The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	微生物由来ホスホリラーゼを用いた新規機能性オリゴ糖の生産に関する研究
Author(s)	山本, 拓生
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/914
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

博士論文

微生物由来ホスホリラーゼを用いた新規機能性オリゴ糖の生産に関する研究

(Studies on production of novel functional oligosaccharides using bacterial phosphorylases)

２００７年３月

山本　拓生

(Takuo Yamamoto)

目次

緒論 1

第１章　*Thermoanaerobacter brockii* ATCC35047 株由来 KP 遺伝子のクローニングと KP の部位特異的変異解析

第１節　緒言 5

第２節　実験材料と方法 6

第３節　結果

１－３－１　KP 遺伝子断片の PCR による増幅 10

１－３－２　KP 遺伝子全領域のクローニング 10

１－３－３　KP 遺伝子（*kojP*） 14

１－３－４　その他の ORF 16

１－３－５　KP の部位特異的変異解析 18

第４節　考察 21

第５節　要約 23

第２章　枯草菌を宿主とした KP, TP 両遺伝子の高発現化

第１節　緒言 24

第２節　実験材料と方法 25

第３節　結果

２－３－１　KP 遺伝子の枯草菌での発現 28

２－３－２　TP 遺伝子の枯草菌での発現 28

第４節　考察 31

第５節　要約 32

第３章　組換え KP, TP を用いた効率的なセラギノースの酵素合成

第１節　緒言 33

第２節　実験材料および方法 34

第３節　結果

３－３－１　組換え KP, TP を用いたセラギノースの調製 36

３－３－２　セラギノースの *in vitro* 消化性試験 37

第４節　考察 38
第５節　要約 40

第４章　ランダム変異による KP の機能改変
第１節　緒言 41
第２節　実験材料と方法 42
第３節　結果
４－３－１　耐熱化変異酵素のスクリーニング 48
４－３－２　耐熱化変異酵素の精製 48
４－３－３　耐熱化変異酵素の諸性質 49
４－３－４　DP 変異酵素のスクリーニング 51
４－３－５　DP 変異酵素を用いたコージオリゴ糖生成試験 52
第４節　考察 54
第５節　要約 56

第５章　KP, TP のキメラ化による特異性改変酵素の取得
第１節　緒言 57
第２節　実験材料と方法 58
第３節　結果
５－３－１　キメラ酵素の設計 65
５－３－２　活性型キメラ酵素のスクリーニング 65
５－３－３　キメラ酵素 V-III の諸性質 70
５－３－４　キメラ酵素 V-III のラミナリビオースに対する作用 76
第４節　考察 81
第５節　要約 87

第６章　KP の受容体基質認識機構の解明
第１節　緒言 88
第２節　実験材料と方法 89
第３節　結果
６－３－１　KP の受容体特異性試験 91
６－３－２　グリコシルグリセロールの調製と単離 92
６－３－３　グリコシルグリセロールの構造解析 93

６－３－４　グリコシル *myo*-イノシトールの調製と単離　97
６－３－５　グリコシル *myo*-イノシトールの構造解析　98
第４節　考察　102
第５節　要約　105

総括　106

引用文献　111

参考論文　120

その他論文　121

謝辞　122

略号

KP	:	kojibiose phosphorylase
TP	:	trehalose phosphorylase
MP	:	maltose phosphorylase
SP	:	sucrose phosphorylase
CBP	:	cellobiose phosphorylase
LBP	:	laminaribiose phosphrylase
T6PP	:	trehalose-6-phosphate phosphorylase
CGTase	:	cyclomaltodextrin glucanotransferase
β-G1P	:	β-glucose 1-phosphate
α-G1P	:	α-glucose 1-phosphate
Pi	:	inorganic phosphate
DP	:	degree of polymerization
ORF	:	open reading frame
GH-65	:	glucoside hydrolase family 65
TLC	:	thin-layer chromatography
HPLC	:	high-performance liquid chromatography
GLC	:	gas-liquid chromatography
PAGE	:	polyacrylamide gel electrophoresis
SDS	:	sodium dodecyl sulfate
GPC	:	gel-permeation chromatography

緒論

糖質は、生命活動において主たるエネルギー源として利用されている。人類は、糖質に対し栄養素としての一次機能を与え、甘味などの嗜好性機能（二次機能）を求め、砂糖の製造やデンプンの加工を行ってきた。近代に入り、各種加水分解酵素・糖転移酵素の発見に伴い、デンプン加工業が急速に発達し、各種の糖質やオリゴ糖が供給されるようになった。近年、消費者の健康志向が高まるにつれ、食品のもつ生体調節機能（三次機能）が注目されるようになり、さまざまな機能性糖質の開発が行われるようになった。この過程においてα-1,4 結合のマルトースやマルトオリゴ糖、α-1,6 結合のイソマルトオリゴ糖、α-1,3 結合のニゲロオリゴ糖、β-1,6 結合のゲンチオオリゴ糖、α-1,4 結合の環状オリゴ糖シクロデキストリン、α,α-1,1 結合のトレハロース、さらには種々のヘテロオリゴ糖などが開発された。高齢化社会・生活習慣病が増大する中、オリゴ糖の機能性食品素材、化粧品素材としての期待はますます高まっており、さらに新しいオリゴ糖の開発が望まれている。

コージビオースはグルコース 2 分子が α-1,2 結合した還元性二糖で、麹汁、酒、蜂蜜、ビール、澱粉加水分解物中に微量ながら存在する（1）。コージビオースの最も有効な製造方法として、*Leuconostoc mecenteroides* NRRL B-1229 株が生成するデキストランの加酢分解物からコージビオースを単離する方法が知られていたが、この調製方法は非常に煩雑なものであった。また、コージビオースの酵素合成としてα−グルコシダーゼやグルコアミラーゼ、さらにはスクロースホスホリラーゼを利用した製造が報告されたが（2-4）、その酵素反応過程における副生成物の生成、低収率などの問題点のため大量生産には至らず、よって本糖質の有用性や機能性についての知見はほとんどなかった。我々はコージビオースを含む新規機能性オリゴ糖の開発を目的として、広く微生物を対象に鋭意検索した結果、嫌気性好熱菌 *Thermoanaerobacter brockii* ATCC35047 株が新規酵素コージビオースホスホリラーゼ（KP; EC 2.4.1.230）を産生することを見出した（5）。本酵素はグルコースと β-グルコース-１-リン酸（β-G1P）とからコージビオースのみならず重合度３以上のコージオリゴ糖を生成した（6）。また、適当な受容体糖質の存在下で本酵素を β-G1P に作用させることにより、新規なオリゴ糖や新規なコージオリゴ糖を調製することも可能であることが判明した（7,8）。本酵素は α-1,2 結合を選択的に生成する唯一のホスホリラーゼとして報告されている（5）。*T. brockii* は KP の他に、KP の類縁酵素であるトレハロースホスホリラーゼ（TP; EC 2.4.1.64）を産生する（9）。トレハロースはグルコース 2 分子が α,α-1,1 結合した非還元性二糖であり、凍結や乾燥などの極限状態からタンパク質や組織を保護する機能がある（10）。トレハロースは細菌、酵母、キノコなどの菌類、藻類、コケ、シダなどの植物、エビ、昆虫などの無脊椎動物など、広く自然界に存在しているが、工業的に抽出、

製造することは困難であった。㈱林原では工業的なデンプンからのトレハロース製造に成功し、トレハロースを安価で大量に供給できるようになった。我々は既に *T. brockii* 由来 TP の酵素的諸性質を決定するとともに、その塩基配列を明らかにした（11,12）。KP を用いて調製したコージビオースや種々のコージオリゴ糖は、低い還元力、弱いメイラード反応性、高い安定性、難消化性や非う蝕原性、*Bifidobacterium* 属細菌による選択的資化（プレバイオティクス素材としての利用）、等さまざまな機能を有しており、食品、化粧品、医薬品分野での用途が期待される（6, 13,14）。

糖質関連酵素のうち、加リン酸分解酵素（ホスホリラーゼ）は細胞内貯蔵多糖の代謝あるいは細胞外多糖の部分分解物の細胞内での代謝に関与する酵素群である。現在までに報告されているホスホリラーゼは、Table 1 に示すように合計 14 種類ある（15,16）。それらのうち、デンプンあるいはグリコーゲンのホスホリラーゼを除いて、すべて「加リン酸分解される基質＋ホスホリラーゼ」と命名されている。全ての既知のホスホリラーゼは非還元末端単糖のグリコシド結合を加リン酸分解するエキソ型酵素で、大部分がグルコシド結合切断酵素であるが、ガラクトシル結合（16,17）および *N*-アセチルグルコサミニル結合に関与するものも近年報告された（18,19）。ホスホリラーゼはすべて菌体内あるいは細胞内酵素であり、分泌型の加リン酸分解酵素は知られていない。

Table 1.　The phosphorolytic enzymes.

EC	name	mechanism	substrate	d.p. substrate	product	family	Source
2.4.1.1	(Glycogen) phosphorylase	retention	Glc-α1,4-Glc	≧5 or 4	α-Glc-1P	GT35	Animal, Plant, Yeast, Bacteria
2.4.1.7	Sucrose phosphorylase	retention	Glc-α1,β2-Fru	2 only	α-Glc-1P	GH13	Bacteria
2.4.1.8	Maltose phosphorylase	inversion	Glc-α1,4-Glc	2 only	β-Glc-1P	GH65	Bacteria
2.4.1.20	Cellobiose phosphorylase	inversion	Glc-β1,4-Glc	2 only	α-Glc-1P	GH94	Bacteria
2.4.1.30	β-1,3-Oligoglucan phosphorylase	inversion	Glc-β1,3-Glc	≧2	α-Glc-1P	not cloned	Animal (Protozoa)
2.4.1.31	Laminaribiose phosphorylase	inversion	Glc-β1,3-Glc	≧2	α-Glc-1P	not cloned	Animal (Protozoa)
2.4.1.49	Cellodextrin phosphorylase	inversion	Glc-β1,4-Glc	≧3	α-Glc-1P	GH94	Bacteria
2.4.1.64	Trehalose phosphorylase	inversion	Glc-α1,α1-Glc	2 only	β-Glc-1P	GH65	Bacteria
2.4.1.97	β-1,3-Glucan phosphorylase	inversion	Glc-β1,3-Glc	polymer	α-Glc-1P	not cloned	Animal (Protozoa)
2.4.1.211	Lacto-*N*-biose phosphorylase	inversion	Gal-β1,3-GlcNAc	2 only	α-Gal-1P	new family	Bacteria
2.4.1.216	Trehalose-6-phosphate phosphorylase	inversion	Glc-α1,α1-Glc6P	2 only	β-Glc-1P	GH65	Bacteria
2.4.1.230	Kojibiose phosphorylase	inversion	Glc-α1,2-Glc	≧2	β-Glc-1P	GH65	Bacteria
2.4.1.231	Trehalose phosphorylase	retention	Glc-α1,α1-Glc	2 only	α-Glc-1P	GT4	Fungi
ND	Chitobiose phosphorylase	inversion	GlcNAc-β1,4-GlcNAc	2 only	α-GlcNAc-1P	GH94	Bacteria

ND, not determined.

近年、マルトース、トレハロースなどのオリゴ糖とその機能が注目され、加水分解酵素や糖転移酵素のみならず、ホスホリラーゼを組み合わせたこれらオリゴ糖の多様な生産方法が各方面から広く検討されるようになってきた。これらオリゴ糖を生産する方法として、マルトースホスホリラーゼ（MP; EC 2.4.1.8）とトレハロースホスホリラーゼ（反転型）（TP; EC 2.4.1.64）を組み合わせたマルトースからのトレハロースの製造(20)、スクロースホスホリラーゼ(SP; EC 2.4.1.7）とトレハロースホスホリラーゼ（保持型）（TP; EC 2.4.1.231）を用いたトレハロースの製造（21)、SP とセロビオースホスホリラーゼ（CBP; EC 2.4.1.20）を組み合わせたスクロースからのセロビオースの製造（22)、SP とラミナリビオースホスホリラーゼ（LBP; EC 2.4.1.31）を用いたスクロースからのラミナリビオースの製造（23)、さらには SP と（グリコーゲン）ホスホリラーゼ（EC 2.4.1.1）を組み合わせたスクロースからのアミロース酵素合成（24)、CBP と(グリコーゲン)ホスホリラーゼを組み合わせたセロビオースからのアミロース酵素合成(25)など、種々のホスホリラーゼを用いた合成方法が報告されている。ホスホリラーゼは反応の位置選択性において極めて特異性が高く、特定の位置に結合したグリコシド結合のみに作用する。そのため、逆反応（合成反応）を利用することにより特定の結合をもつオリゴ糖を効率よく、選択的に合成することが可能である。かかる観点から、本研究において、前述の *T. brockii* 由来ホスホリラーゼを用いた新規機能性オリゴ糖の生産について検討した。

本論文は新規な機能性オリゴ糖の生産を実現させるため、KP の遺伝子クローニングおよびその遺伝子解析、取得した酵素遺伝子を大量に発現させるための、枯草菌を宿主とした高発現宿主ーベクター系の構築、本発現系で得られた組換え酵素を用いた非還元性三糖セラギノースの効率的な酵素合成とその機能性調査、さらには、より有用な機能性オリゴ糖の生産に発展させるための可能性の検証として、遺伝子工学的手法を用いた KP の機能改変、KP の受容体基質の特異性ならびにその認識機構についてまとめたものである。第１章では、機能性オリゴ糖の生産を見据え、*T. brockii* ATCC35047 株から KP 遺伝子ならびにその下流領域をクローニングし塩基配列を決定した。また、大腸菌を宿主とした KP の発現系の構築を行った。さらに KP に部位特異的変異を導入し、KP の活性残基および糖結合に関与する残基を推定した。第２章では、KP、TP の効率的な大量生産を目的として、枯草菌を宿主とした高発現系の構築を行った。プラスミド pUB110 上に *Bacillus amyloliquefaciens* 由来 α-アミラーゼプロモーターとその下流に KP または TP 遺伝子を連結し、KP, TP の高発現ベクターをそれぞれ構築した。得られた組換え枯草菌でのそれぞれの酵素発現量は培養液 1 L 当たり数グラム（いずれも菌体内）であり、工業化に耐えうる発現量を示した。第３章では、効率的なオリゴ糖製造への応用の一例として、枯草菌を宿主として発現させた組換え KP と TP を組み合わせて、トレハロースから非還元性三糖であるセラギノースの酵素合成を試みた。さらに本糖質の機能性を調査した。第４章では、error-prone PCR 法により KP 遺伝子にランダム変異を導入し、1 種類の耐熱化変異酵素ならびに

2 種類の生成物の重合度が高分子側へシフトした生成物変異酵素（DP 変異酵素）を取得した。第５章では、KP の反応特異性の改変を目的として、KP とその類縁酵素である TP との間で遺伝子シャッフリングを行った。類縁酵素同士のキメラ化によって基質特異性や反応特異性が大きく変化したキメラ酵素を取得した。本キメラ酵素について酵素的諸性質を明らかにした。第６章では、KP の受容体特異性を幅広く検索し、グリセロールおよび *myo*-イノシトールが受容体基質となることを明らかにした。それぞれの糖転移物を単離し構造決定するとともに、得られた転移糖の構造をもとに KP の受容体認識機構を明らかにした。

以上、本研究において、*T. brockii*ATCC35047 株由来 KP の遺伝子クローニングおよびその遺伝子解析を行った。得られた KP 遺伝子を用いて枯草菌を宿主とした高発現宿主ーベクター系を構築し、工業化に耐えうる高発現化を実現させた。さらに、本発現系で得た組換えホスホリラーゼを用いたセラギノースの効率的製造を行い、本糖質の機能性を調査した。また、得られた KP 遺伝子を用いて遺伝子工学的手法による KP の機能改変を行い、耐熱化変異酵素、DP 変異酵素、キメラ酵素をそれぞれ取得するとともに、KP の幅広い受容体特異性を明らかにした。これらは更なる新規機能性オリゴ糖生産への可能性を開くものと考えられた。

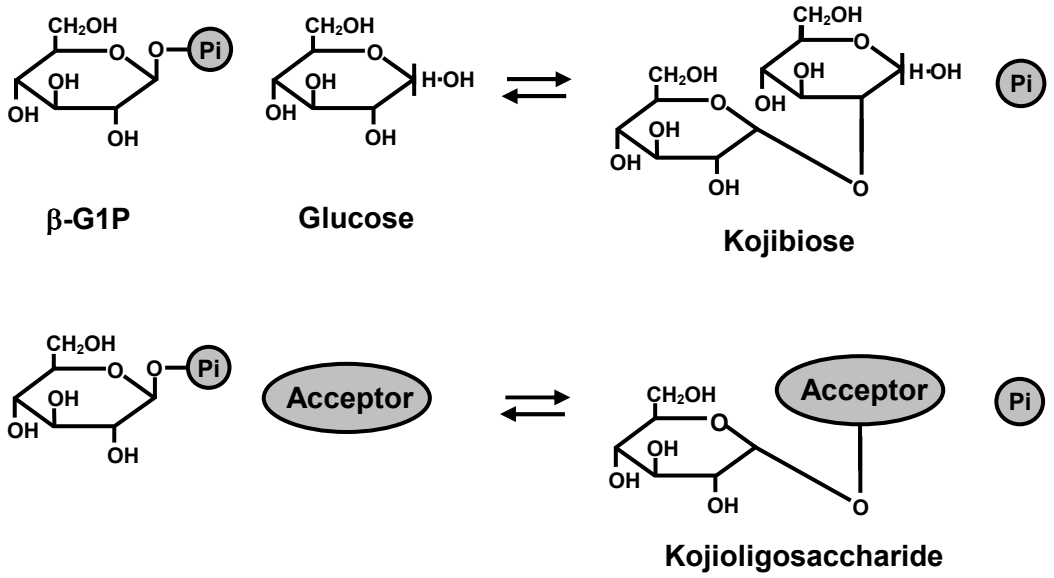


Fig. 1.　Scheme for the formation of kojibiose or kojioligosaccharide by KP

第１章　*Thermoanaerobacter brockii* ATCC35047 株由来 KP 遺伝子のクローニングと KP の部位特異的変異解析

第１節　緒言

コージビオース（α-D-glucopyranosyl-(1→2)-D-glucopyranose）はグルコースが α-1,2 結合した還元性二糖で、麹汁、酒、蜂蜜、ビール、澱粉加水分解物中に微量ながら存在する（1）。これまで α−グルコシダーゼやグルコアミラーゼ、さらにはスクロースホスホリラーゼを利用したコージビオースの酵素的製造が試みられてきたが、その製造過程において副生成物の生成、低収率などの問題があった（2-4）。我々は広く微生物を対象に検索した結果、嫌気性好熱菌 *Thermoanaerobacter brockii* ATCC35047 株から新規酵素コージビオースホスホリラーゼ（KP; EC 2.4.1.230）を発見した（5）。本酵素は β-グルコース-１-リン酸（β-G1P）のグルコース残基を受容体グルコースへ α-1,2 転移させてコージビオースを生成する反応を触媒する。本酵素はさらに、反応により生成したコージビオースに α-1,2 グルコシル転移し、重合度３以上のコージオリゴ糖を生成した（6）。また、適当な受容体糖質の存在下で KP を β-G1P に作用させることによって、新規なオリゴ糖や新規なコージオリゴ糖を調製することが可能であることも判明した（7,8）。これらオリゴ糖の有用性についての報告がなされている（6,13,14）。

T. brockii は、KP 以外にもトレハロースホスホリラーゼ（TP; EC 2.4.1.64）を産生する（9）。TP はトレハロース（α-D-glucopyranosyl- (1 ↔1) α-D-glucopyranoside）の α, α-1,1 グルコシド結合を加リン酸分解してグルコースと β-G1P を生成する。我々は TP の酵素的諸性質を決定するとともに、その塩基配列を明らかにした（11,12）。KP, TP 両酵素の共同作用により、トレハロースから非還元性三糖であるセラギノース（α-D-glucopyranosyl-(1→2) α-D-glucopyranosyl α-D-glucopyranoside）が生成する（9）。

trehalose + inorganic phosphate (Pi) ⇄ β-glucose 1-phosphate (β-G1P) + glucose ; TP

trehalose + β-G1P ⇄ selaginose + Pi ; KP

現在までに報告されているホスホリラーゼは合計 14 種類ある（15,16）。これら酵素群の酵素的諸性質については詳細に調べられているが、遺伝子のクローニングならびに活性残基や活性部位の同定についての報告は少ない。

本章では、KP と TP を用いた新規機能性オリゴ糖の生産を見据え、まず *T. brockii* ATCC35047 株の染色体 DNA から KP 遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した。さらに、KP に部位特異的変異を導入して活性残基ならびに活性部位の同定を試みた。

第２節　実験材料および方法

１－２－１　実験材料

（１）宿主大腸菌

遺伝子操作の宿主大腸菌として、*Escherichia coli* XL1-Blue MRF'（*hsdR*17, *sup*44, *recA*1, *endA*1, *gyrA*46, *thi*, *relA*1, *lac*/F' [*proAB*$^+$, *lacI*^{q}, *lacZ*ΔM15::Tn*10* (*tet*^{r})]）を使用した。また、遺伝子発現の宿主大腸菌として、*E. coli* JM109（*recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*, *hadR*17 ($r_K^-m_K^+$), *e*14$^-$ (mcrA$^-$), *sup*E44, *rel*A1, Δ(*lac-proAB*)/F'[*traD*36, *proAB*$^+$, *lacI*^{q}, *lacZ*ΔM15]）を、さらに部位特異的変異解析における宿主として、大腸菌 *E. coli* MV1184（*ara*, Δ(*lac-proAB*), *rpsL*, *thi* (ϕ80 *lacZ*ΔM15), Δ(*srl-recA*) 306::Tn*10* (*tet*^{r})/F'[*traD*36, *proAB*$^+$, *lacI*^{q}, *lacZ*ΔM15]）を使用した。

（２）プラスミド

クローニングベクターには、pBluescriptII SK+（Stratagene 社製、USA）を用いた。また発現ベクターには、pKKZ（pKK223-3 由来、*Eco*RI – *Pst*I サイトに、5'-GAATTCCACACAGGAAAC-AGAGCTCCCGGGACTAGTCTGCAG-3'（下線部が *Sac*I サイト、二重下線部が *Spe*I サイト）の DNA 配列をもつ。Amersham Pharmacia Biotech 社製、UK）を用いた。プラスミド pKF18k（宝酒造社製）は、部位特異的変異解析に使用した。

１－２－２　組換え大腸菌の培養

組換え *E. coli* の培養は、液体培養の場合２×YT 培地（1.6%ポリペプトン、1.0%酵母エキス S、0.5% NaCl）を、遺伝子発現実験では 1% N-Z Soy peptone（Sigma-Aldrich, USA）、2%酵母エキス S、1%パインデックス#4（デンプン部分分解物、松谷化学社製）、0.1% NaH_2PO_4 からなる培地（pH7.0）を用いた。平板培養の場合、LB 培地（1.0%ポリペプトン、0.5%酵母エキス S、1.0% NaCl、1.5%寒天）を用いた。いずれの場合も、必要に応じてアンピシリンまたはカナマイシンを終濃度 100 μg/mL となるように添加し、37℃で培養した。

１－２－３　KP の部分アミノ酸配列

T. brockii ATCC35047 株由来 KP の精製標品（5）をリジルエンドペプチダーゼとトリプシンで消化した後、逆相 HPLC に供して 8 種類のペプチド KP-1～KP-8（Fig. 1-2）を単離した。これらペプチドおよび KP の N 末端アミノ酸配列は、プロテインシーケンサー model 473（Applied Biosystems, USA）を用いて分析した。

１－２－４　DNA の調製

T. brockii ATCC35047 株の染色体 DNA は、Saito と Miura の方法に準じて調製した（26）。プラスミド DNA の精製は、Birnboim らの方法に従った（27）。PCR プライマーと配列決定に用いるオリゴヌクレオチドは、DNA/RNA シンセサイザー model 394（Applied Biosystems, USA）を用いて合成した。特別な場合を除き、他の遺伝子操作は Maniatis らの標準法に従った（28）。

１－２－５　塩基配列決定

塩基配列の決定は、DNA シーケンサーmodel 373A（Applied Biosystems）を用いて行った。作製した各種サブクローン体またはデレーションミュータントからプラスミドを抽出、精製して鋳型とした。プライマーには T3, T7 または KS を用い、Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）を添加し、PCR を行った。PCR 条件および DNA 回収方法はキットのプロトコールに従った。塩基配列の解析は、遺伝子解析ソフト GENETYX-Mac（ソフトウェア開発㈱社製）を用いて行った。

１－２－６　遺伝子クローニング

（１）KP 遺伝子断片のクローニング

KP 遺伝子断片を得るため、Takara LA PCR *in vitro* Cloning Kit（宝酒造）を用いて PCR を行った。*T. brockii* ATCC35047 株由来の染色体 DNA を鋳型とした。センスミックスプライマーとして、KP の N 末端アミノ酸配列 Met-Val-Lys-His-Met-Phe-Leu（Fig. 1-2 の N-terminus）に対応する塩基配列 5’-ATGGTNAARCAYATGTTYYT-3’ (N=A, C, G, or T, R=A or G, Y=C or T) を、アンチセンスミックスプライマーとして、KP の内部アミノ酸配列 Phe-Asp-Glu-Asn-Asn-Met-Pro（Fig. 1-2 の KP-7）に対応する塩基配列 5’-GGCATRTTRTTYTCRTCRAA-3’を用いた。PCR 条件として、98℃で 20 秒間、50℃で 15 秒間、68℃で 3 分間を 1 サイクルとし、95℃で 1 分間保持して DNA を変性させた後、30 サイクル運転した。増幅した DNA 断片（Fig. 1-1 の PCR-1）をアガロースゲル電気泳動により精製し、pBluescriptII SK+上の *Sac*II – *Apa*I サイトにクローニングした。本 DNA 断片はコロニーハイブリダイゼーションのプローブとして使用した。

（２）KP 遺伝子のクローニング

T. brockii ATCC35047 株由来の染色体 DNA を制限酵素 *Hin*dIII で完全消化後、アガロースゲル電気泳動で分画し、約 3 – 7 kbp 付近の DNA 断片を回収した。これを pBluescriptII SK+上の *Hin*dIII サイトに挿入し、*Hin*dIII ゲノミック DNA ライブラリーを作製した。DIG DNA 標識および検出キット（Roche Molecular Biochemicals 社製、Mannheim、Germany）により標識した PCR-1 プローブを用いて、添付のプロトコールに従ってコロニーハイブリダイゼーションを行い、陽性ク

ローンをスクリーニングした。

１－２－７　KP 遺伝子発現ベクターの構築と同遺伝子の大腸菌での発現

KP 遺伝子発現ベクターを構築するため、KP 遺伝子を PCR により増幅した。KP 遺伝子全長を含むプラスミド pBKP1（Fig. 1-1）を鋳型とした。センスプライマーとして、KP 遺伝子の 5’末端配列を含む塩基配列　5’-CCCGAGCTCATATGGTAAAGCACATGTTTTTAGAGGATG-3’（KPN と命名、下線部が *Sac*I サイト)を、アンチセンスプライマーとして、KP 遺伝子の 3’末端配列を含む塩基配列 5’-AAAACTAGTTCATTATTCTATTGTCAGCTCTTTC-3’（KPC と命名、下線部が *Spe*I サイト)を用いた。PCR の反応は、100 pmol の各プライマー、0.2 mM dNTP および 2.5 単位の Takara *LA Taq* DNA polymerase（宝酒造）を含む 50 μL 容量で行った。PCR 条件として、98℃で 20 秒間、72℃で 4 分 30 秒間を 1 サイクルとし、95℃で 1 分間保持して DNA を変性させた後、25 サイクル運転した。増幅した DNA 断片は制限酵素 *Sac*I と *Spe*I で消化後、アガロースゲル電気泳動により精製し、プラスミド pKKZ 上の *Sac*I – *Spe*I サイトに挿入した。これを大腸菌 *E. coli* JM109 に形質転換し、アンピシリンで選抜後、塩基配列を確認した。

１－２－８　KP の部位特異的変異解析

KP 遺伝子をプラスミド pKF18k に挿入するため、KP 遺伝子を PCR により増幅した。遺伝子増幅には 2 種類のプライマーKPN と KPC を用いた。PCR の条件は方法１－２－７に準じて行った。増幅した DNA 断片は制限酵素 *Sac*I と *Spe*I で消化後、アガロースゲル電気泳動により精製し、プラスミド pKF18k 上の *Sac*I – *Xba*I サイトに挿入した。これを大腸菌 *E. coli* JM109 に形質転換し、アンピシリンで選抜後、塩基配列を確認した。構築したプラスミドは pKFKP1 と命名した。

変異 KP 遺伝子発現ベクターを得るため、ODA-LA PCR 法により点変異を導入した。Takara Mutan-Super Express Km Kit を用いて、添付のプロトコールに従い KP 遺伝子に点変異を導入した。遺伝子増幅には点変異導入用に設計したプライマーを用い（Table 1-1）、プラスミド pKFKP1 を鋳型とした。PCR 条件として、94℃で 1 分間、55℃で 1 分間、72℃で 3 分間を 1 サイクルとし、95℃で 1 分間保持して DNA を変性させた後、25 サイクル運転した。増幅した変異 KP 遺伝子発現ベクターを大腸菌 *E. coli* MV1184 に形質転換し、カナマイシンで選抜後、塩基配列を確認した。

点変異のターゲットは、*T. brockii* 由来 KP および TP（12）、*Bacillus* sp.由来マルトースホスホリラーゼ（MP; EC 2.4.1.8）（29）間で完全に保存されているアミノ酸残基とし、15 種類の極性アミノ酸残基（アスパラギン酸残基 5 種類、グルタミン酸残基 2 種類、リジン残基 4 種類、アルギニン残基 4 種類）を選抜した（Fig. 1-3）。点変異によって、アスパラギン酸残基はアスパ

ラギン残基に、グルタミン酸、リジン、アルギニンの各種アミノ酸残基はグルタミン残基に置換した。

１－２－９　変異 KP 遺伝子の大腸菌での発現

変異 KP を得るため、各変異 KP 遺伝子発現ベクター（Table 1-1）を大腸菌 *E. coli* JM109 に形質転換した。組換え大腸菌を液体培養後、培養菌体は 4℃、10000×g、5 分間の遠心分離により回収した。菌体を 20 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）にて洗浄後、400 μg/mL のリゾチームを含む同緩衝液に懸濁し、37℃で 3 時間インキュベートした。次にこれを Ultrasonic Homogenizer UH-600（SMT 社製）を用いて 2 分間超音波破砕した。破砕懸濁液を遠心分離し、上清を変異酵素液とした。

１－２－10　活性測定法

（１）KP の加リン酸分解活性

コージビオースと無機リン酸とを基質として、加リン酸分解により生じたグルコースを定量する方法でKPの加リン酸分解活性を評価した。0.1%コージビオース、McIlvaine緩衝液（pH 5.5、無機リン酸として 0.1 M）からなる基質溶液 2 mL に酵素液 0.2 mL を添加して反応を開始した。60℃で 30 分間反応後、酵素反応液を沸騰水浴中で 10 分間加熱して酵素反応を停止させ、遊離したグルコースを GOD 法（30）により定量した。酵素活性 1 単位は、上記反応条件下で 1 分間に 1 μmol のグルコースを遊離する酵素量と定義した。

（２）KP の合成活性

グルコースとβ-G1P とからコージビオースを生成する反応において、遊離する無機リン酸を定量して KP の合成活性を評価した。0.1%グルコース、0.1% β-G1P、50 mM 酢酸緩衝液（pH 5.5）からなる基質溶液 2 mL に酵素液 0.2 mL を添加して反応を開始した。60℃で 30 分間反応後、酵素反応液を沸騰水浴中で 10 分間加熱して酵素反応を停止させ、遊離した無機リン酸を Fiske-Subbarow 法（31）により定量した。酵素活性 1 単位は、上記反応条件下で 1 分間に 1 μmol の無機リン酸を遊離する酵素量と定義した。

１－２－11　速度論的解析

各変異酵素の K_m 値の算出には、方法１－２－10 の活性測定において基質濃度を変更し、Lineweaver-Bruk プロットを用いた。

第３節　結果

１－３－１　KP 遺伝子断片の PCR による増幅

T. brockii 株由来の精製 KP をリジルエンドペプチダーゼで消化した。消化断片の一部はさらにトリプシンで消化した。プロテインシーケンサーにより、N 末端および 8 種類のペプチド KP-1～KP-8（Fig. 1-2）のアミノ酸配列を決定した。これら配列をもとにプライマーを合成し、*T. brockii* 株由来の染色体 DNA から 2.0 kb の KP 遺伝子断片を増幅した（Fig. 1-1 の PCR-1）。DNA 断片 PCR-1 は、KP 酵素蛋白質の N 末端アミノ酸配列および内部アミノ酸配列 KP-1～KP-7 をコードしていた。

１－３－２　KP 遺伝子全領域のクローニング

KP 遺伝子全長をクローニングするため、2.0 kb の KP 遺伝子断片 PCR-1 をプローブとして、*T. brockii* 株由来の染色体 DNA ライブラリーからコロニーハイブリダイゼーション法によりスクリーニングを行った。3956 bp からなる 1 つの陽性クローンを得た（Fig. 1-1）。この DNA 断片中には、完全長の KP 遺伝子（*kojP*）、さらにその下流には 3 つのオープンリーディングフレーム（ORF; *kojE*, *kojF* および不完全長 *kojG*）が認められた。3956 bp DNA 断片を保有するプラスミド DNA を pBKP1 と命名した（Fig. 1-1）。今回決定した *kojP*, *kojE*, *kojF* および *kojG* からなる 3956 bp 塩基配列（Fig. 1-2）は、アクセッション No. AB073931 として DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録した。

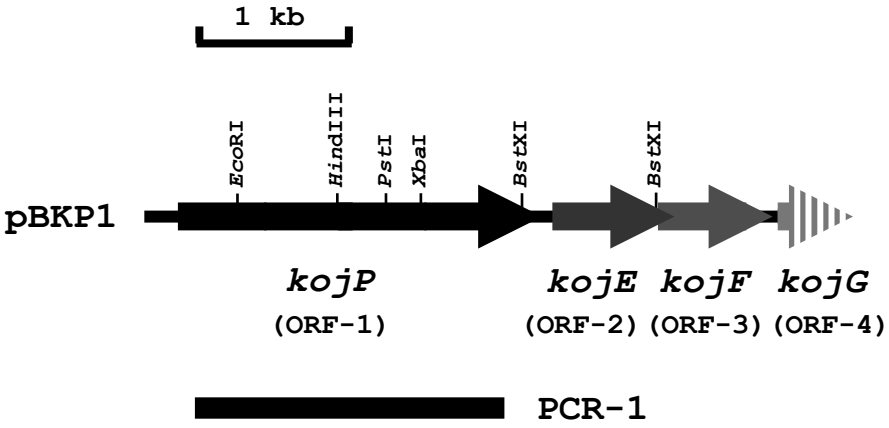


Fig. 1-1. Restriction map of *kojP* from *Thermoanaerobacter brockii* ATCC35047.

The arrows indicate genes and their transcription directions. PCR-1 indicates the region of a probe for colony hybridization amplified by PCR.

```
                                                                                        SD
AGCTTGTAATTAGAGATTCAGCTAGAAAGATATAATTTTTTTAAAAAGTACCCAAAACGTTTCGGATAAAATTTTTAGCAGGAATCAGGAGGTATATAAGTGGTAAAGCACATGTTTTT   120
                                                                                    KojP   M  V  K  H  M  F  L            7
                                                                                             N-terminus
AGAGGATGTAAACAATTTAATAAGTGATGACAAATGGCTTATTTTCCAAAATGAGTATAATACAGAGGTAAATCCTCGATATGAGACCCTTTTTACACTTACAAATGGTTACATGGGCGT   240
 E  D  V  N  N  L  I  S  D  D  K  W  L  I  F  Q  N  E  Y  N  T  E  V  N  P  R  Y  E  T  L  F  T  L  T  N  G  Y  M  G  V   47

AAGAGGTACTTTTGAGGAAGGAAGCGAGGGAGAAAGGTCGGGAAATTTTATTGCAGGAATTTTTGACAAGTCAGATGCGCAGGTTAGAGAAATAGTAAATGCTCAAAATTGGTTGAGAAT   360
 R  G  T  F  E  E  G  S  E  G  E  R  S  G  N  F  I  A  G  I  F  D  K  S  D  A  Q  V  R  E  I  V  N  A  Q  N  W  L  R  I   87
                                                                                                  KP-1
AAAGTTGTATGTTGAAGGTGAAGAATTAAGTTTGGATAAATGCCAGTTGATAGAATTTAAAAGAATTCTTGATATGAAAAAAGGTATTCTATTTAGGAGTATGTTGATAAAAGACAGCAA   480
 K  L  Y  V  E  G  E  E  L  S  L  D  K  C  Q  L  I  E  F  K  R  I  L  D  M  K  K  G  I  L  F  R  S  M  L  I  K  D  S  K   127

AGATAGAATTACTCGAATTGAGGGATACAGGTTTATAAGCCGTAGCGACCTTCATCGTTCTGCAATTAAGCTATTTGTAACACCTGTAAATTACAGTGGTGTTGTAGGTATAGAGAGCAT   600
 D  R  I  T  R  I  E  G  Y  R  F  I  S  R  S  D  L  H  R  S  A  I  K  L  F  V  T  P  V  N  Y  S  G  V  V  G  I  E  S  I   167

TATTGATGGGACTGTTTTAAATTCAGCAGATAGCCCAAAGCATAGGGTAAAGCATTTGAAAGTGGCTGACAATAGCAGTTTAAATAAAAGCGGAGTTTATCTTGAAACAGCAACTATTGA   720
 I  D  G  T  V  L  N  S  A  D  S  P  K  H  R  V  K  H  L  K  V  A  D  N  S  S  L  N  K  S  G  V  Y  L  E  T  A  T  I  D   207
                                                                                                          KP-2
CGATGATATTCGCATTGCAACAGGTAGTGCAGTGAGGTTATATCATTATGAGGATAAAGAGAAAAATAACATAGCTAAATTTAAGAGATTTTTGCCTTTAGGTGAAATGAGTATTGAATA   840
 D  D  I  R  I  A  T  G  S  A  V  R  L  Y  H  Y  E  D  K  E  K  N  N  I  A  K  F  K  R  F  L  P  L  G  E  M  S  I  E  Y   247

CTTTGAGTTTGATGGCACAGAGAACAAAACAGTAGTAATTGACAAATTTATTATAACCTATACCTCAAGAGACGTAAAAAAAGGCCTATTAAAGAGTACGGTGGAAAAAGAACTCTTTGC   960
 F  E  F  D  G  T  E  N  K  T  V  V  I  D  K  F  I  I  T  Y  T  S  R  D  V  K  K  G  L  L  K  S  T  V  E  K  E  L  F  A   287

TTTTGCTGGAGAAGGTATTGACAAAGAGTTGCAGAGACATATTGAGGTATATGAAGAACTATGGTCTGTTGCAGATATAAATATTGAAGGGGATGAAGAAGCAGATAAAGCTTTGAGGTT   1080
 F  A  G  E  G  I  D  K  E  L  Q  R  H  I  E  V  Y  E  E  L  W  S  V  A  D  I  N  I  E  G  D  E  E  A  D  K  A  L  R  F   327

TAATATTTTTCATCTCATGAGTTCTGTCAATGAAAATGACCCCATGGTAAGTATCGCTGCAAAGGCCCTTCATGGTGAGGGATACAAAGGCCATGTCTTTTGGGATACAGAAATATTTAT   1200
 N  I  F  H  L  M  S  S  V  N  E  N  D  P  M  V  S  I  A  A  K  A  L  H  G  E  G  Y  K  G  H  V  F  W  D  T  E  I  F  M   367
                                                                                                          KP-3
GCTTCCGTTTTTCATATATGTGCATCCAAAAGCGGCAAAGACACTTTTGATGTACAGGTACAATATGCTGGATGCAGCGAGAAAAAATGCGGCTTTAAACGGGTATAAGGGAGCACAATA   1320
 L  P  F  F  I  Y  V  H  P  K  A  A  K  T  L  L  M  Y  R  Y  N  M  L  D  A  A  R  K  N  A  A  L  N  G  Y  K  G  A  Q  Y   407

CCCTTGGGAATCTGCAGATACAGGAGAGGAAGAGACACCTAAATGGGGATTTGATTACATGGGAAACCCTGTAAGGATATGGACGGGTGATTTAGAGCATCATATAACTGCTGATATAGC   1440
 P  W  E  S  A  D  T  G  E  E  E  T  P  K  W  G  F  D  Y  M  G  N  P  V  R  I  W  T  G  D  L  E  H  H  I  T  A  D  I  A   447

TTTTGCAGTGTGGGAGTATTTTAGAGCGACAGAGGATATTGAGTTTATGTTGAATTACGGTGCAGAAGTCATTTTTGAGACTGCAAGGTTTTGGGTATCTAGATGTGAATATGTAAAAGA   1560
 F  A  V  W  E  Y  F  R  A  T  E  D  I  E  F  M  L  N  Y  G  A  E  V  I  F  E  T  A  R  F  W  V  S  R  C  E  Y  V  K  E   487

ATTAGACAGGTATGAAATAAACAATGTCATAGGTCCTGATGAATTTCATGAGCATGTTGATAATAATGCTTATACTGATTACCTTGCAAAATGGAATATTAAAAAGGGACTTGAACTAAT   1680
 L  D  R  Y  E  I  N  N  V  I  G  P  D  E  F  H  E  H  V  D  N  N  A  Y  T  D  Y  L  A  K  W  N  I  K  K  G  L  E  L  I   527
                          KP-4                                                    KP-5
CAATATGTTAAAAGAAAAATACCCTGAACATTATCATGCTATATCAAACAAGAAATGTTTGACAAATGAGGAAATGGAAAAGTGGAAAGAAGTTGAAGAAAAAATATATATACCTTATGA   1800
 N  M  L  K  E  K  Y  P  E  H  Y  H  A  I  S  N  K  K  C  L  T  N  E  E  M  E  K  W  K  E  V  E  E  K  I  Y  I  P  Y  D   567
                                                                                                          KP-6
CAAAGACAAAAAGCTGATAGAACAATTTGAAGGCTATTTTGATAAAAAAGATTATGTTATTGATAAATTTGATGAAAACAATATGCCTATATGGCCTGAAGGTGTTGATATAACAAAATT   1920
 K  D  K  K  L  I  E  Q  F  E  G  Y  F  D  K  K  D  Y  V  I  D  K  F  D  E  N  N  M  P  I  W  P  E  G  V  D  I  T  K  L   607
                                                                                   KP-7
GGGTGATACCCAGCTTATTAAACAGGCTGATGTTGTTATGTTAATGCTTTTGTTAGGTGAGGAATTTGACGAAGAAACGAAAAGAATCAATTACGAATATTATGAAAAGCGAACTATGCA   2040
 G  D  T  Q  L  I  K  Q  A  D  V  V  M  L  M  L  L  L  G  E  E  F  D  E  E  T  K  R  I  N  Y  E  Y  Y  E  K  R  T  M  H   647

CAAATCTTCATTAGGTCCCAGCATGTATGCCATTATGGGGTTAAAAGTAGGGGACCACAAAAACGCATATCAGTCTTTCATGAGAAGTGCCAACGTGGACCTTGTGGACAATCAGGGGAA   2160
 K  S  S  L  G  P  S  M  Y  A  I  M  G  L  K  V  G  D  H  K  N  A  Y  Q  S  F  M  R  S  A  N  V  D  L  V  D  N  Q  G  N   687

CACTAAAGAAGGTTTGCATGCTGCATCTGCTGGTGGTACATGGCAAGTAGTTGTTTTTGGATTTGGCGGAATGGAAATTGACAAAGAAGGGGCATTAAATATAAATTCGTGGCTGCCAGA   2280
 T  K  E  G  L  H  A  A  S  A  G  G  T  W  Q  V  V  V  F  G  F  G  G  M  E  I  D  K  E  G  A  L  N  I  N  S  W  L  P  E   727

AAAATGGGATAAACTTTCCTATAAAGTATTTTGGAAAGGCAATTTAATAGAGGTGATTGTTACAAAACAGGAAGTGACAGTAAAAAAATTAAAAGGAAAAGGAAATATAAAAGTAAAGGT   2400
 K  W  D  K  L  S  Y  K  V  F  W  K  G  N  L  I  E  V  I  V  T  K  Q  E  V  T  V  K  K  L  K  G  K  G  N  I  K  V  K  V   767
   KP-8
AAAAGGGAAAGAGCTGACAATAGAATAGTCAAAAAGGTATAGGCAGGTGGATAACCTGCTATACCTTAAAATAAATTGATTATGTTTTAAGGGGGGATAAGTGGAGTTAGAGTAAAATTT   2520
 K  G  K  E  L  T  I  E  *                                                                                                  775
```

Fig. 1-2. Nucleotide sequences of *kojP*, *kojE*, *kojF* and *kojG* genes and deduced amino acid sequences.

