

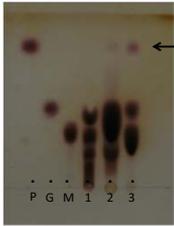
目的

配糖化は化合物の安定性向上や物性改善に有用であり、配糖体が有用な生理機能を持つ場合もある。我々は土壌細菌の α -グルコシダーゼに着目し、マルトースをドナーとした配糖化酵素の探索と配糖体の合成検討を行い、生姜活性成分6-ジンゲロールの配糖化を報告してきた。本研究は芳香性があり生理機能を持つテルペンアルコールを基質とし、1級アルコールのネロールの配糖化検討および3級アルコールのリナロールの配糖化等について検討し、有用配糖体合成基盤の確立と酵素の性質解明を進めることを目的とする。

方法および結果

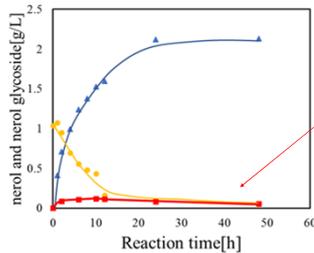
Agrobacterium sp. M-12株によるネロールの配糖化

微生物のスクリーニング

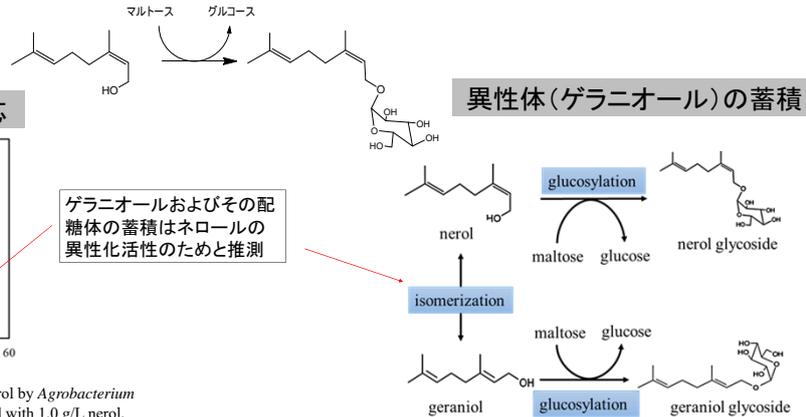


Thin-layer chromatography showing reaction products obtained from nerol and maltose using CGTase (lane 1), transglucosidase (lane 2), and washed cells of *Agrobacterium* sp. M-12 (lane 3). The arrow indicates the reaction product derived from nerol. P, nerol glucoside; G, glucose; M, maltose.

菌体を用いた配糖化反応



Time course showing the conversion of nerol by *Agrobacterium* sp. M-12. The washed cells were incubated with 1.0 g/L nerol, 100 g/L maltose, and 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) in a total volume of 8.0 mL. The reaction was carried out at 40 °C.

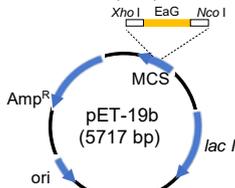


A proposed mechanism of microbial glycosylation of geraniol and nerol.

Ensifer adhaerens NBRC100388からの α -グルコシダーゼのクローニングと発現酵素による配糖化検討

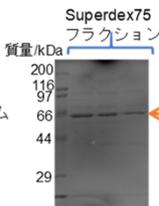
酵素遺伝子のクローニング

対象遺伝子: α -glucosidase (1,632 bp)
(GenBank accession number ANK71440)
宿主: *E. coli* BL21 (DE3)



酵素精製

超音波破碎 (可溶性画分を回収)
硫酸沈殿 (40-60%飽和)
透析
Resource Q 強陰イオン交換カラム
Superdex75 (ゲル濾過カラム, 3,000-70,000)

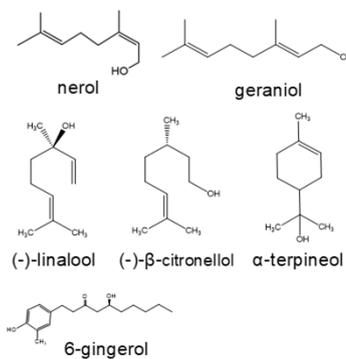


基質特異性(加水分解反応)

Substrate	Chemical bond	Hydrolytic rate [g/(L·min)]	Relative hydrolysis activity [%]
Maltose	Glc- α -1,4-Glc	1.67×10^{-1}	100
Trehalose	Glc- α -1,1- α -Glc	5.56×10^{-3}	3.3
Sucrose	Glc- α -1,2- β -Fru	2.04×10^{-2}	12.2
Maltulose	Glc- α -1,4-Fru	2.20×10^{-2}	13.1
D-(+)-Cellobiose	Glc- β -1,4-Glc	0	0
Lactose	Gal- β -1,4-Glc	0	0
p-NPG**	-	5.79×10^{-2}	34.6

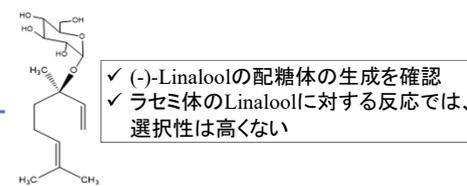
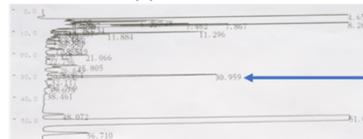
基質特異性(配糖体合成)

Substrate	Activity
1-butanol (C4)	○
1-nonanol (C9)	○
5-nonanol	○
1-tetradecanol (C14)	×
7-tetradecanol	×
nerol	○
geraniol	○
(-)-linalool	○
(-)- β -citronellol	○
(\pm)- α -terpineol	○
6-gingerol	○

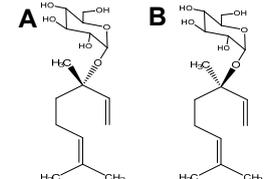
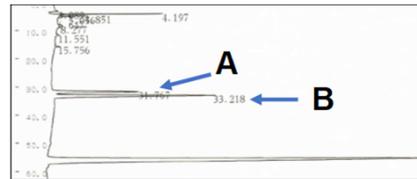


3級アルコールのリナロールに対する反応

< HPLC > (-)-linalool

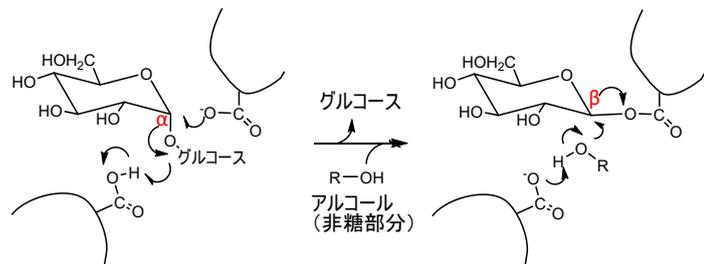


(\pm)-Linaloolに対する反応



まとめと今後の予定

- テルペンアルコールの高収率な配糖化を可能とした
- 3級アルコールへの糖転移反応を確認した
- 糖転移反応の非糖部分の選択性(立体選択性, 位置選択性など)の検討を進める



• 特許第6156947号 (H29.6.16) • R. Matsumoto *et al.*, *J. Mol. Catal. B:Enzym.*, 2016;133:S200-S203.
• 特開2017-123844 • K. Takahashi *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 2018;82:2205-2211.
• 特願2018-115568