

平成 30 年 9 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07380

研究課題名(和文)ゴマ搾り粕から高効率な有用物質生産を可能にする新規酵素の分子解析と応用

研究課題名(英文)Molecular analysis and application trial of a novel enzyme for efficient production of valuable compounds from sesame oil cake

研究代表者

山下 哲 (Yamashita, Satoshi)

金沢大学・物質化学系・准教授

研究者番号：70361186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ゴマ油に微量含まれる抗酸化能の極めて高いリグナンである、セサミノールの効率的な生産を目指し、ゴマ種子に難分解性の配糖体として蓄積するセサミノール配糖体を分解可能な新規酵素の分子解析と応用を試みたものである。その成果として、現在のところ有効利用されていないゴマ搾り粕を出発原料とし、目的物質のセサミノールを生産する過程を試験管内で実現した。また、現在未知の同酵素の反応機構についての知見を得ると共に、原子分解能の構造情報に必須な結晶も取得した。さらに、同酵素の高活性化を行うことに成功し、その過程における遺伝子解析により、セサミノール配糖体の難分解性結合に特異性の高い新規な酵素も発見した。

研究成果の概要(英文)：This research focuses on the trials for efficient production of sesaminol, a sesame lignan with prominent health-giving effects on human such as potent antioxidant activity. Although sesame oil contains a small amount of sesaminol, sesame seed contains some conjugated forms of sesaminol such as sesaminol triglucoiside (STG) which is highly resistant to hydrolytic actions of beta-glucosidases. We previously isolated a beta-glucosidase which was capable of hydrolyzing STG to produce sesaminol, and named the enzyme as PSTG. However, the molecular mechanism of PSTG is still unknown and its possibility of application for industrial production of sesaminol needs to be examined. Here, we succeeded a consecutive reaction from STG to sesaminol in vitro. To obtain insights into the mechanism of PSTG, we crystallized PSTG and successfully obtained good crystals. Moreover, we identified the operon containing PSTG gene and a novel PSTG-like gene which encoded a more efficient enzyme than PSTG.

研究分野：酵素化学

キーワード：セサミノール

1. 研究開始当初の背景

ゴマは非常に古くから人の健康に良い成分を含むことが知られており、近年はリグナンという化学構造を持つ化合物の一種であるセサミンがゴマから抽出され、健康食品として量産化され、大きな市場を形成して久しい。ゴマリグナン類の効用の大きな特徴の一つは、抗酸化作用の高さであり、その点においてゴマ油の抗酸化性に大きな寄与をしている物質は、セサミノール(図1)というセサミンに類似した化合物であることが知られている。セサミノールは、セサミンが肝臓などでの部分的な代謝を受けないと抗酸化作用を示さないのに対し、そのまま抗酸化作用を示し、さらには抗腫瘍活性などの人体にとって好ましい性質を示す有用物質である。しかしながら、セサミノールのゴマ油中の含量は低く、ゴマ搾り粕に水溶性のセサミノール配糖体として存在するため、ゴマ搾り粕から回収などはされていない。さらに、セサミノール配糖体は、3つのグルコースが分岐して連なったセサミノールトリグルコシド(図1)という構造であり、同構造中に含まれる-1,2-グルコシド結合が通常の-グルコシダーゼによる切断に

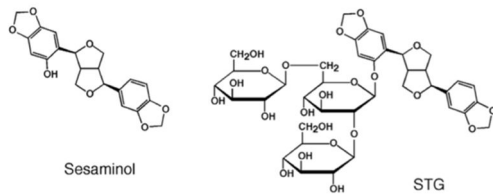


図1 セサミノール(左)とセサミノールトリグルコシド(右)

