

新規枝作り酵素による高保湿剤としての多分岐グルカンの合成と構造・物性解析

東京工業大学生命理工学院

八波 利恵

In recent years, the development of environmentally friendly materials with reduced environmental impact has been promoted in various fields in order to realize a sustainable society. Among them, materials synthesized by microbial enzymes are attracting attention as environmentally friendly materials because they do not require organic solvents during synthesis and are decomposed by microorganisms without causing environmental pollution.

Haloarcula japonica, a halophilic archaeon that requires high concentrations of salt, harbors the malA gene encoding an enzyme of the α -amylase family in its genome, and recombinant MalA expressed in *H. japonica* efficiently catalyzes the transfer of short glucose chains and produces highly water-soluble hyperbranched glucan. This property has been shown to produce a highly water-soluble hyperbranched glucan. This property makes the synthesized glucan potentially applicable as a high-performance moisturizer.

In this study, recombinant MalA was prepared to gain insight into the substrate specificity of MalA, and high molecular weight glucans were synthesized utilizing various maltodextrins and polysaccharides to analyze their chain length distribution. Furthermore, the solubility of glucans synthesized with MalA was evaluated under different NaCl concentrations. The results revealed that MalA mainly synthesizes highly branched glucans from maltodextrins of degree of polymerization (DP) 3 or higher and shows a unique ability to produce branched glucans from very short oligosaccharides such as G3. Furthermore, the glucan synthesized with MalA showed higher solubility than those synthesized without enzymatic treatment, suggesting its potential as a high-performance moisturizer.

The synthesized glucans have potential applications in the cosmetics industry as an environmentally friendly alternative to palm oil and squalene, addressing concerns regarding deforestation, human rights issues, and species extinction. Further studies on the structure and properties of the synthesized branched glucan will facilitate its use as a high-performance moisturizer in cosmetic formulations.

1. 緒言

近年、持続可能な社会の実現のために、環境負荷低減型の素材開発が様々な分野で行われている。中でも、微生物酵素によって合成される素材は、「合成の際に有機溶媒を使用しない」、「河川等に排出されても微生物が分解でき、環境汚染とならない」という2つの利点から環境に非常に優しい素材として注目されている。

*Haloarcula japonica*は、生育に高濃度の塩を要求する高度好塩性古細菌である¹⁾。また、*H. japonica*のゲノム上に α -アミラーゼファミリー酵素をコードする *malA* 遺伝子が見出され、発現型プラスミド pJMalA を用いた親株 *H. japonica* における組換え MalA の発現と性質検討が行われた。その結果、MalA は非常に短いグルコース鎖を極めて効率よく α -1,6 転移する新規な好塩性枝作り酵素であることがわかった^{2,3)}。薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いた予備的解析の結果、オリゴ糖に組換え MalA を作用させ

て合成した高重合度グルカンは多くの分岐をもち、その分岐鎖は非常に短いことが推測された (図1)。またこの構造から、本グルカンは極めて水溶性が高く高保湿剤として利用できると考えられた。

そこで本研究では、まず MalA に関する知見を得るため、組換え MalA を調製し、基質特異性の解析を行うこととした。またこのグルカンは、非常に短い分岐鎖を数多く有する多分岐グルカンであることが推測されたが、その構造の詳細は調べられていない。そこで、各種マルトオリゴ糖および多糖に組換え MalA を作用させて高重合度グルカンを合成し、その分岐鎖解析および水に対する溶解性を評価した。なお、MalA との比較として、*Rhodothermus obamensis* 由来枝作り酵素 Branchzyme を用い、基質特異性の解析および Branchzyme を作用させて合成した高重合度グルカンの解析も行った。

2. 方法

2.1. 組換え MalA の発現および精製

MalA 発現型プラスミド pOMJ2 を *H. japonica* に導入し、形質転換体を取得した。取得した形質転換体を 37℃ で7日間培養し、可溶性画分を取得した。可溶性画分をニッケル固定化担体を用いた FPLC に供した。溶出した試料を透析し、SDS-PAGE を行った。



