

平成22年 5月31日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19580143

研究課題名（和文）：新しい抗菌剤としての1, 5-アナンヒドロフルクトースの評価

研究課題名（英文）：Evaluation of 1,5-anhydro-D-fructose as an antimicrobial agent

研究代表者

安部 淳一 (ABE JUNICHI)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：80128404

研究成果の概要（和文）：

1, 5-アナンヒドロフルクトースは、多くのグラム陽性細菌（枯草菌、黄色ブドウ球菌、連鎖球菌、乳酸菌、リステリア菌）に対して強い成育阻害活性を示すことが明らかにされた。グラム陰性細菌の代表である大腸菌に対しても、弱いながら増殖阻害活性が認められたが、これは大腸菌にはこの糖質を代謝する酵素活性があるからと考えられた。真菌類も本糖質を代謝し、増殖阻害は認められなかった。

本糖質は万能ではないものの、食品加工・製造業界にとって問題とされる多くの細菌に対して有効な抗菌剤であることが認められた。

研究成果の概要（英文）：

1,5-Anhydro-D-fructose suppressed the growth of many kinds of Gram positive bacteria including *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*. The effect of the sugar on Gram negative bacteria was limited. In the case of *Escherichia coli*, the sugar was found to be assimilated. The sugar also did not give any effect on the growth of many fungi and yeast, because they also assimilated this sugar.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2005年度 | | | |
| 2006年度 | | | |
| 2007年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2008年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2009年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：応用生物化学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：増殖阻害、グラム陽性菌、グラム陰性菌、真菌、糖アルコール

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎え、健康に密接に結びつく食品には安全であることと、高い生理活性機能が強く求められている。安全面を詳細に見ると、これら毎日口にする食品は作られる前、すなわち原材料のときから、また加工、調理された途端から物理的危害、生物的危害、化学的危害にさらされており、これらすべてに対するより一層の安全が要求されている。食品由来の大腸菌 O157, サルモネラ菌, 黄色ブドウ球菌に代表される病原体が引き起こす食中毒は、毎年新聞をにぎわせており深刻な社会問題となっている。最近の研究では多くの食品由来病原菌が心臓病や炎症性腸疾患, 神経障害, 自己免疫異常, 腎臓損傷などを引き起こすことが明らかにされつつある。最も簡便な加熱法などに代表される物理的な抗菌・殺菌法では風味が劣化、食品成分の変性や消失を招き、機能性を著しく損なう。そこで、これらの病害を防ぐために強力な薬品類や抗生物質が大量に使用されていることは周知のとおりで、使われたものの残留により食品の安全度が低下するという悪循環が発生している。

このような背景を元に、食品業界や農業、医薬業界では、使いやすく、残留性が低く、また人への悪い作用がない抗菌・殺菌剤の必要性が益々高まっているが、これらの条件を満たすものはなかなか見当たらなかった。我々は、海藻から抽出した酵素 α -グルカンリアーゼを澱粉に作用させて得られる 1,5-アンヒドロフルクトース(1,5-AF)の生理機能を調べている最中に、この新しい糖質が強い抗酸化能と抗菌作用を持つことを見出し、抗菌剤への利用を開発してきた。この新規糖質は食品に混在させて利用することができ、残留性等従来法の持つ欠点が見出せない。

2. 研究の目的

食品には、伝統的な製法を守り、あるいはその形状や物理的な性質から最新技術をもって殺菌、滅菌が極めて困難なものが存在する。例えば、味噌はその物理的な性質から加熱殺菌することが不可能であるため、高濃度食塩を添加することにより微生物汚染を防いでいる。しかしながら、例えば今後大きな社会問題に発展すると考えられる *Listeria monocytogenes* は高濃度食塩に耐性である。また、微生物にも従来の殺菌方法にはきわめて耐性の強いもの、例えば *Bacillus* 属菌による芽胞などが存在する。本研究はこれらの状況にでも使用できる抗菌剤を開発する。

我々は、現在の研究において、上記芽胞細菌の芽胞の形成と発芽に対して 1,5-AF が顕著な阻害効果を示すことを明らかにしつつあり、滅菌が困難な芽胞細菌に対する抗菌剤としての機能を認めつつある。本研究では、

