

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580135

研究課題名(和文) 創薬原料として有効なマテ茶成分の固定化麹触媒による効率的単離法の開発

研究課題名(英文) Development of immobilized koji-mold catalyst for effective isolation of pharmaceutically significant yerba mate compounds

研究代表者

足立 収生 (ADACHI, OSAO)

山口大学・その他部局等・名誉教授

研究者番号：20027189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：タミフル製造に重要な原料であるシキミ酸の製造法において、有機合成法は不可能である。最も多用されているグルコースを初発とする発酵法には克服し難い幾多の隘路があった。2002年以来、研究代表者はこれらにブレークスルーを求めて、クロロゲン酸を高濃度に含む南米特産のマテ茶(*Ilex paraguariensis*)から、麹菌を固定化触媒としてキナ酸やカフェ酸を効率よく安価に大量に調製する方法の開発を行った。得られたキナ酸は、既に研究代表者が確立している新規な酢酸菌触媒によって、高速・高効率にシキミ酸へ変換できる系へ連結させることができた。

研究成果の概要(英文)：A novel strategy preparing raw materials for pharmaceuticals such as shikimic acid for Tamiflu was established applying koji-mold catalyst to yerba mate tea. Chlorogenic acid (CGA) hydrolase (CGase) was potently induced in mycelia such as *Aspergillus niger* when grown on yerba mate extract. Heat treatment of mycelia at 40°C for 30 min destroyed polyphenol oxidase but CGase was highly resistant and survived during the heat treatment. Thus, the heated mycelia were found useful as a kind of immobilized catalyst of CGase. Some model reaction using immobilized heated mycelia as CGase was studied. This is the most outstanding point in this study and this method can be accepted for industrial production of QA and caffeic acid (CA). QA can be converted to shikimate by two enzyme systems of acetic acid bacteria, as has already been established in the previous study. Simultaneous isolation of QA, CGA, and CA was established by a simple ion exchange column chromatography.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：マテ茶成分 麹菌触媒 酢酸菌 酸化発酵 シキミ酸 タミフル

1. 研究開始当初の背景

抗インフルエンザウイルス剤として知られているタミフル合成には、シキミ酸が必須な原料である。しかしながら、タミフルの世界的備蓄を実現して、人々をインフルエンザから守るには、原料となるシキミ酸の供給法が最大の隘路となっていた。研究代表者は、この問題のブレークスルーを求めて、2002年から発酵法によらずにキナ酸からシキミ酸を製造する全く新規な技術開発を目指してきた。それはグルコースを初発炭素源とする発酵法とは基本的に異なる新規な技術である。図1に示すように、キナ酸の給源としてクロロゲン酸を多量に含む食品工業産廃のコーヒー粕に着目して、キナ酸の円滑な供給も視野に入れた研究によって、この難局を克服することができると考えた。

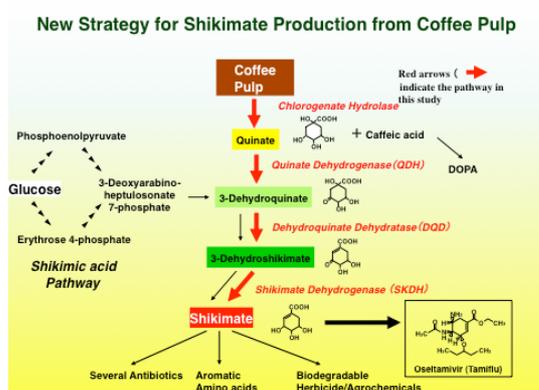


図1. 発酵法に依らない新規技術によるマテ茶からシキミ酸の製造

本法の斬新さは多くの国内外の企業や研究者から関心をもって迎えられ、研究代表者が調製した試料は要望に応じて無償で供給した。実験室的には良好な結果が得られていたが、①コーヒー粕には依然として高濃度の油脂分を含むためにイオン交換樹脂の交換能力の低下を防ぐことができない。②企業から排出されるコーヒー粕は、品種、加工法や産地により千差万別であり、ロットごとに異なる結果を伴うなど、現実に克服しなければならない負の要因が顕在化してきた。

