

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：52201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05374

研究課題名(和文) -グルコシド配糖体合成に向けた新規糖転移酵素の探索と酵素の機能解析

研究課題名(英文) Exploring novel glucosidase for glucoside synthesis and the characterization.

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖転移反応により型配糖体を生成する微生物を土壌および研究室の保存微生物から探索した。土壌分離細菌の *Agrobacterium* sp. No.201 の洗浄菌体は、7 g/L フェネチルアルコール、100 g/L セロビオース、40 °C の反応条件で、フェネチルアルコール- $\beta$ -D-グルコピラノシドをモル収率15.2%で蓄積した。さらに、*Rhizobium pusense* JCM10209 の酵素遺伝子(RPG3)をクローニングし大腸菌で発現させた。形質転換 *E. coli* BL21 (DE3) を用い、RPG3 の基質特異性などの諸特性を解明した。炭素数10程度の1級アルコールがアクセプターとして優れていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリフェノールなどの配糖体は食品や医薬品分野等で広く使われ、各種の化合物の配糖体合成法が研究されている。特に、酵素の糖転移反応による配糖体合成は効率が良く実用化例もある。一方、配糖体については、高収率かつ高生産な合成手法の報告は無い。薬用植物や医薬の活性成分として配糖体は有用であり、新しい合成反応の開発が期待されている。そこで本研究では、配糖体を優位に合成できる微生物を探索し微生物反応による生産性を明らかにした。また、触媒酵素の性質解明も行い、各種アルコール基質に対する配糖化活性などの性質を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated of screening of microorganisms that produce  $\beta$ -glycosides by transglycosylation in soil and in the laboratory. Washed cells of *Agrobacterium* sp. No.201, a bacterium isolated from soil, accumulated phenethyl alcohol- $\beta$ -D-glucopyranoside with a molar yield of 15.2% under reaction conditions of 7 g/L phenethyl alcohol, 100 g/L cellobiose, and 40 °C. Furthermore, the enzyme gene (RPG3) of *Rhizobium pusense* JCM10209 was cloned and expressed in *Escherichia coli*. Using transformed *E. coli* BL21 (DE3), we elucidated various enzymatic properties of RPG3, such as substrate specificity. Primary alcohols with up to about 10 carbon atoms were excellent acceptors for the glycosylation reaction, and secondary and tertiary alcohols did not react.

研究分野：応用微生物

キーワード：配糖体 -グルコシド結合 -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

ポリフェノールやテルペンアルコールは有用な生理機能をもつが水に難溶で刺激性もある。この欠点の克服のため、配糖化し物性改善する研究が盛んである。配糖体はグリコシド結合の $\alpha$ -、 $\beta$ -アノマーに分類できるが、 $\alpha$ -アノマーは酵素反応により合成され実用化例も多い。 $\beta$ -アノマーは有機合成で合成可能だが、反応の選択性(アノマーの選択性や位置選択性)が低い。また、酵素反応ではアノマーの選択性は厳密だが収率が低い。天然物の多くは $\beta$ -配糖体であり(例:レスベラトロール)機能性素材としての開発が期待されているが、効率的な合成法が無く新しい方法が求められている。

配糖体を酵素反応で合成する手法として、オリゴ糖(マルトースなど)から単糖(グルコースなど)をアグリコン(ポリフェノールなど)に転移するグルコシダーゼによる糖転移反応が一般的である。 $\alpha$ -配糖体は、糖質加水分解酵素ファミリー(Glycoside hydrolase family: GHファミリー)のGH13に分類される $\alpha$ -グルコシダーゼ反応により合成される。 $\alpha$ -グルコシダーゼの反応は、

