

## 論文の内容の要旨

氏名：伊藤 博

博士の専攻分野の名称：博士（工学）

論文題名：澱粉の高度利用を指向する糖質・酵素工学

澱粉は天然由来の高分子であり、我々人類の貴重な栄養源として食品加工への活用のみならず、これを原料として機能性素材を創製する上で非常に魅力的な素材である。一方で、澱粉を原料として糖質・酵素工学に基づいた物質生産系を構築する際は、澱粉もしくは澱粉関連酵素についての知見が重要となる。澱粉は  $\alpha$ -D-グルコースを唯一の構成要素とする代表的なホモグリカンであり、鎖状構造のアミロースと多岐に分岐した 3 次元構造のアミロペクチンの 2 種類の分子構造からなることが知られている。このように複雑な構造を有する澱粉に対して酵素触媒による糖質の生産を図る場合、構成成分であるアミロースあるいはアミロペクチンに対して優位に触媒能を発揮する酵素を選択することはもちろんのこと、澱粉に内包されるアミロース - アミロペクチン含有率を知ることが重要となる。しかしながら、植物起源ごとにその構成比が異なる澱粉は、その構造評価が煩雑になりがちである。これらの澱粉の構成成分の違いが要因となって起きる特性として糊化・ゲル化・老化現象が知られている。澱粉は一般に水に不溶であるが、加水、加熱条件下において水和、膨潤することで糊化状態となる。その後、離水し老化状態になるが、その中間プロセスとしてゲル化状態を経由することがある。この糊化・ゲル化・老化プロセスは、澱粉の構成成分であるアミロース - アミロペクチンの形態や存在比により影響を受けていることが知られている。そこで、この澱粉の形態変化に着目し、架橋剤を添加することで起きるゲル化挙動の違いから澱粉の構造に関する簡易評価を試みた。一方で、酵素触媒により澱粉を基質とした効率的な糖質の生産を図る場合、酵素の機能を評価するための酵素工学に基づく知見が重要になる。一般に、産業的に澱粉を基質とした糖質の生産を行う場合、糖加水分解酵素を用いてオリゴ糖などの加水分解産物を得ることが多い。しかし、糖加水分解酵素は基質濃度が高い条件下においては糖転移反応により新たなグリコシド結合を形成する触媒として作用する。近年、通常の条件下では示さない酵素の触媒能 (Enzyme Promiscuity) に着目し、酵素が本来作らない物質生産を促進させる試みが注目されている。そこで、澱粉を基質とする酵素である  $\alpha$ -アミラーゼもこのような Enzyme Promiscuity を示すと考え、糖受容体に非天然型の基質を用いた酵素的グリコシル化反応を試みた。その際、グリコシル化効率の向上を目指し、澱粉由来の物理化学的特性を活用することで反応の効率化を図った。また、本酵素反応系をモデル反応とし、そのグリコシル化効率のための簡便な基質環境の設計ならびにそれらの評価系の構築も試みた。

本論文では、糖質および酵素工学の知見をもとに、澱粉を原料とした効率的な物質生産系の構築ならびにその評価系の構築を試みた。また、 $\alpha$ -アミラーゼによる Enzyme Promiscuity の効率化ならびに評価のためのモデル反応として糖受容体に糖脂質であるアルキルグリコシドを用いた反応系について述べている。

本論文は「澱粉の高度利用を指向する糖質・酵素工学」と題し、5 章で構成される。

第 1 章は、序論であり、本研究の背景として、澱粉利用産業における高分子素材としての澱粉の特性と活用ならびに澱粉を原料とした糖質・酵素工学に基づく糖質産業および酵素産業について概説し、本論文の目的、意義および構成について述べている。

第 2 章は、糖質工学に基づく澱粉の特性評価について述べている。ホウ砂（四ホウ酸ナトリウム）は、ポリビニルアルコール（PVA）のようなポリオールの架橋剤として利用されており、ポリオール間にホウ酸エステル架橋を形成することでゲル化を促進することが知られている。PVA と同様に多数のヒドロキシを有する澱粉でも同様にゲル化が期待できる一方で、直鎖構造のみの PVA とは異なり、様々な分岐構造を内包する澱粉では特有のゲル化挙動を示すこと考えられる。そこで、それぞれアミロース - アミロペクチン含有率が異なる天然型澱粉あるいは可溶性澱粉を含む水溶液に対し、架橋剤としてホウ砂を添加し、それぞれの澱粉ごとにゲル化挙動について検討した。その結果、アミロペクチンを多く含む天然型澱粉においてはゲル化の促進が確認され、アミロペクチンをほとんど含まない可溶性澱粉ではゲル化の抑制が確認された。次に、澱粉ゲル構造内における水分保持能に着目し、天然型澱粉であるトウモロコシ澱粉と可溶

