

# 大豆イソフラボンからのイソフラボンアグリコンの効率的生産に適した新規 $\beta$ グルコシダーゼの開発

荻野千秋

神戸大学大学院工学研究科

## Characterization of Yeast Cell Surface Displayed *Aspergillus Oryzae* $\beta$ -Glucosidase 1 High Hydrolytic Activity for Soybean Isoflavone

Chiaki OGINO

Department of Chemical Science and Engineering,  
Graduate School of Engineering, Kobe University

### ABSTRACT

For efficient production of isoflavone aglycones from soybean isoflavones, we isolated three novel types of  $\beta$ -glucosidase (BGL1, BGL3 and BGL5) from the filamentous fungi *Aspergillus oryzae*. Three enzymes were independently displayed on the cell surface of a yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a fusion protein with  $\alpha$ -agglutinin. Three  $\beta$ -glucosidase-displaying yeast strains hydrolyzed isoflavone glycosides efficiently, but exhibited different substrate specificities. Among these  $\beta$ -glucosidases, BGL1 exhibited the highest activity and also broad substrate specificity to isoflavone glycosides. Although glucose released from isoflavone glycosides are generally known to inhibit  $\beta$ -glucosidase, the residual ratio of isoflavone glycosides generated using BGL1-displaying yeast strain reached approximately 6.2%, and the glucose concentration in reaction mixture was maintained at lower level. This result indicated that the BGL1-displaying yeast strain assimilated the glucose before they inhibited the hydrolysis reaction, and efficient production of isoflavone aglycones was achieved by engineered yeast cells displaying  $\beta$ -glucosidase. In addition, the optimal pH and temperature for BGL1 displayed on the cell surfaces of the yeast were 5.0 and 55°C, while the optima for BGL1 secreted by the yeast were 4.0 and 55°C. The displayed BGL1 was stable at higher pH compared with the secreted BGL1. In addition, the thermostability of BGL1 was improved by displaying the enzyme on the yeast cell surfaces. In addition, the displayed and secreted forms of BGL1 had similar substrate specificity.  $\beta$ -glucosidase hydrolyzes daidzin and genistin, which are the glycoside forms of

soybean isoflavones, to the aglycones. Isoflavone aglycones were efficiently produced by BGL1-displaying yeast from an isoflavone mixture; at optimal temperature and pH the rate of aglycone production was at least 15.8 g/l/h. After 144 h of reaction, almost isoflavones were converted to its aglycone by BGL1-displaying yeast. The results of the present study demonstrate that BGL1-displaying yeast strains are effective whole cell biocatalysts of isoflavone aglycone production. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 78-83, 2009.

Key words :  $\beta$ -glucosidase, isoflavone, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, cell surface display

イソフラボン類はポリフェノールの分類の1種であり、イソフラボンを基本骨格とするフラボノイドである。大豆、葛などのマメ科の植物に多く含まれている。ゲニステイン、ダイゼインなどのイソフラボンはエストロゲン（女性ホルモン）様の作用を有しており、これはエストロゲン受容体に結合してアゴニストとしてはたらくためである。近年では、イソフラボンのステロイド様の生理学的活性、抗心不全や抗がん作用、により非常に注目をされている<sup>1)</sup>。しかしながら、植物（大豆など）において、イソフラボンはアグリコン型（例えばdaizein, genistein, そしてglycitein）では存在せず、glucose-, 6'-O-malonylglucoside-, そして6'-O-acetylglucoside結合型<sup>2)</sup>などの配糖体として存在する。そしてこの配糖体が体内で吸収される時には、腸内細菌が持つ酵素で糖を切り離して初めて吸収することが可能となる。この糖が切り離されたものをアグリコン（ゲニン）といい、イソフラボンの生理活性の本体は、このアグリコンだと考えられている。

腸内において配糖体を加水分解する酵素 $\beta$ -グルコシダーゼ（ $\beta$ -D-グルコシドglucohydrolase; EC 3.2.1.21）は、イソフラボンの加水分解に触媒作用を示す複数のアイソフォームが多く、微生物に普遍的に存在しており、配糖体分子の非還元末端からのグルコシド、二糖類、オリゴ糖類、アリアルグルコシドとアルキルグルコシドなどを触媒する事が可能である。これまでに、この酵素の加水分解および転移酵素活性を利用して、様々な生物工学的なアプリケーションが提案されている。一例として、 $\beta$ -グルコシダーゼの加水分解活性はセルロースの分解を促進し、アルキルグルコシド<sup>3,4)</sup>を合成するのに利用されている。また、 $\beta$ -グルコシダーゼは酵母の細胞表層に提示することが可能である。我々は、酵母の細胞表層技術を既に確立しており（Fig. 1）、この表層提示系にBGLの表層提示を行うことで、遊離の $\beta$ -グルコシダーゼと同等程度の酵素活