(1)1,5-AF、あるいはその誘導体を利用して、さらに広範囲の微生物に対する殺菌・抗菌素材を開発し、それらの利用方法を確立すること、

(2)1,5-AF とその誘導体の抗菌メカニズムを明らかにするために、それらの物質の取り込みにより特異的に発現され、また抑制される細菌の蛋白質群を解析・同定すること、を目的とした。

当初は細胞毒性解析などの安全性の確認も目指したが、同時期に獲得された別資金のプロジェクトにより、霊長類を使用した動物実験を実施することができ、安全性を確認することができたため、本研究では安全性試験を中止した。

1,5-AF は、グルコースに似た構造を持つ天然糖であり、哺乳類の肝臓にも見出されている。しかしながら、その代謝速度の速さから調製するのが大変困難であり、従って生理機能はこれまで全く明らかになっていない。糖は、生物にとって一般的にエネルギー源であるが、もちろん高濃度下では高い浸透圧、低い水分活性のために細菌の生育を阻害することはよく知られている。適度な濃度の糖が菌の生活環を阻害することは 1,5-AF に特異な現象である。この糖がさまざまな細菌の生育を抑制するメカニズムを解明し、食品工業への応用法を開発することは食の安全と健康に重要な貢献をする。

我々の研究グループは、この新規糖質の「ものづくり」から研究を開始し、現代社会が強く求めている安全に寄与する物質を見出し、これを工業化することを目指している。これらのすべては現代社会が科学技術に求めている方向とマッチしている。

3. 研究の方法

①増殖抑制作用

1,5-AF を含む培地と含まない培地に同時に各種菌を植菌し、それぞれの金の最適条件で培養した。培養経過を 600 nm における吸光度を経時的に測定することにより調べた。また、様々な培養時間における培養上清、菌体に含まれる蛋白質をプロテオミクス的手法で、また糖質を高速液体クロマトグラフ、および質量分析計を用いて解析した。

②大腸菌の 1,5-AF 資化性

1,5-AF を含む培地に大腸菌を植菌し、37°C で一夜培養した。得られた菌体を超音波破砕し、得られた上清より各種クロマトグラフィーにより 1,5-AF 変換酵素を精製し諸性質を調べた。

③酵母による 1,5-AF の変換

酵母の培地に 1,5-AF を添加し、経時的に培地と菌体に含まれる糖質を解析した。また、酵母菌体を細胞壁分解酵素と超音波の併用により破壊して調製した粗酵素液より、各種

クロマトグラフィーにより、1,5-AF を糖アルコーンに変換する酵素を生成し、その性質を調べた。

4. 研究成果

①増殖抑制作用

食品の製造、加工、保存にさまざまな危害を与える微生物の培養時に 1,5-AF を共存させ、その培養への影響を調べた。その結果は、増殖が著しく阻害されたものと、軽微な疎外を受けたもの、全く影響を受けなかったものの 3 つに大別された。著しく阻害を受けたものは、グラム陽性の細菌群であり、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*)、連鎖球菌 (*Streptococcus mutans*)、乳酸菌 (*Lactobacillus casei*) などが挙げられた。軽微な阻害を受けたもののほとんどはグラム陰性細菌であり、大腸菌 (*Escherichia coli*)、腸球菌 (*Enterococcus casseliflavus*)、プロテウス菌 (*Proteus vulgaris*) などであった。一方、生育に全く盈虚を受けないのは真菌類であり、酵母 (*Candida sake*, *Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌 (*Aspergillus oryzae*, *Penicillium chrysogenum*) があげられた。

グラム陽性細菌の中でも、黄色ブドウ球菌は 1,5-AF への感受性が高く、0.5% の添加で増殖量が 20% に抑制された。この時菌体外に生産される毒素を定量したところ、生産性はおよそ 0.1% に低下していた。

虫歯の原因菌として有名な *Streptococcus mutans* も増殖を阻害され、さらには虫歯の発生病因因子と考えられている水不溶性のグルカンのスクロースからの生成が強く抑制された。

