

てについて高度に精製できていることが明らかになった。しかし、それらを Native-PAGE に供したところ、B-his と X-his は単一のバンドを示したが、A-his はバンドがスミアになり、F-his では 2 本のバンドが確認された。なぜこのようになったかは不明であるが、結晶化に用いる酵素は B-his と X-his を選択した。この方法で、2L の LB 培地で培養した大腸菌約 10 g から 10 mg 以上の精製酵素が得られ、精製に要する時間は 1 日であり、当初の目的である簡便かつ大量に調製することに成功した。この酵素を用いて結晶化スクリーニングを行った結果、約一週間で Crystal Screen II 43, Index 71 など針状結晶などが得られた(図 2)。

【今後の展開】 今回のスクリーニングによって得られた結晶は回析実験を行えるものではなかったが、これらの条件

を基に、解析に適した結晶化条件をスクリーニングしていく予定である。解析に適した結晶が得られれば、構造解析を進め、この酵素の L-プロリンや NADH からの電子伝達経路の解析や応用利用を踏まえた機能改変などを行っていく予定である。

最後に、本研究を遂行するにあたり、ご理解をいただき、研究奨励金を賜りました財団法人農芸化学研究奨励会に深謝申し上げます。

- 1) H. Tsuge, R. Kawakami, H. Sakuraba, H. Ago, M. Miyano, K. Aki, N. Katunuma, and T. Ohshima, *J. Biol. Chem.* **280**, 31045-9 (2005).
- 2) R. Kawakami, H. Sakuraba, H. Tsuge, S. Goda, N. Katunuma, and T. Ohshima, *FEBS J.*, **272**, 4044-54 (2005).
- 3) R. Kawakami, H. Sakuraba, and T. Ohshima, *Extremophiles*, **8**, 99-108 (2004).

加水分解酵素の糖転移能を高めるための基質エンジニアリング

東北大学大学院工学研究科 小林厚志

【目的】 ゲノムプロジェクトの成果により、近年におけるポストゲノム研究の発展は目覚ましいものがある。酵素触媒反応もゲノムプロジェクトの恩恵にあずかり、数多くの酵素がクローニングされ、それらの諸性質が明らかになっている。また、酵素蛋白質の立体構造情報も簡単に利用可能になり、かつ、蛋白質の機能改変技術もここ数年で向上していることから、優れた触媒能を有する酵素蛋白質の出現が待たれるところである。しかしながら、このような条件がそろっているにもかかわらず、実際の反応系において組換え酵素蛋白質触媒が所望する機能や効率を示さないのも事実である。このことは、酵素反応の効率化において、遺伝子工学を用いる酵素構造の改良に関わる研究に重点がおかれ、実際の反応場および基質の構造に関する情報が軽視されているためである。

筆者は、酵素反応の効率化には基質の状態が重要であると考え、遺伝子工学に因らない、基質の活性化技術と高次構造化技術を用いる酵素触媒反応の基礎研究を行ってきた。最近の研究で澱粉の構成成分であるアミロースがらせん内に脂溶性分子を包接することを利用し、澱粉-糖脂質複合体を α -アミラーゼ基質として用いることにより、効率的な配糖化反応が進行することを明らかにした¹。この結果は水に難溶な化合物であっても、二つの基質分子を近接させることによって、酵素反応が進行するという

ことを示唆するものである。

本研究では、基質構造の制御が酵素触媒反応の効率化に最も重要な要因であることを示すために、 α -アミラーゼによる糖転移反応における糖脂質中のアグリコン部位の影響を評価した。

【実験方法】 超音波処理は、糖脂質と *Klebsiella pneumoniae* 由来のプルラナーゼ(天野エンザイム)により処理した可溶性澱粉との混合溶液に対し、20 kHz, 1.7 W/cm², 0°C で 30 分間照射することによって行った。糖アクセプターである糖脂質としては、phenyl, octyl 基をアグリコンとする β -グルコシドを用いた。超音波処理後の基質溶液に、所定濃度の TVAI を添加することで反応開始し、HPLC を用いて生成物の分離を行い、NMR 及び MALDI-TOF MS を用いて構造解析を行った。

【結果と考察】 MALDI-TOF MS により、octyl, phenyl どちらの β -グルコシドを用いた反応系においても、1~5 糖程度のオリゴ糖が転移した生成物の存在を確認した(図 1)。また、反応溶液の HPLC 解析により、octyl β -グルコシド反応系のみにおいて、多くの副生成物の存在を確認した(図 2)。それぞれのピークを HPLC により分取し、構造解析を行ったところ、 α -1,4 転移生成物のみを与える phenyl β -グルコシド反応系と異なり、octyl β -グルコシド反応系では、 α -1,4 結合以外にも α -1,3, α -1,6 結合を介して糖が転移した生成物を与えることが明らかになった。このことから、アグリコンの構造次第で糖転移反応生成物の結合様式を制御できることが示唆される。また、 α -アミラー

