

スクロースホスホリラーゼによる  
糖質異違物質の合成

1994

北尾 賢

寄	贈
北	平成
尾	年
悟	月
氏	日

スクロースホスホリラーゼによる  
糖質関連物質の合成

北 尾 悟

## 目次

緒論	.....	1
第1章 <u>Leuconostoc mesenteroides</u> 由来のスクロースホスホリラーゼ 遺伝子のクローニングと大腸菌における発現	.....	8
緒言	.....	8
第1節 実験材料および方法	.....	9
第2節 結果および考察	.....	13
(1) 遺伝子のクローニング	.....	13
(2) 遺伝子構造の解析	.....	16
(3) スリーパーベクターによる大腸菌での高発現	.....	18
(4) 遺伝子産物の解析	.....	21
第3節 要約	.....	25
第2章 スクロースホスホリラーゼによる中性オリゴ糖の合成	.....	29
緒言	.....	29
第1節 実験材料および方法	.....	30
第2節 結果および考察	.....	32
(1) 逆反応における各種糖類の受容体特異性	.....	32
(2) グルコシルキシリトールの合成と性質	.....	34
a. 分取		
b. 構造解析		
c. 虫菌予防効果		
(3) コージビオースとニゲロースの合成	.....	40
a. 分取		

b. 構造解析	
c. 基質の組み合わせによる生成条件	
d. 反応の経時変化	
第3節 要約	..... 46
第3章 スクロースホスホリラーゼによるフェノール化合物配糖体の合成	..... 49
緒言	..... 49
第1節 実験材料および方法	..... 50
第2節 結果および考察	..... 52
(1) 受容体特異性	..... 52
(2) ハイドロキノンを受容体とする配糖体の合成	..... 53
a. 反応条件	
b. 分取	
c. 構造解析	
d. 性質の検討	
第3節 要約	..... 64
第4章 スクロースホスホリラーゼによるカテキン類配糖体の合成	..... 65
緒言	..... 65
第1節 実験材料および方法	..... 65
第2節 結果および考察	..... 67
(1) 受容体特異性	..... 67
(2) (+)-catechinを受容体とする配糖体の合成	..... 68
a. 反応条件	

b. 分取	
c. 構造解析	
d. 性質の検討	
(3) (-)-epigallocatechin gallateを受容体とする配糖体の合成	..... 78
a. 反応条件	
b. 分取	
c. 構造解析	
d. 性質の検討	
第3節 要約	..... 88
第5章 スクロースホスホリラーゼによるフラノン化合物配糖体の合成	..... 92
緒言	..... 92
第1節 実験材料および方法	..... 92
第2節 結果および考察	..... 93
(1) 受容体特異性	..... 94
(2) 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanoneを 受容体とする配糖体の合成	..... 94
a. 分取	
b. 構造解析	
c. 性質の検討	
第3節 要約	..... 96
第6章 スクロースホスホリラーゼによるピロン化合物配糖体の合成	.....102
緒言	.....102
第1節 実験材料および方法	.....102

第2節	結果および考察	……103
	(1) 麴酸を受容体とする配糖体の合成	……103
	a. 反応条件	
	b. 分取	
	c. 構造解析	
	d. 性質の検討	
第3節	要約	……107
第7章	糖質関連物質の生産モデル系の構築	……112
	緒言	……112
第1節	実験材料および方法	……112
第2節	結果および考察	……113
	(1) 基質および生成物の経時変化	……113
	(2) 有機溶媒の検討	……113
	(3) 吸着樹脂の検討	……115
	(4) 連続生産とモデル系の構築	……115
第3節	要約	……122
	総合考察	……123
	引用文献	……127
	謝辞	……137

略語

BAD	: benzoic acid
BAL	: benzyl alcohol
BHI	: brain heart infusion
C	: (+)-catechin
CG	: transfer product, (+)-catechin 3'- <u>Q</u> - $\alpha$ - <u>D</u> -glucopyranoside
CGTase	: cyclodextrin glucanotransferase
DHB	: dihydroxybenzene
DHBAD	: dihydroxybenzoic acid
DMSO	: dimethylsulfoxide
<u>L</u> -Dopa	: L- $\beta$ -3,4-dihydroxyphenylalanine
EC	: (-)-epicatechin
ECg	: (-)-epicatechin gallate
EGC	: (-)-epigallocatechin
EGCg	: (-)-epigallocatechin gallate
EGCgG-1	: transfer product, (-)-epigallocatechin gallate 4'- <u>Q</u> - $\alpha$ - <u>D</u> -glucopyranoside (G-1)
EGCgG-2	: transfer product, (-)-epigallocatechin gallate 4',4''- <u>Q</u> - $\alpha$ - <u>D</u> -di- glucopyranoside (G-2)
EMFG	: transfer product, 2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2H)-furanone 4- <u>Q</u> - $\alpha$ - <u>D</u> - glucopyranoside
G-1-P	: $\alpha$ - <u>D</u> -glucose-1-phosphate
G-6-P	: <u>D</u> -glucose-6-phosphate
GS	: glucan synthesizing enzyme

G-X	: transfer product, 4- <u>Q</u> - $\alpha$ - <u>D</u> -glucopyranosylxylitol
HB	: hydroxybenzene, phenol
HBAD	: hydroxybenzoic acid
HBAL	: hydroxybenzyl alcohol
HDMF	: 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3 (2H)-furanone
HEMF	: 4-hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2H)-furanone
HQ	: hydroquinone
HQG	: transfer product, hydroquinone <u>Q</u> - $\alpha$ - <u>D</u> -glucopyranoside
KA	: kojic acid
KAG1	: transfer product, kojic acid 5- <u>Q</u> - $\alpha$ - <u>D</u> -glucopyranoside
KAG2	: transfer product, kojic acid 7- <u>Q</u> - $\alpha$ - <u>D</u> -glucopyranoside
IPTG	: isopropyl- $\beta$ - <u>D</u> -thiogalactoside
NAD	: nicotinamide-adenine dinucleotide
NADP	: nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate
NMR	: nuclear magnetic resonance
Pi	: inorganic phosphate
SIMS	: secondary ion mass spectrometry
SPase	: sucrose phosphorylase
THB	: trihydroxybenzene
THBAD	: trihydroxybenzoic acid



## 緒論

本研究は、スクロースを加磷酸分解する酵素であるスクロースホスホリラーゼ (SPase, EC 2. 4. 1. 7) をコードする遺伝子のクローニングと大腸菌を宿主とする大量発現による本酵素の調製法に端を発し、当該酵素の糖転移能を利用したオリゴ糖・配糖体など、糖質関連物質の合成に関する基礎および応用研究を目的として行ったものである。

近年、糖質工学技術の進展により糖質関連物質が注目されるようになってきている。その中で、グリコシル結合に関与する糖質関連酵素が、これらの合成・変換・分解などに関する研究や物質生産の道具として重要な役割を果たしている。これらの酵素の中で、加水分解酵素については基礎・応用両面から多くの研究がなされてきた。特に、アミラーゼは澱粉糖化など広く工業的に使用された背景があり研究が発展してきた経緯がある<sup>1)</sup>。これに対し、加磷酸分解酵素は、グリコーゲンあるいはスターチのホスホリラーゼ (EC 2. 4. 1. 1) を除けば、加水分解酵素と比較すると研究が非常に少ない。

後述するように、最近、オリゴ糖や配糖体などの生理機能についての研究が増えており、オリゴ糖については数種の加水分解酵素を用いて工業的に製造されるようになった。これらの工業生産には酵素が重要な役割を果たしており、加水分解酵素の新たな応用面として注目されている。一方、加磷酸分解酵素も糖質関連物質生産に有利な酵素と思われるが、現状では工業的に利用されていない。Kitaokaらによって、セロピオースホスホリラーゼ (EC 2. 4. 1. 20) やラミナリピオースホスホリラーゼ (EC 2. 4. 1. 31) を用いてセロピオース<sup>2)</sup>やラミナリオリゴ糖<sup>3)</sup>を、また、Takahashiらによって、SPaseを用いてグルコシルキシロース<sup>4)</sup>を工業生産する可能性を示したに過ぎない。

このような状況の中、二糖類加リン酸分解酵素で比較的研究されていたSPaseに関する本研究に着手した。以下にまずSPaseに関する今までの研究の流れやオリゴ糖合成などの応用研究について述べる。そして、これまでのオリゴ糖や配糖体の応用研究についてもその背景も含めて俯瞰し、本研究の目的について記述する。

従来知られている糖類のグルコシル結合を加リン酸分解する酵素は、全て、糖の非還元末端のグルコシル結合のみを切断し、切断されたグルコースにリン酸基を付与した $\alpha$ -あるいは $\beta$ -型のグルコース-1-リン酸とアクセプター分子に分解する可逆反応を触媒する。このうちSPaseは、次式に示すように、スクロースと無機リンからグルコース-1-リン酸 ( $\alpha$ -型) とフラクトースを生成する反応、またはその逆反応を触媒する酵素である。

$$\text{sucrose} + \text{inorganic phosphate (Pi)} \rightleftharpoons \alpha\text{-D-glucose-1-phosphate (G-1-P)} + \text{D-fructose}$$
二糖類加リン酸分解酵素には、SPaseや上述のセロビオースホスホリラーゼ、ラミナリビオースホスホリラーゼ以外にマルトースホスホリラーゼ (EC 2. 4. 1. 8) とトレハロースホスホリラーゼ (EC 2. 4. 1. 64) が見いだされている。SPaseのみヘテロ二糖を加リン酸分解し、他のホスホリラーゼは全てグルコース二糖の分解酵素である。また、二糖のグルコシドのアノマー型と生成するG-1-Pのアノマー型からの分類においてSPaseのみ同じ $\alpha$ -型を保持するのに対し、他の四つの加リン酸分解酵素とは異なっている<sup>5)</sup>。

SPaseは、Leuconostoc mesenteroidesにその活性が最初に見いだされ<sup>6)</sup>、その後、Pseudomonas saccharophila<sup>7,8)</sup>, P. putrefaciens<sup>9)</sup>, Clostridium pasteurinum, Acetobacter xylinumやPullularia pullulans<sup>10)</sup>などの原核微生物が産生することが知られている。同酵素は、SilversteinらによりP. saccharophila由来から最初に精製され、二量体構造をもつことが推定された。また、酵素反応機構の解析の結果、典型的なping pong型であることが明らかとなった<sup>11)</sup>。L. mesenteroides由来の酵素

の精製と性質の検討は、Kogaらにより報告され、*P. saccharophila*由来の酵素とは異なり単量体構造であることが示された<sup>12)</sup>。Ferrettiらにより *Streptococcus mutans* 由来のグルコシルトランスフェラーゼの一つと考えられてクローニングした *gfA* 産物<sup>13)</sup>が、実際はSPaseであったことが Russellらにより報告された<sup>14)</sup>。その塩基配列から、*S. mutans*由来の酵素の分子量は55,665と決定された。

現在までの本酵素の実用的な応用の試みとしては、オリゴ糖の合成がまず挙げられる。Doudoroffらは逆反応を利用してG-1-Pとフラクトースからスクロースの *in vitro*合成をはじめて報告した<sup>7)</sup>。また基質特異性が必ずしも厳密でないことを利用して、グルコシルソルボサイド、グルコシルキシロサイド、あるいは、グルコシルアラビノサイドの合成が示された<sup>15)</sup>。Palleroniらは、グルコシルラムニユロサイドの合成について示した<sup>16)</sup>。これらのオリゴ糖合成の研究は、主に *P. saccharophila*由来の酵素を用いて精力的に進められてきた。他由来の酵素については、*P. saccharophila*由来の酵素と単に比較する形で *P. putrefaciens* と *L. mesenteroides*由来の酵素を用いた合成が簡単に示されているに過ぎない<sup>17)</sup>。しかも、その当時の実験手法としては、反応で副生する無機リンの確認を指標としており、直接オリゴ糖産物の定量はされていない。Daurat-Larroqueらは、ホスホリラーゼとSPaseの反応を組み合わせることで澱粉を原料としたスクロースの合成を示した<sup>18)</sup>。また、Waldmannらは、SPaseの加リン酸分解反応で生成するG-1-Pをプライマーとするアミロース合成法を提示した<sup>19)</sup>。また、単にG-1-Pとフルクトースの生産に関する報告もある<sup>20)</sup>。

分析化学の観点から、Birnbergらは、SPase、ホスホグルコムターゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの反応を組み合わせることによるスクロースの定量法を開発した<sup>21)</sup>。同様の視点から無機リンの定量法も提案されている<sup>22)</sup>。この無機リンの定量は臨床検査の分野で実用化されており、血中・尿中のリン濃度は腸管からの吸収、体内利用とリン酸化合物の異化、腎からの排泄に関連した各種の疾患、

例えば腎不全やビタミンD欠乏症などで変動することが知られることより、その用途が急速に広まってきている。なお、SPaseIに関して、いくつかの優れた総説がある<sup>10,23,24</sup>。

オリゴ糖は炭水化物の構成単位である単糖が一般に2分子から10分子程度グリコシド結合した構造を有する化合物である。従来、スクロース等のオリゴ糖は、栄養素、食べてカロリーになるという一次機能、または、甘味を目的とした二次機能として利用してきたが、近年、生体調節機能と呼ばれる三次機能が叫ばれるようになって、新たな食品および医薬品素材として考えられるようになった。機能性からオリゴ糖を分類すると(1)低エネルギー性、(2)インスリン節約性、(3)腸内細菌叢改善性、(4)難う蝕性などが挙げられる<sup>25</sup>。

近年、種々の糖加水分解酵素や糖転移酵素の検索、それら酵素の作用機作の解明、異性化糖製造などに見られる酵素利用技術の進歩、各種クロマトグラフィーを利用したオリゴ糖の大量分画技術の著しい進歩と相まって、酵素合成(縮合・転移)による高純度のオリゴ糖が大量かつ安価に調製できるようになり、新しく食品・医薬品工業の分野に原料素材として供給され始めている<sup>26,27</sup>。その代表例としてフラクトオリゴ糖、カップリングシュガー、パラチノースなどが挙げられる<sup>28</sup>。

環状構造をとる糖がそのヘミアセタール水酸基(カルボニル基)で、その水素原子が他のアルコール性またはフェノール性水酸基をもつ化合物と置換して環状アセタールを形成したものを配糖体(グリコサイド)と呼ぶ。配糖体は自然界に広く分布しており、その大部分は植物界に存在し、ほとんどは $\alpha$ -配糖体である。この $\alpha$ -配糖体は、酸または酵素によって容易に加水分解され、糖とアグリコンになる。糖のヘミアセタール水酸基の向きによって配糖体には $\alpha$ -と $\beta$ -型があるが、天然の配糖体はほとんど $\beta$ -型で、それらは種々の $\beta$ -グリコシダーゼによって水解される。

配糖体の合成法としては、まず化学合成法が挙げられるが、複雑な工程を要求される。オリゴ糖合成で触れたように酵素機能を活用した方法が注目されてきている（広義の意味でオリゴ糖も配糖体である）。糖を付与することにより、ある生理活性物質（アグリコン）の物性の改善、例えば安定化や水に対する溶解性を向上させることや、新たな機能発現を目的とする研究報告が増えている。その代表的な事例としてアスコルビン酸（ビタミンC）の安定化した配糖体を  $\alpha$ -グルコシダーゼ<sup>29)</sup>やサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ（CGTase）<sup>30)</sup>により合成したことが挙げられる。これらの酵素により合成された2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸は、アスコルビン酸の2位の水酸基がグルコース1分子で $\alpha$ 置換されたもので、直接の還元活性を示さず、熱および酸化に対して安定である<sup>31)</sup>。また、細胞や生体に投与されると、そこに存在する $\alpha$ -グルコシダーゼによって還元型アスコルビン酸とグルコースに分解され、アスコルビン酸と同様の生理活性を発揮する<sup>32)</sup>。CGTaseを用いた量産技術も確立しており<sup>30)</sup>、アスコルビン酸研究の基礎・応用にわたる新たな展開が期待される。今後、有用な各種糖質関連酵素が数多く見いだされれば、アスコルビン酸以外でも配糖化が期待される生理活性物質の開発が進むと思われる。

上述の研究背景から、

ア、無機燐定量用酵素としてのSPaseの工業レベルでの大量発現菌株の作製

イ、実用化が期待される新しい糖転移酵素源としてのSPaseによるオリゴ糖および配糖体など糖質関連物質の合成

などを追求し、これらの問題が解決できれば、品質の良い本酵素の安定な供給と無機燐定量用以外の新たな用途開発につながり、また、新たに合成された素材の利用価値を追求することが、食品・医薬・化粧品・化成品産業上意義のあることと考え、以下の研究を行った。

第1章では、SPaseの由来として一番生産量が高いとされている乳酸菌L. mesenteroidesを選択し、精製酵素アミノ酸配列に基づくDNAプローブを用いて、ライブラリーより遺伝子をクローニングした。また、スリーパーベクターに当該遺伝子を導入し、大腸菌における高発現株を作製した。また、塩基配列の解析の結果、一次構造を明らかにした<sup>33)</sup>。

第2章では、G-1-Pを糖供与体、各種糖類を受容体としたとき、逆反応の特異性を詳細に調べ、従来知られている糖質以外の化合物も受容体となり得ることを示した。特に、5炭糖のアルコールへの転移効率が良く、この中のキシリトールを受容体とした場合の転移産物の構造解析を行ない、その虫歯予防効果を検討した<sup>34)</sup>。また、スクロースを受容体としたときの転移産物の構造解析を行ない、希少グルコ二糖であるコージビオース、ニゲロースが生成されることを見いだした<sup>35)</sup>。

第3章では、スクロースを糖供与体、各種フェノールおよびその関連化合物を受容体としたときの特異性を詳細に調べ、本酵素は、正方向の糖転移反応においてフェノール性水酸基に対して幅広く転移することを見いだした。特に、官能基に隣接してフェノール性水酸基を有する化合物に対して転移効率が高いことが判明した。また、ハイドロキノンを受容体としたときのアルブチン様転移産物の構造解析を行ない、その産物の性質の検討を加えた<sup>36)</sup>。

第4章では、スクロースを糖供与体、ポリフェノール化合物であるカテキン類を受容体としたときの特異性を調べ、全てのカテキン類が受容体となり得ることを明らかにした<sup>37)</sup>。そして(+)-catechinや(-)-epigallocatechin gallateを受容体としたときの転移産物の構造解析を行ない、その特質について調べた。特に、配糖化することにより、水に対する溶解性向上や安定化とともに、アグリコンであるカテキンにはない酵素活性阻害能を新たに発現したことは興味ある知見である。

第5章では、スクロースを糖供与体、フェノール性フラノン類を受容体とした

ときの特異性を調べた。醤油の香気成分である4-hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2H)-furanone (HEMF) を受容体としたときの転移産物の構造解析を行ない、その性質の検討を行なった。この中で配糖化することによって、物性の改善が計られたことは興味ある知見である。

第6章では、スクロースを糖供与体、アルコール性水酸基とフェノール性水酸基両方をピロン環に有する麴酸を受容体とした場合の転移産物の構造を調べ、転移産物の性質について若干の検討を加えた<sup>38)</sup>。

第7章では、SPaseを用いて各種オリゴ糖・配糖体を効率良く合成させ工業規模生産を実施するための条件検討を、スクロースを供与体、(+)-catechinを受容体とした場合で行ない、その生産システムの可能性を検討した。特に、有機溶媒や吸着樹脂の検討や半連続生産の条件検討を行ない、モデル系を構築した。

SPase遺伝子をクローン化し、スリーパーベクターによる大腸菌での大量発現を可能としたことにより、精製工程の簡略化や純度向上につながった。また、本酵素の糖転移反応に着眼し、オリゴ糖・配糖体などの糖質関連化合物の合成法を確立し、食品・医薬品・化粧品・化成品などの素材として応用し得ることを示唆し、新しい製造技術に向けての一途を拓いた。

## 第1章 Leuconostoc mesenteroides由来のスクロースホスホリラーゼ遺伝子のクローニングと大腸菌における発現

### 緒言

SPaseは、スクロースを加磷酸分解してG-1-Pとフラクトースを生成する反応、あるいはその逆反応を触媒する酵素である。近年、無機燐定量用として腎不全やビタミンD欠乏症などの臨床検査における診断用として、急速にその用途が広がってきている<sup>22)</sup>。本酵素を産生する微生物のなかで最も生産量が高いとされているのが、L. mesenteroidesである<sup>17)</sup>。しかし、このL. mesenteroidesから酵素を得る場合でも、生産性が低い、培養時に蓄積するデキストランやマンニトールのため精製しづらい、無機燐のnicotineamide-adenine dinucleotide (NADH) 定量系の妨害酵素であるNADHオキシダーゼあるいは6-ホスホグルコン酸脱水素酵素の除去が困難であることなど、問題点が山積していた。

このような背景から、デキストランや妨害酵素の問題の少ない大腸菌による高度生産を行うために、乳酸菌L. mesenteroidesからSPase遺伝子をクローニングすることにした。

クローニングした遺伝子を大腸菌で発現させるベクターとして、一般にはその取り扱い易さからプラスミドベクターが使用されることが多い。しかし、本研究では工業規模での大量培養時の安定性を考慮して、スリーパーベクターと命名したファージベクターを使用した<sup>39)</sup>。本研究で用いたスリーパーベクターslp501 $\Delta$ -Tcの特徴を述べる<sup>40)</sup>。まず、EcoRIあるいはKpnIの制限酵素部位がファージの形態形成に関する後期遺伝領域の両端に存在し、制限酵素処理によりこの領域を除去することにより、約7-20Kbの長さに及ぶ外来遺伝子を導入することができる。したがって、数Kbからなる目的遺伝子ならば複数個挿入することにより、一層の発現量増大を期待することができる。また、この領域は $\phi 80$ の主要コート蛋白



質 (No.20) の構造遺伝子に存在する<sup>41)</sup>ので、作製した組換えファージは完全なファージ粒子を作れなくなり伝達性がなく安全である。通常、溶原ファージとして、宿主染色体中に安定に保持され、誘発によって短時間のうちに数百コピーに増幅することから、工業生産 (特に食品・医薬品工業) に用いるベクターとして好適である。

スリーパーベクターによる外来遺伝子発現の試みは、Koyamaらのグリセロキナーゼ<sup>42)</sup>、クレアチナーゼ、およびザルコシンオキシダーゼ遺伝子が代表として挙げられるが、特にクレアチナーゼ、ザルコシンオキシダーゼについては各々、菌体内蛋白質の約60%および30%の生産量を示し<sup>43)</sup>、精製工程の簡略化、標品の純度向上につながった。今回、同じスリーパーベクターを用いてSPase遺伝子の大量発現を試みた。

## 第1節 実験材料および方法

### 1. 使用菌株・プラスミド・ファージ

Table Iに示す。用いた大腸菌はすべて *Escherichia coli* K-12株である。

### 2. 培地および培養方法

培地はTable IIに示す。

*L. mesenteroides*の培養はACI-B培地<sup>23)</sup>で30℃静置にて行った。大腸菌の培養はLB培地で、溶原菌の場合は30℃ (固体培養) または32℃ (液体培養) で行い、非溶原菌は37℃で行った。生育はKlett Summerson光電比色計でNo.66フィルターを用いて測定した (Klett unit, KUと表示)。溶原菌の酵素活性を測定するための培養は通常次のように行った。まず3 ml LB培地が入った試験管で30℃一晩静置培養し、10 ml LB培地が入った三角フラスコに0.5ml接種した。初め32℃で振盪培養し、適当な時期 (KU=100) に43℃の水槽に移し、20分間振盪して誘発をかけ、その後32℃の水槽に戻しさらに6時間振盪を続けた。

Table I. Strains, plasmids, and phage used in this study

Strain, plasmid, or phage	Genotype, phenotype, or marker
<u>Escherichia coli</u> K-12	
DHI	F <sup>-</sup> <u>recA1</u> <u>endA1</u> <u>gyrA96</u> <u>thi</u> <sup>-1</sup> <u>hsdR17</u> <u>supE44</u> <u>relA1</u>
JM101	Δ(lac-pro) <u>thi</u> <sup>-1</sup> <u>lacI</u> <sup>q</sup> ZΔM15
1100	F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> <u>supE44</u> <u>thi</u> <sup>-1</sup> <u>endA1</u>
<u>Leuconostoc mesenteroides</u> ATCC 12291	
Plasmids	
pBR322	Tc <sup>r</sup> Amp <sup>r</sup>
pUC119	Amp <sup>r</sup>
Phage	
slp 501S-Tc	λ <u>cl857</u> att λ <u>Sam7</u> Tc <sup>r</sup>

Table II. Media used in this study

ACI-B	Tryptone 1%, yeast extract 1%, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.5%, sucrose 1%, vitamine solution*1%, CH <sub>3</sub> COONa 2%
Luria-Bertani(LB)	Tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1.0%

\*Vitamine solution: Thiamine-HCl 0.1%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 4.0%, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1%, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 2.0%, ascorbic acid 0.5%.

### 3. 試薬

制限酵素と修飾酵素は、宝酒造あるいはベーリンガーマンハイム山之内より購入した。ホスホグルコムターゼはベーリンガーマンハイム山之内、G-6-P脱水素酵素はオリエンタル酵母製をそれぞれ用いた。Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) は和光純薬から購入した。その他の試薬は特級レベルを用いた。

### 4. 染色体DNAの調製

*L. mesenteroides* ATCC12291株の染色体DNAの調製は、基本的には、Saito-Miura法<sup>44)</sup>に従って行った。すなわち、1リットルのACI-B培地で30℃で静置培養を行った後、集菌し、それを洗浄した。その後4 mlのリゾチーム溶液 (2 mg/ml in 0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0) に懸濁し、室温で30分間放置した。次に、24 mlの0.1M Tris-HCl (pH 8.9) -1% SDS-0.1 M NaClを加え、60℃で10分間加熱した。さらに、1.5 mlの5 mg/ml濃度のPronase Pを加え、37℃で一晩放置した。フェノール処理を行ない蛋白を除いた後、エーテルを加えフェノールを除去した。その後、2倍量のエタノールを加え、生じた沈澱をガラス棒に巻き付け、70%エタノールで洗浄、減圧乾燥した後、5 mlの10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7.5) に懸濁した。

### 5. 遺伝子ライブラリーの作製とスクリーニング

二種類の制限酵素EcoRI, Sau3AIを用いて、各々遺伝子ライブラリーを作製した。EcoRIライブラリーは20  $\mu$ gの*L. mesenteroides* ATCC12291染色体DNAと2  $\mu$ gのpBR322をEcoRIで切断した後、T4 DNAリガーゼ処理して作製した。大腸菌DH1を形質転換した後、EcoRIライブラリーは最終濃度100  $\mu$ g/mlのアンピシリンと10  $\mu$ g/mlのテトラサイクリンを含むLB寒天培地に塗布した。Kogaらによって判明した*L. mesenteroides*由来の酵素のN末端アミノ酸配列 Met-Glu-Ile-Gln-Asn-Lys<sup>12)</sup>に対応する24通りのDNA塩基配列 ATGG AA (or G) ATT (or C or A) CAA (or G) AAT (or C) AAをSystem 1 Plus DNA synthesizer (ベックマン) で合成し、T4

DNA polynucleotide kinase と  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  にて末端ラベルしたミックスプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングを行った。

Sau3AIライブラリーは、20  $\mu\text{g}$  の L. mesenteroides 染色体DNAと2  $\mu\text{g}$  の pBR322 を BamHI で切断した後、T4 DNAリガーゼ処理して作製した。EcoRIライブラリーと同様、大腸菌DH1を形質転換し、100  $\mu\text{g/ml}$  のアンピシリンを含むLB寒天培地に塗布した。このライブラリーは、EcoRIライブラリーで選択したプラスミド pSPL02の Sau3AI-EcoRI 0.34Kb断片をニックトランスレーション法によりラベル化したプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーションを行なった。

## 6. 遺伝子組換え技術

大腸菌の形質転換法、オリゴヌクレオチドDNAやDNA断片のラベル法、コロニーハイブリダイゼーション法、サザンブロット分析および *in vitro* packaging法などDNAの取り扱いについてはManiatisらの方法<sup>45)</sup>に従って行った。

## 7. 塩基配列決定法

塩基配列は dideoxy-chain termination法<sup>46)</sup>による7-DEAZA sequencing kit (宝酒造) と  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{dCTP}$  (アマシャム) を用いて決定した。

## 8. 酵素活性の測定法

酵素活性測定のために、10 ml培養ペレットを2 mlの50 mM phosphate buffer (pH 6.8) に懸濁し、ブランソン製ソニックセルディスラプターを用いた超音波処理 (output control-4, duty cycle-50%) により溶菌し、12,000 rpm 10分間遠心した上澄を酵素液として用いた。

ア、SPase 基本的にはSilversteinらの方法<sup>11)</sup>によった。すなわち、スクロースと無機燐を基質とし、酵素反応により生成する  $\alpha\text{-D-glucose-1-phosphate}$  (G-1-P) 量をホスホグルコムターゼと D-glucose-6-phosphate (G-6-P) 脱水素酵素の共存下で、nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidized form ( $\text{NADP}^+$ ) から生じる nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate reduced form (NADPH) 量を反映す

る340 nmを測定した。基本的な酵素反応液 (3.3 ml) の組成は、50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) , 140 mM sucrose, 1 mM EDTA-2Na, 150 mM MgCl<sub>2</sub> , 1 mg NADP<sup>+</sup>, 1 μg glucose-1,6-diphosphate, 100 μg phosphoglucosyltransferase, 20 units G-6-P dehydrogenase<sup>47)</sup>と20 μlの酵素液 (SPase) である。25℃で酵素反応を行なった後、340 nmの波長を測定した。1単位は上記条件における1分間に1 μmolのNADP<sup>+</sup>を減少させ、NADPHを生成させる酵素量として定義した。吸光係数は  $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  を用いて計算した。

イ、NADH オキシダーゼ NADHの減少により測定した。酵素反応液 (3.0 ml) は、100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) , 0.34 mgのNADHと100 μlの酵素液である。340 nmの減少を追跡した。1単位は、上記条件における1分間に1 μmolのNADHを減少させる酵素量として定義した。

ウ、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素 基本的には de Mossの方法<sup>48)</sup>に従った。すなわち、酵素反応液 (2.85 ml) は、100 mM glycylglycine buffer (pH 7.5) , 1.89 mgの6-phosphogluconate, 4.3 mgのNADと500 μlの酵素液である。340 nmの増加を追跡した。1単位は、上記条件における1分間に1 μmolのNADを減少させる酵素量として定義した。

## 9. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動<sup>49)</sup>

10 ml培養液から得られた大腸菌ペレットを2 mlの蒸留水に懸濁し、超音波処理した後、12,000 rpm 10分間遠心した上澄と等容量のサンプルバッファーを混合し、5分間沸騰させ、10 μlを4-20% gradient gel (第一化学薬品) に供した。Laemmliの緩衝液を用いて泳動した後、Coomassie Brilliant Blue (CBB) にて染色した。

## 第2節 結果および考察

### (1) 遺伝子のクローニング

L. mesenteroides ATCC 12291株の染色体DNAを各種の制限酵素で処理した後、

0.7% アガロースゲル電気泳動したものをサザンブロットした。その結果をFig. 1に示す。オリゴヌクレオチドプローブを用いた結果、PstI (9.5 Kb) , KpnI (9.0 Kb) , EcoRI (4.3 Kb) , BamHI (8.0 Kb) 付近の断片とハイブリダイズした。

SPaseは分子量が約 55,000であり、その構造遺伝子をカバーする領域は約1.5 Kbと算出されるので、EcoRIライブラリーを作製し、スクリーニングを開始した。

約10,000のアンピシリン、テトラサイクリン耐性コロニーから、1株だけオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズした。このクローニングされた領域の長さは約1.3 Kbであり、Fig. 1のgenomicサザンの結果と一致しなかった。塩基配列の結果から後で判明したことであるが、断片の一方がGAATTTの配列で切断されていた。このような認識部位で制限酵素が切断する活性をスター活性と呼ぶが、これは反応液の塩濃度が高いか、または酵素濃度が高いときに現れることがある。当初この1株だけしかスクリーニングできなかったので、この株の有するプラスミドpSPL02を出発材料とした。このpSPL02を有する大腸菌DHIを培養したが、当然のことながら、SPase活性は認められなかった。pSPL02の制限酵素地図を作製し (Fig. 2) 、クローン化された領域を一部塩基配列を決定したところ、HindIII-Sau3AI断片中にN末端が存在し、EcoRI認識部位が一番C末端側に位置することが判明した。N末端の位置と分子量から計算すると、C末端は約0.35 Kb程度足りないため、pSPL02挿入断片の一番C末端側の断片である約0.34 KbのSau3AI-EcoRI断片をニックトランスレーションによりラベルしたプローブとSau3AIライブラリーを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行った結果、プラスミドpSPL08を得た。このプラスミドは、プローブに用いた約0.34 KbのSau3AI-EcoRI断片を含む約2.0 Kbの*L. mesenteroides*由来の染色体DNASau3AI断片を有していた。この断片は、構造遺伝子のC末端側は勿論のこと、非翻訳領域も充分含有することが予想された。

全長を有するSPase遺伝子を取得するために、まずプラスミドpSPL08の約2.0

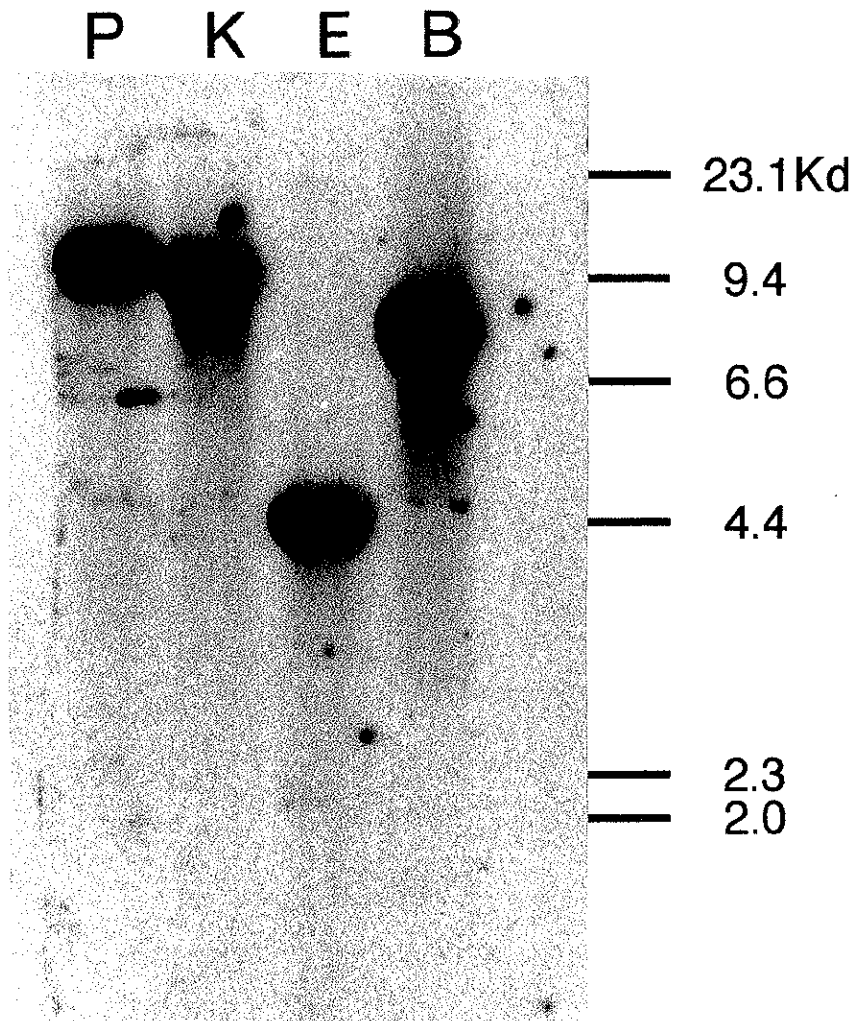


Fig. 1. Southern blot analysis of the chromosomal DNA from *L. mesenteroides* with the oligonucleotide probe.

The chromosomal DNA was digested with PstI (P), KpnI (K), EcoR I (E), or BamHI (B). The HindIII digested  $\lambda$  phage DNA was used as a M. W. standard.

