Basic Study and Industrial Manufacture of Carbohydrate Active Enzymes and Development of Novel Carbohydrate Materials*

糖質関連酵素の基礎的研究と工業生産および新規素材の創出*

大段光司 (おおだん こうじ)^{1,**}

Kohji Ohdan^{1,**}

¹ 江崎グリコ株式会社 健康科学研究所
555-8502 大阪市西淀川区歌島 4-6-5

¹ Institute of Health Sciences, Ezaki Glico Co., Ltd.
4-6-5 Utajima, Nishiyodogawa-ku, Osaka 555-8502, Japan

要旨：糖質関連酵素を広く産業利用するにあたり、酵素の基質特異性ならびに反応特性を改善する目的で行った基礎的な研究について、さらに酵素を工業スケールで生産する技術を確認して有用な機能性糖質生産を実現した一連の成果について述べる。 α -アミラーゼの触媒活性ドメインとサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの機能ドメインとを立体障害を起こさせずに融合し、両ドメインの機能を発揮する新しい酵素を創出した。酵素の構造と機能の相関を明らかにした一例である。また、ホスホリラーゼのカップリング反応を応用して、スクロースを原料に、純粋なアミロースを酵素合成する反応系を開発し、必要な酵素を工業スケールで製造することにより酵素合成アミロースを上市した。さらに数種類の酵素を組み合わせることにより、 β -グルカンを α -グルカンに効率よく変換する酵素反応システムを確立した。

キーワード：糖質関連酵素、アミロース、ホスホリラーゼ、工業生産***

1. 緒言

酵素は、食品、化学、医薬をはじめ多岐にわたる分野で広く利用されており、近年、世界の産業用酵素市場は、年平均成長率2桁台に迫る勢いで拡大している。酵素は触媒であり、素材（製品）をつくるための原材料の1つとして利用されている。したがって酵素は、売上げ規模は製品よりはるかに小さいが、製品のキーとなる機能や特徴を出すために必須の存在であることが多く、製品のオリジナリティをつかさどっているという点でも極めて重要な原材料といえる。酵素は化学触媒とは違い、生物学的な性質すなわち柔軟性をもっている。したがって、近年のタンパク質工学的手法を用いれば、酵素の反応性（基質特異性や耐熱性）を比較的容易に変えることができる^{1,2)}。ここでは、糖質関連酵素の機能改変の実例と、酵素を利用した糖質素材の製造および実用化の一例について詳述する。

2. α -アミラーゼの機能改変

α -アミラーゼ [EC 3.2.1.1] やサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ（以下CGTase [EC 2.4.1.19]）等の糖質関連酵素の研究は歴史が長く、タンパク質の立体構

造を含め情報量が豊富である。したがってこれらの酵素は、糖化産業における工業的な利用に関する研究に限らず、「酵素の構造と機能の相関解明」といった基礎研究の良い材料にもなる。「複数ドメインの活性ある形での融合」は一般的に困難とされている。しかし、酵素を設計するという視点に立ち、緻密にデザインすれば、異種ドメイン導入による「 α -アミラーゼの高機能化」も可能となる。

筆者らは、ハイドロキノンやコウジ酸への強い糖転移活性を示す新しいタイプの α -アミラーゼを *Bacillus subtilis* から見出した。ハイドロキノンやコウジ酸はチロシナーゼ活性を阻害する有用な物質であることが報告されている³⁾。糖を転移させることによってこのような物質の水溶性を高めることは産業上も重要な課題である。糖転移活性を上昇させるためには、酵素反応系において、目的の糖転移受容体（ハイドロキノンやコウジ酸）以外には受容体となりうる分子（マルトオリゴ糖およびデキストリン）が少ない方が有利である。すなわち、糖供与体として用いる α -アミラーゼの基質は可溶性澱粉よりも不溶性の生澱粉であることが好ましい。さらに、生澱粉を加熱せずに使用できる方がエネルギー効率の面においても有利であることはいまでもない。このような背景から、筆者らは特異な糖転移活性をもつ本 α -アミラーゼに、不溶性基質への作用性を賦