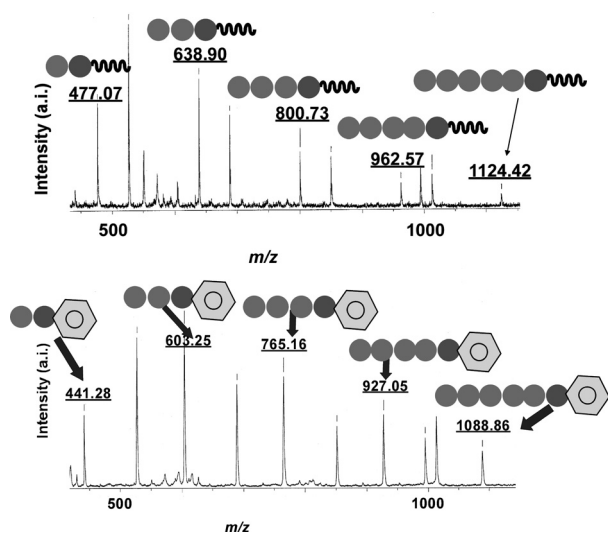


図1 糖転移反応生成物のMALDI-TOF MS解析 (上) オクチル-β-D-グルコシド (下) フェニル-β-D-グルコシドを糖受容体として糖転移反応を行なったときの反応生成物分布。

ぜによる α -1,3 転移反応はこれが初めての報告であり、これは直鎖の疎水性部分を有する octyl β -グルコシドと、澱粉のらせん内部の疎水部との相互作用により、特異的な酵素反応場が形成したためであると推測した。今後は、高分子である澱粉と糖脂質の混合状態の影響を評価するために、X線解析や熱測定を行っていく予定である。

【謝辞】 本研究にご理解、ご援助をいただきました(財)農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。また、ご推薦いただいた東京農工大学の坂野好幸名誉教授に深く御礼申し上げます。

リグニン分解中間物質を主鎖に含む高分子の合成と生分解性評価

東京農工大学大学院共生科学技術研究院 道信剛志

目的

化石燃料に依存したCO₂排出型社会から脱却し、カーボンニュートラル(CO₂循環型)社会への転換が望まれている。我々の研究グループでは、木材未利用バイオマス資源としてのリグニンに着目し、代謝過程に遺伝子工学技術を適用することで安定な中間物質 2H-pyran-2-one-4,6-dicarboxylic acid (PDC)を大量生産することに成功している。PDCは簡単な二塩基酸構造であるにもかかわらず、化学合成での報告例はない。すなわち、石油化学から得ら

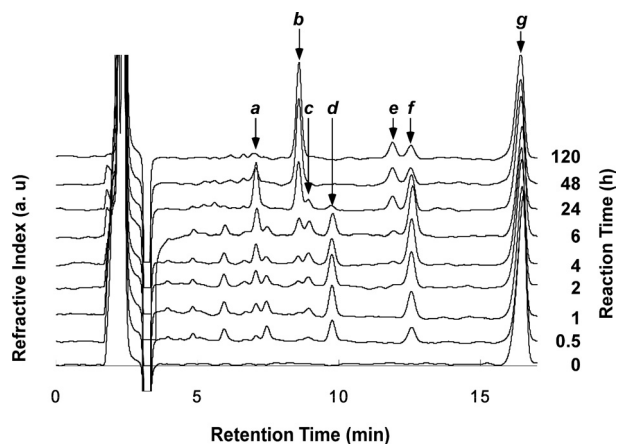


図2 オクチル-β-D-グルコシドを糖受容体としたときの反応生成物のHPLC解析 (a) イソパノシド (b) イソマルトシド (c) マルトシル- α -1,3-グルコシド (d) マルトトリオシド (e) ニゲロシド (f) マルトシド (g) グルコシド(原料)

参考文献

- 1 A. Kobayashi, H. Itoh, and S. Shoda, *Chemistry Letters*, 2005, 34, 1384-1385.

本研究に関する発表

- 1) 小林厚志, 山本憲司, 伊藤 博, 石原正規, 野口真人, 殿塚隆史, 坂野好幸, 正田晋一郎, *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 由来 α -アミラーゼの触媒作用による α (1-3)結合の生成, 2007年度日本農芸化学会大会
- 2) 山本憲司, 小林厚志, 石原正規, 野口真人, 伊藤 博, 殿塚隆史, 坂野好幸, 正田晋一郎, アグリコンの構造による α -アミラーゼの糖転移産物の結合制御, 第56回高分子学会年会(2007年)

れる既存材料にない特性を備えている可能性がある¹⁾。これまで明らかになったPDCの物性は、非常に強酸性およびアルカリ金属イオンとの非常に強い錯形成能がある。本研究では、4,6-位に二つのカルボン酸を有するPDCを二官能性モノマーとして捉え、主鎖骨格にPDCを含む溶媒可溶性高分子を合成することを目的とした。得られた高分子の熱特性および生分解性についても評価した。

結果および考察

まず、PDCとジオールモノマーを等モルで縮合重合させたが、生成するポリエステル(Polymer1)の分子量はオリゴマー程度に留まった(図1)^{2,3)}。そこで、均一溶液中で銅触媒存在下、効率よく反応進行するアルキンとアジドの付加環化反応を用いることにした。可溶性モノマーと共重