

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：84431

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05821

研究課題名（和文）ヘキソースのC-6位酸化活性を示す糖酸化菌を用いた新規酸性糖の創製

研究課題名（英文）Production of new oligosaccharides by bacteria oxidizing C-6 position of aldohexoses

研究代表者

桐生 高明（KIRYU, Takaaki）

地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森之宮センター・研究室長

研究者番号：20416308

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：D-グルコースのC-6位を酸化するアルコールデヒドロゲナーゼを持つ *Pseudogluconobacter* 属微生物の各種配糖体、オリゴ糖及び環状糖への反応性について調べた。さらに、NMRや質量分析で生成した糖酸化物を同定した。本菌の休止菌体及び酵素は各種配糖体、オリゴ糖を効率よく酸化した。配糖体の酸化ではRebaudioside Aのように比較的大きなアグリコンを持つものも酸化した。オリゴ糖の酸化では、複数あるC-6位のヒドロキシメチル基のうち非還元末端側のグルコース残基のC-6位だけが酸化された。環状糖を基質とした場合、酸化反応の効率は落ちるが、環状糖酸化物を生成できることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖質のC-6位を酸化できる酵素の報告は本申請に関するもの以外なく、本申請により、酵素的に様々な糖質のC-6位酸化物が生成できたという報告は学術的に非常に貴重である。配糖体やオリゴ糖には水溶性が低く利用が制限されるものがある。本技術でそれらにカルボキシ基を導入すれば水溶性の向上が期待できる。また、カルボキシ基は様々な化学反応に利用できる残基であり、カルボキシ基を導入することで、ポリマー等の原料等の工業的な利用が期待できる。上記のようにまた、糖質のC-6位の酸化による糖質へのカルボキシ基導入は実用化の観点からも期待できる技術である。

研究成果の概要（英文）：The substrate specificities at various glycosides, oligosaccharides and cyclic sugars of resting cells of *Pseudogluconobacter* Sp. and its alcohol dehydrogenases that oxidize the C-6 position of D-glucose were investigated. The oxides were identified by NMR and mass spectrometry. The resting cells and the enzyme efficiently oxidized various glycosides and oligosaccharides. In the oxidation of glycosides, the glycoside with relatively large aglycons, such as Rebaudioside A, was also oxidized. Among the multiple hydroxymethyl groups at the C-6 positions of oligosaccharides, only the C-6 position of the D-glucose residue on the non-reducing end was oxidized. When cyclic sugars were used as substrates, cyclic sugar oxides were produced, although the efficiency of the oxidation reaction declined.

研究分野：糖質工学

キーワード：グルカル酸 配糖体 アルコールデヒドロゲナーゼ 酸化反応 環状糖 アルデヒドデヒドロゲナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

D-グルコースなどのアルドヘキソースの C-6 位のヒドロキシメチル基を酸化し、カルボキシ基に変換するとウロン酸 (D-グルクロン酸) が生成する。一方、アルコールデヒドロゲナーゼは糖の C-6 位を酸化しないとされていた。我々は、*Pseudogluconobacter saccharoetogenes* 由来のアルコールデヒドロゲナーゼ (Ps-ADH) が糖の C-6 位を酸化できることを発見し、D-グルコースから D-グルクロン酸を効率よく生産する技術を開発した。しかし、*P. saccharoetogenes* 以外に糖の C-6 位を酸化する酵素の報告はなく、また、これまでの研究では、本菌の休止菌体や Ps-ADH の基質特異性の報告はごく一部の単糖に限定されていた。そのため、休止菌体や Ps-ADH の様々な糖に対する基質特異性や酸化生成物の構造等には不明な点が多い。しかし、本菌は菌体と基質を混合して攪拌するだけで、非常に簡便かつ高収率に糖の C-6 位を酸化することができる。本技術によりカルボキシ基が付された糖質は水溶性の向上等、新たな機能性の付与が期待されることから、本菌及び Ps-ADH の糖の酸化反応の詳細の解明が求められていた。