Numbers on the right side of the sequences denote nucleotide (upper) and amino acid (lower) positions. The potential Shine-Dalgarno (SD) sequences are marked with solid lines on the top. The N-terminal and internal amino acid sequences of KP from *T. brockii* are underlined. Asterisks indicate stop codons.

```
                                   SD
TAAGTCCTCAATCAGATATTTTACTATAAAATTGTGAAAGGGGAAAGTGGTAATGAGTAAAAAACTTTCAAGCATCTTTGTATTGACGATCTTTGTATTAGCTACTGTTTTAGCTGGTTG  2640
                                   KojE  M  S  K  K  L  S  S  I  F  V  L  T  I  F  V  L  A  T  V  L  A  G  C   23

TTCATCCAGTAAAAATAATACTTCCAGTGCCAATGAGACAAATACACAAAAACAAGAGACAGCAAAACCAGTTACTATAAAATTAGGCATGTGGTCTTCATCTCCAGCAGAAAAGAAGAT  2760
 S  S  S  K  N  N  T  S  S  A  N  E  T  N  T  Q  K  Q  E  T  A  K  P  V  T  I  K  L  G  M  W  S  S  S  P  A  E  K  K  I   63

AGTGGATGACCAAATAGCTAAGTTTAAAGAAAAATATCCAAATATAGATGTGCAAATTGAGACAATTGTGGGAGATTACATGCAAAAATTACAAACAGAACTGGCGTCAAATACAGCACC  2880
 V  D  D  Q  I  A  K  F  K  E  K  Y  P  N  I  D  V  Q  I  E  T  I  V  G  D  Y  M  Q  K  L  Q  T  E  L  A  S  N  T  A  P  103

AGACATATTCTATCTTGACAGCATGCCGGCACCACAGCTTATGTCTTCAGGAGTTTTAGAGCCATTAGATGATTATATTAAGAAATACAATGTGGATGTAAATGATTTCGAGCCAGCATT  3000
 D  I  F  Y  L  D  S  M  P  A  P  Q  L  M  S  S  G  V  L  E  P  L  D  D  Y  I  K  K  Y  N  V  D  V  N  D  F  E  P  A  L  143

GCTTTCCGCTTTTCAGTGGGAGGGAAAAACTTATGGTTTACCAAAGGATTTCAATACTCTAGCTTTGTTTTACAACAAAGACATGTTTAAAGCGGCTGGAATAAATGAGCCTCCAAAAAC  3120
 L  S  A  F  Q  W  E  G  K  T  Y  G  L  P  K  D  F  N  T  L  A  L  F  Y  N  K  D  M  F  K  A  A  G  I  N  E  P  P  K  T  183

ATGGGAGGAATTAAGAGATGTAGCTAAAAAGTTGACAAAAGACGGTGTCAAAGGTTTGGTTTTATCAGCAGACCTTGCAAGATTTGATGCTTTTATAAATCAAAATGGCGGTTCAGTATA  3240
 W  E  E  L  R  D  V  A  K  K  L  T  K  D  G  V  K  G  L  V  L  S  A  D  L  A  R  F  D  A  F  I  N  Q  N  G  G  S  V  Y  223
                                                                                                KojF  M  A  V  Q  Y  I   6

TCAAGGATGGAAAAGTTACTTTAAATCTGCCAGAGAATGCACAAGCTCTTGATTTTTATGTAGGCCTCATTACAAAAGACAAAGTTACTGACACACCACAAAACATGGGAGAAGGCTGGA  3360
 Q  G  W  K  S  Y  F  K  S  A  R  E  C  T  S  S  *                                                                       239
  K  D  G  K  V  T  L  N  L  P  E  N  A  Q  A  L  D  F  Y  V  G  L  I  T  K  D  K  V  T  D  T  P  Q  N  M  G  E  G  W  N  46

ATGGAGATGCTTTTGCTGCTAAAAAAGCTGCAATGGCAATAGAAGGTGGCTGGATGATACCATTCCTCAAAGAAAAAGCTCCTGATTTAAACTATGGTATAGCAGAGCTTCCAGCAGGAA  3480
  G  D  A  F  A  A  K  K  A  A  M  A  I  E  G  G  W  M  I  P  F  L  K  E  K  A  P  D  L  N  Y  G  I  A  E  L  P  A  G  K  86

AGCAAAAATCTACAATGGCTTTCACTGTTGCATATGTGATGAATAAAAACAGCAAACATAAAGATGAAGCCTTTAAACTTATTGAATTTTTAACCGGTAAAGAAGGACAGCAATTTGTAG  3600
  Q  K  S  T  M  A  F  T  V  A  Y  V  M  N  K  N  S  K  H  K  D  E  A  F  K  L  I  E  F  L  T  G  K  E  G  Q  Q  F  V  V  126

TAGATTCAGGCCTTGCACTTCCATCGAGAAAGTCTATGCAAGAAGGATTTAAGGAGAAATATCCTGAAAGAGCTGCCTTTGTAGATGGTGCTTCTTATGCGGTACCATGGCAATTCGGTT  3720
  D  S  G  L  A  L  P  S  R  K  S  M  Q  E  G  F  K  E  K  Y  P  E  R  A  A  F  V  D  G  A  S  Y  A  V  P  W  Q  F  G  L  166

TGTATGGCACAAAGGTAGTAGATGCGGCTAATAAAGCCTGTGAAGCATTAATAATGAAGCAAATAAGTAGTGCTCAGCAAGCTCTTGACAACGCACAAAAGGAAGTTGGACAATAATTTA  3840
  Y  G  T  K  V  V  D  A  A  N  K  A  C  E  A  L  I  M  K  Q  I  S  S  A  Q  Q  A  L  D  N  A  Q  K  E  V  G  Q  *        203
                                                                SD
AGTAAGCAGCACCTTACTAAAATAAGGTGCTGCAATTATGATTTTTTAAGGTTGAAGGGAAGGATGTATTTATGGAAGCTAAAATGACTATGAAAAAGAGGTATTTATACGAAGCT      3956
                                                                KojG  M  E  A  K  M  T  M  K  K  R  Y  L  Y  E  A       15
```

Fig. 1-2. Continued

１－３－３　KP 遺伝子（*kojP*）

Fig. 1-2 に示したように、*kojP* 遺伝子は、開始コドン GTG から Glu をコードする GAA に続く終止コドン TAG までの 2328 bp（塩基番号 101～2428）で構成されていた。本遺伝子の開始コドン GTG の 7 bp 上流に、推定リボソーム結合部位（SD 配列）5'-AGGAGG-3'（塩基番号 88～93）が認められた。*kojP* 遺伝子は、775 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードし、その分子量は 89699 Da と計算された。これは、SDS-PAGE により概算された KP 精製酵素の分子量 83000 Da とほぼ一致した。*kojP* 遺伝子から推定したアミノ酸配列中には、*T. brockii* 由来精製 KP から得られた部分アミノ酸配列が全て含まれていた。*T. brockii* 由来の TP（12）、*Bacillus* sp. 由来の MP（29）および *Lactobacillus brevis* 由来の MP（32）のアミノ酸配列とは、それぞれ 35%, 29%, 28%の相同性が認められた（Fig. 1-3）。なお、*kojP* 遺伝子上流には明確なプロモーター配列は認められなかった。

kojP 遺伝子発現ベクターの構築には、合成プライマーKPN と KPC を用いて酵素遺伝子全長を増幅した。この際、宿主大腸菌のコドン使用頻度を考慮して開始コドン GTG を ATG に、また終止コドン TAG を TAA に変更した。*kojP* 遺伝子をプラスミド pKKZ の *Sac*I - *Spe*I サイトに挿入し、*kojP* 遺伝子発現ベクターpKBK14 を構築した。*kojP* 遺伝子産物は、宿主大腸菌 *E. coli* JM109 中で *tac* プロモーター支配下において効率よく発現した。発現ベクターpKBK14 組換え大腸菌の菌体破砕抽出液中の酵素活性（加リン酸分解活性）は、780 U/g-wet cells であった。プラスミド pKKZ 組換え大腸菌中にはコージビオースの加リン酸分解活性が認められなかったことから、*kojP* 遺伝子は KP をコードしていることが確認された。各種クロマトグラフィーにより、プラスミド pKBK14 組換え大腸菌の菌体破砕抽出液から *kojP* 遺伝子産物を精製し酵素的諸性質を調査したところ、比活性 70.1 U/mg-protein, 最適 pH 5.5, 最適温度 65℃、コージビオース、無機リン酸、β-G1P およびグルコースに対する K_m 値はそれぞれ 0.85 mM, 0.75 mM, 0.79 mM, 3.84 mM であり、*T. brockii* 由来の精製 KP の値とほぼ一致した。

```
KP      MVKHMFLEDVNNLISDDKWLIFQNEYNTEVNPR-YETLFTTTNGYMGVRGTFEEGSEGERSGNF----IAGIFDKSDAQV 75
TP      MANKTKKP-IYPFE--D-WVIRETQFSIDTNYR-NETIFTLANGYIGMRGTFEERYSGPKNTSFNGTYINGFYEIHDIVY 75
Bs-MP   MYYNRLFDVDE-------WTLKAAQLDREHI-RLQESLTSLCNGYMGMRGNFEETYSGDHHQ---GTYIAGIWYPDKTRV 69
Lb-MP   --MKRIFEVQP-------WNVITHTFDPKDK-RLQESMTSLCNGYMGMRGDFEEGYSGDSLQ---GIYLGGVWYPDKTRV 67

KP      RE-----IVNAQNW-LR------IKLYVEGEELSLDKCQLIEFKRILDMKKGILFRSMLIKDSKDRITRIEGYRFISRSD 143
TP      PE-GGYGFAKIGQTMLNVADSKIIKLYVDGEEFDLLQGKILFYERVLDMKKGFVERKVKWESPTGKILEVKIKRIVSLNR 154
Bs-MP   -GWWKIGYPDYFGKVINAINLVGLRIWIDQEEIDLFIDHLEQFQLELDMKKAVLRHSYIVKQPGKMVKIEIY-RYGSIVH 147
Lb-MP   -GWWKNGYPKYFGKVVNAVNFIKLPIEINGEPVDLAKDKISDFTLDLDMHQGVLNRSFVVERGAVRVALN-FQRFLSVAQ 145

KP      LHRSAIKLFVTPVNYSGVVGIESIIDGTVLNSAD-SPKHRVKH-LKVADNSSLNKSGVYLETATIDDDIRIATGSAVRLY 221
TP      QHLAAISFTMQPVNFTGKIRFVSAIDGNVSNIND-SEDVRVGSNLKGKVLKTIDKSVEGLKGWIVQKTQKSNFSYACA-- 231
Bs-MP   KQIAAIRFRATNLGKPATI-KLMPYLDGNVKNEDANYDE-MFWTDIHSEVNEKRAAVITETIENPFGVPRFTVAATMGCR 225
Lb-MP   PELSVQKVTVKNLSDAEVDVTLKPSIDADVMNEEANYDE-RFWDVLATDQQADRGSIVAKTTPNPFGTPRFTSGMEMRLV 224

KP      HYEDKEKNNIAKFKRFLPLGEMSIEYF-EFDGTENKTVVIDKFIITYTSRDVKKGL-LKST-VEKELFAFAGEGIDKELQ 298
TP      -IDNVLVADS-KYEVSNSLEEDGVKVIVDLEAEKGTSYTLNKFISYYTSKDFDENK-LVALALE-EIEKAKNDGFETIE- 306
Bs-MP   TDAILT--THQA-K-PLYAEQIYEKELGENESLHLE-----KIIAVTTSRDYEKELLLSRAY---ELLDQALESGYEELF 293
Lb-MP   TDLKNVAITQ-PNEKEVTT-A-YTGKLAPQASAELE-----KRVIVVTSRDYDTQESLTAAM--HQLSDKVAQSSYEDLL 294

KP      RHI-EVYEE--LWSVADINIEGDEEADKALRFNIFHLMSSVNENDPMVSIAAKALHGEGYKGHVFWDTEIFMLPFFIYVH 375
TP      KEQEE-FLNS-FWKDADVIIEGDKALQQGIRFNEFHLLQSVG-RDGKTNIAAKGLTGGGYEGHYFWDSDIYIMPFFLYTK 383
Bs-MP   QEHAAAWQKR--WDKADVRIVGDPEAQQGIRFNLFQLFSTYYGDDPRLNIGPKGFTGEKYGGATYWDTEAYAVPMYLSVA 371
Lb-MP   NAHTAIWAQR--WEKSDVVIKGDDESQQGIRFNLFQLFSTYYGEDARLNIGPKGFTGEKYGGATYWDTEAFAFPVYLGIT 372

KP      PKAA-KTLLMYRYNMLDAARKNAA-LNGYKGAQYFWESADTGEEETPKWGFDYMGNPVRIWTGDLEHHITADIAFAVWEY 453
TP      PEIA-KALVMYRYNLLDAARSRAKEL-GHKGALYFWRTIDGFECS----A--YF--PAGT--AQY--HINADIVYALKRY 449
Bs-MP   SPEVTRNLLLYRYNHLPQAYENAKKL-GLKGALYFMVTFTGIECHNE-WEITFEEI----------HRNGA-IAYAIYNY 438
Lb-MP   DPKVTRNLLMYRYKQLDGAYINAQEQ-GLKGALFFMVTFDGIECHNE-WEITFEEI----------HRNGD-IAFAIYNY 439

KP      FRATEDIEFMLNYGAEVIFETARFWVSRCEYVKEL-D-RYEINNVIGPDEFHEHVDNNAYTDYIAKWNIKKGLELINMLK 531
TP      VEATNDVDFLYDYGCEILFETARFWEDLGAYIP-LKGNKFCINCVTGPDEYTALVDNNAYTNYMAKMNLEYAYDIANKMK 528
Bs-MP   VNYTGDKEYINQYGIDVLVGISRFFADRVHFSERKQKYM--IHGVTGPNEYENNVNNNWYTNRIAVWTLKFTIASLD--K 514
Lb-MP   TRYTGDDSYVLHEGAKVLTEISRFWADRVHFSKRNNQYM--IHGVTGADEYENNVDNNWDTNMLAQWTLKYTLEILG--K 515

KP      EKYPEHYHAISNKKCLTNEEMEKWKEVEEKIYIPYDKDKKLIEQFEGYFDKKDYVIDKFDENNMPI---WPEGVDITKLG 608
TP      KEVPQKYQKVASKLNLKDEEIVAWKKAADNMYLPYSKELDIIPQDDSFLYKERITVDEIPEDQPLLLLHWHYL-NIYRY- 606
Bs-MP   IGKDKKTALNITEKELTQ-----WRDIIDRMYFPYDEKLGIFLQQDGFLDKPIQPVSAIPREDIPLNQHWSWDRILRSCY 589
Lb-MP   VDQDTAKQLDVSDEEKTK-----WQDIVDRMYLPYDKDLNIFVQHDGFLDKDIEPVSSIPADQRPINQNWSWDKILRSPY 590

KP      DTQLIKQADVVMLMLLLGEEFDEETKRINYEYYEKRTMHKSSLGPSMYAIMGLKVGDHKNAYQSFMRSANVDLVDNQGNT 688
TP      --QICKQPDVLLLMFLQREKFTKDELKKNYDYYEPITTHDSSLSPAIFSILANEIGYTDKAYKYFMMTARMDLDDYNDNV 684
Bs-MP   I----KQADVLQGFYFFNDEFTMEEKQRHFEFYEPLTVHESSLSPCVHAILAAELRKEDKAVELYKRTSRLDLDNYNHDT 665
Lb-MP   I----KQGDVLQGIWDFIDDYTPEQKKANFDFYEPLTVHESSLSPAIHSVLAADLHYEDKAVELYSRTARLDLDNYNNDT 666

KP      KEGLHAASAGGTWQVVVFGFGGMEIDKEGALNINSWLPEKWDKLSYKVFWKGNLIEVIVTKQEVTVKKLKGKGN-IKV-- 765
TP      KDGIHAASMAGTWSAVVNGFGGMRVYTNE-LHFEPRLPKEWNLLSFNVRYKGRKINVKLTKENVVFALLEGEPIEIYYFD 763
Bs-MP   EDGLHITSMTGSWLAIVHGFAGMRTFNETLSFAPF-LPKIWDAYAFKINYRNRLLEVKVNKKHVTVSLLEGEPLELKLFG 744
Lb-MP   TDGLHITSMTGAWLAVVQGFAGMRVRDGQLHYAPF-LPKTWTSYTFRQVFRDRLIEVSVHADGPHFKLLSGEPLTIDVAG 745

KP      -KVKG-K-ELTIE-                                                                   775
TP      KKILLEKGE--IK-                                                                   774
Bs-MP   EPIYLTNTYTKEYV                                                                   758
Lb-MP   AAAAAAAAA-----                                                                   754
```

Fig. 1-3. Alignment of amino acid sequences among kojibiose phosphorylase (KP) from *T. brockii*, trehalose phosphorylase (TP) from *T. brockii*, maltose phosphorylase (Bs-MP) from *Bacillus* sp. and maltose phosphorylase (Lb-MP) from *Lactobacillus brevis.*

Residues in black boxes are conserved. Closed triangles indicate the target amino acid residues for point mutation. Asterisks indicate the residues that form the active-site pocket of Lb-MP (32). Two residues, Asp359 and Glu487, of Lb-MP are candidate catalytic residues (32).

１－３－４　その他の ORF

（１）*kojE* 遺伝子

kojP 遺伝子の 144 bp 下流に、ORF2 遺伝子（*kojE*）が認められた（Fig. 1-2）。*kojE* 遺伝子は、開始コドン ATG から Ser をコードする TCT に続く終止コドン TGA までの 720 bp（塩基番号 2573～3292）で構成されていた。本遺伝子の開始コドン ATG の 7 bp 上流に、推定リボソーム結合部位（SD 配列）5'-AAGGGGAA-3'（塩基番号 2558～2565）が認められた。*kojE* 遺伝子は、239 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードし、その分子量は 26606 Da と計算された。本 ORF の推定アミノ酸配列は、*Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 由来ペリプラズム糖結合蛋白質の N 末端領域（33）と 88%の相同性を、また *Bacillus halodurans* C-125 株の糖輸送系を構成する糖結合蛋白質の N 末端領域（34）と 39%の相同性をそれぞれ示した（Fig. 1-4）。

（２）*kojF* 遺伝子

kojP 遺伝子の 796 bp 下流に、ORF3 遺伝子（*kojF*）が認められた（Fig. 1-2）。*kojF* 遺伝子は、開始コドン ATG から Gln をコードする CAA に続く終止コドン TAA までの 612 bp（塩基番号 3225～3836）で構成されていた。*kojF* 遺伝子は、203 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードし、その分子量は 22199 Da と計算された。本遺伝子は、*kojE* 遺伝子の 3'末端側と 68 bp の領域でオーバーラップして存在していた。本 ORF の推定アミノ酸配列は、*T. tengcongensis* MB4 由来ペリプラズム糖結合蛋白質の C 末端領域（33）と 92%の相同性を、また *B. halodurans* C-125 株の糖輸送系を構成する糖結合蛋白質の C 末端領域（34）と 44%の相同性を示した（Fig. 1-4）。

（３）*kojG* 遺伝子

ORF4 遺伝子（*kojG*）は、5'末端領域のみからなる不完全な ORF（塩基番号 3912～3956）で、開始コドン ATG から Ala をコードする GCT までの 45 bp がコードされていた。本遺伝子の開始コドン ATG の 7 bp 上流に、推定リボソーム結合部位（SD 配列）5'-AAGGA-3'（塩基番号 3900～3904）が認められた。本 ORF の推定アミノ酸配列（15 アミノ酸残基）は、*T. tengcongensis* MB4 由来 ABC 型糖輸送系のパーミアーゼ（33）と 47%の相同性を示した。

```
KojE      1  MSKKLSSIFVLTIFVLATVLAGCSSSKNNTSSANETNTQKQETAKPVTIKLGMWSSSPAE
KojF         ------------------------------------------------------------
Tt-SBP    1  MSRKFLSIFVLTVFVLATILAGCSSSKTPESQTP---TQ--ETSKPVTIKLGMWSSSPAE
Bh-SBP    1  MKKWLWTLGISSLLA-GVVLTGCNFADEEPSSEPTEGGNTDGEVVELTLT--GWQSSPTE

KojE     61  KKIVDDQIAKFKEKYPNIDVQIETIVGDYMQKLQTELASNTAPDIFYLDSMPAPQLMSSG
KojF         ------------------------------------------------------------
Tt-SBP   56  KKIVDDQIAKFKEKYPNIDVQIETIVGDYMQKLQTELASNTAPDIFYLDSMPAPQLMSSG
Bh-SBP   58  QRYFEETVATFEEQNPDIKVNINTIPDQYMDVLRIRLIGGEGPDVFFLDAFEAPGLIETG

KojE    121  VLEPLDDYIKKYNVDVNDFEPALLSAFQWEGKTYGLPKDFNTLALFYNKDMFKAAGINEP
KojF         ------------------------------------------------------------
Tt-SBP  116  VLEPLDEYIKKYNVDVNDFEPALLSAFQWEGKTYGLPKDYNTLVLFYNKDMFKEAGINEP
Bh-SBP  118  AVEPLDEYITDE-FDLADFEQPLLEAFERNGVLYGLPKDTSTLALFYNIDMLEEAGFDGP

KojE    181  PKTWEELRDVAKKLTKDGVKGLVLSADLARFDAFINQNGGSVYQGWKSYFKSARECTSS-
KojF      1  -------------------------------------MAVQ-YIKDGKVT-LNLPENAQA
Tt-SBP  176  PKTWEELRETAKKLTKNGVKGIVLSADLARFDAFINQNDGSVY-KDGKVT-LNLPQNAEA
Bh-SBP  177  PETWEELEEMAIALTNDDEYGFGVVTDLARLM-FIAQSNGGQIATDNQATFAD-PRVVEA

KojE         ------------------------------------------------------------
KojF     22  LDFYVGLITKDKVTDTPQNMGEGWNGDAFAAKKAAMAIEGGWMIPFLKEKAPDLNYGIAE
Tt-SBP  234  LDFYVGLIIRDKVADTPQNMGEGWNGDAFAAKKAAMAIEGGWMIPFLKEKAPDLNYGIAE
Bh-SBP  235  LQPIVDMRNVDGSAVEPSEVGADWGGEMFGLERVAMVIEGNWTVPFLDENFEDVNYGVAE

KojE         ------------------------------------------------------------
KojF     82  LPAGKQKST-MAFTVAYVMNKNSKHKDEAFKLIEFLTGKEGQQFVVDSGLALPSRKSMQE
Tt-SBP  294  LPAGKKKST-MAFTVAYVMNKNSKHKDEAFKLIEFLTGKEGQQFVVDSGLALPSRKSMEA
Bh-SBP  295  VPTINGNEGTMAYTVSYVMNRNSEHKEEAWRLIEFLTGKEGMELWTSSGLTLPTRASVSE

KojE         ------------------------------------------------------------
KojF    141  GFKEKYPERAA---FVDGASYAVPWQFGLYGTKVVDAANK-ACEALIMKQISSAQQALDN
Tt-SBP  353  NFKEKYPERAP---FIDGASYAVPWQFGLYGTKLVDAANK-ACEALIMKQIGSAQEALDN
Bh-SBP  355  KLD--YADDPIYGPFIAGQSYATVWADDTNLPI-VNNNFQNQFTSAFLGQRDLAEA-LKE

KojE         -----------
KojF    197  AQKEVGQ----
Tt-SBP  409  AQKEVMQSK--
Bh-SBP  411  AEE-VANSEIQ
```

Fig. 1-4. Sequence alignment among KojE, KojF and two sugar-binding proteins from *T. tengcongensis* MB4 and *B. halodurans* C-125.

Identical amino acids are shaded. Tt-SBP, sugar-binding periplasmic protein encoded by the gene from *T. tengcongensis* MB4; Bh-SBP, sugar-binding protein from *B. halodurans* C-125.

１－３－５　KP の部位特異的変異解析

T. brockii 由来 KP, TP および *Bacillus* sp.由来 MP 間で完全に保存されている 15 種類の極性アミノ酸残基を選抜し、部位特異的変異解析を行った。変異 KP、R33Q, R48Q, K114Q, R137Q, D177N, D271N, E284Q, D340N, D362N, K403Q, D459N, R476Q, K614Q, E642Q および K749Q は、大腸菌 *E. coli* JM109 内で発現させた。15 種類の変異酵素および野生型酵素における KP 活性（コージビオースの加リン酸分解活性）の比較を、Table 1-2 に示した。各変異酵素の大腸菌内における発現量は、SDS-PAGE の結果より野生型酵素と同等であると確認されたことから、各変異酵素液の活性値の違いは、変異導入により生じたものと考えられた。変異酵素のうち、D362N, K614Q および E642Q の KP 活性は完全に消失していた。また、D459N 変異酵素の KP 活性は 0.56 U/g-wet cells であり、野生型酵素の 1/10 以下にまで低下していた。

次に、各変異酵素について速度論的解析を行った。すなわち、各変異酵素のコージビオースに対する K_m 値をそれぞれ算出した。変異酵素 15 種類のうち D459N 酵素でのみ K_m 値の上昇が確認され、その値は 5.21 mM で野生型 KP の約 7 倍であった。D459N 酵素についてはさらに無機リン酸、β-G1P、グルコースに対する K_m 値を調査した。Table 1-3 に示したように、各基質に対する K_m 値はそれぞれ 1.11 mM（無機リン酸）、8.75 mM（β-G1P）、25.4 mM（グルコース）であった。KP の Asp-459 に変異を導入することで、無機リン酸以外の糖基質、すなわちコージビオース、β-G1P 、グルコースに対する K_m 値で、野生型のそれぞれ 7 倍、11 倍、7 倍の増加が認められた。

Table 1-1. Oligonucleotide primers used for site-directed mutagenesis

Primer	Sequence[a]	Position[b]	Constructed plasmid[c]
P1	5'-GGTAAATCCTCAATATGAGACC-3'	198(G → A)	pKFR33Q
P2	5'-CATGGGCGTACAAGGTACTTTTG-3'	242,243(AG → CA)	pKFR48Q
P3	5'-TGATATGAAACAAGGTATTCT-3'	440(A → C)	pKFK114Q
P4	5'-TGAGGGATACCAGTTTATAAGC-3'	509,510(AG → CA)	pKFR137Q
P5	5'-AAATTCAGCAAATAGCCCAAAG-3'	629(G → A)	pKFD177N
P6	5'-TACCTCAAGAAACGTAAAAAAAGGC-3'	911(G → A)	pKFD271N
P7	5'-GGTGGAAAAACAACTCTTTGC-3'	950(G → C)	pKFE284Q
P8	5'-CAATGAAAATAACCCCATGGT-3'	1118(G → A)	pKFD340N
P9	5'-TGTCTTTTGGAATACAGAAAT-3'	1184(G → A)	pKFD362N
P10	5'-AAACGGGTATCAGGGAGCACA-3'	1307(G → C)	pKFK403Q
P11	5'-AGCGACAGAGAATATTGAGTTTATG-3'	1475(G → A)	pKFD459N
P12	5'-TGAGACTGCACAGTTTTGGGTATC-3'	1526,1527(AG → CA)	pKFR476Q
P13	5'-CCAGCTTATTCAACAGGCTGA-3'	1940(A → C)	pKFK614Q
P14	5'-CGAATATTATCAAAAGCGAAC-3'	2024(G → C)	pKFE642Q
P15	5'-GATTGTTACACAACAGGAAGT-3'	2345(A → C)	pKFK749Q

[a] The underlined bases in the sequences are substituted ones.

[b] The position of base substitution.

[c] The position corresponds to the number in the deduced amino acid sequences in Fig. 1-2. The constructed plasmids were used for expression in *E. coli* JM109.

Table 1-2. KP activities (phosphorolysis of kojibiose) of mutant and wild-type enzymes

Mutant	KP activity (U/g-wet cells)
R33Q	2.32
R48Q	4.55
K114Q	6.22
R137Q	4.46
D177N	7.78
D271N	5.11
E284Q	7.56
D340N	6.61
D362N	N.D.
K403Q	5.39
D459N	0.56
R476Q	3.71
K614Q	N.D.
E642Q	N.D.
K749Q	5.76
Wild type	7.34

N.D., Not detected.

Table 1-3. K_m values for D459N and wild-type KP

Mutant	K_m value (mM)			
	Kojibiose	Pi	β-G1P	Glucose
D459N	5.21	1.11	8.57	25.4
Wild type	0.87	0.65	0.86	3.92

第４節　考察

本章において、*T. brockii* ATCC35047 株由来染色体 DNA より KP 遺伝子を含む 3956 bp の DNA 断片をクローニングし、KP 遺伝子を大腸菌内で発現させた。その発現量は 780 U/g-wet cells であり、*T. brockii* 中における発現量と比較して約 700 倍に達した。また、精製した組換え KP の酵素的諸性質は、*T. brockii* 由来のものと同等であった。*T. brockii* 由来の KP と同等の性質を有する組換え酵素の高発現化を達成できたことは、本酵素を用いたコージビオースや種々のコージオリゴ糖の大量生産を可能にした。実際、我々は組換え KP および TP を用いたオリゴ糖の調製検討を開始した。

KP のアミノ酸配列は、*T. brockii* 由来の TP と 35%の相同性を、*Bacillus* sp. 由来の MP と 29%の相同性を、また *Lactobacillus brevis* 由来の MP と 28%の相同性を示した（Fig. 1-3）。近年、*L. brevis* 由来 MP の立体構造が明らかとなり、触媒残基を含む活性部位を構成するアミノ酸残基について報告がなされた（30）。MP の 2 つの推定触媒残基 Asp-359, Glu-487、および活性部位を構成する残基、Tyr-352, Trp-358, His-427, Lys-592, Ser-627, Ser-628, His-671 は、*T. brockii* 由来の KP, TP、*Bacillus* sp.由来 MP においてもほぼ完全に保存されていた。このことは、KP, TP の活性部位の構造が *L. brevis* 由来 MP と類似していることを意味している。3 種類の二糖類ホスホリラーゼ、KP, TP および MP は、基質であるコージビオース、トレハロース、マルトースのα-グルコシド結合をそれぞれ加リン酸分解して β-G1P を生成する。このとき反応はアノマーの反転を伴う。β-グルコシド結合の基質から α-G1P を生成するセロビオースホスホリラーゼ（CBP; EC 2.4.1.20）や α-グルコシド結合の基質から α-G1P を生成する（グリコーゲン）ホスホリラーゼ（EC 2.4.1.1）のアミノ酸配列は、KP, TP, MP のそれらとは相同性が低く、さらに MP の活性部位を構成するアミノ酸に対応する残基も保存されていない。以上、酵素の構造と機能との相関から、KP, TP および MP は同じ作用様式をもつホスホリラーゼ（α-グルコシド結合の二糖類からβ-G1P を生成する）であることが示唆された。

次に、より詳細な構造と機能との相関を明らかにするため、KP の部位特異的変異解析を行った。15 種類の変異酵素のうち、D362N, K614Q および E642Q の KP 活性（加リン酸分解活性）は完全に消失した。Asp-362 は MP の Asp-359 に対応するアミノ酸残基であり、Asp-359 は MP の触媒残基と考えられている。さらに、Lys-614 残基は MP の Lys-592 に対応するアミノ酸で、Lys-592 は MP の活性中心に位置している。おそらく、Asp-362、Lys-614 両残基へ変異を導入したことにより KP の活性部位が機能しなくなり、酵素活性の消失が引き起こされたと考えられた。*L. brevis* 由来 MP の立体構造から、KP の Glu-642 残基は活性部位の外部にあることが予想されたが、このアミノ酸残基はリン酸結合部位を構成する２つのセリン残基 Ser-649, Ser-650（これら 2 アミノ酸残基は MP の Ser-627, Ser-628 に対応）に近接していることがわかった。これら

の知見から、KP の Ser-649, Ser-650 への無機リン酸の結合が E642Q 変異によって阻害された可能性が考えられた。Asp-459 を置換した D459N 変異により、KP 活性が 1/10 以下に低下したとともに、無機リン酸以外の基質、コージビオース、β-G1P、グルコースに対する K_m 値が野生型酵素のそれぞれ 7 倍、11 倍、7 倍に増大した（Table 1-3）。これらの結果は Asp-459 が無機リン酸ではなく、糖の結合に関与していることを示唆している。しかしながら、MP の活性部位を構成するアミノ酸残基のうち、この Asp-459 に対応するものは認められていない。本章において、Asp-459 へ変異を導入することで糖基質への親和性のみが変化した。この糖に対する親和性の変化は、D459N 変異によって直接的に、あるいは間接的にもたらされたものなのか、明確な解答は得られなかった。更なる解析によって Asp-459 残基の機能が明らかになるかもしれない。

本章でクローニングした 3956 bp の DNA 断片中には、KP 遺伝子（*kojP*）の下流に 3 つの ORF, *kojE*, *kojF* および *kojG* が認められた。*KojE* と *kojF* のアミノ酸配列についてホモロジー検索を行ったところ、*T. tengcongensis* MB4 由来ペリプラズム糖結合蛋白質の N 末端および C 末端領域とそれぞれ 88%, 92%の高い相同性を示した。さらに、*B. halodurans* C-125 株の糖輸送系を構成する糖結合蛋白質の N 末端および C 末端領域とそれぞれ 39%, 44%の相同性が認められた。これら相同性比較から、*kojE*, *kojF* は糖結合蛋白質として機能していると推定された。また、*kojE*, *kojF* が 1 種類の蛋白質の N 末端および C 末端領域をそれぞれコードしているという点から、それぞれの遺伝子産物がサブユニット構造を形成している可能性が考えられた。しかしながら、遺伝子構造から推定すると、進化の過程で挿入や欠失が生じて 2 つに分断されたと考えるのが妥当であろう。

先に我々は、*T. brockii* 染色体 DNA より TP 遺伝子（*treP*）をクローニングした（12）。*kojP* 遺伝子の 3'末端領域をもとにセンスプライマーを、また *treP* 遺伝子の 5'末端領域をもとにアンチセンスプライマーをそれぞれ合成して PCR を行った結果、*T. brockii* 染色体において *kojP* 遺伝子の約 9 kb 下流に *treP* 遺伝子が存在していることが明らかとなった。*kojP* と *treP* の間には糖の代謝に関連する ORF（*kojE*, *kojF* および *kojG*）が認められることから、この領域には *T. brockii* の糖代謝に関連した遺伝子オペロンが存在しているかもしれない。近年、*Bifidobacterium longum* よりラクト *N* ビオースホスホリラーゼ（LNBP; 2.4.1.211）遺伝子がクローニングされた（16）。本細菌には、LNBP 遺伝子を含むガラクトース代謝のオペロンが存在している。*KojP* と *treP* の間を解析することにより、*T. brockii* における *kojP* や *treP* の役割の解明が期待される。

第５節　要約

α-1,2 結合を選択的に生成することが報告されている唯一の加リン酸分解酵素、コージビオースホスホリラーゼ（KP; EC 2.4.1.230）の構造遺伝子を *Thermoanaerobacter brockii* ATCC35047 株染色体 DNA よりクローニングした。KP 遺伝子（*kojP*）は 775 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードし、その分子量は 89699 Da と計算された。これは、SDS-PAGE により概算された KP 精製酵素の分子量 83000 Da とほぼ一致した。本酵素のアミノ酸配列は、*T. brockii* 由来の TP、*Bacillus* sp. 由来の MP および *Lactobacillus brevis* 由来の MP とそれぞれ 35%, 29%, 28%の相同性を示した。立体構造が明らかな *L. brevis* 由来 MP とアミノ酸配列を比較したところ、MP の 2 つの触媒残基および活性部位を構成する残基がほぼ完全に保存されていた。

KP 遺伝子をプラスミド pKK223-3 由来発現ベクターに挿入して、大腸菌を宿主として高発現させた。その発現量は 780 U/g-wet cells であり、*T. brockii* 中における発現量と比較して約 700 倍に達していた。

より詳細な構造と機能との相関を明らかにするため、KP の部位特異的変異解析を行った。3 種類の変異酵素、D362N, K614Q および E642Q の KP 活性が完全に消失していたことから、Asp-362, Lys-614 および Glu-642 は触媒反応に重要な残基であることが推定された。他の変異酵素、D459N におけるコージビオース、β-G1P、グルコースに対する K_m 値は、野生型酵素のそれぞれ 7 倍、11 倍、7 倍に増大していた。このとき、無機リン酸に対する K_m 値はほとんど変化していなかった。このことから、Asp-459 は糖の結合に関与している残基であると推測された。

kojP 遺伝子の下流には、3 つの ORF, *kojE*, *kojF* および *kojG* が認められた。*KojE* と *kojF* のアミノ酸配列は、*T. tengcongensis* MB4 由来ペリプラズム糖結合蛋白質の N 末端および C 末端領域とそれぞれ高い相同性（88%と 92%）を示した。さらに、*B. halodurans* C-125 株の糖輸送系を構成する糖結合蛋白質の N 末端および C 末端領域とそれぞれ 39%, 44%の相同性が認められた。また、*kojG* のアミノ酸配列は *T. tengcongensis* MB4 由来 ABC 型糖輸送系のパーミアーゼと 47%の相同性を示した。*KojP* を含むこれら一連の遺伝子群は、ある種の遺伝子オペロンを形成していることが示唆された。

第２章　枯草菌を宿主とした KP, TP 両遺伝子の高発現化

第１節　緒言

第１章では、嫌気性好熱菌 *Thermoanaerobacter brockii* ATCC35047 株由来コージビオースホスホリラーゼ（KP）遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した。次いで、大腸菌を宿主とした KP 遺伝子の発現系を構築した。

目的の酵素遺伝子を高発現化させることは、糖質のみならず種々の有用物質の生産において極めて重要である。目的とする酵素を容易に取得できることはもとより、酵素剤調製の際、培養タンクのスケールダウンが可能で、また酵素液の濃縮工程の簡略化につながり経済的に有利である。さらには酵素液中の発現酵素の占める割合が高いため、高い活性発現率を有する固定化酵素の調製が可能となる。現在、枯草菌（*Bacillus subtilis*）を宿主として種々の酵素の高発現化が試みられ、それらが報告されている。*Bacillus* sp.由来マルトースホスホリラーゼ（MP）や *Bacillus stearothermophilus* 由来トレハロースホスホリラーゼ（TP）（29）、*Bacillus circulans* var. *alkalophilus* ATCC21783 由来 cyclomaltodextrin glucanotransferase（CGTase; EC 2.4.1.19）（35）さらには *Staphylococcus aureus* 由来 protein A（36）がその例である。これらの報告では、いずれも酵素タンパクの高発現化で実績のある *Bacillus amyloliquefaciens* 由来 α-amylase プロモーターとプラスミド pUB110 が用いられている。

本章では、KP, TP を用いた機能性オリゴ糖の生産を実現するため、両酵素の効率的な大量生産を目的とした枯草菌宿主における高発現化について述べる。プラスミド pUB110 上に *Bacillus amyloliquefaciens* 由来 α-アミラーゼプロモーターとその下流に KP または TP 遺伝子を連結し、KP, TP の高発現ベクターをそれぞれ構築した。得られた組換え枯草菌を最適条件下で培養し、これまでの大腸菌宿主での発現量を大幅に向上させた。この系を用いることで種々の酵素の高発現化が可能となった。

