

## 学位論文要旨 Dissertation Abstract

氏名： 鈴木 琢磨  
Name

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

### 学位論文要旨： Dissertation Abstract

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。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、酵素の生産に高価な希少糖や誘導物質を必要とすることが問題点として挙げられる。*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。

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。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。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。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。

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からDXI (SzXI)を精製した。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。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の処理を施しSzXIとSzLREを含む部分精製酵素を調製した。これを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よりも向上したため、高い再利用性が期待された。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-キシルロースへの活性よりも低いためと示唆された。

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、精製酵素を調製した。組換え酵素LRE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。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-キシル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-エピメラーゼであることが明らかとなった。一方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。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。本研究の成果から、NN6株は希少糖の効率的生産だけでなく酵素の発展的研究に大きく寄与することが期待される。