

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	鈴木 琢磨
審査委員	主査 森本 兼司 副査 高田 悟郎 副査 渡邊 彰 副査 渡邊 誠也 副査 芦内 誠

### 論文名

*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

### 審査結果の要旨

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。

以上のように、野生株が 2 種のケトース 3-エピメラーゼを有すること、そのうち 1 種は新規な D-リブロース 3-エピメラーゼであることを見出した。これらは貴重な知見であり、今後の希少糖の酵素による生産にとっての有用性を示すものであり、博士論文として高く評価できる。

本論文に関する学位論文公開審査会は令和 4 年 2 月 4 日にリモートシステムを利用して開催され、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 (農学) の学位を授与するに値するものと判定した。