KbのSau3AI断片を、プラスミドpUC119のBamHI部位に挿入したプラスミドpSPL09を構築した。次にプラスミドpSPL02のEcoRI-PstI断片（0.75 Kb）をプラスミドpSPL09のEcoRI-PstI断片（1.66 Kb）にすげ替えたプラスミドpSPL10を構築し、大腸菌DHIを形質転換した。この株を培養したところSPase活性が認められ、全長を有するSPase遺伝子を取得することに成功した。その活性値は、10 ml規模で振盪培養を37℃一晩行なった結果、培養液1 ml当たり約0.64単位であり、元株である*L. mesenteroides*とほぼ同程度であった。なお、*L. mesenteroides*からの遺伝子のクローン化は、本研究が最初の事例である。

さらに、活性値を上げるために、*lac*プロモーターによる発現を試みた。サザンブロットによるN末端の位置や分子量より、SPase遺伝子領域は、プラスミドpSPL10の約1.8 KbのHindIII断片上に存在することが予想されたため、このHindIII断片をプラスミドpUC119のHindIII部位に挿入して、プラスミドpSPL11を構築した。このプラスミドpSPL11を大腸菌JM101に形質転換し、1 mM IPTG存在下、10 ml規模で振盪培養を37℃一晩行ない、SPase活性を測定したところ、培養液1 ml当たり約19.75単位であり、*L. mesenteroides*より約30倍活性が高い組換え体を作製することができた。なお、IPTG非存在下での活性は、培養液1 ml当たり約0.87単位であった。一連のプラスミド構築の手順をFig. 2に示す。

## (2) 遺伝子構造の解析

プラスミドpSPL11の約1.8KbのHindIII断片の全塩基配列を決定した。

その結果、191番目のATGから1660番目のTAAの終止コドンで終わる唯一のopen reading frame (ORF) が存在し (Fig. 3)、このORFは490個のアミノ酸からなる分子量55,749と算出され、SDS-PAGEの結果とほぼ一致した。N末端から予想される30アミノ酸配列は先に精製酵素からアミノ酸シーケンサーから求められた配列 MEIQNKAMLITYADSLGKNLKDVLHQLKED<sup>12)</sup>と完全に一致し (Fig. 3、下線)、このORFがSPase遺伝子であることが確認された。開始コドンより上流



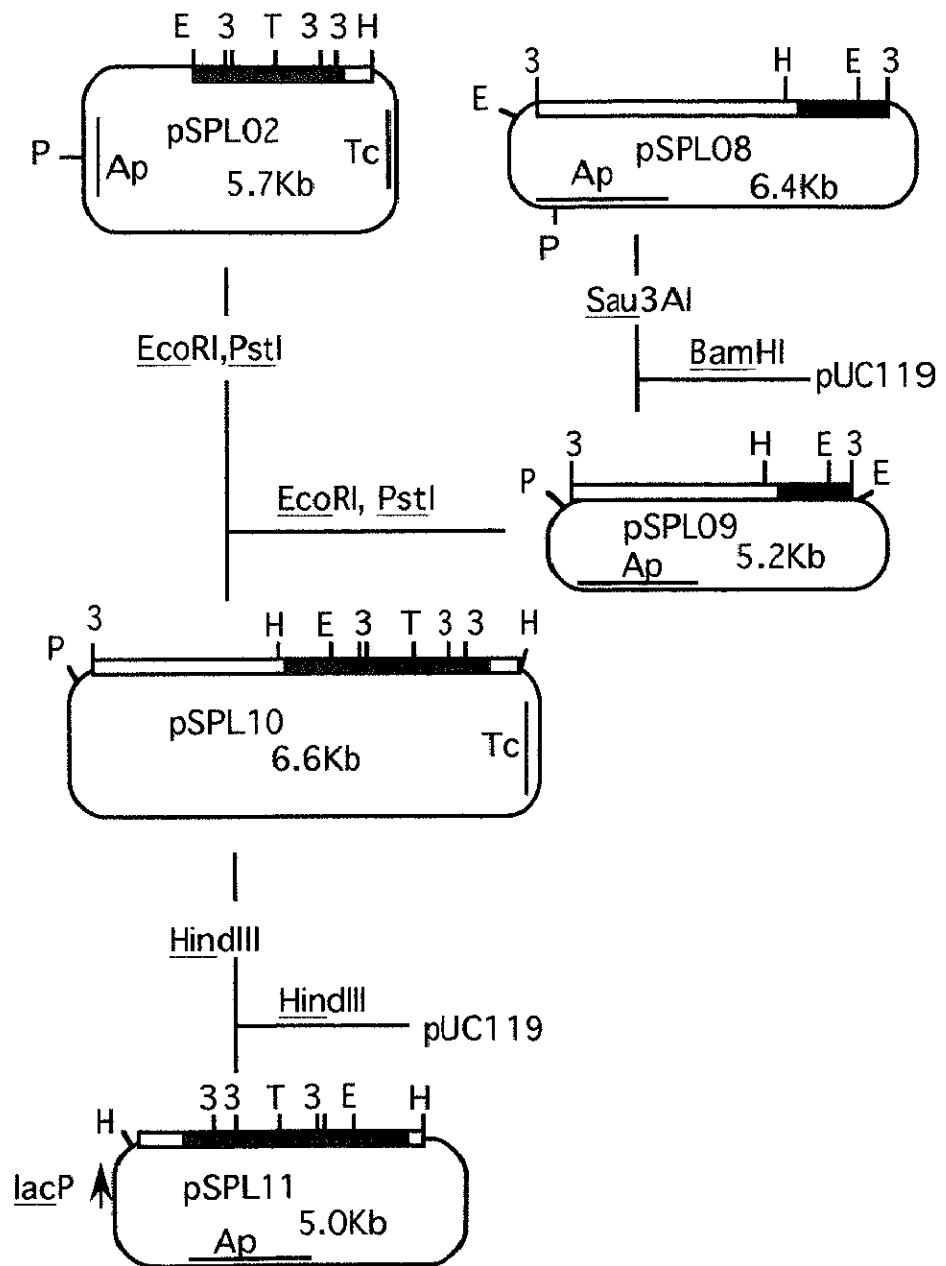


Fig. 2. Construction of plasmids for the expression of SPase.

Blackened segments show the coding region of the SPase gene, and open segments show its non-coding regions. Abbreviations: *lacP*, *lacZ* promoter of *E. coli*; Ap, ampicillin-resistance gene; Tc, tetracycline-resistance gene; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; P, *PstI*; T, *EcoT14I*; 3, *Sau3AI*.

8 bpにAGGAGの配列が存在し、リボソーム結合部位<sup>50)</sup>と予想される。しかし、その上流には乳酸菌や大腸菌で見られるプロモーター配列やORF下流にターミネーター配列は見いだされなかった<sup>51)</sup>が、プロモーターについては、プラスミドpSPL10を保持する大腸菌DH1が低いながらも活性を示したことから、存在すると思われる。

予想されるアミノ酸配列をホモロジー検索したところ、虫歯菌Streptococcus mutansのgfaA<sup>13)</sup>のコードする蛋白質と約68%という高い相同性を示した (Fig. 4)。このgfaAのコードする蛋白質は、最初不溶性グルカン合成酵素の一種とされていたが、後にスクロースを加リン酸分解する反応を触媒する、つまりSPaseであることが判明し<sup>14)</sup>、高い相同性を示すのは当然の結果と思われる。また、虫歯菌のS. mutansのgfaAはスクロース代謝の一経路をにない、スクロース代謝酵素群はオペロンを形成していることが知られており、L. mesenteroidesも同様な遺伝子構造をとっていることが予想される。今までクローニングされたSPase遺伝子はS. mutansとL. mesenteroides由来のものだけである。また、スクロースを基質とする他の酵素 (インベルターゼなど)<sup>52)</sup>や加リン酸分解を触媒する酵素 (グリコーゲンホスホリラーゼ)<sup>53)</sup>との相同性は見られなかった。

### (3) スリーパーベクターによる大腸菌での高発現

スリーパーベクターに目的遺伝子を組み込み、大腸菌で高発現させるためには、大腸菌で効率良く発現するプロモーターを目的遺伝子上流に備え、そのプロモーターと目的遺伝子を含む断片を2個以上直列に連結して挿入断片を長くすることが望ましい。そこで、Fig. 5に示した手順でスリーパーベクターにSPase遺伝子を組み込み発現させることにした。

まず、pUC119由来の0.2 Kbのlacプロモーター断片をプラスミドpSPL11の約1.8 KbのHindIII断片の上流に挿入したプラスミドpSPL14を得た。次にBamHI、BglII処理によりプロモーターとSPase遺伝子を含む断片を2個直列に連結したプラス

1                   GAATTTTGATGGATTTAATGTTGGGCTCTTCBITGAACCAATGTTTGTGGCGACTTTTGGCAGCTTGATTGGTCACGGTGGTGGCAGTG  
 91 CTGCCGCATCAGCGTATGCTACAAATTCCTTATTTGGGATTAAGTACTGCTCATATCGCAATCGTTACAGTTTATTACTAGCAGAAAAACAGGAAAAATAATA  
M E I Q N K A M L I T Y A D S L G K N L K D V H Q V L K E D I G D  
 191 ATGGAAATTCAAAACAAAGCAATGTTGATCACCTATGCTGATTCCTTGGGCAAAAACCTFAAAAAGATGTTTCATCAAGTCTTGAAGCAAGATATTGGAGAT  
 A I G G V H L L P F F P S T O D R G F A P A D Y T R V D A A F G D  
 290 GCGATGGTGGGTTCAITGTTGCTTTCCTTCCCTCAACAGGTGATCGGGTTTTGGCCAGCCGATTACTCGTGTGATGCGCATTTGGTGTAT  
 W A D V E A L G E E Y Y L M F D F M I N H I S R E S V M Y Q D P K  
 389 TGGCAGATGTCGAAGCATGGGTGAAGAAATACATTTGATGTTTGACTTCATGATTAACCAATATTTCTCGTGAATCAGTGTATCAAGATTTAAG  
 K N H D D S K Y K D F F I R W E K F W A K A G E N R P T Q A D V D  
 488 AAGATCATGACGATTCAAAGTATAAAGATTTCTTTATTCGTTGGGAAAAGTCTGGGCAAAAGCCGGCAAAACCGTCCAACACAAGCCGATGTTGAC  
 L I Y K R K D K A P T Q E I T F D D G T T E N L W N T F G E E Q I  
 587 TTAATTTACAAGCGTAAAGATTAAGGCCACCAACGCAAGAAATCACTTTTGTATGATGGCACAACAGAAAACCTTGTGGAATCTTTTGGTGAAGAACAAAT  
 D I D V N S A I A K E F I K T T L E D M V K H G A N L I R L D A F  
 686 GACATGATGTTAATTCAGCCATTCGCAAGCAATTTAATAAGACAACCCCTGGAAGACATGGTAAAACATGCTGCTAATGATTCGTTGGATGCTCTT  
 A Y A V K K V D T N D F F V E P E I W D T L N E V R E I L T P L K  
 785 GCGTATGCAAGTAAAAAGCTGACACAAATGACTTCTTCGTTGAGCCAGAAATCTGGGACACTTTGAATGAAGTACCGTAAATTTGACACCAATTAAG  
 A E I L P E I H E H Y S I P K K I N D H G Y F T Y D F A L P M T T  
 884 GCTGAAATTTACCAGAAATCATGAACATTAAGTCAATCCCTAAAAGATCAATGATCATGGTACTTCACCTATGACTTTGCATTACCAATGACAACG  
 L Y T L Y S G K T N Q L A K W L K H S P M K Q P T T L D T H D G I  
 983 CTTTACACATTTGATTCAGGTAAGACAAAATCAATGGCAAAAGTGGTTGAAGATGTCACCAATGAAGCAATTCACAACATGGACACCGCATGATGGTATT  
 G V V D A R D I L T D D E I D Y A S E Q L Y K V G A N V K K T Y S  
 1082 GGTGTCGTTGATGCCCGTATTTCTAACTGATGATGAAATGACTACGCTTCTGAACCACTTTACAAGGTTGGCCGGAATGTCAAAAGACATATTCA  
 S A S Y N N L D I Y Q I N S T Y Y S A L G N D D A A Y L L S R V F  
 1181 TCTGCTTCATAACAACCTTGTATTTACCAAAATTAACCTCAACTTATTATTCAGCATTCGGAAATGATGATGCACATACTTGTGAGTCGCTGCTTC  
 Q V F A P G I P Q I Y Y V G L L A G E N D I A L L E S T K E G R N  
 1280 CAAGTCTTTGGCCCTGGAAATGCCACAAATTTATTACGTTGGTTTGTGGCAGGTGAAAACGATATCGCGCTTTTGGAGTCAACTAAAAGAAAGTCTGTAAT  
 I N R H Y Y T R E E V K S E V K R P V V A N L L K L L S W R N E S  
 1379 ATTAACCGTCAITACTATACGGGTGAAGAAATTAAGTCAGAAGTTAAGCCAGCAGTTGTTGCTAACTATTGAAAGCTATTGTCATGGCGTAAATGAAAGC  
 P A F D L A G S I T V D T P T D T T I V V T R Q D E N G Q N K A V  
 1478 CCGCATTGATTTGGTGGCTCAATCA CAGTTGACACGCCAACTGATACAACAATTTGGTGA CACGTC AAGATGAAAATGGTCAAAAACAAAGCTGTA  
 L T A D A A N K T F E I V E N G Q T V M S S D N L T Q N  
 1577 TTAACAGCCGATGCGCCCAACAAAACCTTTTGAATCGTTGAGATGGTCAACTCTTATGAGCAATGATAATTCACTCAGAACATAAATTTTGAAT  
 1677 CAATTTCTAAGAACTGTTTCTGAGGGAAGCAGTTTITTTGCTGATAGTGGGAAATATTATATTGACAGACAAAAGTAAATTTATTTATACTAAACTCACT  
 1777 GTTCAAAAGCTT

Fig. 3. Nucleotide sequence of the SPase gene and its flanking regions and the deduced amino acid sequence of SPase.

Thick underline indicates a probable Shine-Dalgarno sequence. Thin underline indicates the sequence of amino acids from the NH<sub>2</sub>-terminal region analyzed by a protein sequencer.

```

MEIQNKAMLITYADSLGKNLKDVIHQVLKEDI GDAIGGVHLLPFFPSTGDRGFAPADYTRV 60
P T T ELNENIENYF V I HE
DAAFGDWADVEALGEEYYLMFDFMLNHISRESVMYQDFKKNHDDSKYKDFRWEKFWAK 120
S D KR K Q KY K YQEK EA A L LN D P
AGENRPTQADVDLIYKRKDKAPTQEITFDDGTENLWNTFGEEQIDIDVNSAIAKEFIKT 180
--- E R K Q A SV H L TKEVTMD RS
TLEDVVKHGANLIRLDAFAYAVKKVDTNDFVVEPEIWDTLNEVREILTPLKAEILPEIHE 240
I NLAAN CD L TL DK N AAVSG
HYSIPKKINDHGTYFYDFALPMTLYTLYSGKTNQLAKWLKMSPMKQFTTLDTHDGIGVV 300
T QF A D YV V S VDR
DARDILTDDDEIDYASEQLYKVGANVKKTYSSASYNLDIYQINSTYYSALGNDDAAYLLS 360
VK E T T NE NRK T E D QK F A
RVFQVFAPGIPQIYYVGLLAGENDIALLESTKEGRNINRHYYTREEVKSEVKRPVVANLL 420
LI A V F K LE SS IAK KA
KLLSWRNESPAFDLAGSITVDTPDTTIVVTRQDENGQNKAVLTADAANKTFEIVENGQT 480
N FTY Q A D R E E NEA IE N KD SHI TAEINLQDM YRVT D
VMSSDNLTQN
I- FE-----

```

Fig. 4. Comparison of the amino acid sequences between SPase of L. mesenteroides (upper row) and GTF-A of S. mutans (lower row).

The numbering is that of the ORF of SPase of L. mesenteroides (Fig. 3). Different amino acids are indicated in lower row. Gaps (-) are introduced to optimize the amino acid alignment.

ミドpSPL14-2を構築した。この二つの制限酵素は認識部位の切断のりしろが同じなので、直列につながると両酵素では切断不可能となり、制限酵素分析で直列に繋がったか否かを容易に識別できる。そしてプラスミドpSPL14-2のKpnI断片を調製し、スリーパーベクターslp501S-TcをKpnI処理したものをligationした。このligation混合物をin vitro packagingし、大腸菌1100に導入した。テトラサイクリン (1.5  $\mu$ g/ml) を含むM9最少寒天培地に撒き溶原菌を得た。温度感受性やプラーク形成能の欠落を指標にSPase発現株を30株選択した。これらを培養し、熱誘導によりSPaseを高発現する大腸菌1100 (slp-spl-1) 株を取得した。この株のファージslp-spl-1の構造を解析した結果、プラスミドpSPL14-2のKpnI断片を2個有しており、つまり、SPase遺伝子を4個直列に、ファージの後期プロモーターP'rと同じ向きに含むことが判明した (Fig. 5)。

大腸菌1100 (slp-spl-1) を10 ml振盪培養し、熱誘導6時間後でのSPase活性を測定したところ、培養液1 ml当たり約55.7単位であり、元株*L. mesenteroides*より約80倍活性が高い組換え菌を構築することができた。その時のSDS-PAGEをFig. 6に示す。熱誘導後、時間の経過とともにSPaseが生産されていき、6時間後には全菌体抽出蛋白の約30%をSPaseが占めていた。この時間での無機燐定量時の妨害酵素であるNADHオキシダーゼと6-ホスホグルコン酸脱水素酵素はTable IIIに示すように、元株*L. mesenteroides*培養時と比較して非常に少なく、また、デキストランやマンニトールも培地中に蓄積せず、工業生産時の精製工程を簡略化することができた。

#### (4) 遺伝子産物の解析

Kogaらによって*L. mesenteroides*由来のSPaseの精製と諸性質について詳細な検討がなされている<sup>12)</sup>ため、その方法に準じて大腸菌1100 (slp-spl-1) 由来のSPaseを精製し、その諸性質について*L. mesenteroides*由来の酵素と比較検討を行った。精製手順をまとめたものをTable IVに示す。この電気泳動的に均一な酵素標品と

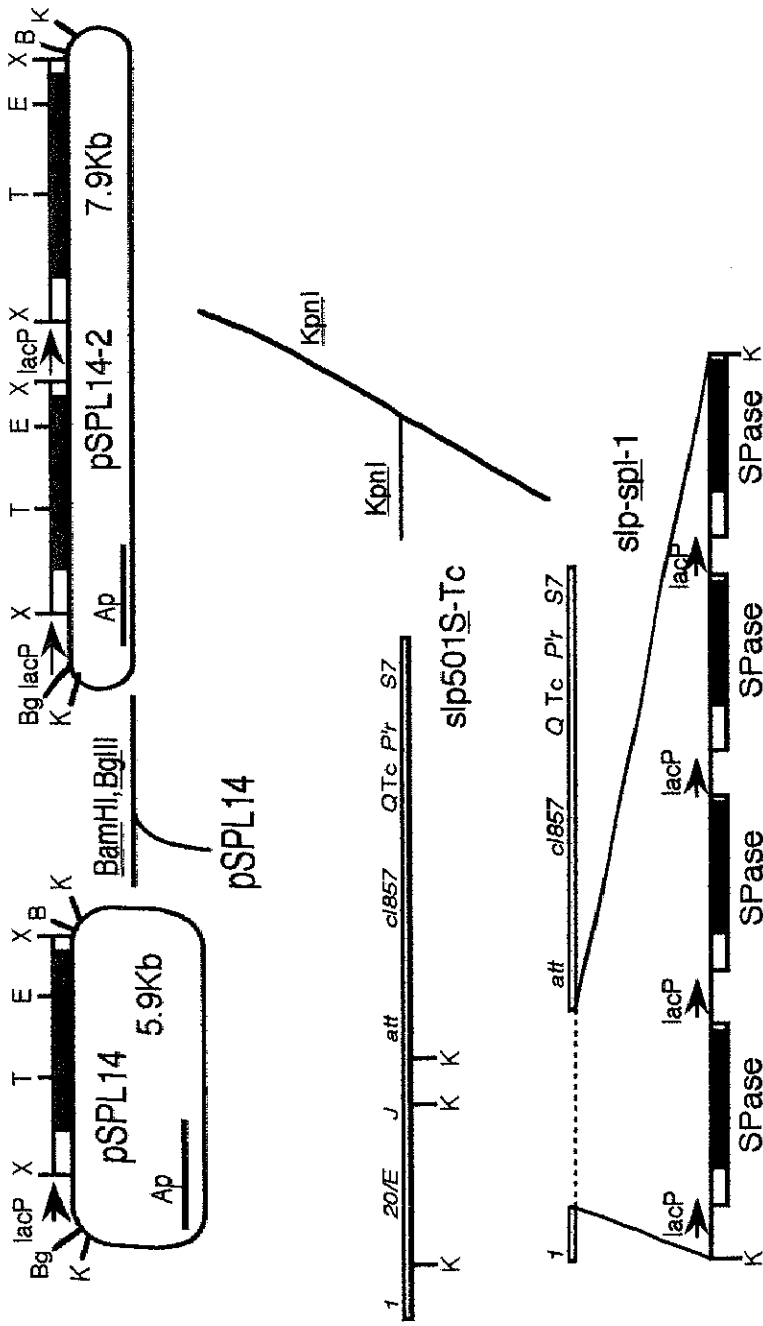


Fig. 5. Construction of *slp-spl-1* phage for the overexpression of SPase.

Italics are genomic markers of  $\phi$  80 or  $\lambda$ . 20/E is fused site of  $\phi$  80 and  $\lambda$ . Left region is  $\phi$  80, and right one is  $\lambda$ . Abbreviation is the same described in Fig. 2, except for B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; K, *Kpn*I; X, *Xba*I.

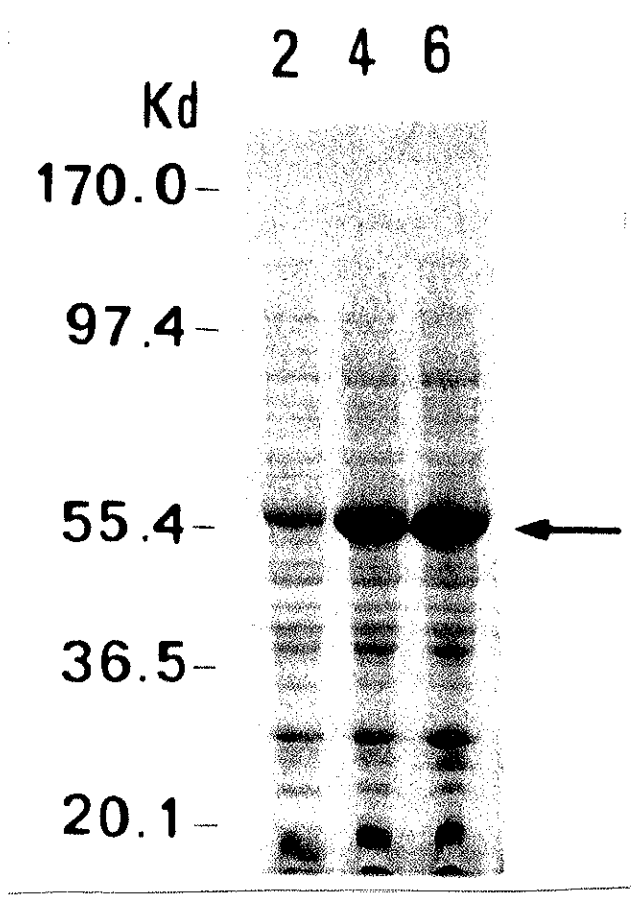


Fig. 6. SDS-PAGE of cell extracts from *E. coli* 1100 (*slp-spl-1*).  
The numbers indicate hours after heat induction. The arrow indicates SPase.

TABLE III. SPase, NADH oxidase, and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities in E. coli 1100 (slp-spl-1) and L. mesenteroides

Strains	Enzyme activities (units/ml culture)		
	SPase	NADH oxidase	6-Phosphogluconate dehydrogenase
<u>E. coli</u> (slp-spl-1)	55.70	0.0042	0.011
<u>L. mesenteroides</u>	0.69	0.070	0.138



古賀氏より恵与いただいた L. mesenteroides 由来の精製 SPase を用いて以下の検討を行なった。

a. 比活性 L. mesenteroides 由来の SPase は、 $173.8 \text{ units/mg}^{12)}$  であるのに対し、大腸菌 1100 (slp-spl-1) 由来のそれは、Table IV に示すように  $185.77 \text{ units/mg}$  であった。ほぼ一致しているが、若干大腸菌由来の酵素のほうが値が高いのは、精製が効率良く行なわれたため、失活が防がれたものと判断した。

b. 至適温度・温度安定性 Figure 7-A, B に示したように、両由来の酵素とも加リン酸分解反応において、 $42^\circ\text{C}$  で最大活性を示し、 $45^\circ\text{C}$  以下で安定であった。

c. 至適 pH・pH 安定性 Figure 7-C, D に示したように、両由来酵素とも加リン酸分解反応において pH 7.5 付近で最大活性を示し、pH 5.5-8.0 の範囲で安定であった。

d. 基質特異性 逆反応における受容体特異性については次章で詳細に述べる。

以上の結果、元株である L. mesenteroides 由来、そして、大腸菌 1100 (slp-spl-1) 由来の SPase の性質は同じであると判断される。

### 第 3 節 要約

無機リン定量用酵素として、市場ニーズが高まってきた SPase の生産性を高め、工業生産を可能とするため、元株乳酸菌 L. mesenteroides から遺伝子をクローニングし、大腸菌にて高発現させることにした。N 末端アミノ酸配列を基に作製したオリゴヌクレオチドプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーションよりプラスミド pSPL02 を得た。このプラスミド pSPL02 は、構造遺伝子の C 末側を欠いていたため、pSPL02 の C 末側断片を用いて再度コロニーハイブリダイゼーションを行い、C 末端側領域を含むプラスミド pSPL08 を得た。次に、pSPL02 と pSPL08 とをつなぎ合わせ全長 SPase 遺伝子領域を含むプラスミド pSPL10 を構築した。このプラスミド pSPL10 をもつ大腸菌 DHI は、遺伝子供与菌である L. mesenteroides とほぼ同程度の、培養液 1 ml 当たり約 0.64 単位の SPase 活性値を示し

Table IV. Purification of SPase produced by *E. coli* 1100 (slp-spl-1)

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg-protein)	Purification (-fold)	Yield (%)
Crude extracts <sup>a</sup>	381.2	5,551	14.56	1	100
Ammonium sulfate (35-75% saturation)	107.5	4,143	38.54	2.65	74.6
DEAE-5PW HPLC	33.7	3,589	106.50	7.31	64.7
Ether-5PW HPLC	16.5	3,065	185.76	12.76	55.2

<sup>a</sup>Crude extracts were from cultured cells in 1L of broth.

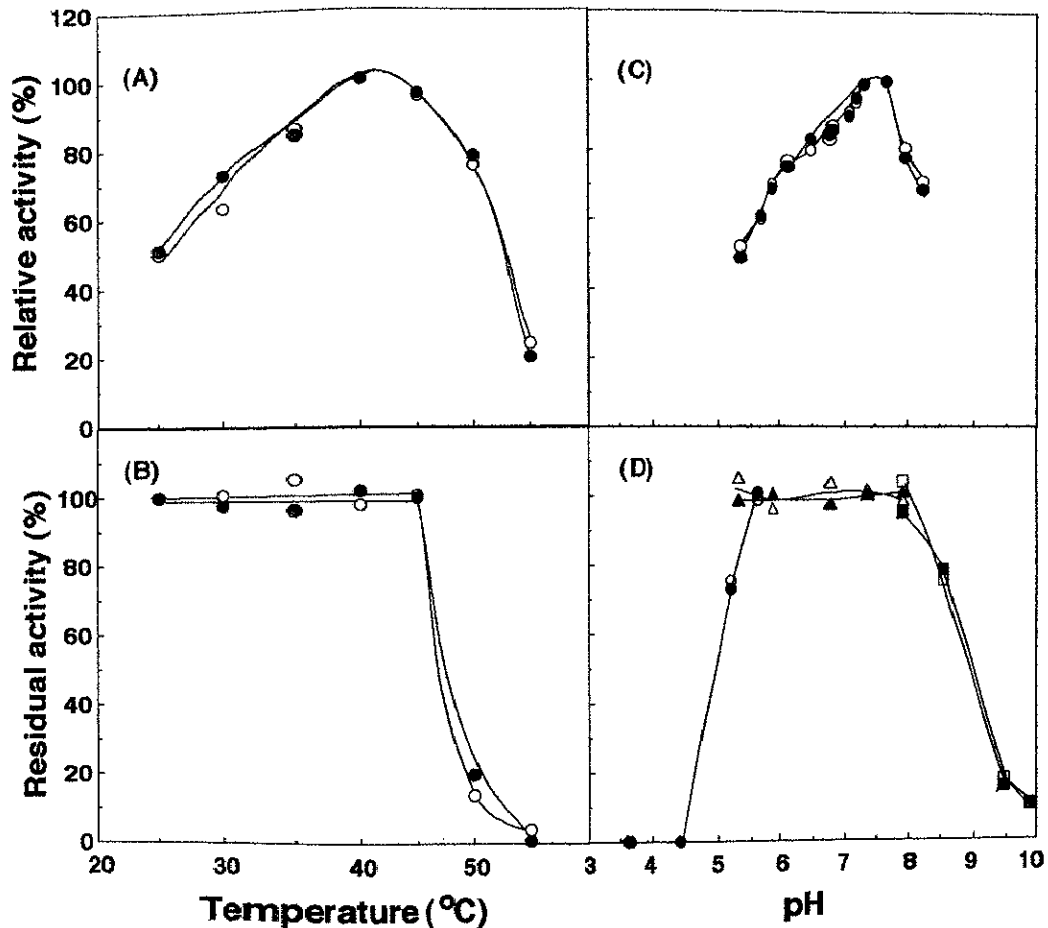


Fig. 7. Effects of pH and temperature on SPase activity and stability.

SPase is assayed by the method of Silverstein *et al.* <sup>11</sup>) in which the production of G-1-P from sucrose and  $\text{P}_i$  is coupled to the reduction of  $\text{NADP}^+$ .

The relative activities (A, C) are expressed as a percentage of the maximum activity under the experimental conditions used. The residual activities (B, D) are expressed as a percentage of the SPase activity obtained with non-treated SPase solution. In (B), 1 ml (0.2 mg protein) of the SPase containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) was incubated for 10 min at various temperatures. In (D), 1 ml (0.2 mg protein) of the SPase containing 50 mM sodium acetate (○ or ●),  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{PO}_4$  (△ or ▲), and  $\text{H}_3\text{BO}_4\text{-NaOH}$  (□ or ■) buffer was incubated for 1 hr at 37°C. Opened and closed symbols show SPase from *L. mesenteroides* and *E. coli* 1100 (slp-spl-1), respectively.

た。次に、lacプロモーターで発現させるため、このプロモーターの下流に構造遺伝子を配したプラスミドpSPL11を構築した。このプラスミドをもつ大腸菌DHIは、IPTG存在下で、元株のL. mesenteroidesに比べ約30倍活性が高い、培養液1 ml当たり約19.75単位のSPase活性値を示した。

取得したSPase遺伝子上流にlacプロモーターを配し、これらを2単位直列に並べたプラスミドpSPL14を構築し、スリーパーベクターslp501S-Tcに挿入したSPase高生産株、大腸菌1100 (slp-spl-1)を選択した。この菌株のファージには、ファージ後期プロモーター方向にlacプロモーター支配下、SPase遺伝子が4個直列に並んでいる。この大腸菌1100 (slp-spl-1)のSPase活性は、熱誘導6時間後、培養液1 ml当たり約55.7単位で、これは元株のL. mesenteroidesの約80倍生産性が高まり、全菌体抽出蛋白の約30%を占めていた。また、デキストランやマンニトールなども培地中に蓄積せず、妨害酵素の生産量も低く、工業生産に適した菌株を作製することができた。

塩基配列解析の結果、本酵素は490個のアミノ酸から構成され、そのアミノ酸配列から分子量55,749と算出された。この値は蛋白の電気泳動の結果ともよく一致する。また、ホモロジー検索よりSPase触媒能があるS. mutansのgfaAのコードする蛋白質と約68%という高い相同性を示したが、他の加燐酸分解酵素やスクロースを基質とする酵素との相同性は見いだされなかった。今後、より多くの酵素がクローニングされ立体構造が解析されれば、構造と活性の相関が明らかになる可能性は高い。大腸菌1100 (slp-spl-1)のSPaseを精製し性質を検討したところ、元株のL. mesenteroidesのSPaseとほぼ同じ比活性・至適温度・温度安定性・至適pH・pH安定性を示した。

## 第2章 スクロースホスホリラーゼによる中性オリゴ糖の合成

### 緒言

SPaseは両方向の反応を触媒する酵素である。正反応（右向き、加磷酸分解反応）では、スクロースが糖供与体、無機磷が糖受容体であるとき、G-1-Pとフラクトースが生成する反応が代表的である。無機磷以外にも特異性は低いが、メタノール、エタノール、砒酸、エチレングリコールなどが受容体となり得る<sup>24)</sup>。一方、逆反応（左向き）では、G-1-Pが糖供与体、フラクトースが糖受容体であるとき、スクロースと無機磷が生成する反応が代表例である。この反応において受容体としてフラクトース (D-fructose) 以外に、ソルボース (L-sorbose)、キシルロース (D-xylulose)、リブロース (L-ribulose)、ラムニュロース (D-rhamnulose)、アラビノース (L-arabinose) が知られている<sup>10)</sup>。これらの知見は、主に Pseudomonas saccharophila 由来の酵素について調べられたものである。他由来の酵素については単に比較するだけで、P. putrificience と L. mesenteroides 由来について簡単に調べられたにすぎない<sup>17)</sup>。この当時の実験手法は直接定性あるいは定量したものでなく、副生する無機磷を調べたものである。また、同じ Pseudomonas 属の酵素でも、ソルボースやキシルロースに対する特異性が違うことが知られている<sup>10)</sup>。

最近、キシリトールとその誘導体について、甘味料としての関心が高まりつつある。キシリトールは、インスリン非依存型で、また、虫歯予防効果も高いと言われている<sup>54)</sup>。キシリトールとの構造相関性から、これにグルコースが結合したオリゴ糖の性質が興味あるところである。

そこで本章では、L. mesenteroides と大腸菌 1100 (slp-spl-1) 由来の両 SPase について、逆反応における受容体特異性を、HPLC を用いて直接定量することにより、明らかにすることとした。また、合成されたオリゴ糖のうち、その性質に特徴の

あるキシリトールとグルコースが結合したオリゴ糖 (4-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-xylitol) と、従来、大量調製が困難であった $\alpha$ -グルコ二糖であるコージビオースとニゲロースについてその生成条件などの検討を行った。

## 第1節 実験材料および方法

### 1. 酵素と試薬

乳酸菌 *L. mesenteroides* と大腸菌 1100 (slp-spl-1) 両由来の SPase は、培養した後、第1章で述べたように精製を行ない、電気泳動的に均一な標品を用いた。

*Saccharomyces* sp. 由来の  $\alpha$ -glucosidase とスイートアーモンド由来の  $\beta$ -glucosidase は、東洋紡から購入した。G-1-P dipotassium salt とキシリトールは、各々ナカライテスクと東京化成工業から購入した。ニゲロースは、シグマより購入し、コージビオースは、東北大学農学部中島佑先生より恵与していただいた。他の糖と糖アルコールは、和光純薬、または、東京化成工業から購入した。試薬は全て、特級グレードのものを使用した。

### 2. 酵素活性の測定法

第1章に準じた。

### 3. SPase 逆反応における転移率の測定法

G-1-P (20%、w/v)、受容体糖類 (20%、w/v)、SPase (5 units) を含む 100mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) 緩衝液 (pH 6.9) 200  $\mu$ l を 37°C 8時間反応させた後、100°C、5分間熱処理して反応を停止した。その反応停止液 10  $\mu$ l を HPLC に供した。転移率は、用いた G-1-P のモル数に対する、転移したグルコースのモル数の比で表わした。

### 4. HPLC

逆反応における HPLC 分析は、以下の条件で行った。

カラム : TSK gel Amide-80 (250 X 4.6 mm, i. d.) (TOSOH)

カラム温度：35℃

検出器：TOSOH RI-8000 differential refractive index monitor

移動相：アセトニトリル-水 (60:40, v/v)

流速：1.0 ml/min

コージビオースとニゲロース検定用 HPLC分析の条件は、

カラム：Hiber Lichrosorb NH<sub>2</sub> (250 X 4.0 mm, i.d.) (Cica-Merck)

移動相：アセトニトリル-水 (80:20, v/v)

これら以外の条件は、逆反応における分析条件と同じであった。

分取時は、Asahipak NH<sub>2</sub> (250 X 10 mm, i. d.) カラムと、移動相にアセトニトリル-水 (60:40, v/v) を用いた。

## 5. 各種スペクトル分析

ア、マススペクトル Secondary ion mass spectrometry (SIMS) は、日立 M80B スペクトロメーターを用いて測定した。

イ、核磁器共鳴スペクトル <sup>13</sup>C-Nuclear magnetic resonance (<sup>13</sup>C-NMR) スペクトルは dimethylsulfoxide (DMSO) 溶媒中、テトラメチルシランを内部標準として測定した。測定機器は、JOEL-FX200 (50.10 MHz) スペクトロメーターを用いた。

コージビオース、ニゲロース解析時は、重水中、アセトンを用いて測定した。測定機器は、Bruker AM-500 (500 MHz) スペクトロメーターを用いた。

## 6. 粗グルカン合成酵素の調製

Streptococcus mutans IFO 13955株を 3.5% Brain Heart Infusion (BHI) (Difco製) 培地にてガスパックを用いて、嫌氣的条件下、37℃で18時間静置培養を行った。培養終了液700 mlを8,000 rpm 20分間 4℃で遠心分離を行い、その上澄液に予め冷やしておいた400 mlの95% (v/v) エタノールを注いだ。そこに飽和した塩化カルシウム溶液を2-3滴、滴下し、直ちに5,000 rpm 15分間 4℃で遠心分離を行っ

た。沈澱物を5 mlの10 mM phosphate緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、同緩衝液に対して透析を行った。この透析液を粗グルカン合成酵素 (glucan synthesizing enzyme, GS) として用いた。

#### 7. 各種糖類に対する水不溶性グルカン合成能の測定

1.0 mlの0.2 M各種糖類水溶液、1.5 mlの100 mM phosphate緩衝液 (pH 7.0) に0.5 mlのGSを混合し、37°C 4時間ガラスの試験管で反応させた。その後、4回水洗いを行い、水に不溶な産物を1.0 mlの0.5N NaOHで溶解した。その溶液をグルコースを標準としてフェノール硫酸法<sup>55)</sup>にて糖量を測定した。

#### 8. *S. mutans* IFO 13955株細胞懸濁液の調製とpH測定

*S. mutans* IFO 13955株を1,400 mlの3.5% BHI培地にて、粗グルカン合成酵素の調製時と同じように、37°Cで18時間静置培養を行った。培養液を7,000 rpmで15分間4°Cで遠心分離を行い、沈澱物を0.9% (w/v) NaClで洗い、2 mlの蒸留水で懸濁し、細胞懸濁液とした。pH変化の測定は、0.2 mlの細胞懸濁液に1.5 mlのStephan's緩衝液<sup>56)</sup>と0.3 mlの100 mg/mlの各種糖類水溶液を混合し、37°Cに保持してpHを測定した。

## 第2節 結果および考察

### (1) 逆反応における各種糖類の受容体特異性

G-1-Pと糖供与体、各種糖類・糖アルコールを受容体として、反応の検討を行った。まず適切な反応時間を調べるため、D-fructoseとD-arabinitolを受容体とした場合の経時変化を検討した (Fig. 8)。D-Fructoseを受容体に用いた場合、1時間以内で転移率22.3%に達し、その後の上昇は見られなかった。一方、D-arabinitolを受容体に用いた場合には、D-fructoseのそれと比較すればゆるやかに上昇するが、8時間では転移率が逆転し、最大転移率は25.0%に達した。この結果、各種糖類の受容体特異性の検討は、反応時間8時間で行うこととした。



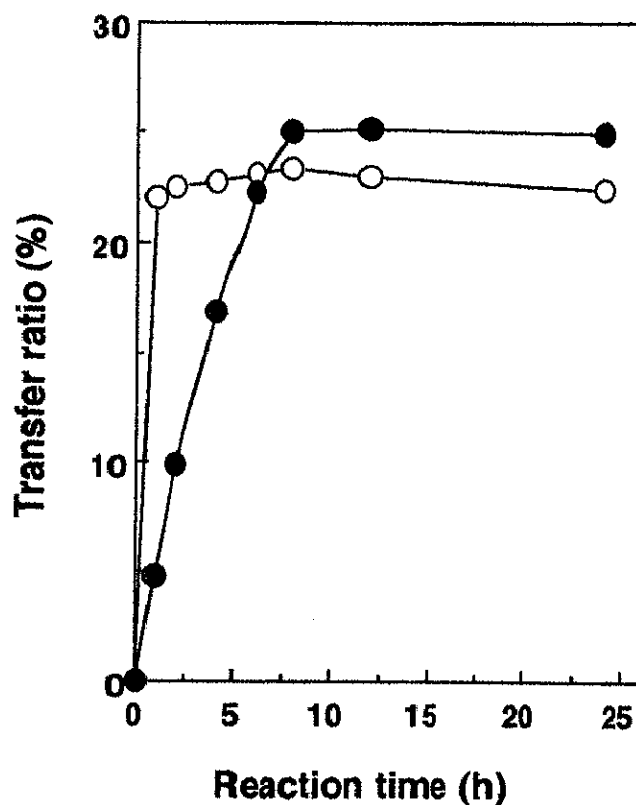


Fig. 8. The course of disaccharide formation by SPase from *L. mesenteroides*.

