

氏 名	寺 田 よし のぶ
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2330 号
学位授与の日付	平 成 12 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Cyclization Reaction of Cyclodextrin Glucanotransferase and Amylo- maltase on α -1,4-Glucan (シクロデキストリン合成酵素とアミロマルターゼの α -1,4-グルカン環状化 反応) (主 査)
論文調査委員	教 授 北 畠 直 文 教 授 伏 木 亨 教 授 井 上 國 世

論 文 内 容 の 要 旨

シクロデキストリン合成酵素 (CGTase) は α -1,4-グルカン環状化反応を触媒し、シクロデキストリン (CD) を合成する酵素である。CGTase は α -1,4-グルカンの非還元末端から順に作用し、生成する環状 α -1,4-グルカンは重合度10程度のものしか存在しないと考えられてきた。しかし近年重合度17以上の環状 α -1,4-グルカンが発見され、CGTase の反応機構の再検討が始まった。本研究では CGTase の α -1,4-グルカン環状化反応の解析を行い、上記の問題点の解明を目的としている。さらにシクロアミロースの工業生産を目指し、高度好熱菌 *Thermus aquaticus* 由来アミロマルターゼの α -1,4-グルカン環状化反応について検討している。得られた主な結果は以下の通りである。

みかんに含まれるフラボノイドであるヘスペリジンを CGTase の糖転移反応により配糖化した化合物であるグルコシルヘスペリジンを、ヘスペリジンを含む水溶液に添加することにより、水溶液中でのヘスペリジンの結晶化が阻害されることを示している。このことは、ミカン缶詰シラップやミカンジュースで問題となっているヘスペリジン結晶による白濁現象を防ぐ有効な手段となることを示唆している。

CGTase の α -1,4-グルカンの環状化反応について検討している。CGTase が反応初期に α -1,4-グルカンに作用して、これまで知られてきた重合度6～8のシクロデキストリン (CD6～CD8) の他に、重合度9～60以上の一連の環状 α -1,4-グルカン (CA) も合成することを証明している。この高重合度 CA は反応の経過とともに低分子化され、最終的に CD6～CD8 が蓄積することを明らかにしている。これらの結果は、CGTase が基質の α -1,4結合にランダムに作用していることを示している。これまでに CGTase の種類により、最も多量に合成される CD6～CD8 の種類に差があったが、特異性の異なる3種類の CGTase について、生成する CA の経時変化を比較検討した結果、高重合度 CA の合成も CGTase の種類により異なることを明らかにした。

ついで、CGTase の種類による CA 合成の違いを説明することを目的として、 α -1,4-グルカンの環状化反応における作用位置特異性、カップリング反応および加水分解反応における CA の基質特異性を検討している。 α -1,4-グルカンの環状化反応における作用位置特異性では、CGTase の種類により CD6 または CD7 の合成割合が多く、その他の CA はほぼ同じ割合で合成されることを明らかにした。カップリング反応および加水分解反応における CA の基質特異性では、高重合度 CA に対する活性が CD6～CD8 のものと比較して高いことが明らかになった。また、カップリング反応と加水分解反応の比率が CGTase の種類により異なり、加水分解反応の比率が高いものほど、反応中に高重合度 CA を蓄積しにくいことも明らかにした。以上の結果をもとに、CGTase により合成される CA の経時変化と、その CGTase の種類による差異について説明している。

CA の工業生産を念頭に、高度好熱菌 *Thermus aquaticus* 由来アミロマルターゼについて研究を展開している。*T. aquaticus* のアミロマルターゼを精製し、本酵素遺伝子のクローニングおよび大腸菌内での発現を行っている。本酵素の最適温度は75℃であり、85℃、10分間の加熱においても安定な耐熱性酵素であることを明らかにした。さらに *Thermus* アミロマルターゼの酵素活性について検討している。オリゴ糖への作用では、*Thermus* アミロマルターゼが大腸菌アミロマ

ルターゼと馬鈴薯 D 酵素のいずれとも異なる反応パターンを示すことを見出した。アミロースへの作用では、*Thermus* アミロマルターゼが環状化反応を触媒し、CA を合成することが明らかになった。本酵素が合成する CA の最小重合度は 22 であり、大腸菌アミロマルターゼや馬鈴薯 D 酵素とは異なっていたことから、合成される CA の最小重合度が酵素分子により決定されていることが示唆された。*Thermus* アミロマルターゼが合成する CA の収率は、アミロースの分子量が大きいほど、また濃度が低いほど高い値を示し、110 kDa のアミロースの 0.2% 溶液では CA の収率は 91% を示した。