Synthesis, structure and property analysis of hyperbranched glucan as a high moisturizing agent by a novel branching enzyme

Rie Yatsunami

Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology

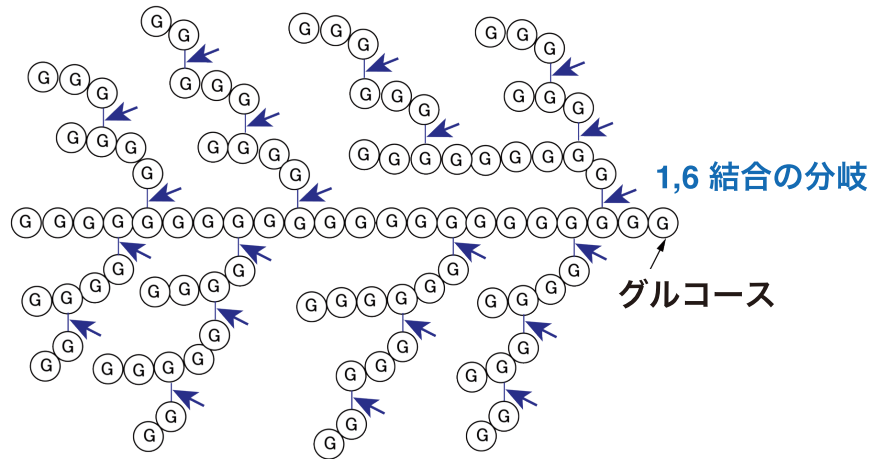


図1 MalA が合成する新規多分岐グルカンの構造模式図
新規多分岐グルカンは、多くの分岐をもち、その分子鎖は非常に短い。

2.2. 組換え MalA および Branchzyme の基質特異性の評価

基質には、マルトオリゴ糖としてグルコース (G1)、マルトース (G2)、マルトトリオース (G3)、マルトテトラオース (G4) を、多糖として可溶性デンプン、アミロース、アミロペクチンおよびグリコーゲンを用いた。可溶性基質 (マルトオリゴ糖、可溶性デンプン、アミロペクチンおよびグリコーゲン) の調製は以下のように行った。マイクロチューブに 20 mg の基質および 1.0 ml の滅菌イオン交換水を加え、設定温度 100℃ で加熱溶解した。溶解後、遠心分離により回収した上清を、2.0% (w/v) 基質溶液として用いた。不溶性基質であるアミロースの調製は、アミロースに 2.0 M NaOH を加え、適宜攪拌しながら溶解後、等量の 2.0 M HCl で中和し、2.0% 溶液を調製した。MalA の活性は、ヨウ素デンプン反応を用いた加水分解活性により算出した。2.0 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 40 μ l に、5.0 μ l の 2.0% 可溶性デンプンおよび 5.0 μ l の酵素精製標品を加え、37℃ において 15 分間反応を行った。反応液に 150 μ l のヨウ素試薬および 1.1 ml のイオン交換水を加え、波長 660 nm の吸光度を用いて測定した。上述の測定条件において、1 分間に A_{660} を 0.1 減少させるのに必要な酵素量を 1 ヨウ素デンプンユニット (ISU) と定義し、酵素活性を算出した。比活性 (ISU/mg) は酵素精製標品中に含まれるタンパク質濃度より見積った。Branchzym は 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) 40 μ l に、5.0 μ l の 2.0% 可溶性デンプンおよび 5.0 μ l の酵素精製標品を加え、70℃ において 15 分間反応を行った。組換え MalA と同様に 1 分間に A_{660} を 0.1 減少させるのに必要な酵素量を 1 ヨウ素デンプンユニット (ISU) と定義し、酵素活性を算出した。

MalA による基質特異性の解析は、以下のようにして行った。すなわち、4.5 M NaCl を含む 200 mM クエン酸緩

衝液 (pH 6.5) 8.0 μ l に、2.0% 各種基質溶液 10 μ l および MalA 精製標品 (60 ISU/ml) あるいは 2.0 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 2.0 μ l を加え、37℃ において 24 時間反応を行った。反応産物は、TLC により解析した。すなわち試料を、TLC プレートにスポットし、展開溶媒として 1-ブタノール/酢酸/水 (混合比 2:2:1、v/v/v) を使用して室温で展開した。展開後の TLC プレートを風乾し、発色液に浸潤した後、加熱して発色させた。発色液には 6.5 mM MN-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩および 3% 硫酸を含むメタノール溶液を使用した⁴⁾。