コーヒー粕のように高濃度に油脂を含まず、かつクロロゲン酸(CGA)を含有する材料として、南米大陸中央南部を中心にアルゼンチン(亜国)などで広く栽培されているマテ茶(*Ilex paraguariensis*)に注目した。これは、2010年度に研究代表者が学振の特定国派遣

研究者(短期)としての亜国での研究活動から得た情報である。亜国の国立マテ茶研究所 LA Brumovsky 教授、ミシオネス大学 ME Schmalko 教授と、ラプラタ大学 RA Hours 教授ら、マテ茶の専門家らの協力を得て、マテ茶を材料にすることにした。我が国の茶葉同様に、マテ茶は研究の推進に妨げとなる油脂分も少ない。我が国の茶葉はカテキン類を高濃度に含むのに対して、マテ茶はクロロゲン酸を高濃度に含み、創薬原料となる種々な成分が含まれていることも分かった。亜国政府の協力によって、研究遂行に必要な量のマテ茶が山口大学へ届けられ、2010年末には研究が開始できるよう環境整備がなされた。

2. 研究の目的

創薬原料として有効なマテ茶成分を効率よく抽出する方法を確立することと、抽出・

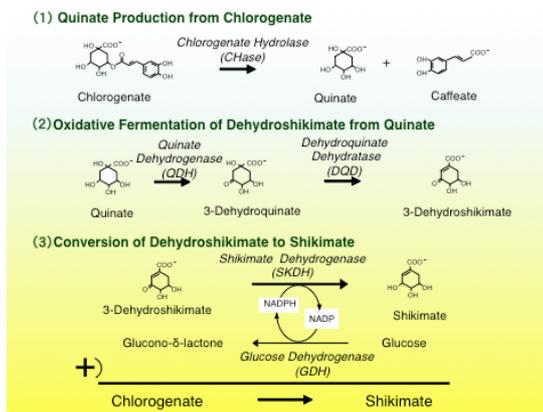


図2. 本研究を構成する3つの反応

単離した有効成分のうち最も重要なキナ酸をシキミ酸へ変換することが目的である。そのために、マテ茶に麹菌を生育させてマテ茶麹を作って有効成分を抽出するほか、クロロゲン酸加水分解酵素(CGase)を含む麹菌とマテ茶抽出液とを接触させることによって、クロロゲン酸を加水分解する方法の2つの方法を試験する。研究の目的として、マテ茶に含まれるクロロゲン酸から効率よくキナ酸を製造して、それを酢酸菌の酸化発酵系で3-デヒドロシキミ酸(DSA)へ変換する。次に、DSAを同じ酢酸菌の細胞質のシキミ酸脱水素酵素(SKDH)によってシキミ酸へ変換することを目的として、3年間の研究を開始した。

3. 研究の方法

上記の研究目的は図2に示すように、3つの反応に分けられる。(1)クロロゲン酸からキナ酸とカフェ酸を製造する。(2)キナ酸をDSAへ酢酸菌の酸化発酵によって変換する。(3)DSAからシキミ酸を不斉還元酵素法によって製造する。過去10年を超える

当該研究から、如何に効率よくキナ酸を調製するかが最も重要であることが分かってきた。すでにほぼ確立されている方法(2)と(3)へ連結するために、方法(1)に高い再現性を求める研究展開をおこなった。研究成果の項目で詳述しているが、それらは以下の項目からなっている。① 優良な麹菌の選択、② 強力なCGaseの誘導生成と固定化麹菌体の調製、③ CGaseが生成するキナ酸の生成速度を測定する新しい酵素定量法の確立、④ 固定化麹触媒によるマテ茶抽出液からキナ酸の連続的調製法、⑤ 反応生成物の単離法の開発。

4. 研究成果

① 優良な麹菌の選択

マテ茶葉に生育できる多数の糸状菌を探索して、*Aspergillus sojae* AKU 3012ならびに*Asp. niger* AKU3302を選択した。これらの菌株を、マテ茶エキスを0.25%含有するZapeck培地で36-48時間培養すると、強力にCGaseが誘導生成された。菌株の選択状況を図3に示した(詳細は主な発表論文等の3と2に掲載)。

