

ステビアのグルコシルトランスフェラーゼによるステビオサイドからレバウディオサイドAへの変換

著者	東 四郎, 阿部 美紀子, 内海 俊樹, 藤崎 香里, 中山 法義, 西 保則, 南谷 俊治
雑誌名	鹿児島大学理学部紀要. 地学・生物学
巻	27
ページ	199-207
別言語のタイトル	Conversion of Stevioside to Rebaudioside A by Stevia-Glucosyltransferase
URL	http://hdl.handle.net/10232/6029

ステビアのグルコシルトランスフェラーゼによるステビオサイドからレバウディオサイドAへの変換

著者	東 四郎, 阿部 美紀子, 内海 俊樹, 藤崎 香里, 中山 法義, 西 保則, 南谷 俊治
雑誌名	鹿児島大学理学部紀要. 地学・生物学
巻	27
ページ	199-207
別言語のタイトル	Conversion of Stevioside to Rebaudioside A by Stevia-Glucosyltransferase
URL	http://hdl.handle.net/10232/00001729

ステビアのグルコシルトランスフェラーゼによる ステビオサイドからレバウディオサイドAへの変換

東 四郎¹⁾・阿部美紀子¹⁾・内海俊樹¹⁾・藤崎香里¹⁾・中山法義¹⁾・
西 保則²⁾・南谷俊治³⁾

(1994年10月17日)

Conversion of Stevioside to Rebaudioside A by Stevia-Glucosyltransferase

Shiro HIGASHI¹⁾, Mikiko ABE¹⁾, Toshiki UCHIUMI¹⁾, Kaori FUJISAKI¹⁾,
Noriyoshi NAKAYAMA¹⁾, Yasunori NISHI²⁾, Shunji NANYA³⁾

Abstract

Content-distribution of two sweet-glycosides, stevioside and rebaudioside A isolated from whole plant of *Stevia rebaudiana* Bertoni was estimated. Stevioside and rebaudioside A are contained mainly in leaves of the top part of the plant, 60.9% and 49.5% of the respective total contents. In the roots, only a little amount of stevioside was detected but not rebaudioside A. The mature leaves contained large amount of these glycosides than in the young leaves.

Glucosyltransferase which is an enzyme to convert stevioside into rebaudioside A, was isolated from fresh leaves of *S. rebaudiana*. The enzyme was partially purified by ion exchange and gel permeation chromatography. Molecular weight of the enzyme was approximately 33,500. This glucosyltransferase was immobilized on DEAE-agarose gel. More than 50% of stevioside had converted to rebaudioside A by continuous cyclic flow of the substrates solution through the enzyme-immobilized column for 24 hr.

Key words; *Stevia rebaudiana* Bertoni, Stevioside, Rebaudioside A,
Glucosyltransferase, Immobilized enzyme.

-
- ¹⁾ 鹿児島大学理学部生物学科 〒890 鹿児島市郡元1丁目21-35
Department of Biology, Faculty of Science, Kagoshima University, 1-21-35 Korimoto, Kagoshima 890, Japan
- ²⁾ 日農生研株式会社 〒899-73 鹿児島県曾於郡大崎町永吉5285-3
Nichinoh Seiken Co. Ltd., 5285-3 Nagayosi, Ohsaki-cho, Soh-gun, Kagoshima 899-73, Japan
- ³⁾ 山崎製パン株式会社 〒101 東京都千代田区岩本町3-2-4
Yamazaki Baking Co. Ltd., 3-2-4 Iwamoto-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 101

緒 論

キク科の多年生草本であるステビア (*Stevia rebaudiana* Bertoni) は、2次代謝産物として数種の甘味物質を産生する。その主たるものはステビオールをアグリコンとするジテルペン配糖体であり、結合する糖の種類、数、さらに結合する位置により甘味度が変化することが知られている (Mizutani *et al.* (1989))。その中でも最も多量に含まれているステビオサイド (Stevioside) およびレバウディオサイドA (Rebaudioside A) はしょ糖の200~300倍の甘味度を示すことから、近年、食品への利用が盛んになってきた。例えば、漬物食品への過剰な糖添加に起因する浸透圧損傷による品質低下、焼物食品などにおける糖質の過燃焼による外観上の損傷などは商品価値の下落を伴う。このような点を防止しつつ必要な甘味を確保する手段として、また、医療分野において食物としての糖の摂取量減少のために、ステビオサイドやレバウディオサイドAの利用の範囲はますます拡大しつつある。

