

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：52201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07739

研究課題名(和文) 新たな糖質マテリアルの創製に向けた新規配糖化反応の開発と酵素の性質解明

研究課題名(英文) Characterization of a recombinant glucosidase from *Ensifer adhaerens* NBRC 100388 and evaluation of its glucosyl transfer activity

研究代表者

上田 誠 (UEDA, MAKOTO)

小山工業高等専門学校・物質工学科・教授

研究者番号：10615751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：*Ensifer adhaerens* NBRC100388から  $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子(EaG)のクローニングと大腸菌への形質転換を行い、酵素の諸性質を調べた。分子量は60 kDaで、至適pHは7.5、至適温度は45℃であった。本酵素は1価の陽イオンにより活性化された。加水分解活性はマルトース、マルトトリオースなどに活性を示した。配糖化活性では、ネロールや6-ジンゲロールの1,2級アルコールのみならず、リナロールなどの3級アルコールへも活性を示した。さらに、ラセミ体のリナロールを基質とし、アクセプター基質への立体選択性を調べた結果、(+)基質に対し20% e.e.の選択性を示すことが判った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アグリコンとなるステロイドやテルペンアルコールは、立体構造により薬理作用や香りなどの生物活性が異なる。また、配糖体が生物活性を持つ場合もあり、 $\alpha$ -アルブチンはチロシナーゼの阻害活性を持ち、ポリフェノール配糖体は糖の結合位置で抗酸化能が変わる(文献3)。さらに、配糖体の  $\alpha$ -と  $\beta$ -アノマーは、分解酵素の存在など生物的環境により安定性も異なる。以上のことから、アグリコンに対し立体・位置選択性を示し、アノマーの作り分けも可能な酵素による配糖体の精密合成が可能になれば、様々なアグリコンの配糖体や、また同じアグリコンから機能の異なる配糖体を、新たな機能性素材として創出できる。

研究成果の概要(英文)：An  $\alpha$ -glucosidase gene from a strain of *Ensifer adhaerens* NBRC 100388 showing transglucosylation activity toward alkylalcohols was cloned and expressed in *Escherichia coli*. The molecular mass of the purified recombinant  $\alpha$ -glucosidase protein was estimated to be 60 kDa. This  $\alpha$ -glucosidase from *E. adhaerens* NBRC 100388 (EaG) was able to hydrolyze maltose, maltotriose, maltotetraose, maltulose, sucrose, trehalose, ethyl- $\alpha$ -D-glucoside, and p-nitrophenyl1; D-glucoside (pNPG). The enzyme activity increased in the presence of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{K}^+$  ions but was inhibited by  $\text{Cu}^+$  and  $\text{Zn}^{2+}$ . The enzyme exhibited optimal activity with maltose at a pH of 7.5 and a temperature of 45 °C. The transglucosylation activity was observed not only for nerol, a primary alcohol, but also for 6-gingerol, a secondary alcohol, and (-)-linalool, a tertiary alcohol. The enantioselectivity for the glucosyl transfer towards the acceptor of ( $\pm$ )-linalool was 21.5% ee for the (-)-isomer.

研究分野：応用微生物

キーワード：配糖化 テルペンアルコール エンシファー グルコシダーゼ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食品機能成分のポリフェノールはサプリメントや食品添加物として利用されている。ポリフェノールは水に難溶で刺激性を有するものもあるが、この欠点の克服のため、そのフェノール性水酸基を配糖化し、水溶性や刺激性を改善する研究が盛んである。酵素による配糖化研究の問題点は、配糖化酵素反応がフェノール性水酸基に限定されていることであり、アルコール性水酸基を配糖化する新しい酵素反応技術が求められていた。

ショウガに含まれる 6-ジンゲロールは代謝促進等の効能があるが、水に難溶で刺激性を有するため応用分野は限られている。この欠点の改善の手段として、申請者は土壌から分離した細菌 *Ensifer* sp. M-26 株に 6-ジンゲロールの配糖化活性を見出した。酵素反応で合成した 6-ジンゲロール配糖体は狙い通りに水溶性が増大し、刺激性が消失した。

さらに研究を進めた結果、*Agrobacterium* sp. M-12 株にバラ香料成分のゲラニオールの配糖化活性も見出した。これまでの研究からアルキルアルコール配糖体を合成する酵素活性は、根圏菌(植物の根に共生する微生物)に分類される土壌微生物(これまでに 6 株を同定済)から得られている。植物は配糖化されたポリフェノールなど多数の化合物を根から分泌する。根圏菌はそれらの配糖体を分解するグルコシダーゼ活性を持つことが報告されており、多様な配糖体を合成する酵素源として期待できる。以上のことから、土壌細菌のグルコシダーゼの多様性に着目し、酵素の探索と性質を解明すれば、食品、医薬品、化粧品分野などで役に立つ配糖体が合成でき、これまでにない糖質マテリアルの合成基盤が構築できるとの着想に至った。