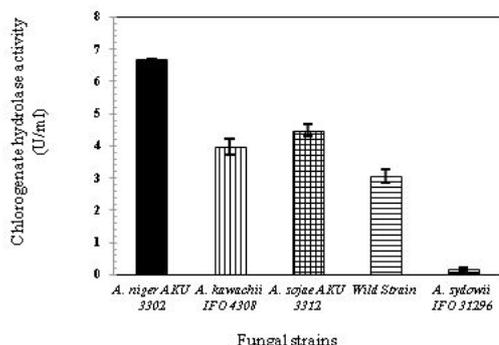


図3. CGaseを有する麹菌の選択

② CGaseの誘導生成と固定化麹菌体の調製

種々な濃度のマテ茶エキスをZapeck培地に加えて*A. niger* AKU 3302を36-48時間培養して得られた菌糸体からCGaseを調製した。結果の一部を図4に示した。培地中にマテ茶抽出液の粉末を0.125%~0.25%に加えて培養することで、著量のCGaseが麹カビ菌体に生成された。

本研究の転換点となった成果を図5に示す。麹を摂氏60度で30分熱処理しても、CGase活性は損なわれないがカビの繁殖力や胞子の発芽力は停止する。得られた麹菌の菌糸の表面にCGaseは活性化状態で残存している。マテ茶のみならず、多くの植物成分にはクロロゲン酸をはじめ無数のポリフェノール化合物が含まれている。それらは容

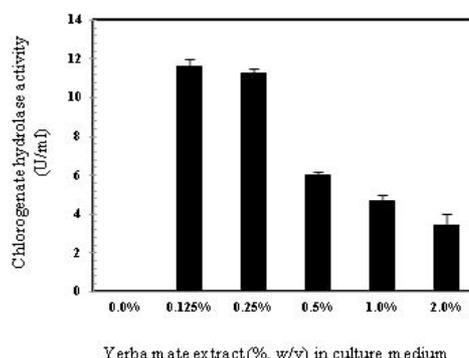


図4. 麹菌*A. niger* AKU 3302によるCGaseの生成

易に酸化されて褐変黒化して製品の着色の原因となる。図5では40度摂氏で30分の熱処理後のポリフェノール酸化酵素の様子を示している。熱処理しない場合(A)では反応液の褐変が起きるが、熱処理する(B)とは反応液の褐変が起きないことを示している(詳細は主な発表論文等の4と2に掲載)。

この発見によって、CGaseによる生成物が酸化されて収量・収率を減少させることがなくなった。このような簡単な熱処理が有効なことは、低廉な経費によって大量の原料処理を可能にしている。これはマテ茶のような付加価値の乏しい農産物や農産廃棄物から付加価値の高い有用物質の生産に適した工業的単位操作と評価できる。

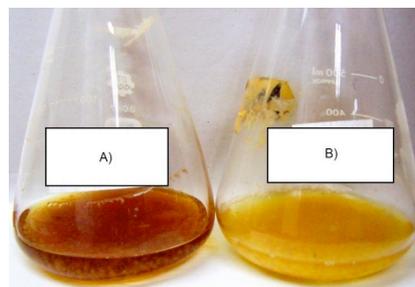


図5. 熱処理によるポリフェノール酸化酵素の不活性化

マテ茶抽出液に熱処理した菌糸体を投入して攪拌するだけで、クロロゲン酸の加水分解は容易に進行して、反応液中にキナ酸とカフェ酸が生成される。反応生成物を反応液から分離するのも、ナイロンネットで菌糸体をすくいあげるといった簡便な操作で達成され、高価な遠心分離機を稼働させる必要もなかった。

③ CGaseが生成するキナ酸の生成速度を測定する新しい酵素定量法の確立

CGase 反応と酢酸菌細胞膜のキナ酸脱水素酵素 (QDH) の至適 pH がともに中性付近にあるのを利用して、CGase と QDH を同じ反応液中で共役反応させることによって、キナ酸の生成速度及び生成量を測定する試験を行った。中性の緩衝液中で、精製した CGase と QDH を加え、標準 CGA またはマテ茶抽出液を基質として反応液量を 0.9 ml に調節した。反応開始は 10 μmol の ferricyanide の添加によって行い、0.5 ml の ferric-Dupanol 試薬の添加によって反応を停止させた。さらに水を 3.5 ml 加えたのち 20 分後に反応液を 660 nm における吸光度測定をおこなった。この方法は研究代表者らが 1970 年代に酢酸菌の糖質酸化反応の測定法として確立した方法である。上記の反応条件で 660 nm における吸光度が 4.0 のときに、1.0 μmol の基質の酸化に相当する。当該反応は酵素濃度、反応時間、基質濃度によく対応した (詳細は 2014 年 5 月 8-10 日にウルグアイで開催の第 6 回世界マテ茶会議で口頭及びポスター発表した)。