- ・通常の加水分解
- ・糖転移によるオリゴ糖合成
- ・糖転移による配糖化

に分類される。これまでの研究から、配糖化の高活性な $\alpha$ -グルコシダーゼは、アグリコンの結合サイト近傍、および結合サイトへの侵入部分に配糖化に適したタンパク質の構造的な変化があり、特徴的なアミノ酸配列が存在する。同じ酵素ファミリーの中で活性中心の構造は保存しつつ機能がファミリー内で多様化している。つまり分子進化の過程で反応特性が変化し、配糖化活性が向上したことになる。一方、 $\beta$ -グルコシダーゼの研究は加水分解とオリゴ糖合成が主であり、 $\beta$ -配糖体合成活性が優位な $\beta$ -グルコシダーゼは発見されていない。 $\beta$ -グルコシダーゼにも反応特性の変化による配糖化特異的な酵素は存在するのか?この問いに対し、申請者は土壌細菌等の酵素の研究により可能性を見出しつつある。新しい機能の酵素により $\beta$ -配糖体の合成研究法を進展させ意義深い研究とする。

### 2. 研究の目的

本研究は、天然物や医薬品に多く存在しながら合成困難であった $\beta$ -配糖体を、新規な微生物酵素により合成可能とすること、および酵素の性質解明を目的とする。本研究の特色は、微生物のグルコシダーゼの多様性への着目による、有用なポリフェノールやアルキルアルコールを基質(アグリコン側)とする $\beta$ -配糖体合成反応の実現である。糖の供与体としてセロビオース(グルコース2分子からなる $\beta$ -1,4結合の2糖)を用い、一段階の酵素反応でグルコースを様々なアルコールに $\beta$ -アノマーで転移する。さらに酵素遺伝子を大腸菌に形質転換し、得られた組換え酵素を用いて酵素化学的な性質の解明を試みる。

### 3. 研究の方法

微生物の探索は土壌からの分離株および研究室の保存菌株から行った。配糖化反応の検討は、セロビオースを主炭素源とした培養液から調整した洗浄菌体に基質を添加することで行った。生成配糖体の定性・定量はTLC, HPLCを用いた。生成したフェネチルアルコール配糖体は、分離精製し、NMR及びLC-MSにて構造解析を行った。形質転換体の作成はゲノム公開株から酵素遺伝子を取得し、宿主として大腸菌を用い、発現誘導した大腸菌を用いて反応および酵素精製検討を行った。

### 4. 研究成果

土壌分離株の *Agrobacterium* sp. No.201 株の洗浄菌体による各種アルコール基質の配糖化検討を行った。図1に用いた基質とTLCで分析した配糖化結果を示す。

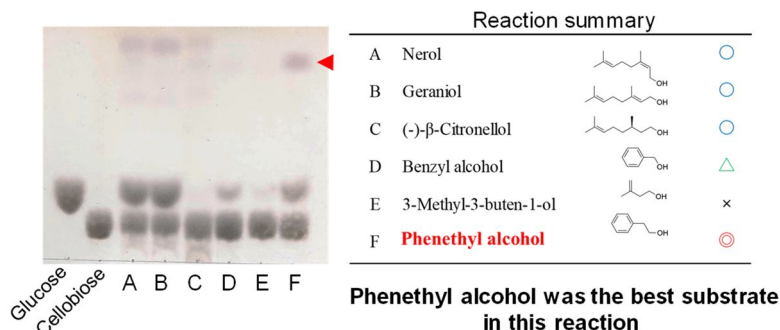


図1. *Agrobacterium* sp. No.201 株による各種基質の配糖化

フェネチルアルコールは反応性が良く副生成物も少ないことから以降の検討の基質とした。次に反応温度の検討を行った(図2)。40 で一日以上の活性保持が可能であったが、50 では5時間程度で活性が消失した。グルコースドナーはセロビオースであるが、セロビオース濃度の検討を行った(図3)。セロビオースが低濃度の場合はフェネチルアルコールの配糖化は十分に進行せず、50g/L以上の濃度が必要であった。