## 2. 研究の目的

我々は *P. saccharoetogenes* の C-6 位酸化活性に着目し、本菌の休止菌体や Ps-ADH の配糖体、オリゴ糖及び環状糖などに対する基質特異性の解明や、酸化で生成する配糖体酸化物、オリゴ糖酸化物及び環状糖酸化物の構造の解明を目的に研究を行った。また、様々な糖質への作用性や酸化反応の生成物から、Ps-ADH の基質認識などの酵素的な性質についても考察した。

## 3. 研究の方法

- (1) *P. saccharoetogenes* 休止菌体及び Ps-ADH の基質への作用性の解明  
*P. saccharoetogenes* Rh47-3 株から Ps-ADH を部分精製した。部分精製した Ps-ADH 及び Rh47-3 株の休止菌体の配糖体、オリゴ糖及び環状糖に対する基質特異性を明らかにした。基質特異性から、それぞれの糖質の構造と Ps-ADH の作用性の関係について考察した。
- (2) 配糖体糖酸化物の調製と構造の決定  
各種配糖体を *P. saccharoetogenes* Rh47-3 株の休止菌体と混合し、攪拌することで酸化した。酸化後、配糖体の構造を NMR や質量分析により同定した。
- (3) オリゴ糖酸化物及び環状糖酸化物の調製と構造を決定  
トレハロース、マルトース、マルトトリオース、セロビオース及びゲンチオビオースを *P. saccharoetogenes* Rh47-3 株の休止菌体と混合し、攪拌することで酸化した。酸化反応液を HPAEC-PAD で解析、オリゴ糖酸化物の生成を経時的に測定した。生成した、オリゴ糖の構造を NMR や質量分析で同定した。トレハロースの反応については、反応液から TLC を使って反応中間体を分離し、それらを塩酸加えて煮沸することで加水分解した。加水分解で生成する単糖類から反応中間体の構造を推定し、トレハロース酸化経路を明らかにした。

## 4. 研究成果

- (1) *P. saccharoetogenes* 休止菌体及び Ps-ADH の基質への作用性の解明  
Ps-ADH や Rh47 - 3 株の休止菌体の配糖体に対する基質特異性を調べた。本菌の糖の C-6 位を酸化する酵素は Ps-ADH であることから、C-1 位がアグリコンとの結合でふさがっている配糖体では、酵素と休止菌体の配糖体に対する基質特異性はほぼ同じであった。本菌は、様々な配糖体を効率的に酸化できることが分かり、その中には Rebaudioside A のように大きなアグリコンを持つ配糖体も含まれていた。グリコン部分が D-グルコースや D-マンノースの場合は、アグリコンとの結合が、結合を問わず、効率的に酸化した。この結果はアグリコン部分が酵素の基質認識にほとんど影響を与えないことを示唆しており、Rebaudioside A のような比較的大きなアグリコンもつ配糖体に対しても比較的高い活性を示す結果を支持するものであった。一方、グリコン部分が D-ガラクトース残基になると、活性がかなり低下 (1/5 ~ 1/10 程度) することが分かった。  
トレハロース、マルトース、セロビオース及びゲンチオビオースなど二糖類に対する休止菌体および Ps-ADH の酸化活性を調べた。菌体や酵素は糖の結合種類にかかわらず、D-グルコース二分子からなる上記の二糖類を効率的に酸化した。一方、配糖体のケースと同様に、ラクトースのように、非還元末端側の糖残基がガラクトース残基となった場合、その酸化が抑えられることが分かった。

## (2) 配糖体酸化物の調製と構造の決定

休止菌体を用い、配糖体であるメチル- $\beta$ -グルコシド及び $\beta$ -グルコシドを酸化した。反応液から酸化物を精製し、質量分析やNMRで構造を決定した。それぞれの酸化物は、基質のグルコシル基のC-6位のヒドロキシルメチル基が酸化され、グルクロニル基に変換された構造を持つことが分かった。休止菌体は結合をもつ配糖体をほぼ収率100%で酸化することができた。一方、本菌は微弱ではあるが $\beta$ -グルコシダーゼまたは $\beta$ -グルクロニダーゼ活性を示すため、結合をもつ配糖体または配糖体酸化物をわずかであるが、分解することが分かった。