性を有していることをこれまでに明らかにしている。

本研究では、麹菌由来の $\beta$ -グルコシダーゼをコードしている5つの遺伝子（BGL1～5）を、麹菌染色体DNAよりコンピューター解析によって特定し、これらのBGL遺伝子をグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカーである $\alpha$ -agglutininのC末端領域と遺伝子レベルで融和し、細胞表層に提示することを各々の酵素活性を比較検討する。そして、様々な酵素学的特性を明らかにする事を目的とする。

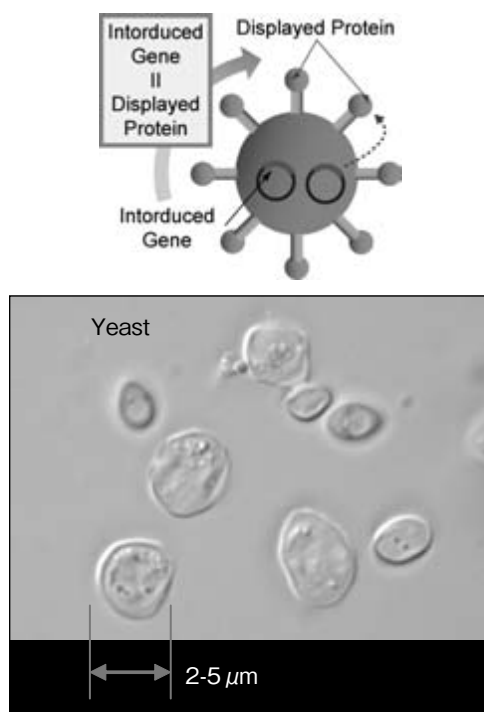


Fig. 1. Illustration of arming yeast.

## 実験方法

### 形質転換酵母の創製

Yeast Maker yeast transformation systemを用いた酢酸リチウム法によりBGL遺伝子を保持しているプラスミドを*S. cerevisiae* MT8-1の染色体上に相同組み換えにより導入し、BGL表層提示酵母を創製した。

## 結果と考察

### 麹菌由来β-グルコシダーゼ遺伝子の同定およびクローニング

麹菌ゲノム中から、優先順位の高いβ-グルコシダーゼ遺伝子の取得を行った。まず*in silico*解析において、既存のBGL酵素配列と相同性を有する遺伝子候補群を検索し、25候補遺伝子を選抜した。その中から新規な遺伝子配列、そしてイントロン位置を決定した5つの遺伝子について、最適primer設計後に、PCRによりエキソンユニットを増幅するとともに、これをjunction PCRで連結することで、cDNAを取得した。

### 形質転換酵母におけるBGL活性評価

取得した5つのBGL遺伝子は細胞表層提示システムを用い酵母に導入した。各株について合成基質を用いてβ-グルコシダーゼの簡易アッセイを行った結果、BGL4以外のBGL遺伝子は、酵母細胞表層においてβ-グルコシダーゼ活性を示した。特にBGL1は強力な酵素活性を示すため、アグリコン切り出しに威力を発揮すると期待されたため、BGL1表層提示酵母を用いて、大豆イソフラボン配糖体の食品添加剤「フジフラ

ボンP40」からのアグリコン切り出し活性について評価した。一般的にアグリコンは不溶性であり、アグリコン切り出し活性の有無は、配糖体の水溶液からの不溶性成分の生成により簡易的に評価できると予想された。その結果、BGL1表層提示酵母と接触させたフジフラボンP40水溶液からは、予想通り不溶性成分が生成した。以上から、BGL1表層提示酵母は、目的とするアグリコン切り出し活性を持つことが示唆された<sup>5)</sup>。従って、以降の実験ではBGL1について詳細に検討を行った。

