

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手 B

研究期間：2009 ～ 2012

課題番号：22780068

研究課題名（和文） 非天然型デオキシ希少糖の酵素反応を用いた網羅的合成技術の開発

研究課題名（英文） Development of unnatural deoxy rare sugars using microbial enzymes

研究代表者

森本 兼司 (MORIMOTO KENJI)

香川大学・希少糖研究センター・准教授

研究者番号：90363184

研究成果の概要（和文）：L-ラムノースを出発源とし生物変換法、酵素反応法、水素添加法を組み合わせた大量生産法を確立し、6-デオキシ-D-プシコースの収率が従来の 4.0% から 6.6% に向上した。それから 6-デオキシ-D-アロースの生産について、多数ある異性化酵素のうちで最も効率の高い酵素を選択し、両者の大量生産の条件を確立した。さらに各種イソメラーゼによる 6-デオキシ-アルドヘキソースへの反応性を網羅的に調べた。また、デオキシ希少糖の生産に有力な酵素を生産する微生物を 2 種類スクリーニングし、それらの基礎的な性質を確認した。

研究成果の概要（英文）：6-Deoxy-D-psicose productivity was raised yield to 6.6% from 4.0% through the improvement in this study. The optimum L-rhamnose isomerase among a plenty of them was selected to produce from 6-deoxy-D-psicose to 6-Deoxy -D-allose. These results suggested that mass-production step of both rare deoxy sugars was established. Furthermore, the various isomerases reactivity for 6-deoxy-ketohexoses was overall investigated. For production of other deoxy sugars, two useful microbes was screened and then some enzymes relating rare sugars production was revealed basic properties.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
23 年度	600,000	180,000	780,000
24 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物

キーワード：希少糖、デオキシ希少糖、異性化反応

## 1. 研究開始当初の背景

希少糖は天然に存在量が少ない単糖、及びその誘導体と定義されている。単糖には多くの異性体が存在し、全 57 種類である。しかし普遍的に存在する単糖は D-グルコースや

D-フルクトースなど 7 種類のみであり、残りの単糖は天然にはほとんど存在しないので希少糖である。

酵素反応法を中心とする希少糖生産戦略図、イズモリングが構築され、全単糖の生産

法が確立されている。これまでにD-プシコースやD-アロースは、kgレベルでの生産が可能となっている。これにより、希少糖の応用面に関する研究が様々な分野で飛躍的に進み、両者が生理活性作用を示すことが報告され、D-プシコースやD-アロースは特定保健用食品や医薬品への応用開発が進んでいる。

さらにイズモリングに基づき、1位または6位がデオキシ化された六炭糖（デオキシ希少糖）の合成法を考案した。デオキシ希少糖と希少糖との性質・性能を比較することで、①作用機作解明への手がかりを得、②新たな生理活性作用を発見し③食品・農薬・医薬品等の原材料として応用させることを目的とし現在研究を展開している。D-グルコースの2デオキシ体(2-デオキシ-D-グルコース)は強い細胞増殖抑制活性などを持つことが知られており、前述のD-アロースやD-プシコースが生理活性作用を有することから、これら2糖のデオキシ体をはじめ全デオキシ希少糖の生産が強く望まれている。

これまでにケトヘキソース、ヘキシトールの1位または6位がデオキシ体として計48種類の生産法を確立したが、16種類のアルドヘキソースのうち天然に存在するL-ラムノース、L-フコース以外の14種については未着手であり、全6-デオキシ-アルドヘキソース、特に6-デオキシ-D-アロースの生産法の確立が期待されている。

## 2. 研究の目的

1位、または6位がデオキシ化された六炭糖（デオキシ希少糖と称する。なお以下化合物名のデオキシはdと省略する）は全部で64種類存在し、本研究では最初に6-d-D-プシコース、および6-d-D-アロースについて微生物変換法、酵素反応法、水素添加法を組み合わせた大量生産法を確立する。そして発展的に全デオキシ希少糖の大量生産化を目指すためのデータを集積する。合成の出発原料は天然に豊富なL-ラムノースを使用し、安価かつ安全な手法の達成を目指した。また全デオキシアルドソースの反応性試験と酵素の基質特異性を解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 6-d-D-プシコースおよび6-d-D-アロースの生産