*本原稿は、日本応用糖質科学会平成24年度大会の奨励賞受賞講演で一部発表された。

**連絡先 (Tel. 06-6477-8425, Fax. 06-6477-8362, E-mail: odan-kouji@glico.co.jp)

***Key words: carbohydrate active enzyme, amylose, phosphorylase, industrial production

与することを目的として、「 α -アミラーゼへの生澱粉吸着ドメインの導入」を試みた。

本 α -アミラーゼ (Ba-L) は、一部が菌体培養中に C 末端側 186 アミノ酸を欠失し、C 末端欠失型 (Ba-S) に変換される特徴をもつ (図 1)。Ba-L と Ba-S の諸性質 (モル分子活性、至適温度、至適 pH、および糖転移活性) は本質的に同じであり、タンパク質の二次元構造解析および推定三次元構造解析の結果、Ba-S は α -アミラーゼとしての機能発現に必須と考えられる全てのドメイン (A, B, C ドメイン) を含んでおり、C ドメインに続く数アミノ酸を残して切断されていることがわかった⁹。さらに、本 α -アミラーゼの N 末端および C 末端領域は酵素活性に影響を与えず、ポリペプチドの削除や付加に対してかなり柔軟であることが示唆された¹⁰。以上のことから、Ba-S はコンパクトな構造で、その C 末端領域に、削除されたポリペプチドの代わりに何らかの異種機能性ドメインを導入しても α -アミラーゼ活性は保持されると考えられた。

一方、*Alkalophilic Bacillus* sp. A2-5a 由来 CGTase (以下 A2-5a CGTase と略す) の遺伝子をクローン化し、C 末端領域に、典型的な生澱粉吸着モチーフ配列¹¹が存在すること、さらに、本 CGTase の生澱粉吸着能を酵素的に確認した¹²。Ba-S の C 末端領域に CGTase の E ドメインを結合させたキメラ酵素 (Ch1 Amy) ならびに D および E ドメインを結合させたキメラ酵素 (Ch2 Amy) の 2 種類を作製した

図 1. Ba-L および Ba-S の末端アミノ酸配列の同定

数字は N 末端からのアミノ酸配列番号を表す。白色領域はシグナルペプチド、グレー領域は Ba-S の成熟タンパク、黒色領域は削除された Ba-L の C 末端領域ポリペプチド。

図 2. Ba-S, A2-5a CGTase, およびキメラ酵素の構造模式図

Aa, Ba, Ca は、Ba-S のそれぞれ A, B, C ドメインを表す。Ac, Bc, Cc, Dc, Ec は、A2-5a CGTase のそれぞれ A, B, C, D, E ドメインを表す。ドメイン境界線上の数字は、それぞれの成熟酵素の N 末端から数えた、ドメイン最後尾のアミノ酸残基番号を表す。

(図 2)。各ドメインの境界位置は、既に X 線結晶構造解析により三次元構造のわかっている *B. circulans* No. 8 および *B. circulans* 251 由来 CGTase と本 CGTase のアミノ酸配列との間でアライメントを行うことで決定した。

Ch1 Amy ならびに Ch2 Amy は共に大腸菌内で生産することができた。両キメラ酵素は、Ba-S でみられなかった生澱粉吸着能および分解能を獲得し (表 1, 図 3)、生澱粉吸着能は、ドメイン供与タンパクである A2-5a CGTase あるいは比較的強い生澱粉分解能を有するとされるブタ膵臓 α -アミラーゼと同程度であった。また、生澱粉吸着能および分解能はともに Ch2 Amy の方が Ch1 Amy よりも高かった¹³。さらに、キメラ酵素のハイドロキノンおよび中性糖に対する糖転移活性は Ba-S と同レベルに保持されていた。

図 3. Ba-S, キメラ酵素の生澱粉分解活性

Ba-S, Ch1 Amy, Ch2 Amy によるコーンスターチの分解反応を行い、反応系に生じた還元糖を DNS 法にて測定 (グルコース換算) し、分解前の全糖量に対する分解率を計算した。○, Ba-S; □, Ch1 Amy; ■, Ch2 Amy。

表 1. 生澱粉吸着率 (%)

Ba-S	A2-5a CGTase	Ch 1 Amy	Ch 2 Amy	PPA
9.4	68.5	49.8	63.0	76.7

生澱粉吸着率 = $[(A - B)/A] \times 100$ (%) を示す。A, 吸着反応前の酵素活性; B, 生澱粉非吸着画分の酵素活性; PPA, ブタ膵臓 α -アミラーゼ。

一般的に、異種タンパク質どうしの融合体では、元のタンパク質のフォールディングパターンが保持されず、期待された機能が発現しないことが知られている。筆者らが酵素活性を保持した融合タンパク質を産出することができた理由として、

- (1) 触媒ドメインである Ba-S が α -アミラーゼとしての機能を維持するのに十分に強固な折り畳まれ方をしていた
- (2) 触媒ドメインと生澱粉吸着ドメインとの橋渡し役を担う、いくつかのアミノ酸残基が存在した
- (3) A2-5a CGTase の E ドメインが構造的かつ機能的に他のドメインから独立した存在であった