配糖体には水溶性が低いものや、味質が悪いものがある。配糖体へのカルボキシ基の導入はそれらの欠点の改善が期待できる。本申請の酵素は大きなアグリコンを持つ配糖体も酸化できることから、様々な配糖体の性質向上への利用が期待できる。

## (3) オリゴ糖、環状糖酸化物の調製と構造の決定

アルドースはC-6位にヒドロキシメチル基を、C-1位にアルデヒド基を持つ。C-1位のアルデヒド基は酸化によりカルボキシル基に変換される。一方、C-6位のヒドロキシメチル基は、一度、アルデヒド基に酸化され、更にこのアルデヒド基が酸化されてカルボキシル基が生成する。*P. saccharoetogenes* 休止菌体で配糖体、二糖類を酸化し、その反応の経時変化を観察した。予想通り、酸化進行とともに、糖のC-6位がのヒドロキシル基が酸化されてカルボキシル基に変換される前に、ヒドロキシメチル基がアルデヒド基に変換された中間体が確認された。

トレハロース、マルトース、セロビオース及びゲンチオビオースを *P. saccharoetogenes* 休止菌体で酸化し、それらの酸化物を精製した。NMRによる構造決定の結果、トレハロースの酸化物は二分子あるグルコシル基の両方がグルクロニル残基に変換されたものであることが分かった。一方、マルトース、セロビオース及びゲンチオビオース酸化物は加水分解による構成糖の同定、質量分析及びNMRの結果から、非還元末端側のグルコース残基はC-6位のヒドロキシルメチル基が酸化されグルクロニル基に変換されていること、さらに、還元末端のグルコース残基はC-1位のアルデヒド基がカルボキシ基に変換されて、グルコン酸に変換されていることが分かった(図1A)。また、マルトトリオースの酸化を行った。マルトトリオース酸化物はその加水分解生成物から、非還元末端側のグルコース残基のC-6位と還元末端側のグルコース残基のC-1位のみが酸化されることが分かった(図1B)。ヒドロキシメチル基に比べカルボキシ基は様々な化学反応に利用しやすい残基である。そのため、生成したオリゴ糖酸化物を原料に様々な化学反応を行うことで、新たな糖質の利用用途の創出が期待できる。

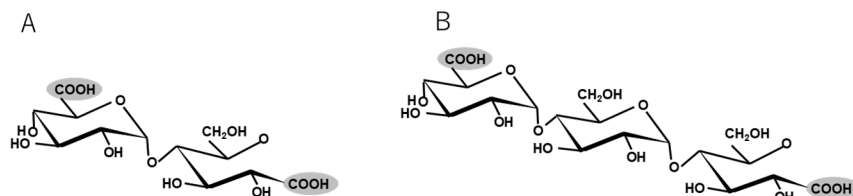
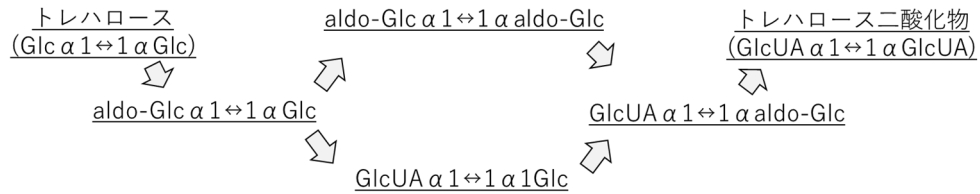