極めて耐性が高い。したがって、セサミノール配糖体は難分解性であるがために有効利用されていないという側面も持つが、そのような状況の中、セサミノール配糖体の分解を効率的に進行させる酵素が単離された。本酵素はゴマ搾り粕からの微生物の単離と、粘り強い選別によって、単一生物(Paenibacillus属の一種)が生産する酵素であることが同定され、セサミノールトリグリコシドSTGにちなんで、PSTGと命名された。本酵素の有用性の最も顕著であるセサミノール配糖体中の-1,2-グルコシド結合の切断メカニズムについては、まだ不明であり、詳細な分子解析が求められるとともに、本酵素を用いた応用の可能性についても期待されることであった。

2. 研究の目的

本研究は、ゴマ搾り粕から単離された微生物由来のセサミノール配糖体分解酵素PSTGの反応メカニズムの理解のため、主に酵素の立体構造情報による分子解析を目的とする。さらに、同酵素の応用展開のため、試験管内でのセサミノール配糖体からセサミノール生産系の確立を検討する。また、本項目に関連し、高活性型酵素の作出についても検討する。

3. 研究の方法

本研究は、PSTGの分子解析および応用展開のための検討からなり、以下の項目のような方法で研究を遂行した。

- (1) 精製PSTGの結晶化条件の探索と最適化、およびX線結晶構造解析: 大腸菌で大量発現させたPSTGを数段階のカラムクロマトグラフィーで精製し、結晶化条件のスクリーニングのため、約500種類の異なる条件で結晶化を行った。また、初期の結晶が得られた条件を基に、ファインチューニングおよび種々の添加剤の検討を行い、良質な結晶が得られる条件を探索した。また、得られた結晶がタンパク質由来であるか確認するため、ホームソースでのX線回折実験を行い、回折データの収集を行った。
- (2) PSTGの高活性化の検討と試験管内セサミノール生産系の確立: PSTGの高活性化のため、PSTG生産菌であるPaenibacillus属の細菌に対して変異誘発処理を施し、生じたコロニー群から、糖遊離活性に基づくスクリーニングを3次選抜までを行い、高活性型PSTG生産菌株を単離した。また、PSTGの高活性化の原因を調査するため、同菌株におけるPSTG遺伝子および周辺遺伝子の配列解析を行った。また、試験管内セサミノール生産系のため、種々の反応条件の検討を行った。
- (3) 新規酵素PSTG2の遺伝子クローニングと異種発現および機能解析: 上記の項目(2)において、PSTG遺伝子の周辺からオペロンを形成する類似の遺伝子が発見されたため、遺伝子クローニングを行い、異種発現系の構築を行った。また、大腸菌で異種発現した同酵素を精製し、セサミノールトリグルコシドに対する特異的な活性が認められたため、PSTG2と命名し、詳細な機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) 精製PSTGの結晶化条件の探索と最適化、およびX線結晶構造解析について: 本項目では、すでに精製条件が確立しているPSTGを大量に調製し、シットティングドロップ法によって約500条件の結晶化条件のスクリーニングを行った。その結果、数種の条件で微細な結晶が得られたため(図2)、その結果を基にしてハンギングドロップ法によって結晶条件の最適化を試みた。しかし、結晶の形やサ

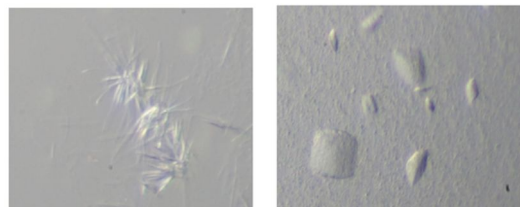


図2 PSTGの初期結晶(左)と最適化された結晶(右)

イズなどは劇的に変化しなかったため、約100種の添加剤のスクリーニングを行った。その結果、PSTGの結晶サイズおよび形状に変化が見られたものが見出され、その中でも、アルキルグルコシド系の界面活性剤を添加した場合に、良好なサイズ(0.1-0.2 mm)の単結晶が得られることを確認した(図2)。さらに、同結晶をホームソースのX線結晶構造解析装置にて回折実験を行ったところ、低分解能ではあったがタンパク質結晶性の回折スポットが確認された。現在、タンパク質の精製段階における安定性の検討や、精製度を向上させる取り組みをしている。また、放射光施設の高輝度X線を利用すれば、構造解析に必要な全てのデータが得られる可能性があるため、現在のところ同施設利用のための調整を行っている。位相決定は、PSTGと配列相同性が高いThermotoga属細菌由来の α -グルコシダーゼ(ゴマリグナンに対する活性は持たない)の位相を利用し、分子置換法で行う予定である。