第２節　実験材料および方法

２－２－１　実験材料

（１）糖質

トレハロースおよびコージビオースは㈱林原生物化学研究所製（37）を、またマルトースは㈱林原製を用いた。その他の試薬は、市販の特級品またはそれに準ずるものを用いた。

（２）宿主枯草菌

遺伝子発現の宿主枯草菌として、*Bacillus subtilis* ATCC33713（*leuC7*, *recE4*）を使用した。

（３）プラスミド

発現ベクターには、*B. subtilis* ATCC37015 より調製した pUB110 を用いた。また、PCR による遺伝子増幅の鋳型には、プラスミド pKBK14（KP 遺伝子発現ベクター、結果１－３－３）および pKTP1（TP 遺伝子発現ベクター（12））を用いた。

２－２－２　組換え枯草菌の培養

組換え *B. subtilis* の培養は、液体培養の場合シード培地として P4M1 培地（1.0%マルトース、4.0%ポリペプトン S、1.0%酵母エキス S）を、またメイン培地として P10M4 培地（4.0%マルトース、10%ポリペプトン S、2.0%酵母エキス S、0.1%消泡剤「シリコン KM72F」）を用いた。液体培地は、いずれも炭素源と窒素源（pH 7.0）をそれぞれ別滅菌した後に混合した。平板培養の場合、LB 培地（1.0%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、1.0% NaCl、1.5%寒天）を用いた。いずれの場合も、必要に応じてカナマイシンを終濃度 50 μg/mL となるように添加し、37℃で培養した。

２－２－３　枯草菌の形質転換

枯草菌の形質転換は、プロトプラスト法により行った（38）。プロトプラスト細胞は Ohse らの方法により調製した（39）。

２－２－４　遺伝子操作

プラスミド DNA の精製は、Birnboim らの方法に従った（27）。合成オリゴヌクレオチドは、シグマジェノシスジャパン社製のものを用いた。特別な場合を除き、他の遺伝子操作は Maniatis らの標準法に従った（28）。

２－２－５　塩基配列の決定

塩基配列の決定は、CEQ^{TM} DTCS Quick Start kit（Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA）を用い、DNA シーケンサーmodel CEQ8000（Beckman Coulter）にて行った。反応条件および DNA 回収方法はキットのプロトコールに従った。塩基配列の解析は、遺伝子解析ソフト GENETYX-WIN（ソフトウェア開発㈱社製）を用いて行った。

２－２－６　KP, TP 遺伝子発現ベクターの構築

枯草菌内で機能する KP 遺伝子発現ベクターを構築するため、*B. amyloliquefaciens* 由来 α-アミラーゼのプロモーター領域（*BamP*）を合成した（35,37）。*BamP* 領域の作製には、5'末端に制限酵素 *Bam*HI を、3'末端に *Nde*I サイトをそれぞれ含む 6 種類のオリゴヌクレオチドを用いた。それぞれのオリゴヌクレオチドのアニーリングには、Thermal cycler model PJ2000（Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA）を使用した。使用したオリゴヌクレオチドを Table 2-1 に示した。アニーリングの反応は、各オリゴヌクレオチド 4 μg, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl（pH8.0）および 1 mM EDTA（pH8.0）を含む 20 μL 容量で行った。アニーリングの条件は、100℃で 3 分間、次いで 65℃で 10 分間、最後に 37℃で 10 分間とした。なお、100℃から 65℃、および 65℃から 37℃へ移行する時間はそれぞれ 10 分間に設定した。KP 遺伝子を PCR により増幅するため、センスプライマーとして KP 遺伝子の 5'末端配列を含む塩基配列 5'-AAAAACATATGGTAAAGCAC-ATGTTTTTAGAGGATGTA-3'（下線部が *Nde*I サイト)を、アンチセンスプライマーとして KP 遺伝子の 3'末端配列を含む塩基配列 5'-AAAAAGAATTCTCATTATTCTATTGTCAGCTCTTTCCC-TTT-3'（下線部が *Eco*RI サイト)を、また鋳型 DNA としてプラスミド pKBK14 を用いた。PCR の反応は、100 pmol の各プライマー、0.2 mM dNTP および 2.5 単位の Takara *Pyrobest* DNA polymerase（宝酒造）を含む 50 μL 容量で行った。PCR 条件として、98℃で 20 秒間、65℃で 30 秒間、72℃で 3 分 30 秒間を 1 サイクルとし、96℃で 1 分間保持して DNA を変性させた後、25 サイクル運転した。アニーリングさせた *BamP* 領域は制限酵素 *Bam*HI と *Nde*I で、PCR 増幅した KP 遺伝子は制限酵素 *Nde*I と *Eco*RI でそれぞれ消化後、プラスミド pUB110 の BamHI – EcoRI サイトに挿入した。これを枯草菌 *B.subtilis* ATCC33713 に形質転換し、カナマイシンで選抜後、塩基配列を確認した。構築した KP 遺伝子発現ベクターを pUBAPKP とした。TP 遺伝子発現ベクターの構築は、KP 遺伝子の場合と同様に行った。TP 遺伝子の増幅には、センスプライマーとして TP 遺伝子の 5'末端配列を含む塩基配列 5'-AAAAACATATGGCCAACAAA-ACGAAGAAACCAATTTAC-3'（下線部が *Nde*I サイト)を、アンチセンスプライマーとして TP 遺伝子の 3'末端配列を含む塩基配列 5'-AAAAAGAATTCTCATTACTTTATTTCTCCTTTTTCAA-GTAA-3'（下線部が *Eco*RI サイト)を、また鋳型 DNA としてプラスミド pKTP1（12）を使用した。次いで、*BamP* 領域と PCR 増幅した TP 遺伝子断片をプラスミド pUB110 の BamHI – EcoRI

サイトに挿入し、これを枯草菌 *B.subtilis* ATCC33713 に形質転換した。構築した TP 遺伝子発現ベクターを pUBAPTP とした。

２－２－７　KP, TP 遺伝子の枯草菌での発現

発現ベクターpUBAPKP または pUBAPTP を有する組換え枯草菌を 100 mL の P10M4 培地に接種し、好気条件下で振とう培養した。培養には 500 mL 容量のはねつき三角フラスコを用いた。培養液を遠心分離（10000×g、5 分間、4℃）して得られた培養菌体に 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）を添加して菌体を懸濁、洗浄した。再度遠心分離した菌体沈殿物にリゾチーム溶菌液（400μg/mL のリゾチームを含む 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.0））を添加し、37℃で 1 時間振とうした。これを 60℃で 1 時間熱処理したものを粗酵素液とした。

２－２－８　活性測定法

（１）KP の加リン酸分解活性

KP の加リン酸分解活性は、方法１－２－10（１）に準じて行った。

（２）TP の加リン酸分解活性

TP の加リン酸分解活性は、上記 KP の場合と同様の方法で行った。なお、基質溶液には 1.0% トレハロースを含む McIlvaine 緩衝液（pH 7.0、無機リン酸として 0.1 M）を用いた。

２－２－９　酵素タンパクの発現確認

酵素タンパクの発現確認は、SDS-PAGE により行った。SDS-PAGE は Laemmli の方法に従い、5－20%濃度勾配既成ポリアクリルアミドゲル（パジェル AE-6000, NPG-520L、アトー㈱製）を用いて行った（40）。電気泳動後、タンパク質は Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。分子量マーカーとして、SDS-PAGE Standards（broad-range size marker, Bio-Rad 社製）を用いた。なお、試験試料は方法２－２－７で調製した粗酵素液の遠心上清を用いた。

第３節　結果

２－３－１　KP 遺伝子の枯草菌での発現

枯草菌 *B. subtilis* ATCC33713 を宿主として、*B. amyloliquefaciens* 由来 α-アミラーゼプロモーターの支配下で KP 遺伝子を高発現化させた。組換え枯草菌の培養の経時変化を Fig. 2-1（A）に示した。KP の比活性 71.4 U/mg（5）から換算した場合、組換え KP の発現量は培養 40 時間目で最も高く、その発現量は培養液 1 L 当たり 2.1 g に達した。これは、*T. brockii* での発現量の約 15000 倍であった。SDS-PAGE の結果、調製した酵素液中のタンパクの大部分が組換え KP であることが確認された（Fig. 2-2（A））。なお、対照として用いた組換え枯草菌（プラスミド pUB110 を導入）からは KP 活性は検出されなかった（data not shown）。

２－３－２　TP 遺伝子の枯草菌での発現

枯草菌を宿主として、*B. amyloliquefaciens* 由来 α-アミラーゼプロモーターの支配下で TP 遺伝子を高発現化させた。組換え枯草菌の培養の経時変化を Fig. 2-1（B）に示した。TP の比活性 78.2 U/mg（11）から換算した場合、組換え TP の発現量は培養 48 時間目で最も高く、その発現量は培養液 1 L 当たり 4.9 g に達した。これは、*T. brockii* での発現量の約 13000 倍であった。SDS-PAGE の結果、KP の場合と同様に、調製した酵素液中のタンパクの大部分が組換え TP であることがわかった（Fig. 2-2（B））。なお、対照のプラスミド pUB110 組換え枯草菌からは TP 活性は検出されなかった（data not shown）。

Table 2-1.　Oligonucleotides used for the construction of *BamP* region

Primer	Sequence	Direction
P1	5’-GATCCATCGATCTGCAGGCCCCGCACATACGAAAAGACTGGCTGAAAACATTGAGCCTTTGATGACTGAT-GATTTGGCTGAAGAAGTGG-3’	Sense
P2	5’-ATCGATTGTTTGAGAAAAGAAGAAGACCATAAAAATACCTTGTCTGTCATCAGACAGGGTATTTTTTATGC-TGTCCAGACTGTCCGCT-3’	Sense
P3	5’-GTGTAAAAATAAGGAATAAAGGGGGGTTGTTATTATTTTACTGATATGTAAAATATAATTTGTATAAGAAAAT-GAGAGGGAGAGGA**CA**-3’	Sense
P4	5’-**TATG**TCCTCTCCCTCTCATTTTCTTATACAAATTATATTTTACATATCAGTAAAATAATAACAACCCCCCTTTAT-TCCTTATTTTTACACAGCGGACAGTCTGGACAGCA-3’	Anti-sense
P5	5’-TAAAAAATACCCTGTCTGATGACAGACAAGGTATTTTTATGGTCTTCTTCTTTTCTCAAACAATCGATCCACT-TCTTCAGCCAAATCA-3’	Anti-sense
P6	5’-TCAGTCATCAAAGGCTCAATGTTTTTTCAGCCAGTCTTTTCGTATGTGCGGGGCCTGCAGATCGATG-3’	Anti-sense

*Bam*HI and *Nde*I site are indicated by single underline and bold letters, respectively.

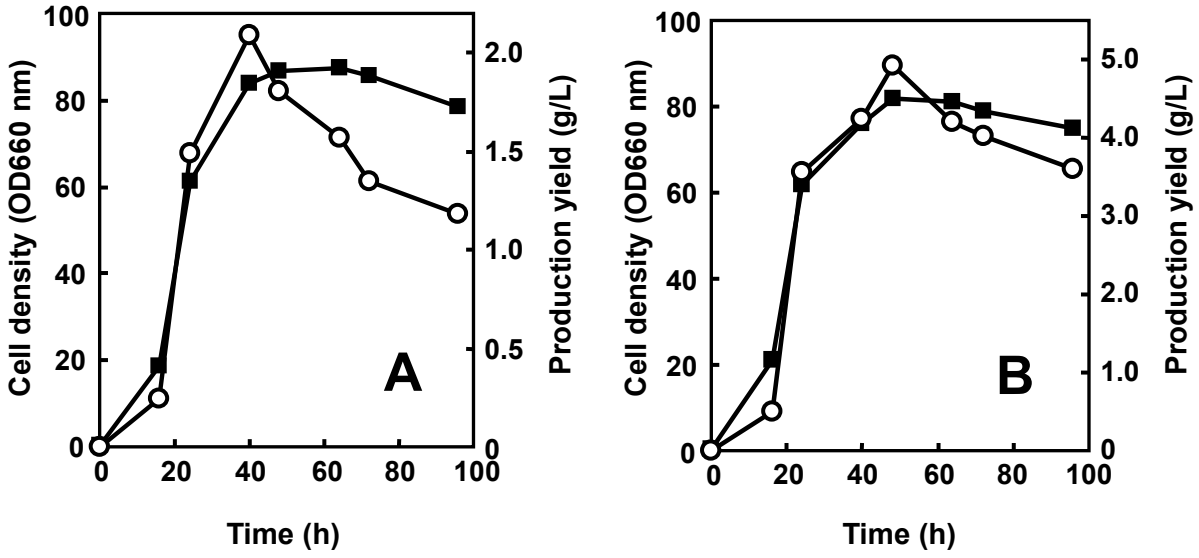


Fig. 2-1. Time courses of KP (A) and TP (B) expression in *B. subtilis*.

Cultivation conditions are described in the text. (A) Circles, Production yields of KP; Squares, Cell density of *B. subtilis* harboring pUBAPKP. (B) Circles, Production yields of TP; Squares, Cell density of *B. subtilis* harboring pUBAPTP; g/L, gram per liter of culture broth.

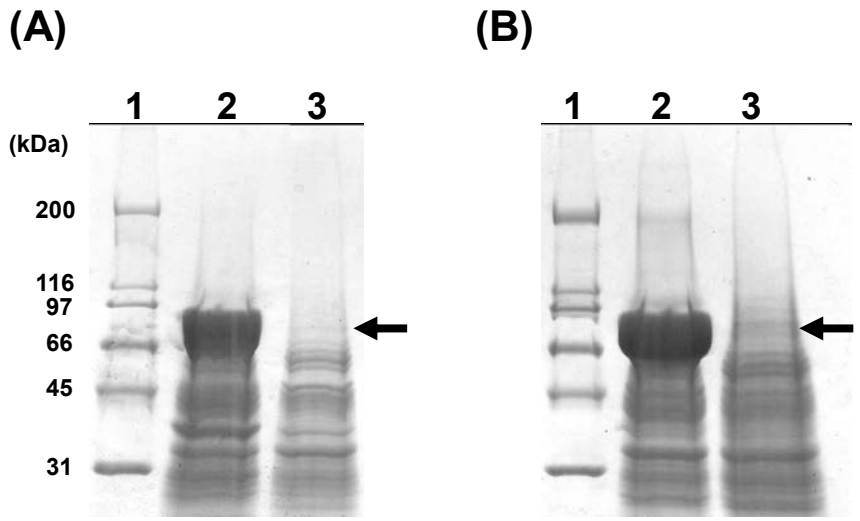


Fig. 2-2. SDS-PAGE of cell free extracts of *B. subtilis* harboring pUBAPKP or pUBAPTP.

Lane 1, standard protein mixture containing myosin (molecular mass, 220 kDa), β-galactosidase (116 kDa), phosphorylase B (97 kDa), serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), and carbonic anhydrase (31 kDa); lane 2, cell free extracts of *B. subtilis* harboring pUBAPKP (A) and pUBAPTP (B), respectively,; lane 3, cell free extracts of *B. subtilis* harboring pUB110 (control).

第４節　考察

高発現化で実績のある「枯草菌－*B. amyloliquefaciens* 由来 α-アミラーゼプロモーター」の組み合わせ（29,35,36）で、KP ならびに TP 遺伝子を高発現化させた。両酵素ともに菌体内でのみ発現が認められ、それらの発現量は KP で培養液 1 L 当たり 2.1 g、TP で 4.9 g であった。

著者は第 1 章において、大腸菌を宿主とした KP 遺伝子の発現系を構築した。その発現量は培養液 1 L 当たり 0.30 g であった。TP についても同様の発現系が構築され、その発現量は 0.51 g と報告された（12）。これまで大腸菌を宿主として KP, TP 遺伝子を発現させた場合、リゾチーム処理だけでは酵素を可溶化させることは困難で、超音波破砕処理の併用が必要不可欠とされ、酵素の回収にかかる操作が煩雑で、かつ回収率の低さが問題となっていた。それに対して、枯草菌を宿主とした場合、リゾチーム処理単独でも酵素の可溶性画分への回収が容易で、その回収率は KP の場合で発現量の約 70%、TP で約 90%に達した（data not shown）。従って、本章で構築した枯草菌宿主による KP, TP 遺伝子の高発現系を用いることで、簡易な操作で酵素液を調製することが可能となった。さらに、本高発現系では KP, TP の発現量がそれぞれ培養液 1 L 当たり 2.1 g、4.9 g であり、これまでの大腸菌宿主での発現量をそれぞれ 7 倍、10 倍に向上させた。この結果は、酵素液を調製する際の培養タンクのスケールダウンにつながり、経済的に有利であると考えられた。

KP, TP 遺伝子は起源を同一とし、遺伝子の GC 含量もほとんど等しいにもかかわらず、本発現試験における組換え TP の発現量は KP のそれの約 2.4 倍であった（Fig. 2-1）。これは、大腸菌を宿主とした場合においても同様の傾向が認められた（TP の発現量は KP のそれの約 1.7 倍）。TP の水溶液中での活性型構造は 2 量体であるが、KP は 6 量体構造である（5,11）。このオリゴマー構造の違いが両酵素の活性発現量の差に起因していると考えられた。すなわち、KP のオリゴマー構造は TP のそれよりも嵩高いことが予想されることから、本試験でのリゾチームによる溶菌条件では KP を可溶性画分へ完全に移行させることが困難であったことが推測された。さらに、培養 96 時間目における粗酵素液の KP 活性は、40 時間目のそれの 57%にまで減少していた。それに対して、TP の培養 96 時間目における活性は、最も活性が高かった培養 48 時間目での活性値の 73%であった。このことは、KP 活性の減少速度が TP 活性のそれよりも大きいことを意味している。すなわち、KP, TP いずれもが宿主である *B. subtilis* の産生するプロテアーゼにより分解されていることが考えられたが、活性型構造の大きい KP のほうが、よりプロテアーゼの作用を受けやすいことが示唆された。

第３章において、枯草菌由来組換え KP ならびに TP を組み合わせたトレハロースからの非還元性三糖セラギノースの酵素合成について述べる。

第５節　要約

KP, TP の大量生産を目的として、枯草菌を宿主とした高発現系の構築を行った。プラスミド pUB110 上に *Bacillus amyloliquefaciens* 由来 α-アミラーゼプロモーターとその下流に KP または TP 遺伝子を連結し、KP, TP の高発現ベクターをそれぞれ作製した。得られた組換え枯草菌を用いて KP, TP の活性発現を調査したところ、両酵素活性はいずれも菌体内にのみ認められ、リゾチーム処理によって容易に発現酵素を可溶化することができた。KP, TP 遺伝子組換え枯草菌の培養の経時変化を詳細に調査した結果、組換え KP の発現量は培養 40 時間目で最も高く、その発現量は培養液 1 L 当たり 2.1 g に達した。これは、*T. brockii* での発現量の約 15000 倍であった。組換え TP の場合は、培養 48 時間目で最も発現量が高く、培養液 1 L 当たり 4.9 g に達していた。これは、*T. brockii* での発現量の約 13000 倍であった。SDS-PAGE の結果、KP, TP いずれにおいても調製した酵素液中のタンパクの大部分が発現した酵素タンパクであることが確認された。この系を用いることで種々の酵素の大量生産が可能となり、それら酵素を用いた有用オリゴ糖製造の可能性を開いた。

第３章　組換え KP, TP を用いた効率的なセラギノースの酵素合成

第１節　緒言

加リン酸分解酵素（ホスホリラーゼ）を組み合わせたオリゴ糖の酵素合成は、近年になり広く検討されるようになった。マルトースホスホリラーゼ（MP; EC 2.4.1.8）とトレハロースホスホリラーゼ（反転型）（TP; EC 2.4.1.64）（20）、スクロースホスホリラーゼ（SP; EC 2.4.1.7）とセロビオースホスホリラーゼ（CBP; EC 2.4.1.20）、SP とラミナリビオースホスホリラーゼ（LBP; EC 2.4.1.31）（22,23）、さらには CBP と（グリコーゲン）ホスホリラーゼ（25）を組み合わせた種々のオリゴ糖やアミロースの酵素合成が報告されている。

コージビオースホスホリラーゼ（KP; EC2.4.1.230）はコージビオース（α-D-glucopyranosyl-(1→2)-D-glucopyranose）の α-1,2 グルコシド結合を、またトレハロースホスホリラーゼ（反転型）（TP; EC2.4.1.64）はトレハロース（α-D-glucopyranosyl- (1 ⇔1) α-D-glucopyranoside）の α, α-1,1 グルコシド結合をそれぞれ可逆的に加リン酸分解する酵素である。両酵素はいずれも加リン酸分解反応によって β-グルコース-１-リン酸（β-G1P）とグルコースを生成する。*Thermoanaerobacter brockii* ATCC35047 株は、KP と TP を産生する（9）。両ホスホリラーゼについては詳細な解析がなされ、酵素遺伝子の塩基配列も決定された（5,11,12）。

セラギノース（α-D-glucopyranosyl-(1→2) α-D-glucopyranosyl α-D-glucopyranoside）は、グルコース１分子がトレハロースに α-1,2 結合した非還元性三糖で、イワヒバより単離されている（41）。本糖質は KP, TP 両酵素の共同作用により、トレハロースから効率よく生成される（9）。

trehalose + inorganic phosphate (Pi) ⇄ β-G1P + glucose ; TP

trehalose + β-G1P ⇄ selaginose + Pi ; KP

セラギノースは、その分子中にトレハロース構造とコージビオース構造を有する糖質である。分子中にイソマルトース構造を有するグルコシルトレハロース（α-D-glucopyranosyl-(1→6) α-D-glucopyranosyl α-D-glucopyranoside）は、*Streptococcus mutans* によるスクロースからの不溶性グルカンの生成阻害や *Bifidobacterium* 属細菌による選択的資化など、種々の有用な機能を有する（42）。コージオリゴ糖にもまた種々の機能をもつことから（6,13,14）、セラギノースもグルコシルトレハロースやコージオリゴ糖と同様な機能を有していることが期待されるが、本糖質の機能性についての報告はなかった。

本章では、ホスホリラーゼを用いたオリゴ糖製造への応用の一例として、組換え KP ならびに TP を用いてトレハロースからセラギノースを酵素合成し、本糖質の機能性を調査した。

第２節　実験材料および方法

３－２－１　実験材料

（１）糖質

トレハロースは㈱林原製を用いた。その他の試薬は、市販の特級品またはそれに準ずるものを用いた。

（２）酵素

組換え KP, TP は枯草菌を宿主として発現させたものを用いた。それぞれの酵素液は方法２－２－７に準じて調製し、遠心分離後の上清を本試験に使用した。

３－２－２　組換え KP, TP を用いたセラギノースの調製

146 mM トレハロース、2 mM 無機リン酸、組換え KP（4×10^4 単位）および組換え TP（4×10^4 単位、いずれも加リン酸分解活性として）を含む 20 mM 酢酸緩衝液（pH 5.5）約 200 L の酵素反応液を 60℃で 96 時間保持した。80℃, 2 時間の熱処理によって酵素反応を停止させた後、反応液を濃縮した。次に、反応液を陽イオン交換カラムクロマトグラフィーに供してセラギノース画分を部分精製した。主にセラギノースを含む画分を回収・濃縮した後、再度陽イオン交換樹脂を用いたクロマトグラフィーを行ってセラギノース画分を回収した。次いで、セラギノース画分に水酸化ナトリウム（130 g）を添加し、混在する還元性糖質を分解した。最後に、アルカリ処理を行ったセラギノース画分を三菱化学㈱製イオン交換樹脂「Diaion SK-1B」とオルガノ㈱製アニオン交換樹脂「IRA411S」（SK1B : IRA411S = 1 : 2）を用いて脱色・脱塩した。得られたセラギノース溶液をエバポレーターで濃縮した。

３－２－３　陽イオン交換カラムクロマトグラフィー

酵素反応液からセラギノースを画分するため、オルガノ㈱製陽イオン交換樹脂「アンバーライト CR-1310」（225 L）を充填したカラム（12.5 cm i.d. × 160 cm × 10）を使用した。カラム温度は 60℃、溶出は水を用いた。流速は 70 L/h とし、溶出液を 2 L 毎に回収した。

３－２－４　糖質の分析

（１）薄層クロマトグラフィー（TLC）

TLC は、薄層に Silicagel 60 F254 plate（Merck 社製）を、展開溶媒として 1-ブタノール：ピリジン：水（6：4：1, v/v）を用いて上昇法で行った。糖の検出は、20%硫酸-メタノール溶液を噴霧後、110℃にて約 10 分間加熱して行った。

（２）高速液体クロマトグラフィー（HPLC）

糖質試料の HPLC 分析には、「LC-7A 型高速液体クロマトグラフ」（島津製作所㈱製）を使用し、ポンプに CCPM 型、検出器に RI-8020 型示差屈折計（いずれも東ソー㈱製）を用いた。カラムには Shodex SUGAR KS-801（8 mm i.d. × 300 mm × 2, 昭和電工㈱製）を用い、カラム温度 60℃、流速 0.5 mL/min の条件で分析した。溶媒は水を使用した。

（３）ガスクロマトグラフィー（GLC）

糖質試料を 40℃で一晩真空乾燥後、ピリジンに溶解し、トリメチルシリル化（TMS 化）したものを GLC 分析に供した。TMS 化は、ビス（トリメチルシリル）アセトアミド、トリメチルシリルイミダゾール、トリメチルクロロシランを含む TMS 化剤を添加し、60℃で 30 分間加温して行った。GLC 分析には「GC-16 型ガスクロマトグラフ」（島津製作所㈱製）を使用し、カラムにはクロモゾルブ W に 2%シリコン OV-17 をコートした担体（60-80 mesh, GL サイエンス㈱製）を充填したステンレスカラム（3 mm i.d. × 2 m）を、検出には水素炎イオン化検出器（flame ionization detector, FID）を用いた。カラム温度 160℃で２分間保持した後、昇温速度 7.5℃/min で 320℃までの昇温法で分析した。

３－２－５　セラギノースの *in vitro* 消化性試験

セラギノースの *in vitro* 消化性試験は、岡田らの方法に従い（43）、唾液アミラーゼ、人工胃液、膵液アミラーゼおよびラット小腸粘膜酵素による消化性を調査した。

第３節　結果

３－３－１　組換え KP, TP を用いたセラギノースの調製

組換え KP, TP それぞれ 4×10^4 単位をトレハロース 10 kg に作用させた。60℃、96 時間保持後の反応液の糖組成を Table 3-1 に示した。セラギノースの生成率は 32%であった。次いで、反応液を濃縮後、陽イオン交換カラムクロマトグラフィーに供して純度 77.4%、固形分として 1530 g のセラギノースを含む画分を回収した。これを再度陽イオン交換クロマトグラフィーに供し、固形分 653 g のセラギノース画分を得た。水酸化ナトリウムを用いたアルカリ処理、脱色および脱塩処理を経て、最終的に純度 96.2%、固形分 433 g のセラギノース溶液を得た。セラギノースの反応液からの回収率は 13.5%であった。

Table 3-1.　Sugar composition of the reaction mixture used by recombinant KP and TP

Sugar composition (%)					
Glucose	Trehalose	Kojibiose	Selaginose	Kojitriose	Others
17.0	26.7	11.4	32.0	7.0	5.9

Others, kojioligosaccharides with a degree of polymerization greater than three.

３－３－２　セラギノースの *in vitro* 消化性試験

機能性調査の一環として、i*n vitro* 消化性試験を行った。結果を Table 3-2 に示した。マルトース、コージビオースおよびトレハロースがラット小腸粘膜酵素によりそれぞれ 79.9%, 50.5%, 4.2%消化されたのに対して、セラギノースは唾液アミラーゼ、人工胃液、膵液アミラーゼおよびラット小腸粘膜酵素のいずれにおいても消化されなかった。

Table 3-2.　*In vitro* digestibility of selaginose

	Hydrolysis of oligosaccharides (%)			
	Maltose	Kojibiose	Trehalose	Selaginose
Human saliva	0	0	0	0
Artificial gastric juice	0	0	0	0
Porcine pancreas	0	0	0	0
Rat intestinal acetone powder	79.9	50.5	4.2	0

第４節　考察

組換えKPならびにTPを用いてトレハロースからセラギノースを酵素合成した。セラギノースはKPの作用によって、β-G1Pとトレハロースとから酵素合成することが可能であるが、この場合、糖供与体であるβ-G1Pが高価であるため、上記反応をそのまま実用的なセラギノース製造法に用いることはできない。TPはトレハロースと無機リン酸からβ-G1Pとグルコースを生成する酵素であり、G1Pのアノマー型（β）がKPと同一のため、本酵素をβ-G1Pの供給源として用いることができる。すなわち、二つの加リン酸分解酵素を組み合わせて反応を行えば、触媒量の無機リン酸の存在下にトレハロースを原料としてセラギノースを生成する反応系を構築することが可能となる。しかしながら、この反応系ではトレハロースの加リン酸分解によってグルコースが生成してしまう。グルコースはKPの糖受容体となって、β-G1Pとグルコースとからコージビオースと無機リン酸が生成する。さらに、反応中に生成したコージビオースが基質となって、グルコース重合度が3のコージトリオースを生成し、更に反応が進行して重合度が4～9のコージオリゴ糖が生成することになる。結果的に、反応液はセラギノースとコージオリゴ糖の混合液となる。本試験では最終的に純度96.2%、固形分433 gのセラギノースを得た。これは対セラギノース収率として13.5%、対トレハロース収率として4.3%であった。本反応系においてセラギノースのみを単離･精製することは操作的に煩雑で､かつ収率も低いことから、さらなるスケールアップを行うためには製造工程の改良や簡略化が必要であると考えられた。そこで、一度のみの分画操作を実施したところ、セラギノースを含む重合度3以上のオリゴ糖画分が良好に分離されることがわかった（data not shown）。セラギノースは*in vitro*消化性試験の結果より、小腸でほとんど消化・吸収されることなく大腸に到達する難消化性糖質であることが示唆された。同様の試験を、重合度3以上のセラギノース含有オリゴ糖について試験したところ、セラギノースの場合と同様の結果が得られた（唾液アミラーゼ、人工胃液、膵液アミラーゼおよびラット小腸粘膜酵素における消化率がそれぞれ 0%, 0%, 0%, 5.7%、unpublished data）。これは混在する重合度3以上のコージオリゴ糖もまた、セラギノースと同様に難消化性糖質であるためと推測された（6）。以上のことから、セラギノースよりも重合度3以上のセラギノース含有オリゴ糖を製造するほうがより現実的であると考えられた。

既に我々は、重合度3以上のセラギノース含有オリゴ糖について腸内細菌資化性試験やラットを用いた生理機能の調査を行っている。腸内細菌資化性試験の結果、オリゴ糖摂取による嫌気性菌や *Bifidobacterium* 属細菌の増加が認められ、腸内細菌叢改善作用が示唆された（unpublished data）。また、ラットのオリゴ糖摂取による脂質代謝の影響を調査した結果、血清中の中性脂肪量や腸管膜周囲、腎周囲、ならびに精巣周囲における蓄積脂肪量の減少が観察され､セラギノース含有オリゴ糖摂取による脂肪吸収の抑制作用が確認された（unpublished data）。

In vitro の試験により、セラギノースは胆汁酸と相互作用することが NMR 分析によって明らかとなった。これは、セラギノースが脂肪酸と胆汁酸のミセル形成を阻害する可能性を示唆し、セラギノース含有オリゴ糖摂取による蓄積脂肪の低減作用は、セラギノースが脂肪酸－胆汁酸ミセルの形成を阻害することによる脂肪の吸収抑制と考えられた（unpublished data）。このようにセラギノースの有する種々の機能が解明されつつある。

効率的なセラギノース含有オリゴ糖の製造を行うため、固定化 KP, 固定化 TP を充填したカラムを用いたオリゴ糖生成条件の検討を行った。固定化担体にイオン交換樹脂 BCW-3501（富士紡績社製）を用い、反応 pH 5.5、反応温度 50℃において、この固定化酵素カラムの連続反応試験を行った。通液初期の固定化酵素カラム反応液中、重合度 3 以上のオリゴ糖生成率は約 25% であった。その組成は 100 日以上維持された（unpublished data）。今後、固定化酵素カラムのスケールアップを図ることによる大量製造の実証が期待される。

第５節　要約

ホスホリラーゼを用いたオリゴ糖製造への応用の一例として、枯草菌を宿主として発現させた組換えKPならびにTPを用いたトレハロースからの効率的なセラギノースの酵素合成を行った。得られたセラギノースは純度96.2%、固形分433 gで、セラギノースの反応液からの回収率は13.5%であった。機能性調査の一環として、セラギノースの *in vitro* 消化性試験を行った。セラギノースは唾液アミラーゼ、胃酸、膵液アミラーゼおよびラット小腸粘膜酵素のいずれにおいても消化されなかったことから、本糖質は難消化性糖質であることが示唆された。

第４章　ランダム変異による KP の機能改変

第１節　緒言

第 1 章では、α-1,2 結合を生成することが報告されている唯一の加リン酸分解酵素、コージビオースホスホリラーゼ（KP; EC 2.4.1.230）の構造遺伝子を *Thermoanaerobacter brockii* ATCC35047 株染色体 DNA よりクローニングし、塩基配列を決定した。第２章では、KP 遺伝子と既に取得済みのトレハロースホスホリラーゼ（TP; EC 2.4.1.64）遺伝子を枯草菌内で高発現化させた。これにより、これまで調製が困難であったコージビオースをはじめ、種々のコージオリゴ糖の製造が容易となり、有用なオリゴ糖開発の可能性を開いた。コージオリゴ糖のうち、コージビオース、コージトリオース、コージテトラオースは低い還元力、弱いメイラード反応性、高い安定性、非う蝕原性、難消化性など食品、化粧品、医薬品など用途に期待される糖質である（13）。

ランダム変異は、ターゲットとする酵素の改変に非常に有効な手法である。酵素を耐熱化することは、酵素反応の利用の際、少量の酵素量で長時間反応できるため酵素反応における酵素量が低減でき、また酵素反応中のコンタミネーションリスクの低減につながることから、糖質の製造上、経済的に有利である。また、酵素の特異性を変化させることで、目的生成物の生成率を向上させることが可能となり、その工業的意義は大きい。かかる観点から、種々の酵素でそれら検討が試みられている（44-46）。

本章では、ランダム変異による KP の機能改変について述べる。KP の推定触媒残基を含む遺伝子領域に error-prone PCR 法によりランダム変異を導入し、変異酵素遺伝子ライブラリーを作製した。これを大腸菌内で発現させ、その培養菌体から調製した粗酵素液を用いて、耐熱性が向上した耐熱化変異酵素ならびに生成物の重合度が高分子側へシフトした生成物変異酵素（DP 変異酵素）をスクリーニングした。耐熱化酵素は熱処理後の残存活性を指標に、また DP 変異酵素はβ-G1P とグルコースとを基質とし、生成物の DP を指標にそれぞれスクリーニングした。その結果、耐熱化酵素 1 種類と DP 変異酵素 2 種類を得た。

第２節　実験材料および方法

４－２－１　実験材料

（１）糖質

コージビオース、β-G1P は㈱林原生物化学研究所製を用いた（37,8）。その他の試薬は、市販の特級品またはそれに準ずるものを用いた。

（２）宿主大腸菌

遺伝子操作の宿主大腸菌として、*Escherichia coli* XL-2Blue MRF'（Δ(*mcr*A)183, Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173, *endA*1, *sup*E44, *thi-1*, *rel*A1, *gyr*A96, *rel*A1, *lac*[F', *proAB*, *lacI*^{q} Z ΔM15, Tn*10* (*tet*^{r}), Amy, Cam^r]）を、また遺伝子発現の宿主大腸菌として、*E. coli* JM109（*recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*, *hadR*17 ($r_K^-m_K^+$), *e*14$^-$ (mcrA$^-$), *sup*E44, *rel*A1, Δ(*lac-proAB*)/F'[*traD*36, *proAB*$^+$, *lacI*^{q}, *lacZ*ΔM15]）を使用した。

（３）プラスミド

クローニングベクターには、pBluescriptII SK+（Stratagene 社製、USA）を用いた。また、遺伝子の発現および変異酵素遺伝子の構築には、プラスミド pKKZ（pKK223-3 由来、方法１－２－１（２）)および pKBK14（KP 遺伝子発現ベクター、結果１－３－３）を用いた。

４－２－２　組換え大腸菌の培養

組換え *E. coli* の培養は、方法１－２－２に準じて行った。

４－２－３　変異導入用プラスミドの構築

775 アミノ酸残基からなる KP において、269 番目の Ser から 700 番目の Thr までの範囲を変異導入のターゲットとした。この領域には、第 1 章において推定した 3 つの触媒反応に重要な残基 Asp-362, Lys-614 および Glu-642、糖の結合に関与している残基 Asp-459 が存在している。この領域のみに変異を導入するため、KP 遺伝子中に制限酵素 *Xho*I, *Kpn*I サイトを作製した。いずれの制限酵素サイトも KP にアミノ酸置換が起こらないように、サイレントミューテーションとなるように設計した。まず、KP 遺伝子に *Xho*I サイトを作製するため、PCR によって KP 遺伝子の *Xho*I サイト導入位置を境に 5'末端を含む領域と 3'末端を含む領域の 2 つに分けた。5'末端を含む領域の増幅にはセンスプライマーとして、KP 遺伝子の 5'末端配列を含む塩基配列 5'-CCCGAGCTCATATGGTAAAGCACATGTTTTTAGAGGATG-3'（KPN、下線部が *Sac*I サイト）を、アンチセンスプライマーとして、*Xho*I サイトを含む塩基配列 5'-TTTTACGTCTCTCGAG-

GTATAGGTTAT-3’（Xa と命名、下線部が *Xho*I サイト）を用い、KP 遺伝子発現ベクターpKBK14 を鋳型とした。PCR の反応は、100 pmol の各プライマー、0.2 mM dNTP および 2.5 単位の Takara *Pyrobest* DNA polymerase（宝酒造）を含む 50 μL 容量で行った。PCR 条件として、98℃で 20 秒間、60℃で 30 秒間、72℃で 2 分 30 秒間を 1 サイクルとし、95℃で 1 分間保持して DNA を変性させた後、25 サイクル運転した。PCR によって増幅した DNA 断片は *Xho*I により消化した。同様の方法で、3’末端を含む領域の増幅に 2 種類のプライマー、5’-ATAACCTATCCTCGAG-AGACGTAAAA-3’（Xs プライマー、下線部が *Xho*I サイト）と 5’-AAAACTAGTTCATTATTC-TATTGTCAGCTCTTTC-3’（KPC プライマー、KP 遺伝子の 3’末端配列を含む。下線部が *Spe*I サイト）を用いた。増幅した DNA 断片は *Xho*I により消化した。このようにして得られた 2 種類の DNA 断片を *Xho*I サイトで結合して、両端に *Sac*I および *Spe*I リンカーを、またその内部に *Xho*I サイトを有する完全長の KP 遺伝子を得た。これをプラスミド pKKZ 上の *Sac*I – *Spe*I サイトに挿入して発現ベクターpKBK14X を構築した。次に、制限酵素 *Xho*I での場合と同様のスキームで、KP 遺伝子内に *Kpn*I サイトを作製した。PCR によって KP 遺伝子の *Kpn*I サイト導入位置を境に 5’末端領域と 3’末端領域の 2 つに分け、5’末端を含む領域の増幅には KPN プライマーと Ka プライマー 5’-AACTACTTGCCAGGTACCACCAGCAGA-3’（下線部が *Kpn*I サイト）を、鋳型 DNA に発現ベクターpKBK14X をそれぞれ用いた。3’末端を含む領域の増幅はセンスプライマーとして *Kpn*I サイトを有する塩基配列 5’-TCTGCTGGTGGTACCTGGCAAGTAGTT-3’（Ks プライマー、下線部が *Kpn*I サイト）を、アンチセンスプライマーとして KP 遺伝子の 3’末端配列を含む KPC プライマーを用いた。2 種類の増幅断片を制限酵素 *Kpn*I にて消化後、それぞれを *Kpn*I サイトで連結した。これをプラスミド pKKZ 上の *Sac*I – *Spe*I サイトに挿入して発現ベクターpKBK14XK とした。構築のスキームを Fig. 4-1A に示した。以上の操作によって、KP 遺伝子の開始コドン ATG から塩基番号 804 – 809 の位置に *Xho*I サイトが、塩基番号 2095 - 2100 の位置に *Kpn*I サイトがそれぞれ導入された。構築したプラスミド pKBK14XK は、error-prone PCR の鋳型として用いた。

４－２－４　Error-prone PCR 法によるランダム変異の導入

KP 遺伝子へのランダム変異の導入には、GeneMorph PCR Mutagenesis Kit（Stratagene 社製、USA）を使用し、方法は添付のプロトコールに従った。方法４－２－３で作製した KP 遺伝子中の約 1.3 kb の *Xho*I – *Kpn*I 領域を変異のターゲットとした。変異が誘発される頻度は、1 kb あたり 0-3 個の塩基置換が起こる条件に設定した。Error-prone PCR は 2 種類のプライマーXs および Ka を用い、プラスミド pKBK14XK を鋳型とした。PCR 条件として、96℃で 30 秒間、60℃で 30 秒間、72℃で 1 分 30 秒間を 1 サイクルとし、95℃で 30 秒間保持して DNA を変性させた後、30 サイクル運転した。PCR によって増幅した DNA 断片は制限酵素 *Xho*I および *Kpn*I によ

り消化した。これをプラスミド pKBK14XK 上の *Xho*I – *Kpn*I サイトに挿入して変異酵素遺伝子ライブラリーを構築した。構築のスキームを Fig. 4-1B にまとめた。