The transfer activity of SPase was examined as follows: a reaction mixture (0.2 ml) contained G-1-P (20%, w/v), acceptor saccharide (20%, w/v), and SPase (5.0 units) in 100 mM MES buffer (pH 6.9) was incubated at 37°C. The transfer ratio was defined as the percentage of the amount of the glucose (moles) transferred to acceptor against the amount of initial G-1-P (moles). The amount of the glucose transferred to acceptor was calculated from the peak area of the transfer product on HPLC using the calibration curves of authentic samples (sucrose and glucosyl-D-arabinitol). Acceptors used were: (○), D-fructose; (●), D-arabinitol.

Figure 9に反応終了液の典型的なHPLCパターンを示す。多くの糖類で、G-1-Pや用いた受容体糖類以外にピークが現れ、これらは、酵素が存在しないと出現しない（例えば、Fig. 9-14のキシリトールを用いた場合、酵素が存在しないとピークが現れない）ことより、矢印で示したピークは、糖転移産物と判断した。また、キシリトールを用いた場合、*L. mesenteroides*と大腸菌1100 (slp-spl-1)由来の両酵素ではほとんど同じパターンを示し (Fig. 9-12,13)、他の糖類を受容体に用いた時も同じ結果を得、両酵素の受容体特異性に差がないことが示された。その結果をまとめたのが、Table Vである。

最も転移効率が高い受容体としては、D-fructose、D-あるいはL-arabinitolが挙げられ、転移率は20%以上であった。これらの糖アルコール類に対しては、*P. saccharophila*由来の酵素で効率が高いと言われているL-sorbitol (6.8%) やL-arabitol (12.4%)<sup>15)</sup>よりも転移率が高かった。L-Fucose,  $\alpha$ -methyl-D-glucoside, glyceraldehyde, D-ribitol, xylitolも受容体として機能し、それらの転移率は、5-15%であった。D-Glucose, D-galactose, D-xylose, D-mannose, D-ribose, D-gluconic acid, glycerol, D-sorbitol, inositolも受容体となり得るが、それらの転移率は、5%以下と低かった。*P. saccharophila*由来の酵素<sup>15)</sup>では、D-glucose, D-galactose, D-xylose, D-mannose, D-riboseやL-fucoseは受容体となり得ない、とされている。この酵素の受容体の特異性の法則性としては、グルコシル結合とcisの位置に水酸基を有することが必須とされている<sup>10)</sup>。今回の*L. mesenteroides*酵素については、この法則性にあてはまらない糖類でも受容体となっている。同じ*Pseudomonas*属の酵素でも、L-sorbitolやD-xyluloseに対する特異性が違うことが知られており<sup>10)</sup>、これら三つの由来の異なるSPaseにおいて、加リン酸分解反応は同じように触媒するが、逆反応ではその受容体特異性が違うようである。

## (2) グルコシルキシリトールの合成と性質

キシリトールは5炭糖の糖アルコールで、甘味を持っている。この糖アルコー

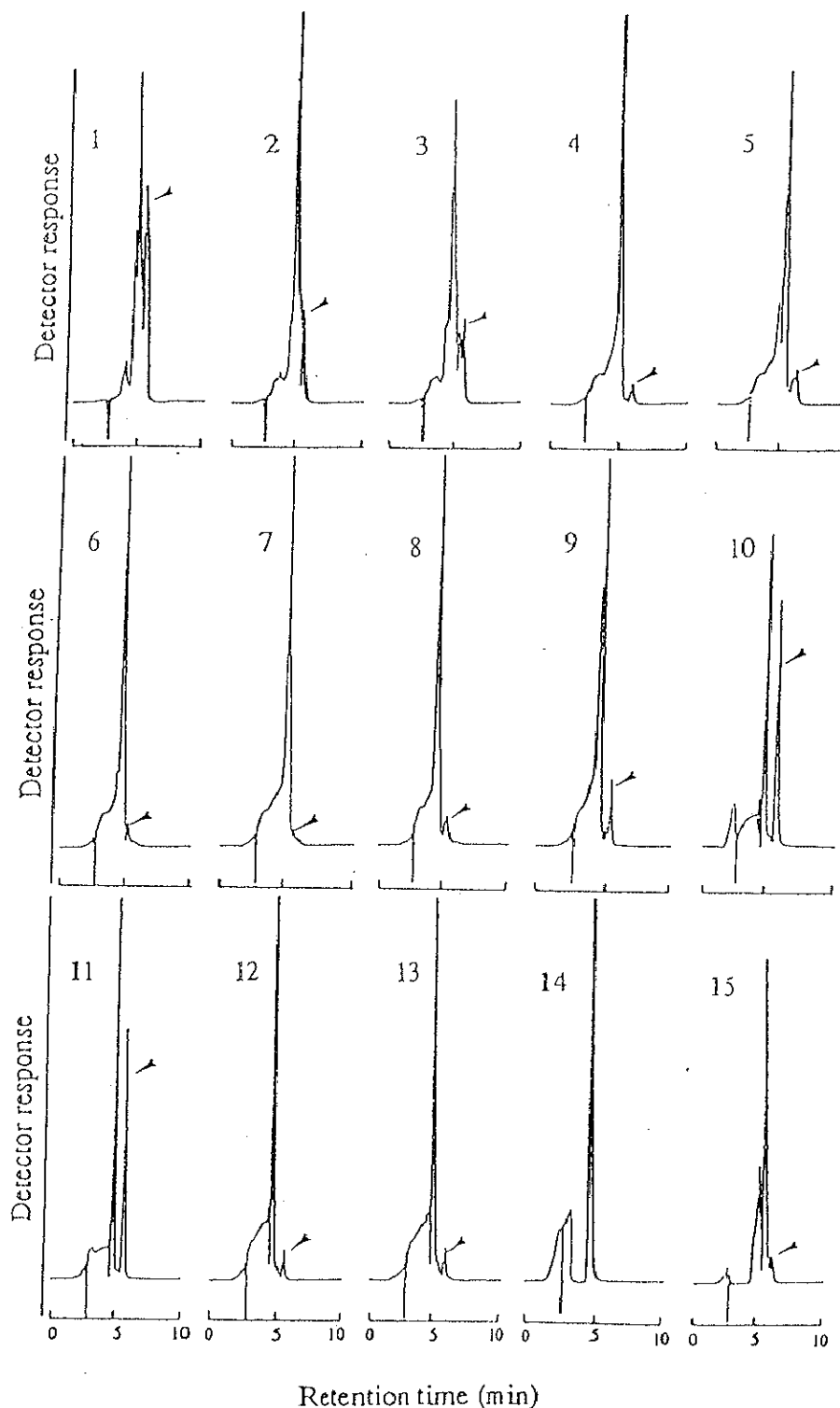


Fig. 9. High performance liquid chromatograms of reaction products of SPase from *L. mesenteroides* on the mixture of G-1-P as a donor and various saccharides as acceptors.

Acceptors used were: 1, D-fructose; 2, L-sorbose; 3, L-arabinose; 4, D-glucose; 5, D-galactose; 6, D-xylose; 7, D-mannose; 8, D-ribose; 9, L-fucose; 10, D-arabinitol; 11, L-arabinitol; 12-14, xylitol; 15, sucrose. Enzymes used were: 1-12, 15, from *L. mesenteroides*; 13, from *E. coli* (slp-spl-1); 14, no enzyme. Arrows show the peaks that were considered to be transfer products.

Table V. Acceptor specificity of SPase

Compound	Transfer ratio (%)	Compound	Transfer ratio (%)
D-Fructose	23.4	Ascorbic acid	0
L-Sorbose	6.8	Glyceraldehyde	6.8
D-Arabinose	0	Glycerol	1.4
L-Arabinose	12.4	Erythritol	0
D-Glucose	2.4	D-Ribitol	12.8
2-Deoxy-D-glucose	0	D-Arabinitol	25.0
$\alpha$ -Methyl-D-glucose	10.6	L-Arabinitol	24.3
L-Glucose	0	Xylitol	5.1
D-Galactose	3.5	D-Mannitol	0
D-Xylose	1.5	D-Sorbitol	2.8
L-Xylose	0	Inositol	1.0
D-Mannose	1.1	Trehalose	0
D-Rhamnose	0	Cellobiose	0
L-Rhamnose	0	Maltose	0
D-Ribose	2.5	Isomaltose	0
D-Fucose	0	Maltotriose	0
L-Fucose	10.7	Melibiose	0
Glucosamine	0	Melezitose	0
N-Acetylglucosamine	0	Panose	0
D-Gluconic acid	4.3	Raffinose	0
D-Galacturonic acid	0	Sucrose	1.2

Transfer ratio : see the Legend of Fig. 8. Except for the case of D-arabinitol, the amount of glucose transferred to the acceptor was calculated using the calibration curve of sucrose.

ルは溶解時に吸熱するため、口中で溶けるときにさわやかな風味を与える。日本では食品への利用はまだ認可されていないが、欧米ではインスリン非依存性で虫歯予防効果があるため、砂糖菓子などに積極的に利用されている<sup>54)</sup>。

キシリトールを受容体とした場合に、グルコースにキシリトールが結合したオリゴ糖が合成されている可能性が高いため、分取を行ない、それについての虫歯予防効果を調べてみることにした。

a. 分取 G-1-Pを30 g、キシリトールを30 g、そして大腸菌1100 (slp-spl-1) 由来のSPase 4500単位を含む100 mlの100 mM MES緩衝液(pH 6.9)を42℃で15時間反応させた後、100℃で5分間熱処理して反応を停止した。その反応停止液を活性炭カラム (5 X 45 cm) に供し、流速50 ml/hで分離を行った。2リットルの水により単糖類を溶出し、次いで、1リットルの10% (v/v) エタノールにて転移産物を集め、凍結乾燥を行った。約3 gの白色粉末を得、HPLC的に単一でしかもシンメトリックなピークを示した。

b. 構造解析 転移産物の構造を決定するため、まずSIMSを行い、分子量は314と決定した(データ未提出)。次に2N HCl存在下で105℃ 2時間処理を行うと、完全にモル比1 : 1でグルコースとキシリトールに分解された (Fig. 10)。これらの結果より、転移産物はグルコースとキシリトールが1モルずつグルコシド結合していることが明らかとなった。<sup>13</sup>C-NMR解析で最終的な構造確認を行った。Table VIにグルコースとキシリトールの値と比較するようにして解析値を示した。この中で、99.2 ppmのシグナルは、グルコースのアノメリックカーボンのシグナルであり、 $\alpha$ -D-glucopyranoseのシグナル値と比較し、7.1 ppm低磁場側へシフトしていることから、 $\alpha$ 結合していることが示唆された。一方、転移産物のキシリトールの4位のシグナル値がキシリトールのそれと比較して8.7 ppm低磁場側へ大きくシフトしていることより、キシリトールの4位とグルコースの1位が結合していることが明らかとなった。以上の解析の結果、転移産物は、4-O- $\alpha$ -D-

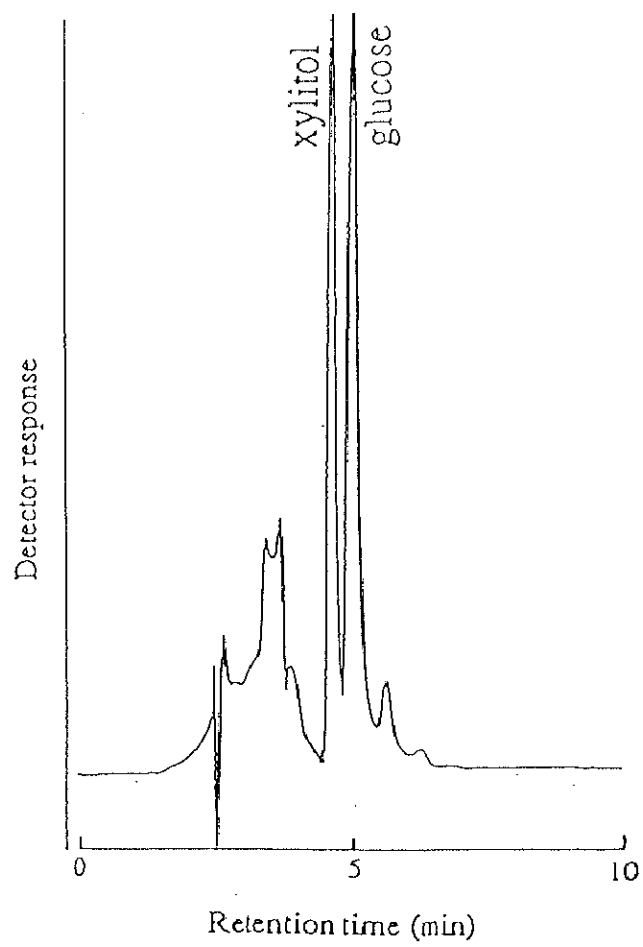


Fig. 10. High performance liquid chromatogram of hydrolysate of G-X by hydrochloric acid.

Table VI.  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift data for transfer product to xylitol

	Transfer product		$\alpha$ -D-glucopyranose	Xylitol
	$\alpha$ -D-glucopyranose	Xylitol		
C-1	99.2	62.9	92.1	62.3
C-2	72.2	72.9	72.3	73.3
C-3	73.4	70.7	73.1	71.7
C-4	70.1	82.2	70.6	73.5
C-5	72.4	60.7	71.8	63.4
C-6	60.9		61.2	

Values are given in  $\delta$  ppm.

glucopyranosylxylitol (G-X) であることが確定した。

c. 虫歯予防効果 G-Xによる水不溶性グルカン生成抑制作用について、スクロース、キシリトールも併せて検討を行った。Table VIIに示したように、スクロースが著量のグルカンを生成したのに対し、G-Xはキシリトールと同様、単独では全くグルカンを生成しなかった。また、スクロースを併用した時も、キシリトールと同様、約4割程度グルカンの生成を抑制した。虫歯は、Streptococcus属の細菌が歯の表面に付着し、この細菌がスクロースを基質として水不溶性グルカンを生成すると同時に、有機酸を生成してpHを酸性側にして疾病を進行させることが知られている<sup>57)</sup>。そこで、S. mutans IFO 13955株細胞懸濁液を用いて各糖類水溶液のpH変化を調べた (Fig. 11)。スクロース、グルコース、マルトースは1時間以内で劇的にpHが低下したが、G-Xはキシリトールと同様、18時間経過後も中性域のpHを示した。このような観点から、G-Xはキシリトールと同様、虫歯予防の立場から有用な素材となる可能性が示唆された。

### (3) コージビオースとニゲロースの合成

G-1-Pとスクロースとの反応により、転移率は低いながらも転移産物が得られることが示唆された (Fig. 9-15)。他の二糖・三糖を受容体とした時には産物が得られないため、この反応時の転移産物の構造を解析することにした。

a. 分取 G-1-Pを30 g、スクロースを30 g、そしてSPase 4500単位を含む150 mlの100 mM MES緩衝液 (pH 6.9) を、42°Cで23時間反応させた後、100°Cで5分間熱処理して反応を停止した。その反応停止液をロータリーエバポレーターで50 mlまで濃縮し、100 mlの酢酸緩衝液 (pH 5.0) を混合し、残存するスクロースを分解するため、100単位のインベルターゼを加え30°Cで2時間反応させた後、100°Cで5分間熱処理して反応を停止した。その反応停止液を活性炭カラム (5 X 45cm) に供した。2.0リットルの水で未反応の単糖類を溶出した後、1.5リットルの10% (v/v) エタノール溶液で転移産物を溶出した。この画分を濃縮し、



Table VII. Glucan synthesis with several saccharides by GS

Saccharides	Relative activity
Sucrose	100.0
Xylitol	0.0
G-X	0.0
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>	
Sucrose + xylitol	60.4
Sucrose + G-X	57.9

The amounts of water-insoluble glucan synthesized with sucrose were taken as 100%.

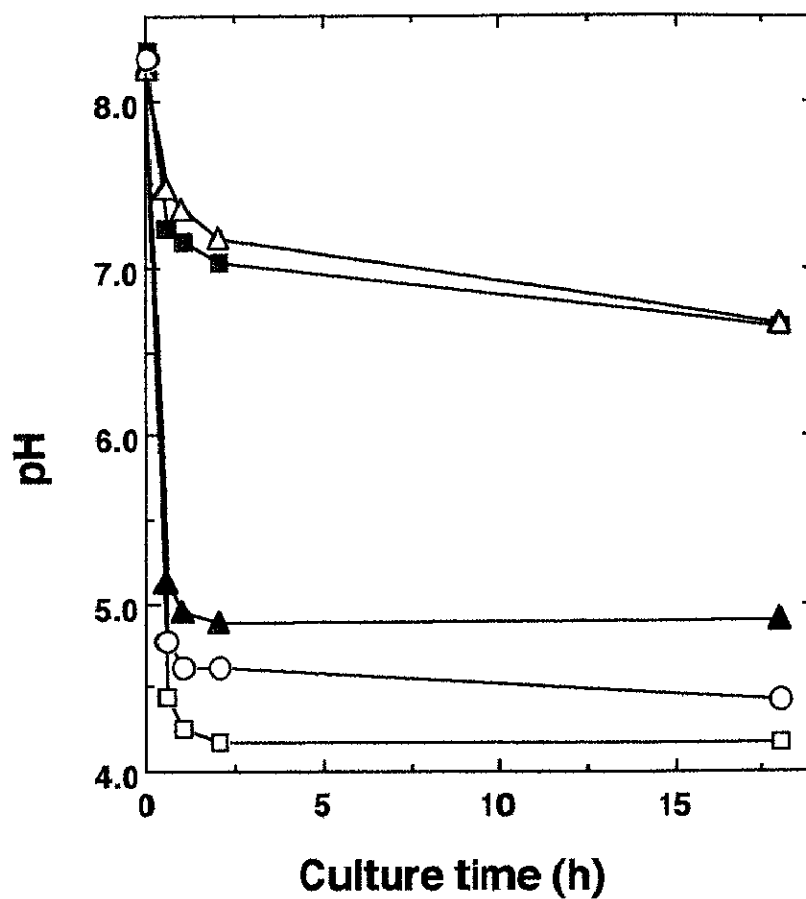


Fig. 11. The course of pH change of cell suspension with various saccharides.

Saccharides used were: (△), G-X; (■), xylitol; (□), sucrose; (▲), D-glucose; (○), D-maltose.

分取用HPLCに供し、約1.2 gの白色粉末を得た。

b. 構造解析 SIMSより分子量342と決定し（データ未提出）、 $\alpha$ -glucosidaseで完全にグルコースに分解されるが、 $\beta$ -glucosidaseでは分解を受けないことより、 $\alpha$ 結合を有するグルコ二糖であることが示唆された。 $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルのアノメリック領域を特に注目して解析した結果、文献値<sup>58)</sup>との比較から、転移産物はコージビオースとニゲロースの混合物であることが明らかになった（Fig. 12）。また、シグナルの強さより、コージビオースとニゲロースの生成比率は、おおよそ2 : 1であると判断された。反応終了液をHPLC分析した結果（Fig. 13-D）も、スクロース、グルコース、フラクトース以外の二つのピークが現れ、これらのピークはその保持時間よりコージビオースとニゲロースであると断定された。また、それらのピーク面積からも、生成比率はおおよそ2 : 1であった。他の $\alpha$ 結合を有するグルコ二糖であるトレハロース、マルトース、イソマルトースの保持時間の位置には有意なピークは存在せず、これらの二糖は生成されないと思われる。

c. 基質の組み合わせによる生成条件 G-1-Pとスクロースという基質の組み合わせ以外の反応で、コージビオースとニゲロースが生成するか否かをHPLC分析した。20%（w/v）濃度の各基質と反応させたところ、スクロースとグルコース、スクロース単独、G-1-Pとグルコースという組み合わせでも、コージビオースとニゲロースが生成することが確認された（Fig. 13-A,B,C）。これらの場合もコージビオースとニゲロースの比は、おおよそ2 : 1であった。基質の組み合わせでの生成効率は、高いほうからスクロースとグルコース>スクロース単独>G-1-Pとグルコース>G-1-Pとスクロースであった。G-1-P単独、あるいは、グルコース単独では、これらの二糖は生成されなかった。

d. 反応の経時変化 各々20%（w/v）濃度のスクロースとグルコースとSPase(5 units)を含む0.2 mlの100 mM MES緩衝液（pH 6.9）の37℃での反応の経時変化

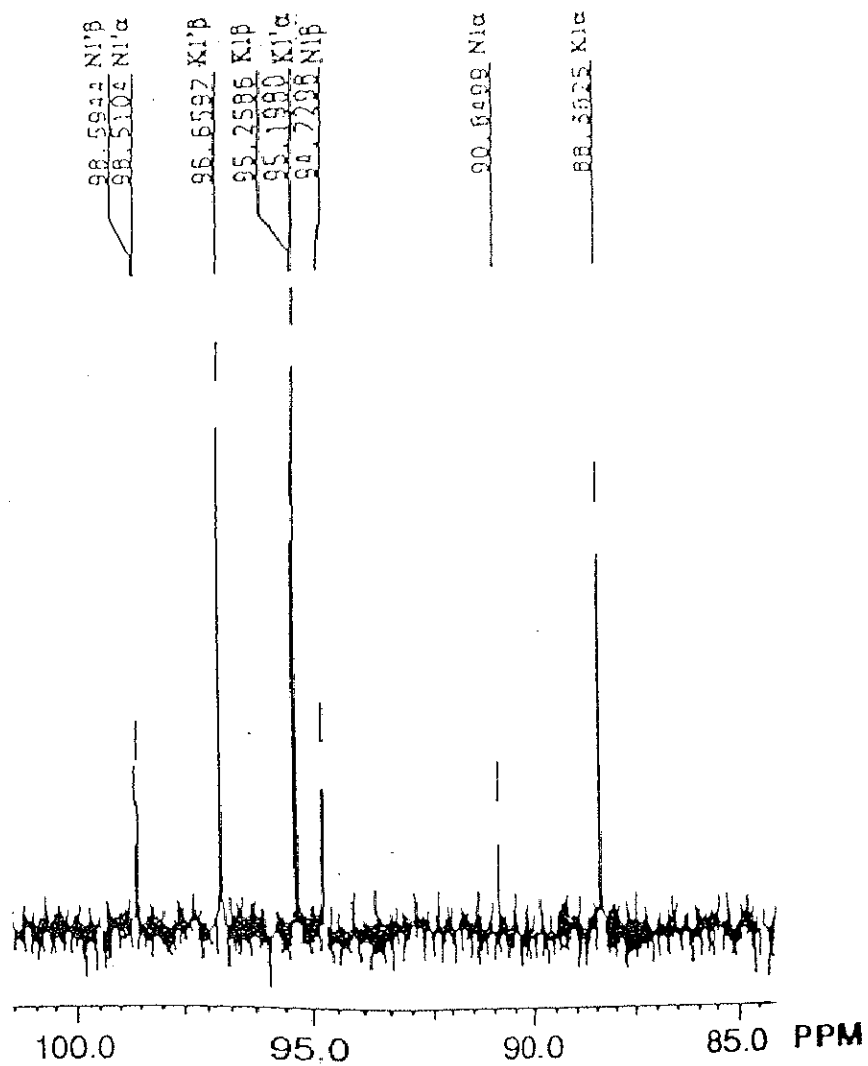


Fig. 12.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of the reaction product in anomeric region.

K, kojibiose; N, nigerose.

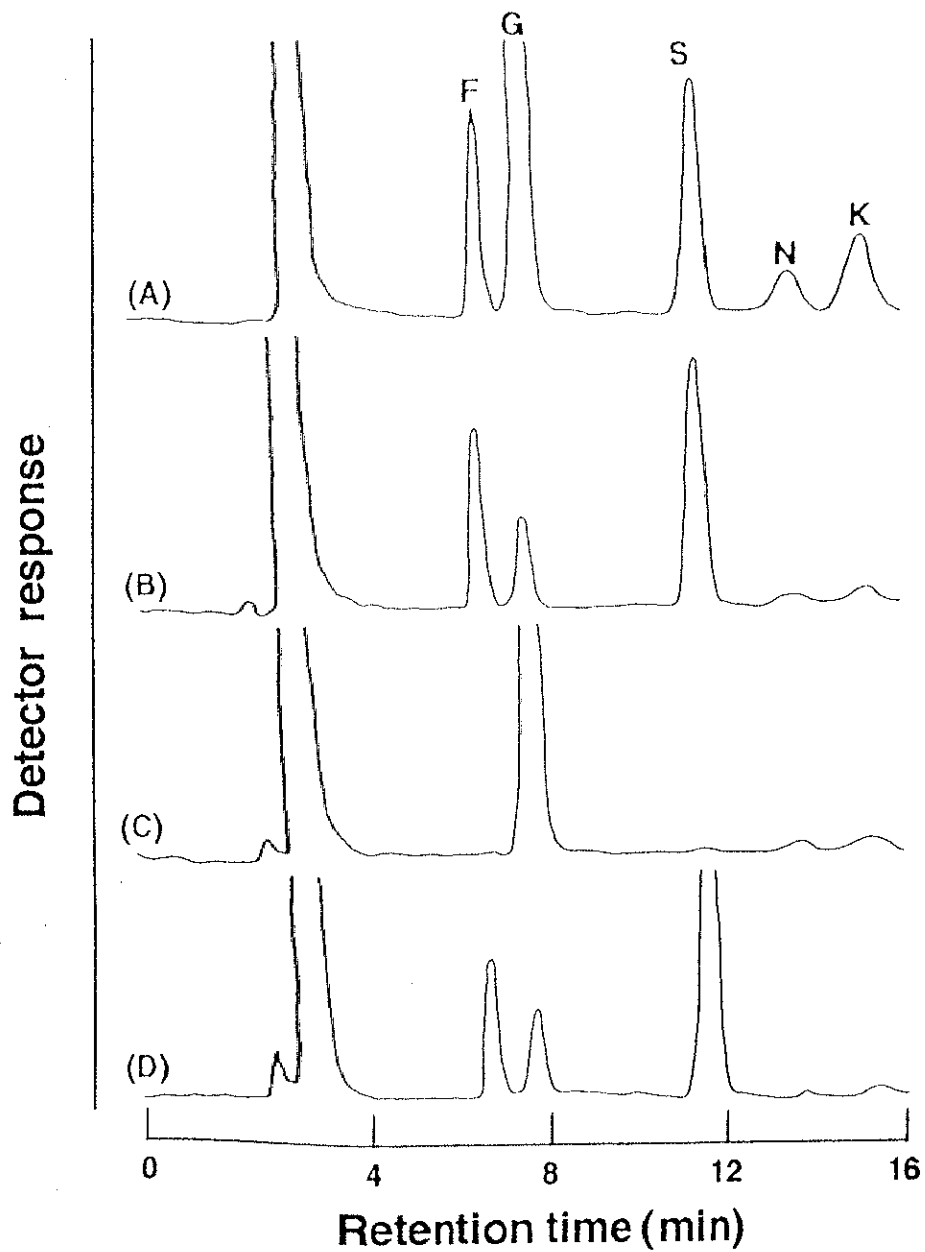


Fig. 13. High performance liquid chromatograms of  $\alpha$ -glucobioses produced by SPase.

Substrates used were: (A), sucrose and D-glucose; (B), sucrose; (C), G-1-P and D-glucose; (D), G-1-P and sucrose. Abbreviations used were: F, D-fructose; G, D-glucose; S, sucrose; K, kojibiose; N, nigerose.

を示した (Fig. 14) 。33時間反応でコージビオースとニゲロースは、反応液に各々7.5、3.5%占めた。一方、スクロースとグルコースは、各々4.9、16.6%であった。フラクトースも、スクロースの加水分解によって時間と共に増加し6.8%であった。グルコースは、受容体として使われ減少するが、その一方、スクロースの加水分解で生成し増加するため、ほぼ変化なく一定であった。

SPaseの糖転移反応によるコージビオースとニゲロースの生成では、"glucosyl-X"が糖供与体となる。例えば"X"がフラクトースの時は、"glucosyl-X"はスクロースとなる。また"X"が無機燐の時は、"glucosyl-X"はG-1-Pとなる。一方、糖受容体は、グルコースである。上記の結果から、供与体の効率としてはG-1-Pよりスクロースの方が生成効率が良いようである。そして反応の初期から受容体であるグルコースが存在する場合と、スクロースが加水分解してからグルコースが反応の場に現れる場合があるが、反応の初期から存在する場合の方が良いということが、基質条件と経時変化の結果からも推察できる。

コージビオースとニゲロースは古くからその存在が知られたグルコ二糖であり、例えば、甘薯スターチの加水分解物<sup>59)</sup>、麴抽出物、酒<sup>60)</sup>、蜂蜜<sup>61)</sup>、麦酒<sup>62)</sup>に存在するという報告があるが、その含有率は低い。また、有機合成手法による報告<sup>63)</sup>も知られているが、工程が複雑で実用的ではない。一方、酵素を用いる方法も $\alpha$ -glucosidaseを用いた報告がいくつかあるが<sup>64,65,66)</sup>、これらの効率はSPaseより低いようである。このことから、SPaseによる方法が一番実用的な製造法と思われる。

### 第3節 要約

G-1-Pを糖供与体、各種糖類を受容体とする逆反応における受容体特異性について、HPLCを用いて詳細に検討した。従来、*P. saccharophila*由来の酵素で報告

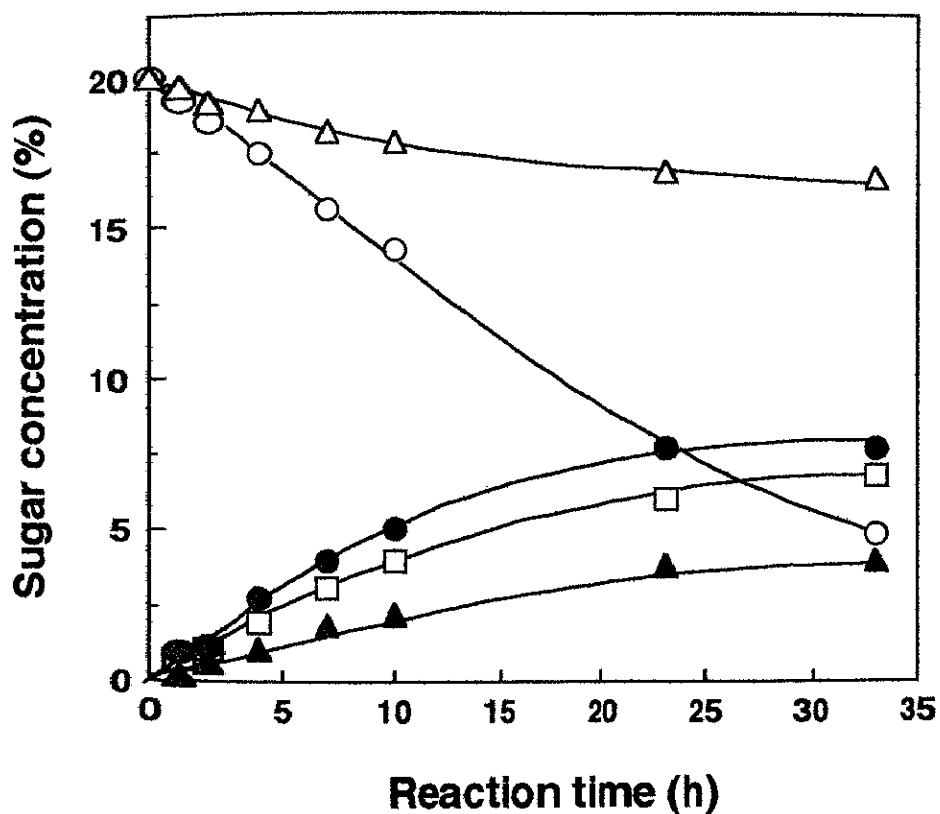


Fig. 14. The course of formation of the saccharides from sucrose and D-glucose by SPase.

Reaction mixture (1.0 ml) containing 200 mg sucrose, 200 mg D-glucose, and SPase (5.0 units) was incubated for the indicated time, at pH 6.9 of 100 mM MES buffer, at 42°C. Symbols used were: ○, sucrose; △, D-glucose; □, D-fructose; ●, kojibiose; ▲, nigerose.