ステビア植物体中でのステビオサイドおよびレバウディオサイドAの含有量は、その生育時期により異なる。すなわち開花期前の9月頃が最も多く、開花後急速に低下する。さらに、この2成分は植物体各組織、および同一組織中でも部位によっても含量が異なっている。これらの含有量を詳細に測定し、これらの甘味配糖体の収量を高めるための手段を考案することは有意義である。

一方、レバウディオサイドAはステビオサイドより高品位な甘味物質であり、その甘味度はステビオサイドの約1.5倍に達することが知られている。レバウディオサイドAを多く含有するステビアの品種を得るためには、従来の育種的手法による品種改良 (西, (1984)) と、酵素反応により、1分子のグルコースをステビオサイド分子へ付加してレバウディオサイドAへと変換する *in vitro* での手法の開発が試みられてきた (Sakamoto, *et al.* (1977), Kusama, *et al.* (1986), Fukunaga, *et al.* (1989), Shibata, *et al.* (1991))。

本研究においては、ステビア栽培種よりグルコシルトランスフェラーゼ (glucosyltransferase) を抽出、部分精製し、これを材料として固定化酵素を作成、UDP-グルコースをグルコシル供与体、ステビオサイドを受容体とし、ステビオサイドへのグルコース付加によるレバウディオサイドAの生成系の確立を試みることにした。

材料と方法

供試植物

ステビア (*Stevia rebaudiana* Bertoni) は日農生研株式会社試験圃場にて育成した、レバウディオサイドAの高生産品種8号を使用した。試験植物は土耕栽培し、自然光の条件下で育成した。

配糖体の抽出

風乾した植物試料を乳鉢で粉碎、粉末試料を乾燥重量の20倍量の温水に懸濁、60℃にて1時間振盪した。不溶物をろ過した後、同容量のn-ブタノールを加えて激しく振盪抽出し、5000rpmで5分間遠心分離、上層のブタノール層を50℃で減圧濃縮、乾固させた。これを少量の70%メタノールに溶解したものを抽出試料とした。

抽出物中のステビオサイドおよびレバウディオサイドAの同定

高速液体クロマトグラフィー (HPLC): 試料をメンブランフィルター(0.45 μ m)にてろ過し, アセトニトリル:水(80:20)の混合液にて平衡化した順相分配クロマトグラフィー用カラム TSKgel Amide-80 (カラムサイズ0.46 \times 25cm, Tosoh)にて, 流速0.75ml/minで溶出, UV-検出器で210nmにおける吸光度をモニターしてステビオサイドおよびレバウディオサイドA標準試料の溶出に要する相対保持時間と比較した。

薄層クロマトグラフィー (TLC): 試料中のステビオサイドおよびレバウディオサイドAの存在は薄層クロマトグラフィーにて確認した。薄層プレートはシリカゲル (DC-Alufolien Kieselgel 60 F254, MERCK) を使用, クロロホルム:メタノール:水(30:20:4)の混合溶液を展開溶媒として用いた。展開した薄層板は風乾した後, 50%硫酸を噴霧, 130 $^{\circ}$ Cで15分間加熱して発色するスポットの位置をそれぞれの標品のRf値と対比した。

核磁気共鳴 (1 H-NMR) の測定: 酵素反応により得られた生成物よりカラムクロマトグラフィー, HPLC で精製したレバウディオサイドAは, 1 H-NMR (JEOL SX-400)にて, ステビオサイドおよびレバウディオサイドAのそれぞれの標品のケミカルシフトと対比・確認した。

グルコシルトランスフェラーゼ粗酵素の抽出および部分精製

グルコシルトランスフェラーゼの抽出, 部分精製の手法を Fig. 1 に示した。すなわち, ステビアの新鮮葉を水洗し, 生重量の10倍量の Lysing buffer (125mM アスコルビン酸ナトリウム,