芽胞最近の形成する芽胞は、食品の様々な加工条件、特に加熱殺菌に著しい耐性をしめし、しばしば大きな食中毒事件を引き起こす。1,5-AF は、この芽胞細菌 *Bacillus subtilis* の増殖を抑制し、また芽胞の生成、及び芽胞の発芽を著しく抑制することが認められた。

食品の保存のためには、冷蔵や食塩の添加がしばしば行われるが、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) はそれらの条件下、低温と高濃度食塩存在下でも生育する細菌である。この菌は、畜産製品の汚染菌として最近注目を集めている。1,5-AF はリステリアの生育を強く阻害し、また添加する食塩と相乗的に増殖を阻害することが認められ、本菌の増殖予防に有効であった。

以上の例のように、1,5-AF はグラム陽性細菌の増殖を抑制し、また菌の生理を変化させ毒素や芽胞の生成を抑制することが認められ、増殖抑制剤として極めて効果が高いことが認められた。

②大腸菌の 1,5-AF 資化性

1,5-AF はグラム陽性細菌に対して強い増殖抑制作用を示すが、グラム陰性細菌への増殖抑制効果はあまり高くない。この理由を解明するために、1,5-AF の大腸菌に与える影響を調べた。

1,5-AF を添加した培地で大腸菌の増殖を追跡したところ、初期の増殖はこの糖により抑えられることが分かった。また、この時に食産業にとって問題となるバイオフィルムの形成が強く抑制されていることが判り、1,5-AF はやはり食品に応用できる優れた増殖抑制剤であることが認められた。しかしながら、培養後期には菌の増殖が回復することが認められた。これらのことは、大腸菌が、誘導的に 1,5-AF を分解する酵素を生産し、1,5-AF を資化していることを示唆する。

培養液中における 1,5-AF の変化を測定したところ、1,5-AF が減少するとともに別の物質に変換され、これがさらに減少していく (資化されている) ことが認められた。この物質を集めて解析したところ、既知の 1,5-アンヒドログルシトール (1,5-AG) であった。次に、大腸菌中に存在する 1,5-AF を 1,5-AG に変換する酵素を精製し、その性質を調べた。

菌体を超音波破砕した上清を粗酵素液として調べたところ、NADPH に依存して 1,5-AF を還元して 1,5-AG とする活性が認められた。本酵素活性をイオン交換、アフィニティ、疎水の各クロマトグラフィーにより精製度 58 倍、11% の収率で精製酵素を得た。

本酵素の様々な糖質に対する活性を調べたが、1,5-AF 以外の糖質に対する活性を見出すことができなかった。

本酵素をトリプシンで限定分解し、得られたペプチドのアミノ酸配列を調べた。これをデータベースで検索したところ、調べたすべてのアミノ酸配列が既知の大腸菌の酵素 2,5-diketo-D-gluconate reductase と一致した。この酵素は大腸菌内で glyoxal などを還元して、それら化学物質による増殖阻害を回復することが知られている。1,5-AF がどのように微生物の増殖阻害をするのか現時点ではまだ明らかにできていないが、増殖が強く抑制されない微生物では、1,5-AF はこのように変換されていることが明らかになった。変換された 1,5-AG は、大腸菌により資化されることが確かめられた。

③酵母による 1,5-AF の変換

前述のように、大腸菌では 1,5-AF は菌体内の酵素により 1,5-AG に変換されていることが認められたため、まったく 1,5-AF の増殖に対する影響を受けない酵母でも同様のメカニズムが働いているかを検討した。

1,5-AF 添加培地で酵母 *S. cerevisiae* を培養し、培地中の糖の誘導体を経時的に測定し

たところ、酵母では2種類の糖アルコールが精製していることを認めた。構造を解析したところ、前述の1,5-AGと1,5-アノヒドロマンニトール(1,5-AM)であった。

これら2種の糖アルコールがどのような酵素で生じるのかを検討したところ、NADPH依存性の2種それぞれの酵素があることが認められた。これらの酵素のうち、1,5-AMを精製する酵素は極めて不安定な酵素であることが判り、精製をすることはできなかった。

1,5-AGを精製する酵素は酵母菌体を細胞壁溶解酵素と超音波処理を併用して得られる粗酵素液から、精製度合いは1740倍、収率0.4%で酵素を均一に精製することができた。