デオキシイズモリングの中核をなすL-ラムノースから6-d-D-プシコースまでの反応経路を見直し収率・収量を向上させるために、水素添加法、微生物酸化、異性化の3工程を改良した。最終的に6-d-D-アロースの100g

程度の生産規模の向けた条件を検討した。

(2) 各種イソメラーゼによる6-d-アルドヘキソースの反応性

6-d-ケトヘキソースを基質とし、14種の6-d-アルドヘキソースへの酵素反応を個々に実施した。イズモリングを構成する取得済の5種類のイソメラーゼ(L-ラムノースイソメラーゼ、L-リボースイソメラーゼ、D-アラビノースイソメラーゼ、L-アラビノースイソメラーゼ、D-キシロースイソメラーゼ)を用い、これまでの知見を基にした条件で反応試験を実施した。

(3) 希少糖生産酵素のスクリーニング

当初計画にはなかったが、新たに有用な希少糖生産酵素を取得するためL-ラムノース等を培養炭素源としてスクリーニングを実施した。

## 4. 研究成果

(1) 6-d-D-プシコースおよび6-d-D-アロースの生産

デオキシイズモリングの中核をなすL-ラムノースから6-d-D-プシコースまでの五段階の反応経路を見直し収率・収量を向上させることを目標とした。

① L-ラムノースの水素添加

水素添加装置の水素充填圧、攪拌速度、および糖濃度について検討した結果、糖濃度10%、水素圧1.0MPaの条件で、5%濃度のL-ラムノースが48時間、10%濃度のL-ラムノースが72時間後にL-ラムニトールに100%転換された。水素圧の法的上限が1.0MPaであることから、これ以上の効率化はできないことがわかった。

② 微生物酸化(1回目)

*Enterobacter aerogenes* IK7株の休止菌体で酸化反応を実施した。培養条件はTSB+1%D-マンニトール培地による培養菌体の活性が最も高く、菌体濃度30、攪拌速度については300mL容三角フラスコに30mLが最適であり、基質5%で48時間後に90%、基質10%で48時間後に87%まで1-d-L-フルクトースに変換された。従って、収率を考慮すると5%が最適だと判断した。分離後の1-d-L-フルクトースの収率は85%であった。その他にもジャケット式カラムでのバイオリクター、ジャーファーメンターを使った酸化反応を試みたが、良い結果は得られなかった。今後の検討課題の1つである。

③ エピ化反応

固定化D-タガトース3-エピメラーゼにより1-d-L-フルクトースの3位のエピ化効率の向上を図った。平衡比率は基質濃度1%のときに25%が1-d-L-プシコースへと変換された。基質濃度を増加したところ、濃度10%のとき

でも反応したが、濃度 5%の条件が単位時間あたりの生産量が多い結果であった。しかしながら、このときの変換率は 7 日間の反応でも 10%であった。従って、収率を考慮すると濃度 1%で 1 日間の反応をバッチ式で実施することが最良であると判断した。分離後の 1-d-L-プシコースの収率は 20%であった。

#### ④1-d-L-プシコースの素添加反応

1-d-L-プシコース（濃度 10%）を①と同法にて 12 時間水素添加し、1-d-L-アリトールおよび 1-d-L-アルトリトールを 50%ずつ得た。

#### ⑤微生物酸化（2回目）

1-d-L-アリトールおよび 1-d-L-アルトリトールを *Enterobacter aerogenes* IK7 により酸化させ、6-d-D-プシコースおよび 6-d-L-タガトースを 50 : 50 の比で得、収率はそれぞれ 85%であった。

以上のことから L-ラムノースからの 6-d-D-プシコースの収率は 6.3%であり、目標とした 10%に及ばなかった。今後は酸化反応とエピ化反応のリサイクルによる一層の収率改善が必要である。

