

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450166

研究課題名(和文) N-アセチルアミノ糖に着目したヘテロオリゴ糖の機能特性研究

研究課題名(英文) Functional study on heterooligosaccharides focusing on N-acetylamino sugars

研究代表者

西尾 俊幸 (NISHIO, Toshiyuki)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：10256836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：各種糖質加水分解酵素の糖転移作用を利用してN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を構成糖として含む特殊構造オリゴ糖を合成し、それらのプレバイオティクス機能について評価を行った。その結果、以前に量産法を確立したN-アセチルスクロサミンを原料として用い、新規な6種類のGlcNAc含有オリゴ糖を合成することができた。これらのオリゴ糖は、ヒト腸内細菌由来の善玉菌であるビフィズス菌の中で特定の種を選択的に増殖させることが分かった。従来のオリゴ糖プレバイオティクスはこのような選択的ビフィズス菌増殖能が無いことから、今回合成したものは新しいタイプのプレバイオティクスとして開発できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： We synthesized novel N-acetylglucosamine-containing oligosaccharides using several transglycosylation-catalyzing glycosidases, and evaluated their prebiotics effect. As the results, we succeeded in the synthesis 6 kinds of the oligosaccharides using N-acetylsucrosamine as a low material. Moreover, we found that these oligosaccharides proliferated specific species of Bifidobacteria. These facts indicate the possibility that N-acetylglucosamine-containing oligosaccharides we synthesized in this study become new type of prebiotics.

研究分野：応用生物化学

キーワード：応用生物化学 応用酵素学 糖質化学 機能性オリゴ糖 微生物利用学 タンパク質工学

## 1. 研究開始当初の背景

オリゴ糖については、昔から主に嗜好性に関わる食品素材として利用されてきた。しかし、現代人の健康志向の高まりにより、食用オリゴ糖の利用はヒトの健康に良い効果を及ぼす生理機能特性を対象とする方向に発展してきた。その過程において、自然界に豊富に存在するオリゴ糖とは構成単糖間の結合位置が異なるなど、特殊な構造を有した幾つかのオリゴ糖に様々な有用生理機能特性が見出されたことから、それらは機能性オリゴ糖と呼ばれ健康補助食品として使用されるようになった<sup>1-3</sup>。これらのオリゴ糖の多くは、グルコース、フルクトース、およびガラクトースの3種類の単糖のいずれかあるいは複数のものから構成されている。それは、デンプン、スクロース、ラクトース(乳糖)といった、生物により豊富に生産され安価に入手できる身近な糖質の利用を基盤として開発が進められたためである。機能性オリゴ糖はヒトの口に入る物質であるため、ほとんどは酵素反応を利用して生産が行われている。そのため、デンプン、スクロース、ラクトースの分解や変換に関わる微生物酵素の探索が盛んに行われ、それらの作用特性が解明されると共に微生物発酵技術の向上により量産化が可能となり、各種オリゴ糖の生産に利用できるようになった。

カニやエビなどの甲殻類の殻の主成分であるキチンは単糖 *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)により構成される多糖であり、デンプンなどと同様に生物によって豊富に生産されている。GlcNAc は、我々の体の各所において大変重要な働きをしている。しかし、GlcNAc は自然界に豊富に存在し、体にとっても大切な糖であるにもかかわらず、グルコース、フルクトース、ガラクトースとは異なり、機能性オリゴ糖作成のための素材として今まで利用されてこなかった。しかし、最

近になって、キチンの分解により得られるキチンオリゴ糖(GlcNAc の -1,4 オリゴマー)の特定の重合度のものに小麦アレルギーを低減する効果、癌の進行を抑制する効果、および病原微生物の感染を防御する効果が確認された(キチンオリゴ糖の有用性については、優れた総説が出されている)。また、ヒトの母乳中に含まれるミルクオリゴ糖の酵素分解により遊離するガラクトースと GlcNAc から構成されるヘテロ2糖が、特定のビフィズス菌を増殖させる効果や病原菌の細胞接着を阻害する効果を示すことが明らかにされた。これらのことから、構成糖として GlcNAc を含むオリゴ糖には、様々な有用生理機能が期待されるようになった。

GlcNAc を含む機能性オリゴ糖の開発が今まで積極的に行われてこなかったのは、原料となる本単糖が安価に入手できなかったことも原因の一つであると考えられる。しかし最近、GlcNAc が健康維持や美容のために有効な効果を示す可能性が動物試験を通して指摘されるようになってから、酸加水分解によりカニ殻キチンから大量に生産されるようになり、比較的安価に入手できるようになってきた。また、微生物発酵法による GlcNAc 生産も検討されており、本単糖がさらに安価に入手できるようになる可能性がある。