といったことが考えられる。つまり、酵素のドメインレベルにおける構造を詳細に把握して目的の融合タンパク質を設計することで、各ドメインの機能を互いに発揮させることが可能となる。

以上のようなタンパク質工学的手法を用いる酵素の機能改変技術を、他の酵素で利用した例を次に紹介する。

3. 酵素合成アミロースの製造技術開発

澱粉中に約 20% 存在するアミロースはアミロペクチンとの分離が困難なためこれまで工業スケールでの生産は行われてこなかった。澱粉から分離するのではなく、酵素を用いて純粋なアミロースを合成する試みはいくつか報告されている^{14,15)}。若干の分岐構造をもつ天然のアミロースに対し、酵素合成したアミロースは完全にリニアな構造をしたグルカンである。そのため、酵素合成アミロースは単にエネルギー源としてのみではなく、高い生分解性と安全性を有する高分子材料であり、天然アミロースには存在しない新規な用途が期待される。

筆者らは、スクロースを原料にスクロースホスホリラーゼ (*Streptococcus mutans* 由来, [EC 2.4.1.7]) とグルカンホスホリラーゼ (馬鈴薯由来, [EC 2.4.1.1]) を組み合わせ、

目的に応じた大きさでかつ分子量分布の極めて狭い純粋なアミロースを高収率で得る方法を開発した¹⁶⁾。この方法は、「原料が安価」、「アミロース分子量を自在にコントロールできる」、「均一性の高いアミロースを合成できる」といった利点を備えている¹⁷⁾。

本法では 2 種類の酵素を同時にスクロースに作用させることでアミロースを合成する (図 4(左))。2 つの酵素反応を同一系内で行うと、リン酸はリサイクルされ反応液中には蓄積しない。伸長反応は連続的に起こり、その結果プライマーがアミロースへと成長する。図 4(右) は、6% (w/v) スクロースを原料に酵素合成したアミロースの分子量分布を示したものである。プライマーはマルトテトラオースを使用した。反応開始時のスクロースとプライマーのモル比を変えることで、約 10 kDa から 1,600 kDa にいたるさまざまな大きさのアミロースを任意に合成することができた。また、反応液は、副産物であるフラクトースならびにリン酸を除去する精製工程を経て乾燥、粉末化することがわかった。

図 5. グルカンホスホリラーゼの耐熱性向上

部位特異的変異により得られた馬鈴薯由来グルカンホスホリラーゼの各種変異体を、20 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.7) 中で 60°C 処理を行い、残存活性を測定した。○, wild type; □, F39L; △, N135S; ◇, T706I; ■, F39L/N135S; ▲, F39L/T706I; ◆, N135S/T706I; ●, F39L/N135S/T706I。

図 4. スクロースを原料とした酵素合成アミロースの合成スキーム (左) および分子量分布 (右)

反応開始時の、(スクロース/プライマーモル比) と合成されたアミロースの〈重量平均分子量〉はそれぞれ以下のとおり。1 は(58.0) 〈 31×10^3 〉, 2 は(283.0) 〈 71×10^3 〉, 3 は(1,130) 〈 305×10^3 〉, 4 は(9,000) 〈 $1,010 \times 10^3$ 〉, 5 は天然アミロース。

図 6. スクロースホスホリラーゼの耐熱性向上

部位特異的変異により得られた *Streptococcus mutans* 由来スクロースホスホリラーゼの各種変異体を、20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中、以下の各温度にて 20 分間熱処理を行い、残存活性を測定した。白バー、55°C；グレーバー、57°C；黒バー、60°C。

図 7. セルロース系原料のアミロースへの変換反応

楕円で示す1つの反応系内にてアミロース合成反応が進行する。CBP、セロビオースホリラーゼ；GP、グルカンホスホリラーゼ。

酵素合成アミロースを工業スケールで製造するためには、酵素の改良が必要である。先に述べた糖質関連酵素に関する基盤技術を活かし、種々のタンパク質工学的アプローチにより2種類のホスホリラーゼの耐熱性を上昇させた結果を図5 (グルカンホスホリラーゼ) および図6 (スクロースホスホリラーゼ) に示す^{18,19)}。さらに、これら改良酵素の枯草菌あるいは大腸菌における生産性を高め²⁰⁾、培養工学を利用した効率的酵素生産を行うことで、世界で初めて酵素合成アミロースの量産化に成功した。アミロースは分子量によって、結晶、ゲル、溶液という異なった3つの物性を示す (図4 (右))。筆者らの開発した方法により、目的に必要な物性をもつアミロースの合成が可能となった。これまで3物性がミックスされた状態である天然アミロースには見出せなかった、新規な用途がみつかるものと期待され、現在、食品、工業製品、医薬品用途への応用研究が進行中である^{21,22)}。