されている糖類以外へも、グルコースが転移された。特に、D、L-arabinitolなど5炭糖のアルコールへ良く転移された。

キシリトールを受容体とした時に生成されるオリゴ糖を活性炭カラムで分離し、構造をSIMS、 $^{13}\text{C}$ -NMRなどで解析した結果、4-O- $\alpha$ -D-glucopyranosylxylitol (G-X)であった。このG-Xは水不溶性グルカンの合成を抑制し、有機酸の生成も抑えることから、虫歯予防効果のあるオリゴ糖として期待される。

G-1-Pを糖供与体、スクロースを受容体として糖転移反応を行ない、生成するオリゴ糖を同じく活性炭カラムで分離し、構造を $^{13}\text{C}$ -NMRやHPLCなどで解析した結果、おおよそ2 : 1の生成比率のコージビオースとニゲロースの混合物であった。これらのグルコ二糖は、スクロースとグルコース、スクロース単独、G-1-Pとグルコースという組み合わせでも生成することが確認された。基質の組み合わせでの生成効率は、高いほうからスクロースとグルコース > スクロース単独 > G-1-Pとグルコース > G-1-Pとスクロースであった。G-1-P単独、あるいは、グルコース単独では、これらの二糖は生成されなかった。また、マルトース、イソマルトース、トレハロースなど他の $\alpha$ -グルコ二糖の生成は確認されなかった。



### 第3章 スクロースホスホリラーゼによるフェノール化合物配糖体の合成

#### 緒言

ベンゼンは6個づつ炭素と水素とからなり、その6個の炭素原子の集合が、単結合と二重結合で交互に結ばれた六角形の環であるベンゼン環で構成されている。主に植物体からの抽出物で芳香性の物質が、このベンゼン環を基本骨格としており、芳香族化合物と定義されている。芳香族化合物とその誘導体は、殺虫剤・医薬品・合成ゴム・プラスチックなど工業製品の重要な素材である。

芳香族化合物は、そのほとんどがフェノール性水酸基をもち、植物から得られるそれらは、フェノール化合物とも呼ばれている。フェノール配糖体も植物体に少量ではあるが広く存在し、その単離・精製に関する報告は数多くなされている。最近、生物活性についての報告とともに、その低毒性故にフェノール性配糖体が医薬品・化粧品のターゲットとして注目されるようになった。

例えば、アルブチン（α-β-D-グルコピラノサイド）は、化粧品素材として抗菌剤・かゆみ止め・酸化防止剤やメラニン生成抑制剤として広く使用されている。特にメラニン生成の鍵酵素であるチロシナーゼの酵素活性を強く阻害することが知られており、肌に対する副作用が少ない美白化粧料として使用されている<sup>67)</sup>。そのアグリコンである hidroキノンも、チロシナーゼ活性阻害能などの生理機能を有しているが、酸素や光に対する安定性が極めて悪く褐色化しやすいこと、生体に投与すると細胞に対する毒性が強いことなど、その用途に制限がある。これらの欠点を解決する一つ的手段として糖を付与することが挙げられ、糖質関連酵素を用いる方法は有力な手段と考えられる。アルブチンはベリー類の植物から見いだされているが、現在では、有機合成的手段<sup>68)</sup>や植物細胞<sup>69)</sup>を用いて生産されている。

SPaseは、第2章において転移対象として糖あるいは糖アルコールなどのアル

コール性水酸基には、かなり幅広い特異性を有していることを述べた。今回、広くその誘導体も含めてベンゼン環を有するフェノール化合物を受容体とした場合の転移パターンをHPLCを用いて検討し、本酵素のフェノール性水酸基に対する特異性を調べることにした。また、ハイドロキノンを受容体とした場合の反応条件を調べ、その時に生成する配糖体の構造を解析し、あわせてその性質をアルブチンと比較して検討した。

## 第1節 実験材料および方法

1. 試薬 SPaseは、第2章と同じく大腸菌1100 (slp-spl-1) 由来の精製酵素を用いた。Saccharomyces sp.由来の $\alpha$ -glucosidaseとスイートアーモンド由来の $\beta$ -glucosidaseも、第2章に記載したものをを用いた。マッシュルーム由来のチロシナーゼはシグマ社から、L-tyrosineは和光純薬から購入した。種々のフェノールおよびその関連物質は、東京化成工業から購入した。全ての試薬は、特級グレードを用いた。
2. SPase活性 SPase活性測定法や定義は、第1章に準じて行なった。
3. 転移反応 50% (w/v) sucrose, 1% (w/v) acceptor phenolと5 unitsのSPaseを含む0.1 mlの100 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) 緩衝液 (pH 7.5) を37°C15時間反応させた。その反応液10 $\mu$ lをHPLC分析をした。
4. HPLC 以下の条件で行った。

カラム : TSKgel ODS-80TM (250 X 4.6 mm i. d.) (Tosoh Co., Ltd.)

カラム温度 : 室温

検出 : V4-absorbance detector (Isco Co., Ltd.)

set at 270 nm-hydroxybenzenes (HBs)

297 nm-benzoic acid (BAD) and hydroxybenzoic acids (HBADs)

307 nm-dihydroxybenzoic acids (DHB ADs)

265 nm-trihydroxybenzoic acids (THBADs)

260 nm-benzyl alcohol (BAL)

275 nm-hydroxybenzyl alcohols (HBALs)

移動相 : 20% (v/v) methanol (pH 2.2 with phosphoric acid)

-dihydroxybenzenes (DHBs)

30% (v/v) methanol (pH 2.2 with phosphoric acid)

-hydroxybenzene (HB, phenol), trihydroxybenzenes (THBs),

BAD, HBADs, BAL and HBALs

流速 : 1.0 ml/min

分取時の条件は以下の通りである。

カラム : CAPCELL PAK C18 SG120 (250 X 20 mm i. d.) (Shiseido Co., Ltd.)

カラム温度 : 室温

検出 : 270 nm

移動相 : 7.5% (v/v) methanol

流速 : 6.0 ml/min

5. TLC 以下の条件で行った。

プレート : シリカゲル60 (メルク社)

移動相 : 酢酸エチル/酢酸/水 = 3 / 1 / 1

検出 : 硫酸/メタノール = 1 / 1 を噴霧し加熱

6. スペクトル分析 SIMS,  $^{13}\text{C}$ -NMRは第2章と同じ方法で行なった。 $^1\text{H}$ -NMR (199.5 MHz) はアセトン溶媒中、テトラメチルシランを内部標準として用いた。

7. 光照射に対する褐色化抵抗性 100 mMのハイドロキノン、あるいはハイドロキノン配糖体水溶液を3.0 ml作製した。次に27Wの蛍光灯の5 cm直下に水溶液を置き、30℃ 7時間照射した。照射条件は、可視光線19,470ルクス、UV強度

(310-400 nm)  $0.13 \text{ mW/cm}^2$ であった。経時的に460 nmの吸光度をShimazu UV-

visible recording spectrometerで測定し、褐色度を検討した。

8.チロシナーゼ活性阻害能 基本的にはSarunoらの方法<sup>70)</sup>に準じて行なった。即ち、0.3 mM L-tyrosine と 35  $\mu$ g のチロシナーゼを 3 mM のインヒビター存在、あるいは非存在下で、3 ml の 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.8) 中、37°C で 5 分間反応させ、475 nm の吸光度の増分を測定した。この 475 nm の吸光度は、チロシナーゼ反応の生成物であるドーパクロム量を反映している。コントロールは、インヒビターの代わりに 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.8) を用いた。阻害活性は、吸光度の減分で算出した。阻害度 (Percentage inhibition) は、 $[(A-A^*)/A] \times 100$  で表わした。A はインヒビター非存在、A\* はインヒビター存在下での 475 nm の吸光度の増分である。

## 第2節 結果および考察

### (1) 受容体特異性

Figure 15 に、代表的なフェノールおよびその誘導体を受容体に用いた時の HPLC クロマトグラムの結果を示した。矢印のピークは、酵素添加しない場合 (Fig. 15-C) には出現しないことから、転移産物と思われる。HPLC の全てのピーク面積中の転移産物のピーク面積の比率 (%) を数値化し、受容体特異性の定量化を行なったものが、Table VIII である。

BAD はフェノール性水酸基が存在せずカルボキシル基のみなので、転移は行なわれない。アルコール性水酸基 (ヒドロキシメチル基) のみを有する BAL へは転移したが、フェノール性水酸基のみを有する HB よりは効率が低かった。

HBAL 類では二つの転移産物が現れ、このことは SPase がフェノール性、アルコール性両水酸基へ転移する可能性が示唆された。

受容体効率は、DHB 類では、1,2-DHB (カテコール) > 1,4-DHB (ヒドロキノン) > 1,3-DHB (レゾルシノール) の順であった。また HBAL 類では、2-HBAL

>4-HBAL>3-HBALの効率順で、それぞれの官能基（フェノール性、アルコール性水酸基）とフェノール性水酸基との立体配座が、ortho->para->meta-の順であることが判明した。これに対して、HBAD類では、2-HBAD>3-HBAD>4-HBADの順で、カルボキシル基とフェノール性水酸基との立体配座が、ortho->meta->para-の順であり、多少の違いが見られた。また、フェノール性水酸基が三つ隣接した構造を有する2,3,4-THBADや3,4,5-THBADでは、効率が低い傾向にあった。

## (2) ハイドロキノンを受容体とする配糖体の合成

a. 反応条件 ハイドロキノンの $\beta$ 結合配糖体であるアルブチンは、美白化粧品に使用されている<sup>67)</sup>。その結合異性体である $\alpha$ 結合配糖体の性質を調べることを目的として、まず、その合成条件である反応のpH、温度、スクロース濃度、酵素量の検討を行なった。通常、転移効率を上げるためには、受容体濃度を上げることが鉄則であるが、フェノール化合物は蛋白変性作用を有し、濃度が高くなると酵素が失活するため、ここではハイドロキノン濃度を一律1% (w/v) に固定して実験を行なった。

pHの影響は、50 mgのスクロース、1 mgのハイドロキノンと5単位のSPaseを含む0.1 mlの100 mM MES緩衝液 (pH 6.2-7.3) あるいはHEPES緩衝液 (pH 6.8-8.2) 中、42°Cで15時間反応させ、転移産物であるハイドロキノン配糖体の量をHPLCにより求めた。転移率は、用いたハイドロキノンのモル数に対する、配糖体のモル数の比で表わした。配糖体のモル数は、便宜上、アルブチンを標準として、HPLCピーク面積から求めた。Figure16-Aに示したように、pH 7.5で最大の転移率を示した。第2章の逆反応時や*P. saccharophila*の逆反応の至適pH 6.3<sup>11)</sup>とは大きな開きがあり、このことは反応pHをうまくコントロールすれば、一度生成した産物の逆反応による分解を防ぎ、生成産物が蓄積する可能性が示唆された。

温度の影響は、50 mgのスクロースと1 mgのハイドロキノンおよび5単位のSPaseを含む0.1 mlの100 mM HEPES緩衝液 (pH 7.5) 中、各温度で15時間反応さ

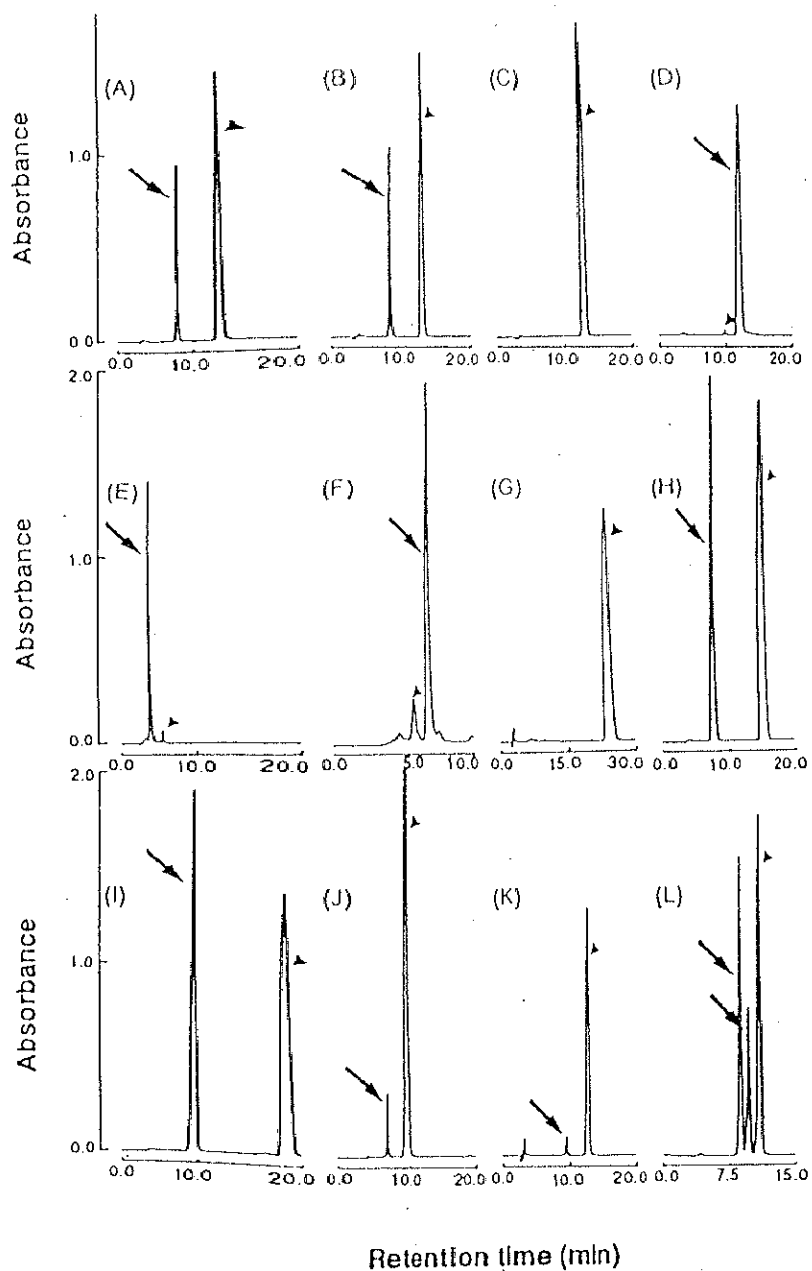


Fig. 15. High performance liquid chromatograms of reaction products. Acceptors used were: A-C, HB; D, 1,2-DHB; E, 1,4-DHB; F, 1,2,3-THB; G, BAD; H, 3-HBAD; I, 2,3-DHBAD; J, 2,3,4-THBAD; K, BAL; L, 2-HBAL. Enzymes used were: A, D-L, from *E. coli* 1100 (slp-spl-1); B, from *L. mesenteroides*; C, no enzyme. Arrows and closed triangles show the peaks that were considered to be the transfer products and acceptor phenolic compounds, respectively.

Table VIII. Acceptor specificity of SPase for phenolic and related compounds

Acceptor	Transfer efficiency <sup>1)</sup>
HB	22.90
1,2-DHB	90.09
1,3-DHB	13.51
1,4-DHB	82.15
1,2,3-THB	80.11
1,3,5-THB	12.47
BAD	0.00
2-HBAD	69.12
3-HBAD	31.57
4-HBAD	5.16
2,3-DHBAD	43.53
2,4-DHBAD	9.77
2,5-DHBAD	23.92
2,6-DHBAD	0.00
3,4-DHBAD	19.93
3,5-DHBAD	29.80
2,3,4-THBAD	4.50
2,4,6-THBAD	26.30
3,4,5-THBAD	10.18
BAL	3.92
2-HBAL	32.94, 16.81
3-HBAL	4.08, 1.53
4-HBAL	5.28, 4.60

1) Transfer efficiency was expressed as the percentage of peak area of the transfer product against that of total compounds.

せて転移率の比較を行なった。Figure16-Bに示したように、40℃付近で最大の転移率を示した。

スクロース濃度の影響は、各濃度のスクロースと1 mgのヒドロキノンおよび5単位のSPaseを含む0.1 mlの100 mM HEPES緩衝液 (pH 7.5) 中、37℃で15時間反応させて転移率の比較を行なった。Figure16-Cに示したように、50% (w/v) の濃度において最大の転移率を示し、それ以上の濃度ではあまり変化がなかった。

酵素量の影響は、50 mgのスクロースと1 mgのヒドロキノンおよび0-10単位のSPaseを含む0.1 mlの100 mM HEPES緩衝液 (pH 7.5) 中、37℃で15時間反応させて転移率の比較を行なった。Figure16-Dに示したように、ヒドロキノン1 mg当たり5単位のときほぼ最大の転移率を示した。それ以上の酵素添加量での転移産物の顕著な増加は見られなかった。

受容体にヒドロキノン以外に、カテコールやレゾルシノールを含む三種類のDHBを用いて、pH 7.5、温度37℃、スクロース濃度50% (w/v)、そしてDHB 1 mg当たり5単位のSPaseという条件での経時的変化をFig. 17に示した。その結果、反応時間の経過とともに転移率は上昇していくが、20時間でほぼ最大に達し、その後の伸びは見られなかった。

b. 分取 50 gのスクロースと2 gのヒドロキノンおよび500単位の大腸菌1100 (slp-spl-1) 由来のSPaseを含む100 mlの100 mM HEPES緩衝液 (pH 7.5) 中、37℃で8時間反応させた。反応終了液を活性炭カラム (4 X 35 cm) に供した。1.5リットルの水で非吸着糖類を溶出した後、2リットルの20% (v/v) エタノールで転移産物と未反応のヒドロキノンを溶出した。この画分を濃縮し、分取用 ODS-HPLCカラムに供し、転移産物の画分を集め、凍結乾燥した。2.3 gの白色粉末を得、HPLC的に単一かつシンメトリックなピークを示した。この産物をHQGと名付けた。

c. 構造解析 SIMSの結果、272という値が得られた (データ未提出)。α-



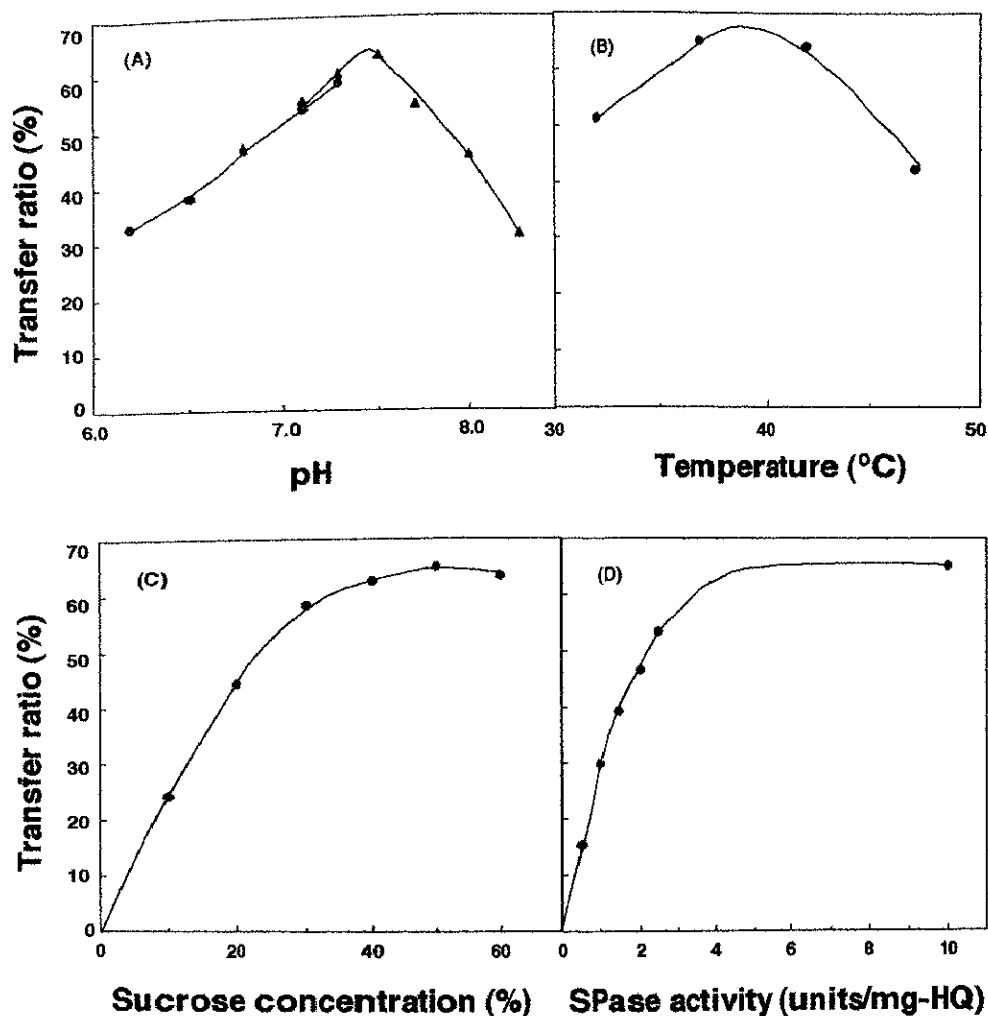


Fig. 16. Optimization of the reaction conditions on glycosylation of hydroquinone with SPase.

(A) Effect of pH: Reaction mixture (0.1 ml) containing 50 mg sucrose, 1 mg hydroquinone, and SPase (5.0 units) was incubated for 15 h, at various pHs of 100 mM MES (●) and 100 mM HEPES (▲), at 42°C.

(B) Effect of temperature: Reaction mixture (0.1 ml) containing 50 mg sucrose, 1 mg hydroquinone, and SPase (5.0 units) was incubated for 15 h, at pH 7.5, at various temperatures.

(C) Effect of sucrose concentration: Reaction mixture (0.1 ml) containing various concentrations of sucrose, 1 mg hydroquinone, and SPase (5.0 units) was incubated for 15 h, at pH 7.5, at 37°C.

(D) Effect of SPase activity: Reaction mixture (0.1 ml) containing 50 mg sucrose, 1 mg hydroquinone, and various activities of SPase was incubated for 15 h, at pH 7.5, at 37°C. Transfer ratio was expressed as the percentage of the amount of the transfer product (mole) against that of initial hydroquinone (mole). The amount of the transfer product was calculated from the peak area on HPLC using the calibration curve of arbutin.

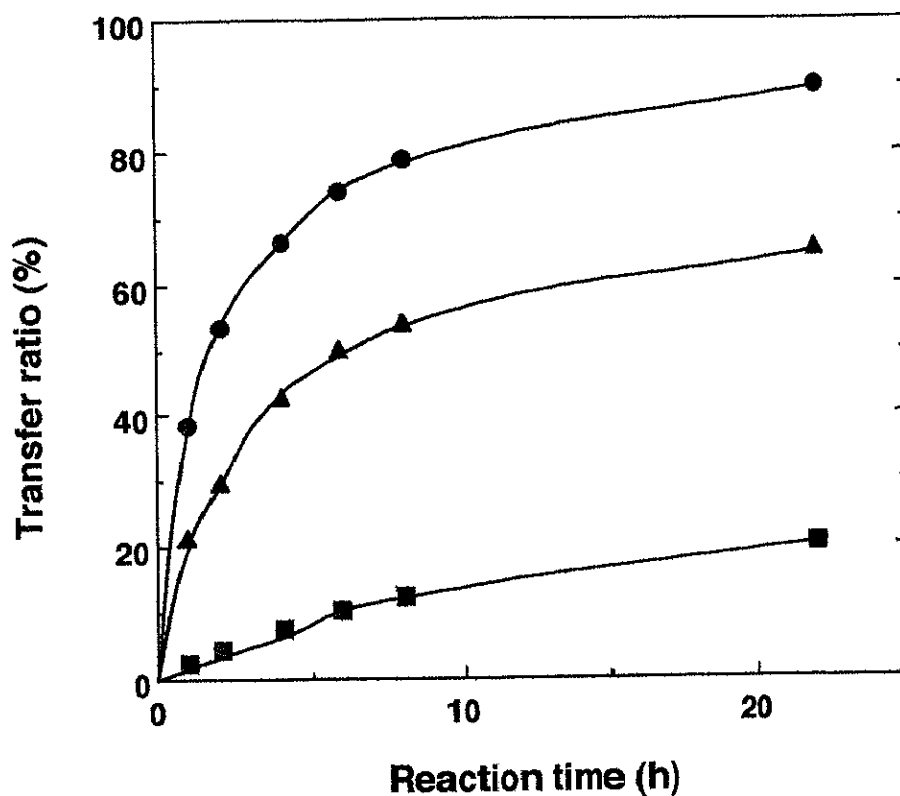


Fig. 17. The course of glycosylations of dihydroxybenzenes with SPase.

Reaction mixture (0.1 ml) containing 50 mg sucrose, 1 mg catechol (●), resorcinol(▲), or hydroquinone (■), and SPase (5.0 units) was incubated for the indicated time, at pH 7.5, at 42°C. Transfer ratio was calculated from the peak area of the transfer product on HPLC as described in Fig. 16.

Glucosidaseによってヒドロキノンとグルコースが遊離するが、 $\beta$ -glucosidaseでは遊離されなかった (Fig. 18)。これらの結果より、転移産物はヒドロキノンとグルコースが1モルずつ $\alpha$ 結合していることが判明した。 $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルをDMSO溶媒中で求め、分析値をアルブチンと比較してTable IXにまとめた。その結果、ヒドロキノン分子内のシグナルは、HQGとアルブチンではほぼ一致した。残りのグルコース分子内のシグナルにおいて、アノメリックカーボンである1'のシグナルが、アルブチンでは102.0 ppmであるのに対し、HQGで99.5 ppmであり、転移産物は $\alpha$ 結合であることが確認された。したがって、HQGは、hydroquinine O- $\alpha$ -D-glucopyranoside ( $\alpha$ -arbutin)と決定した (Fig. 19)。

#### d. 性質の検討

ア、褐色化抵抗性 ヒドロキノンは、水溶液中で光照射により重合し褐色化することが知られている。Table X-Aに示したように、ヒドロキノンは、7時間照射で着色するが、HQGは、7時間経過後もほとんど着色せず、アルブチンと同程度に安定であることが判明した。

イ、チロシナーゼ活性阻害能 Table X-BのようにHQGはアルブチンと同程度、チロシナーゼ活性を阻害するが、ヒドロキノンより阻害能はいくらか弱かった。

フェノール配糖体の製造法は、有機合成では、 $\alpha$ 、 $\beta$ 両配糖体が合成されるが、収率は各々11, 4%と低い<sup>68)</sup>。また、植物細胞を用いた製造法もアルブチン<sup>69)</sup>以外に、サリチル酸グルコサイドなど効率良く生産されている<sup>71)</sup>が、植物培養細胞からの精製に難点がある。一方、酵素的合成は種々報告されているが、このなかでは Penicillium citrinum 由来のガラクタナーゼ<sup>72)</sup>によるフェノール- $\beta$ -ガラクトサイドの生成は比較的特異性が広く効率も良いようである。しかし、SPaseで効率が良かった2-HBADや2,3-DHBADへは転移しない。またレゾルシノールを受容体とした場合の効率を比較したところ、SPaseのほうが生成効率が良いよう

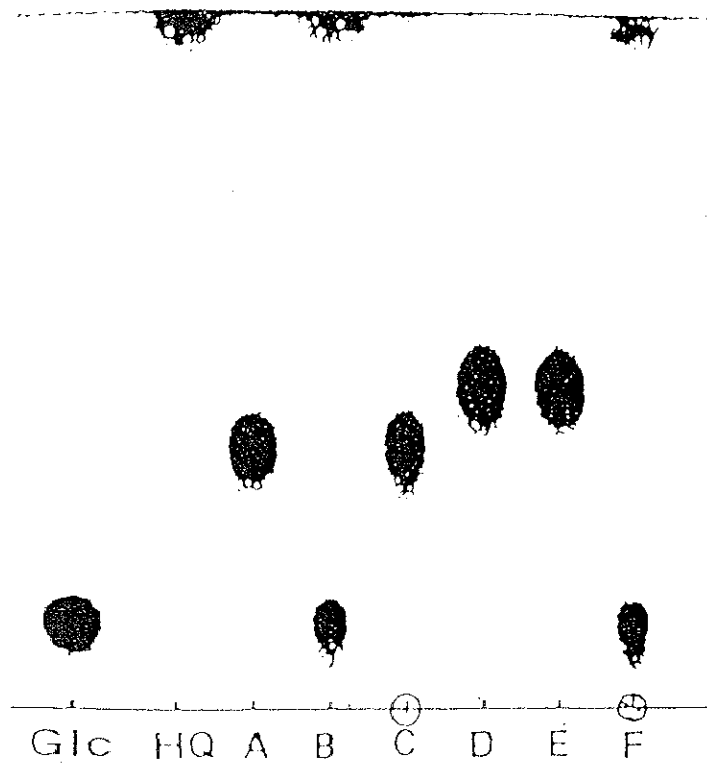


Fig. 18. Thin-layer chromatogram of the enzymatic hydrolysates of hydroquinone glucosides.

Abbreviations used were: Glc, D-glucose; HQ, hydroquinone; A, transfer product; B, transfer product by  $\alpha$ -glucosidase; C, transfer product by  $\beta$ -glucosidase; D, arbutin; E, arbutin by  $\alpha$ -glucosidase; F, arbutin by  $\beta$ -glucosidase.

Table IX.  $^{13}\text{C}$ -NMR Data of hydroquinone glucosides

Position	HQG	Arbutin
Hydroquinone carbon		
1	152.5	152.4
2	118.9	117.9
3	115.7	115.6
4	150.2	150.5
5	115.7	115.6
6	118.9	117.9
Glucopyranose carbon		
1'	99.5	102.0
2'	71.9	73.5
3'	73.6	77.1
4'	70.3	70.1
5'	73.3	76.8
6'	61.0	61.0

Values are given in  $\delta$  ppm.

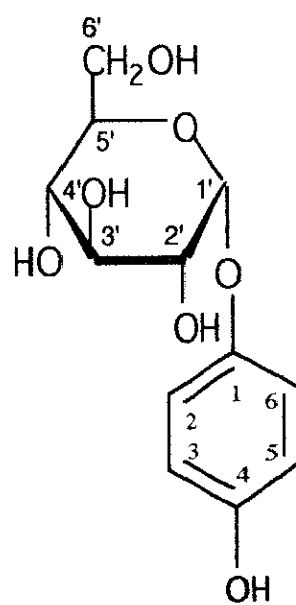


Fig. 19. Proposed structure of the transfer product.

Table X. Some properties of hydroquinone and hydroquinone glucosides

Compounds	(A) Browning resistance $\Delta A_{460}^1$	(B) Inhibitory effects on tyrosinase activity Percentage inhibition <sup>2)</sup>
Hydroquinone	1.498	97.2
Arbutin	0.025	82.0
$\alpha$ -Arbutin	0.052	72.8

1) The solution (3.0 ml) containing 0.3 mM hydroquinone and its glucosides was placed under a fluorescent light (27 W) with a distance of 5 cm and irradiated continuously for 7 h at 30°C. The increase in absorbance at 460 nm ( $\Delta A_{460}$ ) was monitored.

2) Inhibitory effects on tyrosinase activity were measured basically as described by Saruno *et al.* <sup>70)</sup> Percentage inhibition was expressed as  $[(A-A^*)/A] \times 100$ , where A and A\* were absorbances in the absence or presence of the inhibitor, respectively.

である。E. coli, Bacillus circulans, Aspergillus oryzae, Penicillium multicolor 由来の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ<sup>72)</sup>やLyophyllum ulamarium由来のキシラーゼ<sup>73)</sup>を用いた場合は、フェノール性水酸基よりアルコール性水酸基への特異性が高いようである。これらのことから、SPaseが現在のところ最もフェノール配糖体の合成に適した酵素であると思われる。

アルブチンは、チロシナーゼ活性阻害能以外にも免疫賦活効果<sup>74)</sup>や脂質過酸化に対する抗酸化能<sup>75)</sup>などの報告がある。構造の類似性から、HQGも同様の効果があると思われる。また、他の合成されたフェノール配糖体も種々の生理活性があると期待される。

### 第3節 要約

各種フェノールおよびその関連化合物を受容体とした場合、SPaseは、かなり幅広い特異性を示した。特に、官能基（フェノール性水酸基、アルコール性水酸基、カルボキシル基）とフェノール性水酸基との立体配座が、ortho-の構造を有する化合物への転移効率が高かった。また、フェノール性水酸基が三つ隣接した構造を有する化合物では、効率が低い傾向にあった。

ハイドロキノンを受容体とした時の反応効率は、pH 7.5、温度40℃、スクロース濃度50% (w/v)、そしてハイドロキノン1 mg当たり5単位のSPaseという条件が良いことが明らかとなった。50 gのスクロースと2 gのハイドロキノンおよび500単位のSPaseを含む反応液中、37℃で8時間反応させ、2.3 gの転移産物を活性炭カラム、分取用ODS-HPLCカラムを用いて分取精製した。この転移産物の構造は、hydroquinine  $\alpha$ -D-glucopyranoside ( $\alpha$ -arbutin)であった。この $\alpha$ -arbutinはアルブチンと同程度に、褐色化抵抗性・チロシナーゼ活性阻害能を有していた。



## 第4章 スクロースホスホリラーゼによるカテキン類配糖体の合成

### 緒言

カテキン類はポリフェノール化合物で、多くのフェノール性水酸基を有する構造をしており、縮合型タンニンの基本骨格である。その存在は古くから知られており、日本では茶に多く含まれる天然素材として有名である。また、その生理活性も茶のカテキンを中心によく調べられており、抗酸化能<sup>76)</sup>を始めとして、抗突然変異効果<sup>77)</sup>・抗腫瘍活性<sup>78)</sup>・抗菌活性<sup>79)</sup>・虫歯予防効果<sup>80)</sup>・アンジオテンシン変換酵素活性抑制効果<sup>81)</sup>・血清コレステロールレベル調整効果<sup>82)</sup>や血小板凝集抑制活性<sup>83)</sup>などが明らかとなっている。しかし、カテキン類は水に対して大変溶けにくく、例えば(+)-catechinでは水1 mlに対して1 mg程度しか溶解しない。また、酸素や光に対する安定性が極めて悪く、褐色化しやすい<sup>84)</sup>ことも知られており、その用途に制限がある。これらの欠点を解決する一つの手段として、糖を付与することが挙げられよう。

SPaseは、糖・糖アルコールなど、アルコール性水酸基へかなり幅広い特異性を有していることを第2章において述べた。また、フェノールおよびその関連化合物のフェノール性水酸基に対する特異性が幅広く、糖転移効率が高いことを第3章で述べた。今回、フェノール化合物の範疇ではあるが、ポリフェノール化合物と総称されるカテキン類に対する特異性を検討することにした。また、(+)-catechinとカテキン類の中で一番生理活性が強いとされる(-)-epigallocatechin gallateを受容体とした場合の反応条件を調べ、その時に生成する配糖体の構造を解析し、あわせてその性質の検討を行った。

### 第1節 実験材料および方法

1. 酵素・試薬 SPaseは、第3章と同じく大腸菌1100 (slp-spl-1) 由来の精製酵素

を用いた。Saccharomyces sp.由来の  $\alpha$ -glucosidase、スイートアーモンド由来の  $\beta$ -glucosidase、マツシユルム由来のチロシナーゼ、そして、L-Tyrosineは、第3章で記載したものをを用いた。L- $\beta$ -3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-dopa) は、和光純薬から購入した。種々の茶由来のカテキン類である、(+)-catechin (C)、(-)-epicatechin (EC)、(-)-epigallocatechin (EGC)、(-)-epicatechin gallate (ECg)、および(-)-epigallocatechin gallate (EGCg) は、栗田工業から購入した。Sephadex LH-20は、ファルマシアから購入した。その他全ての試薬は、特級グレードを用いた。

2.SPase活性 SPase活性の測定法と定義は、第1章に準じて行なった。

3.転移反応 30% (w/v) sucrose, 1% (w/v) acceptor catechinと5 unitsのSPaseを含む0.1 mlの100 mM HEPES緩衝液 (pH 7.5) を42°Cで15時間反応させた。その反応液 10  $\mu$  lをHPLCで分析した。

4.HPLC 以下の条件で行った。

カラム :  $\mu$  BondapakTM (150 X 3.9 mm i. d.) (Waters Division of Millipore)

カラム温度 : 室温

検出 : 280 nm with V4-absorbance detector (Isco Co., Ltd.)

移動相 : acetonitrile / ethyl acetate / 0.05% (v/v) phosphoric acid = 12 / 2 / 86  
(v / v / v)

流速 : 1.0 ml/min

分取時の条件は以下の通りである。

カラム : CAPCELL PAK C18 SG120 (250 X 20 mm i. d.) (Shiseido Co., Ltd.)

カラム温度 : 室温

検出 : 280 nm

移動相 : 7.5% (v/v) methanol

流速 : 5.0 ml/min

5.スペクトル分析 SIMSは、第2章に準じて行なった。<sup>13</sup>C-NMR、<sup>1</sup>H-

NMR (199.5 MHz) は、アセトン溶媒中でテトラメチルシランを内部標準として測定した。

6. 光照射に対する褐色化抵抗性 0.1% (w/v) のサンプル水溶液を 3 ml 作製し、27 W の蛍光灯の 5 cm 直下にその水溶液を置き、25℃で 7 時間照射した。照射条件は、可視光線 14,600 ルクス、UV 強度 (310-400 nm) 0.12 mW/cm<sup>2</sup> であった。経時的に 460 nm の吸光度を Shimazu UV-visible recording spectrometer で測定し、その吸光度から褐色度を算出した。

7. 水に対する溶解性 各濃度の水溶液を調製し、0.45 μm のメンブランフィルター (ミリポア) の通過液を上記 HPLC で定量した。各々のサンプルについて、HPLC のピーク面積より検量線を作製して定量した。

8. 抗酸化能 20 ppm のリボフラビンに 2500 ppm のサンプルを混合し、褐色化抵抗性と同じく蛍光灯照射し、残存するリボフラビン量を HPLC で測定した。この時の HPLC の条件は、以下の通りである。

カラム : CAPCELL PAK C18 SG120 (250 X 4.6 mm i. d.) (Shiseido Co., Ltd.)