４－２－５　耐熱化変異酵素のスクリーニング

方法４－２－４で構築した変異酵素遺伝子ライブラリーを大腸菌 *E. coli* JM109 に形質転換し、アンピシリンを含む LB 平板培地上に塗布し、37℃で 24 時間静置培養した。それぞれのコロニーを 1% N-Z Soy peptone（Sigma-Aldrich, USA）、2%酵母エキス、1%パインデックス#4（デンプン部分分解物、松谷化学社製）、0.1% NaH_2PO_4 からなる培地（pH 7.0）に接種し、37℃で 48 時間振とう培養した。得られた菌体培養液に等量のリゾチーム溶菌液（400 μg/mL のリゾチームを含む 50 mM 酢酸緩衝液（pH 6.0））を添加し、37℃で 3 時間振とうしたものを粗酵素液とした。次いで、これを 70℃で 30 分間熱処理し、残存するコージビオース分解活性（加リン酸分解活性）を測定した。野生型酵素よりも活性が高いクローンを選抜した。選択したクローンからはプラスミド DNA を精製し、制限酵素 *Xho*I, *Kpn*I で消化して *Xho*I – *Kpn*I 断片を得た。これをプラスミド pBluescriptII SK+上の *Xho*I – *Kpn*I サイトにサブクローニングした後、塩基配列を決定した。

４－２－６　生成物変異酵素（DP 変異酵素）のスクリーニング

変異酵素遺伝子ライブラリーで形質転換した大腸菌 *E. coli* JM109 を方法４－２－５記載の培地で 48 時間振とう培養した。次いで、遠心分離（10000×g、5 分間、4℃）により得られた培養菌体をリゾチーム溶菌液に懸濁し、37℃で 3 時間振とうした。これを Ultrasonic Homogenizer UH-600（SMT 社製）を用いて 1 分間超音波破砕した後、60℃で 60 分間熱処理した。遠心分離後、上清を粗酵素液とし、以下の酵素反応に用いた。すなわち、200 mM β-G1P, 100 mM グルコースおよび粗酵素液（10 U/g β-G1P の作用量）を含む 50 mM 酢酸緩衝液（pH 5.5）からなる反応液を 60℃で 24 時間インキュベートした。反応液を HPLC 分析に供して生成物のグルコース重合度を評価した。野生型酵素と比較して生成物の重合度が大きく変化した生成物変異酵素（DP 変異酵素）産生クローンを選択した。これらクローンについては、プラスミド精製、制限酵素消化を行い、*Xho*I – *Kpn*I 断片の塩基配列を決定した。

４－２－７　DP 変異酵素を用いたコージオリゴ糖生成試験

方法４－２－６に準じて調製した粗変異酵素液（20 U/g β-G1P の作用量）、200 mM β-G1P および 12.5 mM から 200 mM のグルコースを含む 10 mM 酢酸緩衝液（pH 5.5）からなる反応液を 60℃で 24 時間インキュベートした。反応液を HPLC 分析に供し、生成物の糖組成を評価した。また、組成とグルコース重合度から、生成物の平均重合度も算出した。

４－２－８　遺伝子操作

プラスミドDNAの精製は、Birnboimらの方法に従った（27）。PCRプライマーと配列決定に用いるオリゴヌクレオチドは、合成品（日清紡績社製）を用いた。特別な場合を除き、他の遺伝子操作はManiatisらの標準法に従った（28）。

４－２－９　塩基配列の決定

塩基配列の決定は、DNAシーケンサーmodel 373A（Applied Biosystems）を用いて行った。作製した各種サブクローン体からプラスミドを抽出、精製して鋳型とした。プライマーにはT3, T7またはKSを用い、Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）を添加し、PCRを行った。PCR条件およびDNA回収方法はキットのプロトコールに従った。塩基配列の解析は、遺伝子解析ソフトGENETYX-WIN（ソフトウェア開発㈱社製）を用いて行った。

４－２－10　酵素の精製

（１）超音波破砕

培養液2 Lを遠心分離（10000×g、20分間、4℃）して得られた培養菌体に10 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）を添加して菌体を懸濁、洗浄した。再度遠心分離した菌体沈殿物にリゾチーム溶菌液（400 μg/mLのリゾチームを含む10 mMリン酸緩衝液（pH 7.0））を添加し、37℃で3時間振とうした。これをUltrasonic Homogenizer UH-600（SMT社製）を用いて10分間超音波破砕した後、60℃で60分間熱処理した。遠心分離後、菌体破砕上清を得た。

（２）硫安分画

菌体破砕上清に硫酸アンモニウムを60%飽和になるように添加し、4℃で一晩放置した。生じた塩析物を遠心分離により回収し、100 mLの10 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）に溶解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約140 mLを得た。

（３）DEAE Toyopearl 650Sカラムクロマトグラフィー

硫安分画により得られた粗酵素液を、10 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）で平衡化したDEAE Toyopearl 650Sカラムクロマトグラフィー（16 mm i.d. × 490 mm）に供した。吸着した目的酵素をNaCl濃度0 Mから0.4 Mのリニアグラジエントで溶出させた。得られた活性画分をDEAE回収区とした。

（４）Butyl Toyopearl 650Mカラムクロマトグラフィー

DEAE回収区に硫酸アンモニウムを終濃度1.5 Mとなるように添加し、1.5 M硫酸アンモニウ

ムを含む 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）で平衡化した Butyl Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィー（10 mm i.d. × 100 mm）に供した。吸着した目的酵素を硫酸アンモニウム濃度 1.5 M から 0 M のリニアグラジエントで溶出させた。得られた活性画分を 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）に対して透析し、Butyl 回収区とした。

（５）Hydroxyapatite カラムクロマトグラフィー

Butyl 回収区を、10 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）で平衡化した Hydroxyapatite カラムクロマトグラフィー（10 mm i.d. × 100 mm）に供した。リン酸濃度 0.01 M から 0.3 M のリニアグラジエントで溶出させた。得られた活性画分を回収し、Hydroxyapatite 回収区とした。

４－２－11　酵素活性

KP の活性測定法は、加リン酸分解活性、合成活性いずれも方法１－２－10 に準じて行った。

４－２－12　速度論的解析

各基質に対する K_m 値の算出は、方法１－２－11 に準じて行った。

４－２－13　糖質の分析

（１）薄層クロマトグラフィー（TLC）

TLC は、薄層に Silicagel 60 F254 plate（Merck 社製）を、展開溶媒として 1-ブタノール：ピリジン：水（6 : 4 : 1, v/v）を用いて上昇法で行った。糖の検出は、20%硫酸-メタノール溶液を噴霧後、110℃にて約 10 分間加熱して行った。

（２）高速液体クロマトグラフィー（HPLC）

糖質試料の HPLC 分析には、「LC-10A 型高速液体クロマトグラフ」（島津製作所㈱製）を使用し、ポンプに CCPM 型、検出器に RI-8020 型示差屈折計（いずれも東ソー㈱社製）を用いた。カラムに TSK-GEL AMIDE 80（4.6 mm i.d. × 250 mm, ㈱YMC 製）を用いた場合は、カラム温度 40℃、流速 1.0 mL/min の条件で分析し、溶媒は 60%アセトニトリルを使用した。カラムに MCI GEL CK04SS（10 mm i.d. × 200 mm ×２本, 三菱化学㈱製）を用いた場合は、カラム温度 80℃、流速 0.4 mL/min の条件で分析した。溶媒は水を使用した。

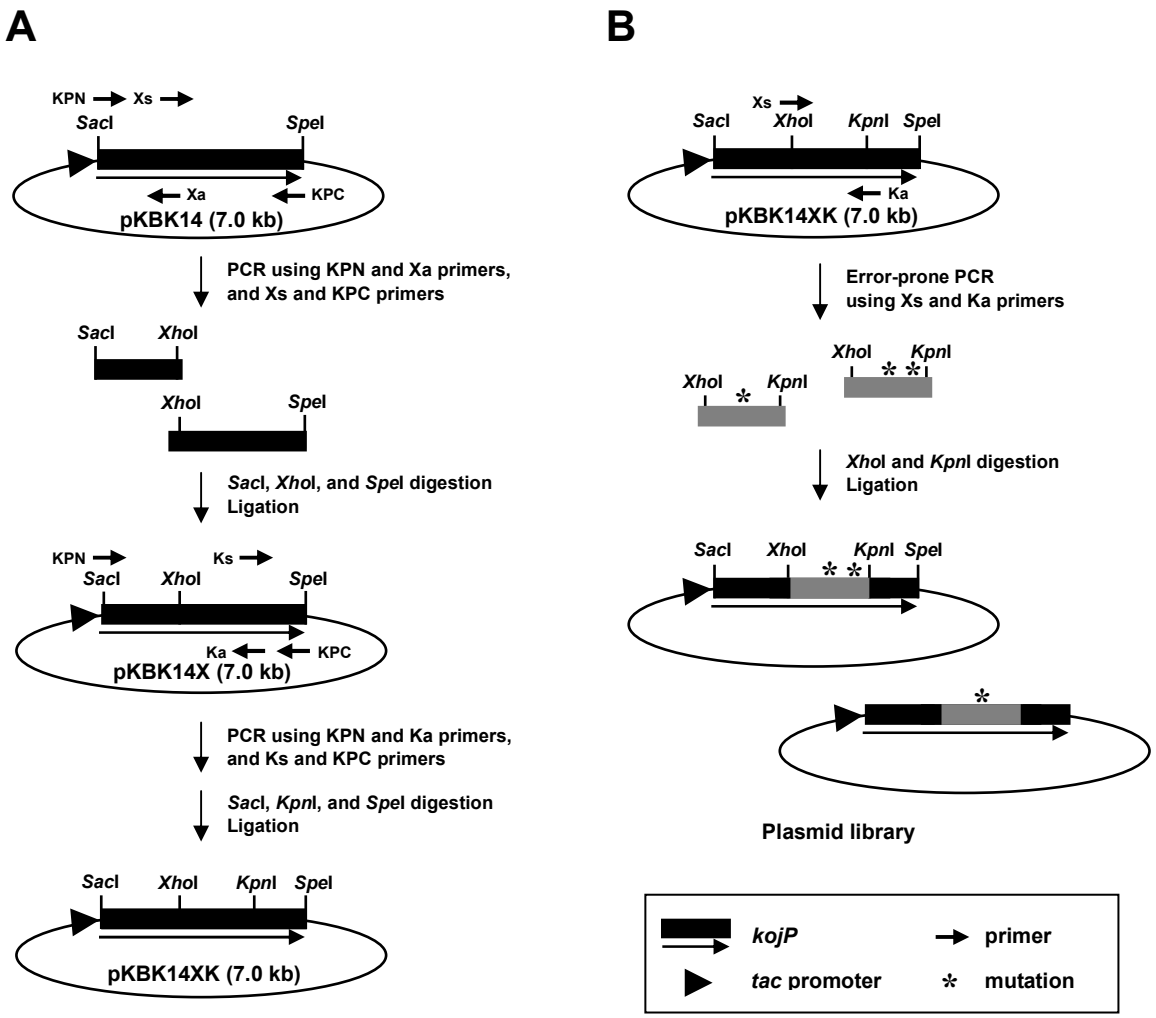


Fig. 4-1. Construction schemes of plasmid pKBK14XK (A) and the plasmid library (B).

第３節　結果

４－３－１　耐熱化変異酵素のスクリーニング

変異酵素遺伝子ライブラリーにより形質転換させた大腸菌約 1500 株について、耐熱化酵素をスクリーニングした結果、野生型 KP よりも耐熱性が向上した変異酵素が 1 種類得られた。本変異酵素の塩基配列を決定したところ、1537 番目の塩基が G から A に置換し、その結果 Asp-513 が Asn に置換していることが確認された。本耐熱化変異酵素を D513N とした。

４－３－２　耐熱化変異酵素の精製

耐熱化酵素 D513N の精製結果を Table 4-1 にまとめた。Butyl 回収区を Hydroxyapatite カラムクロマトグラフィーに供したところ、本酵素は非吸着画分に溶出した。この Hydroxyapatite 回収区を SDS-PAGE に供して酵素標品の純度を検定したところ、単一バンドを示した。耐熱化酵素 D513N の比活性は 64.1 U/mg、精製倍率は 52 倍、回収率は 15%であった。

Table 4-1.　Summary of the purification of the thermoatable KP, D513N

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification index (-fold)	Yield (%)
Supernatant after sonication	5590	6870	1.23	1.00	100
Ammonium sulfate	401	5910	14.7	12.0	86.0
DEAE-Toyopearl	84.5	3720	44.0	36.0	54.1
Butyl-Toyopearl	36.8	2070	56.3	45.8	30.1
Hydroxyapatite	15.9	1020	64.1	52.1	14.8

４－３－３　耐熱化変異酵素の諸性質

D513N 変異酵素の反応最適温度は 67.5－70℃であり、pH 5.5, 1 時間の保持条件下において 67.5℃まで安定であった（Fig. 4-2）。それに対して、野生型 KP では、反応最適温度が 65℃、安定性は同条件下で 60℃までであった。

次いで D513N、野生型 KP それぞれの 60℃、70℃および 75℃における活性半減期 $t_{1/2}$ を比較した。結果を Fig. 4-3 に示した。D513N 酵素の活性半減期は 60℃で 135 hr、70℃で 110 min、75℃で 6 min であり、野生型酵素の場合のそれぞれ 1.6 倍、7 倍、6 倍に増加していた。

さらに、本変異酵素の速度パラメータを求めた。コージビオース、無機リン酸、β-G1P およびグルコースに対する K_m 値はそれぞれ 1.06 mM, 1.15 mM, 0.47 mM, 3.72 mM であった（Table 4-2）。

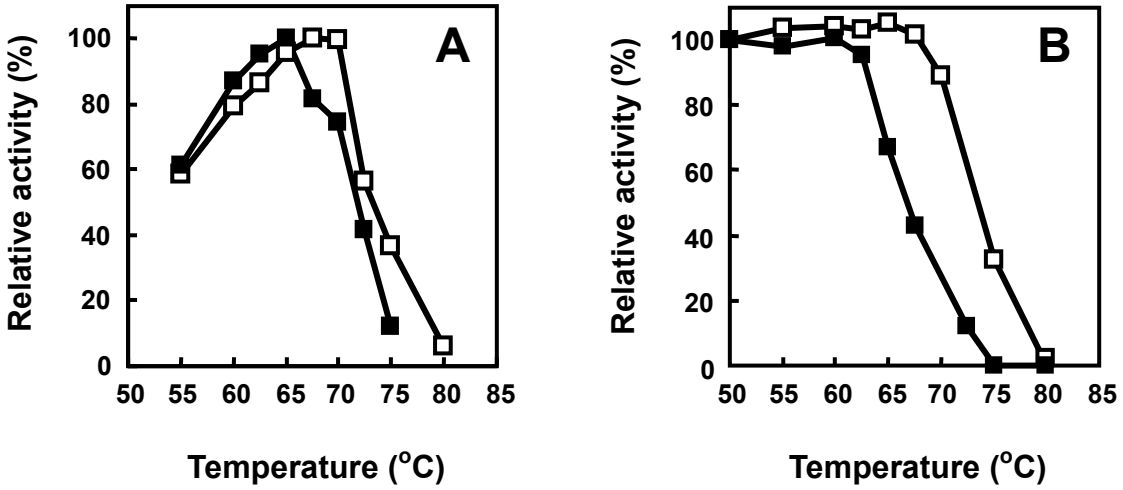


Fig. 4-2.　Effect of temperature on the activity and stability of D513N and wild-type KP.

The enzyme activities were assayed at various temperatures. To determine thermal stability, the enzyme solutions were incubated at various temperatures (50-80°C) for 60 min in 50 mM acetate buffer (pH 5.5) and cooled immediately. The residual activities were assayed at 60°C. (A) Activity; (B) thermal stability. Open squares, D513N; filled squares, wild-type KP.

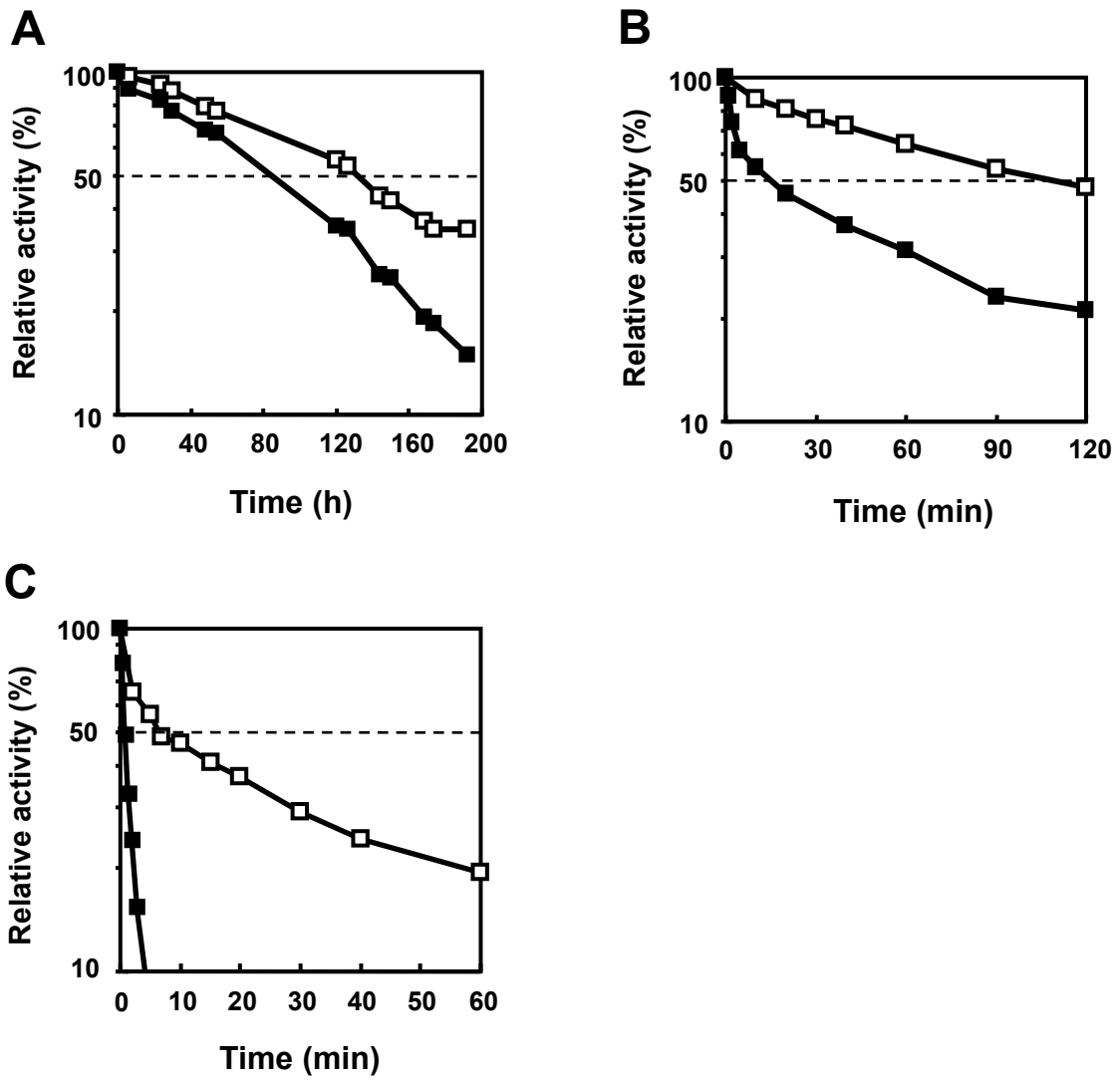


Fig. 4-3. Thermal inactivation of D513N and wild-type KP.

Each enzyme solution was incubated at various temperatures in 50 mM acetate buffer (pH 5.5). After various intervals, the enzyme solutions were cooled immediately and then the residual activities were measured. (A) 60°C; (B) 70°C; (C) 75°C. Open squares, D513N; filled squares, wild-type KP.

Table 4-2.　K_m values for D513N and wild-type KP

Enzyme	K_m value (mM)			
	Kojibiose	Pi	β-G1P	Glucose
D513N	1.06	1.15	0.47	3.72
Wild type	0.80	0.75	0.79	3.84

４－３－４　DP 変異酵素のスクリーニング

変異酵素遺伝子ライブラリーにより形質転換させた大腸菌約 1500 株について、生成物の重合度を指標にスクリーニングした結果、野生型 KP よりも生成物の重合度が高分子側にシフトした生成物変異酵素（DP 変異酵素）が 2 種類得られた。本変異酵素の塩基配列を決定したところ、一方は 2027 番目の塩基が G から A に置換し、その結果 Ser-676 が Asn に置き換わっていた。他方は 2060 番目の塩基が A から T に、その結果 Asn-687 が Ile に置換していた。それぞれの DP 変異酵素を S676N、N687I とした。これら粗変異酵素液のコージビオースの加リン酸分解活性は 75.4 U/g-wet cells（S676N）、376 U/g-wet cells（N687I）であり、同じ条件で調製した粗野生型酵素液のそれぞれ 1/10、1/2 倍であった（47）。

2 種類の DP 変異酵素を用いたオリゴ糖生成反応の結果を Table 4-3 に示した。S676N、N687I 変異酵素ともに野生型酵素に比べて重合度の大きいコージオリゴ糖の生成が認められた。特に S676N 酵素の場合、DP5（コージペンタオース）の生成率が野生型酵素のそれの約 3 倍であり、さらに野生型酵素では検出されなかった重合度 6 以上のオリゴ糖の割合が、S676N では約 14% に達していた（47）。

Table 4-3.　Sugar composition of the reaction mixture used by DP-mutants

Enzyme	Sugar composition (%)						
	Glc (DP1)	K2 (DP2)	K3 (DP3)	K4 (DP4)	K5 (DP5)	K6 (DP6)	≧ K7 (≧ DP7)
S676N	9.5	17.2	28.3	14.8	16.7	10.0	3.5
N687I	8.1	17.2	32.4	19.0	19.1	4.2	0.0
Wild type	11.0	22.3	46.7	14.5	5.5	0.0	0.0

Each reaction mixture was analyzed in detail by TSK gel amide-80 HPLC. DP, degree of polymerization; Glc, glucose; K2, kojibiose; K3, kojitriose; K4, kojitetraose; K5, kojipentaose; K6, kojihexaose; K7, kojiheptaose

４－３－５　DP 変異酵素を用いたコージオリゴ糖生成試験

DP 変異酵素 S676N を用いてのコージオリゴ糖生成試験を行った。糖供与体であるβ-G1P の濃度を 200 mM、糖受容体のグルコースを 12.5 mM から 200 mM の基質濃度条件で行った。結果を Table 4-4 に示した。Table 4-4 から明らかなように、グルコース 12.5 mM から 33.3 mM の濃度条件で DP14（コージテトラカイデカオース）までのコージオリゴ糖が生成した。対照の野生型 KP を用いた場合、同条件において DP9（コージノナオース）までのオリゴ糖しか生成しなかった。グルコース濃度 12.5 mM の場合の S676N、野生型 KP それぞれの HPLC クロマトグラムを Fig. 2-4 に示した。さらに、生成したコージオリゴ糖の平均重合度について調べたところ、S676N では平均重合度が 7.4（グルコース濃度 12.5 mM の場合）に達していた。野生型 KP での最高値である 5.3 を大きく上回ることがわかった（Table 4-4）（特開 2004-154013）。

Table 4-4.　Sugar composition of the reaction mixture used by S676N or wild-type KP

Enzyme	Substrate (mM)		Sugar composition (%)														$\overline{DP}$
	β-G1P	Glc	Glc	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	DP8	DP9	DP10	DP11	DP12	DP13	DP14	
S676N	200	12.5	1.2	3.2	8.4	5.9	10.0	12.1	11.7	11.3	10.3	9.6	7.6	4.9	3.1	0.8	7.4
	200	25	1.2	3.4	9.0	6.5	11.3	13.9	13.3	12.4	10.5	8.5	5.5	2.9	1.2	0.3	6.9
	200	33.3	1.2	4.1	10.5	7.5	12.6	15.2	14.2	12.6	9.8	6.8	3.5	1.4	0.3	0.1	6.5
	200	50	2.9	6.8	15.3	10.0	15.0	16.3	13.5	10.1	6.2	2.9	0.9	0.2	0.0	0.0	5.7
	200	100	9.3	16.8	26.8	13.0	13.8	10.8	6.1	2.6	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1
	200	200	24.6	28.0	28.5	8.9	6.1	2.9	0.8	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1
Wild-type	200	12.5	2.6	7.4	16.3	10.7	15.9	18.8	16.8	8.9	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.3
	200	25	1.7	5.9	14.2	10.5	17.4	23.6	18.3	6.9	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.3
	200	33.3	1.9	5.8	14.3	11.1	19.1	26.6	16.0	4.5	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.2
	200	50	2.3	7.1	17.5	13.7	23.4	28.1	7.0	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.7
	200	100	7.9	16.8	31.1	17.6	19.9	6.5	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7
	200	200	22.4	29.7	33.9	10.0	3.8	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9

Each reaction mixture was analyzed in detail by MCI GEL CK04SS HPLC. $\overline{DP}$, average DP.

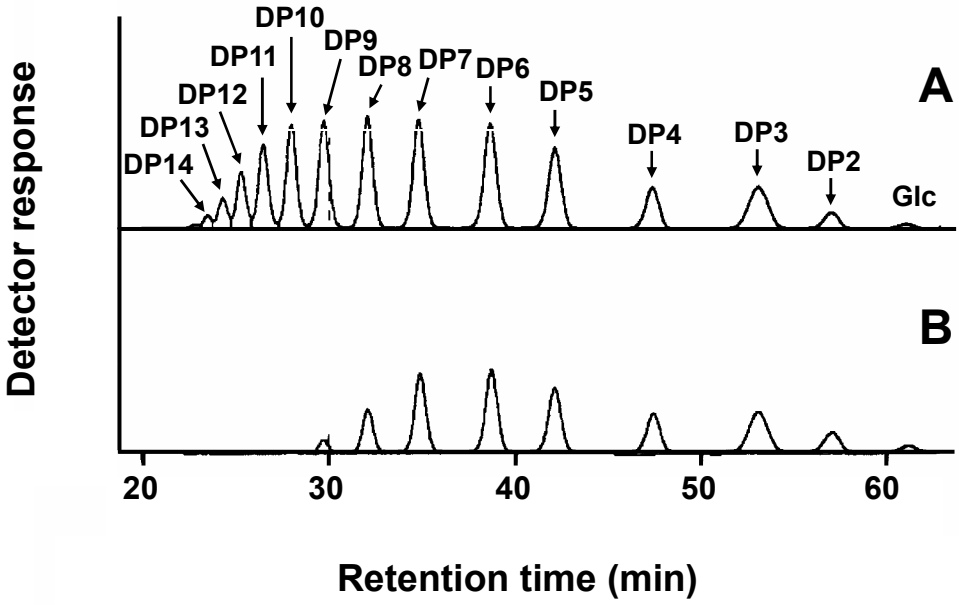


Fig. 4-4. HPLC profiles of the resulting reaction mixture using DP-mutant, S676N (A) and wild-type KP (B) by using a MCI GEL CK04SS column.

E. coli harboring the expression plasmid of S676N or wild-type KP was aerobically cultured and harvested by centrifugation. After centrifugation, the cultured cells were suspended in the lysozyme solution at 37°C for 3 h with shaking, and then sonicated for 1 min. The sonicated solution was heat-treated by incubation at 60°C for 1 h. After the heat-treatment and centrifugation, the supernatant was used as the enzyme solution. Reaction mixtures (2 mL) containing 200 mM β-G1P, 12.5 mM glucose and enzyme (20 U/g for β-G1P) in 10 mM acetate buffer (pH 5.5) were incubated at 60°C for 24 h. Then, each reaction mixture was analyzed in detail by HPLC (47).

第４節　考察

本章において、error-prone PCR 法により KP 遺伝子にランダム変異を導入し、改変酵素の取得を試みた。変異を導入する遺伝子領域は、KP の 269 番目の Ser から 700 番目の Thr までの範囲をコードする約 1.3 kb 領域とした。この領域には、第 1 章において推定した 3 つの触媒反応に重要な残基 Asp-362, Lys-614 および Glu-642、糖の結合に関与している残基 Asp-459 が存在しており、この約 1.3 kb 領域に変異を導入することにより種々の変異酵素が効率よく取得できるのではないかと考えた。また、変異が誘発される頻度は、1 kb あたり 0-3 個の塩基置換、すなわち 1 アミノ酸の置換が起こる条件に設定した。これは、一度の変異により複数のアミノ酸置換が発生すれば、後の解析が複雑になるということを考慮したためである。変異酵素ライブラリーからのスクリーニングによって、耐熱化変異酵素 1 種類（D513N）と DP 変異酵素 2 種類（676N, N687I）を得た。

耐熱化酵素 D513N の比活性は 64.1 U/mg であり、野生型 KP の 70.1 U/mg と同等であった。また、コージビオース、無機リン酸、β-G1P およびグルコースに対する K_m 値はそれぞれ 1.06 mM, 1.15 mM, 0.47 mM, 3.72 mM（野生型 KP；0.80 mM, 0.75 mM, 0.79 mM および 3.84 mM）で、野生型 KP と違いは認められなかった（Table 4-2）。以上のことから、Asp-513 の Asn への置換は、KP の活性部位の構造へ影響を与えないことが示唆された。それに対して、D513N 酵素の反応最適温度、温度安定性はいずれも野生型酵素に比べ、高温側へシフトし、さらに活性半減期も大幅に増大していたことから、Asp-513 から Asn へのアミノ酸置換は酵素の耐熱化に寄与していると考えられた。

KP は glycoside hydrolase family 65（GH-65）に属している（48）（http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/GH.html）。GH-65 には、KP の他にトレハラーゼ（EC 3.2.1.28）、マルトースホスホリラーゼ（MP; EC 2.4.1.8）、トレハロースホスホリラーゼ（反転型）（TP; EC 2.4.1.64）およびトレハロース 6-リン酸ホスホリラーゼ（T6PP; EC 2.4.1.216）が含まれる。近年、GH-65 に属する酵素である *L. brevis* 由来 MP の立体構造が明らかとなり、触媒残基を含む活性部位を構成するアミノ酸残基について報告がなされた（32）。MP の立体構造から、KP の Asp-513 残基は MP の Asn-499 に対応していることがわかった。この Asn-499 はアミノ酸残基 496-513 で構成されるα-ヘリックス構造中に含まれていた。これらアミノ酸残基周辺は KP, MP 互いに相同性が高いことから、KP の Asp-513 残基は α-ヘリックスを構成していることが予想された。さらに、Asp-513 は Glu-492 の側鎖に近接していた。本変異試験で得られた耐熱化酵素 D513N は、Asp-513 から Asn へのアミノ酸置換を介して側鎖間の負電荷の反発が解消されたことによりα-ヘリックス構造が安定化し、その結果酵素の熱安定性向上がもたらされたと推測された。

DP 変異酵素、S676N, N687I は、野生型 KP と比較して高重合度のコージオリゴ糖の生産能が

高かった。特に、S676N 酵素ではこれまで生成が不可能と考えられていた重合度 14 までのオリゴ糖の生成が確認された。KP はβ-G1P とグルコースとからコージビオースと無機リン酸を生成するだけでなく、反応中に生成したコージビオースが基質となって、グルコース重合度が 3 のコージトリオースを生成し、更に反応が進行して重合度 4～9 のコージオリゴ糖が生成する。これらコージオリゴ糖のうち、コージビオース、コージトリオース、コージテトラオースは低い還元力、弱いメイラード反応性、高い安定性、非う蝕原性、難消化性など食品、化粧品、医薬品など用途に期待される糖質である（13)。重合度 3 以上のコージオリゴ糖は難消化性であり、可溶性食物繊維としての応用が期待される。一般に、重合度が大きいほど食物繊維としての効果も大きいことから、本 DP 変異酵素によって、より効果が期待される高重合度オリゴ糖の生成が可能となった。

Ser-676 から Asn、および Asn-687 から Ile へのアミノ酸置換は、KP の一次構造上お互いに近接した位置で起こっていた。これは得られた 2 種類の変異酵素がいずれも生成物の重合度に関係しているという観点から、妥当な結果であると考えられた。Ser-676 および Asn-687 周辺の領域は、KP と MP の間でよく保存されている。MP の立体構造から、KP のこれら 2 アミノ酸残基は、推定リン酸結合部位である Ser-649, Ser-650（MP の Ser-627, Ser-628 に対応）に近接し、活性部位の内側に位置していた。今回得られたセリンからアスパラギン、およびアスパラギンからイソロイシンへの変異によって、KP のリン酸結合部位を含む活性部位の構造に変化が生じ、それがオリゴ糖に対する親和性に影響を与えたのかもしれない。すなわち、重合度が大きいオリゴ糖が受容体となるのに有利な構造に変化したと考えられた。しかしながら、受容体であるオリゴ糖に対する親和性の変化が Ser-676 や Asn-687 のアミノ酸置換によって直接的、あるいは間接的にもたらされたのかについては明らかになっていない。Ser-676 や Asn-687 周辺について解析を進めれば何か糸口が見出されるに違いない。

本章で取得された耐熱化酵素は、野生型酵素に比べて熱安定性が向上した。また、DP 変異酵素は野生型酵素で得ることができない高重合度のコージオリゴ糖を生成した。第 3 章において、KP, TP を用いた機能性オリゴ糖の生産について述べた。これら変異酵素をオリゴ糖生産に用いることで、より効率的な生産（固定化酵素へ利用した場合の耐久性の向上）や、より付加価値に高いオリゴ糖の生産につながることが期待される。

第５節　要約

KP 遺伝子上の推定触媒残基を含む約 1.3 kb の遺伝子領域に、error-prone PCR 法によりにランダム変異を導入し、耐熱化変異酵素および生成物の重合度が高分子側にシフトした DP 変異酵素の取得を試みた。その結果、耐熱化酵素 1 種類と DP 変異酵素 2 種類を得た。

耐熱化酵素 D513N は反応最適温度が 67.5－70℃、pH 5.5, 1 時間の保持条件下において 67.5℃まで安定であった。野生型 KP よりも反応至適温度および熱安定性がそれぞれ 5℃高温側にシフトしていた。さらに、60℃、70℃および 75℃における活性半減期 $t_{1/2}$ を調査したところ、D513N 酵素の活性半減期は 60℃で 135 hr、70℃で 110 min、75℃で 6 min であり、野生型酵素の場合のそれぞれ 1.6 倍、7 倍、6 倍に増加していた。*Lactobacillus brevis* 由来 MP の立体構造より、Asp-513 は KP の α-ヘリックス構造を構成しているということが予想された。さらに、Asp-513 は Glu-492 の側鎖に近接していた。本変異試験で得られた耐熱化酵素 D513N は、Asp-513 から Asn へのアミノ酸置換を介して側鎖間の負電荷の反発が解消されたことによりα-ヘリックス構造が安定化し、その結果酵素の熱安定性向上がもたらされたと推測された。また、本変異酵素の比活性は 64.1 U/mg、各基質に対する K_m 値はそれぞれ 1.06 mM（コージビオース）、1.15 mM（無機リン酸）、0.47 mM（β-G1P）および 3.72 mM（グルコース）であり、野生型酵素と同等であった。この結果は、KP の活性部位が Asp-513 から Asn への置換による直接的な影響を受けなかったことを示唆している。

DP 変異酵素 S676N、N687I は、ともに野生型酵素に比べて重合度が大きいコージオリゴ糖の生成が認められた。特に S676N 酵素の場合、DP5（コージペンタオース）の生成率が野生型酵素のそれの約 3 倍であり、野生型酵素では検出されなかった重合度 6 以上のオリゴ糖の割合が、S676N では約 14%に達していた。この S676N 酵素を用いてさらに詳細な検討を行ったところ、糖供与体であるβ-G1P の濃度が 200 mM、糖受容体のグルコースが 12.5 mM の濃度条件下で DP14（コージテトラカイデカオース）までのコージオリゴ糖の生成が確認された。このとき、対照の野生型 KP では DP9（コージノナオース）までのオリゴ糖しか生成しなかった。本試験における S676N 酵素でのコージオリゴ糖の平均重合度は 7.4 で、野生型 KP での最高値 5.3 を大きく上回った。立体構造の観点から推測すると、DP 変異酵素で認められたアミノ酸置換はリン酸結合部位に近接し、活性部位の内側に位置していた。このことから、KP の活性部位は本試験での変異によって、重合度の大きいオリゴ糖が受容体となるのに有利な構造に変化した可能性が考えられた。

第５章　KP, TP のキメラ化による特異性改変酵素の取得

第１節　緒言

第４章では、コージビオースホスホリラーゼ（KP）遺伝子に error-prone PCR 法によりランダム変異を導入し、耐熱性が向上した耐熱化変異酵素ならびに生成物の重合度が高分子側へシフトした生成物変異酵素（DP 変異酵素）を取得した。これら変異酵素をオリゴ糖生産に用いることで、より効率的な生産や付加価値に高いオリゴ糖の生産への可能性を開いた。

タンパク質工学は、ターゲットとする酵素の特性を改変するのに非常に有効な手法である。酵素に耐熱性を付加させることは、酵素自身あるいはその固定化酵素の耐久性向上、さらには酵素反応中のコンタミネーションリスクの低減につながる。また、酵素の特異性を変化させることで、主生成物の収率の増大（49,50）、それに伴う副生成物の生成率の低減、さらには新規な酵素活性の創出が可能で（51,52）、工業的意義は非常に大きい。また、タンパク質工学的手法の１つであるキメラ化は、酵素特性のダイナミックな改変（53,54）、加えて酵素自体の特異性を決定する領域の同定に非常に有効な方法である（55-58）。

本章では、*Thermoanaerobacter brockii* が産生する KP ならびにトレハロースホスホリラーゼ（TP）を由来とするキメラ酵素を作製し、酵素の特異性が改変されたキメラ酵素の取得を試みた。KP はコージビオース（α-D-glucopyranosyl-(1→2)-D-glucopyranose）の α-1,2 グルコシド結合を、また TP はトレハロース（α-D-glucopyranosyl- (1 ↔ 1) α-D-glucopyranoside）の α, α-1,1 グルコシド結合をそれぞれ可逆的に加リン酸分解する酵素である。

kojibiose + inorganic phosphate (Pi) ⇄ β-glucose 1-phosphate (β-G1P) + glucose ; KP

trehalose + Pi ⇄ β-G1P + glucose ; TP

両酵素はいずれも加リン酸分解反応によってβ-グルコース-１-リン酸（β-G1P）とグルコースを生成する。機能的観点からみると、KP と TP はいずれもアノマー反転型酵素であり、加リン酸分解反応による生成物も共通している。構造的観点からも、両酵素はともに glycoside hydrolase family 65（GH-65）に属しており（48）（http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/GH.html）、互いに類似した構造を有していると推測される。従って、類縁酵素同士をキメラ化することにより活性型酵素が取得し易いと考えた。その結果、活性型キメラ酵素が 5 種類取得された。それらのうちの 1 種、キメラ酵素 V-III について酵素的性質を詳細に解析した。類縁酵素同士のキメラ化によって基質特異性や反応特異性が大きく変化した改変酵素が取得された。

第２節　実験材料および方法

５－２－１　実験材料

（１）糖質

トレハロース、コージビオースおよび β-G1P は㈱林原生物化学研究所製を用いた（37,8）。その他の試薬は、市販の特級品またはそれに準ずるものを用いた。

（２）宿主大腸菌

遺伝子操作の宿主大腸菌として、*E. coli* JM109（*recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*, *hadR*17 ($r_K^- m_K^+$), *e*14$^-$ (mcrA$^-$), *sup*E44, *rel*A1, Δ(*lac-proAB*)/F'[*traD*36, *proAB*$^+$, *lacI*^{q}, *lacZ*ΔM15]）を、また遺伝子発現の宿主大腸菌として、*E. coli* BL21 [F-, *ompT*, *hsdS*$_B$ (r_B^- m_B^-), *gal, dcm*] を使用した。

（３）プラスミド

遺伝子クローニングおよび発現ベクターには、pET38b(+)（Novagen 社製、Germany）を用いた。また、PCR による遺伝子増幅の鋳型には、プラスミド pKBK14（KP 遺伝子発現ベクター、結果１－３－３）および pKTP1（TP 遺伝子発現ベクター（12））を用いた。

５－２－２　組換え大腸菌の培養

組換え *E. coli* の培養は、液体培養の場合２×YT 培地（1.6%ポリペプトン、1.0%酵母エキス S、0.5% NaCl）を、平板培養の場合、LB 培地（1.0%ポリペプトン、0.5%酵母エキス S、1.0% NaCl、1.5%寒天）を用いた。いずれの場合も、必要に応じてアンピシリンを終濃度 100 μg/mL となるように添加し、30℃または 37℃で培養した。

５－２－３　キメラ酵素遺伝子の作製

まず KP, TP 両酵素遺伝子由来のキメラ酵素遺伝子 6 種類を構築するため、KP, TP 間で完全に保存されている 3 つの領域 IEGD（region 1，KP のアミノ酸残基番号 315－318、TP の同番号 324－327 に対応）、FETARFW（region 2，KP のアミノ酸残基番号 472－478、TP の同番号 469－475 に対応）および VDNNAYT（region 4，KP のアミノ酸残基番号 506－512、TP の同番号 503－509 に対応）において KP, TP 両遺伝子をつなぎ換えることとした（Fig. 5-1）。6 種類のキメラ酵素 I－VI 遺伝子の作製に用いた合成オリゴヌクレオチドプライマーを Table 5-1 に示した。まず、キメラ酵素 I 遺伝子を作製するため、キメラ酵素遺伝子の 5'末端を含む領域を PCR により増幅した。プライマーには Table 5-1 中に示した KPF および P1 を、また鋳型 DNA としてプラスミド pKBK14 を用いた。PCR の反応は 10 ng の鋳型 DNA、100 pmol の各プライマー、0.2 mM dNTP