④ 固定化麹触媒によるマテ茶抽出液からキナ酸の連続的調製法

図 6 の (A) には、熱処理した麹菌体を充填したカラムに標準 CGA 液を、30 回、250 回、及び 500 回還流させて得られる反応液の吸収スペクトルを示した。30 回程度の還流で、当初加えた CGA はほとんどキナ酸とカフェ酸に分解されていることを示している。

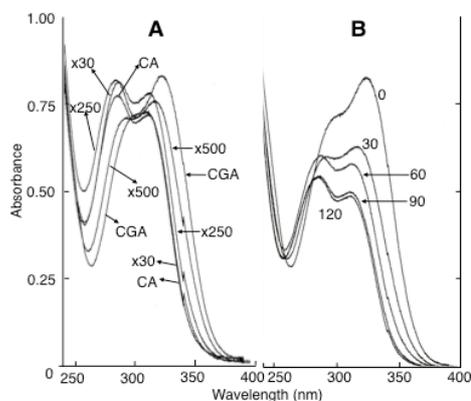


図 6. 固定化麹触媒によるキナ酸の連続的調製法 (その 1. 標準化合物による実験)

(B) には標準 CGA 溶液を 20 ml/hr の速度で 2 時間還流させた反応液の時間経過を示した。当初加えた CGA (スペクトル 0) は 90 分の反応時間を待たずにキナ酸とカフェ酸に分解されていることを示している (詳細は現在投稿準備中)。

図 7 には部分精製した CGase を CM-Toyopearl 1 カラムに吸着させたものを固定化 CGase 触媒としてマテ茶抽出液を 20 ml/hr の速度で還流させた場合の結果を示している。1 時間ごとに反応液の吸収スペクトルを調べた結果、4 時間の還流で初発のマテ

茶抽出液はほとんどキナ酸とカフェ酸に分解されていることを示している (詳細は現在投稿準備中)。

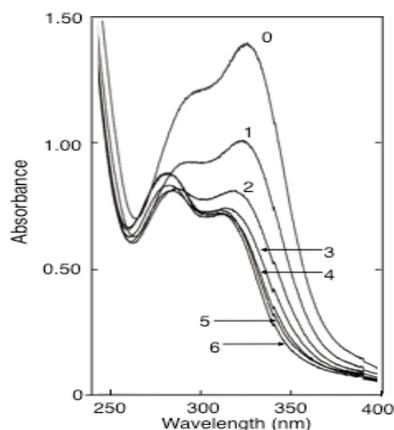


図 7. 固定化麹触媒によるキナ酸の連続的調製法 (その 2. マテ茶抽出液による実験)

⑤ 反応生成物の単離法の開発

イオン交換樹脂を使用して、反応液中に精製されるキナ酸、カフェ酸および未反応な CGA を相互に分離することは重要な作業である。マテ茶抽出液と固定化麹触媒との反応液に活性炭を加えて脱色した上清を DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトに供した。その結果、キナ酸はカラムに吸着されることなく回収された。CGA は 150 mM NaCl でカラムから溶出され、カフェ酸は 250 mM NaCl で溶出された。薄層クロマトやその他の方法で成分の純度を検定したが、それぞれに単一成分を含んでいることが判明した。

分離されたキナ酸は減圧濃縮して酢酸菌の酸化発酵系によってシキミ酸へ変換できる純度であった。CGA とカフェ酸は減圧濃縮したのち、Sephadex G-10 カラムによって脱塩した。これら 2 つの化合物は疎水的であるために、脱塩操作によって容易に NaCl を含まない標品を得ることができた (詳細は 2014 年 5 月 8-10 日にウルグアイで開催の第 6 回世界マテ茶会議で口頭及びポスター発表した)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Adachi O, Hours RA, Schmalko ME, Brumovsky LA, Akakabe Y, Matsushita K, Immobilization of chlorogenate hydrolase and continuous enzymatic production of quinate and caffeoyl quinate from yerba mate extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (査読有) 投稿準備中 (2014).
2. Butiuk AP, Adachi O, Mignone C, & Hours RA, Yerba mate as a novel inducer for fungal chlorogenate hydrolase production, *Process Biochemistry*, **49**, in press (2014) (査読有).