### 基質特異性の評価

BGL1表層提示酵母の基質特異性を詳細に評価した (Table 1)。BGL1表層提示酵母はアリル基を非配糖部に有し、グルコースがβ結合したグルコシド (pNPG) に対して非常に高い活性を示すことが明らかとなった。また、大豆イソフラボン中に豊富に存在するDaidzin, GenistinはpNPGと類似した構造を有する物質であり、これらに対してもBGL1表層提示酵母は高い活性を示すことが明らかとなった。

### 形質転換酵母の培養時間検討

酵母細胞表層にBGL1が最も多量に提示されるような培養時間の検討を行った。BGL1表層提示酵母を100 mLの坂口フラスコでYPD培地を使用し30℃、150 rpm振盪培養を行った。経時的に培養液を採取して菌体濃度と酵素活性を測定した。酵素活性はOD<sub>600</sub>=0.05に調整した菌体と1 mM *p*-nitrophenyl-β-D-glucoside (pNPG) を加えた50 mM酢酸バッファー (pH5.0) に懸濁し、30℃で10 min振盪反応させて、遊離した*p*-nitrophenolの吸光度を測定する事により行った。Fig. 2に示すように、菌体濃度、酵素活

Table 1. Substrate specificity of BGL1

Substrate	Structure	Relative activity	Hydrolysis
pNPG		100	◎
pNPX		2.7	△
Cellobiose		0.46	×
Hexylglucoside		3.9	△
Daidzin Genistin		23.2 (Daidzin) 15.0 (Genistin)	○

性は培養時間とともに増加し、培養時間72 hにおいて最も多量のBGL1表層提示酵母が調製できることが確認できた。

#### 反応pHおよび温度がBGL1活性に及ぼす影響の検討

BGL1表層提示酵母とBGL1分泌生産酵母の培養上清を用いて、BGL1活性に及ぼすpH、温度の影響、およびBGL1のpH、温度の安定性についての検討をpH2.0～8.0 (Fig. 3) および30～70℃ (Fig. 4) の範囲で行った。結果、酵母細胞表層に提示されたBGL1はpH5.0、分泌されたBGL1はpH4.0で活性が最も高い事が確認できた。また、BGL1は幅広いpHで安定である事が確認できた。また、酵母細胞表層に提示されたBGL1、分泌されたBGL1は共に55℃で活性が最も高い事が確認できた。また、分泌生産されたBGL1に比べ、表層提示したBGL1は高い熱安定性を示すことが明らかとなった。このような安定性が向上するという現象は固定化酵素において報告されている。BGL1を細胞表層に固定化することによりこれらの有利な現象が見られたと示唆される。

更に、BGL1の連続的使用を検討するために、最適化した反応温度：30℃、反応pH：5.0において、反応温度50℃における酵素反応変化を検討した (Fig. 5)。

その結果、分泌型BGL1酵素は急速に酵素活性が減少していくが、細胞表層に提示されたBGL1は比較的長時間に渡って酵素活性が保持されていることが明らかになった。この事からも、表層提示したBGL1は高い熱安定性を示すことが明らかとなった<sup>6)</sup>。

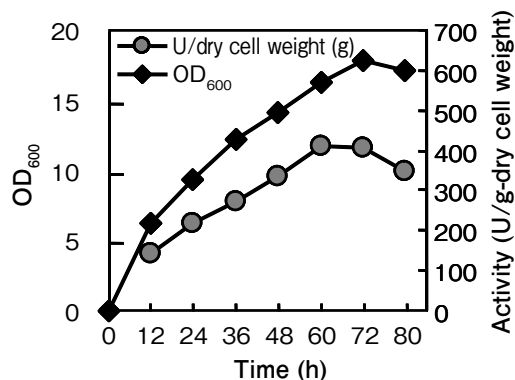


Fig. 2. Effect of cultivation time on the activity of BGL1 displayed on the yeast.