カラム温度 : 室温

検出 : 266 nm

移動相 : methanol / 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5.5) = 35 / 65

流速 : 1.0 ml/min

9. チロシナーゼ活性阻害能 基本的には Saruno らの方法<sup>70)</sup> に従い、第 3 章のように行なった。

## 第 2 節 結果および考察

### (1) 受容体特異性

5 種類のカテキン類を受容体に用いた時の HPLC クロマトグラムの結果を示し

(Fig. 20)、受容体特異性の定量化を行なった。スクロースが反応液に存在しない場合、または酵素を添加しない場合には、矢印のピークが出現しなかった

(Fig. 20-D, (+)-catechinを受容体として用いた場合) ことから、これらが転移産物と思われる。全てのカテキン類が受容体となり得、主な転移産物はECとEGCgでは2種類であるが、他のカテキン類では1種類であった。転移産物量は、分子吸光係数は異なるが、便宜上、(+)-catechinの転移産物である(+)-catechin-glucoside (CG) のHPLCピーク面積から求めた検量線より算出することにした。各カテキン類の受容体特異性を転移率から比較したものが、Table XIである。転移率は、用いた受容体カテキンのモル数に対する、転移産物のピーク面積から算出されたモル数の比で表した。

全てのカテキン類が転移率40%以上と効率良く転移された。転移効率は高い順から、ECg=C>EC>EGCg>EGCであった。ガロカテキンであるEGCgとEGCは、ピロガロール環にフェノール性水酸基が三つ隣接した構造を有しており、転移効率が若干落ちるようである。この傾向は、第3章のフェノール化合物を用いた検討で、2,3,4-THBADや3,4,5-THBADでは効率が低い、という結果と一致した。

## (2) (+)-catechinを受容体とする配糖体の合成

a. 反応条件 (+)-catechinを受容体として、反応のpH、温度、スクロース濃度、酵素量の検討を行なった。(+)Catechinは水に溶けにくいため、メタノールに50% (w/v) となるよう溶解し、終濃度を一律1% (w/v) として反応させた。

pHの影響は、30 mgのスクロース、1 mgの(+)-catechinと5単位のSPaseを含む0.1 mlの100 mM MES緩衝液 (pH 6.2-7.3) あるいはHEPES緩衝液 (pH 6.8-8.2) 中で、42°Cで15時間反応させて、転移産物であるCGをHPLCより求めて、転移率の比較を行なった。Figure 21-Aに示したように、pH 7.5で最大の転移率を示し、この値は、第3章のヒドロキノンを受容体とした時の条件と一致した。逆反応時の至適pH 6.3とは大きな開きがあり、このことは反応pHをうまくコントロー

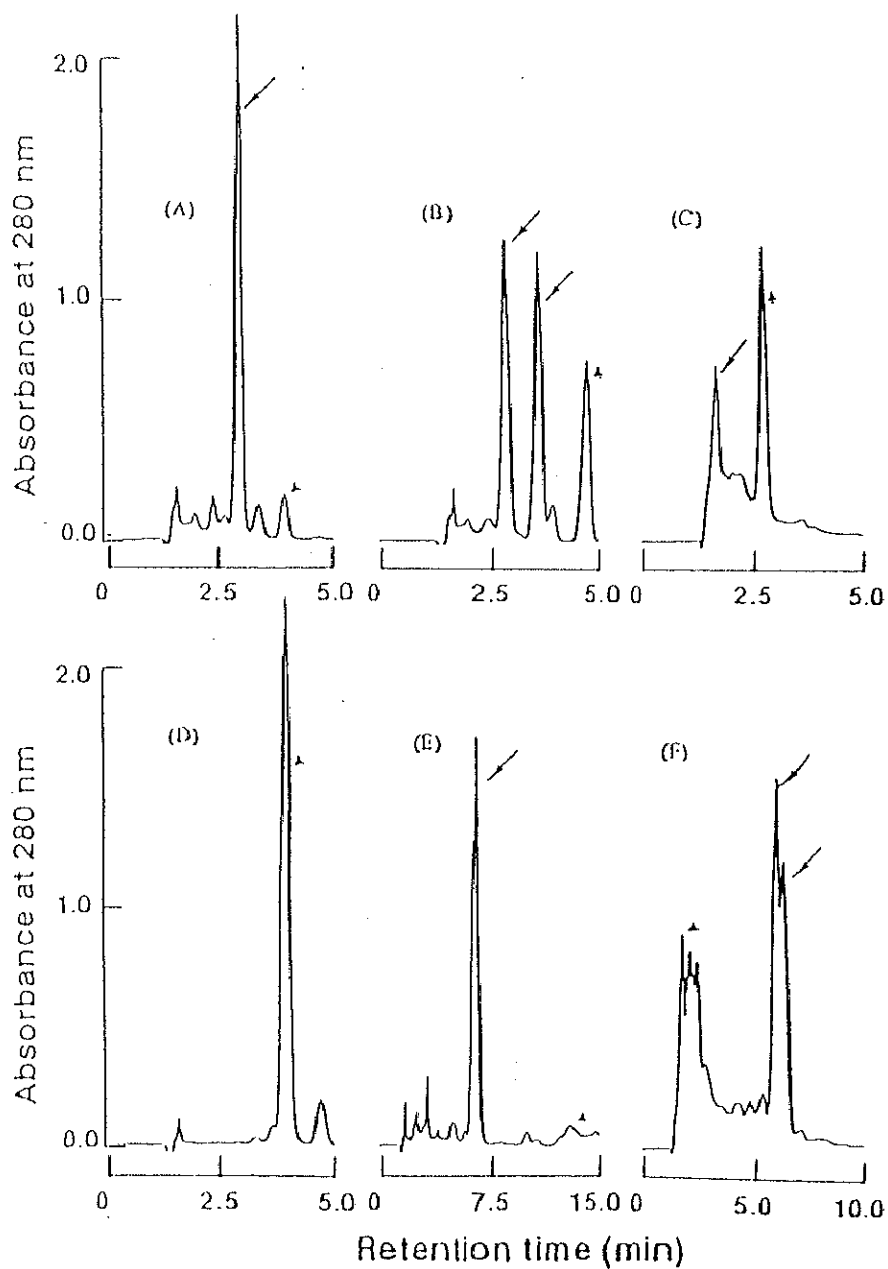


Fig. 20. High performance liquid chromatograms of reaction products with SPase on the mixture of sucrose as a donor and catechins as acceptors.

Acceptors used were: A, (+)-catechin; B, (-)-epicatechin; C, (-)-epigallocatechin; D, (+)-catechin (no enzyme); E, (-)-epicatechin gallate; F, (-)-epigallocatechin gallate. Arrows and closed triangles show the peaks of the transfer products and acceptor catechins, respectively.

Table XI. Transfer products to catechins by SPase

Acceptor	Transfer ratio (%) <sup>1)</sup>
(+)-Catechin	81.0
(-)-Epicatechin	36.2, 32.4
(-)-Epigallocatechin	40.2
(-)-Epicatechin gallate	84.2
(-)-Epigallocatechin gallate	35.3, 27.4

1) Transfer ratio was expressed as the percentage of the amount of the transfer product (mole) against that of initial catechin (mole). The amount of the transfer product was calculated from the peak area of the transfer product on HPLC using the calibration curve of (+)-catechin-glucoside.

ルすれば、一度生成した産物が逆反応による分解を防ぐことが可能となり、生成産物の蓄積が示唆される。

温度の影響は、30 mgのスクロース、1 mgの(+)-catechinと5単位のSPaseを含む0.1 mlの100 mM HEPES緩衝液 (pH 7.5) 中、各温度で15時間反応させて転移率の比較を行なった。Figure 21-Bに示したように、42°C付近で最大の転移率を示した。

スクロース濃度の影響は、各濃度のスクロース、1 mgの(+)-catechinと5単位のSPaseを含む0.1 mlの100 mM HEPES緩衝液 (pH 7.5) 中、42°Cで15時間反応させて、転移率の比較を行なった。Figure 21-Cに示したように、30% (w/v) の濃度において最大の転移率を示した。それ以上の濃度ではむしろ低下する傾向にあった。

酵素量の影響は、30 mgのスクロース、1 mgの(+)-catechinと0-10単位のSPaseを含む0.1 mlの100 mM HEPES緩衝液 (pH 7.5) 中、42°Cで15時間反応させて、転移率の比較を行なった。Figure 21-Dに示したように、(+)-catechin 1 mg当たり5単位のときにはほぼ最大の転移率を示した。それ以上の酵素添加量では、むしろ低下する傾向にあった。

pH 7.5、温度42°C、スクロース濃度30% (w/v)、そして(+)-catechin 1 mg当たり5単位のSPaseという条件での経時的变化を、Fig. 22に示した。その結果、反応時間の経過とともに転移率は上昇していくが、10時間でほぼ最大に達し、その後平衡になり、25時間以降はわずかながら下降する傾向にあった。

b. 分取 30 gのスクロース、0.1 gの(+)-catechin、2% (v/v) のメタノールと500単位のSPaseを含む100 mlの100 mM HEPES緩衝液 (pH 7.5) 中で、42°Cで15時間反応させた。反応終了液をSephadex LH-20カラム (3 X 30 cm) に供した。1リットルの水で糖類を除去した後、1リットルの50% (v/v) メタノールで転移産物と未反応の(+)-catechinを溶出した。この画分を濃縮し、分取用ODS-HPLCに供し、

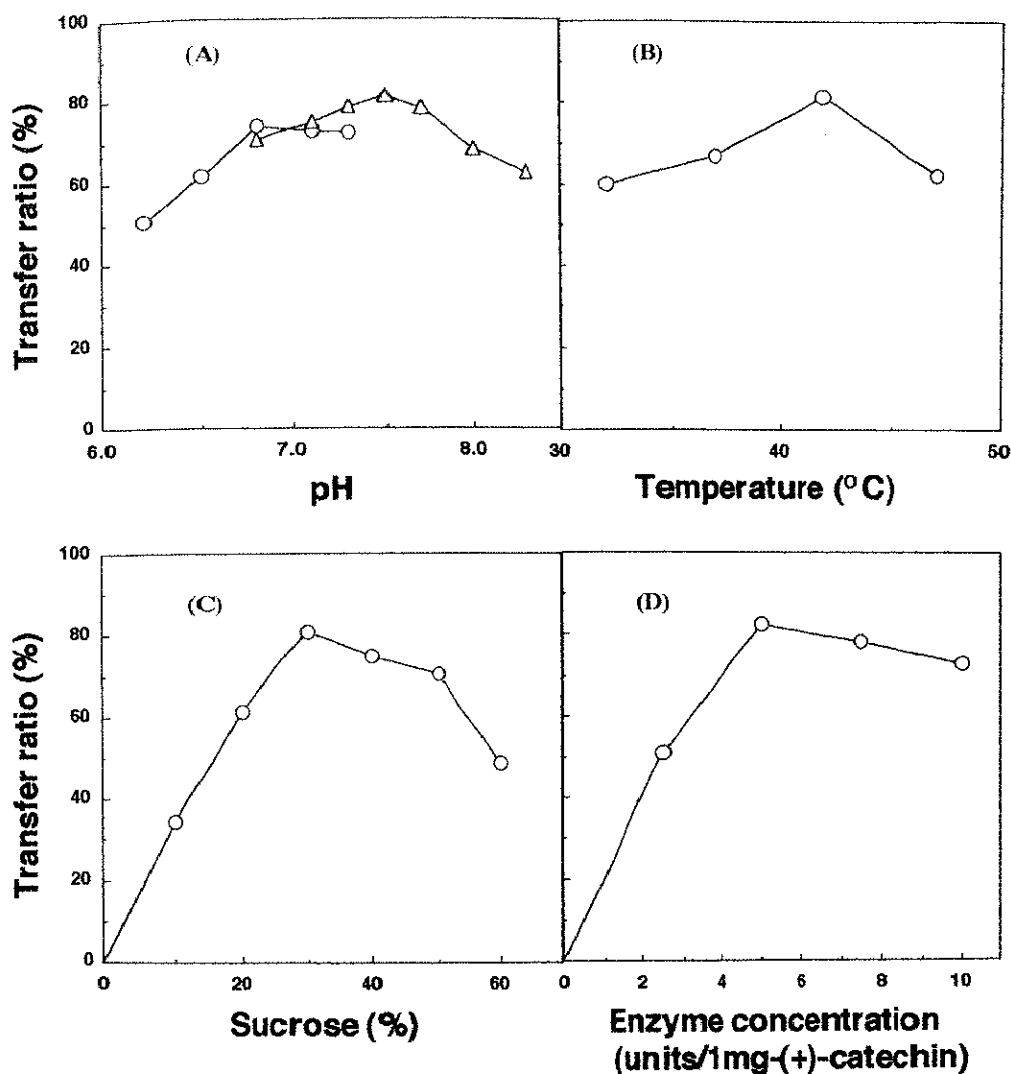


Fig. 21. Optimization of the reaction conditions on glycosylation of (+)-catechin with SPase.

(A) Effect of pH: Reaction mixture (0.1 ml) containing 30 mg sucrose, 1 mg (+)-catechin and SPase (5.0 units) was incubated at various pHs of 100 mM MES (○) and 100 mM HEPES (△), at 42°C, for 15 h.

(B) Effect of temperature: Reaction mixture (0.1 ml) containing 30 mg sucrose, 1 mg (+)-catechin and SPase (5.0 units) was incubated at pH 7.5, at various temperatures, for 15 h.

(C) Effect of sucrose concentration: Reaction mixture (0.1 ml) containing various concentrations of sucrose, 1 mg (+)-catechin and SPase (5.0 units) was incubated at pH 7.5, at 42°C, for 15 h.

(D) Effect of SPase activity: Reaction mixture (0.1 ml) containing 30 mg sucrose, 1 mg (+)-catechin and various activities of SPase was incubated at pH 7.5, at 42°C, for 15 h.

The transfer ratio was calculated from the peak area of the transfer product on HPLC as described in Table XI.



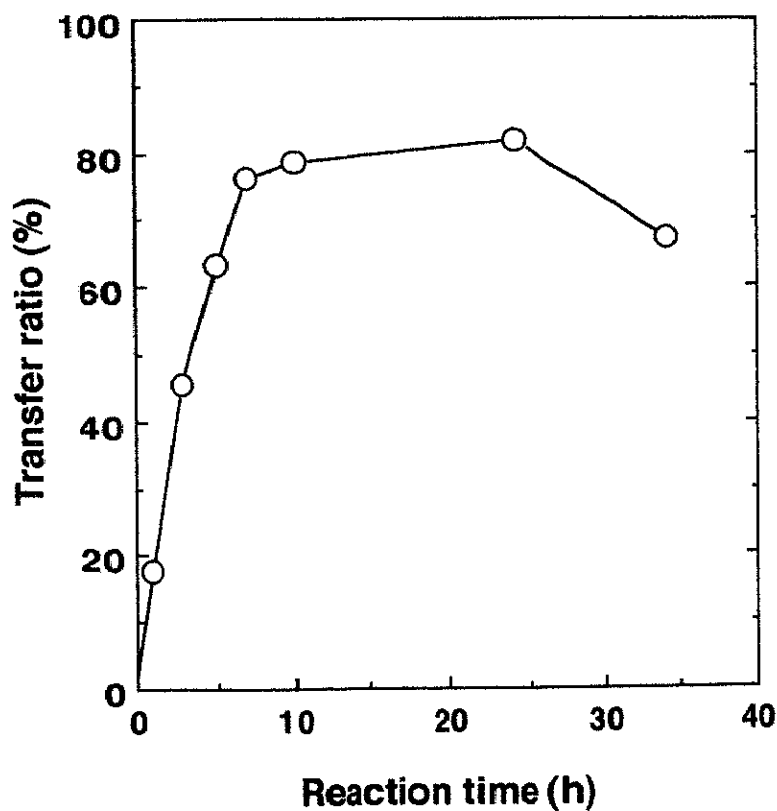


Fig. 22. The course of transglycosylation to (+)-catechin with SPase.

SPase (5 units/ mg-(+)-catechin) was incubated with 30 % (w/v) sucrose and 1% (w/v) (+)-catechin, at 42°C, pH 7.5 for the indicated time. The transfer ratio was calculated from the peak area of the transfer product on HPLC as described in Table XI.

転移産物の画分を集め、凍結乾燥した。約150 mgの白色粉末を得、HPLC的に単一かつシンメトリックなピークを示した。

c. 構造解析 SIMSの結果、452という値が得られた(データ未提出)。 $\alpha$ -Glucosidaseによって(+)-catechinが遊離するが、 $\beta$ -glucosidaseでは遊離されなかった(Fig. 23)。これらの結果より、転移産物は(+)-catechinとグルコースが1モルずつ $\alpha$ 結合していることが判明した。

アセトン溶媒中でNMRスペクトルを求めた分析値をTable XIIにまとめた。 $^1\text{H}$ -NMRでは、標準の(+)-catechin<sup>85)</sup>との比較において、7.30 ppmと7.04 ppmのシグナル値が、(+)-catechinより0.40 ppmと0.28 ppm低磁場側へシフトしていた。これらのシグナルは、各々、H-2'とH-6'であり、これらのシフトは、ピロガロール基の3'位にグルコシル基が導入された可能性を示唆している。一方、グルコースの1位のアノメリックシグナルである5.23 ppmのカップリング定数は、 $J=3.7$  Hzであり、 $\beta$ 結合時の定数6-9 Hzより小さいため、 $\alpha$ 結合と確定した。

$^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルでは、125.1、120.5、117.1 ppmの三つのシグナルが重要となるので、selective spin decoupling実験を行ない、詳細な検討を加えた。全て(+)-catechin分子に属し、125.1 ppmはC-6'、120.5 ppmはC-2'、117.1 ppmはC-5'と同定された。(+)-Catechinと<sup>85)</sup>の比較において、120.5 ppmのC-2'、125.1 ppmのC-6'、149.9 ppmのC-4'のシグナルは、各々、4.7、4.8、3.6 ppm低磁場側へシフトしていた。これらの解析結果を統合すると、転移産物は(+)-catechin 3'-O- $\alpha$ -D-glucopyranoside (CG)と決定され(Fig. 24)、ピロガロール環の3'位にグルコースが転移されていた。

ピロガロール環に三つのフェノール性水酸基を有するガロカテキンでは、転移効率が若干落ちることからも、他のカテキン類でもこの環に転移されていることが予想される。

d. 性質の検討

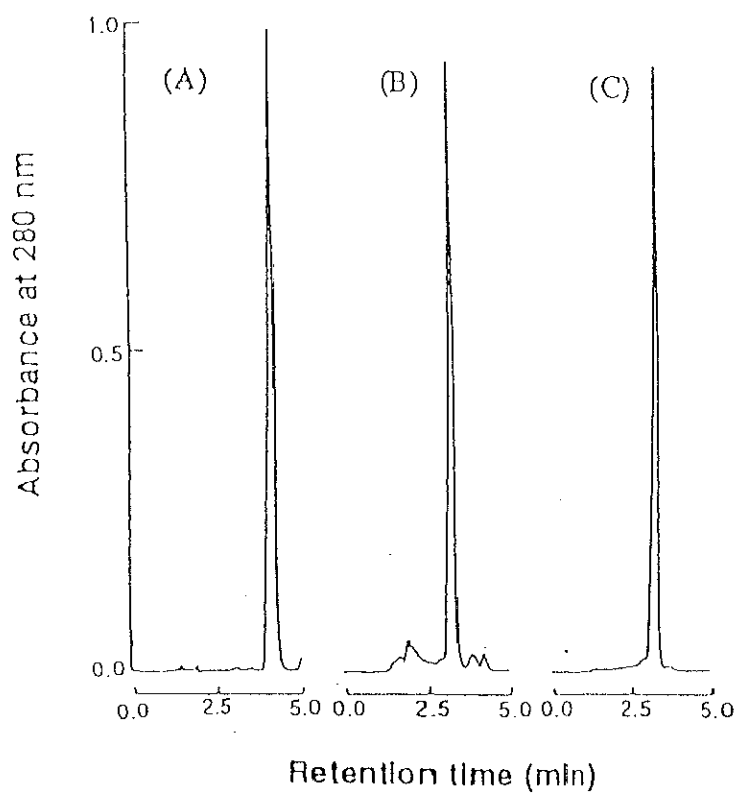


Fig. 23. High performance liquid chromatography analyses of the release of (+)-catechin from the transfer product.

The transfer product was hydrolyzed by  $\alpha$ -glucosidase (A),  $\beta$ -glucosidase (B), and not hydrolyzed (C), respectively.

Table XII. NMR data of (+)-catechin-glucoside

Position <sup>1)</sup>	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> C-NMR
2	4.57 (d, J=8.1 Hz)	83.3 (d)
3	3.47-4.07 (m)	69.1 (d)
4	2.54 (dd, J=16.1, 8.8 Hz) 2.98 (dd, J=16.1, 5.6 Hz)	29.7 (t)
5	-	157.8 (s) <sup>2)</sup>
6	5.89 (d, J=2.3 Hz)	97.1 (d)
7	-	157.5 (s) <sup>2)</sup>
8	6.03 (d, J=2.3 Hz)	96.3 (d)
9	-	158.4 (s) <sup>2)</sup>
10	-	101.5 (s)
1'	-	132.5 (s)
2'	7.30 (d, J=1.7 Hz)	120.5 (d)
3'	-	146.7 (s)
4'	-	149.9 (s)
5'	6.85 (d, J=8.3 Hz)	117.1 (d)
6'	7.04 (dd, J=8.3, 1.7 Hz)	125.1 (d)
1''	5.23 (d, J=3.7 Hz)	103.1 (d)
2''	3.47-4.07 (m)	73.8 (d)
3''	3.47-4.07 (m)	75.1 (d)
4''	3.47-4.07 (m)	72.1 (d)
5''	3.47-4.07 (m)	75.4 (d)
6''	3.47-4.07 (m)	63.2 (t)

1) The numbers in position correspond to those shown in Fig. 24.

2) Assignments may have to be reversed.

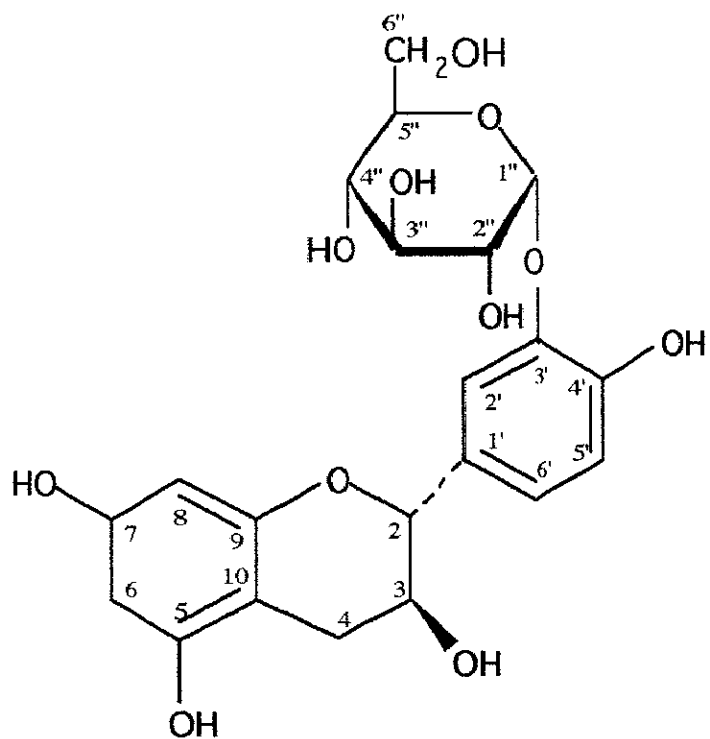


Fig. 24. Proposed structure of the transfer product.

ア、抗酸化能 Figure 25-Aにその結果を示す。リボフラビン量は、(+)-catechinやCGが存在しない場合には時間の経過とともに低下していくが、CGが存在すると(+)-catechinと同様、リボフラビン量は変化せず、この条件では、CGは、(+)-catechinと同程度の抗酸化能を有すると判断した。

イ、水に対する溶解性 (+)-Catechinは、ほとんど水に溶解しないが(1 mg/ml)、CGは、50 mg/mlまで溶解し、約50倍上昇した(Fig. 25-B)。

ウ、褐色化抵抗性 (+)-Catechinは、水溶液中で光照射により重合し褐色化することが知られている。Figure 25-Cに示したように、(+)-catechinは、4時間以降急激に着色していくが、CGは、8時間経過後もほとんど着色せず安定であることが判明した。(+)-Catechinの光酸化重合は、ピロガロール環で起こっており<sup>84)</sup>、CGは、この環にグルコースが導入されていることより、重合を抑制し、安定であると考えられた。

エ、チロシナーゼ活性阻害能 L-TyrosineとL-dopa両基質を用いた場合のチロシナーゼ活性の阻害能をまとめたのが、Table XIIIである。CGは、どちらの基質を用いた場合でも、チロシナーゼ活性を約50%程度阻害することが判明した。また、L-dopaを基質に用いた場合のチロシナーゼに対する阻害様式をLineweaver-Burkプロット(Fig. 26)から求めたところ、拮抗阻害であった。これは、元の(+)-catechinが逆にチロシナーゼの基質であることから、CGは基質アナログとなり、チロシナーゼ活性中心を取り合う形になると考えられた。

CGの酵素的合成は、Bacillus maceransのCGTaseによりSPaseと同じくピロガロール環の3'位にグルコースが $\alpha$ 結合した配糖体を合成した報告<sup>86)</sup>がある。この場合、グルコースの重合度が異なる複数の混合物として反応産物が得られ、CGを得るためには適切な条件でグルコアミラーゼ処理をする必要がある。なお、転移効率は、SPaseの場合の方が高かった。

(3) (-)-epigallocatechin gallateを受容体とする配糖体の合成

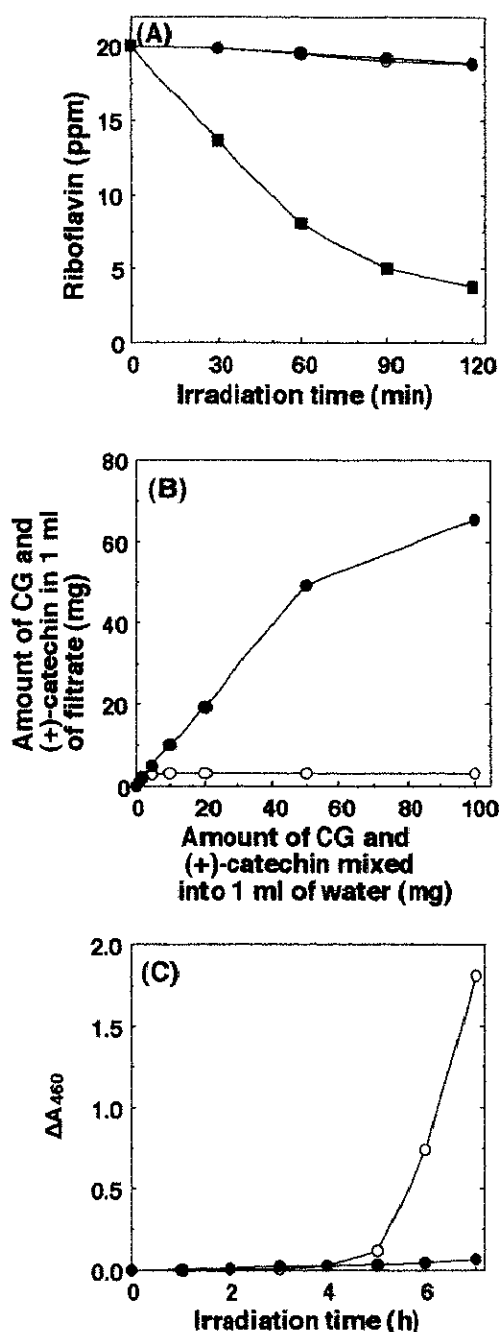


Fig. 25. Some properties of CG.

(A) Antioxidative activity in an aqueous system using riboflavin. Riboflavin (60  $\mu\text{g}$ ) dissolved in 3.0 ml of tap water was irradiated with (+)-catechin (○), CG (●) or without antioxidant (■). Remaining riboflavin was checked by HPLC.

(B) Solubility in water. Various amounts of (+)-catechin (○) or CG (●) mixed with 1 ml of tap water were filtered through a 0.45- $\mu\text{m}$  membrane filter and checked by HPLC.

(C) Browning resistance to light irradiation. A solution (3.0 ml) containing 0.1% (w/v) (+)-catechin (○) or 0.1% (w/v) CG (●) was irradiated, and the absorbance at 460 nm was continuously monitored.

Table XIII. The Inhibitory effect of CG on tyrosinase activity

Substrate	Percentage Inhibition <sup>1)</sup>
L-Tyrosine	57.0
L-Dopa	42.3

1) Percentage Inhibition was measured as described in Table X.



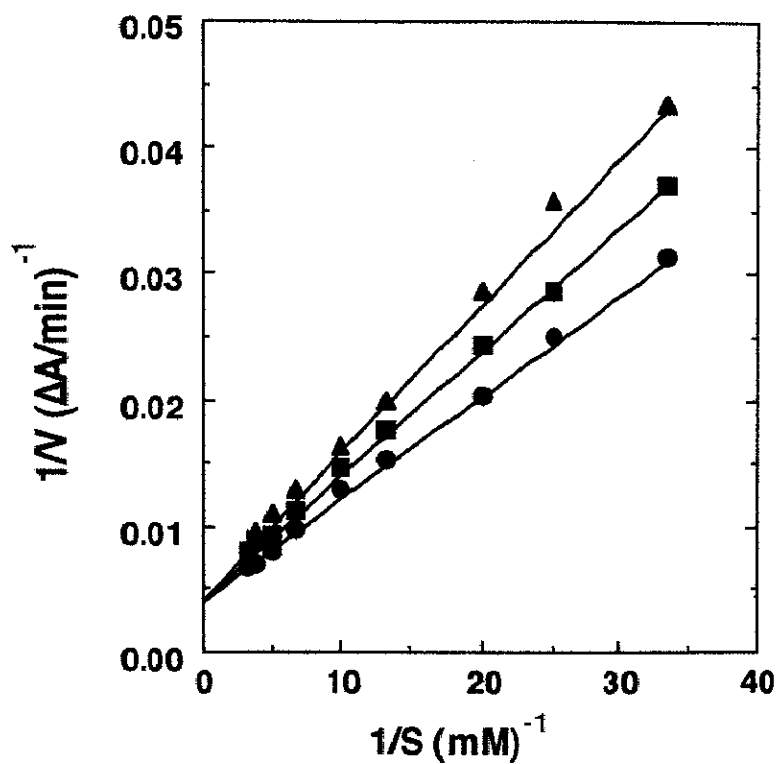


Fig. 26. Lineweaver-Burk plots for oxidation of L-dopa by tyrosinase in the presence of CG.

Concentration of CG was 0 mM (●), 0.5 mM (■), and 1.0 mM (▲).

a. 反応条件 Figure 20-Fに示したように、EGCgへの主な転移産物は、二つであった。この二つのピークのうち保持時間の長い方をG-1、短い方をG-2とした。EGCgより短い保持時間に存在する複数のピークは、酵素反応させなくても出現することから、EGCg自身の自動酸化産物と思われる。二つの転移産物の分別定量はFig. 20のHPLCの条件では困難なため、移動相の組成を変更し、Fig. 27のようなHPLCプロフィールで検討をした。

(+)-Catechinを受容体に用いた場合には転移反応の至適pHは7.5付近だったが、この結果は、(+)-catechinが比較的アルカリpH側で安定であるためである。EGCgは、pHがアルカリ側で不安定とされているので、EGCgを受容体に用いた場合のpHの影響を調べてみることにした。

30 mgのスクロース、2% (v/v) のメタノール、1 mgのEGCgと5単位のSPaseを含む0.1 mlの100 mM MES緩衝液 (pH 6.0, 6.5) あるいはHEPES緩衝液 (pH 7.0, 7.5) 中で、42°Cで15時間反応させ、転移産物であるEGCg配糖体量をHPLCより求めて転移率の比較を行なった (Fig. 28)。その結果、G-1がG-2より先に合成されていくが、その後、逆転した。4種類のpHの中では、pHは6.0が安定なためか、転移率が良く、以降の実験ではpH 6.0を選択した。

b. 分取 30 gのスクロース、0.1 gのEGCg、2% (v/v) のメタノールと500単位のSPaseを含む100 mlの100 mMのMES緩衝液 (pH 6.0) 中で、42°Cで15時間反応させた。反応終了液をSephadex LH-20カラム (3 X 30 cm) に供した。1リットルの40% (v/v) のエタノール水溶液で糖類と未反応のEGCgを除去した後、1リットルずつの40% (v/v) から70% (v/v) エタノール濃度勾配で転移産物を溶出した。転移産物画分を濃縮し、分取用ODS-HPLCカラムに供し、転移産物の画分を集め、凍結乾燥した。100 mgのEGCgより、G-1は約30 mg、G-2は約50 mg得られた。これらの配糖体の純度はHPLC的に単一かつシンメトリックなピークを示した。

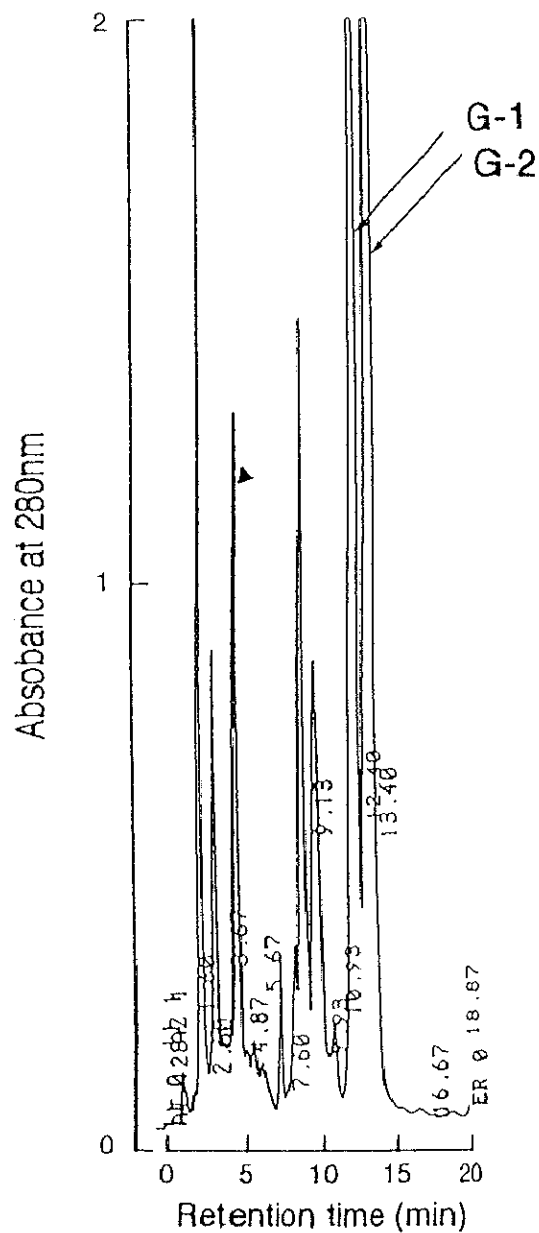


Fig. 27. High performance liquid chromatogram of reaction products with SPase on the mixture of sucrose as a donor and EGCg as an acceptor.

HPLC analysis was done under the following conditions: column, CAPCELL PAK C18 SG120 (250 X 4.6 mm i. d.); detection, 280 nm; column temperature, ambient temperature; mobile phase, 25% methanol (pH 2.2); and flow rate, 1.0 ml/min. Arrows and closed triangle show the peaks of the transfer products and acceptor EGCg, respectively.

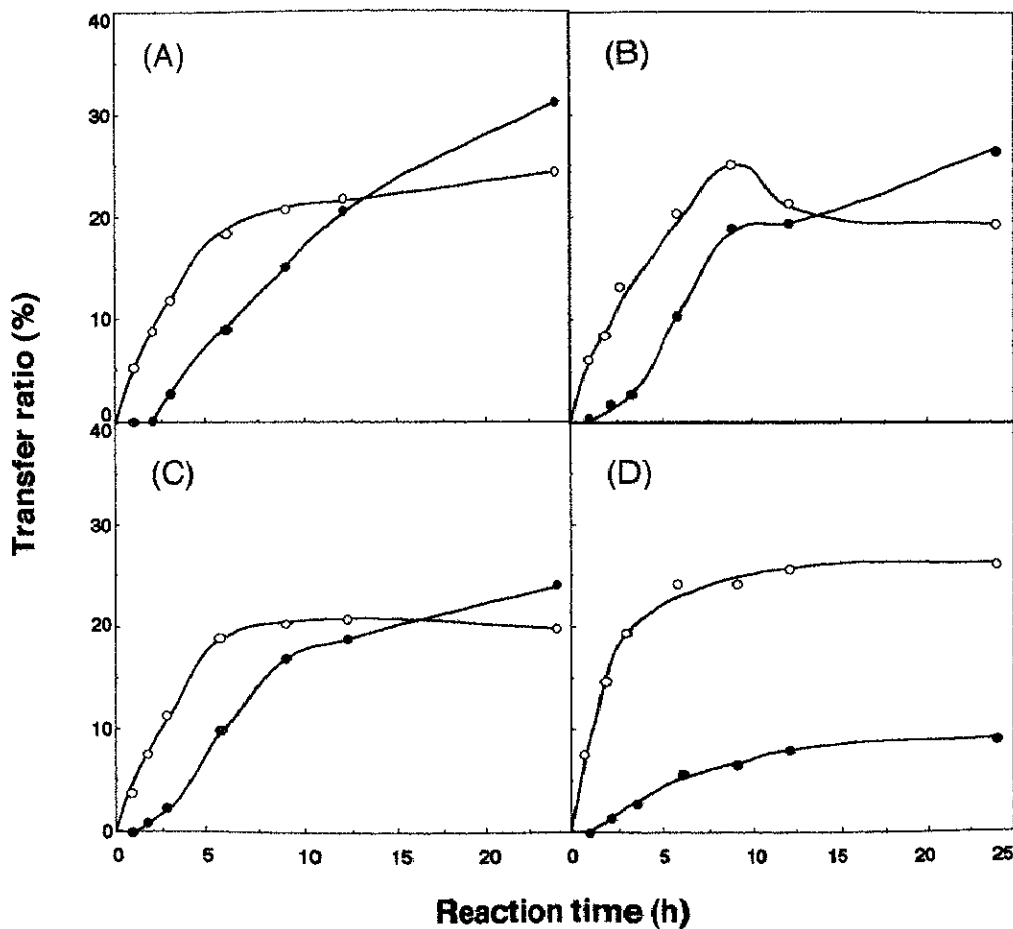


Fig. 28. The course of transglucosylation to EGCg with SPase.