4. β -1,4-グルカンの α -1,4-グルカンへの効率的な変換

先に述べたように、スクロースを原料にアミロースを合成する場合、スクロースホスホリラーゼの加リン酸分解により生じるグルコース 1-リン酸がグルカンホスホリラーゼの基質となり、アミロースが合成された。ここで、グルコース 1-リン酸の供給源をスクロースの代わりに、セルロースの部分分解物であるセロビオースに置き換えること

を試みたところ (図7)、スクロースを原料にした場合と同様にアミロースが酵素合成できることを確認した。すなわち、リン酸存在下でセロビオースにセロビオースホスホリラーゼ (*Clostridium thermocellum* 由来, EC 2.4.1.20) が作用してグルコース 1-リン酸とグルコースが生成し、次にグルカンホスホリラーゼがグルコース 1-リン酸のグルコース部分をプライマーに転移しグルコース鎖が伸長される。アミロースの収率は、基質の仕込み濃度によって異なるが、例えば濃度 30 g/L のセロビオースで反応を開始した場合、濃度約 4.5 g/L のアミロース溶液を得ることができた (セロビオースに対するアミロース収率約 15%)。スクロースを基質にした場合と同様に、反応開始時のセロビオースとプライマーのモル比を変えることにより、アミロースの分子量を厳密かつ任意に制御できることがわかった。分子量約 20 kDa から 900 kDa までの範囲で、目的の大きさのアミロースを合成できることが確認され、さらに、生成したアミロースの分子量分布は非常に狭く、指標となる重量平均分子量 (M_w) と数平均分子量 (M_n) の比 (M_w/M_n) は 1.1 以下であった。

次に、セロビオースからアミロースへの変換効率を上げるためのさまざまな検討を行った。その結果、セロビオースホスホリラーゼの平衡反応をグルコース 1-リン酸合成側にシフトさせるために、反応副産物のグルコースをフルクトースに変換する酵素を添加する、あるいは、グルコースをグルコン酸に変換する酵素を添加することにより (図7)、アミロース収率は、約 32.4% まで上昇させることがで

きた^{17,23)}。

本知見は、セルロースの部分分解物であるセロビオースを酵素反応によって澱粉系原料の1つであるアミロースに変換するキーとなる技術であり、酵素合成アミロースの高い機能性ならびに産業利用の可能性を考慮すると、セルロースの有効利用技術として注目される。

5. おわりに

糖質関連酵素の特異な反応を複数組み合わせることにより、産業上有用な新しい糖質素材を創出できること、また、バイオマス資源を種々の有用な多糖に変換することも可能である。そのような目的を達成するためには、酵素の基礎的な性質を理解し、産業利用に耐えうるものへと改良する技術が極めて重要である。

糖質関連酵素に限らず、近年酵素の利用分野は広がり続けており、産業で利用される酵素の種類も増大してきている。酵素を実際に産業利用しようとする、多くの実用化研究と長い年月が必要となる。そのような研究開発の最前線に、本総説が貢献できれば幸いである。