#### ⑥6-d-D-アロースの生産

6-デオキシ-D-プシコースを基質に *Pseudomonas stutzeri* LL172 株、*Bacillus pallidus* Y25 株及び *Enterobacter aerogenes* IK7 株由来の L-ラムノースイソメラーゼを用いて固定化酵素による反応を行い、6-デオキシ-D-アロースが生産されることを確認した。最も効率的であったのは *Pseudomonas stutzeri* LL172 株由来の酵素であった。そのときの平衡比は 67 : 33 で、大量生産の目処がたつた。

### (2) 各種イソメラーゼによる 6-d-アルドヘキソースの反応性

デオキシ希少糖の原料以外の糖 13 種のうち 10 種について各種イソメラーゼの反応性について調べ、下記にまとめた。これらの成

反応産物	基質	使用した酵素
6-d-D-グルコース	6-d-D-フルクトース	未試験
6-d-D-マンノース		L-リボースイソメラーゼ
6-d-D-アロース	6-d-D-プシコース	L-ラムノースイソメラーゼ
6-d-D-アルトリトース		D-アラビノースイソメラーゼ
6-d-D-タロース	6-d-D-タガトース	L-リボースイソメラーゼ
6-d-D-グロース	6-d-D-ソルボース	未試験
6-d-D-イドース		未試験
6-d-L-グルコース	6-d-L-フルクトース	D-アラビノースイソメラーゼ
6-d-L-アロース	6-d-L-プシコース	L-リボースイソメラーゼ
6-d-L-アルトリトース		L-アラビノースイソメラーゼ
6-d-L-タロース	6-d-D-タガトース	L-ラムノースイソメラーゼ
6-d-L-グロース	6-d-D-ソルボース	L-リボースイソメラーゼ
6-d-L-イドース		D-キシロースイソメラーゼ
以下のものは出発物質であるため未実施		
6-d-L-マンノース (L-ラムノース)	6-d-L-ガラクトース (L-フコース)	6-d-D-ガラクトース (D-フコース)

果は、各種イソメラーゼの基質特異性をさらに明らかにすることで、酵素と基質の構造の相関を明確になった。さらに今後の大量生産方確立への基礎的データが得られた。また、残り 3 種については引き続き検討する必要があるが、本課題で得られた知見から、いずれかのイソメラーゼで反応が可能であると強く示唆された。

### (3) 希少糖生産酵素のスクリーニング

新たにデオキシ希少糖を用いて希少糖生産酵素を有する微生物をスクリーニングした結果、有望な 2 株を得た。1 つは根粒菌に属し、ケトースの 3 位をエピ化する酵素、すなわち当研究室が保有する D-タガトース 3-エピメラーゼ類似酵素であった。もう 1 つは、*Bacillus* 属であり、イズモリングを構成する酵素群とは異なる異性化酵素を見出した。今後の研究の展開により新たな希少糖生産経路の構築が可能であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Morimoto K, Terami Y, Maeda Y, Yoshihara A, Takata G, Izumori K.: Cloning and characterization of the L-ribose isomerase gene from *Cellulomonas parahominis* MB426. *J. Biosci. Bioeng.* **115(4)**:377-381, 2013. (査読有)
2. Uechi K, Takata G, Fukai Y, Yoshihara A, Morimoto K.: Gene Cloning and characterization of L-ribulose 3-epimerase from *Mesorhizobium loti* and its application to rare sugar production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77(3)**:511-515, 2013 (査読有)
3. Morimoto K, Shimonishi T, Miyake S, Takata G, Izumori K.: Preparation of D-gulose from disaccharide lactitol using microbial and chemical methods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77(2)**:253-258, 2013 (査読有)
4. Lenagh-Snow G.M., Jenkinson S.F., Newberry S.J., Kato A., Nakagawa S., Adachi I., Wormald M.R., Yoshihara A., Morimoto K., Akimitsu K., Izumori K., Fleet G.W.: Eight stereoisomers of homonojirimycin from D-mannose. *Org. Lett.*, **14(8)**: 2050- 2053, 2012. (査読有)
5. Jenkinson S.F., Fleet W.J.G., Nash R.J., Koike Y., Adachi I., Yoshihara A.,