SPase (5 units/ mg-(+)-catechin) was incubated with 30% (w/v) sucrose and 1% (w/v) EGCg, at 42°C, at pH 6.0 (A), 6.5 (B), 7.0 (C), or 7.5 (D) for the indicated time. Symbols used were: (○), EGCgG-1 and (●), EGCgG-2. Transfer ratio is indicated in Table XI.

c. 構造解析 SIMSの結果、G-1は620、G-2は782という値が得られ（データ未提出）、G-1はグルコースが1個、G-2はグルコースが2個EGCgと結合した配糖体と予想された。UVスペクトルでは、G-1はEGCgと大差がなかったが、G-2は短波長側へシフトしていた。IRスペクトルでは、EGCgと違いG-1・G-2とも糖由来のアルコール性水酸基に特有な $3400\text{ cm}^{-1}$ 付近に幅広い吸収帯が存在した（データ未提出）。

アセトン溶媒中で $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを求めた分析値をTable XIVにまとめた。G-1は1', 3', 5'のシグナル値が大きく低磁場側へシフトしており、ピロガロール環に存在する4'位へグルコースが結合していることが示唆された。一方、G-2は1', 1'', 3', 3'', 5', 5''のシグナル値が大きく低磁場側へシフトし、G-1と同じくピロガロール環とガロイル基に存在する4', 4''位へグルコースが結合していることが示唆された。また、 $^1\text{H}$ -NMRスペクトルより、G-1のアノメリックプロトンのカップリング定数が $J=3.9\text{ Hz}$ であることより、(-)-epigallocatechin gallate 4'- $\alpha$ - $\underline{\text{D}}$ -glucopyranosideと判定した。一方、G-2のアノメリックプロトン（2本）のカップリング定数が $J=3.6, 3.9\text{ Hz}$ であることより、(-)-epigallocatechin gallate 4', 4''- $\alpha$ - $\underline{\text{D}}$ -diglucopyranosideと判定した。(+) -Catechinと同じようにピロガロール環のフェノール性水酸基への転移が起こり、次に同じ水酸基3個のガロイル環へ転移するようである。これらの構造式をFig. 29に示したが、これらは、新規物質である。

#### d. 性質の検討

ア、抗酸化能 CGの時と同様、リボフラビンの光酸化分解に対する非分解物残存量をHPLCで測定することによって、抗酸化能の指標とした。Figure 30-Aに示したように、G-1あるいはG-2非存在下では、時間の経過とともにリボフラビン量が低下していくが、G-1とG-2はEGCgと同様、リボフラビン量に変化がなく、この条件ではG-1とG-2はEGCgと同等の抗酸化能を有すると判断した。

イ、水に対する溶解性 EGCgは $20\text{ mg/ml}$ 程度しか水に溶解しないが、G-1は

Table XIV.  $^{13}\text{C}$ -NMR data of epigallocatechin gallate glucosides

Position <sup>a</sup>	EGCg	G-1	G-2
EGCg carbon			
2	78.8 (d)	78.7 (d)	78.5 (d)
3	70.0 (d)	71.0 (d)	70.5 (d)
4	27.3 (t)	27.3 (t)	27.2 (t)
4a	99.9 (s)	99.8 (s)	99.5 (s)
5 <sup>b</sup>	158.1 (s)	158.1 (s)	158.1 (s)
6	97.3 (d)	96.0 (d)	97.4 (d)
7 <sup>b</sup>	157.8 (s)	157.6 (s)	157.5 (s)
8	96.6 (d)	95.0 (d)	96.6 (d)
8a <sup>b</sup>	158.5 (s)	158.4 (s)	158.5 (s)
1'	131.5 (s)	137.8 (s)	137.8 (s)
2'	107.6 (d)	109.1 (d)	107.4 (d)
3' <sup>c</sup>	146.6 (s)	151.7 (s)	151.7 (s)
4'	133.9 (s)	135.5 (s)	135.5 (s)
5' <sup>c</sup>	146.9 (s)	151.7 (s)	152.0 (s)
6'	107.6 (d)	109.1 (d)	107.4 (d)
1''	122.7 (s)	122.5 (s)	128.9 (s)
2''	110.8 (d)	109.1 (d)	110.6 (d)
3'' <sup>c</sup>	146.6 (s)	146.6 (s)	151.7 (s)
4''	139.5 (s)	139.5 (s)	139.9 (s)
5'' <sup>c</sup>	146.9 (s)	146.6 (s)	152.0 (s)
6''	110.8 (d)	109.1 (d)	110.6 (d)
-COO	166.8 (s)	166.7 (s)	166.4 (s)
Glucopyranose carbon			
1		105.7 (d)	106.1, 106.3 (d)
2		74.9 (d)	75.4 (d)
3		76.8 (d)	76.4 (d)
4		73.5 (d)	71.9 (d)
5		78.2 (d)	73.4 (d)
6		63.1 (t)	63.0 (t)

Values are given in  $\delta$  ppm.

<sup>a</sup> The numbers in position correspond to those shown in Fig. 29.

<sup>b, c</sup> Assignments may have to be reversed.

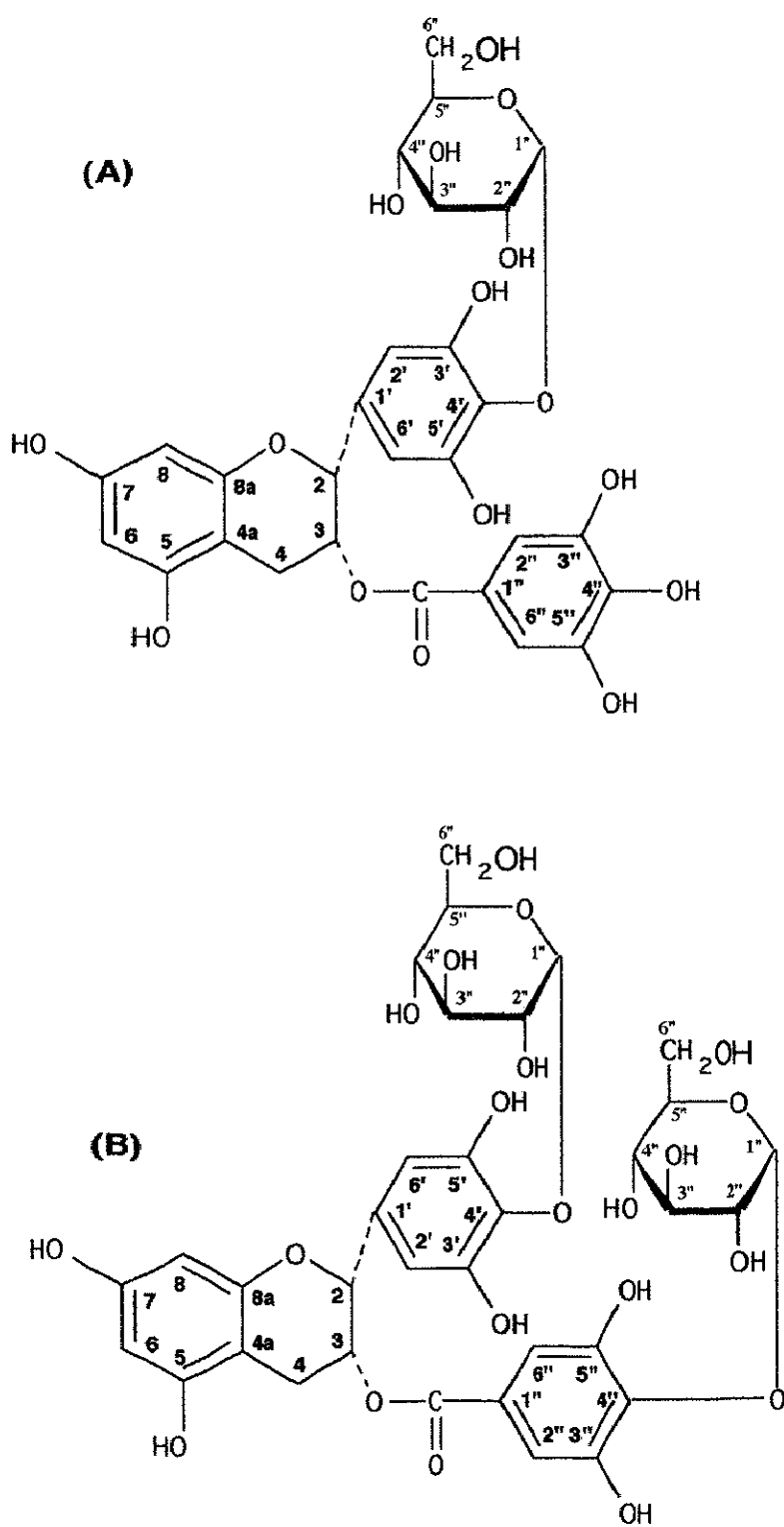


Fig. 29. Proposed structures of the transfer products.

(A), EGCgG-1; (B), EGCgG-2.

500 mg/ml、G-2は1000 mg/mlまで溶解し、各々約25、50倍上昇した (Fig. 30-B-1, 2)。

ウ、褐色化抵抗性 Figure 30-Cに示したように、EGCgは時間の経過とともに吸光度が上昇し、茶褐色化し安定性が悪かったが、G-1とG-2は吸光度があまり上がらず安定であることが判る。G-1とG-2とでは大差がなかった。CGの時に触れたように、カテキン類の光酸化重合はピロガロール環同士で起こっており<sup>84)</sup>、G-1とG-2はこの環にグルコースが導入されていることより、重合を抑えられ安定であると考えられた。

エ、チロシナーゼ活性の阻害能 チロシナーゼによるL-tyrosineからのドーパクロムの生成量を5 mMのG-1またはG-2存在下で測定した。Figure 31のように、配糖体が存在しないコントロールでは、ドーパクロムが生成し、吸光度が上昇していくが、G-1あるいはG-2が存在すると吸光度の上昇が抑制され、これら配糖体はチロシナーゼ活性の阻害能を有していることが判明した。なお、EGCgは、チロシナーゼの基質となり、コントロールよりも吸光度の上昇が速かった。チロシナーゼ反応開始時より10分後の吸光度から算出した阻害率 (Percentage inhibition) は、各々、91.8%、62.0%であった。しかし、G-2よりG-1のほうが阻害能が優れている結果を得たが、その理由は不明である。

### 第3節 要約

ポリフェノール化合物である各種カテキン類を受容体とした場合、主な転移産物は、ECとEGCgでは2種類、他のカテキン類では1種類であったが、全てのカテキン類が受容体となり得た。転移率は、全てのカテキン類において40%以上と効率良く、転移効率は高い順から、ECg=C>EC>EGCg>EGCであった。ガロカテキンであるEGCgとEGCは、ピロガロール環にフェノール性水酸基が三つ隣接した構造を有しており、転移効率が若干落ちるようである。この傾向は、第3章



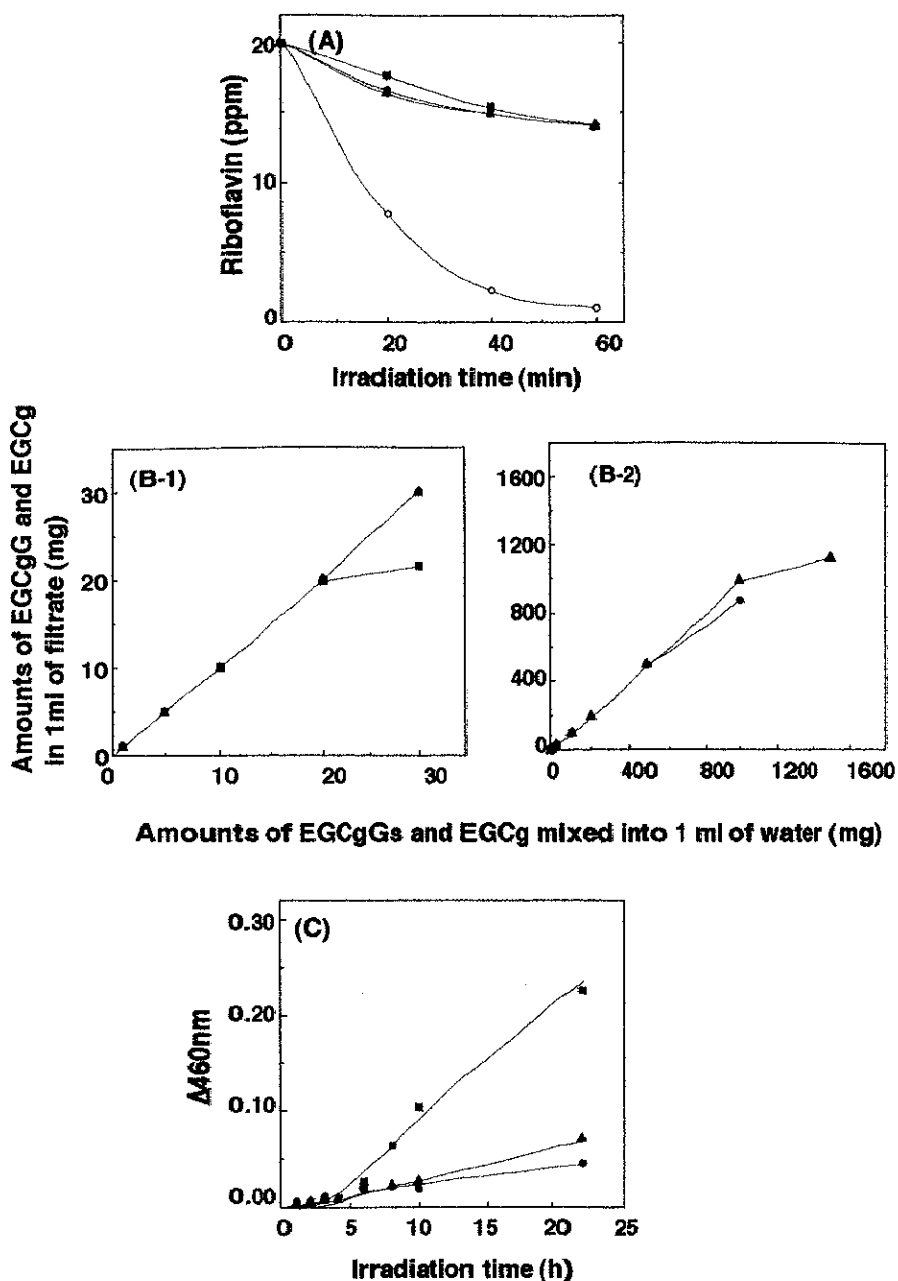


Fig. 30. Some properties of EGCgGs.

(A) Antioxidative activity in an aqueous system using riboflavin. Riboflavin ( $60 \mu\text{g}$ ) dissolved in  $3.0 \text{ ml}$  of tap water was irradiated with EGCg (■), G-1 (●), G-2 (▲) or without antioxidant (○). Remaining riboflavin was determined by HPLC.

(B) Solubility in water. Various amounts of EGCg (■), G-1 (●) or G-2 (▲) mixed with  $1 \text{ ml}$  of tap water were filtered through a  $0.45\text{-}\mu\text{m}$  membrane filter and determined by HPLC.

(C) Browning resistance to light irradiation. A solution ( $3.0 \text{ ml}$ ) containing  $0.1\%$  (w/v) EGCg (■), G-1 (●) or G-2 (▲) was irradiated, and the absorbance at  $460 \text{ nm}$  was continuously monitored.

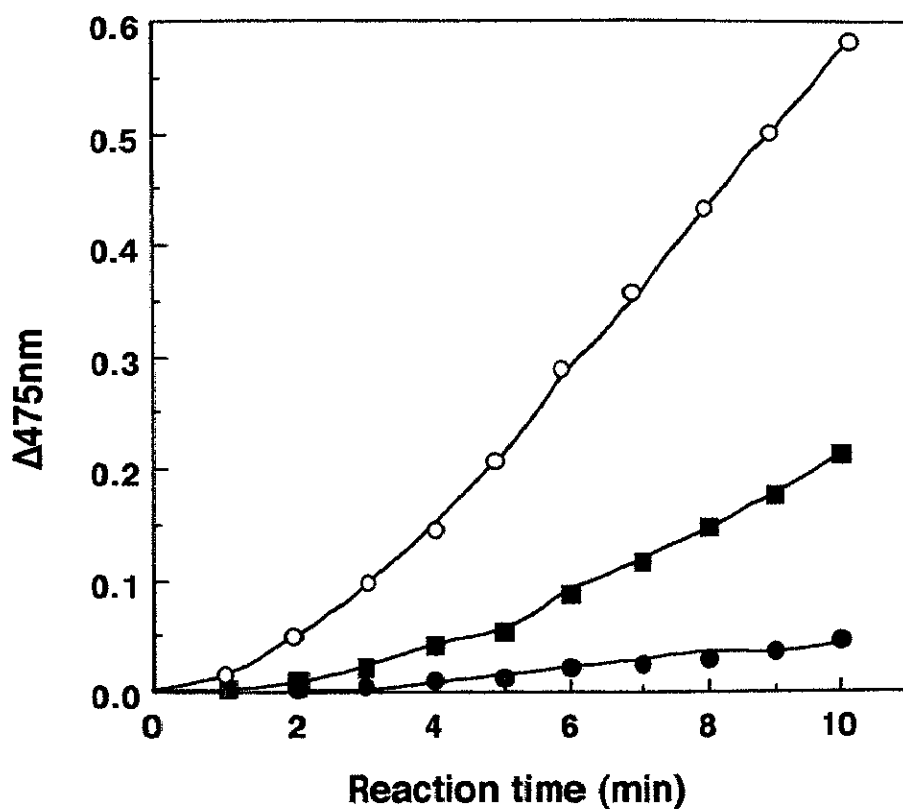


Fig. 31. The course of tyrosinase activity with various inhibitors.

Inhibitory effect on tyrosinase activity was measured basically as described by Saruno *et al.*<sup>70)</sup> Symbols used were: ●, EGCgG-1; ■, EGCgG-2; ○, no inhibitor.

のフェノール化合物の傾向と同様であった。

(+)-Catechinを受容体とした時の転移効率は、pH 7.5、温度42℃、スクロース濃度30% (w/v)、そして(+)-catechin 1 mg当たり5単位のSPaseという条件が良いことが明らかとなった。100 mgの(+)-catechinから約150 mgの転移産物を、Sephadex LH-20カラムと分取用ODS-HPLCカラムによって取得した。この転移産物の構造は、各種の分析機器による解析の結果、(+)-catechin 3'-Q- $\alpha$ -D-glucopyranoside (CG) と決定され、ピロガロール環にグルコースが転移されていた。このCGは、(+)-catechinと同様の抗酸化能を保有し、(+)-catechinと比べて水に対する溶解性や褐色化抵抗性に優れていた。また、(+)-catechinは、チロシナーゼの基質であるが、CGはその酵素活性を拮抗阻害することが判明した。

また、EGCgを受容体とした時は、その安定性からpH 6.0で反応させ、100 mgのEGCgから各々約30 mgと50 mgの転移産物を、CGと同様、Sephadex LH-20カラムと分取用ODS-HPLCカラムによって取得した。これら転移産物の構造は、各種の分析機器による解析の結果、各々、(-)-epigallocatechin gallate 4'-Q- $\alpha$ -D-glucopyranoside (G-1)、(-)-epigallocatechin gallate 4',4''-Q- $\alpha$ -D-diglucoopyranoside (G-2) と決定し、CGと同様、ピロガロール環にグルコースが転移されていた。これら二種類の配糖体もアグリコンのEGCgとほぼ同程度の抗酸化能を有し、水に対する溶解性や褐色化抵抗性に優れていた。また、チロシナーゼ阻害能も新たに発現した。

## 第5章 スクロースホスホリラーゼによるフラノン化合物配糖体の合成

### 緒言

フラノン化合物はフラノン環を有しており、その環にフェノール性水酸基を保持する化合物として、例えば、醤油の香気成分として、4-hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2H)-furanone (HEMF) や、パイナップルなどの香気成分として、4-hydroxy-2,5-dimethyl-3 (2H)-furanone (HDMF) が挙げられる<sup>87)</sup>。HEMFは本醸造醤油中には100ppm程度に互変異性体の形で存在し<sup>88)</sup>、酵母の代謝産物である。最近、Nagaharaらによってマウス前胃の腫瘍生成を抑制する活性があることが見いだされた<sup>89)</sup>。

しかしながら、HEMFは酸化されやすい。このことは、光や熱に対して不安定であることを意味し、また、粘調性の液体で取り扱いにくく、醤油特有の香気を強く有するため、制癌剤として応用開発するには、これらの性質がその利用を妨げている。

SPaseは、第3章と第4章で述べたように、その糖転移反応において、特に、フェノール性水酸基への転移効率が高いことを見いだしており、同じようにフェノール性水酸基を有するフラノン化合物へも糖転移する可能性が高いと予想された。糖付加することによりその性質の改善が期待されることから、今回、HEMF、HDMFを受容体とした場合の反応条件を調べ、HEMFの時に生成する配糖体の構造を解析し、あわせてその性質の検討を行った。

### 第1節 実験材料および方法

1. 酵素・試薬 SPaseは、第3章と同じく大腸菌1100 (slp-spl-1) 由来の精製酵素を用いた。Saccharomyces sp. 由来の $\alpha$ -glucosidaseとスイートアーモンド由来の $\beta$ -glucosidaseは、第3章で使用したものをを用いた。フラノン化合物 (HEMF、

HDMF) は、東京化成工業から購入した。ODS-AQ樹脂は、YMCから購入した。その他全ての試薬は、特級グレードを用いた。

2.SPase活性 SPase活性測定法や定義は、第1章に従って行なった。

3.転移反応 50% (w/v) sucrose, 0.5% (w/v) acceptor furanoneと9 unitsのSPaseを含む0.1 mlの100 mMHEPES緩衝液 (pH 7.5) を42°Cで15時間反応させた。その反応終了液 10 $\mu$ lをHPLCで分析した。

4.HPLC 以下の条件で行った。

カラム : CAPCELL PAK C18 SG120 (250 X 4.6 mm i. d.) (Shiseido Co., Ltd.)

カラム温度: 室温

検出 : 264 nm

移動相 : 10% (v/v) acetonitrile $\rightarrow$ 100% (v/v) acetonitrile (30 min)

流速 : 1.0 ml/min

分取時の条件は以下の通りであった。

カラム : CAPCELL PAK C18 SG120 (250 X 20 mm i. d.) (Shiseido Co., Ltd.)

カラム温度: 室温

検出 : 264 nm

移動相 : 10% (v/v) acetonitrile $\rightarrow$ 50% (v/v) acetonitrile (60 min)

流速 : 5.0 ml/min

5.スペクトル分析 SIMS、<sup>13</sup>C-NMR、<sup>1</sup>H-NMRは、第3章に準じた。

6.安定性試験 250 ppmの各水溶液を作製し、25°Cに密栓保存したのち、経時的にサンプリングを行なった。290 nmの紫外吸収を測定し、その吸光度の残存量を計算した。この290 nmの紫外度は、フラノン化合物量を反映している。

## 第2節 結果および考察

### (1) 受容体特異性

Figure 32に、HEMF、HDMFを受容体とした場合のHPLCクロマトグラムの結果を示し、受容体特異性の定量化を行なった。スクロースが反応液に存在しない場合、または酵素添加しない場合には矢印のピークが出現しないことから、それらが転移産物と思われる。転移産物量は、便宜上、HEMFの転移産物であるHEMF配糖体のHPLCピーク面積から求めた。転移率は、用いた受容体フラノンのモル数に対する、転移産物のモル数の比で表した。その結果、HEMFは約55%、HDMFは約45%の転移率を示した。

### (2) 4-hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2H)-furanoneを受容体とする配糖体の合成

a. 分取 50 gのスクロース、1 gのHEMFと10,000単位のSPaseを含む100 mlの100 mM HEPES緩衝液 (pH 7.5) 中、42°Cで15時間反応させた。反応終了液をODS-AQカラム (6 X 25 cm、流速 1.3 ml/min) に供した。2 リットルの水で糖類を除去した後、1.5リットルの50%(v/v)アセトニトリル溶液で転移産物と未反応のHEMFを溶出した。この画分を約30 mlまで濃縮し、分取用ODS-HPLCカラムに供し、転移産物の画分を集め、凍結乾燥した。その結果、約800 mgの白色粉末を得た。

b. 構造解析 SIMSの結果、304という値が得られた(データ未提出)。 $\alpha$ -GlucosidaseによってHEMFが遊離するが、 $\beta$ -glucosidaseでは遊離せず、転移産物は、HEMFとグルコースが1モルずつ $\alpha$ 結合していることが判明した。また、フェノール性水酸基の有無を検定する塩化第二鉄反応<sup>90)</sup>は陰性であり、4位の水酸基へ転移していることが示唆された。最終的には、NMRスペクトルをDMSO溶媒中で求め、構造決定した。<sup>13</sup>C-NMRの分析値をTable XVにまとめた。HEMFと比較し、5位のシグナルが5 ppm程度低磁場側へシフトしており、フラノン環の構造上、4位の水酸基にグルコースが転移していることが示された。また、<sup>1</sup>H-

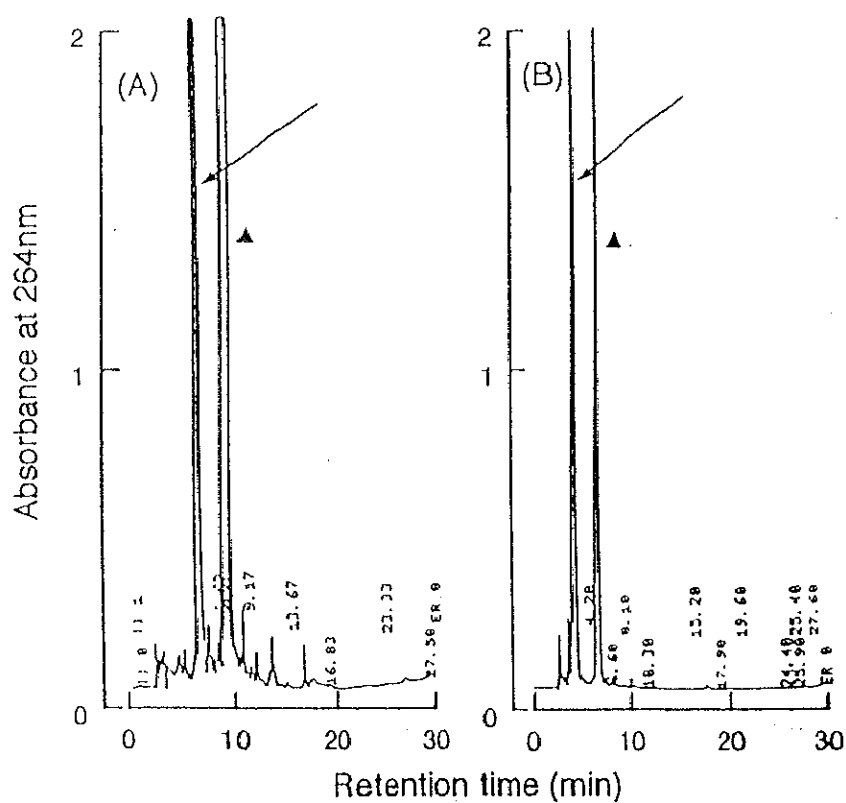


Fig. 32. High performance liquid chromatograms of reaction products with SPase on the mixture of sucrose as a donor and hydroxyfuranones as acceptors.

Acceptors used were: A, HEMF; B, HDMF. Arrows and closed triangles show the peaks of the transfer products and acceptor hydroxyfuranones, respectively.

NMRのアノメリックシグナルより、カップリング定数が $J=3.2$  Hzであり、 $\alpha$ 結合と確定した。そして、高磁場側の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (Fig. 33) より、合成された配糖体も互変異性体であり、例えば、8位の二つのプロトンシグナルのピーク面積より、主生成物である 2-ethyl-5-methyl-3H-furanone 4- $\underline{\text{Q}}$ - $\alpha$ - $\underline{\text{D}}$ -glucopyranoside と副生成物である 5-ethyl- 2-methyl-2H-furanone 4- $\underline{\text{Q}}$ - $\alpha$ - $\underline{\text{D}}$ -glucopyranosideの生成比率は約 3 : 1 であることが判明した。以上のことより、得られた産物は、HEMFの4位の水酸基へグルコースが $\alpha$ 結合した互変異性体配糖体 2(or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2H)-furanone 4- $\underline{\text{Q}}$ - $\alpha$ - $\underline{\text{D}}$ -glucopyranoside (EMFG) (Fig. 34) と決定した。

### c. 性質の検討

ア、物性 HEMFは少し黄色味がかった粘濁性の液体で、醤油独特の香りを有していたが、EMFGは白色無臭の粉末であった。このように、配糖化することによりその物性・性状が変化したことは興味ある知見である。

イ、水溶液中での安定性 HEMFやEMFGをそれぞれ蒸留水に溶解して、経時的に290 nmの吸光度の変化を測定し、その結果をFig. 35に示した。HEMFは25°Cにおいて時間とともに吸光度が減少していくが、EMFGではほとんど変化が見られなかった。このことから、EMFGは酸化されにくく、非常に安定であることが判明した。

## 第3節 要約

フラノン環にフェノール性水酸基を有する化合物である各種のヒドロキシフラノン類を受容体とした場合、SPaseは各々、HEMFに対して約55%、HDMFに対して45%の転移効率で、スクロースからグルコースを転移した。1gのHEMFから約800 mgの転移産物が、ODS-AQカラムと分取用ODS-HPLCカラムによって取得された。この転移産物の構造は、各種分析機器による解析の結果、互変異性体配糖体 2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2H)-furanone 4- $\underline{\text{Q}}$ - $\alpha$ - $\underline{\text{D}}$ -glucopyranoside



Table XV.  $^{13}\text{C}$ -NMR data of HEMF and its glucoside

position <sup>a</sup>	HEMF		Glucoside	
	major	minor	major	minor
HEMF carbon				
2, 2'	84.8	80.1 (d)	84.3	84.2 (d)
3, 3'	198.0	199.1 (d)	196.5	196.5 (d)
4, 4'	135.0	133.2 (s)	133.8	133.8 (s)
5, 5'	175.0	174.6 (s)	179.6	179.4 (s)
6, 6'	13.5	16.5 (q)	16.1	16.5 (q)
7, 7'	24.6	27.3 (t)	23.7	24.1 (t)
8, 8'	8.5	9.5 (q)	13.4	13.4 (q)
Glucopyranoside carbon				
1"			99.6	99.5 (d)
2"			72.7	72.6 (d)
3"			73.8	73.6 (d)
4"			69.6	69.5 (d)
5"			71.5	71.3 (d)
6"			60.5	60.3 (t)

Values are given in  $\delta$  ppm.

<sup>a</sup> The numbers in position correspond to those shown in Fig. 34.

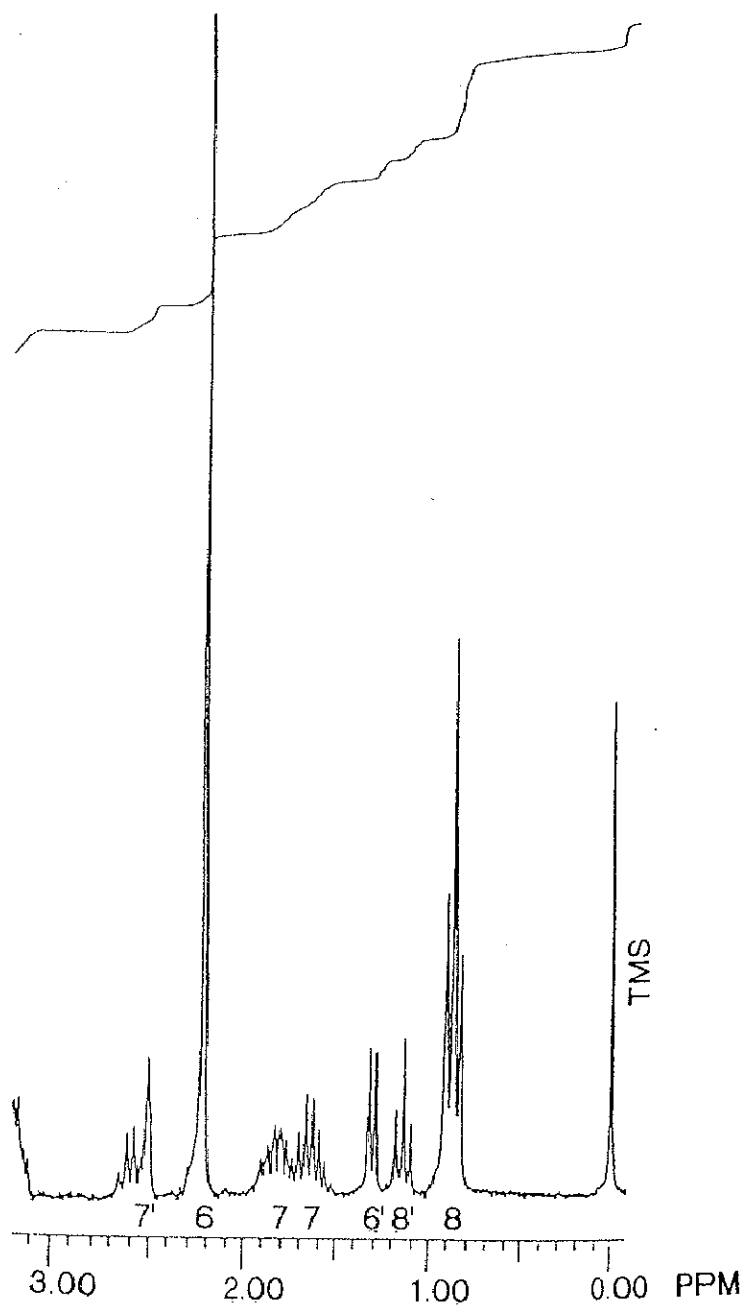


Fig. 33.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the reaction products in upfield region.

The numbers correspond to those shown in Fig. 34.

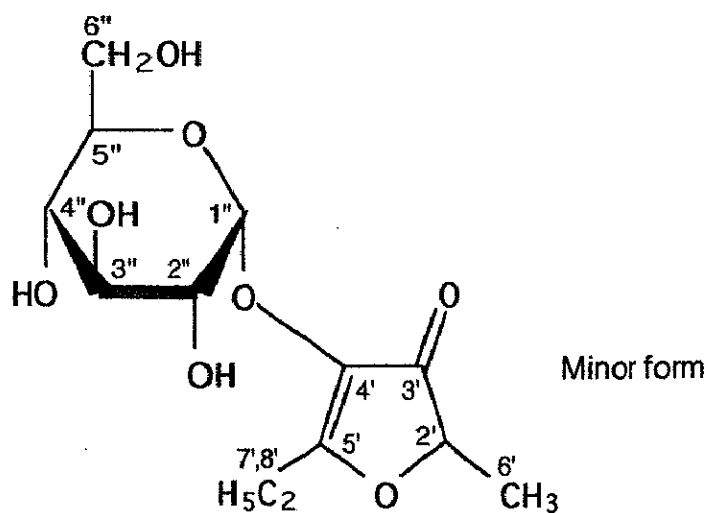
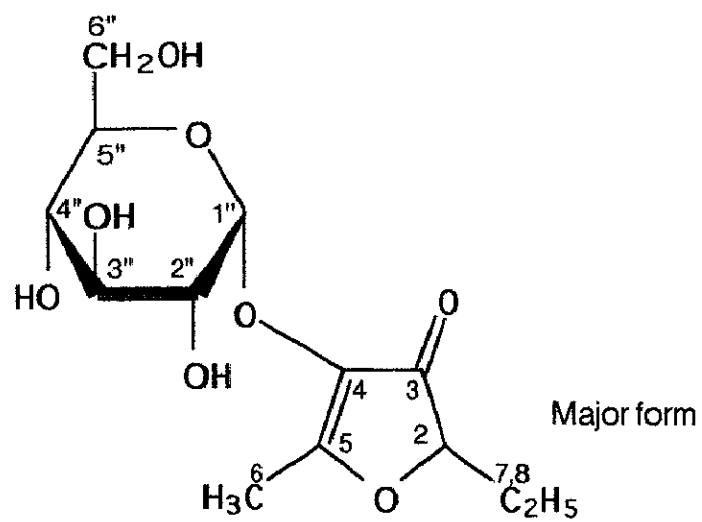


Fig. 34. Proposed structure of the transfer product.

