



耐熱性 β-フルクトフラノシダーゼの開発

嶋根康弘¹、殿塚隆史²、臼井けい子¹、伊藤哲也³、岩沢美佐子¹
正木久晴³、岸野恵理子³、大田ゆかり¹、森梢¹、秦田勇二¹

¹ 独立行政法人 海洋研究開発機構、

² 国立大学法人 東京農工大学 大学院農学研究院、

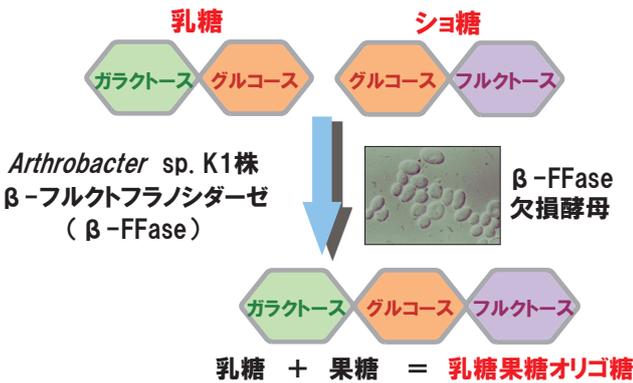
³ 塩水港精糖株式会社 糖質研究所

緒言

Arthrobacter sp. K-1株由来のβ-フルクトフラノシダーゼはラクトースとスクロースを原料として、整腸作用やミネラル吸収促進作用を有する機能性オリゴ糖ラクトスクロース(特定保健用食品)を合成する酵素であり、現在のところバッチ法による工業生産プロセスに利用されている。

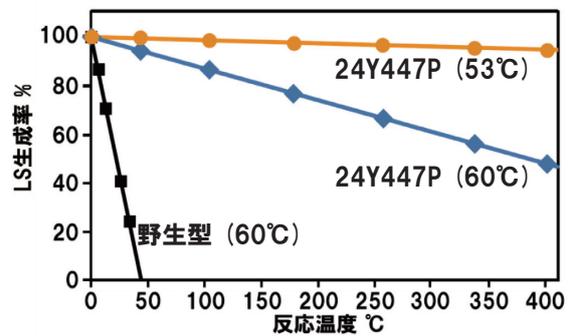
近年、二酸化炭素排出量抑制や廃棄物量の低減、エネルギー利用効率の向上等を背景として、製糖プロセスの効率化が求められており、耐熱性酵素を固定化したバイリアクターシステムによる連続反応への移行が望まれている。

これまでにランダム変異法により野生型酵素に5つのアミノ酸変異を導入した24Y447Pを取得して耐熱性の大幅な向上に成功しているが、工業化の為にさらなる耐熱化が必要である。本研究では、これまでに取得した変異体の耐熱化機構の解明、耐熱化に寄与する新たなアミノ酸変異の予測を行い、その酵素を実際に調整して実証実験を行った。



● 5アミノ酸変異体 24Y447P (特許出願済)

N末端 47番 T→S 447番 F→V 500番 P→S C末端
200番 S→T 470番 F→Y



これまでに開発した変異体24Y447Pは野生型と比較して大幅に耐熱化されている。

腸内のビフィズス菌を増やして



- ① おなかの調子を整える。
- ② ミネラルの吸収を促進する。



目的

FFaseの構造上の弱点を明らかにして耐熱性を効率的に向上させるために・・・

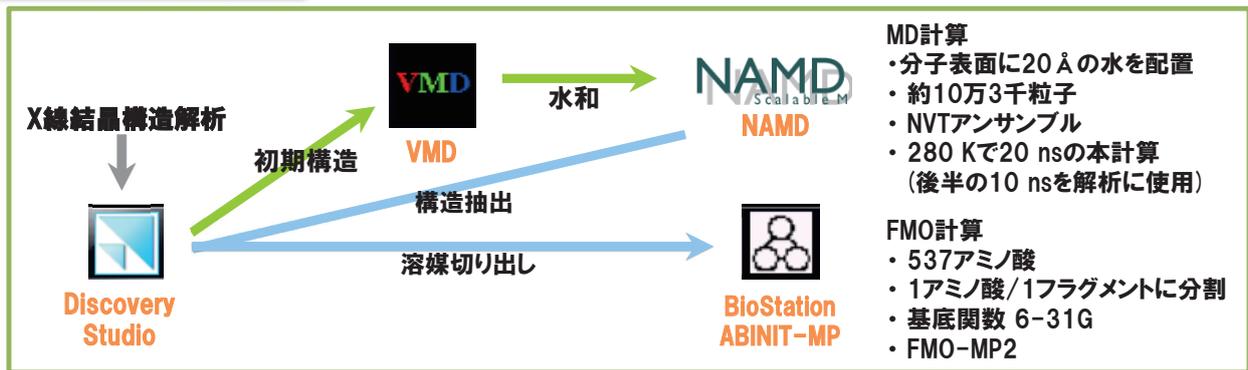
- ・ 24Y447Pの耐熱化機構を明らかにする
- ・ 熱振動の大きさを分子動力学計算で解析し、熱安定性を予測する
- ・ アミノ酸変異のエネルギー的寄与をFMO法で明らかにする
- ・ 遺伝子組換え体を調整して、性能を評価する



