

氏名(本籍)	きた 北	お 尾	さとし 悟	(大阪府)
学位の種類	博士(農学)			
学位記番号	博乙第1,040号			
学位授与年月日	平成7年1月31日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
審査研究科	農学研究科			
学位論文題目	スクロースホスホリラーゼによる糖質関連物質の合成			
主査	筑波大学教授	農学博士	日下部	功
副査	筑波大学教授	農学博士	村上	和雄
副査	筑波大学助教授	農学博士	神山	由
副査	筑波大学教授	農学博士	田仲	可昌

論文の要旨

本研究は、スクロースの加磷酸分解反応を触媒する酵素である、スクロースホスホリラーゼ (SPase) をコードする遺伝子のスクリーニングと大腸菌を宿主とする大量発現による調整法に端を発し、当該酵素の糖転移能を利用したオリゴ糖・配糖体などの糖質関連物質の合成に関する基礎および応用を目的として行ったものである。

無機燐定量用酵素として診断用分野でニーズが高まってきた SPase の工業レベルでの大量発現菌株の作製のため、乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* の遺伝子ライブラリーから、SPase 遺伝子をクローニングした。そして lac プロモーター制御下、SPase 遺伝子が4個直列に並んだ DNA 構造をスーパーベクター slp 501 S-Tc に挿入したファージを有する大腸菌1100 (slp-sol-1) を構築した。この菌株は、誘導後、元株の *L. mesenteroides* に比べ約80倍生産性の高い、培養液 1 ml 当たり約55.7単位の SPase 活性値を示し、全菌体抽出蛋白の約30%を占めていた。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。

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検討し、従来、他起源酵素で報告されている糖類以外へもグルコースが転移することを見いだした。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。Xylitol を受容体とした時に生成されるオリゴ糖の構造を解析した結果、4-0- α -D-glucopyranosylxylitol (G-X) であった。この G-X は虫歯予防効果のあるオリゴ糖として期待される。また、G-1-P あるいはスクロースを供与体、グルコースを受容体に用いた時にコージビオースとニゲロースの混合物が合成されることを見いだした。

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出した。Hydroquinoneを受容体としたとき hydroquinone- $0-\alpha$ -D-glucopyranoside (α -arbutin) が合成され、アルブチンと同程度に、褐色抵抗性・チロシナーゼ活性阻害能を有していた。また、全てのカテキン類が受容体となり得、(+)-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い、その特質について調べた。特に、配糖化する事により、水に対する溶解性向上や安定化とともに、酵素阻害能を新たに発現したことは興味ある知見である。醤油の香気成分である 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone(HEMF) を受容体とした時、2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone 4- $0-\alpha$ -D-glucopyranoside (EMFG) が合成された。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るが、EMFG は白色無臭の粉末であった。また、EMFG は、HEMF と比べてその水溶液での安定性に優れていた。また、麴酸を受容体とした場合の転移産物の構造を調べた。この場合、2種類の転移産物が得られ、各々、kojic acid 5- $0-\alpha$ -D-glucopyranoside, kojic acid 7- $0-\alpha$ -D-glucopyranoside であり、フェノール性・アルコール性の水酸基へ転移することが判明した。これらの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。

最後に、SPase によって生成するオリゴ糖や配糖体など各種糖質関連物質生産を工場化するため、生成比率と生産物の分離効率を高め、連続生産可能なシステムを検討した。スクロースを糖供与体、(+)-catechin を受容体にした場合に生成する (+)-catechin 3'- $0-\alpha$ -glucopyranoside (CG) を想定して、経時変化、有機溶媒や吸着樹脂の検討を行い、300ml 規模の連続生産において、モル比換算で約65%のCG転移回収率を示した。

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への貢献も大きいですが、SPase のユニークな反応機構の遺伝子工学的解析への突破口を拓いた。また、従来、無機燐定量用にしか応用面での可能性のなかった SPase が、その糖転移能に関し新たな知見を与え、食品・医薬品・化粧品素材合成に利用する途を拓いた。

審 査 の 要 旨

これ迄に、乳酸菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) のスクロースホスホリラーゼは無機燐定量用酵素として、主に診断用分野に使われていた。しかし、同酵素を現在よりもさらに広範に利用するためには、酵素生産を工業生産レベルに至るまで高める必要があった。このような現状から著者の研究はまずスクロースホスホリラーゼ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調製法を行い、次に同酵素による糖転移反応を利用して、オリゴ糖や配糖体などの合成に関する基礎および応用を目的として行ったものである。

その結果、大腸菌の大量生産発現株を作製することによって、酵素生産は約80倍に高められた。次にスクロースホスホリラーゼの基質特異性を詳細に研究した結果、同酵素は従来の加燐酸分解反応以

外に糖転移反応を行い、この反応によって多種多様な構造の糖質関連物質を合成できることを発見した。この事実を応用することによって、著者は種々の中性糖やフェノール化合物、カテキン類、フラノンやピロン化合物などにグルコースを酵素的に付加したオリゴ糖類や配糖体類などを合成し、それらを分離し、化学構造を明らかにした。一方、同酵素によって、スクロースを供与体に、カテキンを受容体としてカテキングルコシドを製造する小規模連続生産システムを構築し、実際に連続生産を行い、工業化を指向したデータを提示した。

本研究で行った酵素の大量生産技術は生物化学工学分野へ、また種々の糖質関連物質は機能性食品の開発分野への応用性は極めて高く、さらに医薬品や化粧品素材に利用できる途を拓いたことは高く評価できる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。