論文審査の結果の要旨

シクロデキストリン合成酵素 (CGTase) は α -1,4-グルカン環状化反応を触媒し、シクロデキストリン (CD) を合成する酵素である。CGTase は α -1,4-グルカンの非還元末端から順に作用し、生成する環状 α -1,4-グルカンの重合度は 10 程度のものしか存在しないと考えられてきた。しかし本研究では CGTase の α -1,4-グルカン環状化反応を明らかにし、高重合度環状 α -1,4-グルカンの生成を証明している。さらに高度好熱菌 *Thermus aquaticus* 由来アミロマルターゼの α -1,4-グルカン環状化反応について検討を行い、シクロアミロースの工業生産に道を開いている。成果として評価できる点は以下の通りである。

(1) CGTase の触媒する反応について検討を行い、CGTase の糖転移反応に着目し、その応用例を示している。すなわち、みかんに含まれるフラボノイドであるヘスペリジンを CGTase の糖転移反応により配糖化した化合物であるグルコシルヘスペリジンに変換し、ヘスペリジンを含む水溶液に添加することにより、水溶液中でのヘスペリジンの結晶化を阻害する方法を提起した。これは、ミカン缶詰シラップやミカンジュースで問題となっているヘスペリジン結晶による白濁現象を防ぐ有効な手段となる。

(2) CGTase が α -1,4-グルカンに作用して合成する環状 α -1,4-グルカン (CA) が、これまで知られてきた重合度 6 ~ 8 のシクロデキストリン (CD 6 ~ CD 8) のみでなく、重合度 6 ~ 60 以上の一連の CA を合成することを証明している。また、反応の経時変化を調べることで、反応初期に合成された高重合度 CA が反応の経過と共に低分子化され、最終的に CD 6 ~ CD 8 が蓄積することを明らかにしている。これらの結果により、CGTase が α -1,4-グルカンの非還元末端より順に作用して CD 6 ~ CD 8 を特異的に合成するのではなく、よりランダムに作用していることを示した。

(3) 特異性が異なる 3 種類の CGTase について、 α -1,4-グルカンの環状化反応における作用位置特異性、カップリング反応、および加水分解反応における CA の基質特異性を検討し、CGTase の種類により合成される CD の種類が異なり、それらは CD 6 または CD 7 をおもに合成する CGTase とほぼ同じ割合で合成する CGTase であることを明らかにした。また、カップリング反応と加水分解反応の比率が CGTase の種類により異なり、加水分解反応の比率が高いものほど、反応中に高重合度 CA を蓄積しにくいことも明らかにしている。

(4) 高度好熱菌 *Thermus aquaticus* 由来アミロマルターゼを精製し、本酵素遺伝子のクローニングおよび大腸菌内での発現を行っている。本酵素の至適温度は 75°C で 85°C、10 分間の加熱でも安定な耐熱性酵素であること、酵素遺伝子の相同性比較により、これまで知られているアミロマルターゼ遺伝子は少なくとも 2 つに分類されることを示した。また、高度に保存されている 3 つのアミノ酸残基が活性発現に関与していることを、部位特異的変異導入により明らかにした。

(5) *Thermus* アミロマルターゼのオリゴ糖への作用では、*Thermus* アミロマルターゼが大腸菌アミロマルターゼ、馬鈴薯 D 酵素のどちらとも異なる反応パターンを示すことを明らかにした。アミロースへの作用では、*Thermus* アミロマルターゼが環状化反応を触媒し、CA を合成することを明らかにした。本酵素が合成する CA の最小重合度は 22 であり、大腸菌アミロマルターゼや馬鈴薯 D 酵素とは異なっていたことから、合成される CA の最小重合度が酵素分子により決定されていることが示唆された。*Thermus* アミロマルターゼが合成する CA の収率は、アミロースの分子量が大きいほど、また濃度が低いほど高くなることを示した。

以上のように、本論文はシクロデキストリン合成酵素の α -1,4-グルカン環状化反応の新たな反応モデルを提示し、シクロアミロースの工業生産の基盤確立を行い、さらにシクロデキストリン合成酵素の応用例を示している。これらの成果は食品機能調節学、栄養化学、酵素化学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成12年7月14日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。