3. Butiuk AP, Adachi O, Mignone C, & Hours RA, Optimization of chlorogenate hydrolase production by *Aspergillus niger* using yerba mate as inducer, *XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, **14**, ISBN 978-987-22165-5-9 (2013) (査読有).
4. Butiuk AP, Adachi O, Mignone C, & Hours RA, Preparation of biologically active mycelial chlorogenase hydrolase using yerba mate, *XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, **14**, ISBN 978-987-22165-5-9 (2013) (査読有).
5. Casteneda MT, Adachi O, Mignone C, & Hours RA, Reduction of L-phenylalanine in protein hydrolysates using phenylalanine ammonia lyase. *XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, **14**, ISBN 978-987-22165-5-9 (2013) (査読有).
6. Adachi O, Hours RA, Akakabe Y, Shinagawa E, Ano Y, Yakushi T, & Matsushita K. Pentose oxidation by acetic acid bacteria led to a finding of membrane-bound purine nucleosidase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1131-1133 (2013) (査読有).
7. Adachi O, Hours RA, Shinagawa E, Akakabe Y, Yakushi T, & Matsushita K. 4-Keto-D-aldopentoses and 4-keto-pentulosonates, new products with acetic acid bacteria. *Acetic Acid Bacteria*, **1**, 23 (2012) (査読無).
8. Adachi O, Hours RA, Shinagawa E, Akakabe Y, Yakushi T, & Matsushita K. Enzymatic synthesis of 4-pentulosonate (4-keto-D-pentionate) from D-aldopentose and D-pentionate with two different pathways using membrane enzymes of acetic acid bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 2418-2420 (2011) (査読有).
9. Adachi O, Hours RA, Shinagawa E, Akakabe Y, Yakushi T, & Matsushita K. Formation of 4-keto-D-aldopentoses and 4-pentulosonates (4-keto-D-pentonates) with unidentified membrane-bound enzymes from acetic acid bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1801-1806 (2011) (査読有).

[学会発表] (計 4 件)

1. Butiuk AP, Maidana AS, Adachi O, & Hours RA, Chlorogenic acid from yerba mate, VI The World Congress of Yerba Mate, 平成26年 5月8-10日, Hotel Raddisson, Montevideo (Uruguay)

2. Butiuk AP, Maidana AS, Adachi O, & Hours RA, Optimización de la actividad clorogenato hidrolase de *Aspergillus niger* para la bioconversión del ácido clorogénico de la yerba mate, VI The World Congress of Yerba Mate, 平成26年 5月8-10日, Hotel Raddisson, Montevideo (Uruguay)
3. Butiuk AP, Maidana AS, Adachi O, & Hours RA, Caracterización de una clorogenato hidrolase de *Aspergillus niger* AKU 3302 inducida con extractos de yerba mate, VI The World Congress of Yerba Mate, 平成26年 5月8-10日, Hotel Raddisson, Montevideo (Uruguay)
4. Adachi O, Procesos biotecnológicos con bacterias acéticas, Latin American Biotechnology Symposium, 平成 24 年 5 月 11-12 日. La Plata City Hall, La Plata (Argentina), (招聘講演)。

[図書] (計 1 件)

1. 足立収生 「新規な酸化発酵系の開発」、酢酸菌研究会編 *酢の機能と科学、食と健康の科学シリーズ*、朝倉書店、175-180 頁 (2012)。

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 4-ケトリボ酸、4-ケトリボース、及びそれらの製造方法

発明者: 足立 収生、ロケ アルベルト ア
ワーズ、薬師寿治、松下一信

権利者: 国立大学法人山口大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-047632

出願年月日: 平成 23 年 3 月 4 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 収生 (ADACHI OSAO)

山口大学・名誉教授

研究者番号: 20027189

(2) 研究分担者

赤壁 善彦 (AKAKABE YOSHIHIKO)

山口大学・農学部・教授

研究者番号: 20274186