

<p>研究代表者</p>	<p>所属学系・職名 物質・エネルギー学系 教授 氏 名 杉 森 大 助</p>
<p>研究課題</p>	<p>米粉、小麦粉製品を美味しくする（物性改良ができる）酵素の基礎研究 Basic study on enzyme capable of improving quality of wheat flour and its products.</p>
<p>成果の概要</p>	<p>背景と目的 本研究では、小麦粉や米粉の物性改良や品質向上に有用な新規酵素ガラクトリパーゼ(以下 GL と略記、図 1) の諸特性および触媒機能解析を行うとともに、小麦粉改質試験を試みることを目的とした。</p> <div data-bbox="622 649 1181 1142" data-label="Chemical-Block"> <p style="text-align: center;">Digalactosyldiacylglycerol (DGDG)</p> <p style="text-align: center;">↓ chGL</p> <p style="text-align: center;">R₁, mainly 18:3 acyl R₂, 16:3, 18:2, 18:3 acyl</p> </div> <p style="text-align: center;">図 1. 新規酵素ガラクトリパーゼ (GL) の酵素反応</p> <p>方法と成果 緑藻 <i>Chlorella kessleri</i> の細胞内から目的酵素 GL (以下 chGL) を界面活性剤 1% (w/v) Triton X-100 で可溶化後、カラムクロマトグラフィーを用いて目的 chGL を精製した。この精製サンプルを用いて、酵素の諸特性を解析した。その結果、本酵素は pH 6.5、37°C 付近で最大活性を示し、弱酸性 pH から中性 pH 域、20°C~40°C 付近において活性を示した。chGL は、2 mM EDTA 存在下において活性が強く阻害され、Ca²⁺ 存在下で活性が増強されたことから、本酵素は Ca²⁺ 要求性酵素であると考えられる。Triton X-100 および Ca²⁺ 濃度が酵素活性に与える影響を調べた結果、0.3% (w/v) Triton X-100、2 mM Ca²⁺ 存在下において酵素活性が最大となった。この条件において chGL の基質特異性試験を行った結果、DGDG に対する活性が最も高く、モノガラクトシルジアシルグリセロール、スルホキノボシルジアシルグリセロールには、それぞれ 30% 程度の活性を示すことがわかった。さらに、リン脂質およびトリグリセリドにはほとんど作用しなかったことから、本酵素はグリセロ糖脂質に対する特異性が高い新規酵素であると結論づけた。</p> <p><i>C. kessleri</i> のドラフトゲノム配列情報を取得し、また単離精製された chGL のアミノ酸配列情報 (H₂N-TALREVATKSEVSEA) をもとに構築した cDNA ライブラリ</p>

成果の概要

一よりchGL-cDNAを取得した。その配列情報から本chGLはプロ領域（葉緑体移行シグナル）として34アミノ酸残基を有し、成熟型chGLは476アミノ酸残基（分子量約53 kDa）からなることを明らかにした。また、次世代シーケンサーを用いた *de novo* アセンブリ解析からchGL遺伝子は全長約5.6 kbpで10ヶ所のイントロン領域を有することも判明した。なお、本chGLに対して、GL活性があるとされる既知の *Aspergillus* または *Chlamydomonas* 由来の酵素とのアミノ酸配列比較を行った結果、相同性は各々約12%、約20%と、いずれも極めて低かったことから本chGLは新規なGLであることが示された。次に、取得したchGL-cDNAを可溶化タグ(TF)融合型発現ベクターへ搭載し、*E. coli*にて組換え発現に成功した。一方、本chGLの応用面として、その食品素材の物性改質能力についても簡易試験を行った結果、chGL添加の小麦粉生地サンプルでは、生地の柔らかさが維持される効果を示唆する結果が得られた。この結果を裏付けるデータとして、本酵素が *sn-1* 位のアシルエステルを優先的に加水分解 (*sn-1:sn-2=8:2*、モル比) することがガスクロマトグラフィー分析からわかった。

さらに、データベースサーチにより、本酵素はシロイヌナズナ由来ホスホリパーゼA₁ (PDB ID, 2YIJ) との立体構造類似性が高いことがわかったため、これを鋳型としてコンピュータシミュレーションによりchGLの立体構造モデルを作成した。その結果、基質結合ポケットおよび *sn-1* 位アシル鎖が結合し得るクレフトの存在が確認でき、271番目のセリン、347番目のアスパラギン酸、440番目のヒスチジンが触媒残基の可能性が高いと推定できた。また、部位特異的変異導入実験により、これら3つのアミノ酸が触媒残基であるということを強く示唆する結果を得た。

なお、本研究によって、以下の成果を得た。

査読付き論文

Yoshitaka Hirano, Keisuke Chonan, Kazutaka Murayama, Shin-ich Sakasegawa, Hideyuki Matsumoto, and Daisuke Sugimori, *Syncephalastrum racemosum* amine oxidase with high catalytic efficiency toward ethanolamine, and its application in ethanolamine determination, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1-15 (2016).

国際会議

Characterization and heterologous expression of a novel galactolipase from *Chlorella kessleri*, Daisuke SUGIMORI, Koyu FUJIUCHI, Shuhei HASHIRO, Hisashi YASUEDA, **2016 AOCs annual meeting (25rd Annual Biocatalysis Symposium)**, May 3, 2016 (Salt Palace Convention Center, Salt Lake City, Utah, USA).

国内学会

- 1) *Chlorella vulgaris* の熱ストレスにより誘導される糖グリセロール生産、羽城周平、五十嵐 俊介、佐藤 誠一、藤内恒有、杉森大助、安枝 寿、日本生物工学会 2015 年度大会、2015. 10. 26 (城山観光ホテル、鹿児島)
- 2) *Brevibacillus* Expression System を用いた *Chlorella kessleri* 由来ガラクトリパーゼの組換え発現およびドッキングシミュレーションによる触媒残基の推定、藤内恒有、羽城周平、安枝 寿、杉森大助、日本生物工学会 2015 年度大会、2015. 10. 27 (城山観光ホテル、鹿児島)。
- 3) *Streptomyces sanglieri* A14 株由来ホスホリパーゼのキャラクタリゼーションならびにグリセロ糖脂質の加水分解特性、大田淳平、杉森大助、日本生物工学会 2015 年度大会、2015. 10. 27 (城山観光ホテル、鹿児島)。

特許出願

大田淳平、杉森大助、リパーゼ、ポリヌクレオチド、組換えベクター、形質転

成果の概要	換体、リパーゼの製造法、グリセロ脂質を加水分解する方法及びグリセロ脂質の加水分解物を製造する方法、特願2015-187519（平成27年09月24日）。
-------	--