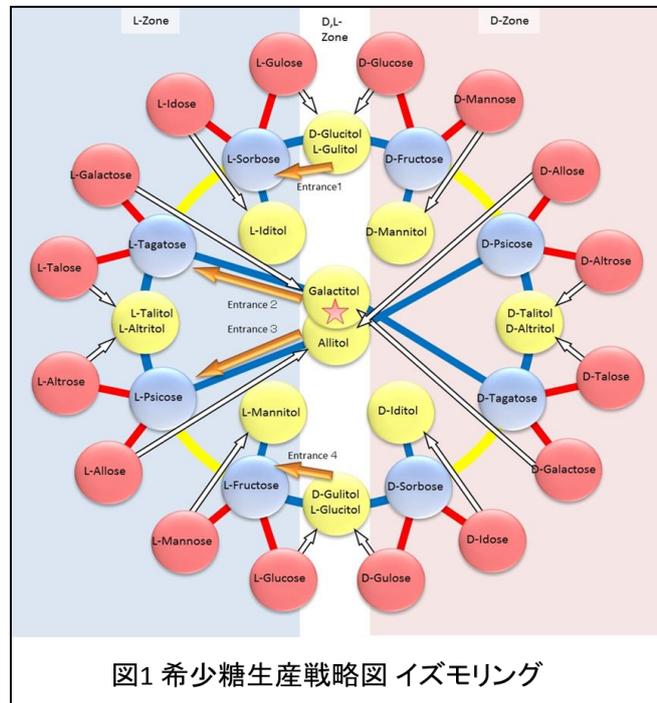


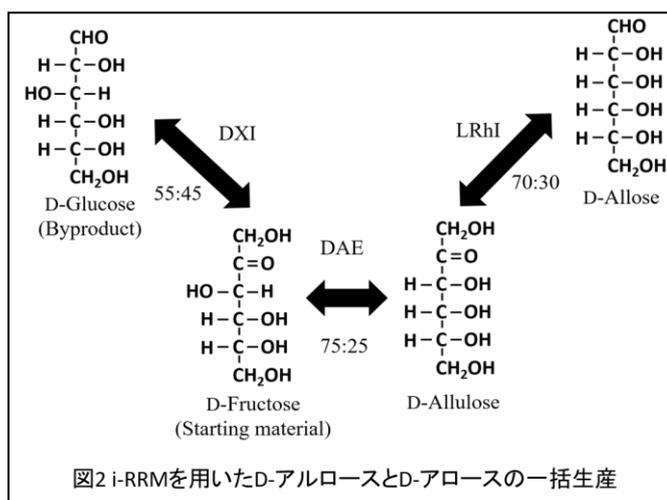
図1 希少糖生産戦略図 イズモリング

図(図1)に基づいた酵素法とアルカリ異性化に基づく化学法が挙げられる^{(3), (4)}。希少糖生産を特異的に実施するためには酵素法が優れているが、基本的に1種類の希少糖を生産するためには酵素1種類を必要とする。そのため酵素反応を繰り返して実施されるイズモリングでは、多種の酵素生産を必要とする。しかしながら、酵素の生産には高価な希少糖や誘導物質を必要とする。組換え大腸菌に希少糖生産酵素2種を共発現させる研究が複数報告されているが、高価な誘導物質を必要とする点は変わらず、コストの低減に直接寄与しているとはいえない^{(5), (6)}。*Shinella zoogloeoides* NN6は所属研究室でスクリーニングされた細菌であり、本菌は希少糖生産において特に重要なL-リブローズ3-エピメラーゼ (LRE)を構成発現する。さらに、NN6株にL-ラムノースを誘導炭素源として与えるとLREと同時にL-ラムノースイソメラーゼ (LRhI)を、D-キシロースを誘導炭素源として与えるとD-キシロースイソメラーゼ (DXI)を発現する。したがって、NN6株を用いれば高価な誘導剤を用いずに複数の希少糖生産酵素を同時に生産できる。本研究ではこれらの性質を利用して希少糖の効率的生産の開発を目指した。また、NN6株の有する希少糖生産酵素をクローニングし、得られた酵素の諸性質を