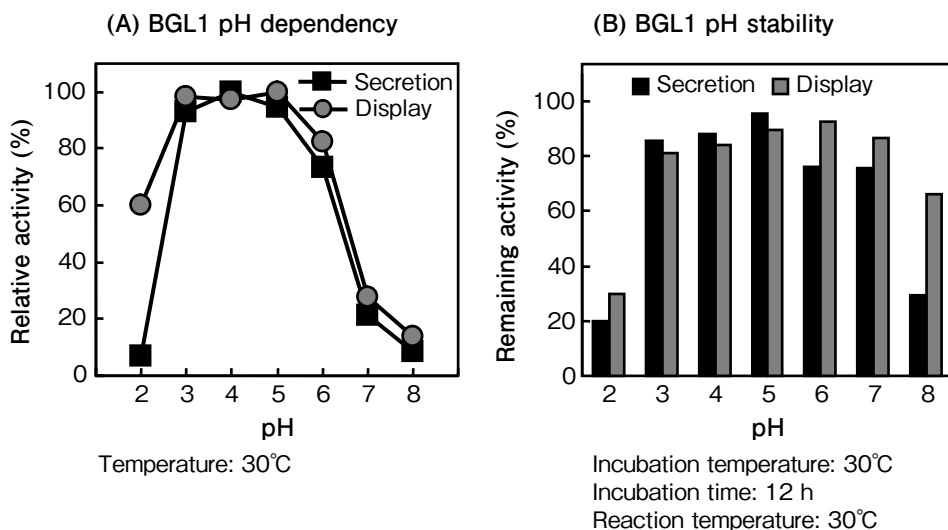


Fig. 3. Effect of pH on enzymatic activity of BGL.

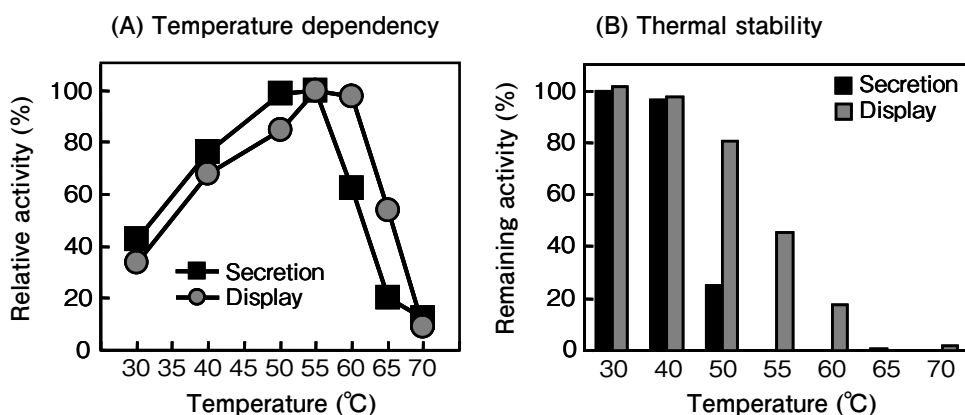


Fig. 4. Effect of temperature on enzymatic activity.

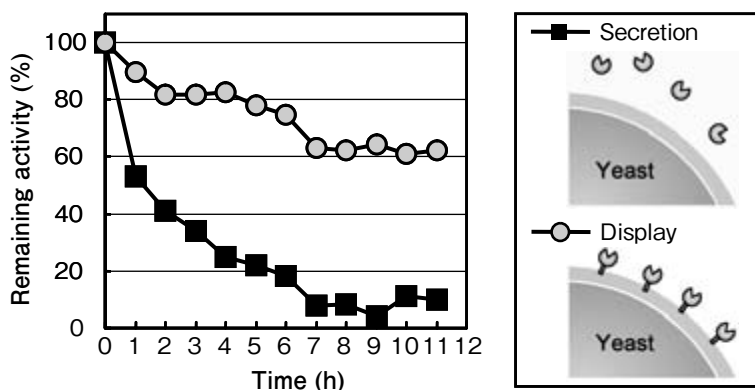


Fig. 5. Thermal stability comparison of BGL1 between displayed on the cell surface and free enzyme.