謝辞

このたびは、荣誉ある日本応用糖質科学会奨励賞受賞にあたり、ご選考いただきました松井博和会長をはじめ、選考委員会の諸先生方、ご推薦を賜りました中野博文近畿支部長、木村淳夫北海道支部長に厚く御礼申し上げます。また、研究のご指導をいただきました山本憲二先生、栗木隆博士をはじめ、関係の皆様にも厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) S. Sen, V. Venkata Dasu and B. Mandal: Developments in directed evolution for improving enzyme functions. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **143**, 212–223 (2007).
- 2) S.B. Rubin-Pitel and H. Zhao: Recent advances in biocatalysis by directed enzyme evolution. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **9**, 247–257 (2006).
- 3) M. Ben Ali, B. Khemakhem, X. Robert, R. Haser and S. Bejar: Thermostability enhancement and change in starch hydrolysis profile of the maltohexaose-forming amylase of *Bacillus steaerothermophilus* US 100 strain. *Biochem. J.*, **394**, 51–56 (2006).
- 4) T. Ozawa, K. Endo, K. Igarashi, K. Kitayama, Y. Hayashi, H. Hagihara, S. Kawai, S. Ito and K. Ozaki: Improvement of the thermal stability of a calcium-free, alkaline α -amylase by site-directed mutagenesis. *J. Appl. Glycosci.*, **54**, 77–83 (2007).
- 5) B.S. Hartley, N. Hanlon, R.J. Jackson and M. Rangarajan: Glucose isomerase: insights into protein engineering for increased thermostability. *Biochim. Biophys. Acta*, **1543**, 294–335 (2000).
- 6) R. Priyadharshini, S. Manoharan, D. Hemalatha and P. Gunasekaran: Repeated random mutagenesis of α -amylase from *Bacillus licheniformis* for improved pH performance. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 1696–1701 (2010).
- 7) R. Priyadharshini, D. Hemalatha and P. Gunasekaran: Role of Val 289 residue in the α -amylase of *Bacillus amyloliquefaciens* MTCC 610: an analysis by site directed mutagenesis. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 563–568 (2010).
- 8) T. Nishimura, T. Kometani, S. Okada, N. Ueno and T. Yamamoto: Inhibitory effects of hydroquinone- α -glucoside on melanin synthesis. *Yakugaku Zasshi*, **115**, 626–632 (1995).
- 9) K. Ohdan, T. Kuriki, H. Kaneko, J. Shimada, T. Takada, Z. Fujimoto, H. Mizuno and S. Okada: Characteristics of two forms of α -amylases and structural implication. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4652–4658 (1999).
- 10) K. Ohdan, H. Takata, T. Kuriki and S. Okada: Flexibility with truncation of the amino- and carboxy-termini of *Bacillus subtilis* X-23 α -amylase. *J. Appl. Glycosci.*, **48**, 37–44 (2001).
- 11) B. Svensson, H. Jespersen, M.R. Sierks and E.A. MacGregor: Sequence homology between putative raw-starch binding domains from different starch-degrading enzymes. *Biochem. J.*, **264**, 309–311 (1989).
- 12) K. Ohdan, T. Kuriki, H. Takata and S. Okada: Cloning of the cyclodextrin glucanotransferase gene from alkalophilic *Bacillus* sp. A2-5a and analysis of the raw starch-binding domain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 430–434 (2000).
- 13) K. Ohdan, T. Kuriki, H. Takata, H. Kaneko and S. Okada: 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).
- 14) T. Harada, A. Misaki, H. Akai, K. Yokobayashi and K. Sugimoto: Characterization of *Pseudomonas* isoamylase by its actions on amylopectin and glycogen: comparison with *Aerobacter* pullulanase. *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 497–505 (1972).
- 15) G. Potocki-Veronese, J.L. Putaux, D. Dupeyre, C. Albenne, M. Remaud-Simeon, P. Monsan and A. Buleon: Amylose synthesized *in vitro* by amylosucrase: morphology, structure, and properties. *Biomacromolecules*, **6**, 1000–1011 (2005).
- 16) K. Fujii, H. Takata, M. Yanase, Y. Terada, K. Ohdan, T. Takaha, S. Okada and T. Kuriki: Bioengineering and application of novel glucose polymers. *Biocatal. Biotransform.*, **21**, 167–172 (2003).
- 17) K. Ohdan, K. Fujii, M. Yanase, T. Takaha and T. Kuriki: Enzymatic synthesis of amylose. *Biocatal. Biotransform.*, **24**, 77–81 (2006).
- 18) M. Yanase, H. Takata, K. Fujii, T. Takaha and T. Kuriki: Cumulative effect of amino acid replacements results in enhanced thermostability of potato type L α -glucan phosphorylase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5433–5439 (2005).
- 19) K. Fujii, I. Masae, M. Yanase, T. Takaha and T. Kuriki: Enhancing the thermal stability of sucrose phosphorylase from *Streptococcus mutans* by random mutagenesis. *J. Appl. Glycosci.*, **53**, 91–97 (2006).
- 20) M. Yanase, T. Takaha and T. Kuriki: Developing and engineering enzymes for manufacturing amylose. *J. Appl. Glycosci.*, **54**, 125–131 (2007).
- 21) S. Suzuki, K. Shimahashi, J. Takahara, M. Sunako, T. Takaha, K. Ogawa and S. Kitamura: Effect of addition of water-soluble chitin on amylose film. *Biomacromolecules*, **6**, 3238–3242 (2005).
- 22) S. Suzuki, B. Ying, H. Yamane, H. Tachi, K. Shimahashi, K. Ogawa and S. Kitamura: Surface structure of chitosan and hybrid chitosan-amylose films-restoration of the antibacterial properties of chitosan in the amylose film. *Carbohydr. Res.*, **342**, 2490–2493 (2007).
- 23) K. Ohdan, K. Fujii, M. Yanase, T. Takaha and T. Kuriki: Phosphorylase coupling as a tool to convert cellobiose into amylose. *J. Biotechnol.*, **127**, 496–502 (2007).