図1. マルトース酸化物 (A) 及びマルトトリオース酸化物 (B) の構造

レハロースの酸化反応について更に詳しく調べた。Ps-ADHはトレハロースをD-グルコースと同じぐらい効率的に酸化した。酸化反応で生成する中間体をTLCにより分離し、加水分解した。加水分解生成物からそれらの構造を決定し、図2の経路で反応が進むことを明らかにした。本反応の最終生成物はトレハロース二酸化物である。我々はこのトレハロース二酸化物を効率的に加水分解し二分子のD-グルクロン酸を生成する酵素の特許を取得している。現在、D-グルクロン酸は澱粉の酸化加水分解で生成されているが、多量の副生成物を生じるなど課題もある。本技術を発展させることで、よりクリーンなD-グルクロン酸生産法の実用化が期待できる。



**図2.トレハロースの酸化経路**

Glc、GlcUA及びaldo-Glcはそれぞれグルコース残基、グルクロン酸残基及びグルカルアルデヒド残基を示す。

環状糖を *P. saccharoetogenes* Rh47-3 株休止菌体で酸化し、環状糖酸化物を生成した。酸化物を精製して、加水分解による構成糖の同定、質量分析や NMR により構造を決定した。環状糖の結合に使用されていない C-6 位のヒドロキシメチル基の全てが酸化され、カルボキシル基になっていることが分かった。本環状糖の反応効率はグルコースやトレハロースより低いことから、効率的に反応を行う条件の確立が課題であることが分かった。そのため、より環状糖の酸化反応に適した株を見つけるため、他の *P. saccharoetogenes* の 5 株の環状糖の酸化活性を調べた。その結果、IF014465 株および IF014464 株が環状糖に対し、Rh47-3 株の倍近くの酸化活性を示すことが分かった。本株の休止菌体を用いた反応では、途中で反応は停止せず、環状糖をすべて環状糖酸化物に変換できることが分かった。さらに、環状糖酸化時に生成する中間体などの経時変化について明らかにした。

上にも記載した通り、カルボキシル基はヒドロキシメチル基より化学反応に利用しやすい。本技術で生成したカルボキシル基を持つ環状糖酸化物は環状糖の新しい利用用途を開くものと期待されている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato Hirofumi, Yamada Rei, Watanabe Yomi, Kiryu Takaaki, Kawano Shintaro, Shizuma Motohiro, Kawasaki Hideya	4. 巻 12
2. 論文標題 Deracemization of 1-phenylethanol in a one-pot process combining Mn-driven oxidation with enzymatic reduction utilizing a compartmentalization technique	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 10619 ~ 10624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D2RA01326F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ito Tetsuya, Masaki Hisaharu, Fujita Koki, Murakami Hiromi, Shizuma Motohiro, Kiso Taro, Kiryu Takaaki	4. 巻 86
2. 論文標題 Identification of Enzymes from <i>Pseudogluconobacter saccharoketogenes</i> Producing <i>d</i> -Glucaric Acid from <i>d</i> -Glucose	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 56 ~ 67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab182	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桐生高明、伊藤哲也、正木久晴、藤田孝輝、村上 洋、静間基博、木曾太郎
2. 発表標題 Pseudogluconobacter saccharoketogenes由来のアルコールデヒドロゲナーゼの性質
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 桐生 高明、木曾 太郎、静間 基博、村上 洋
2. 発表標題 アルドースC-6位酸化菌によるトレハロース二酸化物の合成経路の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桐生高明、木曾太郎、村上洋
2. 発表標題 Pseudogluconobacter saccharoketogenes 休止菌体によるトレハロース酸化反応
3. 学会等名 2020年度（第69回）日本応用糖質科学会 応用糖質科学シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者：73名、技術情報協会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 553
3. 書名 バイオプロセスを用いた有用性物質生産技術	

〔産業財産権〕

〔その他〕

現在、本研究の成果をベースにした特許出願（3件）の準備をしており、近日中に出願予定である。
-----------------------------------------------

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	木曾 太郎  (KISO Taro)  (90416313)	地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森之宮センター・研究室長    (84431)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	龍岡 博亮  (TATSUOKA Hiroaki)  (40983557)	地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森之宮センター・研究員     (84431)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関