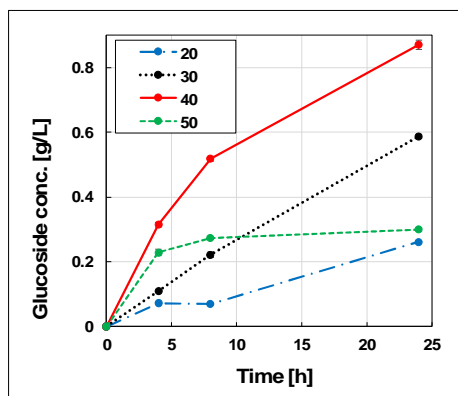


図2. 反応温度の影響

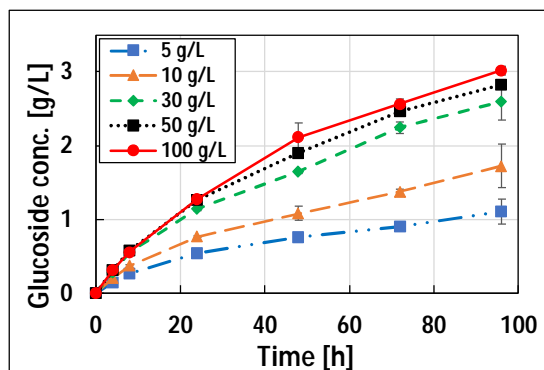


図3. セロビオース濃度の影響

つぎにアクセプターのフェネチルアルコール濃度の影響を調べた(図4)。7g/L以上で迅速な配糖化が可能であり、3g/Lの低濃度では非常に低い反応速度であった。以上の検討から、反応温度40、セロビオース濃度100g/L、フェネチルアルコール濃度7g/Lの至適条件で配糖体の蓄積実験を行った(図5)。その結果、144時間の反応でフェネチルアルコールに対し15.2%のモル収率で配糖体が得られた。

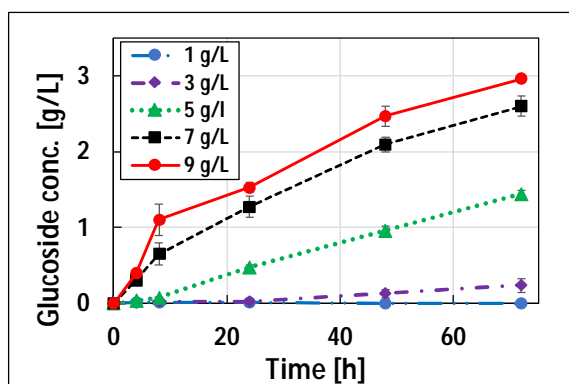


図4. フェネチルアルコールの影響

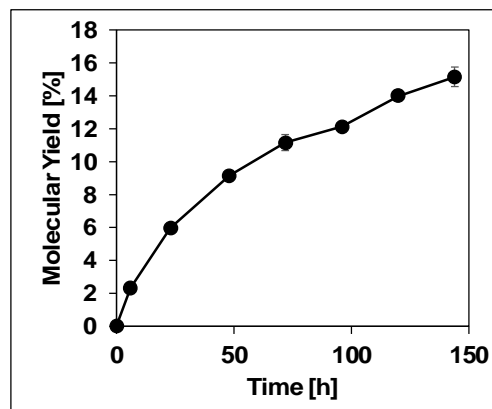


図5. 至適条件での配糖体蓄積の経時変化

これまでの検討より、土壌微生物からアルコール基質に対してセロビオースからβ型の配糖体を効率よく生成する活性を見出した。そこで本反応を触媒する酵素を同定し、形質転換大腸菌により本酵素の酵素化学的な性質を詳細に調べる検討を実行し、興味深い結果を得ており、特許および論文等による報告を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川大空、竹内悠貴、竹内道樹、原良太郎、高橋優輔、小川順、上田誠
2. 発表標題 Agrobacterium sp. No.201株による第一級アルコールの 型配糖化反応の探索とフェネチルアルコールの配糖化検討
3. 学会等名 日本生物工学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 -グルコシル配糖体の製造方法及び形質転換体	発明者 小川順、竹内道樹、 上田誠、松浦圭介	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-201611	出願年 2023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
研究分担者	竹内 道樹  (TAKEUCHI Michiki)  (40766193)	京都大学・農学研究科・特定助教   (14301)	
研究分担者	原 良太郎  (HARA Ryotaro)  (70553535)	京都大学・農学研究科・特定准教授   (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------