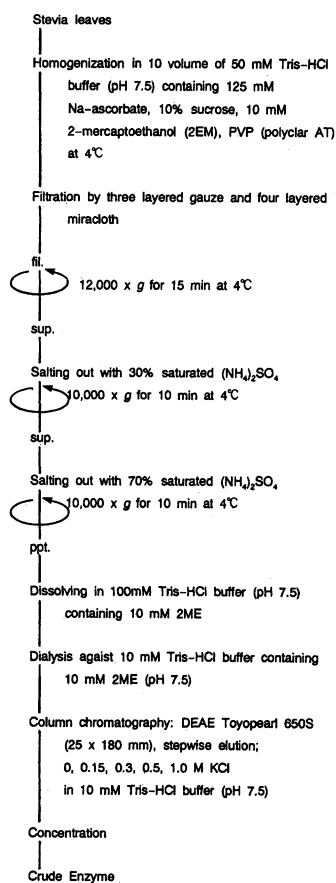


Fig. 1 Preparation of crude glucosyltransferase.

10% サッカロース, 1% 不溶性ポリビニルピロリドン, 10mM メルカプトエタノール (2ME), 50mM Tris-HCl buffer, pH7.5) を加えて 5 分間ホモジネート (Ultra-Turrax T25, Janke + Kunkel Lab.) した。得られた破碎液は, 3 層のガーゼ, 次に 4 層のミラクロス (Carbiochem) にて吸引ろ過し, 細胞壁などの残渣を除いた。ろ液を 12,000×g で遠心分離し, 上清を 30%~75% 飽和硫酸アンモニウムで塩析, 沈殿を 10mM 2ME を含む 0.1M Tris-HCl buffer, pH7.5 に溶解, 10mM の Tris-HCl buffer (pH7.5) に対して一夜透析した。以上の操作はすべて 4℃ で行った。透析した抽出液は次に 10mM Tris-HCl buffer (pH7.5) で平衡化した DEAE-トヨパール 650S (カラムサイズ, 25×180mm, Tosoh) にてイオン交換クロマトグラフィーを行った。溶出は KCl を含む 10mM Tris-HCl buffer (pH7.5) によるステップワイズ法を用いた。各ステップの KCl 濃度は, 非添加 (非吸着部), 0.15, 0.3, 0.5, 1.0M とし, 流速 2 ml/min で, 各ステップは 100ml ずつ溶出した。各分画は限外ろ過法 (アミコン PM-10, M.W. 10,000) にて脱塩濃縮して, ステビオサイドと UDP-グルコースを基質としてグルコシルトランスフェラーゼ活性の有無を測定した。次に, 得られた活性分画を 0.1M Tris-HCl buffer (pH7.5) で平衡化したトヨパール HW-55F (カラムサイズ, 22×500mm, Tosoh) にて, 流速 1 ml/min でゲルろ過クロマトグラフィーを行い, 280nm における吸光度を測定した。タンパク質分画中のグルコシルトランスフェラーゼ活性を測定, 活性分画を濃縮し, 再度同じカラムでクロマトグラフィーした。

Table 1 Composition of reaction mixture

Enzyme	100 μ l
Stevioside (6mM)	100 μ l
UDP-glucose (20mM)	200 μ l
Tris-HCl buffer (0.1M, pH7.5, 10mM 2ME)	600 μ l
Total	1000 μ l

グルコシルトランスフェラーゼ活性は, 6 mM ステビオサイド (グルコシル基受容体) 100 μ l, 20mM UDP グルコース (グルコース供与体) 200 μ l, 酵素溶液 (タンパク質濃度 0.53mg/ml) 100 μ l に, 10mM 2ME を含む 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.5) を加えて全量を 1 ml とし, 35℃ で 2 時間以上インキュベートした (Table 1)。反応生成物は同量の n-ブタノールにて振盪転層した後, n-ブタノールを減圧濃縮法で除去, 乾固試料を 60℃ の温湯に溶解, HPLC (カラム: Amide 80) にてレバウディオサイド A の生成の有無と生成量を測定した。

グルコシルトランスフェラーゼ活性におよぼす金属イオンの効果

DEAE-トヨパール 650S カラムに吸着, 0.15M KCl にて溶出した画分を粗酵素としてその活性発現におよぼす 2 価の陽イオンの効果について調べた。テストした金属イオンは, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} を終濃度 5 mM になるように加え, また 4.6kBq [$1\text{-}^{14}\text{C}$] UDP-D-グルコースを非ラベルの UDP-D-グルコースと共に添加した。反応後 n-ブタノールに転層した画分を液体シンチレーションカウンター (LSC-3050, アロカ) にて測定した。