2.3. 組換え MalA および Branchzyme による高重合度グルカンの合成

2.2.1. MalA による高重合度グルカンの合成

4.5 M NaCl を含む 200 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.5) 1.6 ml に、5.0% 各種基質溶液 (G3、G7、アミロペクチンおよびグリコーゲン溶液) 2.0 ml および MalA 精製標品 (60 ISU/ml) あるいは 2.0 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 400 μ l をポリエチレンチューブに加え、37℃ において 96 時間反応を行った。ただし、G3 に関しては合成効率の低さを考慮して、4 倍スケールで反応を行った。反応終了後、TLC 解析用に少量採取し、残りの反応液から高重合度糖転移産物の抽出を行った。

2.2.2. Branchzyme による高重合度グルカンの合成

100 mM Tris-HCl (pH 7.2) 1.6 ml に、5.0% 各種基質溶液 (G3、G7、アミロペクチンおよびグリコーゲン溶液) 2.0 ml および Branchzyme 精製標品 (60 ISU/ml) あるいは 100 mM Tris-HCl (pH 7.2) 400 μ l をポリエチレンチューブに加え、70℃ において 96 時間反応を行った。反応終了後、TLC 解析用に少量採取し、残りの反応液から高重合度糖転移産物の抽出を行った。

2. 4. 組換え MalA および Branchzyme が合成した高重合度グルカンの抽出

上述した糖転移反応溶液を遠心分離し、不溶性物質を除いた上清をマイクロチューブに分注し、15分間（5分間×3、適宜激しく攪拌）加熱して、反応溶液中に存在する MalA（あるいは Branchzyme）を失活させた。遠心分離により変性した MalA（あるいは Branchzyme）などの不溶性物質を除き、上清を得た。2倍量の冷100%エタノールを加え、ドライアイス上で20分静置し、遠心により沈殿を回収した。沈殿物を冷70%エタノールおよび冷アセトンで洗浄し、再度遠心した後、遠心濃縮機により減圧乾燥した。この沈殿物に対して0.4 M NaCl含有滅菌イオン交換水500 μ lを加えて加熱溶解後、遠心分離し、不溶物を除去した。この操作を繰り返し、上清を凍結乾燥したものを高重合度グルカン抽出物とした。また、高重合度グルカン抽出物を滅菌イオン交換水に溶解した溶液を高重合度グルカン溶液とした。

2. 5. 枝切り酵素による高重合度グルカンの分解と分解産物の解析

2.0% 各高重合度グルカン溶液4.0 μ lに、滅菌イオン交換水4.0 μ lおよびそれぞれ10mU/ μ lとなるよう調製したイソアミラーゼ、プルランナーゼ、オリゴ-1,6-グリコシダーゼ混合酵素液（以降、枝切り酵素ミックスと呼ぶ）2.0 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cにおいて14時間程反応を行った。反応終了後、TLC解析を行った。

2. 6. 高重合度グルカンの各塩濃度下における溶解性評価

G7、グリコーゲンおよびアミロペクチンに組換え MalA を作用させて合成した高重合度グルカン〔以後、それぞれ G7 (MalA+)、グリコーゲン (MalA+) およびアミロペクチン (MalA+) と呼ぶ〕に0-4.0 M NaCl溶液100 μ lを加えた。37 $^{\circ}$ Cあるいは100 $^{\circ}$ Cのもと、15分間静置した（適宜激しく攪拌）。その後、遠心分離により上清を回収した。上清を滅菌イオン交換水で500倍に希釈したのち、フェノール硫酸法^{5,6)}を用いて試料に含まれるグルカン量を測定した。溶解率 (%) は、100 $^{\circ}$ Cで溶解したグルカン量 ($G_{100^{\circ}\text{C}}$) と37 $^{\circ}$ Cで溶解したグルカン量 ($G_{37^{\circ}\text{C}}$) の割合を以下の式により算出した。

$$\text{溶解率 (\%)} = G_{37^{\circ}\text{C}} / G_{100^{\circ}\text{C}} \times 100$$