本酵素の部分的なアミノ酸配列を元にデータベースで検索したところ、本酵素は既知のD-arabinose dehydrogenaseであることが認められた。既報のこの酵素の基質特異性を調べてみたところ、本酵素でも同様の特異性があることが確かめられた。一方、1,5-AFからの生成物である1,5-AGでは全く酸化反応は起きないことより、単に逆反応が作用しているわけではない。従って、この酵素は1,5-AFを還元する作用と、D-アラビノースを酸化する作用の二つを一つの蛋白質で触媒することが明らかになった。二つの別の基質を一つの酵素が逆の反応をする稀な酵素である。

本酵素の還元、酸化の両反応を詳細に調べたところ、1,5-AFに対する親和性と反応性の方がずいぶん大きいことが判った。基質特異性を詳細に検討した結果、本酵素の主反応は1,5-AFの還元であることが判り、本酵素は1,5-anhydro-D-fructose reductaseの名前で呼ばれるべきであることを提唱するものである。

この酵素が二つの反応を触媒することを利用して、一つの反応器内で両基質と微量のNADPHを添加して反応させた。本来ならば、ごく微量のNADPHが消費されたところで、反応は停止するべきであるが、逆の反応が起きるためにNADPHが再生され、両基質が無くなるまで本反応が進み続けることが認められた。

酵母においてD-アラビノース脱水素酵素は、ビタミンC類縁体を生成するのに働く酵素であることが認められている。この酵素がどのような機構で1,5-AFを還元するのか、また酵母内でどのような機能を果たしているのか大変興味のある問題であり、これらのことを今後明らかにしていく予定である。

④結論

1,5-AFは澱粉に海藻の酵素を作用させて生産される食品素材であり、従来の研究によりその安全性は認められている。この糖質は

強い還元作用があることから、その応用が期待されていたが、現在では食品の褐変防止や蛋白質・アミノ酸の修飾剤としての利用が伸びているところである。

研究者らは研究の途中で本糖質に微生物の増殖抑制効果があることを見出し、本研究によりその効果を評価した。1,5-AFは、食品産業で生物学的な危険をもたらす多くの細菌の増殖を強く、あるいは弱く阻害することが認められ、また生理作用が変化するために毒素や菌体外の蛋白質等の生産も抑制することが認められた。微生物の増殖を完全には抑えることができないものの、酸や食塩などと併用して食品の劣化を大きく改善できる物質であることが認められた。特に、増殖が早い細菌に有効なことから中食産業で今後の幅広い利用が期待できる。

また、研究の副産物として、二つの別の糖質の還元・酸化の両方向に作用する酵母の酵素の新知見が得られた。この酵素の昨日と構造については今後の研究で深く研究していく予定である。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計3件)

①泉 秀作、安部淳一

酵母由来1,5-Anhydro-D-fructose還元酵素の作用

平成21年度日本生物工学会九州支部大会

②酵母由来の1,5-Anhydro-D-fructose還元酵素の精製と諸性質

泉 秀作、長崎恵里奈、安部淳一

平成20年度日本生物工学会九州支部大会

③酵母による1,5-Anhydrofructoseの誘導体への変換

泉 秀作、長崎 恵里奈、安部 淳一

平成19年度日本生物工学会九州支部大会

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：1,5-D-アノヒドログルシトールの製造法

発明者：安部淳一、泉 秀作、吉永一浩

権利者：国立大学法人鹿児島大学、日本澱粉工業株式会社

番号：特開2010-104239

出願年月日：平成20年10月28日

国内外の別：国内

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安部 淳一 (ABE JUNICHI)
鹿児島大学・農学部・教授
研究者番号：80128404

(2) 研究分担者

南 雄二 (MINAMI YUJI)
鹿児島大学・農学部・准教授
研究者番号：90253913

高峯 和則 (TAKAMINE KAZUNORI)
鹿児島大学・農学部・准教授
研究者番号：10433070

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

吉永 一浩 (YOSHINAGA KAZUHIRO)
日本澱粉工業株式会社・研究開発部・課長