酵素の固定化

DEAE トヨパール 650S カラムにて部分精製した粗酵素液 4 ml (タンパク質量, 約 20mg 相当) を DEAE-アガロースゲルに固定化させ, 10mM Tris-HCl buffer (pH7.5) で平衡化させたカラ

ム (カラムサイズ10×100mm) を作成した。反応には、6 mM のステビオサイドと20mM のUDP グルコースを、10mMの2 ME を含む10mM Tris-HCl buffer で6 ml調製し、35℃に保温したカラム中を24時間、流速0.75ml/min で循環させた。

結果および考察

植物体中におけるステビオサイドとレバウディオサイドAの分布

植物体全体の中でステビオサイドおよびレバウディオサイドAの両配糖体がどのように分布しているかを測定した。ステビアの全長約75cm、地上部草丈約50cmの生育の順調な個体を選び、地上部は Fig. 2 に示すように3等分したものと、根茎部の4区画について乾燥重量1gあたりのステビオサイドおよびレバウディオサイドAの含有量を測定した。その結果、両者とも最上部の若い葉に最も多く含まれており、ステビオサイドは54.55mg、レバウディオサイドAは28.73mgという値を得た。すなわち、この2者の配糖体だけで植物体の総組織乾燥重量の8.33%を占めていることが判明した。そしてその含有量は植物体の下部になるに従って低下し、根茎ではごくわずかのステビオサイドが検出されただけでレバウディオサイドAは検出されなかった。さらに、植物体上部の葉について、葉齢=葉身長により分類し、それぞれの配糖体の含量を測定した。葉の葉身長により4区分 (1cm未満, 1-2, 2-3, 3-4 cm) に分け、乾燥させた後 HPLC にて定量したところ、両配糖体とも最も大きいサイズ (3-4 cm) の区画に多く含まれていることが判つ

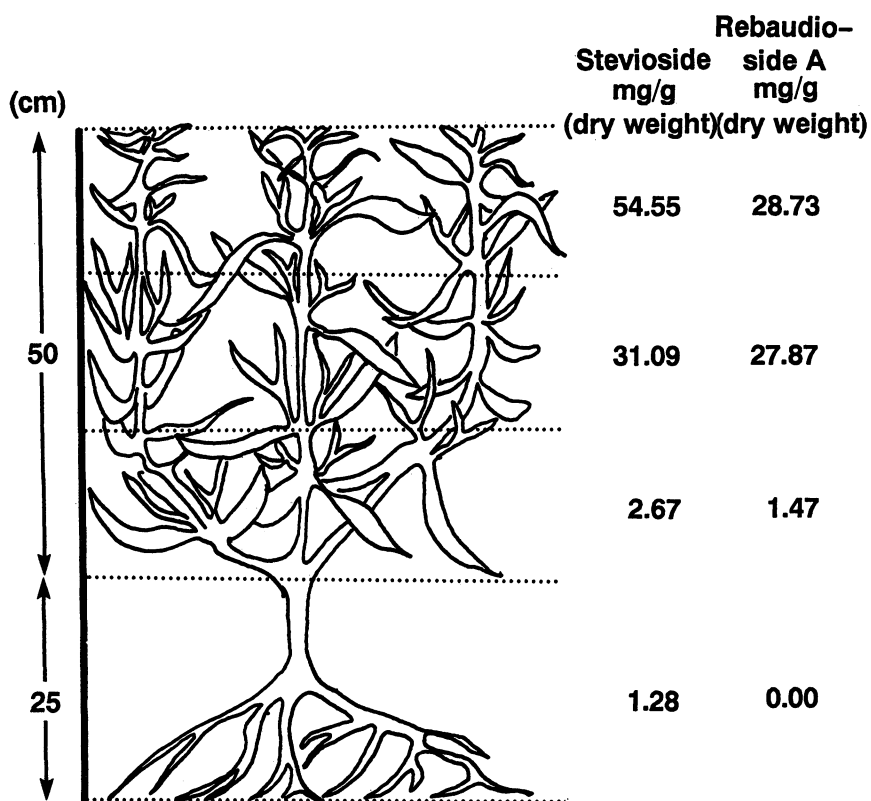


Fig. 2 Contents-distribution both stevioside and rebaudioside A in *Stevia rebaudiana* Bertoni.