明らかにした。

[第1章 *Shinella zoogloeoides* NN6由来LREとLRhIを用いたD-アルロースとD-アロースの一括生産]

NN6株をL-ラムノース存在下で培養した菌体を超音波破碎し、その上清から金属処理、熱処理、ポリエチレングリコール(PEG)分画によりNN6株由来LRE (SzLRE)とLRhI (SzRhI)を含む部分精製酵素を調製した。部分精製酵素にはSzLREとSzRhI以外に、DXI (SzXI)が含まれていることが明らかとなった。この部分精製酵素と陰イオン交換樹脂HPA25Lを混合することで、SzLREとSzRhIの共固定化酵素 (i-RRM)を得た。i-RRMでもSzXI活性が確認され、

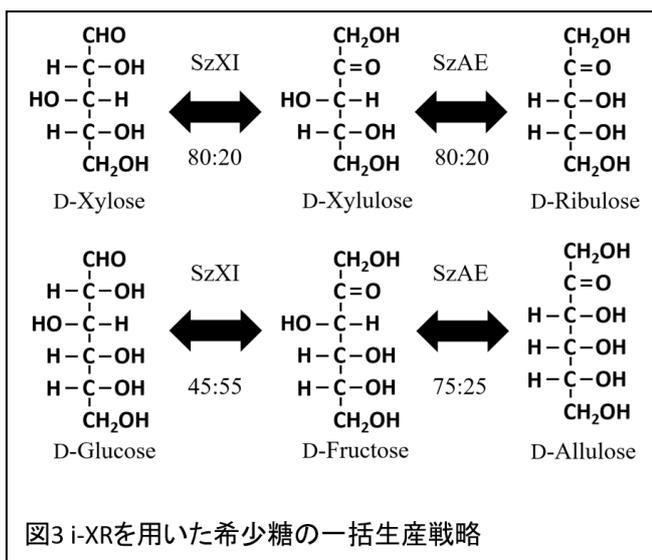


SzXIは熱処理、PEG分画、固定化の工程で除去されないことが明らかとなった。本研究では図2に示したように、D-フルクトースからD-アルロースとD-アロースの一括生産を試みたが、SzXIはD-フルクトースから副産物であるD-グルコースを生産する。そのため、目的産物の収量を高くするためにはSzXI活性を抑制する必要があると考えた。D-フルクトースを基質としてi-RRM 40 U (SzRhI活性)を作用させると希少糖D-アルロースとD-アロースが同時に生産され、本固定化酵素は2種の希少糖を同時に生産できることが明らかとなった。40°Cおよび50°Cで反応させると、pH 8.0のときD-グルコースが多く生産される傾向にあった。しかしながら60°Cで反応させるとD-グルコース生産量は抑制された。D-アルロースとD-アロースの転換率は60°C、pH 9.0のとき文献値とほぼ同等となり、これらが効率的に生産されていることが確認された。60°C、pH 6.0の条件ではD-アロースのみが生産された。これらの結果から、i-RRMは条件を調整することでD-アルロースとD-アロースの同時生産と、D-アルロースの選択的生産の両方に利用できることが明らかとなった。

[第2章 *S. zoogloeoides* NN6由来DXIの諸性質および希少糖生産への応用]

NN6株をD-キシロース存在下で培養して得られた菌体の粗抽出液に金属処理、熱処理、硫酸分画を施し粗精製酵素を調製した。続いて、HiPrep Phenyl HP 16/10カラム、HiTrap Q HPカラム、Resource Qカラムを用いてDXI (SzXI)を完全精製した。諸性質を調査したところ至適温度は60°C、至適pHはpH 9.0(グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液)となった。SzXIは40°Cまでは安定であるが、より高温では酵素活性を著しく失ったことから高温域での希少糖生産には適さないと示唆された。マンガンイオンを添加したとき、SzXIの酵素活性は2.2倍に向上したことから、SzXIはマンガン要求性のDXIであることが示された。SzXIはD-キシロースに対する活性を100%としたとき、D-グルコースに対して0.11%の相対活性であり、既知のDXIと比較して基質特異性が狭いことが分かった。しかしながら先のi-RRMを用いると、D-フルクトースからD-グルコースも少量生産されたことから、SzXIはD-キシロースに対して高い特異性を示すが、D-グルコースの異性化も十分に触媒できることが示された。したがって、SzXIもSzRhIと同様に、SzLREと組み合わせることで希少糖生産に応用できると考えた。