および 2.5 単位の Takara *Pyrobest* DNA polymerase（宝酒造）を含む 50 μL 容量で行った。PCR 条件として、98℃で 20 秒間、60℃で 30 秒間、72℃で 2 分 30 秒間を 1 サイクルとし、95℃で 1 分間保持して DNA を変性させた後、25 サイクル運転した。次に、同様の方法でキメラ酵素遺伝子の 3'末端を含む領域を増幅した。プライマーには P2 および TPR を、また鋳型としてプラスミド pKTP1 を用いた。増幅した DNA 断片はそれぞれ、MicroSpin S-400HR カラム（Amersham Bioscience 社製）を用いて精製した。最後に、overlap PCR 法によってキメラ酵素 I 遺伝子全長を作製した。プライマーには KPF および TPR を用い、鋳型 DNA として PCR により増幅したキメラ酵素遺伝子の 5'末端および 3'末端を含む領域をそれぞれ使用した。Overlap PCR の反応は鋳型 DNA 量をそれぞれ 100 ng とし、それ以外は通常の PCR 条件で行った。キメラ酵素 II および III 遺伝子の作製についても同様のスキームで行った（Fig. 5-2）。キメラ酵素 IV－VI 遺伝子については、キメラ I－III 遺伝子の場合と同様の実験方法で作製した。すなわち、キメラ酵素 IV 遺伝子の場合、プライマーに TPF および P7 を、鋳型 DNA にプラスミド pKTP1 を用いて 5'末端を含む領域を PCR 増幅した。また、P8 および KPR をプライマーに、プラスミド pKBK14 を鋳型 DNA として 3'末端を含む領域を増幅した。最後に、これら増幅断片およびプライマー TPF, KPR を用いて overlap PCR を行い、完全長のキメラ酵素 IV 遺伝子を作製した。キメラ酵素 V, VI 遺伝子についても同様の操作で作製した（Fig. 5-2）。PCR 増幅して得られた 6 種類のキメラ酵素遺伝子は、制限酵素 *Nde*I および *Spe*I を用いてそれぞれ消化し、プラスミド pET38b(+) の *Nde*I－*Spe*I サイトに挿入した。

５－２－４　キメラ酵素遺伝子ライブラリーの作製

KP および TP 遺伝子上には制限酵素 *Bsp*1407I サイトがそれぞれ 1 箇所ずつ存在する。この制限酵素サイトは、KP の Met-384 と Asn-388（TP の Met-392 と Asn-396）の間に位置している。この制限酵素サイトを用いることによって、構造遺伝子内にフレームシフトを起こすことなく両酵素遺伝子をつなぎ換えることができる。我々はこの制限酵素サイトを用いて、方法５－２－３で作製した 6 種類のキメラ酵素の遺伝子シャッフリングを行い、キメラ酵素遺伝子ライブラリーを作製した。Fig. 5-2 に示したように、このライブラリーは 22 種類のキメラ酵素と野生型 KP, TP を含む、理論上 24 種類の酵素遺伝子からなっていると考えられる。方法５－２－３で構築した各キメラ酵素遺伝子発現ベクターをそれぞれ制限酵素 *Bsp*1407I および *Spe*I で消化した。すべての DNA 断片を混合後、再度連結してキメラ酵素遺伝子ライブラリーを得た（Fig. 5-2）。

５－２－５　遺伝子操作

遺伝子操作は、方法４－２－８に準じて行った。なお、PCR プライマーと配列決定に用いるオリゴヌクレオチドは、合成品（シグマジェノシスジャパン社製）を用いた。

５－２－６　塩基配列の決定

塩基配列の決定は、方法４－２－９に準じて行った。

５－２－７　活性型キメラ酵素のスクリーニング

方法５－２－４で構築したキメラ酵素遺伝子ライブラリーを大腸菌 *E. coli* BL21 に形質転換し、アンピシリンを含む LB 平板培地上に塗布し、30℃で 24 時間静置培養した。それぞれのコロニーを２×YT 培地に接種し、30℃で 5 時間振とう培養した。次に、培養液に終濃度 0.1 mM となるようにイソプロピルチオガラクトシド（IPTG）を添加し、さらに 30℃で 19 時間振とう培養した。得られた菌体培養液に等量のリゾチーム溶菌液（400 μg/mL のリゾチームを含む 50 mM 酢酸緩衝液（pH 5.5））を添加し、37℃で 3 時間振とうしたものを粗酵素液とした。調製した粗酵素液を以下の酵素反応に用いた。すなわち、200 mM β-G1P, 100 mM グルコースおよび粗酵素液を含む 50 mM 酢酸緩衝液（pH 5.5）からなる反応液を 60℃で 24 時間インキュベートした。反応液を TLC 分析に供し、オリゴ糖の生成が認められたクローンを選択した。次に、選択したクローンからプラスミド DNA をそれぞれ精製し、各種制限酵素を用いて消化した。各プラスミドの制限酵素消化物をアガロースゲル電気泳動に供し、野生型 KP および TP 遺伝子発現ベクターとは異なる制限酵素消化パターンを示したクローンを選択した。

５－２－８　キメラ酵素の精製

（１）超音波破砕

キメラ酵素遺伝子組換え大腸菌を方法５－２－２の条件にて培養した。培養液 8 L を遠心分離（10000×g、20 分間、4℃）して得られた培養菌体に 20 mM 酢酸緩衝液（pH 6.0）を添加して菌体を懸濁、洗浄した。再度遠心分離した菌体沈殿物にリゾチーム溶菌液（400 μg/mL のリゾチームを含む 20 mM 酢酸緩衝液（pH 6.0））を添加し、37℃で 2 時間振とうした。これを Ultrasonic Homogenizer UH-600（SMT 社製）を用いて 2 分間超音波破砕した後、50℃で 3 時間熱処理した。遠心分離後、菌体破砕上清を得た。

（２）硫安分画

菌体破砕上清に硫酸アンモニウムを 70%飽和になるように添加し、4℃で 48 時間放置した。生じた塩析物を遠心分離により回収し、200 mL の 20 mM 酢酸緩衝液（pH 6.0）に溶解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約 255 mL を得た。

（３）DEAE Toyopearl 650S カラムクロマトグラフィー

硫安分画により得られた粗酵素液を、20 mM 酢酸緩衝液（pH 6.0）で平衡化した DEAE

Toyopearl 650S カラムクロマトグラフィー（25 mm i.d. × 450 mm）に供した。吸着した目的酵素を NaCl 濃度 0 M から 0.4 M のリニアグラジエントで溶出させた。得られた活性画分を DEAE 回収区とした。

（４）Butyl Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィー

DEAE 回収区に硫酸アンモニウムを終濃度 1.5 M となるように添加し、1.5 M 硫酸アンモニウムを含む 20 mM 酢酸緩衝液（pH 6.0）で平衡化した Butyl Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィー（16 mm i.d. × 490 mm）に供した。吸着した目的酵素を硫酸アンモニウム濃度 1.5 M から 0 M のリニアグラジエントで溶出させた。得られた活性画分を 20 mM 酢酸緩衝液（pH 6.0）に対して透析し、Butyl 回収区とした。

５－２－９　活性測定法

（１）KP の加リン酸分解活性

コージビオースと無機リン酸とを基質として、加リン酸分解により生じたグルコースを定量する方法で KP の加リン酸分解活性を評価した。1%コージビオース、McIlvaine 緩衝液（pH 5.5、無機リン酸として 0.1 M）からなる基質溶液 2 mL に酵素液 0.2 mL を添加して反応を開始した。50℃で 30 分間反応後、酵素反応液を沸騰水浴中で 10 分間加熱して酵素反応を停止させ、遊離したグルコースを GOD 法（30）により定量した。酵素活性 1 単位は、上記反応条件下で 1 分間に 1 μmol のグルコースを遊離する酵素量と定義した。

（２）TP の加リン酸分解活性

トレハロースと無機リン酸とを基質として、加リン酸分解により生じたグルコースを定量する方法で TP の加リン酸分解活性を評価した。1%トレハロース、McIlvaine 緩衝液（pH 7.0、無機リン酸として 0.1 M）からなる基質溶液を用いた。反応条件については KP の加リン酸分解活性測定法に準じて行った。

（３）KP の合成活性

グルコースとβ-G1P とからコージビオースを生成する反応において、遊離する無機リン酸を定量して KP の合成活性を評価した。1%グルコース、1% β-G1P、50 mM 酢酸緩衝液（pH 5.5）からなる基質溶液 2 mL に酵素液 0.2 mL を添加して反応を開始した。50℃で 30 分間反応後、酵素反応液を沸騰水浴中で 10 分間加熱して酵素反応を停止させ、遊離した無機リン酸を Fiske-Subbarow 法（31）により定量した。酵素活性 1 単位は、上記反応条件下で 1 分間に 1 μmol の無機リン酸を遊離する酵素量と定義した。

（４）TP の合成活性

グルコースとβ-G1P とからトレハロースを生成する反応において、遊離する無機リン酸を定量して TP の合成活性を評価した。1%グルコース、1% β-G1P、0.1M Tris-HCl 緩衝液（pH 7.0）からなる基質溶液を用いた。反応条件については KP の合成活性測定法に準じて行った。

５－２－10　速度論的解析

各基質に対する速度パラメータは、1/v–1/[s]プロットにて初期値を求めた後、MacCurveFit（Kevin Raner Software 社製、Australia）を用いて Michaelis-Menten の式にフィッティングさせて算出した。

５－２－11　キメラ酵素の諸性質

（１）タンパク質の定量

タンパク質濃度は、牛血清アルブミンを標準タンパク質として Lowry 法により測定した（59）。

（２）電気泳動法

Native-PAGE は Davis の方法に従い、5－20%濃度勾配既成ポリアクリルアミドゲル（パジェル AE-6000, NPG-520L、アトー㈱製）を用いて行った（60）。電気泳動後、タンパク質は Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。SDS-PAGE は Laemmli の方法に準じて行った（40）。分子量マーカーとして、SDS-PAGE Standards（broad-range size marker, Bio-Rad 社製）を用いた。

（３）分子量測定（GPC）

GPC 分析は、0.2 M NaCl を含む 20 mM 酢酸緩衝液（pH 6.0）で平衡化した Superose 6 HR 10/30 カラムクロマトグラフィー（10 mm i.d. × 300 mm）を用いて行った。分子量マーカーとして、gel-filtration standard（Bio-Rad 社製）を用いた。

５－２－12　糖質の分析

（１）薄層クロマトグラフィー（TLC）

TLC は、方法４－２－13（１）に準じて行った。

（２）高速液体クロマトグラフィー（HPLC）

糖質試料の HPLC 分析には、「LC-10A 型高速液体クロマトグラフ」（島津製作所㈱製）を使用し、ポンプに LC-10AD 型、検出器に RID-10A 型示差屈折計（いずれも島津製作所㈱製）を用いた。カラムに ODS-AQ AQ-303（4.6 mm i.d. × 250 mm, ㈱YMC 製）を用いた場合は、カ

ラム温度 40℃、流速 0.5 mL/min の条件で分析した。カラムに MCI GEL CK04SS（10 mm i.d. × 200 mm ×２本, 三菱化学㈱製）を用いた場合は、カラム温度 80℃、流速 0.4 mL/min の条件で分析した。溶媒はいずれも水を使用した。

（３）ガスクロマトグラフィー（GLC）

糖質試料を 40℃で一晩真空乾燥後、ピリジンに溶解し、トリメチルシリル化（TMS 化）したものを GLC 分析に供した。TMS 化は、ビス（トリメチルシリル）アセトアミド、トリメチルシリルイミダゾール、トリメチルクロロシランを含む TMS 化剤を添加し、60℃で 30 分間加温して行った。GLC 分析には「GC-16 型ガスクロマトグラフ」（島津製作所㈱製）を使用し、カラムにはクロモゾルブ W に 2%シリコン OV-17 をコートした担体（60－80 mesh, GL サイエンス㈱製）を充填したステンレスカラム（3 mm i.d. × 2 m）を、検出には水素炎イオン化検出器（flame ionization detector, FID）を用いた。カラム温度 160℃で２分間保持した後、昇温速度 7.5℃/min で 320℃までの昇温法で分析した。

５－２－13　転移三糖の単離

58 mM ラミナリビオース、キメラ酵素 V-III（8.21×10^{-1} U/mmol-ラミナリビオース）および 10 mM $CaCl_2$ を含む 32.5 mL の酵素反応液を 35℃、pH 5.5 で 96 時間保持した。反応液は「ultrafilter unit, USY-1」（アドバンテック㈱製）によりタンパク質を濾過して除去した後、三菱化学㈱製イオン交換樹脂「Diaion SK-1B」と「Diaion WA30」およびオルガノ㈱製アニオン交換樹脂「IRA411S」を用いて脱塩した。得られた糖溶液は HPLC にて分析し、三糖画分のみを回収した。HPLC 分析には MCI GEL CK04SS（10 mm i.d. × 200 mm ×２本）を用いた。続いて、三糖画分をエバポレーターで濃縮後、HPLC 分析に供し、それぞれの三糖成分を分離回収した。この操作にはカラムに ODS-AQ AQ-303（4.6 mm i.d. × 250 mm）を用いて行った。

５－２－14　転移三糖の構造解析

（１）質量分析（Mass spectrometry）

質量分析は「LCQ advantage ion-trap mass analyzer」（サーモエレクトロン㈱製）を使用し、大気圧下化学的イオン化法（APCI）にて行った。0.1%酢酸を含む 50%メタノールに試料を約 10 ppm となるように溶解し、インフュージョン法にて導入した。検出はポジティブモードとし、m/z 150－2,000 の範囲で測定した。

（２）メチル化分析

試料 2.0 mg を Ciucanu&Kerek の方法によりメチル化した後、90%酢酸を含む 25 mM 硫酸を添加し、80℃で６時間加熱して加水分解した。加水分解物は水素化ホウ素ナトリウムで還元した後、無水酢酸を加え、100℃で４時間加熱してアセチル化した。得られた部分メチル化アルジトールアセテートは GLC にて分析した。GLC 分析には「GC-14B 型ガスクロマトグラフ」（島津製作所㈱製）を使用し、DB-5 キャピラリーカラム（0.25 mm i.d. × 25 m, J&W Folsom 社製）にて行った。カラム温度 130℃で２分間保持した後、昇温速度 5℃/min で 250℃までの昇温法で分析した。

（３）核磁気共鳴分析（NMR spectroscopy）

NMR 分析は「JNM-AL300 型核磁気共鳴装置」（JEOL 社製；300.4 MHz for ^{1}H, 75.45 MHz for ^{13}C）を用いて行った。内部標準として 3-(trimethylsilyl)-1-propane-sulfonic acid sodium salt（TPS, $C_6H_{15}NaO3SSi$, メルク社製)を、溶媒として重水を用いて測定した。

（４） β-グルコシダーゼによる消化性試験

アーモンド由来 β-グルコシダーゼは、非還元末端グルコースの β-グルコシド結合を加水分解するエキソ型酵素で、β-1,6 グルコシド結合よりも β-1,3 グルコシド結合に作用しやすい特異性を有する。1%の糖質試料溶液 100 μL に 0.1 U/mL の本 β-グルコシダーゼ溶液（Bioenzyme Laboratories 製、UK）100 μL を添加し、40℃、pH 4.5 で 24 時間反応させた。この反応液を GLC にて分析した。GLC 分析は方法５－２－13（３）に準じて行った。

第３節　結果

５－３－１　キメラ酵素の設計

Fig. 5-1 に KP と TP のアミノ酸配列のアライメントを示した。両酵素間には約 35%の相同性が認められ、4 アミノ酸以上が連続して完全に保存されている領域が 11 箇所存在していた。それらのうち、4 つの領域（region 1, 2, 3 および 4）は KP の活性部位周辺に位置しており、これら 4 領域を KP, TP 遺伝子のシャッフリング部位とした。まず、region 1, 2, 4 で KP, TP 両遺伝子を組換えて、前半が KP、後半が TP 遺伝子からなるキメラ酵素 I, II および III 遺伝子を作製した。次に、前半が TP、後半が KP 遺伝子からなるキメラ酵素 IV, V および VI 遺伝子を同様に作製した（Fig. 5-2）。最後に、region 3 中に存在する制限酵素 *Bsp*1407I を用いてキメラ酵素 I－VI 遺伝子を組換え、Fig. 5-2 に示したように、野生型酵素を含む合計 24 種類の酵素遺伝子からなるライブラリーを構築した。

５－３－２　活性型キメラ酵素のスクリーニング

キメラ酵素遺伝子ライブラリーにより形質転換させた大腸菌約 480 株についてスクリーニングした結果、5 種類の活性型キメラ酵素、II, III, I-III, V-III および IV-I が得られた（Fig. 5-2）。それらのうち、4 種類のキメラ酵素 II, III, I-III および V-III は KP 活性を、残りのキメラ酵素 IV-I は TP 活性を有していた。これらキメラ酵素における諸活性を Table 5-2 にまとめた。KP 活性を有するキメラの酵素活性は、いずれも野生型よりも大幅に低下していた。特に、キメラ酵素 I-III, V-III は、加リン酸分解活性の低下が顕著で、その結果、加リン酸分解活性に対する合成活性の比率（[合成活性／加リン酸分解活性]）が野生型 KP と比較して 5－10 倍に増加していた。一方、TP 活性を有するキメラ IV-I は、野生型 TP と比較して合成活性が低下しており、そのため、[合成活性／加リン酸分解活性]が野生型 TP の約 2 分の 1 に減少していた。

興味深いことに、キメラ酵素 V-III は region 2－4 のみが KP 由来で、タンパクを構成するアミノ酸配列の約 84%が TP に由来しているにもかかわらず、酵素活性が TP 型ではなく KP 型であった。そこで、キメラ酵素 V-III の諸性質についてさらに詳細に調査した。

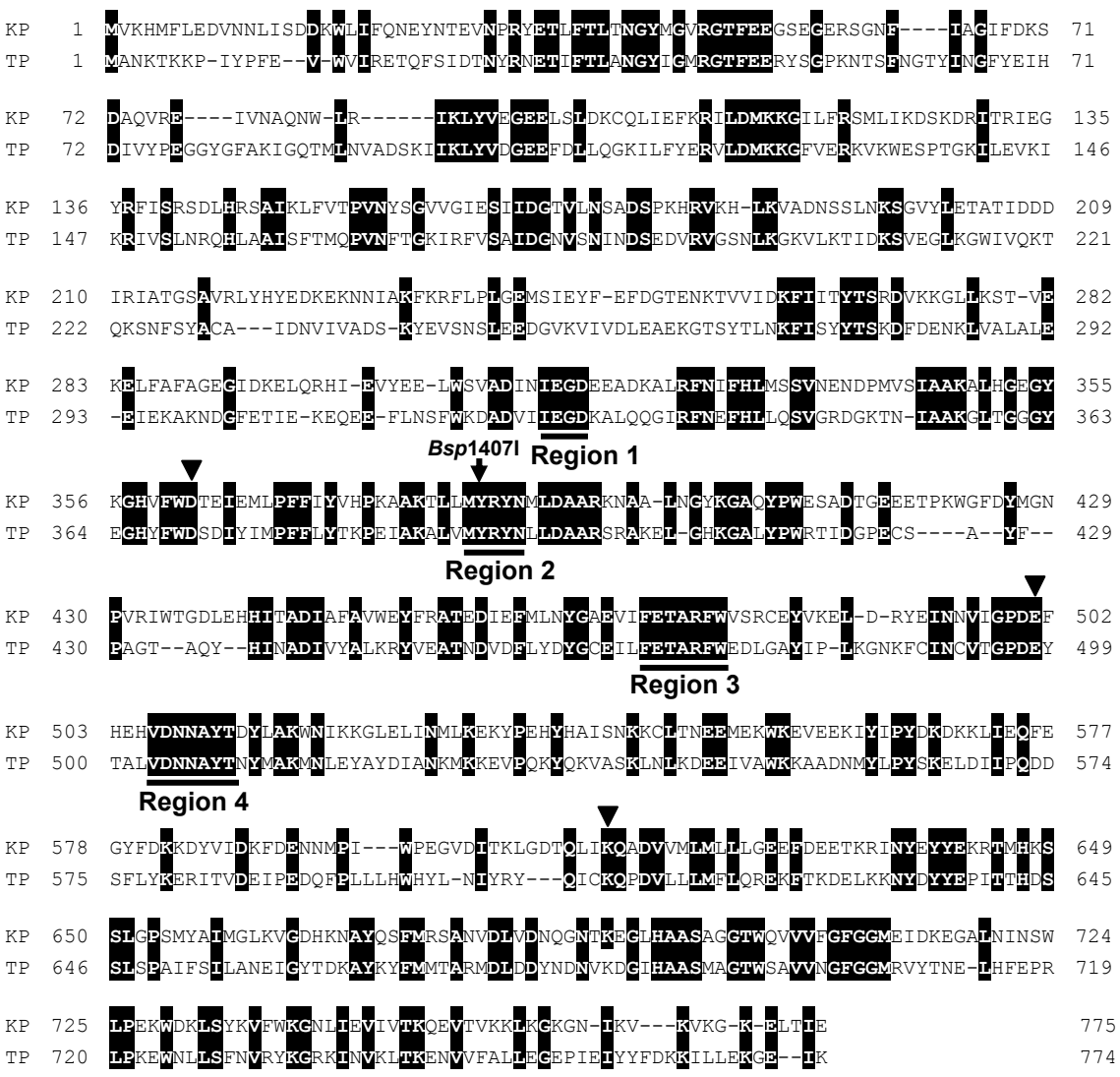


Fig. 5-1. Alignment of amino acid sequences between kojibiose phosphorylase (KP) and trehalose phosphorylase (TP) from *T. brockii*.

Residues in black boxes are conserved. The arrow indicates the restriction site of *Bsp*1407I. Regions 1 to 4 (underlined sequences) indicate the sites of recombination. Closed triangles indicate the putative catalytic residues of KP and TP based on the tertiary structure of maltose phosphorylase (MP) from *Lactobacillus brevis* (32).

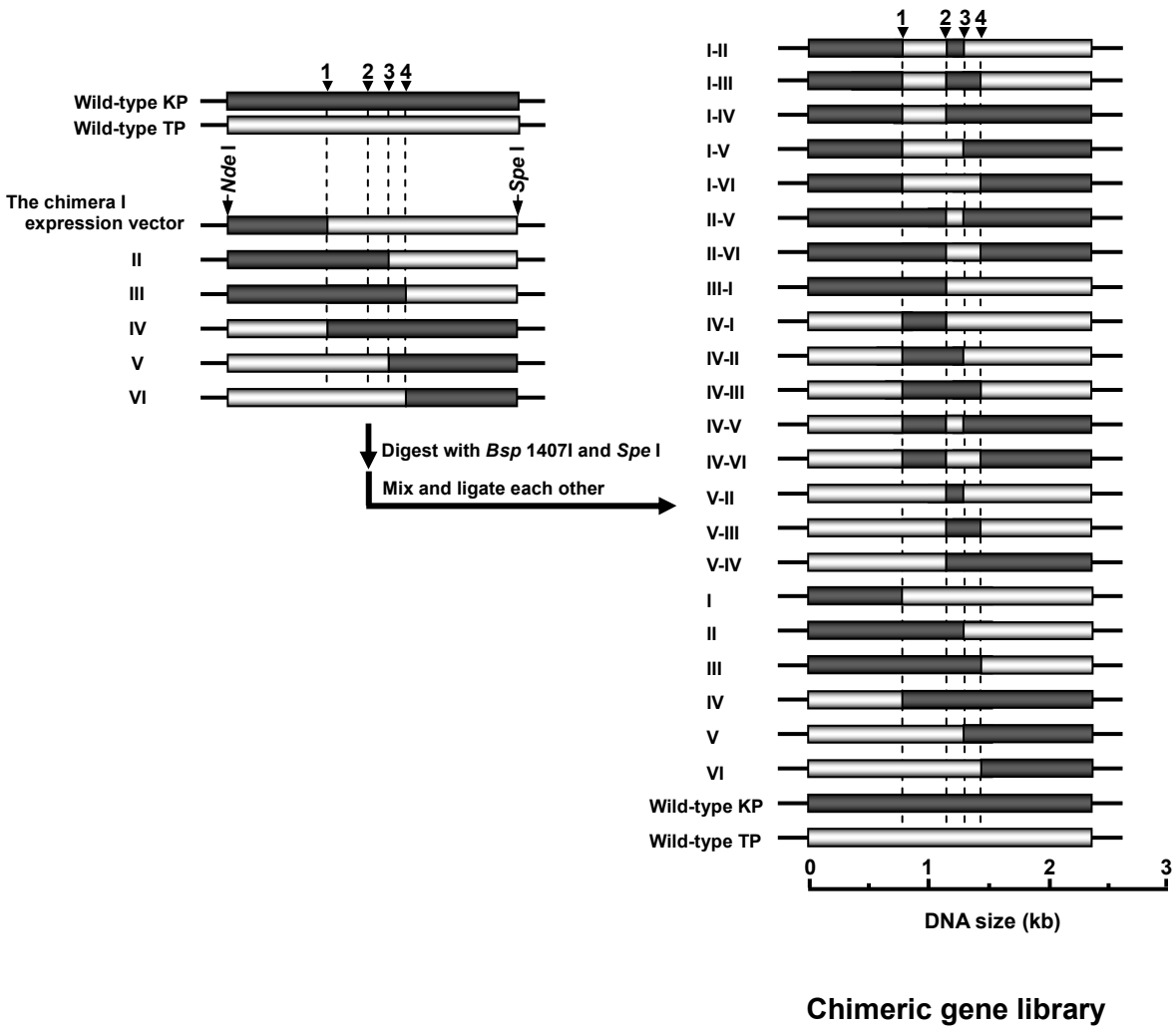


Fig. 5-2. Construction schemes of the chimeric gene library.

The methods of construction are described in Section 5-2-3 and 5-2-4. Black and shaded bars indicate KP and TP genes, respectively. Closed triangles indicate the regions of recombination between KP and TP genes (see Fig. 5-1). There is a unique restriction site of *Bsp*1407I in region 2.

Table 5-1. Oligonucleotide primers used for the constructions of the six chimeric enzyme genes from the KP and TP genes

Primer	Nucleotide sequence (Amino acid sequence)	Sequence of the recombination	Constructed chimeras
P1	5′-**GCAGAGCTTT**ATCCCCTTCAATATTTATATC-3′ L A K D G E I N I D	IEGD (region 1: position 315-318 of KP)	Chimera I
P2	5′-TGAAGGGGAT**AAAGCTCTGCAGCAAGGCATAC**-3′ E G D K A L Q Q G I	IEGD (region 1: position 315-318 of KP)	Chimera I
P3	5′-**CCCAAAATCT**TGCAGTCTCAAAAATGACTTC-3′ W F R A T E F I V E	FETARFW (region 3: position 472-478 of KP)	Chimera II
P4	5′-TGAGACTGCA**AGATTTTGGGAAGATTTAGGAG**-3′ E T A R F W E D L G	FETARFW (region 3: position 472-478 of KP)	Chimera II
P5	5′-**TGGTATAAGC**ATTATTATCAACATGCTCATG-3′ T Y A N N D V H E H	VDNNAYT (region 4: position 506-512 of KP)	Chimera III
P6	5′-TGATAATAAT**GCTTATACCAATTATATGGCG**-3′ D N N A Y T N Y M A	VDNNAYT (region 4: position 506-512 of KP)	Chimera III
P7	5′-CGTCTTCTTC**ATCTCCTTCTATGATTACATC**-3′ A E E D G E I I V D	IEGD (region 1: position 324-327 of TP)	Chimera IV
P8	5′-**AGAAGGAGAT**GAAGAAGCAGATAAAGCTTTG-3′ E G D E E A D K A L	IEGD (region 1: position 324-327 of TP)	Chimera IV
P9	5′-CCCAAAACCT**TGCAGTTTCAAATAATATTTC**-3′ W F R A T E F L I E	FETARFW (region 3: position 469-475 of TP)	Chimera V
P10	5′-**TGAAACTGCA**AGGTTTTGGGTATCTAGATG-3′ E T A R F W V S R	FETARFW (region 3: position 469-475 of TP)	Chimera V
P11	5′-CAGTATAAGC**GTTATTGTCAACTAATGCCG**-3′ T Y A N N D V L A	VDNNAYT (region 4: position 503-509 of TP)	Chimera VI
P12	5′-**TGACAATAAC**GCTTATACTGATTACCTTGC-3′ D N N A Y T D Y L	VDNNAYT (region 4: position 503-509 of TP)	Chimera VI
KPF	5′-GATATA*CATATG*GTAAAGCACATGTTTTTAGAG-3′	5’ of the coding region of the KP gene	
TPF	5′-GATATA*CATATG*GCCAACAAAACGAAGAAACC-3′	5’ of the coding region of the TP gene	
KPR	5′-CTGCAG*ACTAGT*TCATTATTCTATTGTCAGCTC-3′	3’ of the coding region of the KP gene	
TPR	5′-CTGCAG*ACTAGT*TCATTACTTTATTTCTCC-3′	3’ of the coding region of the TP gene	

The sequences of single underline and bold letters indicate the sequences from the KP and TP gene, respectively. Overlapped sequences with the KP and TP genes are shaded. *Nde* I site in the KPF and TPF primers, and *Spe*I site in the KPR and TPR primers are indicated by italic letters, respectively.

Table 5-2. Enzymatic activities of the active chimeras from KP and TP

Chimera	Type of activity	Activity (U/mL)		Synthesis/ Phosphorolysis
		Synthesis	Phosphorolysis	
II	KP	1.6×10^{-2}	N. D.	-
III	KP	3.8	6.4×10^{-1}	5.9
I-III	KP	1.6×10^{-1}	5.4×10^{-3}	2.9×10^{1}
V-III	KP	1.1×10^{-1}	2.0×10^{-3}	5.5×10^{1}
Wild-type KP	KP	2.6×10^{2}	4.8×10^{1}	5.5
IV-I	TP	9.6	1.1×10^{1}	9.1×10^{-1}
Wild-type TP	TP	9.4×10^{1}	4.1×10^{1}	2.3

Synthetic activities were performed by using 1% β-G1P and 1% D-glucose as substrates, so that the amount of Pi released was measured by the method of Fiske-Subbarow (31). Phosphorolytic activities of chimera II, III, I-III, V-III and the wild-type KP were assayed by using 1% kojibiose as a substrate. The substrate for phosphorolytic activities of chimera IV-I and the wild-type TP were trehalose. The glucose released by phosphorolysis was measured by the glucose oxidase-peroxidase method (30). N. D., not determined.

５－３－３　キメラ酵素 V-III の諸性質

（１）酵素学的性質

各種カラムクロマトグラフィーにより、キメラ酵素 V-III を Native-PAGE で単一にまで精製し、最終的に精製キメラ酵素 V－III を 75.3 mg（合成活性として 283 U）得た。本キメラ酵素の比活性は 3.76 U/mg であり、野生型 KP での値（389 U/mg）の約 1%であった。

キメラ酵素 V-III の加リン酸分解活性および合成活性の最適 pH はいずれも 5.5 であり、4℃、24 時間の保持条件下において pH 4.6－9.5 の範囲で安定であった。最適温度は 35℃（両活性ともに）であり、pH 5.5、各温度 1 時間の保持条件下において 50℃まで安定であった（Fig. 5-3）。これら酵素的性質を野生型酵素とともに Table 5-3 にまとめた。

（２）物理化学的性質

SDS-PAGE と GPC 分析の結果より、キメラ酵素 V-III の分子量はそれぞれ 90 kDa、76 kDa と概算された（Table 5-3）。これらの値は、キメラ酵素のアミノ酸配列から計算される分子量 91 kDa とほぼ一致した。野生型 KP は 6 量体、野生型 TP は 2 量体構造であるのに対して、キメラ酵素 V-III は、水溶液中では単量体構造をとることが示唆された。

（３）速度論的解析

各基質に対する速度パラメータを測定した。結果を Table 5-4 にまとめた。キメラ酵素 V-III の各基質に対する K_m 値は、野生型 KP と比較してすべて増加していた。特に、コージビオースに対する K_m 値は、v–[s]プロットより 280 mM 以上と算出された。これは野生型 KP での値の 400 倍以上であった。同様に、v–[s]プロットによりコージビオースに対する k_{cat}/K_m 値は 0.0025 $mM^{-1}s^{-1}$ と算出された。これは、野生型 KP と比較して 10 の 5 乗小さい値であった。それに対して、β-G1P とグルコースに対する k_{cat}/K_m 値は、それぞれ 10 の 2－3 乗低くなっていた。なお、コージビオースについての k_{cat} 値は、K_m 値が測定不能であったため決定できなかった。また、コージビオースを大過剰の条件にできなかったため、無機リン酸に対する k_{cat} および k_{cat}/K_m も決定できなかった。

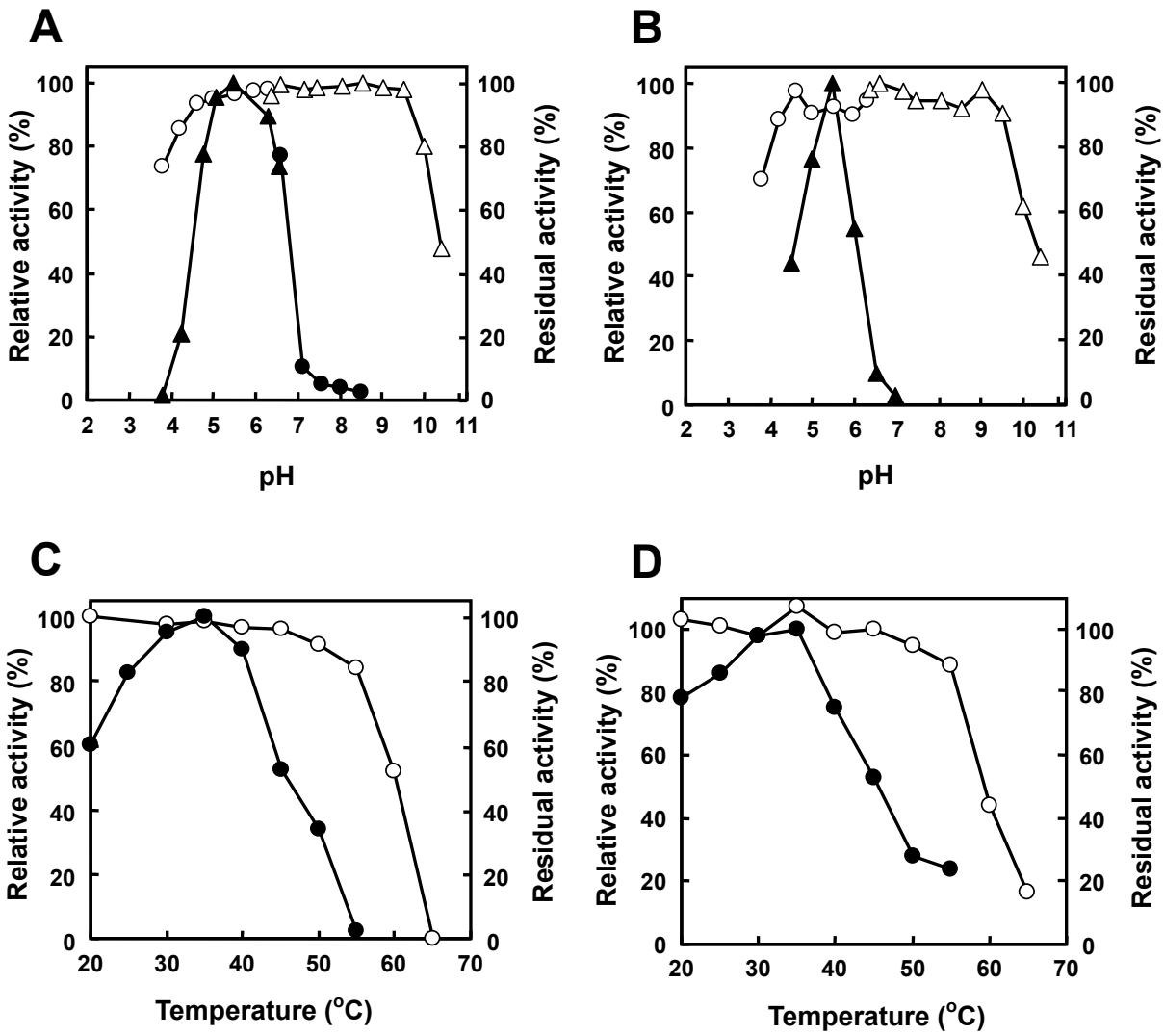


Fig. 5-3. Effects of pH and temperature on activity and stability of chimera V-III enzyme.

The enzyme activities were assayed at various pH and temperatures. (A) Effects of pH on phosphorolytic activity. For the pH test, acetate buffer (pH 4.5-7.0) and phosphate buffer (pH 7.0-8.5), or acetate buffer (pH 3.5-6.5) and glycine-NaOH buffer (pH 6.0-10.5) were used. (B) Effects of pH on synthetic activity. For the pH test, acetate buffer (pH 4.5-7.0), or acetate buffer (pH 3.5-6.5) and glycine-NaOH buffer (pH 6.0-10.5) were used. Closed triangles and circles indicate oputimum pH. Open circles and triangles indicate pH stability. (C) Effects of temperature on phosphorolytic activity. (D) Effects of pH on synthetic activity. Closed and open circles indicate oputimum temperature and thermal stability, respectively.

Table 5-3. Enzymatic properties of chimera V-III, the wild-type KP and TP

		Chimera V-III	Wild-type KP [a]	Wild-type TP [b]
Optimum pH	Synthesis	5.5	-	6.0-7.0
	Phosphorolysis	5.5	5.5	7.0-7.5
Optimum temperature (°C)	Synthesis	35	-	-
	Phosphorolysis	35	65	70
pH stability	Synthesis	4.6-9.5	-	-
	Phosphorolysis	4.6-9.5	5.5-9.7	6.0-9.0
Thermal stability (°C)	Synthesis	50	-	-
	Phosphorolysis	50	65	60
Molecular mass (Da)	SDS-PAGE	90,000	83,000	88,000
	GPC	76,000	500,000	190,000

[a, b] Data taken from Chaen, H. *et al* (5,11).

Table 5-4. The kinetic parameters of chimera V-III and the wild-type KP

		Substrate			
		β-G1P	glucose	kojibiose	Pi
k_{cat} (s^{-1})	V-III	28	13	N. D.	N. D.
	KP	650	650	170	170
K_m (mM)	V-III	9.3	120	>280	58
	KP	0.77	3.5	0.77	0.85
$k$cat/K_m ($mM^{-1}s^{-1}$)	V-III	3.0	0.11	0.0025	N. D.
	KP	840	180	220	200

N. D., not determined.

（4）受容体特異性

キメラ酵素 V-III の合成反応における受容体特異性を調査した（Table 5-5）。二糖類に対する受容体特異性において、キメラ酵素と野生型 KP 間において類似した傾向が認められた。キメラ酵素 V-III は KP 活性を示すことから、これは合理的な結果であると考えられた。一方、野生型 KP および TP は種々の単糖類を受容体とするのに対して、本キメラはグルコース以外の単糖類を受容体としなかった。

Table 5-5. Acceptor specificities of chimera V-III, the wild-type KP and TP

Acceptor	Product		
	ChimeraV-III	KP	TP[a]
D-Glucose	+++	+++	+++
D-Arabinose	-	+	-
D-Fructose	-	-	-
D-Galactose	-	+	++
D-Mannose	-	-	+
L-Rhamnose	-	-	N. D.
L-Xylose	-	+	-
D-Glucosamine	-	-	++
N-Acetyl-D-glucosamine	-	-	+
2-Deoxy-D-glucose	-	-	++
Sorbitol	-	-	-
Mannitol	-	-	N. D.
Trehalose	+++	+++	-
Maltose	+++	+++	-
Isomaltose	+++	+++	-
Cellobiose	-	++	-
Sucrose	++	++	-
Melibiose	-	-	N. D.
Lactose	-	-	-
Lactulose	-	-	N. D.

The reaction mixture (0.5 mL) containing 5.2% β-G1P, 2% acceptor and the enzyme (3.85 U/g β-G1P) in 50 mM acetate buffer, pH 5.5 was incubated at 35°C (chimera V-III) or 60°C (the wild-type KP) for 72 h. The reaction products were analyzed by TLC and GLC under the condition described in Section 5-2-12 (1) and 5-2-12 (3). The transfer ratio to acceptor was detected by GLC. +++, transfer ratio is more than 40%; ++, 40 to 20%; +, 20 to 0%; -, no detected transfer product to acceptor.

[a] Data taken from Chaen, H. *et al* (11).

N. D., not done.

（5）基質特異性

キメラ酵素 V-III の加リン酸分解反応における基質特異性を調査した（Table 5-6）。野生型 KP が無機リン酸存在下において、コージビオースのみを厳密に加リン酸分解するのに対して、本キメラはコージビオース以外にもニゲロース（α-D-glucopyranosyl-(1→3)-D-glucopyranose）、ソホロース（β-D-glucopyranosyl-(1→2)-D-glucopyranose）およびラミナリビオース（β-D-glucopyranosyl-(1→3)-D-glucopyranose）に作用し、生成物を生じた。各基質に対する相対活性は、それぞれ 100%（コージビオース）、0.039%（ニゲロース）、0.21%（ソホロース）および 0.35%（ラミナリビオース）であった。さらに、キメラ酵素 V-III は無機リン酸非存在下においてもソホロースとラミナリビオースに作用し、三、四、五糖を生成した（Fig. 5-4）。

キメラ化により、キメラ酵素 V-III の基質特異性は大きく変化した。そこで、生成物の構造を明らかにすることによって、本キメラ酵素の反応メカニズムを解明できると考え、ラミナリビオースを基質とした場合に生成する未知三糖の単離および構造解析を行った。

Table 5-6. Substrate specificities of chimera V-III and the wild-type KP for phosphorolysis

Substrate		The presence of Pi		The absence of Pi	
		Chimera V-III	Wild-type KP	Chimera V-III	Wild-type KP
Trehalose	(α, α-1, 1)	-	-	-	-
Neotrehalose	(α, β-1, 1)	-	-	-	-
Kojibiose	(α-1, 2)	+ (100)	+	-	-
Sophorose	(β-1, 2)	+ (0.21)	-	+ (0.097)	-
Nigerose	(α-1, 3)	+ (0.039)	-	-	-
Laminaribiose	(β-1, 3)	+ (0.35)	-	+ (0.26)	-
Maltose	(α-1, 4)	-	-	-	-
Cellobiose	(β-1, 4)	-	-	-	-
Isomaltose	(α-1, 6)	-	-	-	-
Gentiobiose	(β-1, 6)	-	-	-	-

The reaction mixture (0.5 mL) containing 2% substrate and the enzyme (5.0 U/g substrate) in 50 mM acetate buffer, pH 5.5 with or without 50 mM Pi was incubated at 35°C (chimera V-III) or 60°C (the wild-type KP) for 72 h. The transfer products were analyzed by TLC and GLC under the condition described in the Section 5-2-12 (1) and 5-2-12 (3). The transfer ratio was detected by GLC. +, detected transfer products; -, no detected transfer product. Values are shown as a percentage of the phosphorolytic activity using kojibiose and Pi as substrates, taken as 100%.