3. 結果および考察

3. 1. MalA 精製標品の取得

MalA 発現型プラスミド pOMJ2 を導入した *H. japonica* 形質転換体を培養後、菌体破碎後に得られた可溶性画分および不溶性画分を SDS-PAGE に供したところ、可溶性画分に MalA が過剰に生産されていることを示唆するバンド

が認められた。そこで、可溶性画分をニッケル固定化担体を用いた FPLC に供し、精製を行った。溶出後の試料を SDS-PAGE に供し、CBB 染色を行ったところ、単一バンドのタンパク質が検出され、MalA が精製されたことが確認された。

3. 2. 組換え MalA および Branchzyme の基質特異性の解析

マルトオリゴ糖を基質として組換え MalA の基質特異性を解析した。その結果、組換え MalA は G1、G2 には作用せず、G3 以上のマルトオリゴ糖から、もとの大きさ以上のオリゴ糖および多分岐グルカンを合成することが明らかとなった（図2）。G3 という非常に短いオリゴ糖から多分岐グルカンを合成する酵素はこれまで例がなく、全く新しい多分岐グルカンを合成している可能性が示唆された。また、各種多糖（可溶性デンプン、アミロース、アミロペクチンおよびグリコーゲン）を基質として用いたところ、いずれの場合も多分岐グルカンが合成することがわかった。一方、G3 および G7 を基質に用いて、Branchzyme を作用させたのちの産物を TLC によって解析した。その結果、いずれの基質を用いた場合も加水分解産物および高重合度グルカンは検出されなかった。これより、Branchzyme は G3 および G7 に作用しないと考えられた。これに対し、アミロペクチンあるいはグリコーゲンを基質に用いた場合、いずれも加水分解産物と高重合度グルカンが検出され、糖転移反応の進行が確認された。

3. 3. 各種マルトオリゴ糖および多糖に酵素を作用させて合成した高重合度グルカンの解析

G3 あるいは G7 に MalA を作用させて合成した高重合度グルカンに枝切りミックスを加え、その分岐鎖を調べた〔図3(a)〕。その結果、G3 あるいは G7 に MalA を作用させて合成した高重合度グルカンは、G1 を含む非常に短い分岐鎖を数多く有する多分岐グルカンであることが示唆された。また、主な分岐鎖は G2-G4 と推測された。次に、基質であるアミロペクチンに対し、枝切り酵素ミックスで処理してその分岐鎖を調べたところ、G3 以上の分岐鎖を確認できた。しかしながら、G3-G4 のスポットは G6 以上に比べ薄いことから、アミロペクチンには非常に短い分岐鎖は少なく、G6 より長い分岐鎖を多く有することが推察された。そこで、アミロペクチンに MalA を作用させて合成した高重合度グルカンに枝切り酵素ミックスを加え、その分岐鎖を調べたところ、G2 以上の分岐鎖を確認できた。これより、アミロペクチンに MalA を作用させることで、より短い分岐鎖をもつグルカンを合成できることがわかった。一方で、グリコーゲンに MalA を作用させたものと、させていないものとは、その分岐鎖のパターンに変化はなか

