

講演番号：3A20a01

講演日時：3月17日 09:00～ 共通講義棟北 A20 会場

バクテリア由来 L-フコキナーゼ/GDP-L-フコースピロホスホリラーゼを用いた GDP-L-ガラクトースの高生産

Effective enzymatic synthesis of GDP-L-galactose using bacterial L-fucokinase/GDP-L-fucose pyrophosphorylase

○大橋 博之¹、WAHL Claudia²、大橋 貴生¹、ELLING Lothar²、藤山 和仁¹ (¹大阪大学生物工学国際交流センター、²アーヘン工科大学)

○Hiroyuki OHASHI¹、Claudia WAHL²、Takao OHASHI¹、Lothar ELLING²、Kazuhito FUJIYAMA¹ (¹ICBiotech, ²RWTH Aachen Univ.)

[背景及び目的]

L-フコース (L-Fuc、6-デオキシ-L-ガラクトース) は糖鎖の非還元末端に広く存在し、分子認識の標的分子として様々な生物学的機能に関与することが知られている。一方、分子アナログである L-ガラクトース (L-Gal) は希少糖であり、海洋生物由来サポニンや植物細胞壁の構成成分として報告されている。これらの L-Gal 残基は GDP-L-Gal をドナー基質として、L-Gal 転移酵素により付加される。しかし GDP-L-Gal は市販されておらず、化学合成法および酵素法で調製が試みられている。酵素法では、GDP-D-マンノースから GDP-L-Gal を生成する、GDP-D-マンノース-3',5'-エピメラーゼ (GME) が用いられたが、GME の酵素学的特性に起因し、収率の向上が困難だった。そこで我々は、L-Gal の L-Fuc との構造類似性に着目し、L-フコキナーゼ/GDP-L-フコースピロホスホリラーゼ (FKP) を用いた GDP-L-Gal の簡便かつ高効率な酵素合成系の構築を目指した。

[結果]

FKP は、L-Fuc と ATP より L-Fuc 1-リン酸 (L-Fuc 1-P) と ADP を生成するフコキナーゼ活性と、GTP と L-Fuc-1P より GDP-L-Fuc とピロリン酸を生成する GDP-L-Fuc ピロホスホリラーゼ活性を有する二機能性の酵素であり、GDP 糖のワンポット合成が可能である。組換え FKP を大腸菌を用いて生産し、L-Gal を FKP の基質として反応を行ったところ、GDP-L-Gal が生成された。そこで、GDP-L-Gal の生成条件を最適化するため、pH、二価カチオン、温度、基質濃度、酵素濃度について検討を行った。さらに、GDP-L-Gal の精製条件を検討し、アルカリホスファターゼ処理、陰イオン交換カラム、及び有機溶媒沈澱を用いることで、酵素反応溶液より全収率 92.0% で GDP-L-Gal が精製できた。

[展望]

FKP は、GDP-L-Gal をはじめとする、GDP-L-Fuc の構造類縁体の生産に効果的だと考えられる。今回、GDP-L-Gal の容易に入手可能となったことで、今後、L-Gal を含む新規化合物や、未知の L-Gal 転移酵素の発見などが期待される。

FKP, GDP-L-fucose, GDP-L-galactose