



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/914">https://hdl.handle.net/11094/914</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	山本拓生
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第21484号
学位授与年月日	平成19年6月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	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
論文審査委員	(主査) 教授 小林 昭雄 (副査) 教授 金谷 茂則 教授 四方 哲也 教授 原島 俊 教授 卜部 格 教授 福井 希一 教授 大竹 久夫 教授 塩谷 捨明 教授 仁平 卓也 教授 清水 浩

### 論文内容の要旨

本論文で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の機能変更、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。

緒論では、本研究の背景をなす知識を概説し、本論文の目的と意義について述べた。

第1章では、機能性オリゴ糖の生産を見据え、*Thermoanaerobacter brockii* ATCC35047株からのKP遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決定した。

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 $\alpha$ -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1L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。

総括では、本研究で得られた成果をまとめた。

## 論文審査の結果の要旨

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としての期待はますます高まっており、新しい機能性オリゴ糖の開発が望まれている。本論文は、機能性オリゴ糖として $\alpha$ -1、2 結合を有するコージオリゴ糖に焦点をあて、微生物由来ホスホリラーゼを用いた本オリゴ糖の生産を目指している。まず、 $\alpha$ -1、2 結合を選択的に生成するコージビオースホスホリラーゼ (KP) の構造遺伝子をクローニングし、枯草菌を宿主とし高発現化している。次に枯草菌で発現させた組換え酵素を用いて、安価なトレハロースから機能性を有するコージオリゴ糖の効率的な生産を行い、製造方法の確立と実証を行っている。さらに、より付加価値の高いオリゴ糖生産の可能性の検証として、KP の遺伝子工学的手法を用いた機能改変、KP の基質特異性の調査を試みている。

これら成果を要約すると以下のとおりである。

- (1) 嫌気性好熱菌 *Thermoanaerobacter brockii* 株から KP 遺伝子をクローニングしてその塩基配列を決定し、隣接して存在する糖の輸送に関与すると推定される遺伝子群とオペロン構造を形成していることを見出している。
- (2) KP 遺伝子ならびにその類縁酵素であるトレハロースホスホリラーゼ (TP) の遺伝子を、枯草菌を宿主として高発現化し、工業化に耐えうる酵素量の生産を実現している。
- (3) 組換え KP ならびに TP を組み合わせて、トレハロースからのコージオリゴ糖の効率的な生産を行い、コージオリゴ糖の 1 つである非還元性三糖セラギノースを製造し、その機能性を明らかにしている。
- (4) KP にランダム変異を導入し、熱安定性が向上した耐熱化変異酵素、コージオリゴ糖の重合度が変化した生成物変異酵素を取得している。取得した変異酵素の有用性を明らかにしている。
- (5) KP と TP を用いてキメラ酵素を作製し、特異性の改変された酵素の取得を試みている。
- (6) KP の基質特異性を幅広く調査し、グリセロールやミオイノシトールへ糖転移することを見出し、それら配糖体の構造を決定している。

以上のように、本論文は、微生物由来ホスホリラーゼを用いてコージオリゴ糖の効率的な製造法を確立するとともに、これまで全く知られていなかったコージオリゴ糖の機能性を明らかにしており、酵素工学ならびに応用生物工学の発展に寄与するところが大きい。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。