## 2. 研究の目的

上記の背景のもとで、GlcNAc を構成糖として含むオリゴ糖に注目し、各種のグリコシダーゼの糖転移作用を利用して特殊構造を有する新規な GlcNAc 含有オリゴ糖を酵素反応により合成し、それらを次世代機能性オリゴ糖として開発するため、それらの有用生理機能(特にプレバイオティクス効果)を評価することを計画した。具体的には、以下の3つの研究を行うことを計画した。

(1)以前に量産法を開発した *N*-アセチルス

クロサミン (SucNAc)<sup>4,5)</sup>に対する腸内細菌の資化・増殖能を調べ、プレバイオティクスとしての有効性を調査する。

(2)量産可能となった SucNAc を原料として用い、グリコシダーゼの糖転移作用を利用して本2糖へ他の糖を結合させ、新規 GlcNAc 含有ヘテロオリゴ糖を生産する。

(3)(2)で合成した新規 GlcNAc 含有ヘテロオリゴ糖について、プレバイオティクスとしての有効性を調査する。

### 3. 研究の方法

上記の(1)~(3)に関する研究は、以下のような方法で行った。

(1)ヒト大腸内の代表的な12種類のビフィズス菌と4種類の乳酸菌を微生物保存機関より購入し、それらの菌を、SucNAcを唯一の糖質源として添加したMRS培地にて培養することで、それらの本オリゴ糖に対する資化・増殖能を調べた。また、比較のため、構造類似糖であるスクロースについても同様な実験を行った。さらに、それぞれのオリゴ糖を含む培地に少量のグルコースを添加したのも用意し、それらを用いて培養実験を行った。

(2)高濃度のSucNAcが溶解した緩衝液中に、糖転移型 $\alpha$ -フルクトフラノシダーゼを含む黄麹菌の乾燥菌糸を添加することで、より重合度の高い新規GlcNAc含有オリゴ糖を糖転移反応により合成することを試みた。また、高濃度のSucNAcとメリビオースが溶解した緩衝液および高濃度のSucNAcとラクトースが溶解した緩衝液それぞれに、真菌由来の糖転移型 $\alpha$ -ガラクトシダーゼおよび $\beta$ -ガラクトシダーゼを添加し糖転移反応を行うことで、SucNAcにガラクトースが $\alpha$ および $\beta$ アノマーで結合した新規GlcNAc含有オリゴ糖を合成することを試みた。

(3)(1)の実験で使用したビフィズス菌と乳酸菌の中から、まずはSucNAcに対して資

化性が認められた菌株について、上記の(2)で合成したオリゴ糖に対する資化・増殖能を調べた。実験は(1)の方法に準じて行った。

### 4. 研究成果

(1)表1に示したように、スクロースは大腸由来の12種類のビフィズス菌と4種類の乳酸菌をほとんど全て増殖させるのに対して、SucNAcは特定の種のビフィズス菌を特異的に増殖させることが分かった。なお、SucNAcによって増殖したビフィズス菌は、いずれも幼児の腸内に多く見られるものであった。従来のプレバイオティクスオリゴ糖については、このようなビフィズス菌選択的増殖効果は全く確認されていない。このことから、SucNAcは新しい特性を持ったプレバイオティクスオリゴ糖として開発できる可能性が示唆された。

表1. ヒト腸内由来ビフィズス菌と乳酸菌のスクロースとSucNAcに対する資化・増殖能

Intestinal bacteria	Saccharide contained in culture medium			
	Sucrose (30 mM)	Sucrose + Glucose (30 mM) (5 mM)	SucNAc (30 mM)	SucNAc + Glucose (30 mM) (5 mM)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> JMC1275	+++	+++	-	-
<i>Bifidobacterium bifidum</i> JCM1255	+++	+++	-	-
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM1192	+++	+++	-	+
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM173	+++	+++	+++	+++
<i>Bifidobacterium dentium</i> JCM1195	+++	+++	-	-
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> JCM1222	+++	+++	+	+++
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> JCM1210	+++	+++	-	±
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> JCM1217	+++	+++	-	-
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> JCM7057	+++	+++	-	-
<i>Bifidobacterium psatenalatum</i> JCM1194	+++	+++	-	+++
<i>Bifidobacterium pseudocatenalatum</i> JCM1200	+++	+++	+++	+++
<i>Bifidobacterium gallium</i> JCM8227	+++	+++	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM1132	+	++	-	-
<i>Lactobacillus casei</i> JCM1134	++	+	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i> JCM1131	++	+++	-	±
<i>Lactobacillus salivarius</i> JCM1231	+++	+++	-	-