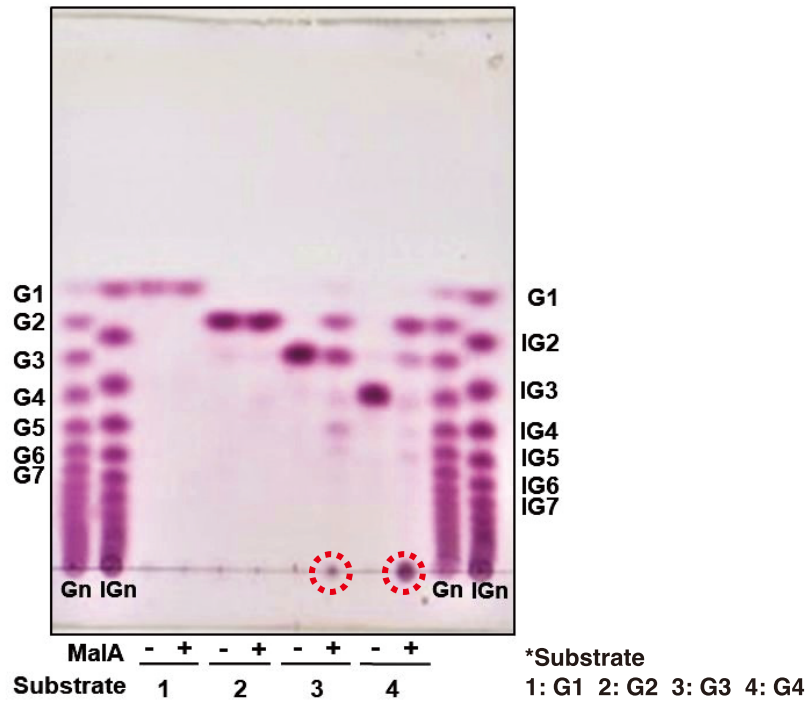


図2 マルトオリゴ糖を基質とした組換え MalA による加水分解および糖転移反応産物の TLC 解析

MalA に基質を加え、2.0M NaCl 存在下、37°C で 24 時間反応後の産物を TLC に供した。多分岐グルカンを破線の丸で囲った。

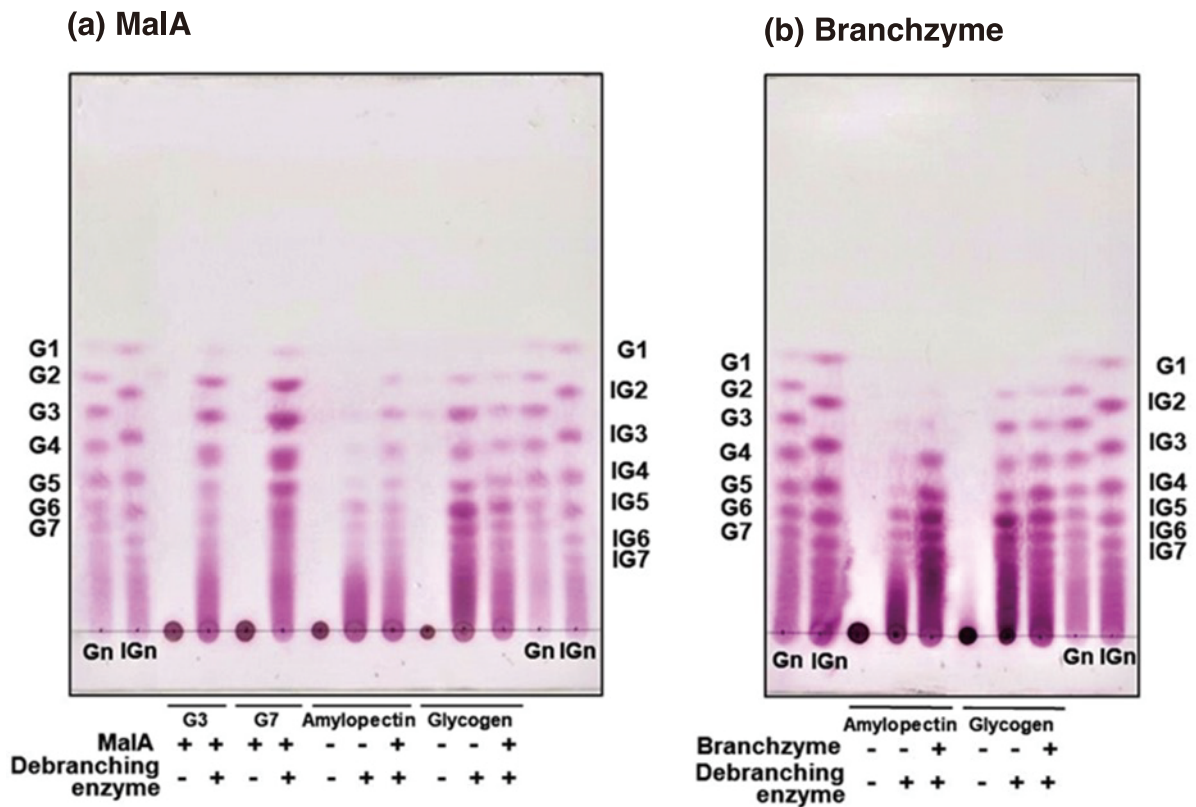


図3 マルトオリゴ糖あるいは多糖に酵素を作用させて合成した高重合度グルカンの TLC による分岐鎖解析
各基質に組換え MalA (a) あるいは Branchzyme (b) を用いて高重合度グルカンを合成したのち、枝切り後の試料を TLC に供した。

った。これより MalA はグリコーゲンには作用しにくいことが推測された。

同様に、アミロペクチンあるいはグリコーゲンに Branchzyme を作用させて合成した高重合度グルカンに枝切り酵素ミックスを加え、その分岐鎖を調べた [図 3 (b)]。アミロペクチンに Branchzyme を作用させて合成したグルカンからは、G2 以上の分岐鎖を確認できた。一方で、グリコーゲンに Branchzyme を作用させたものと、させていないものとは、その分岐鎖のパターンに変化はなかった。これより MalA と同様、Branchzyme はグリコーゲンには作用しにくいことが推測された。

以上の結果より、G3 あるいは G7 に MalA を作用させて合成した高重合度グルカンが、極めて短い分岐鎖を最も多くもつことがわかった。これより、本グルカンがより高い水溶性を有すると考えられた。

3. 4. G7 および多糖に MalA を作用させて合成した多分岐グルカンの溶解性解析

