

556 *Arthrobacter globiformis* A19 株由来環状四糖生成酵素遺伝子のクローニング

○阿賀 創, 丸田和彦, 向井和久, 津崎桂二, 久保田倫夫, 福田恵温, 栗本雅司, 辻阪好夫 (林原生化研)

【目的】新たに土壌から単離した *Arthrobacter globiformis* A19 株由来の環状四糖生成に関与する 6- α -glucosyltransferase (6GT) と α -isomaltosyltransferase (IMT) の両酵素遺伝子をクローニングし塩基配列を決定すること。

【方法】A19 株の染色体 DNA を鋳型とし、6GT の部分アミノ酸配列に基づいて合成したプライマーを用いて PCR を行い、6GT の一部を含む 0.5kb DNA をクローニングした。コロニーハイブリダイゼーションを行い、9.5kb と 6.5kb の陽性クローンをそれぞれ得た。

【結果】決定した DNA 配列には、6GT 遺伝子に隣接して配置する IMT 遺伝子が含まれていた。6GT は分泌シグナル 36 残基を含む 965 アミノ酸残基 (103,915Da)、IMT は分泌シグナル 49 残基を含む 1,121 アミノ酸残基 (121,585Da) であった。アミノ酸配列は *Bacillus globisporus* C11 株由来酵素の配列¹⁾ に対して 21.5%/823aa (6GT)、47.9%/1,096aa (IMT) の相同性を示し、 α -glucosidase family II の 2 つの共通配列も存在し、family II の触媒残基と考えられる 2 つの Asp も保存されていた。A19 株由来 IMT 遺伝子の上流にはリプレッサーのホモログがコードされており、C11 株の *cys* オペロンとは異なる遺伝子構造が示唆された。

1) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 827-838 (2002).

Cloning of the genes encoding cyclic tetrasaccharide-synthesizing enzymes from *Arthrobacter globiformis* A19

○ Hajime Aga, Kazuhiko Maruta, Kazuhisa Mukai, Keiji Tsusaki, Michio Kubota, Shigeharu Fukuda, Masashi Kurimoto, Yoshio Tsujisaka (Hayashibara Biochem. Lab., Inc.)

Key words cyclic tetrasaccharide, 6- α -glucosyltransferase, α -isomaltosyltransferase, *Arthrobacter globiformis*

558 **Direct production of D-arabinose from D-xylose by a coupling reaction using immobilized D-xylose isomerase, D-tagatose 3-epimerase and D-arabinose isomerase**

○ Ishrat Sultana, Goro Takada, Ken Izumori (Fac. Agr., Kagawa Univ.)

Klebsiella pneumoniae 40bXX, a mutant that constitutively produces D-arabinose isomerase (D-AI), was isolated through a series of repeated subcultures from the parent *K. pneumoniae* 40b on a mineral salt medium supplemented with L-xylose as a sole carbon source. D-AI, extracted from the mutant strain, was immobilized on chitopearl beads (BCW 2510). The optimum temperature for activity of immobilized enzyme was recorded at 40°C and the enzyme was stable up to 60°C. The enzyme was optimally active at pH 10.0 and was stable in the pH range of pH 6.0-11.0. The enzyme required manganese ion for maximum activity. The immobilized enzyme was used for the preparation of D-arabinose from D-xylose by a coupling reaction using two other immobilized enzymes, D-xylose isomerase (D-XI) and D-tagatose 3-epimerase (D-TE). At equilibrium, the yield of D-arabinose from D-xylose was approximately 40% and finally 2.0g D-arabinose was obtained from 5g of the substrate. After a number of simple purification steps, the crystalline product was identified by HPLC, IR spectra, NMR spectra and optical rotation measurements.

Direct production of D-arabinose from D-xylose by a coupling reaction using immobilized D-xylose isomerase, D-tagatose 3-epimerase and D-arabinose isomerase

○ Ishrat Sultana, Goro Takada, Ken Izumori (Faculty of Agri., Kagawa Univ.)

