

学位論文題名

Raffinose Synthesis by α - Galactosidase
from *Absidia corymbifera* IFO 8084

(*Absidia corymbifera* IFO 8048 由来 α - ガラクトシダーゼによる
ラフィノースの合成)

学位論文内容の要旨

糖質、特に砂糖は従来 1 次機能のエネルギー源および 2 次機能の甘味料として他の糖質に比べ非常に優れた味質と物性を用い、多用されてきた。しかし、近年になり糖質の過剰摂取による肥満や成人病の問題の原因物質として認識され、砂糖の消費は減少傾向が続いている。その流れから、健康の維持や回復に寄与する、即ち、生理調節機能を有する 3 次機能としての機能性糖質の要求とそれに応じた新たな機能性糖質の開発が重要視されている。

ラフィノースは難消化性オリゴ糖の種類であり、特にビフィズス菌に選択的に資化されやすく、これを顕著に増殖させる作用があり、腸内フローラの改善に有効であることが明らかになってきた。また、最新の研究報告によるとアトピー皮膚炎への影響が疑われるカンジダ菌を有意に減少させ、ラフィノースの経口投与が有効な治療手段になりうるということが明らかになった。その他、ラットをモデルとした一連の研究によって肝障害（B 型肝炎）を抑制することが報告されているし、歯周病と腸内フローラによる免疫賦活との関連を研究した例ではラフィノース投与が多型核白血球（好中球）の貪食作用や、マイトジェン（PHA）の刺激による非特異的 T リンパ球幼若化反応を亢進する事などが報告されている。また、臓器移植の際、保存液として有効であり、即ち、生理調節機能性糖質としての役割だけでなく多方面でのラフィノースの利用価値が増加し続けている。

ラフィノースは現在、工業的には砂糖の原料であるビートの糖蜜から抽出工程により製造されている（日本甜菜製糖株式会社）。しかし、ビートの中に含まれているラフィノースの含量は 0.1% 程度と極めて微量であり、比較的高価なオリゴ糖である。そこで、酵素合成法によって有用なラフィノースをより簡単かつ低コストで生産することが望まれている。ラフィノースの酵素合成は糖転移酵素であるガラクトシルトランスフェラーゼによって特異的に合成することが既に可能であるが、基質である UDP-galactose が非常に高価であり、またこの酵素自体が不安定な性質を持っているためこの方法によるラフィノースの合成は現実的に不可能である。一方、加水分解酵素である α -ガラクトシダーゼ (EC3.2.1.22) は砂糖の結晶化に悪影響を与える有害物質としてのラフィノースを除去す

るため使われてきたが、この酵素の縮合反応、即ちラフィノースの分解産物である砂糖とガラクトスを基質とした逆反応を利用し、ラフィノースを合成出来る可能性がある。さらに、最近消費が減少し続けている安価の砂糖を利用し、経済的に付加価値が高いラフィノースを創出できるという有望な方法である。しかし、一般的に逆反応でオリゴ糖を合成する場合、転移反応を利用して合成する時に比べて反応速度が遅いため、大量の酵素で長時間反応させる必要性が予想される。また、特異性が低下し、生成物は種々の結合様式のオリゴ糖の混合物になる可能性がある。従って、オリゴ糖の合成に逆反応を行うためにはより高い特異性を持っている加水分解酵素の利用とその酵素を大量に得る必要が当面課題になってくる。

我々はこのような観点から有用なラフィノースをより経済的かつ高特異的に生産するためには、*Absidia corymbifera* IFO 8084の α -ガラクトシダ-ゼ(EC3.2.1.22)がこのように目的に適したことを確認した。即ち、逆反応を引き起こすため受容体として高濃度の砂糖(70%)と特異性を高めるために供与体として低い濃度の α -D-ガラクトス(10%)を採用した反応系を構築し、ラフィノースの合成を試み、10%程度の転換率を得た。この転換率はAjisakaらによって報告された転換率よりやや少ないものであるが、本酵素の方が高い特異性を持ち、より立体選択的にラフィノースを合成することが分かった。