G7 (MalA+)、グリコーゲン (MalA+) およびアミロペクチン (MalA+) の 37℃ における各 NaCl 濃度下の溶解性を、溶解率を算出して評価した (図 4)。その結果、すべての多分岐グルカンにおいて NaCl 濃度における溶解性の差は見られなかったものの、MalA を作用させることで溶解率が高くなることがわかった。このことから、MalA を作用させて合成した短い分岐鎖を有する多分岐グルカンは、NaCl 濃度に関わらず高い溶解性を示すことが示唆された。また、MalA を作用させて合成したグルカンのうち、G7 (MalA+) は、グリコーゲン (MalA+) およびアミロペクチン (MalA+) に比べ、全ての NaCl 濃度下で最も高い溶解率を示すことがわかった。

4. 総括

本研究により、組換え MalA は G1、G2 には作用せず、

G3 以上のマルトオリゴ糖から、もとの大きさ以上のオリゴ糖および高重合度グルカンを合成することが明らかとなった。また、各種多糖 (可溶性デンプン、アミロース、アミロペクチンおよびグリコーゲン) を基質に用いた結果、可溶性デンプン、アミロース、アミロペクチンおよびグリコーゲンを基質として用いた場合、いずれも高重合度グルカンを合成することがわかった。G3 という非常に短いオリゴ糖から多分岐グルカンを合成する酵素はこれまで例がなく、全く新しい多分岐グルカンを合成している可能性が示唆された。各種基質に組換え MalA を作用させて合成した高重合度グルカンの分岐鎖を解析したところ、G3 および G7 に MalA を作用させて合成した高重合度グルカンは、G1 を含む非常に短い分岐鎖を数多く有する多分岐グルカンであることが示唆され、主な分岐鎖は G2-G5 と推測された。このような短い分岐鎖をもつグルカンは既報の Branchzyme を用いても得ることができず、MalA は極めて短い分岐鎖をもつ新規多分岐グルカン合成を触媒する新規酵素であることが示唆された。さらに、MalA が合成したグルカンの溶解性を調べたところ、多糖に MalA を作用させることで溶解率が高くなることが明らかとなった。