性澱粉におけるホウ砂の添加効果について検討した。その結果、可溶性澱粉ではホウ砂の添加の有無にかかわらず水分消失速度はほぼ同じであった。一方で、トウモロコシ澱粉ではホウ砂を添加した場合、ホウ砂を添加しない場合に比べて全ての水分が蒸発するまでに約 1.5 倍の時間を要した。これは、澱粉ゲル中における水分子の捕捉効果が天然型澱粉と可溶性澱粉とでは、その高次構造が異なることが要因となることで差が出たためと推測できる。このように、架橋剤の有無によるゲル化もしくは水分保持の挙動の違いから、簡便に澱粉の形態について評価できることが分かった。

第 3 章は、糖質酵素工学に基づく澱粉からの物質生産について述べている。 $\alpha$ -アミラーゼは、水溶液下では加水分解反応を主に触媒することが知られているが、反応条件によっては糖転移反応を触媒することも知られている。一般に、糖質関連酵素によるグリコシル化効率の向上のための手段として、基質の活性化あるいは変異体酵素の作製により糖転移反応を効率化することが多い。一方で、 $\alpha$ -アミラーゼにとっての天然型基質である澱粉の物理化学的特性に焦点を当てて効率的な反応場の構築を目指した例はない。第 2 章で述べた澱粉中のアミロペクチンの澱粉ゲル化への強い影響に対し、アミロースは水溶液中において螺旋構造を形成し、その空洞内に脂溶性分子を取り込む包接作用を示すことが知られている。そこで、アミロースの包接作用に着目し、アミロース - 脂溶性分子の基質複合化を行うことで、糖供与体と糖受容体を近接化することでグリコシル化効率の向上を図った。糖脂質である *n*-octyl  $\beta$ -D-glucopyranoside ( $C_8$ OGlc) を糖受容体として用いた結果、酵素反応初期段階において糖鎖長の長いアルキルポリグリコシド (APGs) を形成し、最終的なグリコシル産物として  $\alpha$ -1,6 グルコシド結合を有する配糖体を確認した。一方で、加水分解反応と糖転移反応が競合する本酵素反応は、糖供与体の重合度や濃度が常に変動しており、効率的なグリコシル化あるいは必要とする糖鎖長の APGs を得るための反応条件の探索のためには数多くの実験的検証が必要となる。そこで、 $\alpha$ -アミラーゼに関する既存の反応解析モデルを活用することで糖供与体の反応系内の変化を予測し、実験手順を簡略化し目的のグリコシル化に有利な反応条件を選択した。反応予測には、サブサイト理論に基づく解析モデルを用いた。*Aspergillus oryzae* 由来の  $\alpha$ -アミラーゼによる反応モデルを用い、糖供与体にアミロース、糖受容体に  $C_8$ OGlc を用い酵素反応系に対して、効率的な反応設計を試みたところ、反応初期段階で糖鎖長の長い APGs の形成の観測が可能な反応条件を探索することができた。このように、澱粉の物理化学的特性の活用のみならず、 $\alpha$ -アミラーゼに関する既存の知見を利用することで、実験手順、反応条件の設計の簡便化、効率化が可能となった。

第 4 章は、酵素工学に基づく澱粉関連酵素の反応特性の評価について述べている。酵素の活性評価は、対象とする酵素の目的とする化学反応に対する触媒能の有無に限らず、その効率を評価するために非常に重要となる。それらの触媒能の中にはその酵素が本来発揮しない Enzyme Promiscuity も含む。第 3 章において用いた糖受容体である  $C_8$ OGlc のような糖脂質も本来  $\alpha$ -アミラーゼにとっては非天然型の基質であり、最終糖転移産物として確認した  $\alpha$ -1,6 グルコシド結合の配糖体の存在が示すように、 $C_8$ OGlc のアグリコン部位のアルキル鎖が Enzyme Promiscuity に関与した可能性がある。そこで、その詳細を知るため、種々のアルキルチオグリコシド (ATG) を糖受容体とし、 $\alpha$ -アミラーゼによる Enzyme Promiscuity についての評価を試みた。HPLC により ATG を糖受容体とした酵素反応産物の追跡条件を検討したところ、ATG が紫外 (UV) 短波長領域である 200~230 nm 領域において特異な UV 吸収を示すことが明らかとなった。この特性が ATG の構造として普遍的な現象であることを確認するため、種々のアグリコン、グリコン部位を有する ATG を用い、その UV スペクトルを比較した。その結果、ATG の UV 吸収特性はグリコン骨格に近い S-C-O 結合近傍における n-to- $\sigma^*$ 遷移機構が原因となり起きていることが示唆された。また、この UV 吸収特性により、示差屈折計 (RI) では検出できない微量のグリコシル化産物である APGs を高い検出感度を保持したまま反応追跡できることが明らかとなった。これは、ATG を糖受容体とすることで、種々の糖質関連酵素による Enzyme Promiscuity の評価系への適用が可能であることを示唆している。

以上のように、本論文では、澱粉の構造特性ならびに糖質関連酵素の基質特異性に関する糖質・酵素工学の知見を活用することで、効率的かつ簡便な物質生産プロセスの設計が可能であることを示した。これらの成果は、様々な物理化学的特性を有する多糖の構造、機能解明のための簡便な評価手法を提供する共に、天然由来の糖質関連酵素が ATG のような非天然型基質に遭遇した際に発現する Enzyme Promiscuity の評価手法について提案したものである。