X線回折で得られたFFaseの立体構造

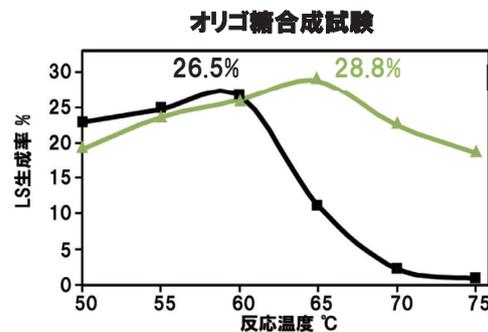
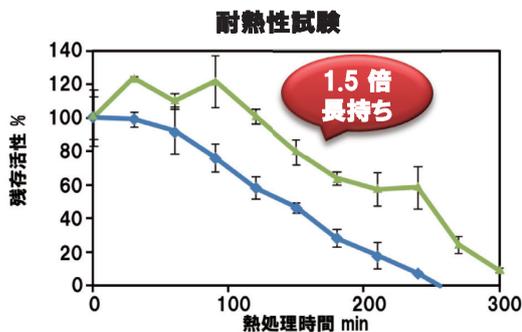
シミュレーションと実証実験により新たな耐熱化変異体を構築する

シミュレーション方法

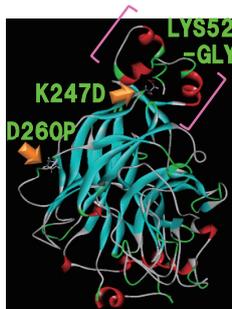
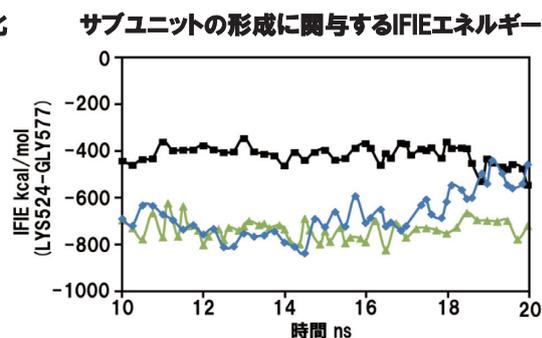
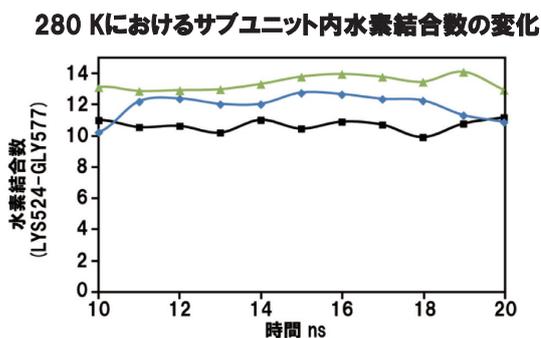


結果

24Y447Pをベースとしてシミュレーションと変異体構築を繰り返した結果、これまでよりも耐熱性が向上した変異体29-3が得られた。29-3は24Y447PをベースとしたD260P、K247Dの二重アミノ酸置換体であり、特にK247Dのアミノ酸置換により顕著に耐熱性が向上した。62°Cにおける寿命は24Y447Pの1.5倍に達した。またオリゴ糖 (LS) 合成能は野生型より若干向上していた。

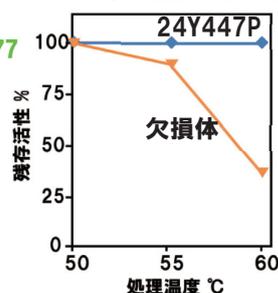


MD & FMOからわかったこと



29-3の構造

サブユニット欠損体の安定性



C末端の切除により耐熱性が低下する。

- 29-3、24Y447Pでは、野生型に比べてC末端のサブユニット構造(LYS524-GLY577)内に形成される水素結合の数が増加していた。
- サブユニット形成に關与するエネルギーをIFIEとして求めたところ、耐熱性との間に相関がみられた。
- 24Y447P及び29-3で導入されたアミノ酸変異は、いずれもサブユニットのトポロジーに影響を与え得る位置にあることから、本酵素の安定化機構の一端はサブユニット構造の強化によるものと推定される。
- サブユニットの切除により安定性が著しく低下することも、この推定を支持している。