- Morimoto K., Izumori K., Kato A.: Looking-glass synergistic pharmacological chaperones: DGJ and L-DGJ from the enantiomers of tagatose. *Org. Lett.*, **13(15)**, 4064-4067, 2011. (査読有)
6. Takata G., Uechi K., Taniguchi E., Kanbara Y., Yoshihara A., Morimoto K., Izumori K.: Characterization of *Mesorhizobium loti* L-rhamnose isomerase and its application to L-talose production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75(5)**:1006-1009, 2011. (査読有)
  7. Takata G., Poonperm W., Morimoto K., Izumori K.: Cloning and overexpression of the xylitol dehydrogenase gene from *Bacillus pallidus* and its application to L-xylulose production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74(9)**:1807-1813, 2010. (査読有)
- [学会発表] (計 26 件)
1. 森本兼司、小林秀明、高田悟郎、吉原明秀。 *Bacillus* sp. K44 株の希少糖に対する反応性と代謝経路の解明。 2012 年度 日本生物工学会大会, 2012 年 10 月 25 日, 神戸。
  2. 上地敬子、深井善範、吉原明秀、森本兼司、高田悟郎。 *Mesorhizobium loti* tonon由来の D-タガトース 3-エピメラーゼの機能解析。 2012 年度 日本生物工学会大会, 2012 年 10 月 25 日, 神戸。
  3. Shompoosang S., Morimoto K., Yoshihara A., Fleet W.J. G., Izumori K. Production of 6-deoxy-aldohexoses from L-rhamnose by enzymatic reactions. 2012 年度 日本生物工学会大会, 2012 年 10 月 25 日, 神戸。
  4. 寺見優司、吉原明秀、森本兼司、高田悟郎。 微生物反応および酵素反応を用いた D-プシコースから D-タロースの生産。 2012 年度 日本生物工学会大会, 2012 年 10 月 25 日, 神戸。
  5. Shompoosang S., Morimoto K., Yoshihara A., Fleet W.J.G., Izumori K. Production of 6-Deoxy-altrose and 6-Deoxy-allose from L-Rhamnose by Enzymatic Reactions. 第 4 回香川大学・チェンマイ大学合同シンポジウム, 2012 年 9 月 19 日, 高松。
  6. Uechi K., Yoshihara A., Morimoto K., Takata G. Gene cloning and characterization of novel D-Tagatose 3-epimerase from *Mesorhizobium loti* tonon. 第 4 回香川大学・チェンマイ大学合同シンポジウム, 2012 年 9 月 19 日, 高松。
  7. Terami Y., Yoshihara A., Morimoto K., Takata G. Characterization of L-ribose isomerase from *Cellulomonas parahominis* MB426 and production of various rare sugars using this enzyme. 第 4 回香川大学・チェンマイ大学合同シンポジウム, 2012 年 9 月 19 日, 高松。
  8. 寺見優司、吉原明秀、森本兼司、高田悟郎。 *Raoultella ornithinolytica* MB426 由来の L-リボースイソメラーゼを用いた L-アロースの生産。 2011 年度 日本農芸化学会, 2012 年 3 月 24 日, 京都。
  9. Terami Y., Yoshihara A., Takata G., Morimoto K., Izumori K.: Cloning and characterization of a novel gene encoding L-ribose isomerase from *Raoultella ornithinolytica* MB426 in *Escherichia coli*. Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, 2011 年 11 月 11 日, 高松。
  10. Nonogaki Y., Hayai Y., Yoshihara A., Morimoto K., Kamitori S., Wormald M.R., Fleet W.J.G., Izumori K.: D-Xylose isomerase is active on 1-deoxy-3-keto-D-galactitol. Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, 2011 年 11 月 11 日, 高松。
  11. Kuroda T., Wakabayashi T., Yoshihara A., Morimoto K., Fleet W.J.G., Izumori K.: D-Tagatose 3-epimerase is active on ketotetroses. Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, 2011 年 11 月 11 日, 高松。
  12. Shompoosang S., Morimoto K., Yoshihara A., Wormald M.R., Jenkinson S.F., Fleet W.J.G., Izumori K.: Production of 6-deoxy-L-altrose and 6-deoxy-L-allose from L-rhamnose by enzymatic reactions. Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, 2011 年 11 月 11 日, 高松。
  13. Momoji A., Yoshihara A., Morimoto K., Wormald M.R., Fleet W.J. G., Best D., Izumori K.: Production of novel 5-deoxy-hexose from 2-deoxy-D-glucose. Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, 2011 年 11 月 11 日, 高松。
  14. Uechi K., Yoshihara A., Morimoto K., Takata G., Izumori K.: Cloning and characterization of mutant L-ribulose 3-epimerase for production of rare sugars from *Mesorhizobium loti*. Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, 2011 年 11 月 11 日, 高松。
  15. Mogami K., Yoshihara A., Morimoto K., Fleet W.J.G., Izumori K.: Production of novel 4-deoxy-pentoses from 2-deoxy-D-ribose. Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, 2011 年 11 月 11 日, 高松。