た。また、1枚の葉では葉の中央部から先端側に基部側よりも多く含まれているという結果を得た(データは示さず)。すなわち、ステビオサイドおよびレバウディオサイドAとも植物全体では茎頂に近い若い部分の葉、また葉についてみれば十分に生長展開した葉で、しかも中央より先端側に多く含まれていたことから、両方の配糖体とも葉が分化して後合成され、ある程度の齢の進行に従って葉に蓄積されていると考えられる。このことは、葉での1次代謝で生成されたグルコースの余剰分が、2次代謝の材料として利用され、配糖体で蓄積されたことを予想させるものである。

ステビアの葉より分離したグルコシルトランスフェラーゼ

植物の茎頂部付近にステビオサイドおよびレバウディオサイドAが多く含まれていたことから、この領域には配糖体を生成する酵素が多く含まれていることが予想される。そこで、茎頂部の葉からステビオサイドにグルコース1分子を付加してレバウディオサイドAを生成する酵素、ステビア・グルコシルトランスフェラーゼの分離を試みた。

新鮮なステビアの葉の抽出液より、硫酸アンモニウムで塩析した分画をDEAE-トヨパール650Sに吸着させ、KClにてステップワイズ法で溶出したところ、グルコシルトランスフェラーゼ活性部分は0.15M KClにて溶出された。この分画を脱塩濃縮してトヨパールHW-55Fにてゲ

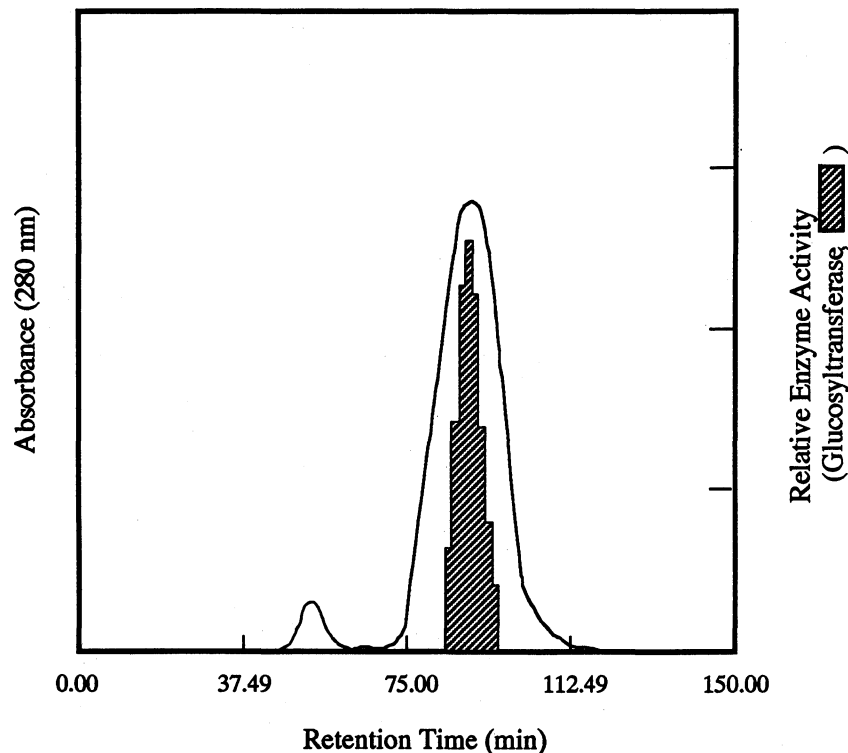


Fig. 3 FFLC-elution profile of stevia-glucosyltransferase. Column; Toyopearl HW-55F, Column size; 2.2×50 cm, Eluent; 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, Flow rate; 1 ml/min, Fraction volume; 2 ml.