(2) PSTGの高活性化の検討と試験管内セサミノール生産系の確立について：ゴマリグナンから単離されたPSTG生産菌であるPaenibacillus属細菌に対して、変異誘発処理を施し、その親株のコロニー3000個から、糖遊離活性に基づく選抜を行った。本操作を3次選抜まで継続した結果、菌体破砕液のセサミノール配糖体分解活性において、変異誘発前と比較し13.5倍にまで上昇したものが得られた。本変異株の解析については、活性上昇の原因がPSTGそのものへの変異によるものではないことが判明し、さらに予想外なことに、独立したもう一つのPSTG類似酵素の関与が見出されたため、次項目で詳細に報告する。この取り組みと並行して、精製PSTGを用いた試験管内セサミノール合成を検討した。PSTGの最適温度、温度安定性、最適pHを決定し、その条件でセサミノールトリグリコシド(STG)を出発物質とし、セサミノールの試験管内合成量の時間経過を測定した。その結果、3時間というタイムスケールで、出発物質からのセサミノール生成量は直線的に増加することが認められ、試験管内の水溶液

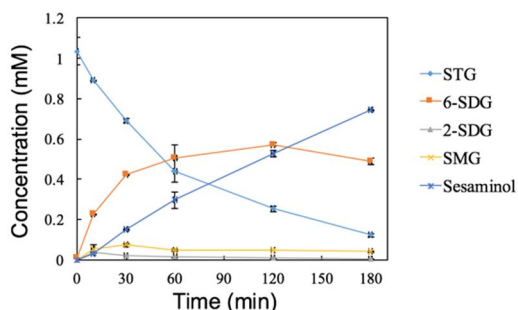


図3 精製PSTGによる試験管内セサミノール合成反応のタイムコース

中では、一定の時間内であれば連続的に疎水性の目的物質を生産できることが示された

(図3)。本系の特徴としては、出発物質の3つのグルコースのうち一つが切断された状態の6-セサミノールジグルコシド(図中6-SDG)が比較的多量に蓄積することである。それに比較すれば、他の2種の間体の蓄積はほとんど無いと言える。本系のより高効率なセサミノール生産においては、上記の問題を他の添加酵素などによって解消するのが一つの戦略であると思われるため、今後検討する予定である。

(3) 新規酵素PSTG2の遺伝子クローニングと異種発現および機能解析について：前項目(2)で記述したようにPSTG遺伝子周辺の配列解析によって、今回新たにPSTG遺伝子を含むオペロン構造が確認され、PSTGの類似酵素がコードされていることが判明した。また、以前より菌体破砕液によるセサミノールトリグリコシド分解に比較して、精製PSTGによる同分解過程のプロファイルが異なることから、同菌が生産する他の酵素の関与が示唆されていたため、当該PSTG相同遺伝子のクローニングと異種発現系の構築を行った。その結果、2553塩基対からなる推定遺伝子が得られ、850アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしていると予想され、PSTGとの配列同一性は32.8%であった。大腸菌における異種発現では、やや不溶性の酵素が発現し、カラムクロマトグラフィーによって均一な精製標品を得るこ