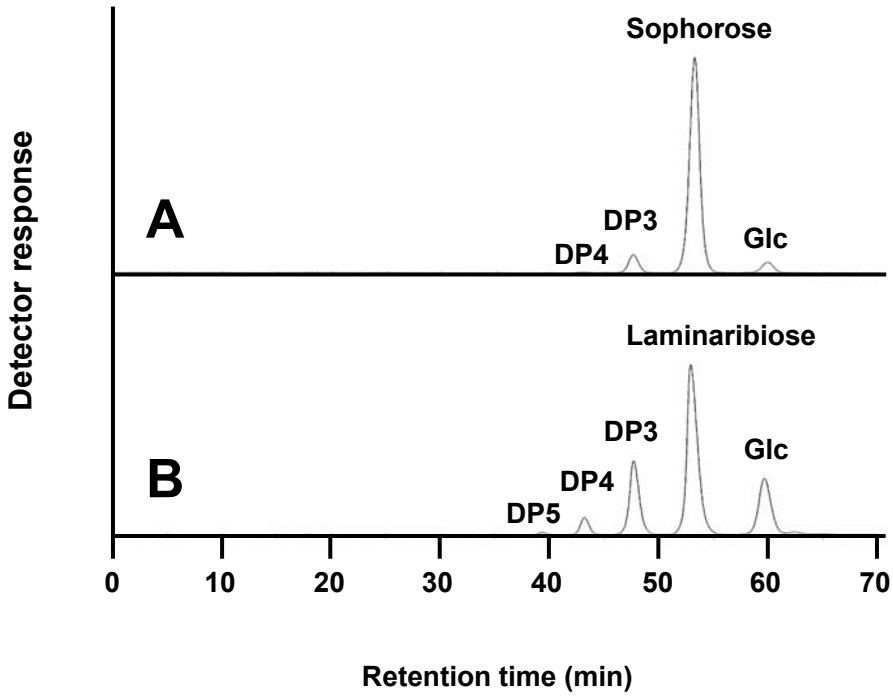


Fig. 5-4. HPLC profiles of reaction products on a mixture of sophorose (A) or laminaribiose (B) using an MCI GEL CK04SS column.

Transfer products were indicated as DP3, DP4 and DP5 (degree of polymerization = DP).

５－３－４　キメラ酵素 V-III のラミナリビオースに対する作用

（１）転移三糖の単離

無機リン酸非存在下でラミナリビオース 650 mg にキメラ酵素 V-III を作用させた後、反応液を MCI GEL CK04SS カラムを用いた分取 HPLC に供して 70 mg の三糖画分を得た。これを NMR 分析に供したところ、本三糖画分は 2 種類以上の糖質からなることが示唆された（data not shown）。次に、この三糖画分を ODS-AQ AQ-303 カラムに供したところ、Fig. 5-5A に示したように 3 つのピーク、P-1（溶出時間 T_R=18.5 min）、P-2（T_R=19.5 min）および P-3（T_R=22.5 min）が検出された。それぞれのピーク画分を同カラムによる分取 HPLC にて回収した結果、P-1 画分が 7.4 mg, P-2 画分が 40 mg, P-3 画分が 9.5 mg 得られた。回収した 3 つのピーク画分を ODS カラムの HPLC 分析に供したところ、P-1 画分から 2 つのピーク（T_R=18.5 min と 19.5 min）、P-2 画分から 3 つのピーク（T_R=18.5 min, 19.5 min および 22.5 min）、P-3 画分から 2 つのピーク（T_R=19.5 min と 22.5 min）がそれぞれ検出された。それぞれの HPLC クロマトグラムを Fig. 5-5B-D に示した。以上の結果より、キメラ酵素 V-III の作用により生成した三糖は 2 種類の糖質からなると結論づけ、それぞれを糖質 A（P-1 画分）と糖質 B（P-3 画分）とした。なお、P-2 画分は糖質 A, B の混合物であると考えられた。HPLC 分析の結果、糖質 A, B の純度はそれぞれ 91.2%, 92.5%であった。

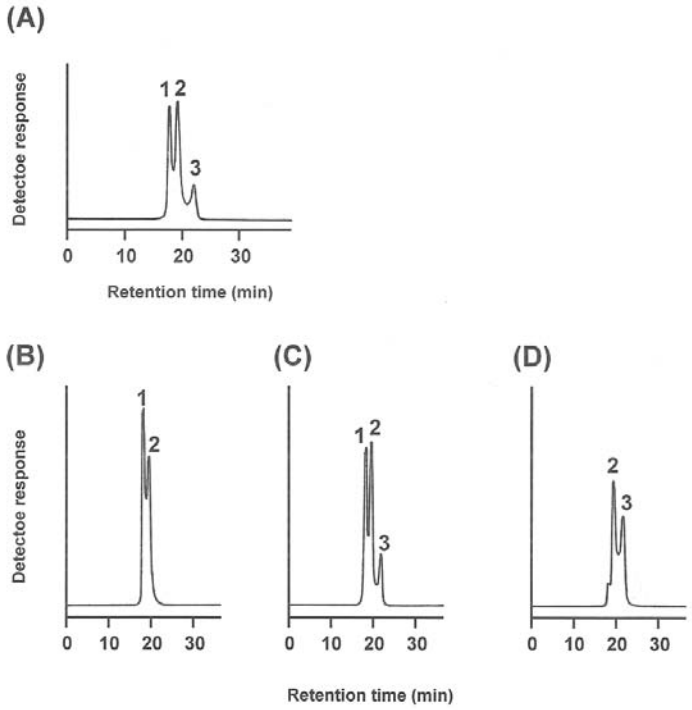


Fig. 5-5.　HPLC profiles of trisaccharides from laminaribiose using an ODA-AQ AQ-303 column.

(A), DP3 fraction separated by an MCI GEL CK04SS column. 1, peak 1 (P-1); 2, peak 2 (P-2); 3, peak 3 (P-3). (B), component of P-1; (C), component of P-2; (D), component of P-3.

（２）糖質 A の構造解析

糖質 A の APCI-MS 分析では、ナトリウム付加イオン$[M+Na]^+$ m/z 527 が検出されたことから、糖質 A の分子量を 504（=527-23）と決定した。この値は、グルコースからなる直鎖の三糖の分子量と一致した。

糖質 A を構成する D-グルコースの結合様式を調べるためメチル化分析を行ったところ、Table 5-7 に示したように、2, 3, 4, 6-テトラメチル化物、2, 4, 6-トリメチル化物および 2, 3, 4-トリメチル化物がほぼ１：１：１のモル比で検出された。従って、糖質 A は非還元末端グルコース残基を 1 分子、3 位が結合に関与したグルコース残基を 1 分子、さらに 6 位が結合に関与したグルコース残基を 1 分子有することが明らかとなった。

糖質 A の構造を決定するため、NMR 分析を行った。^{1}H NMR スペクトルより、アノメリックプロトンが 3 分子検出され、結合に関与するアノメリックプロトンの結合定数はすべてβ結合［$J_{1,2}$ 7.7-7.9 Hz］を示した。^{13}C NMR スペクトルより、炭素 18 個分のシグナルが検出され（Fig. 5-6）、分子量、メチル化分析の結果を支持した。これらの結果より、糖質 A はβ-1,3 グルコシド結合とβ-1,6 グルコシド結合を 1 つずつ有する三糖であることがわかった。

次に、糖質 A 中の非還元末端グルコースの結合様式を明らかにするため、アーモンド由来 β-グルコシダーゼによる消化性試験を行った。方法５－２－14（４）の条件下で、糖質 A に β-グルコシダーゼを作用させたところ、糖質 A はほとんど加水分解されなかった（data not shown）。従って、糖質 A の非還元末端グルコースの結合様式は、β-1,6 グルコシド結合であることが明らかとなった。

以上の結果から、糖質 A の構造をβ-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)- D-glucopyranose（β-D-glucosyl-(1→6)-laminaribiose）と決定した（Fig. 5-7）。

Table 5-7. Methylation analyses of saccharide A and B

Saccharide	2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-Glc	2, 4,6-Tri-*O*-methyl-Glc	2,3,4-Tri-*O*-methyl-Glc
A	0.89	1.00	0.98
B	0.89	2.00	-

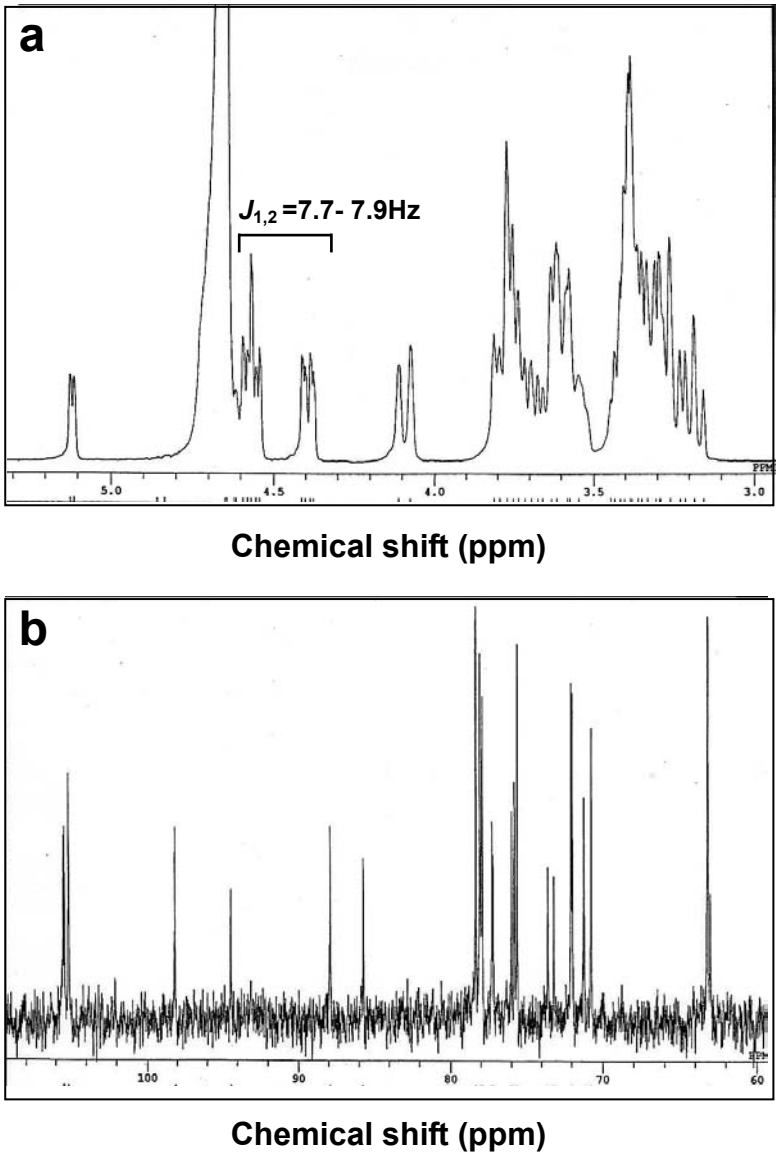


Fig. 5-6. ^{1}H NMR (a) and ^{13}C NMR (b) spectra of saccharide A

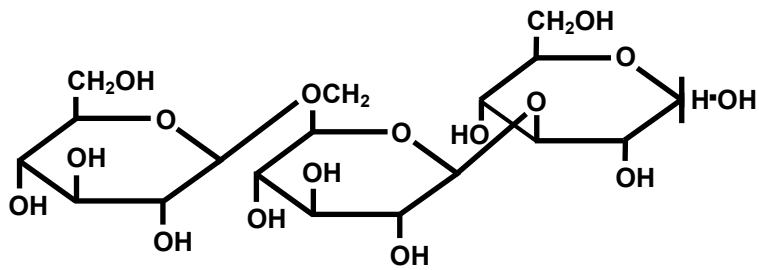


Fig. 5-7. Structure of saccharide A

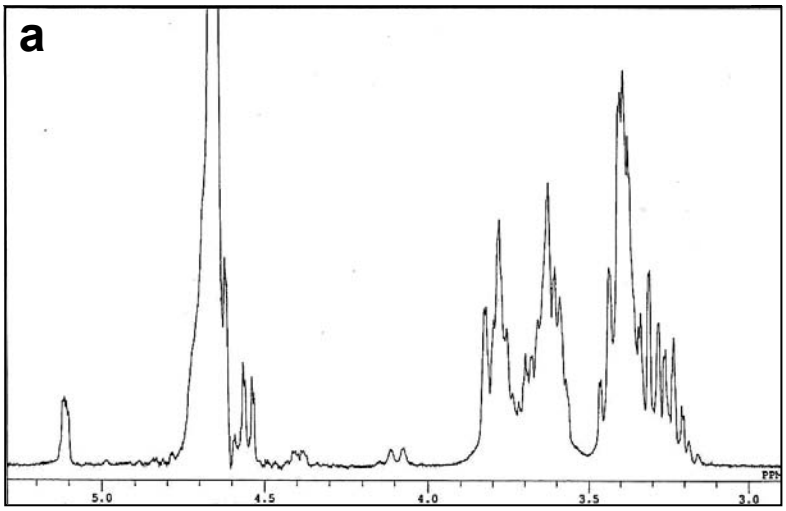
（３）糖質 B の構造解析

糖質 B の APCI-MS 分析では、ナトリウム付加イオン$[M+Na]^+$ m/z 527 が検出されたことから、糖質 B の分子量を 504（=527-23）と決定した。この値は糖質 A 同様、グルコースからなる直鎖の三糖の分子量と一致した。

糖質 B を構成する D-グルコースの結合様式を調べるためメチル化分析を行ったところ、Table 3-7 に示したように、2, 3, 4, 6-テトラメチル化物と 2, 4, 6-トリメチル化物がほぼ１：２のモル比で検出された。従って、糖質 B は非還元末端グルコース残基を 1 分子、3 位が結合に関与したグルコース残基を 2 分子有することが明らかとなった。

さらに糖質 B の構造を決定するため、NMR 分析を行ったところ、^{1}H NMR スペクトルがラミナリトリオースのそれと完全に一致した（Fig. 5-8）。

以上の結果から、糖質 B の構造をβ-D-glucopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-D-glucopyranose（laminaritriose）と決定した（Fig. 5-9）。



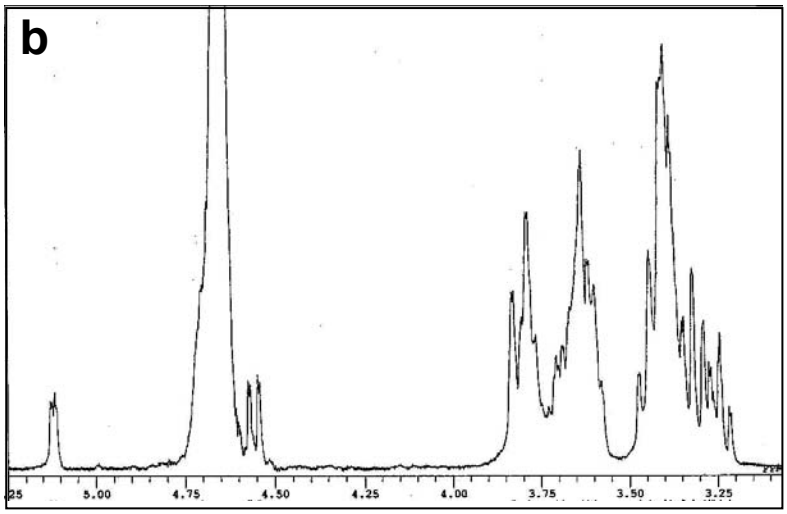


Fig. 5-8. ^{1}H NMR spectra of saccharide B (a) and laminaritriose (b)

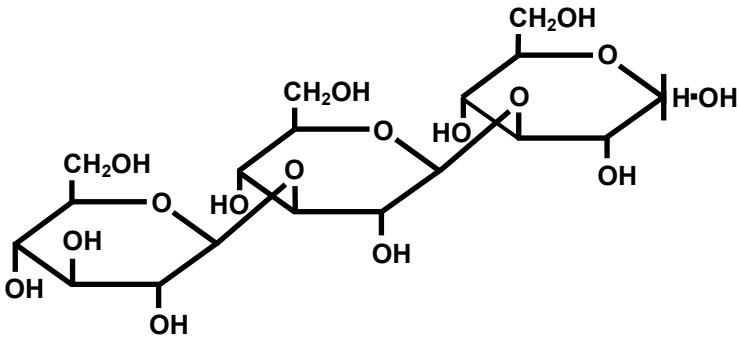


Fig. 5-9. Structure of saccharide B

第４節　考察

本章において、*Thermoanaerobacter brockii* 由来 KP, TP からなるキメラタンパクを作製し、5 種類の活性型キメラ酵素、II, III, I-III, V-III および IV-I を取得した。4 種類のキメラ酵素、II, III, I-III および V-III は KP 活性を有していた。特に、キメラ酵素 V-III は全 785 アミノ酸残基中 125 残基（Fig. 5-1 の region 2－4 に対応）のみが野生型 KP、残り 660 アミノ酸残基が TP に由来しているにもかかわらず、本キメラは TP ではなく KP 活性を有していた。キメラ酵素 V-III は、TP とのアミノ酸配列の相同性が 91%であることから、構造的には TP の変異酵素であると考えられたが、本キメラは KP 活性を示すことから、機能的には KP の変異酵素と考えられた。KP と TP はいずれも、β-G1P を糖供与体とした糖転移反応を触媒する酵素であることから、キメラ化により組換わった 125 アミノ酸残基は、KP の特異性を決定する領域、すなわち糖受容体が結合する領域であることが強く示唆された。この領域を有している他のキメラ酵素 III および I-III もまた、酵素活性は KP 型であった。もう一つのキメラ型ホスホリラーゼであるキメラ IV-I は、TP 活性を有していた。本キメラ酵素は、全 775 アミノ酸残基のうち 69 残基（Fig. 5-1 の region 1－2 に対応）が野生型 KP に由来していた。これらのことから、キメラ化により組換わった 69 アミノ酸残基領域は、酵素の特異性決定に重要でないことが予想された。このことは、キメラ酵素 V-III 中の region 1－2 が TP に由来しているという事実からも支持されている。KP と TP の相同性を比較したところ、KP の region 2－4 中に極めて相同性が低い領域（Thr-419 から His-440 までの 22 アミノ酸残基）が存在していた（Fig. 5-1）。また、region 2－4 中には、第 1 章で同定した糖の結合に関与するアミノ酸残基 Asp-459 が含まれていた。KP と TP はともに glycoside hydrolase family 65（GH-65）に属している（47）。このファミリーには、α-グルコシド結合をもつグルコ二糖を加リン酸分解して β-G1P を生成するホスホリラーゼが含まれている。マルトースホスホリラーゼ（MP; EC 2.4.1.8）もまた、GH-65 を構成する酵素の 1 つである。*Lactobacillus brevis* 由来 MP の立体構造（32）より、KP および TP の region 2－4 は、それぞれの酵素の活性部位を構成していた（Fig. 5-10A, C）。さらに、KP の Gly-428 から His-440 までの 13 アミノ酸残基領域は、活性部位に近接する位置にループを形成していたが、TP に対応する領域（Phe-429 から Tyr-436）はそれを形成していなかった（Fig. 5-10A, C および Fig. 5-11A, C）。KP と TP におけるこの領域の構造が、コージビオースホスホリラーゼとトレハロースホスホリラーゼの基質特異性の違いに起因するものと考えられた。言い換えると、KP の Gly-428 から His-440 で構成されるループが、KP の特異性を決定している可能性が高いと考えられた。事実、KP 活性を示すキメラ酵素 V-III は、この領域を有していた（Fig. 5-10B と Fig. 5-11B）。なお、キメラ酵素 V-III と逆の構造を有するキメラ II-VI（アミノ酸配列の大部分が KP に由来、Fig. 5-2）についても興味が持たれる。キメラ酵素 II-VI はその構造から TP 活性を示すことが期待される

が、活性型キメラとして取得されなかった。その理由として、キメラ化により酵素活性が消失した、或いは本試験のスクリーニング数では取得に至らなかったことが考えられた。

次に、我々はキメラ酵素 V-III の酵素的性質を詳細に解析し、野生型 KP と比較した。キメラ酵素の pH プロファイルは、野生型 KP と同等であった。一方、酵素の温度プロファイルは、野生型 KP の反応最適温度が 65℃付近であったのに対して、キメラ酵素では 35℃付近で 30℃低温側へシフトしていた。また、野生型酵素が 65℃まで安定であったのに対して、本キメラは 50℃までと、やや安定域が低下していた（Table 5-3）。また、合成活性に対する比活性は野生型 KP の約 1%に低下し、各基質に対する速度パラメータも著しく変化していた（Table 5-4）。さらに、キメラ酵素と野生型酵素の構造面での違いについて解析したところ、SDS-PAGE および GPC 分析の結果から、キメラ V-III は単量体であり、野生型 KP や TP のようなオリゴマー構造をとらないことが示唆された。MP の立体構造に基づく分子モデリングにより、キメラ化により組換えられた領域はオリゴマー構造をとる際のサブユニット界面に位置していることがわかった。このことから、キメラ酵素 V-III はキメラ化によってサブユニット間の親和力が低下し、オリゴマー構造を形成できなくなったと推測された。さらに、先に我々はキメラ化によって組換わった領域中には、KP の基質特異性を決定すると推測されるループ構造（KP の Gly-428 から His-440 までの 13 アミノ酸残基）が認められることを述べた。このループ構造は、野生型 KP では触媒部位に近接しているが、キメラ酵素 V-III では劇的に変化していた（Fig. 5-10A, B および Fig. 5-11A, B）。以上のように、キメラ酵素 V-III と野生型 KP における酵素的諸性質の違いは、キメラ化によって生じた酵素間の構造的な相違に起因していると考えられた。種々の酵素における同様の知見が報告されている（61-63）。

取得された KP 型キメラ酵素のうち、キメラ I-III, V-III は、合成活性よりも加リン酸分解活性の低下が顕著であった。そのため、加リン酸分解活性に対する合成活性の比率（[合成活性／加リン酸分解活性]）が野生型 KP と比較して 5－10 倍に増加し、見かけの平衡が合成反応側に偏っていた。それに対して、TP 型キメラ酵素 IV-I は合成活性が低下し、[合成活性／加リン酸分解活性]が野生型 TP の約 2 分の 1 に減少していた。キメラ酵素 IV-I では、見かけの平衡は分解方向に偏っていた（Table 5-2）。コージオリゴ糖を合成する場合、糖供与体であるβ-G1P が高価であるため、KP の合成反応をそのまま実用的なコージオリゴ糖製造法に用いることはできない。TP はトレハロースと無機リン酸からβ-G1P とグルコースを生成する酵素であり、G1P のアノマー型（β）が KP と同一のため、本酵素をβ-G1P の供給源として用いることができる。第３章では、この特長を利用してトレハロースから非還元性三糖セラギノースを酵素合成した。本オリゴ糖合成系では TP の見かけの平衡が分解反応側に、かつ KP のそれが合成反応側に偏っているほうがセラギノース生産には有利である。従って、取得された KP 型および TP 型のキメラ酵素は、セラギノースやコージオリゴ糖の製造に有効であると考えられた。

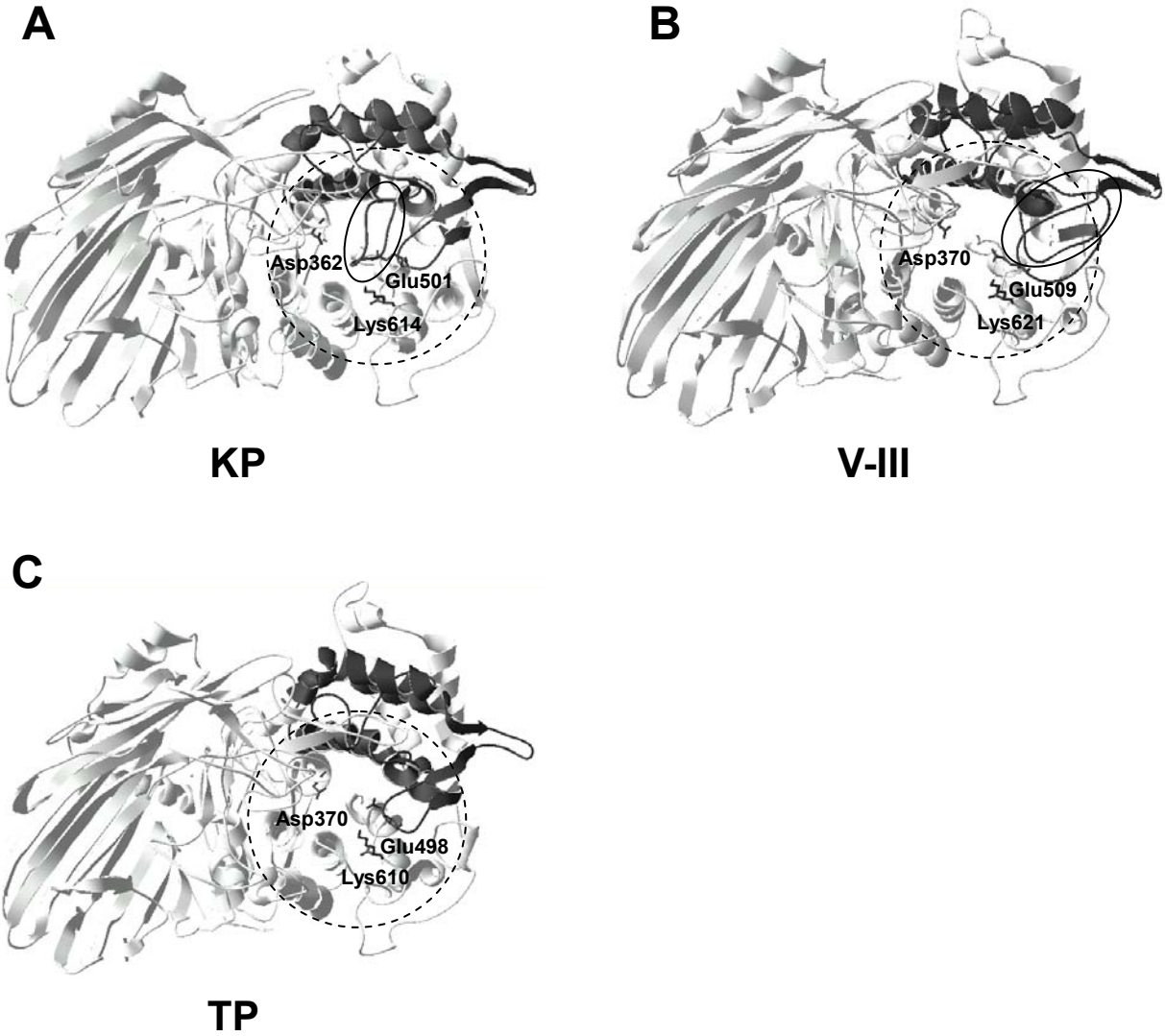


Fig. 5-10. Putative overall structures of KP (A), chimera V-III (B) and TP (C)

The deduced amino acid sequence of MP was homologous to those of KP, chimera V-III and TP with 28.8, 34.1 and 34.3%, respectively. The main chains of proteins are shown as ribbons. The regions 2-4 were colored dark gray. The dotted circles indicate the active-site of the enzymes. The putative catalytic residues of KP are Asp362, Glu501 and Lys614 (chimera V-III, Asp370, Glu509 and Lys621; TP, Asp370, Glu498 and Lys610). The two serine residues in each model are phosphate binding sites. The circles indicate the loop (A and B). This figure is prepared using CPHmodels 2.0 X3M is a computer program to extract the 3D models (http://www.cbs. dtu.dk/services/ CPHmodels/) based on the tertiary structure of MP.[32]

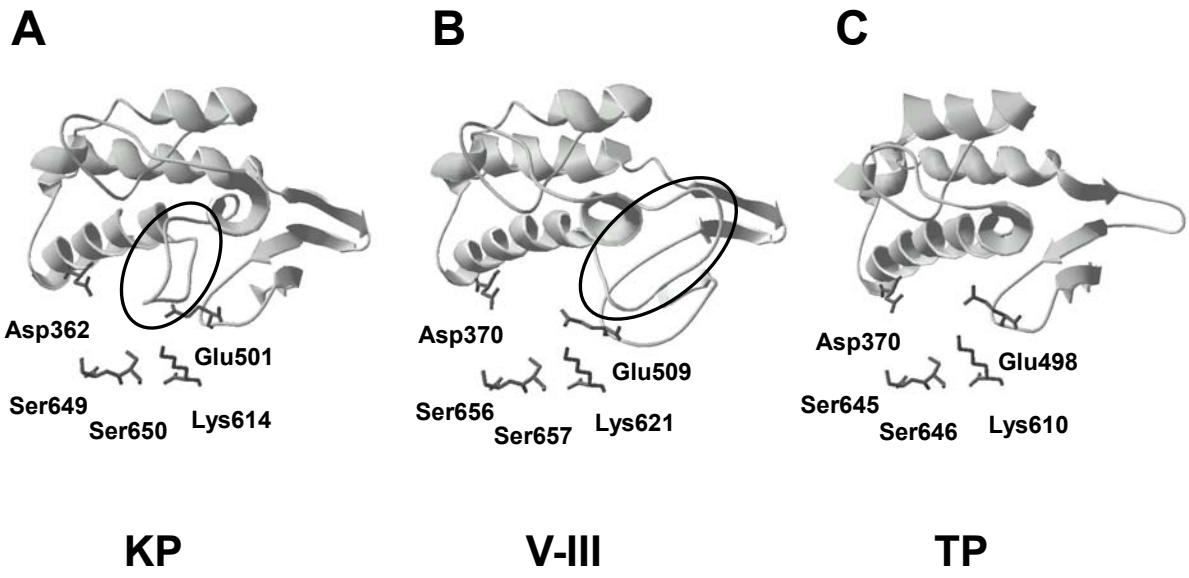


Fig. 5-11. Putative tertiary structures of the regions 2 to 4 of KP (A), chimera V-III (B) and TP (C)

The main chains of proteins are shown as ribbons. The putative catalytic residues of KP are Asp362, Glu501 and Lys614 (chimera V-III, Asp370, Glu509 and Lys621; TP, Asp370, Glu498 and Lys610). The two serine residues in each model are phosphate binding sites. The circles indicate the loop (A and B).

キメラ酵素 V-III と野生型 KP の酵素的諸性質の大きな違いとして、β-グルコ二糖に対する作用性が挙げられる。野生型 KP が無機リン酸存在下において、コージビオースのみを厳密に加リン酸分解するのに対して、キメラ酵素 V-III はコージビオース以外にも β-1,2 結合のソホロースおよび β-1,3 結合のラミナリビオースに作用し、生成物を生じた（Table 5-6）。そこで、ラミナリビオースを基質とした場合に生成する転移三糖の構造解析を行ったところ、それらは 6-β-D-グルコシルラミナリビオースとラミナリトリオースであることがわかった。本キメラ酵素はラミナリビオースの非還元末端グルコースに、β-1,6 およびβ-1,3 グルコシル転移反応を触媒していると考えられた。実際にこのような触媒反応が起こりうるのか考察を行った。野生型 KP は、受容体グルコース残基の 2, 3, 4 位の水酸基の立体配置を厳密に認識し、その 2 位へ糖転移することが既に明らかとなっている。この認識機構をラミナリビオースにあてはめると、野生型 KP では、ラミナリビオースの非還元末端グルコース残基の 2, 3, 4 位の水酸基の立体配置を認識して 2 位へ糖転移することが予想されるが、それ以外にも Fig. 5-12 に示したように、3, 2, 1 位の水酸基の立体配置を認識して 3 位へ、または 6, 4, 3 位の水酸基の立体配置を認識して 6 位へ糖転移する可能性が考えられた。実際に本試験において、3 位水酸基に転移した場合はラミナリトリオースが、6 位水酸基に転移した場合には 6-β-D-グルコシルラミナリビオースが生成することが確認された。キメラ酵素 V-III は、キメラ化によって活性部位の構造、特に受容体が結合すると推測される領域の構造が大きく変化していた（Fig. 5-10A, B および Fig. 5-11A, B）。そのため、野生型 KP の受容体認識機構を持ちながらも、受容体の認識に“あいまいさ”が生じ、ラミナリビオースの非還元末端グルコース残基の 3 位や 6 位水酸基へ糖転移したと考えられた。なお、今回の試験条件では 2 位水酸基への糖転移物は確認されなかった。これは、受容体ラミナリビオースの還元末端グルコース残基の位置が酵素との結合や転移反応に影響を与えているためと考えられた。

キメラ酵素 V-III は、無機リン酸非存在下で β-グルコ二糖に作用して転移糖を生成した。本知見は、キメラ酵素が加水分解活性を獲得した可能性を示唆するものである。多くの加水分解酵素は、グルタミン酸やアスパラギン酸のカルボキシル基を求核基としているのに対して、加リン酸分解酵素であるホスホリラーゼでは無機リン酸を求核基としている。キメラ酵素 V-III は、無機リン酸を利用せずに転移反応を触媒したことから、キメラ化によって無機リン酸結合部位周辺に求核基となり得るカルボキシル基を有している可能性が考えられた。MP の立体構造に基づく分子モデリングにより推定したキメラ酵素 V-III の立体構造を解析したところ、活性部位中にグルタミン酸残基（キメラ酵素の Glu-447）が認められた。本グルタミン酸残基は、本来 KP の Glu-439 に由来するものであった。本グルタミン酸がキメラ酵素の触媒反応における求核基を担っているか否かは推測の域を出ないが、本アミノ酸残基への部位特異的変異解析やキメラ酵素の立体構造解析を行うことで解明されるに違いない。現在、GH-65 ファミリーには、4

種類の加リン酸分解酵素（MP, TP, KP, トレハロース 6-リン酸ホスホリラーゼ（T6PP; EC 2.4.1.216））が分類されている（64）。興味深いことに、本ファミリーには加水分解酵素であるトレハラーゼ（EC 3.2.1.28）も含まれている（65）。これはトレハラーゼと加リン酸分解酵素が互いに類似した立体構造を有していることを示唆するものであり、非常に興味深い知見である。本知見より、GH-65 酵素の活性部位改変によってホスホリラーゼ－加水分解酵素の相互変換の可能性が考えられる。トレハラーゼと同じく、加水分解酵素であるグルコアミラーゼ（EC 3.2.1.3）は GH-65 に属する MP と立体構造が非常に類似しており、活性部位を構成するアミノ酸残基までがよく保存されているという興味深い報告がある（32）。今後、ホスホリラーゼ－加水分解酵素の相互変換を含む、反応特異性の改変による有用酵素の構築が大いに期待される。

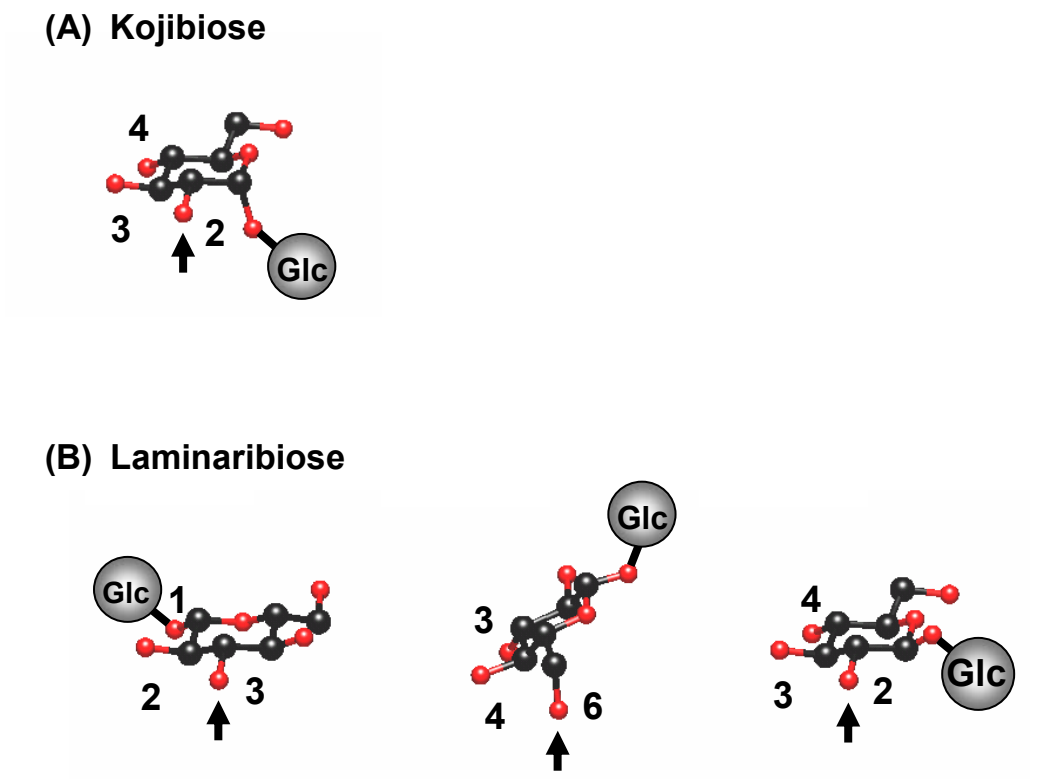


Fig. 5-12. The recognition pattern of kojibiose by KP (A) and the recognition model of laminaribiose by the chimera V-III (B).

The arrows indicate the candidate positions of the transglucosylation site. Each reducing-end of the glucose molecule is indicated by Glc.