現在、様々な分野で地球環境に優しいものづくりが求められ、コスメトロジーにおいても新しい技術開発が強く望まれている。これまで化粧品原料として使用されてきたパーム油 (植物油) は、東南アジアなどで生産されるアブラヤシから採取されている。そのため、プランテーション開発に関わる熱帯雨林の破壊・人権面などの問題が挙げられてきた。他にも化粧品用保湿剤として使用されているスクアレンは、深海サメの肝油から生産されている。しかしながら深海サメが絶滅危惧種であるため、今後漁獲に規制が入り生産が大幅に減少すると推定されている。これらに対し、本研究で合成する新規多分岐グルカンは、微生物酵素による合成であるため、環境破壊・人権問題・種の絶滅といった問題が全くない。また、本研究で合成したグルカン

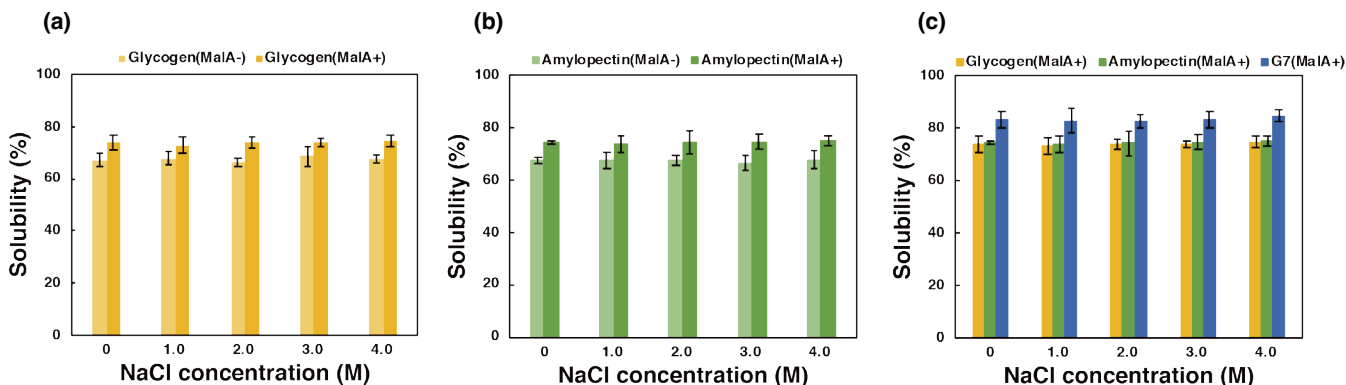


図 4 グリコーゲン、アミロペクチンおよび G7 に組換え MalA を作用させて合成した多分岐グルカンの各 NaCl 濃度下における溶解性解析 (a) および (b) はグリコーゲンおよびアミロペクチンを基質として MalA を作用させて合成した多分岐グルカンの溶解率を、(c) はグリコーゲン、アミロペクチンおよび G7 に MalA を作用させて合成した多分岐グルカンの溶解率を比較した。

は高い溶解性を有することからコスメトロジー分野における高保湿剤として応用が期待される。今後は、本研究において合成した多分岐グルカンの構造および物性をさらに詳細に調べ、高保湿剤としての応用を検討していく予定である。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Horikoshi K, Aono R, Nakamura S. The triangular halophilic archaeobacterium *Haloarcula japonica*. *Experientia*, 49, 497-502 (1993)
- 2) Onodera M, Yatsunami R, Tsukimura W, Fukui T, Nakasone K, Takashina T, Nakamura S. Gene analysis, expression and characterization of an intracellular α -amylase from extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 281-288 (2013)
- 3) Sueda R, Yoshida K, Onodera M, Fukui T, Yatsunami R, Nakamura S. Characterization of a GlgC homolog from extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 85, 1441-1447 (2021)
- 4) Bounias M. N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride as a new reagent for nanomole quantification of sugars on thin-layer plates by a mathematical calibration process. *Anal. Biochem.*, 106, 291-295 (1980)
- 5) Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers P A, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350-356 (1956)
- 6) 福井 作蔵. 還元糖の定量法 II, *化学と生物*, 3, 484-490 (1965)