しかし、糸状菌である*Absidia corymbifera* IFO 8084が生産する α -ガラクトシダ-ゼの分泌量は非常に少ないため、安定したラフィノースの大量生産を実用化させるためにはより簡単、且つ大量にこの酵素を得ることが必要である。さらに、分子レベルでの解析と改変を通して一層逆反応の機能を強化した新しい酵素の開発が期待される。この様な目的で、我々は*Absidia corymbifera* IFO 8084の α -ガラクトシダ-ゼ遺伝子をcDNAクローニングによって取得し、その塩基配列を決定した。取得したcDNAは2,190bpからなり、730アミノ酸残基をコードし、そのタンパク質の分子質量は82,712Daと決定された。推定アミノ酸配列の分析結果、*Absidia corymbifera* IFO 8084の α -ガラクトシダ-ゼの構造が4量体であることが明らかになった。この α -ガラクトシダ-ゼ遺伝子の推定アミノ酸配列を既知の α -ガラクトシダ-ゼ遺伝子と比較したところ、family 36と高い相同性を示した。

近年、遺伝子組換え技術の目覚ましい進展により、種々の宿主-ベクター系を利用し、組換えタンパク質を大量に産生させることが可能になっている。その中でも、大腸菌を宿主とする発現系は菌体の増殖速度が早く、大量培養が簡単であり、何よりも組換えタンパク質を大量に産生するため、工業的にみても非常に魅力的なタンパク質生産システムである。従って、我々は大腸菌を宿主として選び、*Absidia corymbifera* IFO 8084から取得した α -ガラクトシダ-ゼcDNAの大量発現を試みた。 α -ガラクトシダ-ゼcDNAを大腸菌用発現ベクター-pET21b(+)のファージ由来の強力なT7プロモータ下流に挿入し宿主大腸菌BL21(DE3)株より供給されるT7RNAポリメラーゼにより転写させた。しかし、この発現プラスミドpET21(b+)/gal α による α -ガラクトシダ-ゼの菌体タンパク質の20%にも及ぶ大量発現が見られたが全ての発現タンパク質は細胞内で不溶性の封入体を形成し酵素活性は見られなかった。そこで不溶性の封入体を回収し、8Mの尿素で可溶化後、段

階的に透析の尿素濃度を低下させ、可溶化の再生を試みたが、 α -ガラクトシダーゼの活性は見られなかった。

そこで我々は可溶性発現タンパク質を得るためにcDNAを大腸菌用発現ベクタ-pET32-EK/LICのthioredoxin配列の下流に挿入し、融合タンパク質発現系を構築した。構築した発現ベクタ-pET32Trx/gal α を大腸菌に形質転換したところ、融合タンパク質の大量発現が確認された。さらにベクタ-由来のhistidine tagを利用したアフィニティ-クロマトグラフィーにより一段階で単一酵素として精製された。精製酵素の融合タンパク質をenterokinaseによって切断し、本酵素のN末端配列を決定したところ、native酵素のN末端配列と同じであった。精製した融合タンパク質のpHと温度に対する挙動は、*Absidia corymbifera* IF0 8084からの精製酵素とほぼ同じであった。

さらにこれらの知見を基に、活性部位の解明と変異株の作成によるラフィノースの合成をさらに効率よく行う優れた新しい酵素の開発が期待できる。

学位論文審査の要旨

主査 教授 富田 房 男

副査 教授 横田 篤

副査 助教授 浅野 行 蔵

学位論文題名

Raffinose Synthesis by α - Galactosidase from *Absidia corymbifera* IFO 8084

(*Absidia corymbifera* IFO 8048 由来 α - ガラクトシダーゼによる
ラフィノースの合成)

ラフィノースは難消化性オリゴ糖の一種であり、特にビフィズス菌に選択的に資化されやすく、腸内フローラの改善に有効であることが明らかになってきた。また、アトピー皮膚炎への影響が疑われるカンジダ菌を有意に減少させ、ラフィノースの経口投与が有効な治療手段になりうるということが明らかになった。その他、肝障害（B型肝炎）の抑制、多型核白血球（好中球）の貪食作用や、マイトジェン（PHA）の刺激による非特異的Tリンパ球幼若化反応を亢進する事などが報告されている。また、臓器移植の際の臓器保存液として有効である。このように、生理調節機能性糖質としての役割だけでなく多方面でのラフィノースの利用価値が増加し続けている。