Key words D-arabinose isomerase, D-xylose isomerase, D-tagatose 3-epimerase

557 **6-Glucosyltransferase による L-アスコルビン酸への糖転移**

○津崎桂二, 向井和久, 里内和弘, 久保田倫夫, 福田恵温, 栗本雅司, 辻阪好夫 (林原生化研)

【目的】6-Glucosyltransferase (6GT) は環状四糖生成に関わる酵素であり、グルコース残基の 6 位水酸基に α -1,6 転移する作用を有する。6GT の転移受容体を検索したところ、L-アスコルビン酸 (AsA) に糖転移することがわかった。今回、6GT の AsA 糖転移を詳細に調べるとともに、AsA 糖転移物の工業的製造への応用を検討した。

【方法】*Arthrobacter globiformis* A19 株及び *Bacillus globisporus* C11 株由来の 6GT をそれぞれ培養上清から電気泳動的に単一にまで精製した。AsA とマルトペンタオースを基質として反応させ、得られた生成物を HPLC で分離定量した。

【結果】両株由来の 6GT とも AsA に α -グルコシル転移し、AsA の 2 位水酸基への糖転移物 (AA-2G) を生成した。両者の AA-2G 生成率を比較したところ、*A. globiformis* A19 酵素の方が高い生成率であった。A19 酵素の AA-2G 生成反応は最適温度 55°C、最適 pH5.5 を示した。AA-2G 生成反応の最適 pH は、本来のグルコース残基への α -1,6-グルコシル転移の pH8.4 と比べ、酸性側に大きくシフトしていた。AsA への転移はその 2 位水酸基に特異的で、5 位や 6 位水酸基への転移生成物は検出されなかった。A19 酵素を用いて AA-2G 製造を検討したところ、澱粉部分分解物と AsA との混合物から約 24% の AA-2G 生成率が得られた。Cyclomaltodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19) と併用反応させることで、さらに高い約 34% の生成率に達することがわかった。

Transglucosylation into L-ascorbic acid by 6-glucosyltransferase

○ Keiji Tsusaki, Kazuhisa Mukai, Kazuhiro Satouchi, Michio Kubota, Shigeharu Fukuda, Masashi Kurimoto, Yoshio Tsujisaka (Hayashibara Biochem. Lab., Inc.)

Key words 糖転移, L-アスコルビン酸, 6-glucosyltransferase, *Arthrobacter globiformis*, *Bacillus globisporus*, アスコルビン酸 2-グルコシド

559 **L-ラムノースイソメラーゼの固定化と D-アロース生産への応用**

Khim Leang, ○野口尚希, 深井善範, 森安麻耶, 高田悟郎, 何森 健 (香川大・農・生物資源食糧化・希少糖研究セ)

【目的】*Pseudomonas stutzeri* LL172 株の生産する L-ラムノースイソメラーゼは D-ブシコースと D-アロース間の異性化反応を触媒する。我々はすでに L-ラムノースイソメラーゼ遺伝子のクローニング、大腸菌による大量発現および His-tag を融合させた L-ラムノースイソメラーゼの簡易精製法の確立に成功している。本研究では希少糖 D-アロースを大量に生産するために L-ラムノースイソメラーゼ固定化法の検討を行った。

【方法および結果】純度が高く高活性の L-ラムノースイソメラーゼを用いた固定化法としてグルタルアルデヒド架橋法を検討し、D-アロース生産の効率化を試みた。20% L-リジンと 12.5% グルタルアルデヒドを用いて 5500U の精製 L-ラムノースイソメラーゼを架橋したところ 4500U の活性を持つ酵素がえられ、効率よく架橋されていた。架橋した L-ラムノースイソメラーゼの至適温度、熱安定性、至適 pH、pH 安定性、基質特異性、反応速度の解析による諸性質の検討を行ったところ架橋前の L-ラムノースイソメラーゼとほぼ同じ性質であった。3.4g の架橋酵素と 20g の D-ブシコースを全量 200ml の系でバッチ反応させたところ、10 時間で平衡に達し、1 日当たり 10g の D-アロースが生産できた。架橋酵素は 10 日以上安定を保っていた。また、この架橋酵素をカラムにつめバイオリクターを構築し、D-ブシコースを通過して反応させたところ、同様に D-アロースに転換され連続反応が可能であった。

Immobilization of L-rhamnose isomerase and its application for D-allose production

Leang Khim, ○ Naoki Noguchi, Yosinori Fukai, Maya Moriyasu, Goro Takada, Ken Izumori (Dept. Biochem. Food Sci., Fac. Agric., Rare Sugar Res. Center, Kagawa Univ.)

Key words L-rhamnose isomerase, D-allose, D-psicose, cross-link