第５節　要約

KP の反応特異性の改変を目的として、*Thermoanaerobacter brockii* 由来 KP と TP との間で遺伝子シャッフリングを行った。得られたキメラ酵素ライブラリーから酵素活性を示すキメラ酵素をスクリーニングした結果、5 種類の活性型キメラ酵素、II, III, I-III, V-III および IV-I を取得した。4 種類のキメラ酵素、II, III, I-III および V-III は KP 活性を、残り 1 種類のキメラ IV-I 酵素は TP 活性を有していた。特に、キメラ酵素 V-III は全 785 アミノ酸残基中 125 残基のみが野生型 KP に由来しているにもかかわらず、KP 型酵素であった。キメラ酵素 V-III は、TP とのアミノ酸配列の相同性が 91%であることから、構造的には TP の変異酵素であると考えられたが、本キメラは KP 活性を示すことから、機能的には KP の変異酵素と考えられた。KP と TP はいずれも、β-G1P を糖供与体とした糖転移反応を触媒する酵素であることから、キメラ化により組換わった 125 アミノ酸残基は、KP の特異性を決定する領域、すなわち基質受容体が結合する領域であることが強く示唆された。キメラ酵素 V-III の酵素的諸性質を調査した結果、同酵素の反応最適 pH は 5.5 付近、pH 安定性は 4.6－9.5 で安定であり、野生型 KP とほとんど差が認められなかった。一方、反応最適温度は 35℃付近、温度安定性は 50℃以下で安定であり、野生型酵素よりそれぞれ約 30℃、約 15℃低かった。また、合成活性に対する比活性は野生型 KP の約 1%に低下し、各基質に対する速度パラメータも著しく変化していた。基質特異性を評価したところ、野生型 KP が無機リン酸存在下において、コージビオースのみを厳密に加リン酸分解するのに対して、本キメラは、α-グルコシド結合を加リン酸分解する酵素に由来するにもかかわらず、β-グルコシド結合を持つソホロースやラミナリビオースに作用して転移糖を生成した。キメラ酵素と野生型酵素の構造面での違いについて解析したところ、キメラ V-III は単量体であり、野生型 KP や TP のようなオリゴマー構造をとらないことが示唆された。また、MP の立体構造に基づく分子モデリングにより、キメラ酵素の受容体基質の結合部位周辺の構造が大きく変化していることが推測された。以上のことから、キメラ酵素 V-III と野生型 KP における酵素的諸性質の違いは、キメラ化によって生じた酵素間の構造的な相違に起因していると考えられた。

KP, TP という GH-65 に属する類縁酵素同士のキメラ化によって、反応特異性が大きく変化した酵素が作製された。キメラ化は、種々の改変酵素の構築に有効なツールとなることが示唆された。

第６章　KP の受容体基質認識機構の解明

第１節　緒言

コージビオースホスホリラーゼ（KP; EC 2.4.1.230）は、コージビオース（α-D-glucopyranosyl-(1→2)-D-glucopyranose）のα-1, 2 グルコシド結合を可逆的に加リン酸分解する酵素である。本反応は生成物のアノマー反転を伴う。KP はまた、糖供与体であるβ-G1P を適当な受容体基質へ糖転移する反応も触媒する。

β-glucose 1-phosphate (β-G1P) + glucose ⇄ kojibiose + inorganic phosphate (Pi)

我々は既にスクロースやマルトース、さらには環状四糖への糖転移を検討し、それら転移生成物の構造を決定した（6-8）。受容体特異性および糖転移生成物の構造より、KP は受容体グルコース残基の 2 位水酸基へのグルコシル転移反応を触媒していた。本章において、より詳細な受容体特異性試験を行ったところ、新たにグリセロールと *myo*-イノシトールが受容体となることがわかった。このことから、グリセロールや *myo*-イノシトール分子中にはグルコース分子を認識する場合と同様の「共通の認識構造」の存在が示唆された。

セロビオースホスホリラーゼ（CBP; EC 2.4.1.20）は、セロビオース（β-D-glucopyranosyl-(1→4)-D-glucopyranose）を可逆的にα-D-グルコース 1-リン酸（α-G1P）とグルコースに加リン酸分解する酵素である（66）。本酵素の糖転移反応における受容体特異性は Kitaoka らによって詳細に調べられている（67）。その解析によると、CBP はβ-アノマーのグルコース分子の 1, 3, 4 位の水酸基を厳密に認識し、その 4 位水酸基への糖転移を触媒した。この特異性を利用して種々のヘテロオリゴ糖が合成された（68-72）。スクロースホスホリラーゼ（SP; EC 2.4.1.7）は、スクロース（β-D-fructofuranosyl-(2→1)-α- D-glucopyranoside）を可逆的にα-G1P とフラクトースに加リン酸分解する（73）。フェノール性水酸基やアルコール性水酸基を有する種々の受容体を用いて、SP の受容体特異性が詳細に解析されている（74-77）。ホスホリラーゼは反応の位置選択性において極めて特異性が高く、特定の位置に結合したグリコシド結合のみに作用する。この特異性の高さは合成反応を用いてオリゴ糖を生成するときにおいて重要な性質となる。KP においても基質の構造を厳密に認識し、特定の位置にグルコース残基を転移していると考えられる。

本章では、β-G1P を糖供与体、グリセロールまたは *myo*-イノシトールを糖受容体として用い、それぞれの糖転移物を単離し構造決定した。さらに、得られた転移糖の構造をもとに、KP の受容体認識機構を明らかにした。

第２節　実験材料および方法

６－２－１　実験材料

（１）糖質

グリセロールは和光純薬㈱社製の試薬特級品を、*myo*-イノシトールはシグマアルドリッチ社製のものを用いた。また、β-G1P は㈱林原生物化学研究所製を用いた（8）。その他の試薬は、市販の特級品またはそれに準ずるものを用いた。

（２）酵素

組換え KP は大腸菌を宿主として発現させたものを用いた。酵素液は方法１－２－９に準じて調製した。

６－２－２　KP 活性測定法

コージビオースと無機リン酸とを基質として、加リン酸分解により生じたグルコースを定量する方法で KP の加リン酸分解活性を評価した。方法１－２－10（１）に準じて行った。

６－２－３　受容体特異性試験

受容体基質とβ-G1P とから糖転移物を生成する反応において、遊離する無機リン酸を定量して受容体基質に対する相対活性を評価した。111 mM 受容体、29 mM β-G1P、50 mM 酢酸緩衝液（pH 5.5）からなる基質溶液 2 mL に酵素液 0.2 mL を添加して反応を開始した。60℃で 30 分間反応後、酵素反応液を沸騰水浴中で 10 分間加熱して酵素反応を停止させ、遊離した無機リン酸を Fiske-Subbarow 法（31）により定量した。酵素活性 1 単位は、上記反応条件下で 1 分間に 1 μmol の無機リン酸を遊離する酵素量と定義した。なお、相対活性は受容体にグルコースを用いた場合の値を 100%として算出した。

６－２－４　α-グルコシダーゼによるグルコシルグリセロールの調製

α-グルコシダーゼを用いて 3 種類のグルコシルグリセロール、α-D-glucopyranosyl-(1→1)-glycerol（(2S)-1-α-D-glucosyl glycerol）、α-D-glucopyranosyl-(1→3)-glycerol（(2R)-1-α-D-glucosyl glycerol）および α-D-glucopyranosyl-(1→2)-glycerol の混合液を酵素合成した（78）。これは本試験において、KP の糖転移反応により生成したグルコシルグリセロールの標準品として使用した。4.07 M グリセロール、0.15 M マルトースおよび 0.14 U/mL α-グルコシダーゼ（TGaseL-Amano; アマノエンザイム社製）を含む 10 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）5.0 mL の酵素反応液を 40℃で 24 時間保持した。100℃、10 分間の熱処理後、グルコアミラーゼ（3.4 U/mmol-マルトース）を添加

して 50℃で 24 時間保持した。加水分解反応後、反応液を熱失活した。これを濾過、脱塩したものを GLC 分析に供した。

６－２－５　糖質の分析

（１）高速液体クロマトグラフィー（HPLC）

反応液中の糖転移生成物の組成および純度分析には HPLC を用いた。試験試料の分析には、「LC-10A 型高速液体クロマトグラフ」（島津製作所㈱製）を使用し、ポンプに LC-10AD 型、検出器に RID-10A 型示差屈折計（いずれも島津製作所㈱製）を用いた。カラムに ODS-AQ AQ-303（4.6 mm i.d. × 250 mm, ㈱YMC 製）を用いた場合は、カラム温度 40℃、流速 0.5 mL/min の条件で分析した。カラムに MCI GEL CK04SS（10 mm i.d. × 200 mm ×２本, 三菱化学㈱製）を用いた場合は、カラム温度 80℃、流速 0.4 mL/min の条件で分析した。溶媒はいずれも水を使用した。

（２）ガスクロマトグラフィー（GLC）

糖質試料を 40℃で一晩真空乾燥後、ピリジンに溶解し、トリメチルシリル化（TMS 化）したものを GLC 分析に供した（79）。GLC 分析には「GC-14 型ガスクロマトグラフ」（島津製作所㈱製）を使用し、カラムには DB-5 キャピラリーカラム（J & W Folsom, CA, USA 社製）を、検出には水素炎イオン化検出器（flame ionization detector, FID）を用いた。昇温速度 5.0℃/min で 320℃までの昇温法で分析した。なお、ミオイノシトールを内部標準として用いた。

（３）核磁気共鳴分析（NMR spectroscopy）

NMR 分析は「JNM-AL300 型核磁気共鳴装置」（JEOL 社製；300.4 MHz for ^{1}H, 75.45 MHz for ^{13}C）を用いて行った。内部標準として 3-(trimethylsilyl)-1-propane-sulfonic acid sodium salt（TPS, $C_6H_{15}NaO3SSi$, メルク社製)を、溶媒として重水を用いて測定した。

第３節　結果

６－３－１　KP の受容体特異性試験

β-G1P を糖供与体に、また種々のアルコール類を受容体基質として用い、KP の受容体特異性を調査した。結果を Table 5-1 に示した。KP はグルコース以外の受容体としてグリセロールおよび *myo*-イノシトールに作用した。グリセロール、*myo*-イノシトールにおける KP の相対活性は、グルコースを 100%とした場合、それぞれ 0.26%, 6.2%であった。KP は他のアルコール類を受容体としなかった。

Table 6-1.　Acceptor specificity of KP

Acceptor	Relative activity (%)
D-Glucose	100
Ethanol	n.d.
Ethyleneglycol	n.d.
1-Propanol	n.d.
Propyleneglycol	n.d.
1, 3-Propanediol	n.d.
Glycerol	0.26
1-Butanol	n.d.
1, 2-Butanediol	n.d.
myo-Inositol	6.2

The activity of the enzyme was examined using various acceptors under the conditions described in Section 6-2-3. Values are shown as a percentage of the activity using glucose as an acceptor taken as 100%.

n.d., Not detected (less than 0.001%).

６－３－２　グリコシルグリセロールの調製と単離

29 mM β-G1P、217 mM グリセロールおよび組換え KP（34.5 U/mmol-β-G1P）を含む 50 mM 酢酸緩衝液（pH 5.5）400 mL の酵素反応液を 50℃で 72 時間保持した。酵素反応液の一部を HPLC 分析に供したところ、複数の転移生成物が検出された（Fig. 6-1）。2 種類の主生成物のうち、保持時間が 45.1 min の転移物を糖質 A, 44.1 min のそれを糖質 B とした。反応 72 時間後の糖質 A と B の生成率はそれぞれ 5.0%と 7.2%であった。沸騰水浴中, 20 分間の熱処理によって酵素反応を停止させた後、反応液を遠心分離した。次に、得られた遠心上清の脱塩処理を行った。脱塩の操作には三菱化学㈱製イオン交換樹脂「Diaion SK-1B」とオルガノ㈱製アニオン交換樹脂「IRA411S」（SK1B : IRA411S = 50 mL : 100 mL）を用いた。さらに、40℃の条件下で濃縮し、Brix.12.0%, 重量 74.6 g, 固形分 9.0 g の分画原料を得た。分画原料のうち、固形分 6.0 g 分を 2 回に分け、ゲルろ過担体による転移生成物の単離操作を行った。ゲルろ過担体による HPLC には、TSKgel トヨパール HW-40S カラム（70 mm i.d. × 1290 mm, 東ソー㈱社製）を用い、カラム温度 25℃、流速 2.5 mL/min の条件で分析した。溶媒は水を使用した。本条件により、糖質 A, B をそれぞれ分離・回収した。糖質 A は純度 99.0%、収量 191.1 mg であった。糖質 B は純度 95.7%、収量 138.0 mg であった。

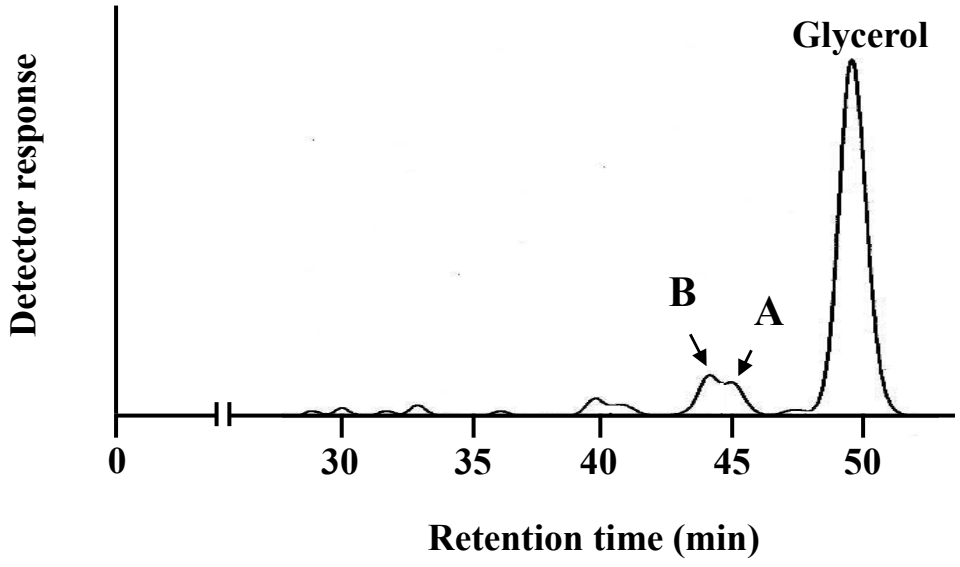


Fig. 6-1.　HPLC profile of reaction products of KP produced using mixture of β-G1P (as the glucosyl donor) and glycerol (as the acceptor).

６－３－３　グリコシルグリセロールの構造解析

（１）糖質 A の構造解析

糖質 A の構造を決定するため、NMR 分析を行った。^{1}H NMR スペクトルより水素 12 個分、^{13}C NMR スペクトルより炭素 9 個分のシグナルが検出され、グルコース 1 分子とグリセロール 1 分子が結合したグルコシルグリセロールであることを支持する結果となった（data not shown）。グルコースの結合位置については、グルコースの 1 位のシグナルが α 結合を支持するシフト値（^{1}H-NMR：δ 4.9 ppm (1H, d), ^{13}C-NMR：δ 101.0 ppm）を示したことから、グルコースの 1 位が α 結合でグリセロールに結合していることがわかった。グリセロールの結合位置については、α-グルコシダーゼの糖転移反応によって生成する α-D-glucopyranosyl-(1→1)-glycerol（(2S)-1-α-D- glucosyl glycerol）(78) と GLC 分析の保持時間がよく一致したことから（Fig. 6-2）、1 位が結合していると考えられた。以上の結果より、糖質 A をα-D-glucopyranosyl-(1→1)-glycerol（(2S)-1-α-D-glucosyl glycerol）と決定した（Fig. 6-3a）。^{13}C のシグナルの帰属を Table 6-2 に示した。

（２）糖質 B の構造解析

糖質 B の ^{1}H NMR スペクトルおよび ^{13}C NMR スペクトルより、水素 19 個分、炭素 15 個分のシグナルがそれぞれ検出され、グルコース 2 分子とグリセロール 1 分子が結合したグリコシルグリセロールであることを支持する結果となった（data not shown）。また、^{1}H NMR スペクトルおよび ^{13}C NMR スペクトルより、糖質 B はその分子中に糖質 A の構造を有していることが示唆された。さらに、糖質 A のグルコース残基の 2 位炭素のシグナルが低磁場側にシフト（73.1 ppm →77.9 ppm）していること、新たに結合したグルコース残基の 1 位のシグナルがα結合を示している（^{1}H-NMR：5.1 ppm (1H, d), ^{13}C-NMR：98.7ppm）ことから、糖質 B は糖質 A のグルコース残基の 2 位にグルコースの 1 位がα 結合したグリコシルグリセロールであると判断した。以上のことから、糖質 B をα-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-D-glucopyranosyl-(1→1)-glycerol（コージビオシルグリセロール）と決定した（Fig. 6-3b）。^{13}C のシグナルの帰属を Table 6-2 に示した。

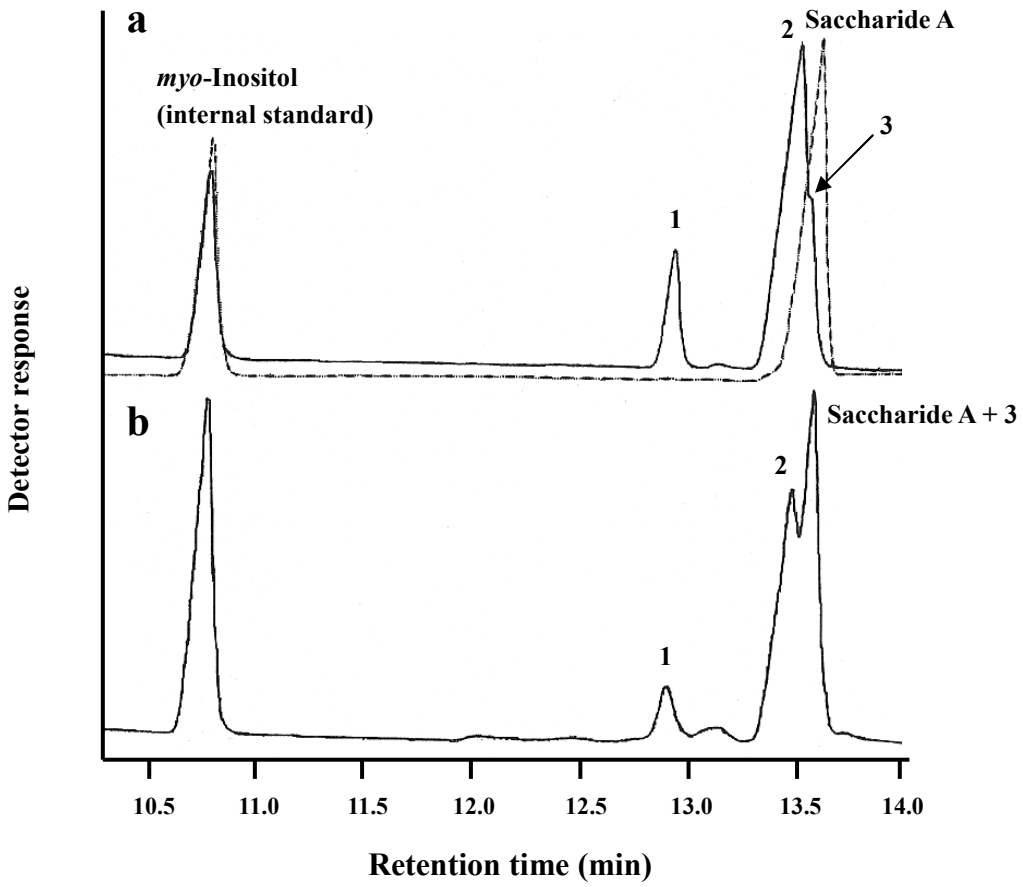


Fig. 6-2. GLC profile of reaction products of α-glucosidase and KP.

(a) Glucosyl glycerols produced by α-glucosidase are indicated by line. Peaks 1, 2, and 3 are *O*-α-D-glucopyranosyl-(1→2)-glycerol, *O*-α-D-glucopyranosyl-(1→3)-glycerol ((2R)-1-α-D-glucosyl glycerol), and *O*-α-D-glucopyranosyl-(1→1)-glycerol ((2S)-1-α-D-glucosyl glycerol), respectively (78). Glucosyl glycerol (saccharide A) produced by KP is indicated by a broken line. The retention time of peak 3 corresponds to that of saccharide A. (b) GLC profile of mixture of glucosyl glycerols from α-glucosidase and saccharide A from KP. The retention time of peak 2 does not correspond to that of saccharide A.

Table 6-2. ^{13}C NMR chemical shift data for saccharides A [a] and B [a]

Carbon atom [b]	Saccharide A	Saccharide B	Glycerol [c]	Kojibiose α [c]
I-1	71.2	71.3	65.2	
I-2	74.5	74.5	74.7	
I-3	65.2	65.2	65.2	
II-1	101.0	98.2		90.8
II-2	73.1	77.9		77.1
II-3	75.7	74.4		73.1
II-4	72.2	72.2		71.1
II-5	74.2	74.0		73.1
II-6	63.2	63.2		62.0
III-1		98.7		96.9
III-2		73.0		72.8
III-3		75.4		74.1
III-4		72.1		71.0
III-5		74.0		72.9
III-6		63.0		61.8

[a] NMR spectra data were recorded for solutions in D_2O at 27°C. Chemical shift is expressed in ppm downfield from the signal of 3-(trimethylsilyl)-1-propane-sulfonic acid sodium salt (TPS), which was used as an internal standard.

[b] Roman numerals indicate the positions of the glycerol and glucose residues in saccharides A and B shown in Fig. 6-3.

[c] Data taken from Bradbury and Jenkins (80).

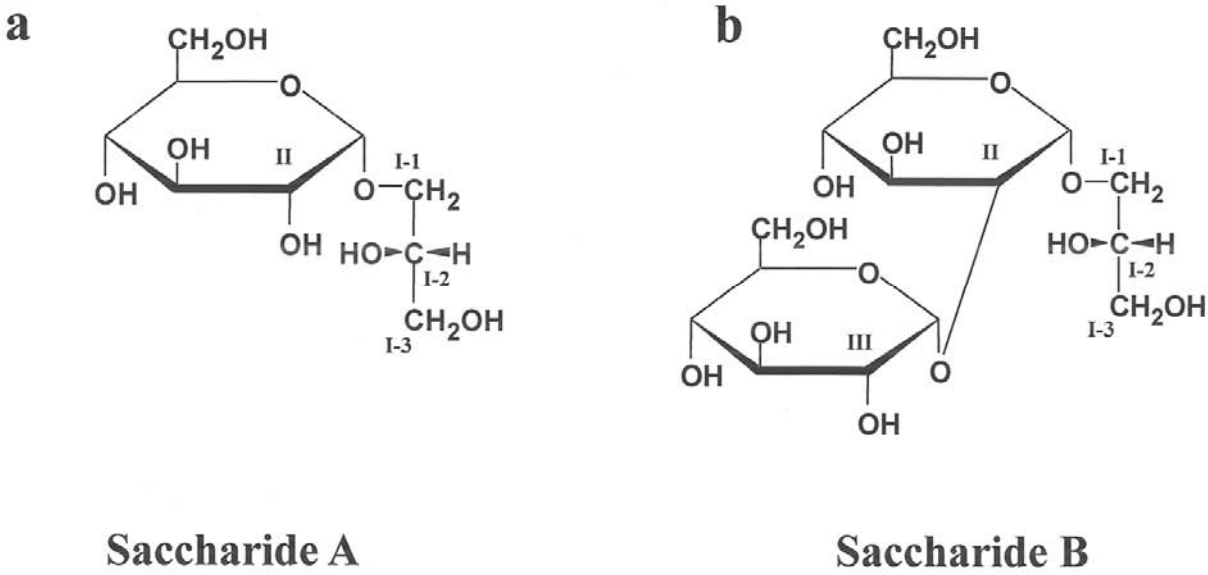


Fig. 6-3. Structures of saccharides A (a) and B (b) produced by KP.

６－３－４　グリコシル *myo*-イノシトールの調製と単離

29 mM β-G1P、111 mM *myo*-イノシトールおよび組換え KP（34.5 U/mmol-β-G1P）を含む 50 mM 酢酸緩衝液（pH 5.5）400 mL の酵素反応液を 50℃で 72 時間保持した。酵素反応の一部を HPLC 分析に供したところ、Fig. 6-4 に示したように 4 つの転移生成物のピークが検出された。4 種類のピークのうち、保持時間が 51.7 min, 49.6 min, 48.1 min および 45.0 min の転移生成物をそれぞれ糖質 1, 2, 3 および糖質 4 とした。反応 72 時間後の糖質 1－4 の生成率はそれぞれ 20.2%, 5.2%, 8.7%および 1.5%であった。酵素反応液を沸騰水浴中で 20 分間熱処理した後、反応液を遠心分離し、得られた遠心上清を脱塩処理に供した。脱塩操作はグリコシルグリセロールの場合と同様に行った。脱塩処理後の反応液を 40℃の条件下で濃縮して Brix.10.2%,重量 100.7 g, 固形分 10.3 g の分画原料を得た。分画原料のうち、固形分 8.0 g 分を 2 回に分け、ゲルろ過担体による転移生成物の単離操作を行った。ゲルろ過担体による HPLC には、TSKgel トヨパール HW-40S カラム（70 mm i.d. × 1290 mm, 東ソー㈱社製）を用い、カラム温度 25℃、流速 2.5 mL/min の条件で分析した。溶媒は水を使用した。本条件により、糖質 1, 2 および糖質 3, 4 の混合液をそれぞれ回収した。次に、MCI GEL CK04SS カラムを用いた分取 HPLC を行い、糖質 1, 2 をそれぞれ単離した。これによって糖質 1 が 20.2 mg（純度 90.5%）、糖質 2 が 8.0 mg（純度 99.4%）得られた。同様に、糖質 3, 4 についても同カラムを用いた分取 HPLC を行い、糖質 3 を 18.6 mg（純度 99.6%）、糖質 4 を 9.2 mg（純度 94.9%）得た。

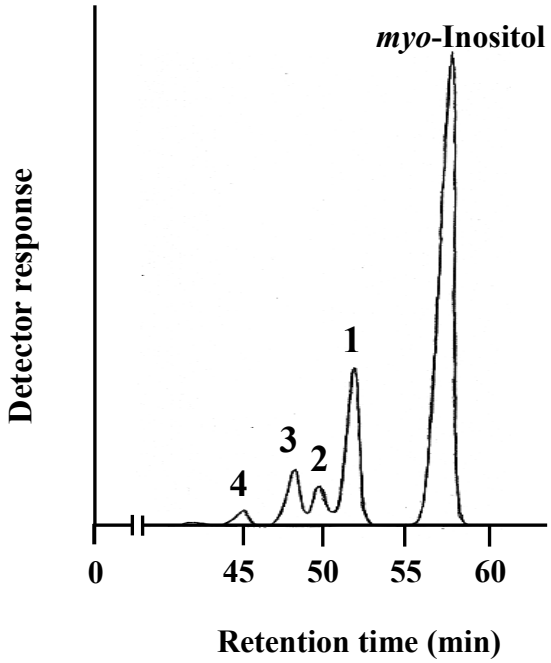


Fig. 6-4.　HPLC profile of reaction products of KP produced using mixture of β-G1P (as the glucosyl donor) and *myo*-inositol (as the acceptor).

６－３－５　グリコシル *myo*-イノシトールの構造解析

（１）糖質 1 の構造解析

糖質 1 の構造を決定するため、NMR 分析を行った。^{1}H NMR スペクトルより水素 13 個分、^{13}C NMR スペクトルより炭素 12 個分のシグナルが検出され、グルコース 1 分子と *myo*-イノシトール 1 分子が結合したグルコシル *myo*-イノシトールであることを支持する結果となった（data not shown）。グルコースの結合位置については、グルコースの 1 位のシグナルが α 結合を支持するシフト値（^{1}H-NMR：δ 5.1 ppm (1H, d), ^{13}C-NMR：δ 98.1 ppm）を示したことから、グルコースの 1 位がα 結合で *myo*-イノシトールに結合していることがわかった。*myo*-イノシトールの結合位置については、α-D-galacopyranosyl-(1→1)-*myo*-inositol の化学シフト値が糖質1のそれとよく一致したことから（Table 6-3）、1 位が結合していると考えられた。以上の結果より、糖質 1 を α-D-glucopyranosyl-(1→1)-*myo*-inositol と決定した（Fig. 6-3a）。^{13}C のシグナルの帰属を Table 6-3 に示した。

（２）糖質 2 の構造解析

糖質 2 の ^{1}H NMR スペクトルおよび ^{13}C NMR スペクトルより、水素 13 個分、炭素 12 個分のシグナルがそれぞれ検出され、グルコース 1 分子と *myo*-イノシトール 1 分子が結合したグルコシル *myo*-イノシトールであることを支持する結果となった（data not shown）。グルコースの結合位置については、グルコースの 1 位のシグナルが α 結合を支持するシフト値（^{1}H-NMR : δ 5.3 ppm (1H, d), ^{13}C-NMR：δ 102.0 ppm）を示したことから、グルコースの 1 位が α 結合で *myo*-イノシトールに結合していることがわかった。*myo*-イノシトールの結合位置については、5 位の炭素のシグナルが低磁場側にシフト（77.0 ppm→84.4 ppm）していることから、5 位が結合していると判断した。以上の結果より、糖質 2 を α-D-glucopyranosyl-(1→5)-*myo*-inositol と決定した（Fig. 6-3b）。^{13}C のシグナルの帰属を Table 6-3 に示した。

（３）糖質 3 の構造解析

糖質 3 の構造を決定するため、NMR 分析を行った。^{1}H NMR スペクトルより水素 20 個分、^{13}C NMR スペクトルより炭素 18 個分のシグナルが検出され、グルコース 2 分子と *myo*-イノシトール 1 分子が結合したグリコシル *myo*-イノシトールであることを支持する結果となった（data not shown）。また、^{1}H NMR スペクトルおよび ^{13}C NMR スペクトルより、糖質 3 はその分子中に糖質 1 の構造を有していることが示唆された。さらに、糖質 1 のグルコース残基の 2 位炭素のシグナルが低磁場側にシフト（74.1 ppm→78.4 ppm）していること、新たに結合したグルコース残基の 1 位のシグナルがα 結合を示している（^{1}H-NMR : 5.3 ppm (1H, d), ^{13}C-NMR : 95.2 ppm）ことから、糖質 3 は糖質 1 のグルコース残基の 2 位にグルコースの 1 位がα 結合したグリコシル *myo*-イノシトールであると判断した。以上のことから、糖質 3 を α-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-D-glucopyranosyl-(1→1)-*myo*-inositol（コージビオシル-(1→1)-*myo*-イノシトール）と決定した（Fig. 6-3c）。^{13}C のシグナルの帰属を Table 6-3 に示した。

（４）糖質 4 の構造解析

糖質 4 の ^{1}H NMR スペクトルおよび ^{13}C NMR スペクトルより、水素 20 個分、炭素 18 個分のシグナルがそれぞれ検出され、グルコース 2 分子と *myo*-イノシトール 1 分子が結合したグリコシル *myo*-イノシトールであることを支持する結果となった（data not shown）。また、^{1}H NMR スペクトルおよび ^{13}C NMR スペクトルより、糖質 4 はその分子中に糖質 2 の構造を有していることが示唆された。さらに、糖質 2 のグルコース残基の 2 位炭素のシグナルが低磁場側にシフト（74.5 ppm→78.4 ppm）していること、新たに結合したグルコース残基の 1 位のシグナルがα 結合を示している（^{1}H-NMR：5.5 ppm (1H, d), ^{13}C-NMR：98.9 ppm）ことから、糖質 4 は糖質 2 のグルコース残基の 2 位にグルコースの 1 位がα 結合したグリコシル *myo*-イノシトールであると判断した。以上のことから、糖質 4 を α-D-glucopyranosyl-(1→2)-D-glucopyranosyl-(1→5)-*myo*-inositol（コージビオシル-(1→5)-*myo*-イノシトール）と決定した（Fig. 6-3d）。^{13}C のシグナルの帰属を Table 6-3 に示した。

Table 6-3. ^{13}C NMR chemical shift data for saccharide 1-4 [a]

Carbon atom [b]	Saccharide 1	Saccharide 3	Saccharide 2	Saccharide 4	1-*O*-(α-D-Galactopyranosyl)-*myo*-inositol [c]	5-*O*-(α-D-Glucopyranosyl)-*myo*-inositol [d]	Kojibiose α [e]	α-D-Glucose [e]	*myo*-Inositol [f] (°)
I-1	78.5	78.5	73.8	74.0	96.0	72.0			75.0 (72.9)
I-2	71.0	70.7	74.5	74.4	68.9	72.7			74.8 (72.7)
I-3	75.0	75.0	73.8	74.0	70.0	72.0			75.0 (72.9)
I-4	73.6	73.6	73.6	73.7	69.8	72.0			73.8 (71.6)
I-5	77.0	77.0	84.4	83.9	71.7	82.9			77.0 (74.8)
I-6	73.7	73.7	75.6	75.5	61.6	73.7			73.8 (71.6)
II-1	98.1	99.6	102.0	99.3	76.3	100.1	90.8	92.9	
II-2	74.1	78.4	74.5	78.4	68.8	72.6	77.1	72.5	
II-3	75.6	73.7	75.6	73.9	73.0	73.9	73.1	73.8	
II-4	72.2	71.9	72.1	72.0	71.6	70.3	71.1	70.6	
II-5	74.5	74.5	74.5	74.5	74.9	72.8	73.1	72.3	
II-6	63.1	63.0	63.0	63.0	71.6	61.3	62.0	61.6	
III-1		95.2		98.9			96.9		
III-2		73.4		73.5			72.8		
III-3		75.5		75.5			74.1		
III-4		72.2		72.0			71.0		
III-5		74.3		74.5			72.9		
III-6		63.1		62.8			61.8		

[a] NMR spectra data were recorded for solutions in D_2O at 27°C. Chemical shift is expressed in ppm downfield from the signal of 3-(trimethsilyl)-1-propane-sulfonic acid sodium salt (TPS), which was used as an internal standard.
[b] Roman numerals indicate the positions of the *myo*-inositol and glucose residues in saccharides 1-4 shown in Fig. 6-5.
[c] Data taken from Schweizer and Horman (81).
[d] Data taken from Sato *et al*. (82).
[e] Data taken from Bradbury and Jenkins (80).
[f] Measurement in this study.

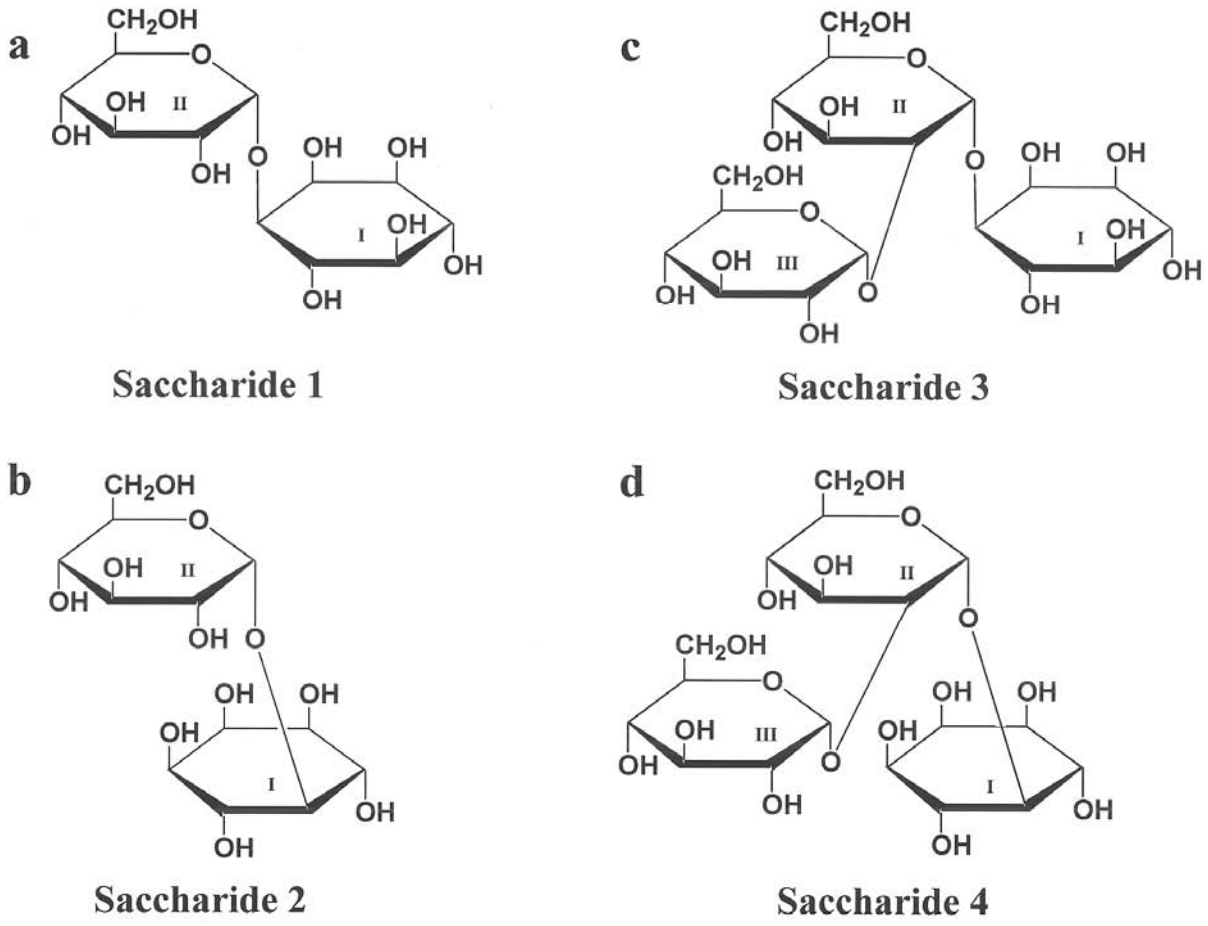


Fig. 6-5. Structures of saccharides 1 (a), 2 (b), 3 (c) and 4 (d) produced by KP.

第４節　考察

KP は糖供与体であるβ-G1P を適当な受容体基質へ糖転移する（5）。その受容体特異性より、本酵素は受容体グルコース残基の 2 位水酸基へのグルコシル転移反応を触媒していた。本章において、より詳細に KP の受容体特異性を調査したところ、新たにグリセロールと *myo*-イノシトールが受容体となることがわかった（Table 6-1）。グリセロールを受容体とした場合、複数の糖転移物が生成した（Fig. 6-1）。これら糖転移物の構造を決定するため、α-グルコシダーゼを用いて 3 種類のグルコシルグリセロール、α-D-glucopyranosyl-(1→1)-glycerol （(2S)-1-α-D-glucosyl glycerol）、α-D-glucopyranosyl-(1→3)-glycerol （(2R)-1-α-D-glucosyl glycerol）および α-D-glucopyranosyl-(1→2)-glycerol の混合液を酵素合成した。これは NMR による構造解析の際、標準品を用いなければ α-D-glucopyranosyl-(1→1)-glycerol とα-D-glucopyranosyl-(1→3)-glycerol の構造を区別することが困難であるためである。Takenaka らはこれら 3 種類のグルコシルグリセロールを化学合成し、GLC 分析によって α-グルコシダーゼによって生成したグルコシルグリセロールの構造を決定した（78）。本章において、著者は α-グルコシダーゼによって生成したグルコシルグリセロールを標準品として用いた。それによって 2 種類の主生成物は、α-D-glucopyranosyl-(1→1)-glycerol と kojibiosyl-(1→1)-*myo*-inositol に決定された。KP はまたグルコシルグリセロール中のグルコース残基への伸長反応を触媒することから、保持時間 41.0 min と 39.9 min のマイナー生成物はそれぞれコージトリオシルグリセロールとコージテトラオシルグリセロールであると考えられた（Fig. 6-1）。グルコースが受容体である場合、コージビオースのみならず、重合度 7 までのコージオリゴ糖が KP の伸長反応によって生成する（6）。従って、本試験においても重合度 5, 6 さらには 7 のコージオリゴ糖を側鎖とするグリコシルグリセロールの生成が予想される。*myo*-イノシトールが受容体の場合、KP の糖転移反応により α-D-glucopyranosyl-(1→1)-*myo*-inositol とα-D-glucopyranosyl-(1→5)-*myo*-inositol が生成した。コージビオシル-(1→1)-およびコージビオシル-(1→5)-*myo*-イノシトールは、それぞれのグルコース残基への伸長反応により生成した。本章において生成した糖転移物の構造をもとに、グルコース、グリセロールおよび *myo*-イノシトールの構造の相関を考察した。Table 6-1 に示したように、KP はグルコース以外にグリセロールと *myo*-イノシトールのみを受容体とした。グリセロールは炭素数が 3 で、KP の受容体の中で最も小さい分子である。KP はグリセロールの 1 位水酸基へグルコース残基を転移した。*myo*-イノシトールの場合は、1 または 5 位水酸基へグルコシル転移した。興味深いことに、グリセロールと *myo*-イノシトール分子中にはグルコース分子の 2, 3 および 4 位水酸基に対応する、連続する 3 つの水酸基からなる「共通の構造」が認められた（Fig. 6-6）。本構造中の 3 つの水酸基の配位はすべてエカトリアル型であった。この構造が KP の基質認識の最小単位であると考えられた。Fig. 6-6 に示したように、グリセロールには KP の

基質認識の最小構造が 1 つ存在した。それは 1, 2 および 3 位水酸基からなる構造、すなわちグリセロールの構造である。それに対して、*myo*-イノシトールは KP の基質認識の最小構造を 2 つ有していた。それらは 1, 6 および 5 位水酸基からなる構造と 5, 4 および 3 位水酸基からなる構造である。グリセロールと *myo*-イノシトールがこれら構造をその分子中に有するという事実から、KP は連続する 3 つの水酸基の配位がすべてエカトリアル型の「最小構造」を厳密に認識し、グルコースの 2 位水酸基に対応するグリセロールの 1 位、*myo*-イノシトールの 1 位および 5 位水酸基へのグルコシル転移反応を触媒していることが強く示唆された。Chaen らは、L-ソルボースを受容体として用い、グルコシル-L-ソルボースの構造を α-D-glucopyranosyl-(1→5)-α-L-sorbopyranose と決定した (7)。L-ソルボースの 5, 4 および 3 位水酸基の配位がグルコースの 2, 3 および 4 位水酸基のそれと一致していた。

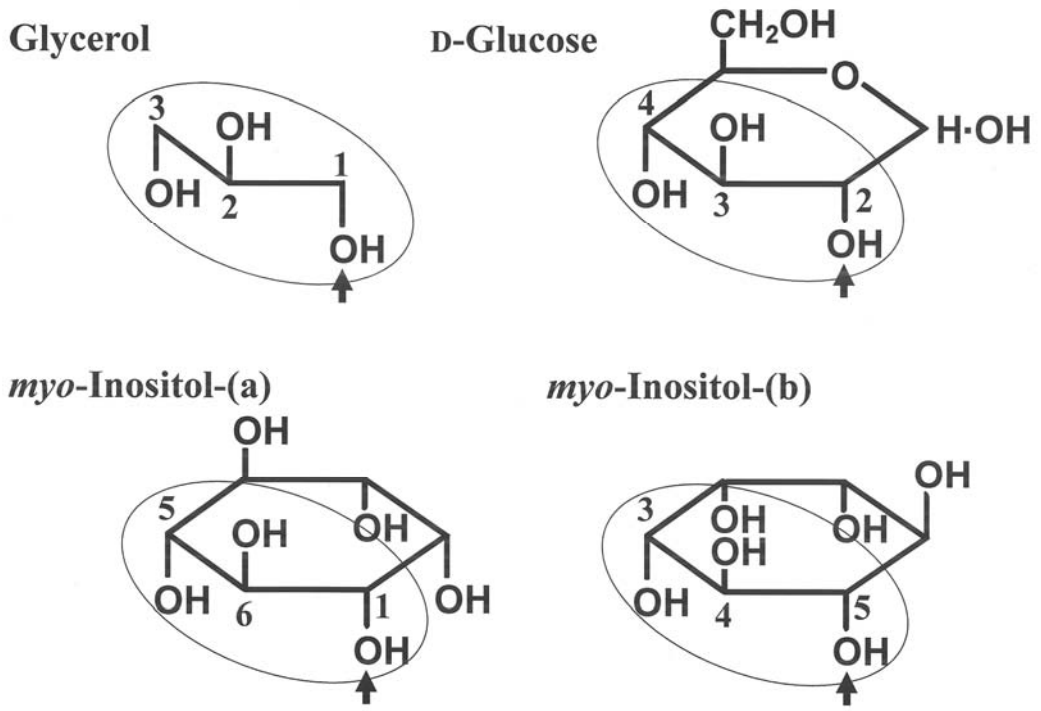


Fig. 6-6. Stereochemical comparison among three acceptors for KP.

Each circle indicates the structure with three hydroxyl groups that is recognized by KP. *myo*-Inositol-(b) represents rotated *myo*-inositol-(a). Arrows indicate the positions of transglucosylation.