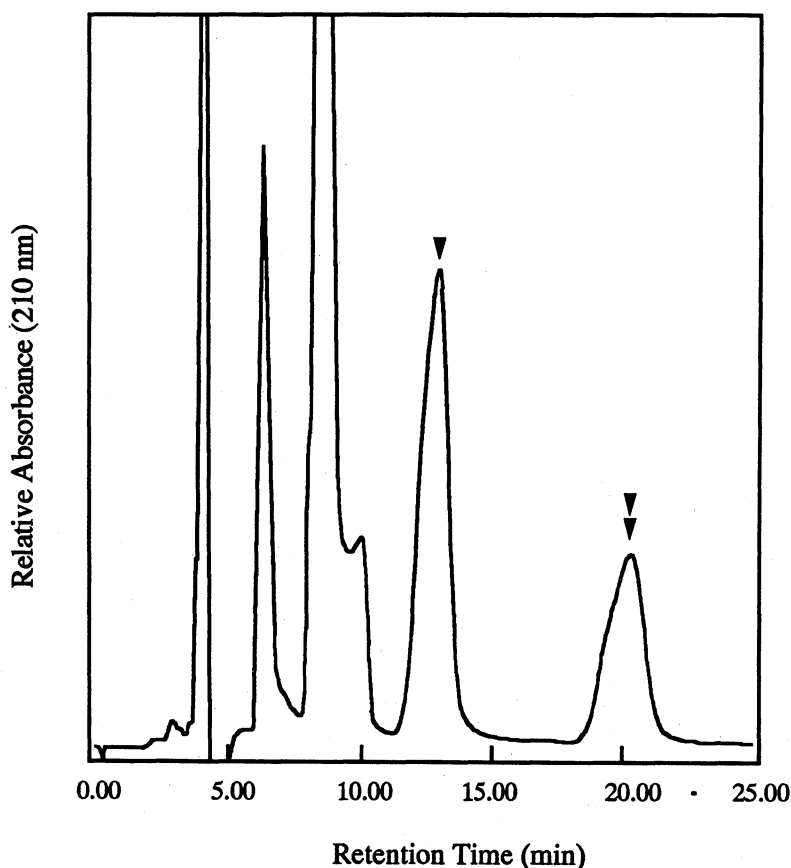


Fig. 4 HPLC-elution profile of the glucosyltransferase-reaction products, Rebaudioside A.
 Column; TSK-gel Amide 80, Column size; 4.6×250 mm,
 Eluent; CH₃CN:H₂O = 80:20, Flow rate; 0.75 ml/min.
 Single arrow; Stevioside, double arrow; Rebaudioside A.

ルろ過クロマトグラフィーを行った。活性分画を再度同じカラムにて再クロマトした280nmにおける吸光度と酵素活性のプロファイルを Fig. 3 に示した。酵素活性の測定には、カラム溶出液を2 ml ずつ分画、濃縮した後、グルコシルトランスフェラーゼ活性をHPLCにて測定し、レバウディオサイドAの生成量を求め Fig. 3 上にプロットした。分子量測定標準タンパク質を、トヨパール HW-55F カラムにてクロマトして作成した検量線より、このグルコシルトランスフェラーゼの分子量は約33,500と推定した。この酵素による反応生成物を Amide 80にて分析したHPLC プロファイルを Fig. 4 に示した。図中、ステビオサイドのピークは単矢印で、レバウディオサイドAのピークは二重矢印で示した。この両者のピークの高さは酵素活性の強さに従ってグルコース受容体であるステビオサイドが低下、反応生成物のレバウディオサイドAが増加する状況が明確に現れる。また、この酵素はCo²⁺により賦活化された (Table 2)。

Table 2 Effect of metal ions on glucosyltransferase activity

Metal ions (5mM)	Activity (%)
None (control)	100
CaCl ₂	86.8
MgSO ₄	31.6
MnCl ₂	29.3
CuSO ₄	20.8
CoCl ₂	123.9
FeSO ₄	73.1
ZnSO ₄	16.5

固定化酵素によるステビオサイドからレバウディオサイドAへの転換

DEAE-アガロースに固定化したグルコシルトランスフェラーゼを酵素源として連続反応を行い、レバウディオサイドAの生成を HPLC (カラム: Amide 80) にて定量した結果、24時間の循環反応で、用いたステビオサイドの約50%がレバウディオサイドAに変換していることを確認した。また、反応生成物中のレバウディオサイドAを Bio-Gel P2カラム (カラムサイズ, 17×1,000 mm) にて、10%エタノールを溶出液として流速0.1ml/minでゲルろ過クロマトグラフィーにより単離精製した。この精製試料を¹H-NMR にて分析、ケミカルシフトを標準試料のものと対比させ、固定化酵素による反応生成物がレバウディオサイドAであることを確認した (Fig. 5)。