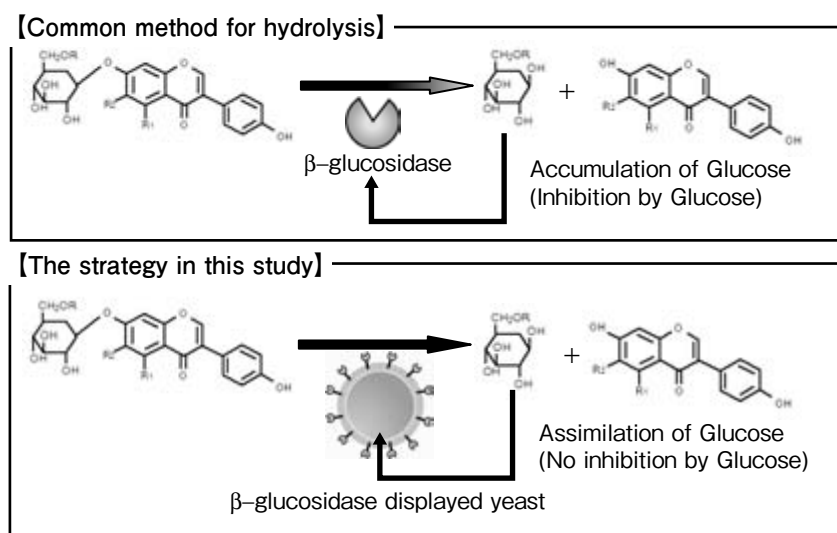


Fig. 6. Isoflavone aglycones production by arming yeast.

## 要 約

糸状菌は多様な2次代謝産物を生産できる多様な修飾酵素群の遺伝子を保有しており、古くから発酵食品用微生物の麹菌としても広く認知され、その安全性も広く認識されている微生物である。そして近年、この麹菌 (*Aspergillus oryzae*) においてゲノム解析が終了し、2次代謝に関与する全ての遺伝子産物(酵素)の情報が明らかになりつつある。大豆由来イソフラボンは、骨粗鬆症、更年期障害などの予防効果が認識されており、特定保険用食品(特保)としても認可されている機能性生体分子である。しかしながら、大豆中においてその多くは配糖体として存在し、その生体内での吸収性は低いことが知られている。一方で、その加水分解産物であるアグリコンの生体内での吸収性は配糖体の100倍以上で有ることが知られており、アグリコンの効率的且つ安全な生成方法の確立が望まれている。

我々は、大豆イソフラボンのアグリコンへの加水分解に適した新規な $\beta$ グルコシダーゼ探索を目指し、糸状菌ゲノム情報から $\beta$ グルコシダーゼ遺伝子のスクリーニングを行ってきた。その結果、5種の新規 $\beta$ グルコシダーゼが活性を有し、大豆イソフラボンの加水分解を触媒する事を明らかにした。そして、我々が構築してきている酵母・細胞表面提示技術に組み込んで、その酵素活性を評価した結果、酵母表面に置いて高いイソフラボンアグリコン生成を行う遺伝子を1つ同定した。このBGL1細胞表面提示酵母は、温度安定性、pH安定性においても分泌型酵素と比較して高い酵素活性を有していることが明らかとなった。一般的に、BGL酵素はイソフラボンアグリコンの酵素生産次に副産物として生成されるグルコースによって大きく阻害(フィードバック阻害)を受けることが明らかとなっているが、この細胞表面提示酵母を使用すれば、酵母自体がグルコース分子を直接取り込み、常に反応溶液中のグルコース濃度を低濃度に制御することが可能となる(Fig. 6)。この戦略より、これまで酵素法にて作製されていたイソフラボンアグリコンをより高濃度で合成が可能となり、食品応用産業分野に大きく貢献できると期待する。

## 文 献

- 1) Németh K, Plumb G.W, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM and Kroon PA (2003): Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr*, **42**, 29-42.
- 2) Song T, Barua K, Buseman G and Murphy PA (1998): Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *Am J Clin Nutr* **68**, 1474-1479.
- 3) Yanase H, Yamamoto K, Sato D and Okamoto K (2005): Ethanol production from cellobiose by *Zymobacter palmae* carrying the *Ruminococcus albus* beta-glucosidase gene. *J Biotechnol* **118**, 35-43.
- 4) Ducret A, Trani M and Lortie R (2002): Screening of various glycosidases for the synthesis of octyl glucoside. *Biotechnol Bioeng* **77**, 752-757.
- 5) Kaya M, Ito J, Kotaka A, Matsumura K, Bando H, Sahara H, Ogino C, Shibasaki S, Kuroda K, Ueda M, Kondo A and Hata Y (2008): Isoflavone aglycones production from isoflavone glycosides by display of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus oryzae* on yeast cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol* **79**, 51-60.
- 6) Ito J, Sahara H, Kaya M, Hata Y, Shibasaki S, Kawata K, Ishida S, Ogino C, Fukuda H and Kondo A (2008): Characterization of yeast cell surface displayed *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -glucosidase I with high hydrolytic activity on soy bean isoflavone. *J Mol Catal B-Enzym* **55**, 69-75.