OD<sub>600</sub> value of culture broth: -, <0.199; +, 0.2-0.499; ++, 0.5-0.999; +++, 1.0-1.99; +++++, 2.0<

また、少量のグルコースを共存させた培養液中では、SucNAc資化菌がより多く出現した。この現象について詳細に調べたところ、糖の2段階資化いわゆるジオーキシの現象が生じていることが分かった(連携研究者および研究協力者と論文を執筆中)。また現在、SucNAc資化菌について、SucNAc加水分解酵素の探索を行っているところである。

(2) SucNAcを共通原料として用い、糖転移活性を有する真菌由来の $\alpha$ -フルクトフラノシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、および $\beta$ -ガラクトシダーゼを作用させて、より重合度が高いGlcNAc含有オリゴ糖の合成を試みたところ、図1に示す3糖(N-アセチル-1-ケ

ストサミン, *N*-アセチルラフィノサミン, *N*-アセチルプランテオサミン, *N*-アセチルプランテオサミン, 3糖A) および4糖(*N*-アセチルニストサミン)を, モル収率 20~30%で合成することに成功した。これらは, いずれも新規なオリゴ糖である。

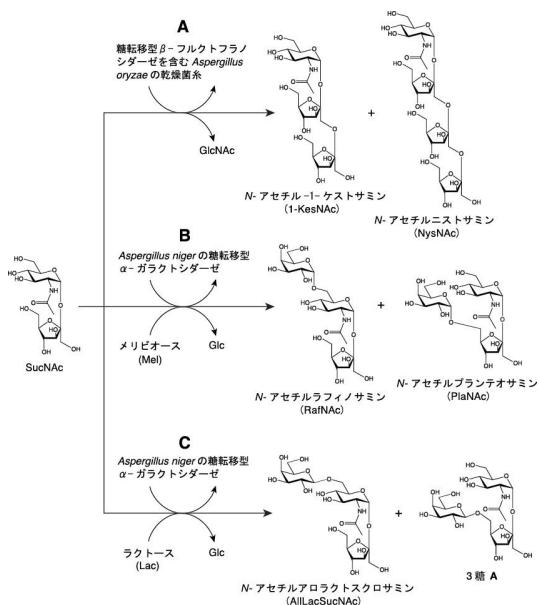


図 1. *N*-アセチルスクロサミンを原料基質として用いた新規 *N*-アセチルグルコサミン含有ヘテロオリゴ糖の酵素利用合成

(3) (2)の実験で合成に成功した各種のオリゴ糖について, 数種類の腸内由来のビフィズス菌と乳酸菌による資化の様子を調べたところ, *N*-アセチル-1-kestosamineと*N*-アセチルラフィノサミン<sup>6)</sup>は, 全ての菌株によって資化され, これらの菌を増殖させることが分かった。一方, *N*-アセチルラフィノサミン, *N*-アセチルプランテオサミン, *N*-アセチルプランテオサミン, および 3糖Aは, -および -ガラクトシダーゼの生産能を有する菌株を特異的に増殖させることが分かった。したがって, 後者の4種類のオリゴ糖は, SucNAcと同様に, 新しい特性を持ったプレバイオティクスオリゴ糖として開発できる可能性が示唆された。

#### <引用文献>

(1) T. Nakakuki, Development of functional oligosaccharides in Japan, *Trends Glycosci.*

*Glycotecnol.*, 15, 2003, 57-64

(2) T. Nakakuki, Present Status and future prospect of functional oligosaccharide development in Japan, *J. Appl. Glycosci.*, 52, 2005, 267-271

(3) S. Patel and A. Goyal, Functional oligosaccharides: production properties and applications, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 2011, 1119-1128

(4) T. Hirano, T. Wada, S. Iwai, H. sato, M. noda, M. juami, M. Nakamura, Y. kumaki, W. Hakamata, T. Nishio, Synthesis of  $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2,1)-2-acetamide-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside (*N*-acetylsucrosamine) using  $\beta$ -fructofuranosidase-containing *Aspergillus oryzae* mycelia as a whole-cell catalyst, *Carbohydr. Res.*, 353, 2012, 27-32