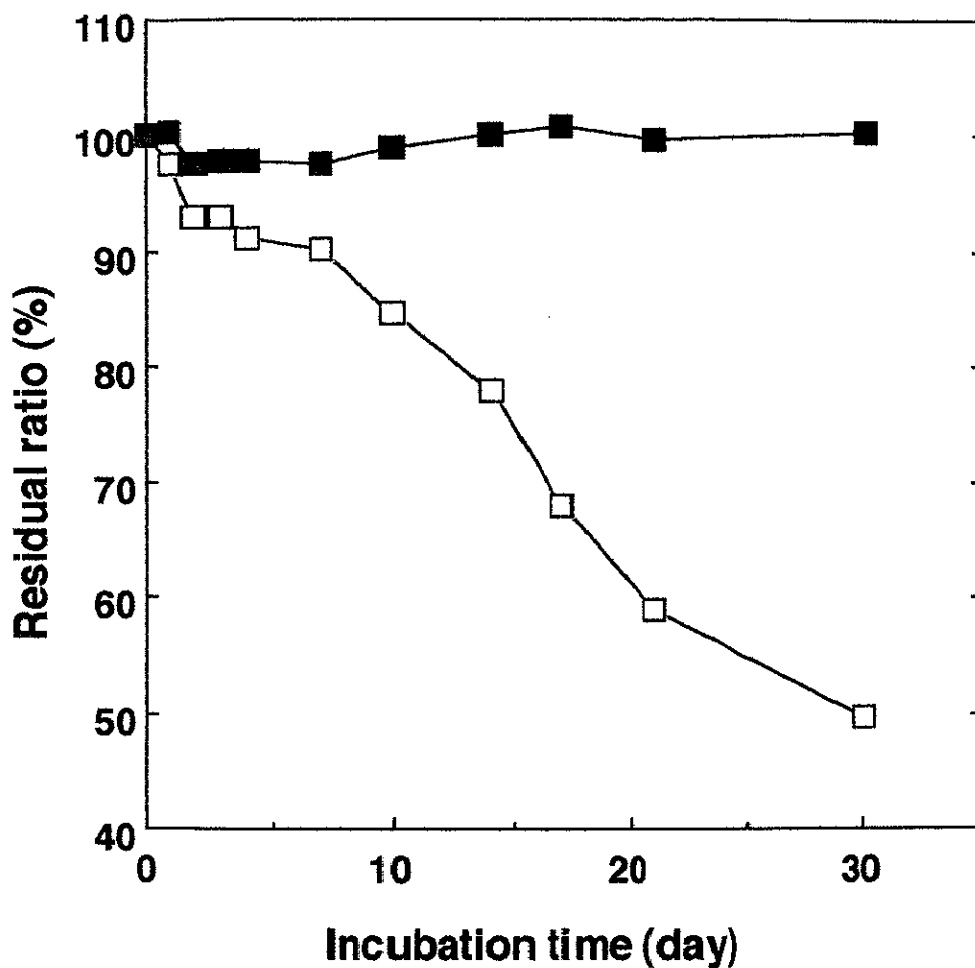


Fig. 35. Stability of HEMF and its glucoside in aqueous solution.

The solution (250 ppm, 3 ml) was incubated at 25°C. The amounts of HEMF and EMFG were measured at 290 nm. Symbols used were: (□), HEMF; (■), EMFG.

(EMFG) であり、主生成物 2-ethyl-5-methyl-3H-furanone 4-O- $\alpha$ -D-glucopyranoside と副生成物 5-ethyl-2-methyl-2H-furanone 4-O- $\alpha$ -D-glucopyranoside の生成比率は、約 3:1 であった。HEMF は少し黄色味がかかった粘濁性の液体で醤油独特の香りを有していたが、EMFG は白色無臭の粉末であった。また、EMFG は、HEMF と比べて水溶液中での安定性に非常に優れていた。

## 第6章 スクロースホスホリラーゼによるピロン化合物配糖体の合成

### 緒言

麴酸 (5-hydroxy-2-hydroxymethyl- $\gamma$ -pyrone) は、フェノール性水酸基とアルコール性水酸基を有しており、多くのアスペルギルス属やペニシリウム属などの糸状菌が産生するピロン化合物であり、古くからその存在が知られていた<sup>91)</sup>。麴酸とその誘導体は、静菌・抗菌作用があり<sup>92)</sup>、食品分野では鮮度保持剤として使用され、また、近年、チロシナーゼ活性に対して阻害能が報告され<sup>70)</sup>、メラニン生成を抑制する美白化粧品素材として開発されている。この物質も水に対する溶解性が低く、光や熱に対する安定性が悪い。

SPaseは、糖・糖アルコールなどアルコール性水酸基へかなり幅広い特異性を有していることを第2章において述べた。また、フェノールおよびその関連化合物についても、それらのフェノール性水酸基に対して幅広く転移し、その転移効率が高いことを第3、4、5章で述べた。その中で、第3章では、アルコール性とフェノール性両水酸基をベンゼン環に有するヒドロキシベンジルアルコール類を受容体に用いた場合、二種類の転移産物と思われるピークが確認された。SPaseの糖転移が、両水酸基に可能であることが推定されたが、それらの構造解析は行なわなかった。今回、同じくアルコール性・フェノール性両水酸基をピロン環に有する麴酸を受容体とした場合、SPaseによる転移産物の構造を解析し、あわせてその性質の検討を行った。

### 第1節 実験材料および方法

1. 酵素・試薬 SPaseは、第3章と同じく大腸菌1100 (slp-spl-1) 由来の精製酵素を用いた。Saccharomyces sp.由来の $\alpha$ -glucosidase、スイートアーモンド由来の $\beta$ -glucosidase、およびマッシュルーム由来のチロシナーゼは、第3章に準じた。

L-Dopaも第3章に準じた。麴酸は、東京化成工業から購入した。

2. 酵素活性 SPase活性測定法や定義は、第1章に準じて行なった。

3. 転移反応 40% (w/v) sucrose, 2% (w/v) 麴酸、20% (v/v) DMSOと9 unitsのSPaseを含む0.1 mlの100 mM HEPES緩衝液 (pH 7.5) 中、42°Cで24時間反応させた。その反応液の10  $\mu$ lをHPLCで分析した。

4. HPLC 以下の条件で行った。

カラム : Asahipak NH<sub>2</sub>P-50 (250 X 4.6 mm i. d.) (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.)

カラム温度 : 室温

検出 : 270 nm

移動相 : acetonitrile / H<sub>2</sub>O=80 / 20

流速 : 1.0 ml/min

分取時の条件は以下の通りであった。

カラム : Asahipak NH<sub>2</sub>P-50 (250 X 10 mm i. d.) (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.)

カラム温度 : 室温

検出 : 270 nm

移動相 : acetonitrile / H<sub>2</sub>O=80 / 20

流速 : 4.0 ml/min

5. スペクトル分析 SIMS、<sup>13</sup>C-NMR、<sup>1</sup>H-NMRは第3章に準じた。

6. 褐色化抵抗性 10 mM水溶液を70°Cで3日間、オイルバスにて加温し、420 nmの吸光度の増分を測定した。

7. チロシナーゼ活性の阻害能 L-Dopaを基質とし、第3章に準じた。

## 第2節 結果および考察

### (1) 麴酸を受容体とする配糖体の合成

a. 反応条件 Figure 36に麴酸を受容体に用いた時のHPLCクロマトグラムの結果を示し、受容体特異性の定量化を行なった。スクロースが反応液に存在しない場合、または酵素を添加しない場合には矢印のピークは出現しなかったことから、それらが転移産物と思われる。保持時間の短い方からKAG1, KAG2と名付ける。Figure 37に二つの転移産物の生成における経時的变化を示す。転移率は、用いた受容体麴酸のモル数に対する、転移産物のピーク面積から算出されたモル数の比で表した。この図より時間の経過と共に両転移産物は増加し、24時間後ではKAG1, KAG2の転移率は、各々、7.5%、12.2%であった。

#### b. 分取

40 gのスクロース、2 gの麴酸、麴酸の溶解性を高めるために、20% (v/v) 濃度のDMSOと500 unitsのSPaseを含む100 mlの100 mM HEPES緩衝液% (pH 7.5) 中、42°Cで24時間反応させた。反応終了液を水で5倍希釈し、活性炭カラム(3 X 30 cm) に供した。1.5リットルの水で糖類を除去した後、1リットルの50% (v/v) のエタノールで転移産物と未反応の麴酸を溶出した。この画分を約30 mlまで濃縮し、分取用HPLCアミノカラムに供し、二つの転移産物の画分を集め、凍結乾燥した。KAG1が約270 mg、KAG2が約420 mg得られ、両転移産物とも白色粉末で、HPLC的に単一かつシンメトリックなピークを示した(データ未提出)。

c. 構造解析 SIMSの結果、両転移産物とも304という値が得られた(データ未提出)。両転移産物とも、 $\alpha$ -glucosidaseによって麴酸が遊離したが、 $\beta$ -glucosidaseでは遊離されず、塩化第二鉄反応<sup>90)</sup>では、KAG1が陰性、KAG2が陽性であった。これらの結果より、両転移産物は、麴酸とグルコースが1モルずつ $\alpha$ 結合しており、KAG1が5位のフェノール性水酸基に、KAG2が7位にアルコール性水酸基にグルコースが転移していることが示唆された。

DMSO溶媒中で、<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを求め、麴酸と $\alpha$ -D-glucopyranoseとの



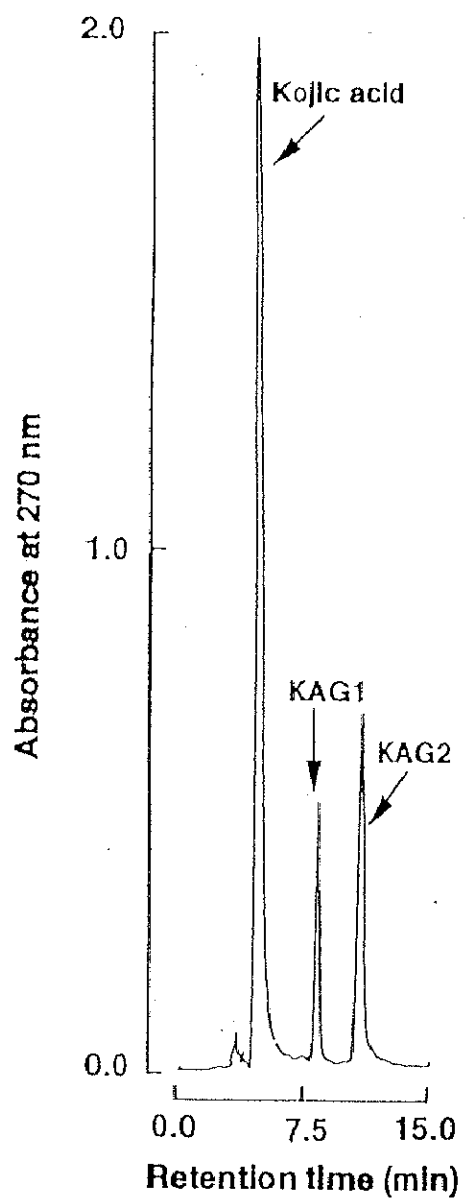


Fig. 36. High performance liquid chromatogram of reaction products.

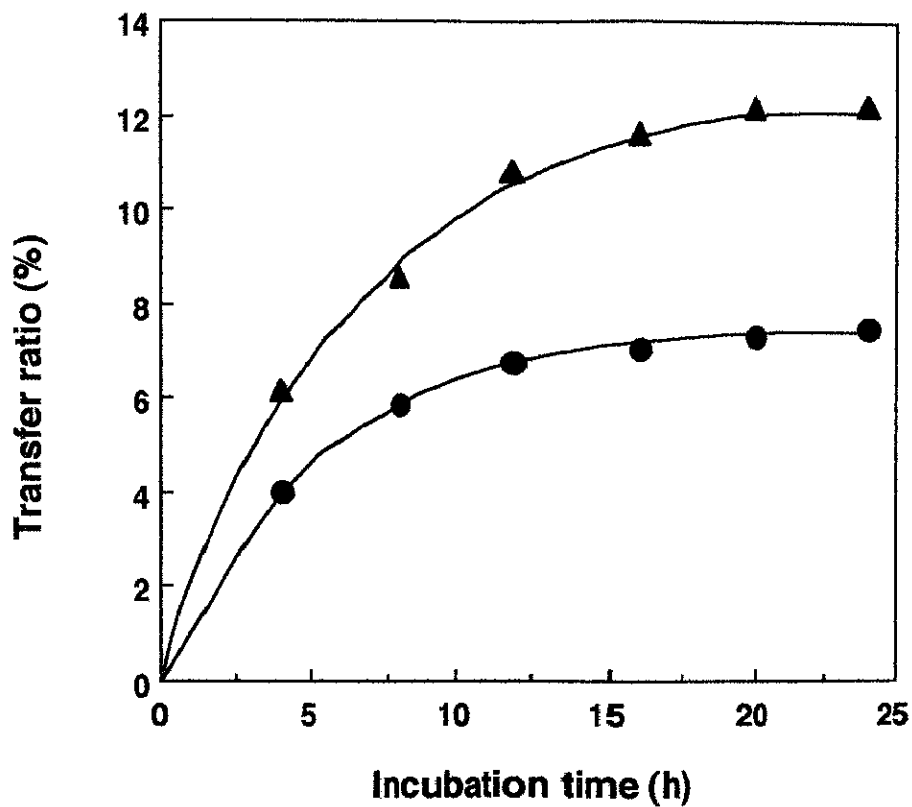


Fig. 37. The course of glycosylation toward kojic acid with SPase.

Symbols used were: ●, KAG1; ▲, KAG2.

分析値を比較する形で、Table XVIにまとめた。まずKAG1の98.7 ppm、KAG2の98.5 ppmのシグナルは、グルコース分子のアノメリックカーボンを示しており、 $\alpha$ 結合を有していることが確認された。次に、KAG1の6位の145.1 ppmのシグナルが麴酸のそれと比べて5.9 ppm低磁場側へシフトしていた。また、KAG2の7位の63.9 ppm、2位の163.9 ppmのシグナルが、麴酸のそれらと比べてそれぞれ4.4 ppm低磁場側へ、4.2 ppm高磁場側へシフトしていた。これらの解析結果を統合すると、KAG1はkojic acid 5-O- $\alpha$ -D-glucopyranoside、KAG2はkojic acid 7-O- $\alpha$ -D-glucopyranosideと決定した (Fig. 38)。

三枝らは、*Aspergillus albus*の $\alpha$ -アミラーゼの作用により、KAG2が生成することを示した<sup>93)</sup>が、フェノール性水酸基へ転移するKAG1は見いだしていない。今回、KAG1は酵素的手法で初めて合成され、有機合成的手法でも、従来、 $\beta$ 結合の物質しか報告がなく<sup>94)</sup>、新規物質である。

#### d. 性質の検討

ア、褐色化抵抗性 麴酸は、水溶液中で光照射により重合し褐色化することが知られている。Figure 39-Aに示したように、麴酸は1日経過後、急激に着色していくが、KAG1、KAG2ともゆっくりと着色していく傾向にあった。KAG2よりKAG1が安定であり、フェノール性水酸基の有無がこの差に表れていると思われる。

イ、チロシナーゼ活性の阻害能 Figure 39-BのようにKAG1、KAG2ともチロシナーゼ活性を阻害するが、麴酸よりは阻害能が弱かった。KAG1とKAG2で比較するとKAG2の方が阻害能が高く、麴酸のフェノール性水酸基が阻害能に関与しているようである。

### 第3節 要約

アルコール性・フェノール性両水酸基をピロン環に有する麴酸を受容体とした

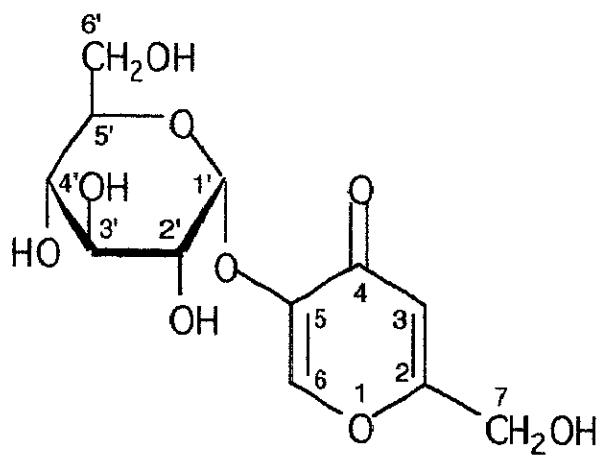
Table XVI.  $^{13}\text{C}$ -NMR data for kojic acid glucosides

Position	KAG1	KAG2	Kojic acid	$\alpha$ -D-Glucopyranose
2	168.1	163.9	168.1	
3	111.7	111.3	109.9	
4	173.6	173.7	173.9	
5	144.6	145.7	145.6	
6	145.1	139.3	139.2	
7	59.3	63.9	59.5	
1'	98.7	98.5		92.9
2'	71.6	71.6		72.5
3'	73.8	73.1		73.8
4'	69.8	70.1		70.6
5'	72.8	73.0		72.3
6'	60.7	60.8		61.6

The numbers in position correspond to those shown in Fig. 38.

Values are given in  $\delta$  ppm.

(A)



(B)

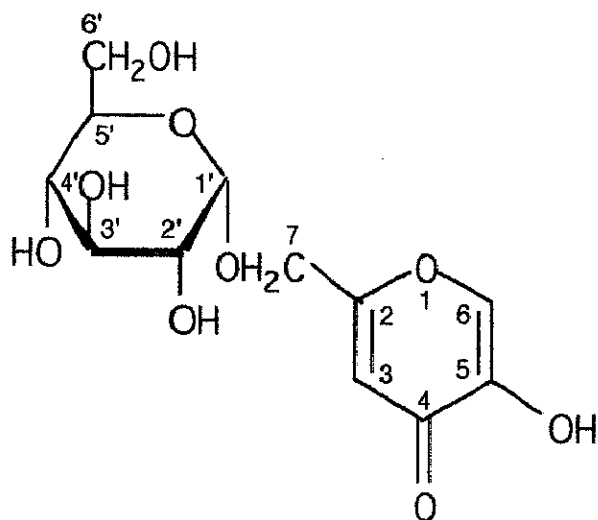


Fig. 38. Proposed structures of the transfer products.

(A), KAG1; (B), KAG2.

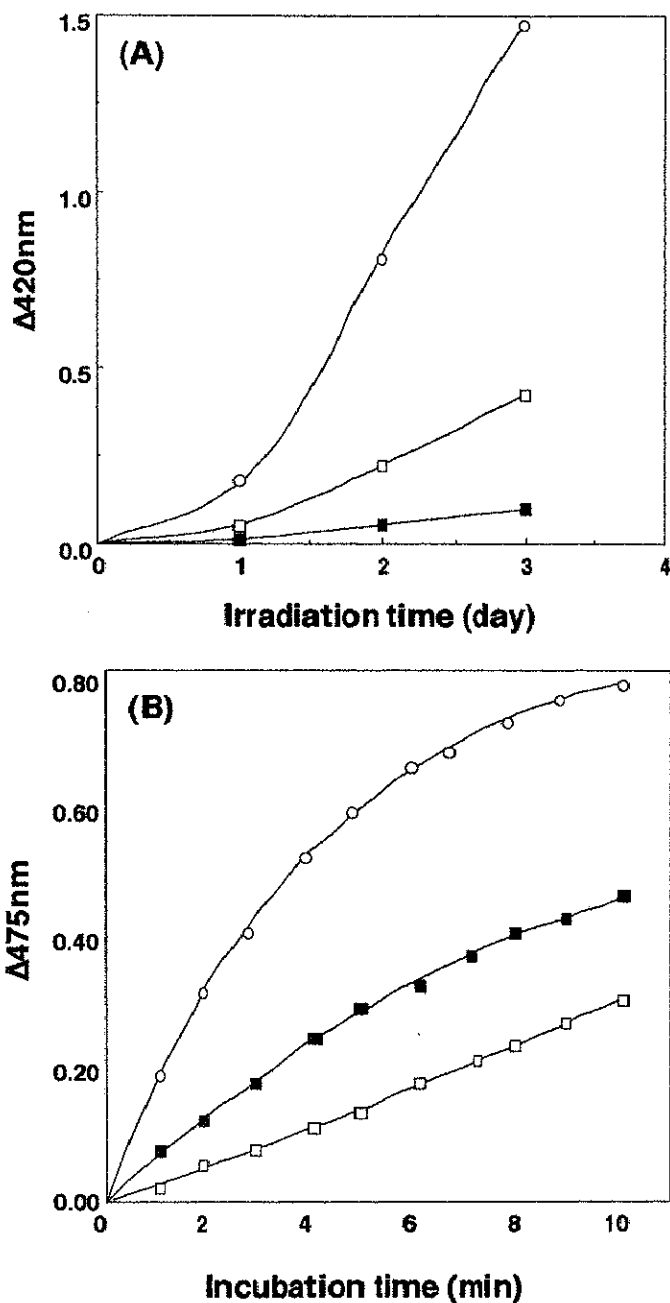


Fig. 39. Some properties of KAG1 and KAG2.

(A) Browning resistance to light irradiation. A solution (3.0 ml) containing 0.1% (w/v) kojic acid (○), KAG1 (■), or KAG2 (□) was irradiated, and the absorbance at 460 nm was continuously monitored.

(B) Tyrosinase inhibitory activity. Inhibitory effect on tyrosinase activity was measured basically as described by Saruno *et al.*<sup>70) Symbols used were: ■, KAG1; □, KAG2; ○, no inhibitor.</sup>

場合、SPaseの糖転移反応で2種類の転移産物（KAG1とKAG2）が得られた。2gの麴酸より各々約270 mg、420 mgの転移産物が得られ、各種分析機器による解析の結果、各々の構造は、kojic acid 5-Q- $\alpha$ -D-glucopyranosideとkojic acid 7-Q- $\alpha$ -D-glucopyranosideであり、フェノール性・アルコール性両水酸基へ糖転移することが判明した。ピロン環上に存在する官能基では、フェノール性よりアルコール性水酸基への特異性が若干高かった。また、KAG1は新規物質である。これら両配糖体とも褐色化抵抗性に優れ、チロシナーゼ活性を阻害した。KAG1はKAG2と比較し、安定性が高く、チロシナーゼ阻害能が低いことより、フェノール性水酸基の生理活性への寄与が示唆された。

## 第7章 糖質関連物質の生産モデル系の構築

### 緒言

第2章から第6章では、SPaseの糖転移反応を利用して、オリゴ糖や配糖体など、各種、糖質関連物質合成の可能性を示した。これら糖質関連物質の生産を実用化するためには、生成比率と生成物の分離効率を高めるシステムの構築が重要となる。また、システム全体の効率を考慮すると、連続生産を念頭に置かねばならない。実際、SPaseによる配糖体合成では、受容体である各種アグリコンより、糖供与体であるスクロース濃度が高い方が転移効率が良いが、大部分のスクロースは未反応物として残存している。そしてスクロースのグルコース部分は糖転移に用いられるが、残り半分のフラクトースは反応液中に蓄積する。また、水も受容体となり得るため、加水分解によるグルコースやフラクトースの生成も認められるなど、改善すべき課題が多い。

そこで、スクロースを糖供与体、(+)-catechinを糖受容体にした場合に生成されるCG生産量の向上を目指して、工業生産可能なシステムの検討を始めた。最初に、基質および生産物の消長を正確に把握し、フラクトースなどの副生成物を抑えることを目標として、有機溶媒の選択を行なった。次に、反応液から効率良く再利用可能な未反応基質と目的生産物を分別できる吸着樹脂の検討を行なった。そして、将来、固定化菌体あるいは固定化酵素技術を利用することを見据えて、連続生産の検討を行なうことにした。

### 第1節 実験材料および方法

1. 酵素・試薬 SPaseは、第2章と同じく大腸菌1100 (slp-spl-1)由来の精製酵素を用いた。全ての試薬は、特級グレードを用いた。
2. 酵素活性の測定 SPase活性測定法や定義は、第1章に準じて行なった。
3. HPLC 糖の分析および定量は、第2章と同じ条件で行った。また、(+)-



catechinとCGの分析および定量は第4章に準じて行なった。

4.樹脂 Sephadex LH-20は、第4章と同じくファルマシアから購入した。また、SP-800、HP-20、および、HP-1MGは、三菱化成工業から購入した。

## 第2節 結果および考察

### (1) 基質および生成物の経時変化

配糖体の連続生産を設定するには、基質の消長を正確に把握し、次のサイクルの基質の添加時期および添加量を決めなければならない。そこでCGの合成反応における(+)-catechin、CGや各糖類の経時変化をHPLCで定量した。この時の反応液は、10 mMのTris-HCl (pH 7.5) 1 mlに300 mgのsucrose、6 mgの(+)-catechin、10% (v/v) のmethanol、そして38 unitsのSPaseを含む組成であった。その結果、10時間で(+)-catechinの90%以上が消費され、CGへ変換された。また、この時点でスクロースは、約30%消費され、フラクトース、グルコース、コージビオース、およびニゲロースが生成されていくことが判った (Fig. 40)。これらのことより、1サイクルを10時間とし、次のサイクルでは、(+)-catechinは1回目と同じ量を、また、スクロースは約30%添加すれば良いことが判明した。

### (2) 有機溶媒の検討

前項での経時変化の検討試験では、(+)-catechinの溶解性を高めるために、メタノールを反応液に用いた。しかし、反応10時間後で著量のフラクトース、グルコース、コージビオース、およびニゲロースが生成されていくことが判った。そこで、これら副生成物の生産を抑え、効率良くCGの合成を行なうために、有機溶媒の検討を行なった。

まず、種々の溶媒が最終濃度10% (v/v) となるような反応液を作製し、10時間後のCG生成量を比較した。その結果、プロパノール類、特に1-プロパノールにおいてCGの生成量が低く酵素を不活性化するようであったが、他の溶媒では、

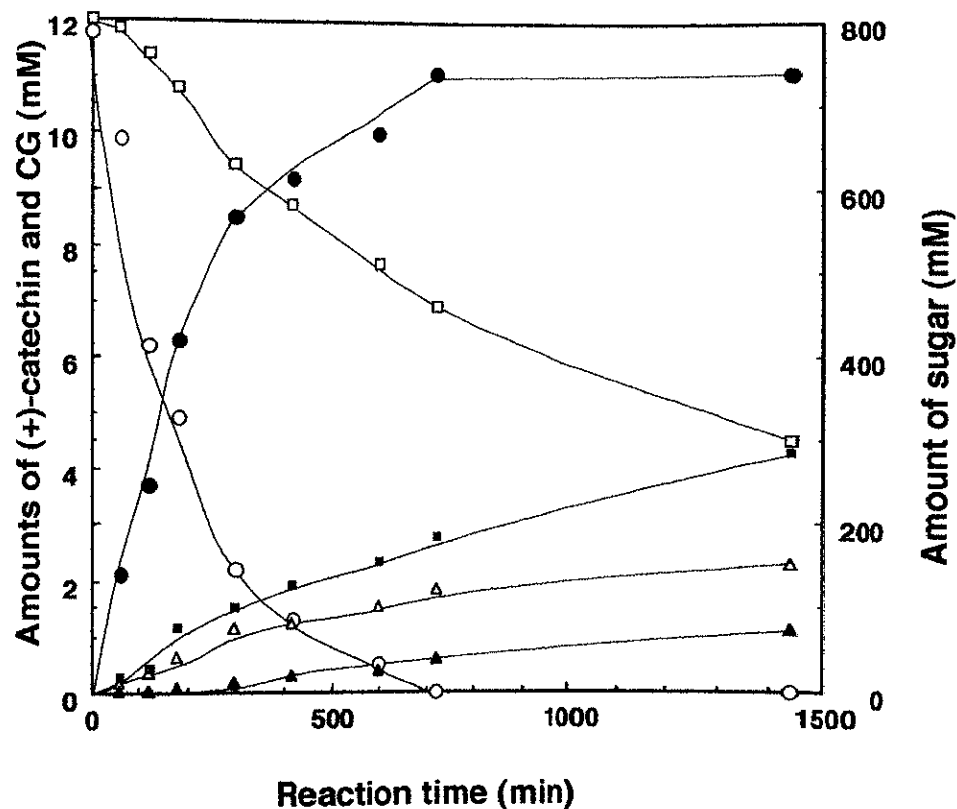


Fig. 40. The course of transglucosylation with SPase on the mixture of sucrose as a donor and (+)-catechin as an acceptor.

Reaction mixture (1 ml) containing 300 mg sucrose, 6 mg (+)-catechin, 10% (v/v) methanol, and SPase (38 units) was incubation at pH 6.9 of 10 mM Tris-HCl, at 42°C for the indicated time. All substances were measured by HPLC. Symbols used were: ○, (+)-catechin; ●, CG; □, sucrose; △, D-glucose; ■, D-fructose; ▲, glucobioses.



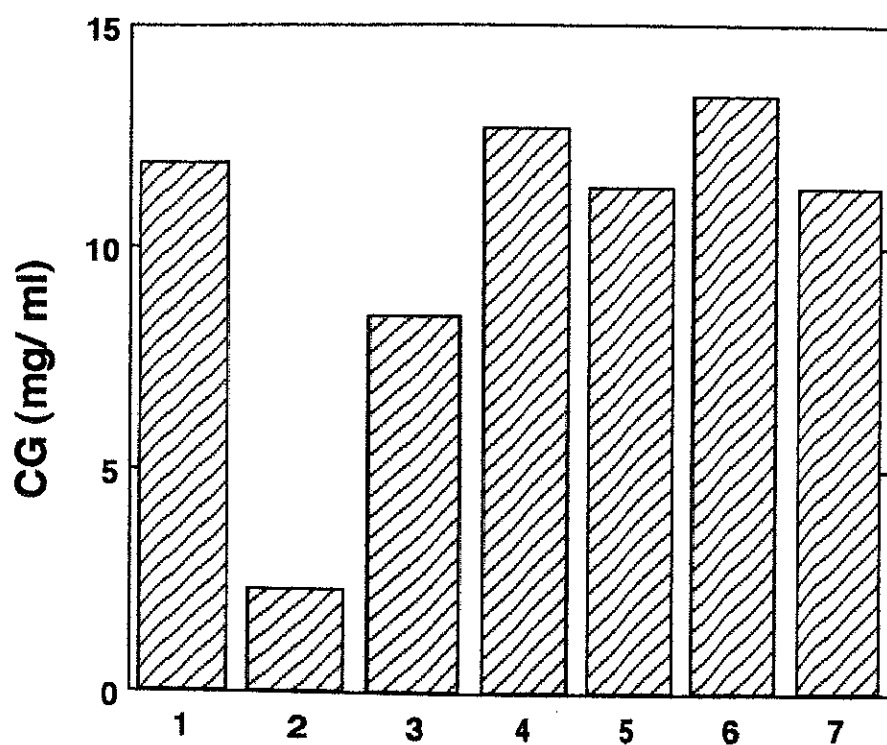


Fig. 41. Effects of various solvents on CG production.

Reaction condition was described in Fig. 40, except for methanol. Solvents used were: 1, methanol; 2, 1-propanol; 3, 2-propanol; 4, DMF; 5, DMSO; 6, ethanol; 7, acetone.

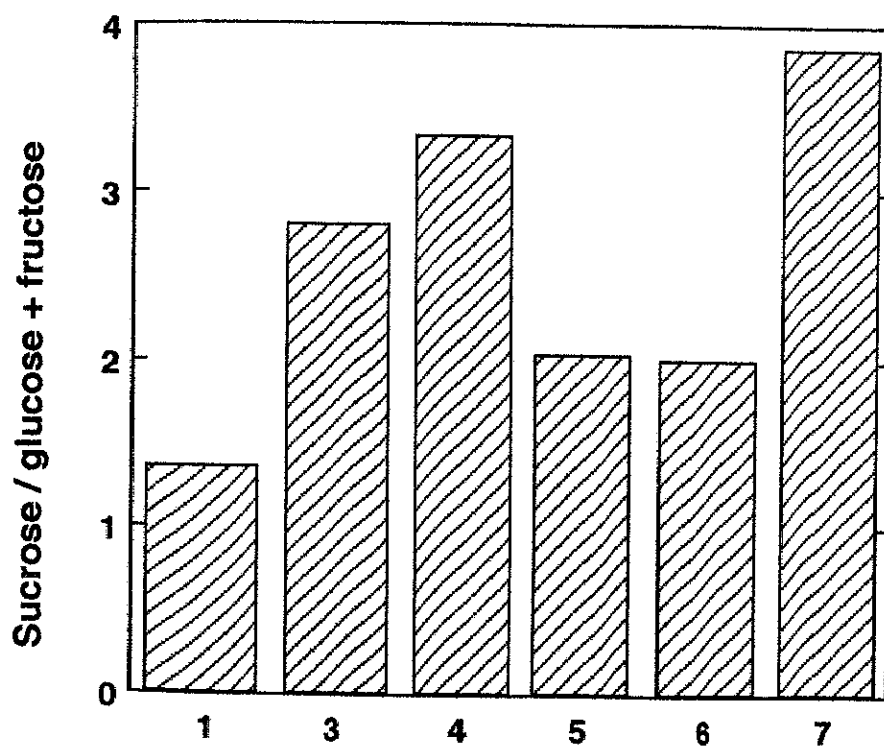


Fig. 42. Effects of various solvents on sugar ratio.

Reaction condition was described in Fig. 40, except for methanol. Solvents used were: 1, methanol; 3, 2-propanol; 4, DMF; 5, DMSO; 6, ethanol; 7, acetone.

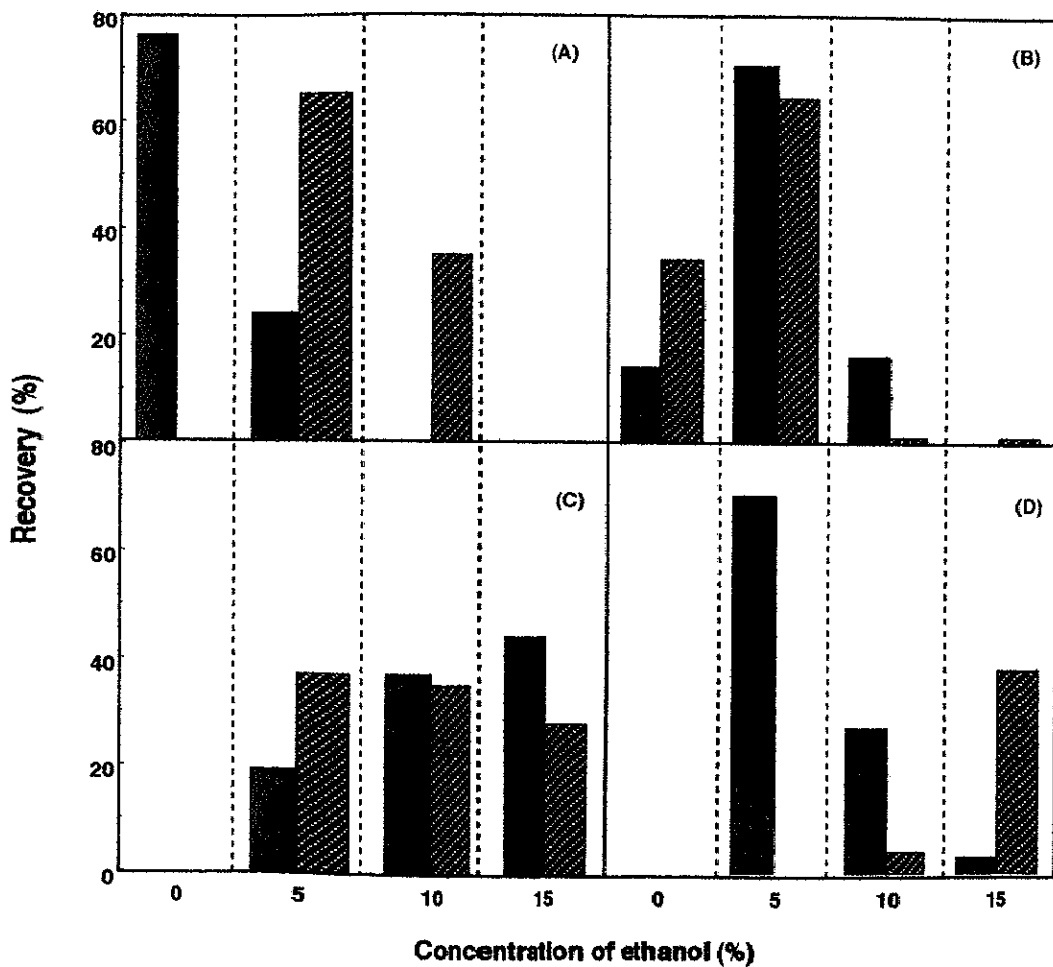


Fig. 43. Effects of various adsorbents on CG purification.

Each adsorbents (2 ml) was mixed with 10 mg (+)-catechin and 10 mg CG solution (10 ml), and washed with various concentration of ethanol (20 ml). (+)-Catechin (▨) and CG (■) were measured by HPLC. (A) Sephadex LH-20; (B), SP-800; (C), HP-20; (D), HP-1MG.