- 松.
16. Morimoto K., Watanabe T., Katoh A., Wakabayashi T., Yoshihara A., Takata G., Izumori K. D-Allose derivative production from L-rhamnose using by microbial enzymes. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo) 2011年9月8日,札幌.
  17. Uechi K., Yoshihara A., Morimoto K., Takata G., Izumori K. Cloning and characterization of mutant L-ribulose 3-epimerase for production of rare sugars from *Mesorhizobium loti*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo) 2011年9月8日,札幌.
  18. Terami Y., Ohira A., Maeda Y., Yoshihara A., Takata G., Morimoto K., Izumori K. Cloning and overexpression of L-ribose isomerase gene from *Raoultella ornithinolytica*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo) 2011年9月8日,札幌.
  19. 吉原明秀, ラオ ディベンダー, 森本兼司, フリート ジョージ WJ, 何森健. 各種異性化酵素を利用した6-デオキシ-タロースの生産. 平成22年度 日本生物工学会大会, 2010年10月29日,宮崎.
  20. 森本兼司, 吉原明秀, 横田有香, 古田睦, 高田悟郎, 何森健. *Enterobacter aerogenes* IK7由来のL-アラビノースイソメラーゼを用いたL-アルトロースの生産. 平成22年度 日本生物工学会大会, 2010年10月29日,宮崎.
  21. 高田悟郎, 上原夕佳, 上地敬子, 谷口絵里子, 吉原明秀, 森本兼司, 何森健. *Mesorhizobium loti*の生産するL-ラムノースイソメラーゼの基質特異性と触媒効率. 平成22年度 日本生物工学会大会, 2010年10月29日,宮崎.
  22. 古田睦, 高田悟郎, 吉原明秀, 横田有香, 森本兼司, 何森健. *Enterobacter aerogenes* IK7由来のL-アラビノースイソメラーゼ遺伝子の大量発現系の構築と組換え酵素を用いた希少糖の生産. 平成22年度 日本生物工学会大会, 2010年10月29日,宮崎.
  23. 古田睦, 吉原明秀, 森本兼司, 高田悟郎, 何森健. *Enterobacter aerogenes*由来キシリトールデヒドロゲナーゼの検討. 平成22年度 日本農芸化学会中四国支部大会, 2010年9月25日,高松.
  24. 加藤明広, 吉原明秀, 森本兼司, 高田悟郎, 何森健. 6-デオキシ-D-ブシコース及び6-デオキシ-D-アロースの新規生産法の確立. 平成22年度 日本農芸化学会中四国支部大会, 2010年9月25日,高松.
  25. 松本麻里子, 吉原明秀, ラオ ディベンダー, 森本兼司, 高田悟郎, 何森健. 異性化酵素を用いた6-デオキシ-L-アロース, 6-デオキシ-L-アルトロースの生産法の確立. 平成22年度 日本農芸化学会中四国支部大会, 2010年9月25日,高松.
  26. 上地敬子, 吉原明秀, 森本兼司, 高田悟郎, 何森健. *Mesorhizobium loti* ケトース3エピメラーゼ誘導発現条件の検討. 平成22年度 日本農芸化学会中四国支部大会, 2010年9月25日,高松.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/morimoto/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森本 兼司 (MORIMOTO KENJI)

香川大学・希少糖研究センター・准教授

研究者番号：90363184