そこで、D-キシロース培養したNN6株から得た粗抽出液に対して先と同様に金属処理、熱処理、PEG分画を施しSzXIとSzLREを含む部分精製酵素 (pp-XR)を調製した。pp-XRは精製SzXIと比して温度安定性が向上し、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5)で最大活性を示した。SzXIとSzLREを組み合わせた希少糖生産(図3)を実施するために、pp-XRをHPA25L樹脂上に固定化することでSzXIとSzLRE共固定化酵素 (i-XR)を得た。i-XR上のSzXIは温度安定性が精製SzXIよりも向上したことから、高い再利用性が期待された。至適pHはリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5)であり、中性pH付近での活性が高かった。この性質



は、酵素反応時の褐変を抑制するために役立つ。i-XR上のSzLREは固定化前と比して安定性が低下したが、70°Cで1時間の熱処理でも80%以上の酵素活性を維持した。i-XR上のSzXIの安定性も考慮すると、希少糖生産において十分な温度安定性を有していると判断した。i-XR 20 U (SzXI活性)を基質D-キシロースもしくはD-グルコースと混合し、50°Cで酵素反応させた。D-キシロースを基質に用いたとき、基質濃度20% (w/v)まで、D-キシロースとD-リブロースの転換率が文献値とほぼ一致した。一方、D-グルコースを基質としたとき、2、および5% (w/v)では文献値とほぼ同様にD-アルロースまで転換されたが10% (w/v)以上の濃度では転換率が減少した。これはSzXIのD-グルコースからD-フルクトースへの活性がD-キシロースからD-キシロースへの活性よりも低いためと示唆された。本研究ではD-キシロース、D-グルコースを基質とした反応は最大濃度20% (w/v)で実施したが、酵素反応時の微生物汚染を防ぐためにはより高濃度の基質が望ましい。10% (w/v)以上のD-グルコースを基質として用いることは難しいと考えたが、D-キシロースを基質としたときは20% (w/v)でも反応は平衡状態に達した。D-キシロースからのD-キシロース、D-リブロースの一括生産においてはさらに高濃度での反応を検討する必要があるだろう。

[第3章 *Shinella zoogloeoides* NN6由来の2種のK3Eの精製と諸性質]

NN6株のゲノム解析により発見されたケトース3-エピメラーゼ (K3E)類似遺伝子2種の遺伝子 (それぞれ*lre*および*dre*)をpQE-60ベクターに挿入し、それぞれの形質転換体を作成した。これらの形質転換体からそれぞれLREおよびDREを抽出し、SzXIと同様の手順で精製酵素を調製した。SDS-PAGEとゲルろ過クロマトグラフィーの結果から、組換え酵素LRE (rLRE)は38 kDaの単量体からなるホモ4量体を形成することが明らかとなった。rLREの至適条件は80°C、pH 6.5 (リン酸ナトリウム緩衝液)で、先行研究で報告されている構成発現しているSzLREと同様の性質を示した。90°Cで1時間の熱処理後も60%の酵素活性を維持したことから、高い熱安定性を有することが明らかとなった。rLREはコバルトイオン添加時に酵素活性が著しく向上したことからコバルトイオン要求性のK3Eであることが強く示唆された。また、すべての遊離のケトペントース、ケトヘキソースに対して作用し、特にL-リブロースからL-キシロースのエピ化を強く触媒した。したがって本酵素はL-リブロース3-