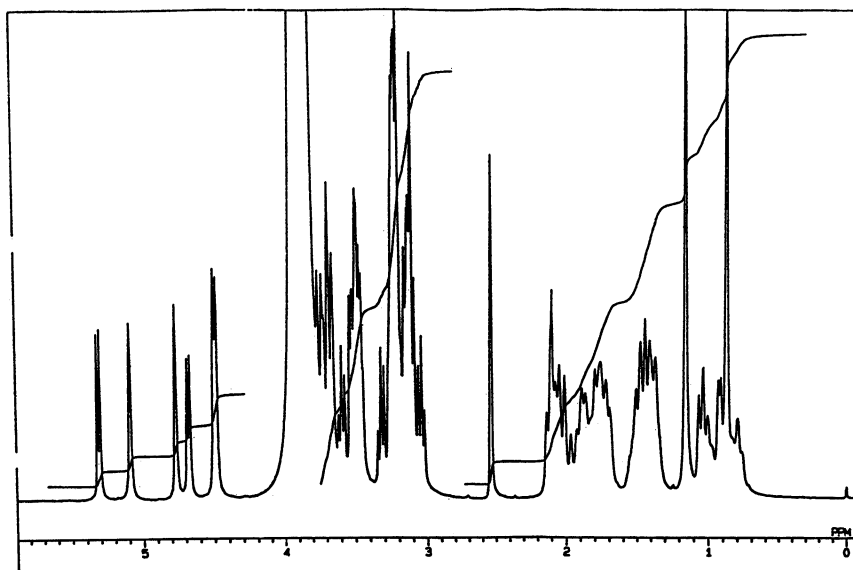


Fig. 5 ¹H-NMR spectra of the reaction product (Rebaudioside A) of the DEAE-agarose immobilized-glucosyltransferase.

以上のように、グルコシルトランスフェラーゼの固定化が可能であり、効率よくレバウディオサイドAが生成することを確認できたことから、酵素活性の安定化による諸種利点を活用した工業的スケールでの適用も可能であると考えられる。

ステビア中に蓄積される多量の甘味成分が植物自身にとって如何なる意味を持つのか、キク科植物の中でも、何故ステビアだけにこのような性質が備わっているのかなど、解析すべき問題点は多い。また、ステビオサイド→レバウディオサイドAへの転換酵素の応用性の拡大を目的とし

て、このグルコシルトランスフェラーゼおよび関連酵素系の遺伝子クローニングを行い、バイオテクノロジー的手法への展開が期待される。

謝 辞

本研究を行うにあたり、¹HNMR 測定ほか配糖体分析に関する諸事項のご助言を賜りました鹿児島大学理学部化学科岩川哲夫博士に衷心から感謝申し上げます。

本研究の一部は財団法人飯島記念食品科学振興財団の平成3年度学術研究助成を受けて行われた。

文 献

- Fukunaga, Y., Miyata, T., Nakayasu, N., Mizutani, K. and Kasai, R. 1989. Enzymatic transglucosylation products of stevioside: Separation and sweetness evaluation. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1603-1607.
- Kusama, S., Kusakabe, I., Nakamura, Y., Eda, S. and Murakami, K. 1986. Transglucosylation into stevioside by the enzyme system from *Streptomyces* sp.. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2445-2451.
- Mizutani, K., Miyata, T. and Kasai, R. 1989. Study on improvement of steviol bisglycosides: Selective enzymic transglucosylation of the 13-O-glycosyl moiety. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 395-398.
- 西 荒介, 1984. 物質生産細胞の変異と選抜. *化学と生物*, **22**, 724-729.
- Sakamoto, I., Yamasaki, K. and Tanaka, O. 1977. Chemical studies on sweet diterpen-glycosides: Conversion of stevioside into rebaudioside A. *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2466-2467.
- Shibata, H., Sonoke, S., Ochiai, H., Nishihashi, H. and Yamada, M. 1991. Glucosylation of steviol and steviol-glucosides in extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Physiol.*, **95**, 152-156.