### 2. 研究の目的

配糖化は化合物の安定性向上や物性改善に有用であり、配糖体が有用な生理機能を持つ場合もある。我々は土壌細菌の  $\alpha$ -グルコシダーゼに着目し、マルトースをドナーとしたアルキルアルコール配糖化酵素の探索と配糖体の合成検討を行い、生姜活性成分 6-ジンゲロールの配糖化を報告してきた。本研究は芳香性があり生理機能を持つテルペンアルコールを基質とし、1 級アルコールのネロールの配糖化検討および 3 級アルコールのリナロールの配糖化等について検討し、有用配糖体合成基盤の確立と酵素の性質解明を進めることを目的とする。

### 3. 研究の方法

ネロールの配糖化は研究室保存の土壌分離細菌 *Agrobacterium* sp. M-12 株 (NITE AP-02189) の洗浄菌体を用い、マルトースをドナーとする糖転移反応により行った。培養は 1L-ジャーファーマンターで行い活性菌体を得た。配糖化反応は反応温度、pH およびマルトース濃度を検討し、至適な条件を選択後、コニカルチューブ中(反応液 15 mL)で反応を行った。形質転換体の作成は、ゲノム公開株で配糖化活性を有する *Ensifer adhaerens* NBRC100388<sup>T</sup> から  $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子 (GH family 13) のクローニングを行い、制限酵素配列を付与した対象遺伝子を pET-19b ベクターに組み込み、大腸菌 (BL21(DE3)) に導入した。得られた遺伝子組換え活性菌体を超音波破碎し、イオン交換とゲルろ過により酵素精製を行った。配糖化酵素活性の測定は TLC と HPLC を用い、ネロール、ゲラニオールおよびリナロール配糖体は反応液から単離精製後、NMR により構造を確認した。

### 4. 研究成果

*Agrobacterium* sp. M-12 株のネロールに対する配糖化活性を既存の配糖化酵素(シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (CGTase) およびトランスグルコシダーゼ (TG)) と比較した。図 1 に示すように本菌株による配糖化活性が高いことがわかる。洗浄菌体によるネロール配糖体の合成は、温度 40 °C、pH 7.0、マルトース濃度は 100 g/L が至適であった。また、マルトースを主炭素源とする培地でのジャー培養では培養 25 時間目の菌体で最大活性が得られた(図 2)。

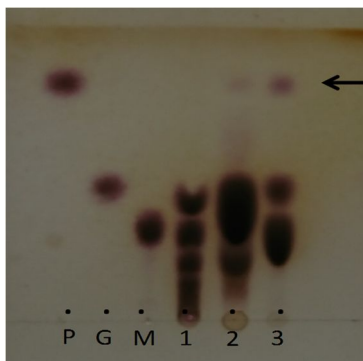


図 1. 薄層クロマトグラフィーによる生成物の分析

CGTase (lane 1), transglucosidase (lane 2), and washed cells of *Agrobacterium* sp. M-12 (lane 3). The arrow indicates the reaction product derived from nerol. P, nerol glucoside; G, glucose; M, maltose.

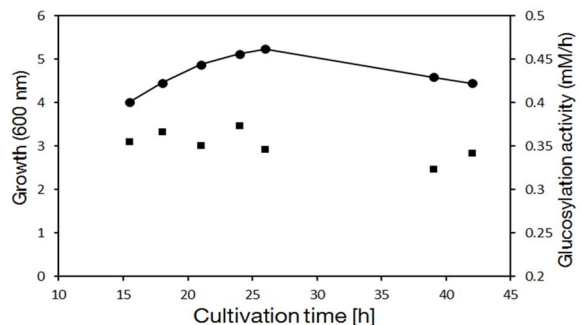


図 2. ジャー培養による *Agrobacterium* sp. M-12 の増殖と配糖化活性

●: 増殖, □: 配糖化活性

この洗浄菌体を用いてネロール 1 g/L を含む反応液中 (20 mM リン酸緩衝液, pH 7.0) でネロール配糖体の合成を行った。図3に示すように、40 で72時間反応を行った結果、1.8 g/Lの配糖体が蓄積した。モル収率は87.6%であった。また、反応中に微量のゲラニオール (0.03 g/L) およびその配糖体 (9.3 mg/L) の蓄積を確認し、菌体中の異性化活性の存在が予想された (図4)。ネロール配糖体の水への溶解度は22.0 g/L (25 ) であり、配糖化により水溶性が大きく向上した (ネロールの溶解度は0.53 g/L)