(様式5) (Style5)

エピメラーゼであることが明らかとなった。これまでに報告されているLREは*Mesorhizobium loti*、*Methylomonas* sp.、*Labeledella endophytica*由来の3種であり、SzLREは4例目のLREとなる^{(7),(8),(9)}。DREもrLREと同様に、SDS-PAGEとゲルろ過クロマトグラフィーの結果から38 kDaの単量体からなるホモ4量体を形成することが明らかとなった。DREの至適条件は60°C、pH 7.5 (トリス-塩酸緩衝液)であり、LREとは全く異なる性質を有していた。また、DREは65°C以上で1時間の熱処理で酵素活性をほぼ全て失ったことから、rLREと比して温度安定性が低いことが明らかとなった。DREはニッケルイオン添加時に酵素活性が1.7倍に向上したことからニッケルイオン要求性であった。さらに、DREは用いた基質の中でD-リブロースに対して最も強く作用したことからD-リブロース3-エピメラーゼであることが強く示唆された。このような酵素はいまだ報告例がなく、新規酵素となる。既知のK3Eとの構造比較によってはK3Eファミリーの基質認識などにおいて新たな知見を提供することになるだろう。

[総括]

本論文では*S. zoogloeoides* NN6が構成発現するLREを利用することで希少糖生産の低コスト化を目指した。i-RRMは需要の高い希少糖D-アルロースとD-アロースを一括で生産し、i-XRは非常に高価な希少糖D-キシロースとD-リブロースを一括で生産した。さらにNN6株から2種のK3E類似遺伝子を見出し、興味深い結果を得た。特にDREは未知の特徴を有した酵素であり、既知酵素との比較はK3Eの構造に関する研究において新たな切口になると期待できる。以上の成果は今まで報告例がなく、産業利用のみならず学術的知見で新しい知見を提供することとなるだろう。本論文が希少糖生産の未来に寄与し、世界中の人々の健康を支える礎となることを願う。

[参考文献]

- (1) Murao, K. *et al.* D-Psicose inhibits the expression of MCP-1 induced by high-glucose simulation in HUVECs, *Life Science*. 81 (7) 592-599, (2007).
- (2) Noguchi, C. *et al.* D-Allose Inhibits Cancer Cell Growth by Reducing GLUT1 Expression. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. Vol. 238 131-141 (2016).
- (3) 何森 健 著 希少糖秘話 希少糖生産技術研究所 (2013).
- (4) 高峰 啓, 飯田哲郎, 大隈一裕, 何森 健アルカリ異性化を用いた希少糖含有シロップの製造方法および生理活性に関する検討 *応用糖質科学* 6 (1) (37-42), (2016).
- (5) Chen, X. *et al.* Production of d-psicose from d-glucose by co-expression of d-psicose 3-epimerase and xylose isomerase. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42 (8) 1117-1128, (2017).
- (6) Li, Z. *et al.* Bioconversion of D-glucose to D-psicose with immobilized D-xylose isomerase and D-psicose 3-epimerase on *Saccharomyces cerevisiae* spores. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42, 1117-1128, (2015).
- (7) Chena, D. *et al.* Biochemical identification of a hyperthermostable l-ribulose 3-epimerase from *Labeledella endophytica* and its application for d-allulose bioconversion. *International Journal of Biological Macromolecules*. 189 (31) 214-222, (2021).
- (8) Uechi, K. *et al.* Gene Cloning and Characterization of L-Ribulose 3-epimerase from *Mesorhizobium loti* and Its Application to Rare Sugar Production. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 77 (3) 511-515, (2013).

(様式 5) (Style5)

(9) Yoshida, H. *et al.* Crystal structure of a novel homodimeric 1-ribulose 3-epimerase from *Methylomonus* sp. FEBS Open Bio. 11 (6) 1621-1637, (2021).

(注) 要約の文量は、学位論文の文量の約 10分の1として下さい。図表や写真を含めても構いません。

(Note) The Summary should be about 10% of the entire dissertation and may include illustrations