とにした。反応液は、10 mMのTris-HCl (pH 7.5) 300 mlに90 gのsucrose, 2.4 gの(+)-catechin, 5% (v/v) acetone,そして12,000 unitsのSPaseを含む組成であった。反応装置は、アミコン平膜限外濃縮装置 (350 ml容) を用い、反応終了液をYM10膜 (分画分子量 10,000) により酵素のみを装置内に残し、膜を通過した糖類・カテキン類は、吸着樹脂HP-1MG (3 X 38 cm) カラムに供した。水洗により糖類画分を別に集め、10% (v/v) のエタノール水溶液で目的産物であるCGを得た。また、未反応の(+)-catechinは20% (v/v) のエタノール水溶液にて回収した。

三回連続反応を行ない、各反応毎に不足分のスクロースとSPaseを新たに添加することにした。各反応において、2.4 gの(+)-catechinより1.7-1.8 gのCGが、回収された (Fig. 44-A) 。転移物の回収率は、モル比換算で約65%だった。残存するスクロース量は反応毎にばらつきがあったが、Fig. 44-Bのように平均して70-80%であった。また、SPase活性は、1回目終了時は約90%残っていたが、2回目以降は約70%となった (Fig. 44-C) 。

以上の結果、反応規模の拡大および連続合成により、若干CGの分離回収効率の低下が見られるが、Fig. 45に示すような連続生産システムを構築することができた。つまり、反応終了液は、分画分子量10,000の限外濾過膜を通過させ、酵素 (SPase) のみ反応槽内に留めた。一方、反応系外に糖類やカテキン類を排出させ、吸着樹脂HP-1MGカラムに供した。水洗により集めたフラクションは、主にスクロースであるので、糖供与体として再利用した。また、10% (v/v) のエタノールにより集めたフラクションに目的のCGを得た。そして、20% (v/v) のエタノールにより集めたフラクションは、主に未反応の(+)-catechinであり、糖受容体として再利用した。このように、酵素は系内に留め、基質であるスクロースと(+)-catechinを再利用する効率良い生産システムを完成した。問題点として、副生するスクロース以外の糖類の生成が挙げられ、これらを抑制するためには、溶媒の濃度を高め、加水分解させないことが必要と思われる。溶媒耐性の酵素の

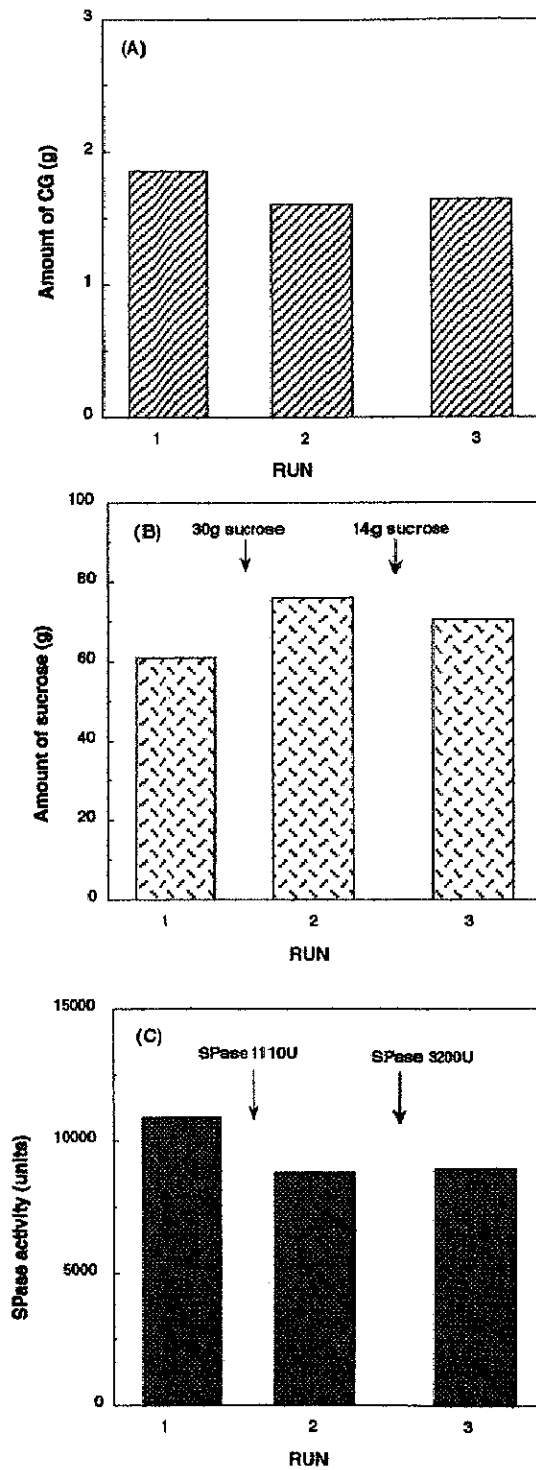


Fig. 44. Continuous production of CG.

Reaction mixture (300 ml) containing 90 g sucrose, 2.4 g (+)-catechin, 5% (v/v) acetone, and SPase (12,000 units) was incubated for 15h, at pH 7.5 of 10 mM Tris-HCl, at 42°C.



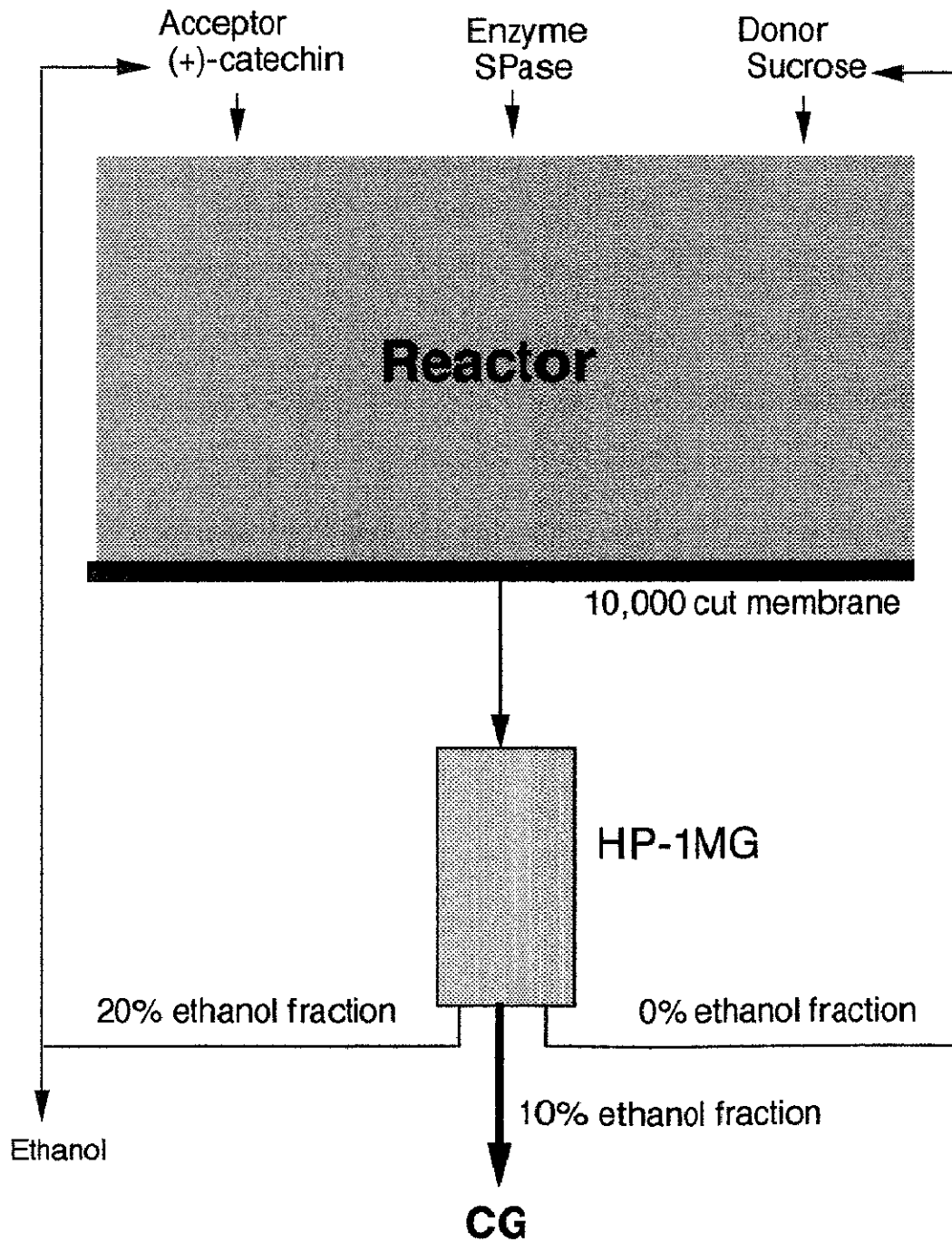


Fig. 45. Proposed model of continuous production of CG.

開発とともに、最終的には、固定化菌体あるいは固定化酵素システムなどの検討が必要となろう。

### 第3節 要約

SPaseによって生成するオリゴ糖や配糖体など、各種の糖質関連物質を工業化するため、生成比率と生成物の分離効率を高め、連続生産が可能なシステムを構築した。スクロースを糖供与体、(+)-catechinを受容体にした場合に生成されるCGを想定して、基質および生産物の増減に関する経時変化を調べ、また、フラクトースなどの副生成物を抑える有機溶媒の検討を行ない、アセトンを選択した。さらに、反応液から未反応基質と目的生産物を効率良く分別できる吸着樹脂の検討を行ない、HP-1MGを選んだ。そして、アミコン平膜限外濃縮装置（350 ml容）を用い、反応液300 ml規模の連続生産を行なった。各反応毎に不足分のスクロースとSPaseを新たに添加する方法で、CGの生成と回収率は、モル比換算で約65%だった。最終的にFig. 45に示すような連続生産システムを構築することができた。

## 結論

本研究は、無機燐定量用酵素であるスクロースホスホリラーゼ (SPase) をコードする遺伝子のクローニングと、大腸菌を宿主とする大量発現による本酵素の調製法に端を発し、当該酵素の糖転移能を利用したオリゴ糖・配糖体など糖質関連物質の合成に関して、基礎および応用を目的として行ったものである。

(1) 乳酸菌 Leuconostoc mesenteroides 由来の SPase 遺伝子のクローニングと大腸菌における発現において以下の知見が得られた<sup>33)</sup>。

N末端アミノ酸配列を基に作製したオリゴヌクレオチドプローブを用いたコローハイブリダイゼーションを取り掛かりとし、SPase遺伝子をクローニングした。これは、Leuconostoc属で最初に行なわれた遺伝子クローニングの例である。ファージ後期プロモーター方向に lac プロモーター支配化 SPase 遺伝子が 4 個直列に並んだスリーパーベクターを保持する大腸菌 1100 (slp-spl-1) の SPase 活性は、培養液 1 ml 当たり約 55.7 単位となり、元株 L. mesenteroides の約 80 倍生産性が高まり、全菌体抽出蛋白の約 30% を占めていた。また、デキストランやマンニトールなども培地中に蓄積せず、妨害酵素の生産量も低く、工業生産に適した菌株を作製することができた。このように生産性を高め、精製工程を簡略化できたため、本酵素の品質向上につながった。現在、本酵素のスリーパーベクターによる工場での製造は、通産省および厚生省の認可を得て実施されている。

塩基配列の解析の結果、本酵素は 490 個のアミノ酸から構成され、そのアミノ酸配列から分子量 55749 と算出された。ホモロジー検索よりスクロースホスホリラーゼ触媒能がある虫歯菌の S. mutans の gfA のコードする蛋白質<sup>13,14)</sup> と約 68% という高い相同性を示したが、他のスクロースを基質とする酵素<sup>52)</sup> や加燐酸分解酵素<sup>53)</sup> との高い相同性は見いだされなかった。グリコーゲン (スターチ) ホ

スホリラーゼは、古くから基礎的研究が活発に行なわれ、遺伝子も各種由来のものがクローニングされ、その一次構造・立体構造が決定されている。この酵素は、ピリドキサルリン酸（ビタミンB<sub>6</sub>）を補酵素とする<sup>53)</sup>が、SPaseはこの補酵素を必要とせず結合保存領域も存在しない。二糖類の加リン酸分解酵素ではビタミンB<sub>6</sub>酵素は今のところ発見されていない。多糖類と二糖類の加リン酸分解酵素の大きな違いと言えよう。同じ加リン酸分解能を有し、G-1-Pを生成するが、一次構造上の相同性は見いだされない。他の二糖類加リン酸分解酵素の遺伝子がクローニングされ、立体構造が解析されれば、構造と活性の相関が見いだされる可能性が高い。

(2) *P. saccharophila*由来のSPaseは、二基質（スクロースと無機リン）と二生成物（G-1-Pとフラクトース）反応を触媒し、典型的なping pong機構の酵素である<sup>11)</sup>。また、他の二糖類加リン酸分解酵素と違い、基質と生成物（スクロースとG-1-P）のアノマー型が反転しない<sup>5)</sup>など、その反応機構に特徴がある。今回、遺伝子がクローニングされたことにより、今後、蛋白の立体構造の解明や他の相同性のある酵素の存在が相まって、蛋白工学的手法による反応機構の解明が進むと期待される。また、実用面では、基質特異性が違う変異酵素を取得することにより、新規かつ有用な糖質関連物質の合成を容易にするであろう。

今回、SPaseの糖転移能に着目して各種のオリゴ糖や配糖体を合成し、本酵素の受容体特異性の幅広さや転移効率能の高さを示した。逆反応において、各種オリゴ糖を合成させた結果、従来、*P. saccharophila*由来の酵素で報告されている糖類<sup>15)</sup>以外へもグルコースが転移された。特に、D-,L-arabinitolなど5炭糖のアルコールへの転移効率が高かった。キシリトールを受容体とした4-O-α-D-glucopyranosylxylitolを合成し、その構造・機能から、虫菌予防効果のあるオリゴ糖として期待される<sup>34)</sup>。また、スクロースまたはG-1-Pを供与体とし、グルコースを受容体とした場合に、マルトース、イソマルトースやトレハロースは生成せ

ず、コージビオースとニゲロースが、約 2 : 1 の比率で生成することを見いだした<sup>35)</sup>。本酵素による反応は、従来の酵素的手法よりこれらグルコ二糖の生成比率が高く、現在、活性炭カラムを用いてグラムオーダーで調製している。今後、これらグルコ二糖の新たな機能、そして応用研究の進展が期待される。

(3) SPaseの糖転移反応において、特にフェノール性水酸基への転移効率の高さを明らかとした<sup>36,37,38)</sup>。糖を付与することにより、生理活性物質(アグリコン)の安定化や水に対する溶解性の向上が計られた。フェノール性水酸基は、抗酸化能を初めとする種々の生理機能を有している。このことは、フェノール性水酸基は、逆に非常に不安定な官能基であることを示唆している。このフェノール性水酸基に糖を付与することは、その化合物が安定化されるが、一方、官能基がマスクされることにより、生理機能の減衰につながることも考えられる。しかし、細胞や生体に投与されると、そこに存在する $\alpha$ -グルコシダーゼによってアグリコンとグルコースに分解され、元のアグリコンと同様の生理活性を発揮することが期待される。実際、アスコルビン酸の配糖体は、動物実験でアスコルビン酸以上に抗壞血病作用を有することが示された<sup>32)</sup>。今回、SPaseによって合成された種々の配糖体もアグリコン以上の生理活性を示すことが期待される。また、第4章のカテキン類配糖体で示されたように<sup>37)</sup>、配糖化することによりアグリコン単独では発揮できない新たな機能が発現することは、興味ある知見である。そして、第5章のフラノン配糖体で示したように、物性・性状の改善も配糖化によってなされることも、これからの配糖化技術の進むべき方向を示唆していると思われる。今後、有用な各種の糖質関連酵素が数多く見いだされれば、新たな食品・医薬品・化粧品・化成品素材につながる配糖化生理活性物質の開発が進むと思われる。

(4) 第7章で示したモデル系が実際の実用段階に応用されるには、まだ克服すべき課題が多い。アセトン反応液に用い、少しは副生成を抑えはしているが、

実際、SPaseは水への受容体特異性があり、加水分解し、グルコースとフラクトースを生成する。そして、遊離したグルコースが受容体となり、コージビオースとニゲロースも生成する。加水分解反応を防ぐには反応液の水をいかに少なくするか、つまり、有機溶媒の割合をどれだけ高められるかにかかっている。その点では、SPaseは有機溶媒に対する耐性が少し弱いと思われ、耐性のある糖転移酵素の探索が必要かもしれない。また、今回は平膜限外装置で連続反応を行なったが、将来的には、固定化酵素あるいは固定化菌体技術の導入が課題となろう。

SPase遺伝子のクローニングは、大量調製法の確立による応用面での貢献も大きい。SPaseのそのユニークな反応機構の遺伝子工学的解明への突破口を拓いた。そして、比較的研究の遅れている加燐酸分解酵素が注目を浴びることを期待する。さらに、従来、無機燐の定量にのみ応用面での可能性がなかったSPaseが、その糖転移能に関し新たな知見を与え、得られた糖転移物は、食品・医薬品・化粧品素材に利用できる途などを拓いた。

## 引用文献

- 1) 中村道徳 (監修) ; アミラーゼ、学会出版センター、東京 (1986).
- 2) M. Kitaoka, T. Sasaki, and H. Taniguchi; Conversion of sucrose into cellobiose using sucrose phosphorylase, xylose isomerase and cellobiose phosphorylase., *Denpun Kagaku*, **39**, 281-283 (1992).
- 3) M. Kitaoka, T. Sasaki, and H. Taniguchi; Conversion of sucrose into laminaribiose using sucrose phosphorylase, xylose isomerase and laminaribiose phosphorylase., *Denpun Kagaku*, **40**, 311-314 (1993).
- 4) H. Takahashi, K. Hara, H. Hashimoto, T. Sasaki, and H. Taniguchi; Synthesis of glucosylxylulose using sucrose phosphorylase., *Denpun Kagaku*, **40**, 1-5 (1993).
- 5) M. Kitaoka, T. Sasaki, and H. Taniguchi; Phosphorolytic reaction of *Cellvibrio gilvus* cellobiose phosphorylase., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 652-655 (1992).
- 6) B. O. Kagan, S. N. Latker, and E. M. Zfasman; Phosphorolysis of saccharose by cultures of *Leuconostoc mesenteroides*., *Biokhimiya*, **7**, 93-108 (1942).
- 7) M. Doudoroff, N. Kaplan and W. Z. Hassid; Phosphorolysis and synthesis of sucrose with a bacterial preparation., *J. Biol. Chem.*, **148**, 67-75 (1943).
- 8) M. Doudoroff; Studies on the phosphorolysis of sucrose., *J. Biol. Chem.*, **151**, 351-361 (1943).
- 9) M. Doudoroff, J. M. Wiame, and H. Wolochow; Phosphorolysis of sucrose by *Pseudomonas putrefaciens*., *J. Bacteriol.* **57**, 423-427 (1949).
- 10) E. J. Vandamme, J. V. Loo, L. Machtelinckx, and A. D. Laporte; Microbial sucrose phosphorylase: fermentation process, properties, and biotechnical applications., in *Advances in Applied Microbiology*, ed. by A. I. Laskin, Academic Press, New York (1987), vol. 32, pp. 163-201.

- 11) R. Silverstein, J. Voet, D. Reed, R. H. Abeles; Purification and mechanism of action of sucrose phosphorylase., *J. Biol. Chem.*, **242**, 1338-1346 (1967).
- 12) T. Koga, K. Nakamura, Y. Shirokane, K. Mizusawa, S. Kitao, and M. Kikuchi; Purification and some properties of sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*., *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1805-1810 (1991).
- 13) J. J. Ferretti, T-T. Huang, and R. R. B. Russell; Sequence analysis of the glucosyltransferase A gene (*gtfA*) from *Streptococcus mutans* Ingbritt., *Infect. Immun.*, **56**, 1585-1588 (1988).
- 14) R. R. B. Russell, H. Mukasa, A. Shimamura, and J. J. Ferretti; *Streptococcus mutans gtfA* gene specifies sucrose phosphorylase., *Infect. Immun.*, **56**, 2763-2765 (1988).
- 15) M. Doudoroff, W. Z. Hassid, and H. A. Barker; Studies with bacterial sucrose phosphorylase II. Enzymatic synthesis of a new reducing and of a new non-reducing disaccharide., *J. Biol. Chem.*, **168**, 733-746 (1947).
- 16) N. J. Palleroni and M. Doudoroff; Preparation and properties of D-rhamnulose (6-deoxy-D-fructose) and glucosyl rhamnulose., *J. Biol. Chem.*, **219**, 957-962 (1956).
- 17) R. Weimberg and M. Doudoroff; Studies with three bacterial sucrose phosphorylases. *J. Bacteriol.*, **68**, 381-388 (1954).
- 18) S. Daurat-Larroque, L. Hammar, and W. J. Whelan; Enzyme reactors for the continuous synthesis of sucrose from starch., *J. Appl. Biochem.*, **4**, 133-152 (1982).
- 19) H. Waldmann, D. Gyax, M. D. Bednarski, W. R. Shangraw, and G. M. Whitesides; The enzymic utilization of sucrose in the synthesis of amylose and derivatives of amylose, using phosphorylases., *Carbohydr. Res.*, **157**, c4-c7



- (1986).
- 20) A. Guibert and P. Monsan; Production and purification of sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* : Application to the production of glucose-1-phosphate., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **542**, 307-311 (1988).
  - 21) P. R. Birnberg and M. L. Brenner; A one-step enzymatic assay for sucrose with sucrose phosphorylase., *Anal. Biochem.*, **142**, 556-561 (1984).
  - 22) 片山善章、金島才仁 ; 無機リンの測定法., 特許出願公開 昭63-146800 (1988).
  - 23) M. Doudoroff; Disaccharide phosphorylases., *Methods. Enzymol.*, **1**, 225-231 (1955).
  - 24) J. J. Mieyal and R. H. Abeles; Disaccharide phosphorylases., in " The Enzymes," 3rd Ed. vol. 7, ed. by P. D. Boyer, Academic Press, New York, 1972, pp. 515-532.
  - 25) 渡辺敏幸 ; オリゴ糖の機能特性., 醬研, **17**, 44-51 (1991).
  - 26) 鱒坂勝美 ; 糖加水分解酵素を用いた糖鎖合成法., 糖質エンジニアリングと製品化技術, 畑中研一 石原一彦 (編) , サイエンスフォーラム, 東京 (1993), pp. 89-105.
  - 27) 北畑寿美雄 ; 糖転移酵素による糖質の合成., 糖質エンジニアリングと製品化技術, 畑中研一 石原一彦 (編) , サイエンスフォーラム, 東京 (1993), pp. 106-125.
  - 28) 機能性甘味料の全容., シーエムシー, 東京 (1988).
  - 29) I. Yamamoto, N. Muto, E. Nagata, T. Nakamura, and Y. Suzuki; Formation of a stable L-ascorbic acid  $\alpha$ -glucoside by mammalian  $\alpha$ -glucosidase-catalyzed transglucosylation., *Bochim. Biophys. Acta*, **1035**, 44-50 (1990).
  - 30) H. Aga, M. Yoneyama, S. Sakai, and I. Yamamoto; Synthesis of 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*., *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1751-1756 (1991).

- 31) I. Yamamoto, N. Muto, K. Murakami, S. Suga, and H. Yamaguchi; L-Ascorbic acid  $\alpha$ -glucoside formed by regioselective transglucosylation with rat intestinal and rice seed  $\alpha$ -glucosidases: Its improved stability and structure determination., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3020-3023 (1990).
- 32) I. Yamamoto, S. Suga, Y. Mitoh, M. Tanaka, and N. Muto; Antiscorbutic activity of L-ascorbic acid 2-glucoside and its availability as a vitamin C supplement in normal rats and guinea pigs., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **13**, 688-695 (1990).
- 33) S. Kitao and E. Nakano; Cloning of the sucrose phosphorylase gene from *Leuconostoc mesenteroides* and its overexpression using a 'Sleeper' bacteriophage vector., *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 179-184 (1992).
- 34) S. Kitao and H. Sekine; Transglucosylation catalyzed by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of glucosyl-xylitol., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 2011-2014 (1992).
- 35) S. Kitao, S. Yoshida, T. Horiuchi, H. Sekine, and I. Kusakabe; Formation of kojibiose and nigerose by sucrose phosphorylase., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 790-791 (1994).
- 36) S. Kitao and H. Sekine;  $\alpha$ -D-Glucosyl transfer to phenolic compounds by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of  $\alpha$ -arbutin., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 38-42 (1994).
- 37) S. Kitao, T. Ariga, T. Matsudo, and H. Sekine; The syntheses of catechin-glucosides by transglycosylation with *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 2010-2015 (1993).
- 38) S. Kitao and H. Sekine; Syntheses of two kojic acid glucosides with sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 419-420 (1994).

- 39) E. Nakano and T. Masuda; Construction of ' Sleeper' cloning vehicle for enzyme overproduction., *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 313-315 (1982).
- 40) 中野 衛一 ; 溶原性ファージ — "スリーパー" を中心として —, 蛋白質核酸 酵素, **32**, 1133-1140 (1987).
- 41) S. Kitao and E. Nakano; Nucleotide sequence from bacteriophage  $\phi$  80 with high homology to the major coat protein gene of lambda., *Nucleic Acid Res.*, **16**, 764 (1988).
- 42) Y. Koyama and E. Nakano; Cloning of the *glpK* gene of *Escherichia coli* K-12 and its overexpression using a ' Sleeper' bacteriophage vector., *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1315-1316 (1990).
- 43) 小山 泰二 ; 遺伝子組換え技術を利用した診断用酵素の生産に関する研究, 学位論文 (1989).
- 44) H. Saito and K. Miura; Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment., *Boichim. Biophys. Acta*, **72**, 619-629 (1963).
- 45) T. Maniatis, E. F. Fritsch, and J. Sambrook; Molecular cloning: A laboratory manual., Cold Spring Harbor Laboratory., Cold Spring, New York (1982).
- 46) F. Sanger, A. R. Coulson, B. G. Barrell, A. J. H. Smith, and B. A. Roe; Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing., *J. Mol. Biol.*, **143**, 161-178 (1980).
- 47) G. Michal; D-Glucose-1-phosphate., in "Methods of Enzymatic Analysis," 2nd Ed. vol. 4, ed. by H. U. Bergmeyer, Academic Press, New York, 1974, pp. 185-191.
- 48) R. D. de Moss; Glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconic dehydrogenases from *Leuconostoc mesenteroides*., *Methods. Enzymol.*, **1**, 328-334 (1955).
- 49) U. K. Laemmli; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature*, **227**, 680-685 (1970).

- 50) J. Shine and L. Dalgarno; The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1343-1346 (1974).
- 51) W. M. de Vos; Gene cloning and expression in lactic streptococci., *FEMS Microbiol. Rev.*, **46**, 281-295 (1987).
- 52) P. Gunasekaran, T. Karunakaran, B. Cami, A. G. Mukundan, L. Preziosi, and J. Baratti; Cloning and sequencing of the *sacA* gene: Characterization of a sucrose from *Zymomonas mobilis*., *J. Bacteriol.*, **172**, 6727-6735 (1990).
- 53) L. N. Johnson and D. Barford; Glycogen phosphorylase: The structural basis of the allosteric response and comparison with other allosteric proteins., *J. Biol. Chem.*, **265**, 2409-2412 (1990).
- 54) I. Havukkala; Trends in xylitology., *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **3**, 372-374 (1991).
- 55) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith; Colorimetric method for determination of sugars and related substances., *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
- 56) R. M. Stephan and E. S. Hemmens; Studies of changes in pH produced by pure cultures of oral micro-organisms., *J. Dental Res.*, **26**, 15-41 (1947).
- 57) 古賀 敏比古 ; *Streptococcus mutans*のグルカン合成とその付着メカニズム., 日本細菌学雑誌, **41**, 679-691 (1986).
- 58) T. Usui, N. Yamaoka, K. Matsuda, K. Tuzimura, H. Sugiyama, and S. Seto; <sup>13</sup>C Nuclear magnetic resonance spectra of glucobioses, glucotrioses, and glucans., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1973**, 2425-2432.
- 59) 麻生 清、柴崎 一雄 ; 多糖類の酸糖化生成糖に関する研究 (第1報) : 甘薯澱粉hydrolysisの糖組成に就て., 日本農芸化学会誌, **29**, 856-861 (1955).

- 60) 松田和雄；麹汁及び清酒中の二糖類（第5報）：Kojibioseの分離確認., 日本農芸化学会誌, **33**, 719-723 (1959).
- 61) T. Watanabe and K. Aso; Isolation of kojibiose from honey., *Nature*, **183**, 1740 (1959).
- 62) 麻生 清、渡辺敏幸；麦酒の研究（第2報）：麦酒中のグルコ二糖類について., 日本農芸化学会誌, **35**, 1078-1082 (1961).
- 63) K. Takeo, S. Kitamura, and Y. Murata; Synthesis of nigero-oligosaccharides., *Carbohydr. Res.*, **224**, 111-122 (1992).
- 64) S. Chiba, S. Sugawara, T. Shimomura, and Y. Nakamura; Comparative biochemical studies of  $\alpha$ -glucosidases: Part I. Substrate specificity and transglucosidation action of an  $\alpha$ -glucosidase of brewer's yeast., *Agric. Biol. Chem.*, **26**, 787-793 (1962).
- 65) M. Takahashi, T. Shimomura, and S. Chiba; Biochemical studies on buckwheat  $\alpha$ -glucosidase: Part III. Transglucosylation action of the enzyme and isolation of the reaction products., *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1399-1410 (1967).
- 66) H. Fujimoto, H. Nishida. and K. Ajisaka; Enzymatic syntheses of glucobioses by a condensation reaction with  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidases, and glucoamylase., *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1345-1351 (1988).
- 67) S. Akiu, Y. Suzuki, Y. Fujinuma, T. Asahara, and M. Fukuda; Inhibitory effect of arbutin on melanogenesis: Biochemical study in cultured B16 melanoma cells and effect on the UV-induced pigmentation in human skin., *Proc. Jpn. Soc. Invest. Dermatol.*, **12**, 138-139 (1988).
- 68) J. Onodera, M. Takano, Y. Kishi, N. Yokoyama, and R. Ishida; Direct condensation of polyhydric phenols with glucose., *Chemistry Letters*, 1487-1488 (1983).
- 69) S. Inomata, M. Yokoyama, S. Seto, and M. Yanagi; High-level production of arbutin from hydroquinone in suspension cultures of *Catharanthus roseus* plant

- cells., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 315-319 (1991).
- 70) R. Saruno, F. Kato, and T. Ikeno; Kojic acid, a tyrosinase inhibitor from *Aspergillus albus.*, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1337-1338 (1979).
- 71) Y. Umetani, E. Kodakari, T. Yamamura, S. Tanaka, and M. Tabata; Glucosylation of salicylic acid by cell suspension cultures of *Mallotus Japonicus.*, *Plant Cell Repots*, **9**, 325-327 (1990).
- 72) H. Nakano, S. Kitahata, H. Ohgaki, and S. Takenishi; Transglycosylation of phenols by endo-1,4- $\beta$ -galactanase from *Penicillium citrinum* and several  $\beta$ -galactosidase., *Denpun Kagaku*, **39**, 1-6 (1992).
- 73) 磯部哲宏、蓑口亮太、天野良彦、松澤恒友、神田鷹久; *Lyophyllum ulmarium*のキシラナーゼによるメチロール置換フェノール誘導体への糖転移反応., 平成4年度日本生物工学会大会講演要旨集, P. 113 (1992).
- 74) 松田秀秋、田中孝幸、久保道德; 生薬・ウワウルシの薬理学的研究 (第3報) 免疫性炎症における Arbutin と Indomethacin の併用効果, *薬学雑誌*, **111**, 253-258 (1991).
- 75) K. Ioku, J. Terao, and N. Nakatani; Antioxidative activity of arbutin in a solution and liposomal suspension., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1658-1659 (1992).
- 76) 松崎妙子、原 征彦; 茶葉カテキン類の抗酸化作用について., *日本農芸化学誌*, **59**, 129-134 (1985).
- 77) T. Kada, K. Kaneko, S. Matsuzaki, T. Matsuzaki, and Y. Hara; Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens: A case of the green tea factor., *Mutation Res.*, **150**, 127-132 (1985).
- 78) I. Oguni, K. Nasu, S. Yamamoto, and T. Nomura; On the antitumor activity of fresh green tea leaf., *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1879-1880 (1988).
- 79) 原 征彦、渡辺真由美; 茶ポリフェノール類のボツリヌス菌に対する抗菌作

- 用., 日本食品工業学会誌, **36**, 951-955 (1989).
- 80) M. Hattori, I. T. Kusumoto, T. Namba, T. Ishigami, and Y. Hara; Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 717-720 (1990).
- 81) 原 征彦、松崎妙子、鈴木建夫; 茶成分のアンジオテンシンI変換酵素阻害能について., 日本農芸化学会誌, **61**, 803-808 (1987).
- 82) K. Muramatsu, M. Fukuyo, and Y. Hara; Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 613-622 (1986).
- 83) 並木和子、山中みどり、立山千草、五十嵐紀子、並木満夫; 茶浸出液の血小板凝集抑制作用., 日本食品工業学会誌, **38**, 189-195 (1991).
- 84) F. Hashimoto, G. Nonaka, and I. Nishioka; Tannins and related compounds. LXIX. Isolation and structure elucidation of B, B'-linked bisflavanoids, theasinensins D-G and oolongtheanin from oolong tea (2)., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1676-1684 (1988).
- 85) 山崎幹夫、奥山恵美、松戸隆直、高丸 健、金子俊之; インドネシア産生薬の抗拘束水浸ストレス潰瘍活性成分の研究 (第1報) : *Artocarpus integra* Meer. (ヒメハラミツ) から(±)-Catechinの単離と同定., 薬学雑誌, **107**, 914-916 (1987).
- 86) M. Funayama, T. Nishino, A. Hirota, S. Murao, S. Takenishi, and H. Nakano; Enzymatic synthesis of (+)catechin- $\alpha$ -glucoside and its effect on tyrosinase activity., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1666-1669 (1993).
- 87) 横塚 保、佐々木正興、布村伸武、浅尾保夫; 醤油の香り(1)., 醸造協会誌, **75**, 516-523 (1978).
- 88) N. Nunomura, M. Sasaki, Y. Asao, and T. Yokotsuka; Isolation and identification

- of 4-hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2H)-furanone, as a flavor component in *Shoyu* (soy sauce)., *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 491-495 (1976).
- 89) A. Nagahara, H. Benjamin, J. Storkson, J. Krewson, K. Sheng, W. Liu, and M. W. Pariza; Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by a principal flavor component of Japanese-style fermented soy sauce., *Cancer Res.*, **52**, 1754-1756 (1992).
- 90) S. Soloway and S. H. Wilen; Improved ferric chloride test for phenols., *Anal. Chem.*, **24**, 979-983 (1952).
- 91) T. Yabuta; The constitution of kojic acid, a  $\gamma$ -pyrone derivative formed by *Aspergillus oryzae* from carbohydrates., *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, **1**, 1-3 (1924).
- 92) T. Kotani, I. Ichimoto, C. Tatsumi, and T. Fujita; Structure-activity study of bacteriostatic kojic acid analogs., *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1311-1317 (1975).
- 93) 三枝隆裕、江越加州生、岡崎清高、原 敏夫；麹菌が生産するコウジ酸グルコシド(KAG)の構造とその生成機作.,平成3年度日本醗酵工学会大会講演要旨集, P. 248 (1991).
- 94) R. M. Hann; The synthesis of 5- $\beta$ -D-glucosidokojic acid., *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 485-486 (1934).



## 謝辞

本論文は、キッコーマン株式会社旧第3研究部3グループと研究本部2グループにおいて、行なった研究をまとめたものである。本研究を振り返ってみると、実に多くの方々のご指導ご鞭撻により、本論文が完成できたことが感じられる。

本研究を行なうにあたり、ご懇篤なるご指導とご高配を賜りました筑波大学教授・村上和雄博士、並びに、本論文の作成に当たり、構成から事務手続きに至るまでご指導を賜った筑波大学教授・日下部功博士に深甚なる謝意を表します。

また、有益なご教示とご助言を戴きました大阪教育大学教授・内山喬夫博士、農林水産省食品総合研究所・小林幹彦博士、そして、ニゲロース・コージピオースの解析などにご尽力戴いた筑波大学助手・吉田滋樹博士に深謝いたします。また、数少ない二糖類加燐酸分解酵素の研究者として、有益な討論をして戴きました日本石油株式会社・北岡本光博士に感謝いたします。さらに、コージピオースを恵与いただいた東北大学助教授・中島佑博士に感謝申し上げます。

本研究の遂行に格別のご理解とご高配を賜りました、キッコーマン株式会社・中野孝三郎社長、常務取締役（現、日本デルモンテ社長）・杉山晋一博士、取締役研究本部長・斎藤成正博士、株式会社盛進社長（現、キッコーマン株式会社顧問）・那須野精一博士、研究本部長代理・杉本洋博士、研究担当部長・水沢清博士、ならびに元常務取締役研究本部長（現、キッコーマン株式会社顧問）・吉田文彦博士に謹んで御礼申し上げます。

本研究の第1章において、遺伝子の取り扱いを始めとして直接ご指導とご鞭撻をいただいた旧第3研究部3グループ長・中野衛一博士（現、研究推進室長）に心から深謝いたします。また、同グループの増田力博士、小山泰二博士を始めとする多くの方々に深謝いたします。

第2章から第7章にわたり、ご指導とご鞭撻をいただいた前、研究本部2グループ長・関根廣博士（現、野田産業科学研究所所長）に感謝申し上げます。特に、

本研究のコンセプトならびに方向づけに多くの時間を割いていただき、さらに投稿論文の推敲に多大なご便宜をいただきました。また、研究の指導ならびに本論文の推敲に多大なご便宜をいただきました現、研究本部2グループ長・堀内達雄博士に厚く御礼申し上げます。そして、2グループの多くの方々に感謝いたします。

本研究は、精製された乳酸菌 *L. mesenteroides* 由来スクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列が決定されたことにより、始められたものであり、本酵素の精製ならびに性質の検討に尽力された、野田産業科学研究所の古賀拓郎氏に感謝申し上げます。また、糖類全般の基礎ならびに実験手法をご指導いただいた、濱田孝司博士ならびに松戸隆直氏に厚く御礼申し上げます。そして、カテキン類などフェノール化合物の基礎ならびに実験手法をご指導いただいた、有賀敏明博士に深謝申し上げます。

また本研究において、NMR, SIMS など各種スペクトル解析にご協力下さった那須綾子氏、徳武昌一博士、山下加恵子氏に感謝いたします。

最後になりましたが、本研究にご協力いただき、諸々の実験のお手伝いをして下さいました斎藤和子氏、嶋岡洋子氏に心より厚く深謝いたします。

筑波大学附属図書館



1 00950 16178 0

本学関係

---