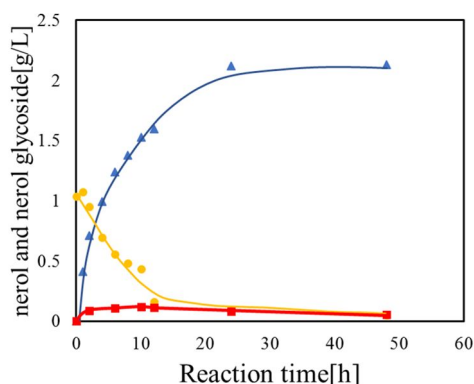


図3 .*Agrobacterium* sp. M-12 株によるネロールからネロール配糖体への変換

● : ネロール, ▲ : ネロール配糖体 ○ : ゲラニオール配糖体

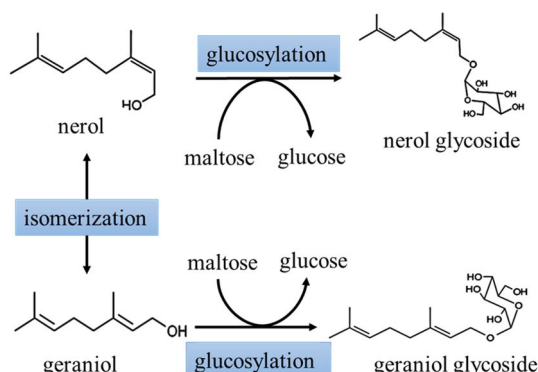


図4 . ネロールのゲラニオールへの異性化と配糖化活性

*Ensifer adhaerens* NBRC100388<sup>T</sup> の GH13 family の  $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子 (543 アミノ酸, 分子量 61,249) をクローニングし、形質転換した大腸菌は所望の配糖化活性を示した。精製した酵素の至適 pH は 7.5 付近であり、マルトース以外にスクロースやトレハロース, マルツロースを加水分解し、マルトースを 100 とした場合の比活性はそれぞれ 12.2, 3.3, 13.1%であった (表1)。配糖化活性の基質特異性を確認した結果、炭素数 10 程度までの 1 級, 2 級アルコールのみならず 3 級アルコールのリナロールや  $\alpha$ -テルピネオールでの配糖体合成を確認した (表2)。従来の知見では、 $\alpha$ -グルコシダーゼによる配糖化は 3 級アルコールでは困難であり、代表的な糖転移酵素の CGTase では tert-ブタノールでの配糖化例が報告されるのみであったが、本酵素はビールの芳香主成分であり生理機能の報告もあるリナロールに対する配糖化が可能であることが明らかとなった。そこで、さらにラセミ体リナロールへの配糖化を行い、本酵素のアクセプター側での立体選択性 (生成物はジアステレオマーとなる) を調べた。その結果、20.5 %e.e. ((-)-リナロール)の立体選択性が確認できた。今後は、さらに多様な酵素を取得し、アクセプターの水酸基への立体選択性や位置選択性等について検討を進める予定である。

表1 . *E. adhaerens* NBRC100388 由来  $\alpha$ -グルコシダーゼの加水分解活性

Substrate	Chemical bond	Hydrolytic rate [g/(L · min)]	Relative hydrolysis activity [%]
Maltose	Glc- $\alpha$ -1,4-Glc	$1.67 \times 10^{-1}$	100
Trehalose	Glc- $\alpha$ -1,1- $\alpha$ -Glc	$5.56 \times 10^{-3}$	3.3
Sucrose	Glc- $\alpha$ -1,2- $\beta$ -Fru	$2.04 \times 10^{-2}$	12.2
Maltulose	Glc- $\alpha$ -1,4-Fru	$2.20 \times 10^{-2}$	13.1
D-(+)-Cellobiose	Glc- $\beta$ -1,4-Glc	0	0
Lactose	Gal- $\beta$ -1,4-Glc	0	0
p-NPG	-	$5.79 \times 10^{-2}$	34.6

表2 . *E. adhaerens* NBRC100388 由来  $\alpha$ -グルコシダーゼの配糖化基質特異性

Substrate	Activity
1-butanol (C4)	○
1-nonanol (C9)	○
5-nonanol	○
1-tetradecanol (C14)	×
7-tetradecanol	×
nerol	○
geraniol	○
(-)-linalool	○
(-)- $\beta$ -citronellol	○
( $\pm$ )- $\alpha$ -terpineol	○
6-gingerol	○

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi Kazuki, Terauchi Issei, Ono Marie, Satoh Hiroshi, Ueda Makoto	4. 巻 82
2. 論文標題 Microbial production of neryl- $\beta$ -D-glucopyranoside from nerol by <i>Agrobacterium</i> sp. M-12 reflects glucosyl transfer activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2205 ~ 2211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1514250">https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1514250</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木達也、深谷美憂、高橋一樹、佐藤浩志、上田誠
2. 発表標題 配糖化酵素遺伝子のクローニングと形質転換体によるリナロールなどのアルコールへの反応
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会大会（東京）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木達也、松本里佳、佐藤浩志、上田誠
2. 発表標題 生姜搾汁液中の6-ジングロールの微生物反応による配糖化に関する研究
3. 学会等名 第24回高専シンポジウム in Oyama
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋一樹、寺内一星、小野満里江、佐藤浩志、上田誠
2. 発表標題 微生物反応によるネロールの配糖化に関する研究
3. 学会等名 2018年度日本農芸化学会大会（名古屋）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木達也、松本里佳、佐藤浩志、上田誠
2. 発表標題 ショウガ搾汁液中の6-ジンゲロールの微生物反応による配糖化に関する研究
3. 学会等名 2018年度日本農芸化学会大会（名古屋）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 出願特許	発明者 上田誠、佐藤浩志	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-115568	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----