ラフィノースは現在、工業的にはスクロースの原料であるビート糖蜜からの抽出により製造されているが、ビートの中に含まれているラフィノースの含量は0.1%程度と極めて微量であり、比較的高価なオリゴ糖である。そこで、酵素合成法によって有用なラフィノースをより簡単かつ低コストで生産することが望まれている。ラフィノースは糖転移酵素であるガラクトシルトランスフェラーゼによって特異的に合成することが既に可能であるが、基質であるUDP-galactoseが非常に高価であり、またこの酵素自体が不安定な性質を持っているため、この方法によるラフィノースの合成は現実的に不可能である。一方、加水分解酵素である α -ガラクトシダーゼはスクロースの結晶化に悪影響を与える有害物質としてのラフィノースを除去するため使われてきたが、この酵素の縮合反応、即ちラフィノースの分解産物であるスクロースとガラクトースを基質とした逆反応を利用し、ラフィノースを合成出来る可能性がある。さらに、最近消費が減少し続けている安価なスクロースを利用し、経済的に付加価値が高いラフィノースを創出できるという有望な方法である。しかし、一般的に逆反応でオリゴ糖を合成する場合、転移反応を利用して合成する時に比べて反応速度が遅いた

め、大量の酵素で長時間反応させる必要性が予想される。また、特異性が低下し、生成物は種々の結合様式のオリゴ糖の混合物になる可能性がある。従って、オリゴ糖の合成に逆反応を行うためにはより高い特異性を持っている加水分解酵素の利用とその酵素を大量に得る必要が当面課題になってくる。

申請者はこのような観点から有用なラフィノースをより経済的かつ高特異的に生産するためには、*Absidia corymbifera* IFO 8084の α -ガラクトシダーゼがこのように目的に適したことを確認した。即ち、逆反応を引き起こすため受容体として高濃度のスクロース（70%）と、特異性を高めるために供与体として低い濃度の α -D-ガラクトース（10%）を採用した反応系を構築し、ラフィノースの合成を試み、10%程度の転換率を得た。この転換率はAjisakaらによって報告された転換率よりやや少ないものであるが、本酵素の方が高い特異性を持ち、より立体選択的にラフィノースを合成することが分かった。

しかし、糸状菌である*Absidia corymbifera* IFO 8084 が生産する α -ガラクトシダーゼの分泌量は非常に少ないため、安定したラフィノースの大量生産を実用化させるためにはより簡単、且つ大量にこの酵素を得ることが必要である。さらに、分子レベルでの解析と改変を通して一層逆反応の機能を強化した新しい酵素の開発が期待される。この様な目的で、申請者は*Absidia corymbifera* IFO 8084の α -ガラクトシダーゼ遺伝子をcDNAクローニングによって取得し、その塩基配列を決定した。取得したcDNAは2,190bpからなり、730アミノ酸残基をコードし、そのタンパク質の分子量は82,712Daと決定された。推定アミノ酸配列を分析した結果、*Absidia corymbifera* IFO 8084の α -ガラクトシダーゼの構造は4量体であることが明らかになった。そこで可溶性発現タンパク質を得るためにcDNAを大腸菌用発現ベクタ-pET32-EK/LICのthioredoxin配列の下流に挿入し、融合タンパク質発現系を構築し、発現ベクタ-pET32Trx/gal α を大腸菌に形質転換したところ、融合タンパク質の大量発現が確認された。さらにベクター由来のhistidine tagを利用したアフィニティークロマトグラフィーにより一段階で単一酵素として精製された。精製酵素の融合タンパク質をenterokinaseによって切断し、本酵素のN末端配列を決定したところ、native酵素のN末端配列と同じであった。精製した融合タンパク質のpHと温度に対する挙動は、*Absidia corymbifera* IFO 8084からの精製酵素とほぼ同じであった。今後はこれらの知見を基に、活性部位の解明や変異の導入によるラフィノースの合成により適した新しい酵素の開発が期待できる。このように本論文はラフィノースの工業的製法に新たな手法を提供する価値が有るものと評価される。

よって審査員一同は、白桑好が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。