本試験において、反応液中のグルコシルグリセロール（糖質 A）の生成率は 5.2%であった。それに対してグルコシル *myo*-イノシトール（糖質 1, 2）の生成率は 25.4%であり、グルコシルグリセロールのそれの約 5 倍に達した。さらに、受容体特異性試験から、*myo*-イノシトールにおける相対活性はグリセロールのそれの約 24 倍であった（Table 6-1）。*myo*-イノシトールはグルコースと類似した環状構造をもつことから、その分子中の最小認識構造は“リジッド”であると考えられた。それに対して、グリセロールは *myo*-イノシトールのように環状構造をとらないため、その最小構造は“フレキシブル”であり、それゆえ *myo*-イノシトールよりもグリセロール中の最小構造のほうが KP によって認識されにくいのではないかと推測された。また、*myo*-イノシトールを受容体として用いた場合、糖転移物の生成率は 5 位よりも 1 位水酸基へ転移した割合が 2.5 倍高かった（Fig. 6-4）。この違いは、認識構造周辺の構造も KP の触媒反応に影響するためと考えられた。

CBP の受容体特異性や基質認識は、Kitaoka らによって詳細に解析されている（67）。その転移特性を利用して種々のヘテロオリゴ糖が合成されている（68-72）。ホスホリラーゼは反応の位置選択性において極めて特異性が高く、特定の位置に結合したグリコシド結合のみを分解・合成する。従って、この特異性の高さを利用することによって特定の結合様式をもつオリゴ糖を選択的に合成することが可能となる。現在、ホスホリラーゼは基質を加リン酸分解する様式によって 14 種類報告されている（15,16）。そのうち KP は α-1,2 グルコシド結合を特異的に合成する唯一の酵素である。それゆえ、本酵素を用いることで α-1,2 結合をもつ新規オリゴ糖を選択的に合成することができる。

本章において、著者らは KP の受容体認識機構を明らかにした。KP はグリセロールの構造を最小単位として認識して、その 1 位にあたる水酸基に対して厳密に糖転移を触媒していると考えられた。この KP の高い受容体選択性を生かすことで、用いた受容体から生成する糖転移物の構造や種類を予測することが可能となった。今後、この受容体選択性を有用なオリゴ糖や配糖体創出のためのツールとして利用することが期待される。

第５節　要約

コージビオースホスホリラーゼ（KP; EC 2.4.1.230）の糖転移反応を用いて、グリセロールや*myo*-イノシトールの糖転移物を酵素合成した。グリセロールを受容体とした場合、主として 2 種類の糖転移物、糖質 A, B が生成した。構造解析の結果、糖質 A はα-D-glucopyranosyl-(1→1)-glycerol、糖質 B はα-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-D-glucopyranosyl-(1→1)-glycerol（kojibiosyl-(1→1)-glycerol）であることがわかった。これらグリコシルグリセロールの構造から、KP はグリセロールの 1 位水酸基へグルコシル転移反応を触媒していた。それに対して、*myo*-イノシトールが受容体の場合、4 種類の糖転移物、糖質 1, 2, 3 および 4 が生成した。糖質 1 の構造はα-D-glucopyranosyl-(1→1)-*myo*-inositol、糖質 2 の構造は α-D-glucopyranosyl-(1→5)-*myo*-inositol であった。糖質 3 は糖質 1 のグルコース残基にさらにグルコース分子が α-1,2 結合したα-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-D-glucopyranosyl-(1→1)-*myo*-inositol（kojibiosyl-(1→1)-*myo*-inositol）、糖質 4 は糖質 2 のグルコース残基にさらにグルコース分子がα-1,2 結合した α-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-D-glucopyranosyl-(1→5)-*myo*-inositol（kojibiosyl-(1→5)-*myo*-inositol）であった。KP は*myo*-イノシトールの 1 または 5 位水酸基へグルコシル転移した。これら糖転移物の構造解析より、グリセロールと *myo*-イノシトール分子中にはグルコース分子の 2, 3 および 4 位水酸基に対応する、連続する 3 つの水酸基からなる「共通の構造」が認められた。本構造中の 3 つの水酸基の配位はすべてエカトリアル型であった。この構造が KP の基質認識の最小単位であると考えられた。KP は連続する 3 つの水酸基の配位がすべてエカトリアル型の構造、すなわち、グリセロールの構造を認識し、その 1 位にあたる水酸基（グリセロールの 1 位、グルコースの 2 位、さらには *myo*-イノシトールの 1 位および 5 位水酸基）に対して厳密にグルコシル転移反応を触媒していることが強く示唆された。

総括

新規な機能性オリゴ糖の生産を実現させるため、コージビオースホスホリラーゼ（KP）の遺伝子クローニングおよびその遺伝子解析、取得した酵素遺伝子を大量に発現させるための、枯草菌を宿主とした高発現宿主ーベクター系の構築、本発現系で得られた組換え酵素を用いた非還元性三糖セラギノースの効率的な酵素合成とその機能性調査、さらには、より有用な機能性オリゴ糖の生産に発展させるための可能性の検証として、遺伝子工学的手法を用いた KP の機能改変、KP の受容体基質の特異性ならびにその認識機構の解明を行った。以下に本研究の結果をまとめた。

α-1,2 グルコシド結合を選択的に生成する唯一の加リン酸分解酵素、コージビオースホスホリラーゼ（KP）の構造遺伝子を *Thermoanaerobacter brockii* ATCC35047 株染色体 DNA よりクローニングした。KP 遺伝子（*kojP*）は 775 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードし、その分子量は 89699 Da と計算された。これは、SDS-PAGE により概算された KP 精製酵素の分子量 83000 Da とほぼ一致した。本酵素のアミノ酸配列は、glycoside hydrolase family 65（GH-65）に属す他のホスホリラーゼ、トレハロースホスホリラーゼ（TP、*T. brockii* 由来）やマルトースホスホリラーゼ（MP、*Bacillus* sp. 由来および *Lactobacillus brevis* 由来）とそれぞれ 35%, 29%, 28%の相同性を示した。立体構造が明らかな *L. brevis* 由来 MP とアミノ酸配列を比較したところ、MP の 2 つの触媒残基および活性部位を構成する残基がほぼ完全に保存されていた。KP 遺伝子を大腸菌宿主内で高発現させたところ、その発現量は 780 U/g-wet cells であり、*T. brockii* での発現量と比較して約 700 倍に達した。より詳細な構造と機能との相関を明らかにするため、KP の部位特異的変異解析を行った。その結果、Asp-362, Lys-614 および Glu-642 は触媒反応に重要な残基であることが推定された。このうち、Asp-362 は立体構造既知の *L. brevis* 由来 MP の触媒残基 Asp-359 に、また Lys-614 残基は同 MP の活性中心に位置する Lys-592 にそれぞれ対応するアミノ酸残基であった。さらに、Asp-459 残基への変異導入によって、コージビオース、β-G1P、グルコースに対する K_m 値がそれぞれ 7 倍、11 倍、7 倍に増大する知見が得られた。このとき、無機リン酸に対する K_m 値はほとんど変化していなかったことから、Asp-459 は糖の結合に関与している残基であると推測された。*kojP* 遺伝子の下流には、3 つの ORF, *kojE*, *kojF* および *kojG* が認められた。*KojE* と *kojF* のアミノ酸配列は、*T. tengcongensis* MB4 由来ペリプラズム糖結合蛋白質の N 末端および C 末端領域とそれぞれ高い相同性（88%と 92%）を示した。さらに、*B. halodurans* C-125 株の糖輸送系を構成する糖結合蛋白質の N 末端および C 末端領域とそれぞれ 39%, 44%の相同性が認められた。また、*kojG* のアミノ酸配列は *T. tengcongensis* MB4 由来 ABC 型糖輸送系のパーミアーゼと 47%の相同性を示した。*KojP* を含むこれら一連の遺伝子群は、あ

る種の遺伝子オペロンを形成していることが示唆された。

オリゴ糖をはじめとする有用物質の生産を実現するためには、目的とする酵素を効率よく生産させる必要がある。そこで、KP およびその類縁酵素であるトレハロースホスホリラーゼ（*T. brockii* 由来, TP）の大量生産を目的として、枯草菌を宿主とした高発現系の構築を行った。プラスミド pUB110 上に *Bacillus amyloliquefaciens* 由来 α-アミラーゼプロモーターとその下流に KP または TP 遺伝子を連結し、KP, TP の高発現ベクターをそれぞれ作製した。得られた組換え枯草菌を用いて KP, TP の活性発現を調査したところ、両酵素活性はいずれも菌体内にのみ認められ、リゾチーム処理によって容易に発現酵素を可溶化することができた。KP, TP 遺伝子組換え枯草菌の培養の経時変化を詳細に調査した結果、組換え KP の発現量は培養 40 時間目で最も高く、その発現量は培養液 1 L 当たり 2.1 g に達した。これは、*T. brockii* での発現量の約 15000 倍であった。組換え TP の場合は、培養 48 時間目で最も発現量が高く、培養液 1 L 当たり 4.9 g に達していた。これは、*T. brockii* での発現量の約 13000 倍であった。SDS-PAGE の結果、KP, TP いずれにおいても調製した酵素液中のタンパクの大部分が発現した酵素タンパクであることが確認された。この系を用いることで種々の酵素の大量生産が可能となり、それら酵素を用いた有用オリゴ糖製造の可能性を開いた。

KP, TP を用いた機能性オリゴ糖の生産を目的として、枯草菌を宿主として発現させた組換え KP および TP を用いてトレハロースから非還元性三糖セラギノースを酵素合成した。得られたセラギノースは純度 96.2%、固形分 433 g で、セラギノースの反応液からの回収率は 13.5%であった。機能性調査の一環として、セラギノースの *in vitro* 消化性試験を行った。セラギノースは唾液アミラーゼ、胃酸、膵液アミラーゼおよびラット小腸粘膜酵素のいずれにおいても消化されなかったことから、本糖質は難消化性糖質であることが示唆された。さらなる機能性調査により、セラギノースの有する種々の生理機能が解明されつつある。

KP と TP を組み合わせることにより、これまで調製が困難であった種々のコージオリゴ糖の生産が容易となり、有用なオリゴ糖開発の可能性を開いた。これをさらに付加価値の高いものにするための可能性の検証として、酵素の機能改変を行った。まず、ランダム変異による KP の改変を試みた。KP 遺伝子上の推定触媒残基を含む約 1.3 kb の遺伝子領域に、error-prone PCR 法によりにランダム変異を導入し、耐熱化酵素 1 種ならびに生成物の重合度が高分子側にシフトした DP 変異酵素 2 種類を得た。耐熱化酵素 D513N は反応至適温度が 67.5－70℃、pH 5.5, 1 時間の保持条件下において 67.5℃まで安定であった。野生型 KP よりも反応至適温度および熱安定性がそれぞれ 5℃高温側にシフトしていた。さらに、60℃、70℃および 75℃における活性半減期 $t_{1/2}$ を調査したところ、D513N 酵素の活性半減期は 60℃で 135 hr、70℃で 110 min、75℃で 6 min であり、野生型酵素の場合のそれぞれ 1.6 倍、7 倍、6 倍に増加していた。*Lactobacillus brevis* 由来 MP の立体構造より、Asp-513 は KP の α-ヘリックス構造を構成しているということ

が予想された。さらに、Asp-513 は Glu-492 の側鎖に近接していた。これら知見より、本変異試験で得られた耐熱化酵素 D513N は、Asp-513 から Asn へのアミノ酸置換を介して側鎖間の負電荷の反発が解消されたことによりα-ヘリックス構造が安定化し、その結果酵素の熱安定性向上がもたらされたと推測された。また、本変異酵素の比活性は 64.1 U/mg、各基質に対する K_m 値はそれぞれ 1.06 mM（コージビオース）、1.15 mM（無機リン酸）、0.47 mM（β-G1P）および 3.72 mM（グルコース）であり、野生型酵素と同等であったことから、KP の活性部位は Asp-513 から Asn への置換による直接的な影響を受けなかったことが推測された。DP 変異酵素 S676N、N687I は、ともに野生型酵素に比べて重合度が大きいコージオリゴ糖の生成が認められた。特に S676N 酵素の場合、DP5（コージペンタオース）の生成率が野生型酵素のそれの約 3 倍であり、野生型酵素では検出されなかった重合度 6 以上のオリゴ糖の割合が、S676N では約 14%に達していた。この S676N 酵素を用いたコージオリゴ糖生成試験を行ったところ、糖供与体であるβ-G1P の濃度が 200 mM、糖受容体のグルコースが 12.5 mM の濃度条件で DP14（コージテトラカイデカオース）までのコージオリゴ糖の生成が確認された。このとき、対照の野生型 KP では DP9（コージノナオース）までのオリゴ糖しか生成しなかった。本試験における S676N 酵素でのコージオリゴ糖の平均重合度は 7.4 で、野生型 KP での最高値 5.3 を大きく上回った。立体構造の観点から推測すると、DP 変異酵素で認められたアミノ酸置換はリン酸結合部位に近接し、活性部位の内側に位置していた。このことから、KP の活性部位は本試験での変異によって重合度の大きいオリゴ糖が受容体となるのに有利な構造に変化した可能性が考えられた。重合度が 3 以上のコージオリゴ糖は難消化性であり、可溶性食物繊維としての応用が期待される。一般に、重合度が大きいほど食物繊維としての効果も大きいことから、本 DP 変異酵素によって、より効果が期待される高重合度オリゴ糖の生成が可能となった。

次に、キメラ化による酵素特性のダイナミックな改変を目指し、KP と TP の間でキメラ酵素を作製した。5 種類の活性型キメラ酵素のうち、4 種類のキメラ酵素、II, III, I-III および V-III は KP 活性を、残り 1 種類のキメラ IV-I 酵素は TP 活性を有していた。特に、キメラ酵素 V-III は全 785 アミノ酸残基中 125 残基のみが野生型 KP に由来しているにもかかわらず、KP 型酵素であった。KP と TP はいずれも、β-G1P を糖供与体とした糖転移反応を触媒する酵素であることから、キメラ化により組換わった 125 アミノ酸残基は、KP の特異性を決定する領域、すなわち基質受容体が結合する領域であることが強く示唆された。キメラ酵素 V-III の酵素的諸性質を調査した結果、同酵素の反応最適 pH は 5.5 付近、pH 安定性は 4.6-9.5 で安定であり、野生型 KP とほとんど差が認められなかった。一方、反応最適温度は 35℃付近、温度安定性は 50℃以下で安定であり、野生型酵素よりそれぞれ約 30℃、約 15℃低かった。また、合成活性に対する比活性は野生型 KP の約 1%に低下し、各基質に対する速度パラメータも著しく変化していた。基質特異性を評価したところ、野生型 KP が無機リン酸存在下において、コージビオースのみ

を厳密に加リン酸分解するのに対して、本キメラは、α-グルコシド結合を加リン酸分解する酵素に由来するにもかかわらず、β-グルコシド結合を持つソホロースやラミナリビオースに作用して転移糖を生成した。キメラ酵素と野生型酵素の構造面での違いについて解析したところ、キメラ V-III は単量体であり、野生型 KP や TP のようなオリゴマー構造をとらないことが示唆された。また、MP の立体構造に基づく分子モデリングにより、キメラ酵素の受容体基質の結合部位周辺の構造が大きく変化していることが推測された。以上のことから、キメラ酵素 V-III と野生型 KP における酵素的諸性質の違いは、キメラ化によって生じた酵素間の構造的な相違に起因していると考えられた。KP, TP という類縁酵素同士のキメラ化によって、反応特異性が大きく変化した酵素が作製された。キメラ化は、種々の改変酵素の構築に有効なツールとなることが示唆された。

酵素の受容体基質に対する特異性ならびに基質認識機構を明らかにすることは、有用なオリゴ糖や配糖体を合成するための有効なツールとなる。そこで、より詳細な KP の受容体基質に対する特異性を調査し、糖転移反応により生成したグリセロールおよび *myo*-イノシトールの糖転移物の構造解析から KP の受容体認識機構の解明を目指した。グリセロールを受容体とした場合、主として 2 種類の糖転移物、糖質 A, B が生成した。構造解析の結果、糖質 A は α-D-glucopyranosyl-(1→1)-glycerol 、糖質 B は α-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-D-glucopyranosyl-(1→1)-glycerol（kojibiosyl-(1→1)-glycerol）であることがわかった。これらグリコシルグリセロールの構造から、KP はグリセロールの 1 位水酸基へグルコシル転移反応を触媒していた。それに対して、*myo*-イノシトールが受容体の場合、4 種類の糖転移物、糖質 1, 2, 3 および 4 が生成した。糖質 1 の構造はα-D-glucopyranosyl-(1→1)-*myo*-inositol、糖質 2 の構造はα-D-glucopyranosyl-(1→5)-*myo*-inositol であった。糖質 3 は糖質 1 のグルコース残基にさらにグルコース分子がα-1,2 結合した α-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-D-glucopyranosyl-(1→1)-*myo*-inositol （kojibiosyl-(1→1)-*myo*-inositol）、糖質 4 は糖質 2 のグルコース残基にさらにグルコース分子がα-1, 2 結合した α-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-D-glucopyranosyl-(1→5)-*myo*-inositol（kojibiosyl-(1→5)-*myo*-inositol）であった。KP は *myo*-イノシトールの 1 または 5 位水酸基へグルコシル転移した。これら糖転移物の構造解析より、グリセロールと *myo*-イノシトール分子中にはグルコース分子の 2, 3 および 4 位水酸基に対応する、連続する 3 つの水酸基からなる「共通の構造」が認められた。本構造中の 3 つの水酸基の配位はすべてエカトリアル型であった。この構造が KP の基質認識の最小単位であると考えられた。KP は連続する 3 つの水酸基の配位がすべてエカトリアル型の構造、すなわち、グリセロールの構造を認識し、その 1 位にあたる水酸基（グリセロールの 1 位、グルコースの 2 位、さらには *myo*-イノシトールの 1 位および 5 位水酸基）に対して厳密にグルコシル転移反応を触媒していることが強く示唆された。これにより、用いた受容体から生成する糖転移物の構造や種類の予測ができ、KP の高い受容体選択性を有用なオリゴ糖や配糖体創出の

ためのツールとして利用することが可能となった。

以上、本研究において、*T. brockii* ATCC35047 株由来コージビオースホスホリラーゼ（KP）の遺伝子クローニングおよびその遺伝子解析を行った。得られた KP 遺伝子を用いて枯草菌を宿主とした高発現宿主ーベクター系を構築し、工業化に耐えうる高発現化を実現させた。さらに、本発現系で得た組換えホスホリラーゼを用いたセラギノースの効率的製造を行い、本糖質の有する種々の機能性を明らかにした。また、得られた KP 遺伝子を用いて遺伝子工学的手法による KP の機能改変を行い、耐熱化変異酵素、DP 変異酵素、キメラ酵素をそれぞれ取得するとともに、KP の高い基質認識性を明らかにした。これらは更なる新規機能性オリゴ糖生産への可能性を開くものと考えられた。今後さらに、有用なオリゴ糖や新規なオリゴ糖が合成され、それらの食品や化粧品分野のみならず多方面での用途が期待される。

引用文献

1. **Sato, A. and Aso, K.:** Kojibiose (2-*O*-α-D-glucopyranosyl-D-glucose): Isolation and structure. Isolation from hydrol. Nature, **180**, 984-985 (1957).

2. **Takahashi, M., Shimomura, T., and Chiba, S.:** Biochemical studies on buckwheat α-glucosidase. Part III. Transglucosylation action of the enzyme and isolation of the reaction products. *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1399-1410 (1969).

3. **Fujimoto, H., Nishida, H., and Ajisaka, K.:** Enzymatic synthesis of glucobiose by a codensation reaction with α-glucosidase, β-glucosidase and glucoamylase. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1345-1351 (1988).

4. **Kitao, S., Yoshida, S., Horiuchi, T., Sekine, H., and Kusakabe, I.:** Formation of kojibiose and nigerose by sucrose phosphorylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 790-791 (1994).

5. **Chaen, H., Yamamoto, T., Nishimoto, T., Nakada, T., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y.:** Purification and characterization of a novel phosphorylase, kojibiose phosphorylase, from *Thermoanaerobium brockii.* J. Appl. Glycosci., **46**, 423-429 (1999).

6. **Chaen, H., Nishimoto, T., Nakada, T., Fukuda, S., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y.:** Enzymatic synthesis of kojioligosaccharides using kojibiose phosphorylase. J. Biosci. Bioeng., **92**, 173-176 (2001).

7. **Chaen, H., Nishimoto, T., Nakada, T., Fukuda, S., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y.:** Enzymatic synthesis of novel oligosaccharides from L-sorbose, maltose, and sucrose using kojibiose phosphorylase. J. Biosci. Bioeng., **92**, 177-182 (2001).

8. **Watanabe, H., Higashiyama, T., Aga, H., Nishimoto, T., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y.:** Enzymatic synthesis of a 2-*O*-α-D-glucopyranosyl cyclic tetrasaccharide by kojibiose phosphorylase. Carbohydr. Res., **340**, 449-454 (2005).

9. **Chaen, H., Nishimoto, T., Yamamoto, T., Nakada, T., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M.,**

and Tsujisaka, Y.: Formation of a nonreducing trisaccharide, selaginose, from trehalose by cell-free system of *Thermoanaerobium brockii.* J. Appl. Glycosci., **46**, 129-134 (1999).

10. **Arguelles, J. C.:** Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. Arch. Microbiol., **174**, 217-224 (2000).

11. **Chaen, H., Nakada, T., Nishimoto, T., Kuroda, N., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y.:** Purification and characterization of thermostable trehalose phosphorylase from *Thermoanaerobium brockii.* J. Appl. Glycosci., **46**, 399-405 (1999).

12. **Maruta, K., Mukai, K., Yamashita, H., Kubota, M., Chaen, H., Fukuda, S., and Kurimoto, M.:** Gene encoding a trehalose phosphorylase from *Thermoanaerobacter brockii* ATCC35047. Biosci. Biotechnol. Biochem., **66**, 1976-1980 (2002).

13. **Nakada, T., Nishimoto, T., Chaen, H., and Fukuda, S.:** Kojioligosaccharides: Application of kojibiose phosphorylase on the formation of various kojioligosaccharides (Proceedings of ACS symposium series 849)., American chemical society, 104-117 (2003).

14. **Sanz, M. L., Gibson, G. R., and Rastall, R. A.:** Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity in vitro. J. Agric. Food. Chem., **53**, 5192-5199 (2005).

15. **Kitaoka, M., and Hayashi, K.:** Carbohydrate-processing phosphorolytic enzymes. Trends Glycosci. Glycotechnol., **14**, 35-50 (2002).

16. **Kitaoka, M., Tian, J., and Nishimoto, M.:** Novel putative galactose operon involving lacto-N-biose phosphorylase in Bifidobacterium longum. Appl. Environ. Microbiol., **71**, 3158-3162 (2005).

17. **Derensy-Dron, D., Krzewinski, F., Brassart, C., and Bouquelet, S.:** β-1,3-Galactosyl-*N*-acetylhexosamine phosphorylase from *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082: characterization, partial purification and relation to mucin degradation. Biotechnol. Appl. Biochem., **29**, 3-10 (1999).

18. **Park, J. D., Keyhani, N. O., and Roseman, S.:** Chitin catabolism in the marine bacterium *Vibrio furnissii*: identification, molecular cloning and characterization of a *N,N'*-diacetylchitobiose

phosphorylase. J. Biol. Chem., **275**, 33077-33083 (2000).

19. **Honda, Y., Kitaoka, M., and Hayashi, K.:** Reaction mechanism of chitobiose phosphorylase from *Vibrio proteolyticus*: Identification of family 36 glycosyltransferase in *Vibrio*. Biochem. J., **377**, 225-232 (2004).

20. **Murao, S., Nagano, S., Ogura, S., and Nishino, T.:** Enzymatic synthesis of trehalose from maltose. Agric. Biol. Chem., **49**, 2113-2118 (1985).

21. **Saito, K., Kase, T., Takahashi, E., Takahashi, E., and Horinouchi, S.:** Purification and characterization of a trehalose synthase from the basidiomycete Grifola frondosa. Appl. Environ. Microbiol., **64**, 4340-4345 (1998).

22. **Kitaoka, M., Sasaki, T., and Taniguchi, H.:** Conversion of sucrose into cellobiose using sucrose phosphorylase, xylose isomerase and cellobiose phosphorylase. Denpun Kagaku, **39**, 281-283 (1992).

23. **Kitaoka, M., Sasaki, T., and Taniguchi, H.:** Conversion of sucrose into laminaribiose using sucrose phosphorylase, xylose isomerase and laminaribiose phosphorylase. Denpun Kagaku, **40**, 311-314 (1993).

24. **Waldmann, H., Gygax, D., Bednarski, M. D., Shangraw, R., and Whitesides, G. M.:** The enzymic utilization of sucrose in the synthesis of amylase and derivatives of amylase, using phosphorylases. Carbohydr. Res., **157**, c4-c7 (1986).

25. **Ohdan, K., Fujii, K., Yanase, M., Takaha, T., and Kuriki, T.:** Phosphorylase coupling as a tool to convert cellobiose into amylase. J. Biotechnol., **127**, 496-502 (2007).

26. **Saito, H. and Miura, K.:** Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. Biochem. Biophys. Acta, **72**, 619-629 (1963).

27. **Birnboim, H. C. and Doly, J.:** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res., **7**, 1513-1523 (1979).

28. **Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J.:** Molecular cloning: a laboratory manual, 1st ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1983).

29. **Inoue, Y., Yasutake, N., Oshima, Y., Yamamoto, Y., Tomita, T., Miyoshi, S., and Yatake, T.:** Cloning of the maltose phosphorylase from *Bacillus* sp. strain RK-1 and efficient production of the cloned gene and the trehalose phosphorylase gene from *Bacillus stearothermophilus* SK-1 in *Bacillus subtilis*. Biosci. Biotechnol. Biochem., **66**, 2594-2599 (2002).

30. **Lloyd, J. B., and Whelan, W. J.:** An improved method for enzymatic determination of glucose in the presence of maltose. Anal. Biochem., **30**, 467-470 (1969).

31. **Fiske, C. H. and Subbarow, A.:** The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., **66**, 375-400 (1925).

32. **Egloff, M.-P., Uppenberg, J., Haalck, L., and van Tilbeurgh, H.:** Crystal structure of maltose phosphorylase from *Lactobacillus brevis*: unexpected evolutionary relationship with glucoamylases. Structure, **9**, 689-697 (2001).

33. **Bao, Q., Tian, Y., Li, W., Xu, Z., Xuan, Z., Hu, S., Dong, W., Yang, J., Chen, Y., Xue, Y., Xu, Y., Lai, X., Huang, L., Dong, X., Ma, Y., Ling, L., Tan, H., Chen, R., Wang, J., Yu, J., and Yang, H.:** A complete sequence of *Thermoanaerobacter tengcongensis* genome. Genome Res., **12**, 689-700 (2002).

34. **Takami, H., Nakasone, K., Takaki, Y., Maeno, G., Sasaki, R., Masui, N., Fuji, F., Hirama, C., Nakamura, Y., Ogasawara, N., Kuhara, S., and Horikoshi, K.:** Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res, **28**, 4317-4331 (2000).

35. **Paloheimo, M., Haglund, D., Aho, S., and Korhola, M.:** Production of cyclomaltodextrin glucanotransferase of *Bacillus circulans* var. *alkalophilus* ATCC21783 in *Bacillus subtilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol., **36**, 584-592 (1992).

36. **Stephen, R. F., and Kathryn, E. F.:** Expression of the Staphylococcal Protein A Gene in *Bacillus subtilis* by Gene Fusions Utilizing the Promoter from a *Bacillus amyloliquefaciens* α-Amylase Gene. J. Bacteriology, **165**, 796-804 (1986).

37. **Matsuda, K., Watanabe, H., Fujimoto, K., and Aso, K.:** Isolation of nigerose and kojibiose from dextrans. Nature, **191**, 278 (1961).

38. **Chang, S., and Cohen, S. N.:** High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by Plasmid DNA. Molec. Gen. Genet., **168**, 111-115 (1979).

39. **Ohse, M., Takahashi, K., Kadowaki, Y., and Kusaoke, H.:** Effects of plasmid DNA sizes and several other factors on transformation of *Bacillus subtilis* ISW1214 with plasmid DNA by electroporation. Biosci. Biotech. Biochem., 59, 1433-1437 (1995).

40. **Laemmli, U. K.:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriopharge T4. Nature, **227**, 680-685 (1970).

41. **Fischer, M., and Kandler, O.:** Identifizierung von selaginose und deren verbeitung in gattung Selaginella. Phytochemistry, **14**, 2629-2633 (1975). (in Germany)

42. **Kurimoto, M., Nishimoto, T., Nakada, T., Chaen, H., Fukuda, S., and Tsujisaka, Y.:** Synthesis by an α-Glucosidase of Glycosyl-trehaloses with an Isomaltosyl Residue. Biosci. Biotechnol. Biochem., **61**, 699-703 (1997).

43. **Okada, K., Yoneyama, M., Mandai, H., Aga, H., Sakai, S., and Ichikawa, T.:** Digestion and fermentation of pullulan. Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi, **43**, 23-29 (1990). (in Japanese)

44. **Yanase, M., Takata, H., Fujii, K., Takaha, T., and Kuriki, T.:** Cumulative effect of amino acid replacements results in enhanced thermostability of Potato type L a-glucan phosphorylase. Appl. Environ. Microbiol., **71**, 5433-5439 (2005).

45. **Fujii, K., Miyagawa, H., Terada, Y., Takaha, T., and Kuriki, T.:** Use of random and saturation mutagenesis to improve the properties of Thermus aquaticus amylomaltase for efficient production

of cycloamyloses. Appl. Environ. Microbiol., **71**, 5823-5827 (2005).

46. **Parikh, M. R., and Matsumura, I.:** Site-saturation mutagenesis is more efficient than DNA shuffling for the directed evolution of beta-fucosidase from beta-galactosidase. J. Mol. Biol., **352**, 621-628 (2005).

47. **Yamamoto, T., Nishimoto, T., Chaen, H., and Fukuda, S.:** Improvement of the enzymatic properties of kojibiose phosphorylase from *Thermoanaerobium brockii* by random mutagenesis and chimerization. Proceedings of the symposium on amylases and related enzymes, 2005. J. Appl. Glycosci., **53**, 123-129 (2006).

48. **Henrissat, B.:** A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J., 280, 309-316 (1991).

49. **Yano, T., Oue, S., and Kagamiyama, H.:** Directed evolution of an aspartate aminotransferase with new substrate specificities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 5511-5515 (1998).

50. **Adrio, J. L., and Demain, A. L.:** Genetic improvement of processes yielding microbial products. FEMS. Microbiol. Rev., **30**, 187-214 (2006).

51. **Juers, D. H., Huber, R. E., and Matthews, B. W.:** Structural comparisons of TIM barrel proteins suggest functional and evolutionary relationships between β-galactosidase and other glycohydrolases. Prot. Sci., **8**, 122-136 (1999).

52. **Allen, S. J., and Holbrook, J. J.:** Production of an activated form of *Bacillus stearothermophilus* L-2-hydroxyacid dehydrogenase by directed evolution. Prot. Eng., **13**, 5-7 (2000).

53. **Hagihara, H., Igarashi, K., Hayashi, Y., Kitayama, K., Endo, K., Ozawa, T., Ozaki, K., Kawai, S., and Ito, S.:** Improvement of thermostability of a calcium-free α-amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. by protein enginnering. J. Appl. Glycosci., **49**, 281-289 (2002).

54. **Ohdan, K., Kuriki, T., Takata, H., Kaneko, H., and Okada, S.:** Introduction of raw starch-binding domains into *Bacillus subtilis* α-amylase by fusion with the starch-binding domain of *Bacillus*

cyclomaltodextrin glucanotransferase. Appl. Environ. Microbiol., 66, 3058-3064 (2000).

55. **Fujiwara, S., Kakihara, H., Woo, K. B., Lejeune, A., Kanemoto, M., Sakaguchi, K., and Imanaka, T.:** Cyclization characteristics of cyclodextrin glucanotransferase are conferred by the NH_2-terminal region of the enzyme. Appl. Environ. Microbiol., **58**, 4016-4025 (1992).

56. **Kuriki, T., Stewart, D. C., and Preiss, J.:** Construction of chimeric enzymes out of maize endosperm branching enzymes I and II : activity and properties. J. Biol. Chem., **272**, 28999-29004 (1997).

57. **Sugimoto, M., Ohta, T., and Kawai, F.:** Change in maltose- and soluble starch-hydrolyzing activities of chimeric α-glucosidases of *Mucor javanicus* and *Aspergillus oryzae*. Biochim. Biophys. Acta, **1645**, 1-5 (2003).

58. **Funane, K., Ishii, T., Terasawa, K., Yamamoto, T., and Kobayashi, M.:** Construction of chimeric glucansucrases for analyzing substrate-binding regions that affect the structure of glucan products. Biosci. Biotechnol. Biochem., **68**, 1912-1920 (2004).

59. **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. Y.:** Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265-275 (1951).

60. **Davis, B. J.:** Disk electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404-427 (1964).

61. **Beernink, P. T., and Tolan, D. R.:** Disruption of aldolase A tetramer into catalytically active monomers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 5374-5379 (1996).

62. **Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R., and Wierenga, R, K.:** A double mutation at the tip of the dimmer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. Biochem., **36**, 9655-9662 (1996).

63. **Velichko, I, S., Mikalahti, K., Kasho, V. N., Dudarenkov, V. Y., Hyytia, T., Goldman, A., Cooperman, B. S., Lahti, R., and Baykov, A. A.:** Trimeric inorganic pyrophosphatase of

Escherichia coli obtained by directed mutagenesis. Biochem., **37**, 734-740 (1998).

64. **Andersson, U., Levander, F., and Radstrom, P.:** Trehalose-6- phosphate phosphorylase is part of a novel metabolic pathway for trehalose utilization in *Lactococcus lactis*. J. Biol. Chem., **276**, 42707-42713 (2001).

65. **Kalf, G. F., and Rieder, S. V.:** The preparation and properties of trehalase. J. Biol. Chem., **230**, 691-698 (1958).

66. **Kitaoka, M., Sasaki, T., and Taniguchi, H.:** Phosphorolytic reaction of *Cellvibrio gilvus* cellobiose phosphorylase. Biosci. Biotechnol. Biochem., **56**, 652-655 (1992).

67. **Kitaoka, M., Sasaki, T., and Taniguchi, H.:** Synthetic reaction of *Cellvibrio gilvus* cellobiose phosphorylase. J. Biochem., **112**, 40-44 (1992).

68. **Kitaoka, M., Taniguchi, H., and Sasaki, T.:** Production of glucosyl-xylose using *Cellvibrio gilvus* cells and its properties. Appl. Microbiol. Biotechnol., **34**, 178-182 (1990).

69. **Tariq, M. A., Hayashi, K., Tokuyasu, K., and Nagata, T.:** Synthesis and structural analysis of disaccharides of 4-*O*-β-D-glucopyranosyl-D-glucosamine and 4-*O*-β-D-glucopyranosyl-2-deoxy-D-glucose. Carbohydr. Res., **275**, 67-72 (1995).

70. **Tariq, M. A. and Hayashi, K.:** Synthesis of three hetero disaccharides, 4-*O*-β-D-glucopyranosyl-6-deoxy-D-glucose, 4-*O*-β-D-glucopyranosyl-D-mannosamine, and 4-*O*-β-D-glucopyranosyl-D-mannose, and confirmation of their structures by C-13 NMR and MS. Biochem. Biophys. Res. Commun., **214**, 568-575 (1995).

71. **Percy, A., Ono, H., Watt, D., and Hayashi, K.:** Synthesis of β-D-glucopyranosyl-(1→4)-D-arabinose, β-D-glucopyranosyl-(1→4)-L-fucose and β-D-glucopyranosyl-(1→4)-D-altrose catalyzed by cellobiose phosphorylase from *Cellvibrio gilvus*. Carbohydr. Res., **305**, 543-548 (1997).

72. **Percy, A., Ono, H., and Hayashi, K.:** Acceptor specificity of cellobiose phosphorylase from *Cellvibrio gilvus*: synthesis of three branched trisaccharides. Carbohydr. Res., **308**, 423-429 (1998).

73. **Mieyal, J. J. and Abeles, R. H.:** Disaccharide phosphorylases. (The enzymes, Boyer, P. D.), Academic Press, NewYork, 515-532 (1972).

74. **Kitao, S. and Sekine, H.:** Transglucosylation catalyzed by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of glucosyl-xylitol. Biosci. Biotechnol. Biochem., **56**, 2011-2014 (1992).

75. **Kitao, S., Ariga, T., Matsudo, T., and Sekine, H.:** The syntheses of catechin-glucosides by transglycosylation with *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase. Biosci. Biotechnol. Biochem., **57**, 2010-2015 (1993).

76. **Kitao, S. and Sekine, H.:** α-D-Glucosyl transfer to phenolic compounds by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of α-arbutin. Biosci. Biotechnol. Biochem., **58**, 38-42 (1994).

77. **Kitao, S., Matsudo, T., Sasaki, T., Koga, T., and Kawamura, M.:** Enzymatic synthesis of stable, odorless, and powdered furanone glucosides by sucrose phosphorylase. Biosci. Biotechnol. Biochem., **64**, 134-141 (2000).

78. **Takenaka, F., Uchiyama, H., and Imamura, T.:** Identification of α-glucosylglycerol in sake. Biosci. Biotechnol. Biochem., **64**, 378-385 (2000).

79. **Hagiwara, K., Tsuda, A., Ichikawa, T., Kanaya, K., Yoneyama, S., Sudo, H., and Iwao, H.:** Quantative analyses of fructooligosaccharides by gas liquid chromatography. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, **24**, 558-562 (1983). (in Japanese)

80. **Bradbury, J. H. and Jenkins, G. A.:** Determination of the structures of trisaccharides by 13C-n.m.r. spectroscopy. Carbohydr. Res., **126**, 125-156 (1984).

81. **Schweizer, T. F. and Horman, I.:** Purification and structure determination of three α-D-galacto-pyranosylcyclitols from soya bean. Carbohydr. Res., **95**, 61-71 (1981).

82. **Sato, M., Nakamura, K., Nagano, H., Yagi, Y., and Koizumi, K.:** Synthesis of glucosyl-inositol using a CGTase, isolation and characterization of the positional isomers, and assimilation profiles for intestinal bacteria. Biotechnol. Lett., **14**, 659-664 (1992).

参考論文

1. **Yamamoto, T., Maruta, K., Mukai, K., Yamashita, H., Nishimoto, T., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y.:** Cloning and sequencing of kojibiose phosphorylase gene from *Thermoanaerobacter brockii* ATCC35047. J. Biosci. Bioeng., **98**, 99-106 (2004).

2. **Yamamoto, T., Mukai, K., Yamashita, H., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y.:** Enhancement of thermostability of kojibiose phosphorylase from *Thermoanaerobacter brockii* ATCC35047 by random mutagenesis. J. Biosci. Bioeng., **100**, 212-215 (2005).

3. **Yamamoto, T., Mukai, K., Maruta, K., Watanabe, H., Yamashita, H., Nishimoto, T., Kubota, M., Chaen, H., and Fukuda, S.:** Hyper expression of kojibiose phosphorylase gene and trehalose phosphorylase gene from *Thermoanaerobacter brockii* ATCC35047 in *Bacillus subtilis* and selaginose synthesis utilizing two phosphorylases. J. Biosci. Bioeng., **100**, 343-346 (2005).

4. **Yamamoto, T., Watanabe, H., Nishimoto, T., Aga, H., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y.:** Acceptor recognition of kojibiose phosphorylase from *Thermoanaerobacter brockii*: Syntheses of glycosyl glycerol and -*mio*-inositol. J. Biosci. Bioeng., **101**, 427-433 (2006).

5. **Yamamoto, T., Yamashita, H., Watanabe, H., Nishimoto, T., Kubota, M., Chaen, H., and Fukuda, S.:** Construction and characterization of chimeric enzymes from kojibiose phosphorylase and trehalose phosphorylase from *Thermoanaerobacter brockii*. Carbohydr. Res., 341, 2350-2359 (2006).

その他論文

1. **Chaen, H., Nishimoto, T., Yamamoto, T., Nakada, T., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y.:** Formation of a nonreducing trisaccharide, selaginose, from trehalose by cell-free system of *Thermoanaerobium brockii.* J. Appl. Glycosci., **46**, 129-134 (1999).

2. **Chaen, H., Yamamoto, T., Nishimoto, T., Nakada, T., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y.:** Purification and characterization of a novel phosphorylase, kojibiose phosphorylase, from *Thermoanaerobium brockii.* J. Appl. Glycosci., **46**, 423-429 (1999).

3. **Yamamoto, T., Maruta, K., Watanabe, H., Yamashita, H., Kubota, M., Fukuda, S., and Kurimoto, M.:** Trehalose-producing operon *treYZ* from *Arthrobacter ramosus* S34. Biosci. Biotechnol. Biochem., **65**, 1419-1423 (2001).

4. **Aga, H., Maruta, K., Yamamoto, T., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y.:** Cloning and sequencing of the genes encoding cyclic tetrasaccharide-synthesizing enzymes from *Bacillus globisporus* C11. Biosci. Biotechnol. Biochem., **66**, 1057-1068 (2002).

5. **Yamamoto, T., Nishimoto, T., Nakada, T., Chaen, H., Fukuda, S., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y.:** Production of koji-oligosaccharides by kojibiose phosphorylase. Proceedings of the international symposium : New approaches in starch science and carbohydrate-active enzymes. J. Appl. Glycosci., **50**, 294-295 (2003).

6. **Yamamoto, T., Nishimoto, T., Chaen, H., and Fukuda, S.:** Improvement of the enzymatic properties of kojibiose phosphorylase from *Thermoanaerobium brockii* by random mutagenesis and chimerization. Proceedings of the symposium on amylases and related enzymes, 2005. J. Appl. Glycosci., **53**, 123-129 (2006).

謝辞

本論文の作成にあたり、懇切なるご指導とご助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科 小林 昭雄教授に衷心より感謝申し上げます。また、懇切なるご助言とご教示を賜りました大阪大学大学院工学研究科 金谷 茂則教授ならびに大阪大学大学院情報科学研究科 四方 哲也教授に謹んで感謝致します。

本論文の母校での発表にご高配下さり、懇切なるご指導とご助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 新名 惇彦教授に衷心より感謝の意を込めてお礼申し上げます。

本研究は、生研機構「新事業創出研究開発事業」の一環として、株式会社林原生物化学研究所 天瀬研究所（現研究センター 糖質研究部門）において遂行されたものであり、本論文を作成し発表する機会を与えて下さいました株式会社林原生物化学研究所代表取締役 林原 健社長、元株式会社林原参与 辻阪 好夫博士、株式会社林原常務取締役 栗本 雅司博士ならびに株式会社林原生物化学研究所 常務取締役 前天瀬研究所所長 福田 恵温博士に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、終始心温かいご指導とご鞭撻を賜りました天瀬研究所所長 茶圓 博人博士（現研究センター 糖質研究部門）、久保田 倫夫博士（現株式会社林原生物化学研究所 開発センター）に心から感謝致します。また、終始ご指導ご討論頂きました株式会社林原生物化学研究所 天瀬研究所 西本 友之博士（現研究センター 糖質研究部門）、阿賀 創博士（現研究センター 糖質研究部門）、山下 洋博士（現株式会社林原生物化学研究所 粧薬化学品センター）に深く感謝致します。

本研究は、株式会社林原生物化学研究所 天瀬研究所 丸田 和彦博士（現研究センター 糖質研究部門）、向井 和久博士（現株式会社林原生物化学研究所 開発センター）、渡邊 光氏（現研究センター 糖質研究部門）をはじめとする同研究所の皆様との共同研究によるものであり、喜びや苦しみを分かち合った諸氏に心から感謝の意を表します。

最後になりましたが、著者の研究を支えてくれました両親ならびに家族に感謝致します。