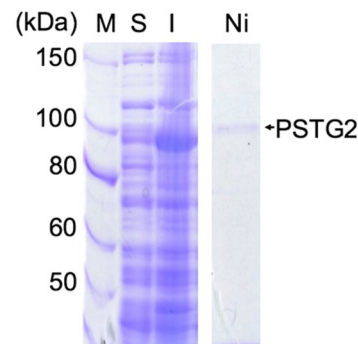


図4 新規酵素PSTG2の発現と精製結果

とができた(図4)。同標品を用いた酵素活性測定を行った結果、予想通りSTG分解活性が確認され、さらに興味深いことに、同出発基質の分解プロファイルにおいて、難分解性結合である α -1,2-グルコシド結合の切断が非常に迅速であるという結果が得られた(図5)。このグルコシド結合への特異性については、ジグルコシド基質を用いた検討の結果、通常の α -グルコシダーゼが切断可能である α -1,6-結合を持つ基質に比べ、 α -1,2-結合を持つソホロースに対する活性が約12倍高いという驚くべき結果が得られた。これらの成果により、本酵素をPSTG2と命名し、ゴマリグナン基質の α -1,2-結合に極めて特異的な酵素という新規性によって、査読付きの国際誌に論文が掲載され、学会発表を行った。

(4) 成果のまとめ：本研究では、研究申請時に予定していた項目(1)と項目(2)について研究を遂行した。(1)については、高輝度X線

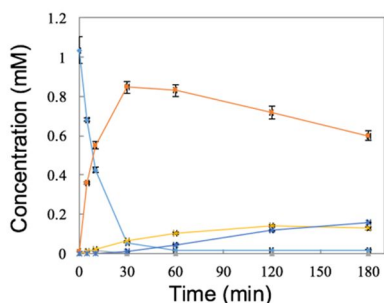


図5 精製 PSTG2 による試験管内セサミノール合成
反応のタイムコース (図中の配色は図3と同じ)

回折実験によるデータ回収の準備段階で期間終了を迎えたが、本項目における一番のボトルネックであるタンパク質結晶の取得と適切なサイズの結晶を得ることに成功したため、可能なかぎり迅速に PSTG の構造モデル構築と論文出版を目指す。また、項目(2)については、予定通り高活性化と試験管内セサミノール合成系の確立を行うことができた。本項目については、高活性化の原因を調査したところ、新規酵素 PSTG2 の発見につながった。PSTG2 は最近 *Listeria* 属細菌から見出された α -1,2-グルカン分解酵素への相同性が高く (配列同一性 42.5%), 明らかに PSTG とは異なる性質であることから *Paenibacillus* 属のゴマリグナン代謝においては、複数種の分解酵素が複合的に機能していることが予想される。PSTG2 はゴマリグナン配糖体を始めとする嵩高い植物二次代謝産物から、選択的に α -1,2-グルコシド結合を切断する特異的な活性を有するため、これまで酵素的に行うことが困難であった分解過程を担うものとしての応用展開も期待できる。また PSTG と共に PSTG2 の有する触媒反応メカニズムも興味を持たれるところであり、将来に向けたシーズを生み出したという点で、非常に有意義に申請期間を終了したと考えている。今後も、ゴマ搾り粕のように有効利用されていない題材からの有用物質生産という戦略で、研究に邁進したいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

櫻井明德, 本江俊太郎, Arun Nair, 和氣駿之, 及川大輝, 西尾拓真, 下山武文, 高橋征司, 山下哲 (責任著者), 中山亨, Identification and characterization of a novel bacterial α -1,2-glucosidase that is highly specific for the α -1,2-glucosidic linkage of sesaminol triglucoside. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, *in press* (Article ID: TBBB 1476123)

〔学会発表〕(計 1 件)

山下哲 (発表者), 櫻井明德, 和氣駿之, 高橋征司, 中山亨, セサミノール配糖体の新規分解酵素の単離およびキャラクタリゼーショ

ン, 2017 年度生命科学系合同年次大会 (ComBio2017), 2017 年 12 月 7 日, 神戸市

〔その他〕

ホームページ等

http://chem.s.kanazawa-u.ac.jp/j/faculty/06_bc.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 哲 (YAMASHITA, Satoshi)

金沢大学・物質化学系・准教授

研究者番号: 70361186

以上