(5) H. Sato, S. Yokochi, T. Kasama, T. Hirano, W. Hakamata, T. Nishio, Continuous production of  $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2,1)-acetamide-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside (*N*-acetylsucrosamine) using a column reactor packed with  $\beta$ -fructofuranosidase-containing mycelia of *Aspergillus oryzae* immobilized on a porous carrier, *J. Appl. Glycosci.*, 59, 2012, 153-160

(6) Y. Sakaki, M. Tashiro, M. Katou, C. Sakuma, T. Hirano, W. Hakamata, T. Nishio, Enzymatic synthesis of novel oligosaccharides from *N*-acetylsucrosamine and melibiose using *Aspergillus niger*  $\alpha$ -galactosidase, and properties of the products, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80, 2016, 1836-1842

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

西尾 俊幸, 糖質関連酵素の機能を活用した特殊オリゴ糖の作出とその利用, 応用糖質化学, 査読有, 6巻, 2016, 2-14

M. Tashiro, T. Fujimoto, K. Furihata, Y. Sakaki, T. Hirano, W. Hakamata, T. Nishio,

Enzymatic synthesis and the structure elucidation of novel trisaccharides composed of D-galactose, N-acetyl-D-glucosamine, and D-fructose, *J. Carbohydr. Chem.*, 査読有, 35, 2016, 378-386  
<http://dx.doi.org/10.1080/07328303.2016.1270296>

Y. Sakaki, M. Tashiro, M. Katou, C. Sakuma, T. Hirano, W. Hakamata, T. Nishio, Enzymatic synthesis of novel oligosaccharides from N-acetylsucrosamine and melibiose using *Aspergillus niger*  $\alpha$ -galactosidase, and properties of the products, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, 80, 2016, 1836-1842  
<http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2016.1189316>

西尾 俊幸, 糖質加水分解酵素の潜在的機能を活用した特殊オリゴ糖の合成, 化学と生物, 査読有, 53 巻, 2015, 89-98

〔学会発表〕(計 7 件)

坂木 洋平, 西垣 あずさ, 松井 彩香, 荒川 浩輔, 平野 貴子, 袴田 航, 田代 充, 西尾 俊幸, グリコシダーゼの糖転移反応を利用した新規オリゴ糖の合成およびプレバイオティクスとしての評価, 日本農芸化学会平成 29 年度大会, 2017 年 3 月 18 日, 京都女子大 (京都府・京都市)

上原 旭輝, 森山 芽衣, 平野 貴子, 袴田 航, 田代 充, 西尾 俊幸, キチンオリゴ糖を原料とした新規 GlcNAc 含有ヘテロオリゴ糖の酵素合成, 日本農芸化学会平成 29 年度大会, 2017 年 3 月 18 日, 京都女子大 (京都府・京都市)

坂木 洋平, 加藤 萌, 平野 貴子, 袴田 航, 田代 充, 西尾 俊幸, N-アセチルスクロサミンを原料として用いた新規 GlcNAc 含有オリゴ糖の酵素合成, 日本農芸化学会平成 28 年度大会, 2016 年 3 月 30 日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

坂木 洋平, 加藤 萌, 平野 貴子, 袴

田 航, 田代 充, 西尾 俊幸, N-アセチルスクロサミンを原料として用いた新規 GlcNAc 含有オリゴ糖の酵素合成, 日本応用糖質科学会平成 27 年度大会, 2015 年 9 月 16 日, 奈良県新公会堂 (奈良県・奈良市)

坂木 洋平, 加藤 萌, 平野 貴子, 袴田 航, 西尾 俊幸, N-アセチルスクロサミンを原料として用いた新規 GlcNAc 含有オリゴ糖の酵素合成, 第 29 回キチン・キトサンシンポジウム, 2015 年 8 月 20 日, 東海大学熊本校舎 (熊本県・熊本市) 町)

篠崎 佑子, 萩原 未来, 平野 貴子, 袴田 航, 西尾 俊幸, N-アセチルスクロサミンの腸内細菌による資化性, 日本農芸化学会平成 27 年度大会, 2015 年 3 月 29 日, 岡山大学 (岡山県・岡山市)

篠崎 佑子, 豊田 葉月, 平野 貴子, 袴田 航, 西尾 俊幸, 腸内細菌の N-アセチルスクロサミン資化性について, 日本応用糖質科学会平成 26 年度大会, 2014 年 9 月 24 日, 新潟コンベンションセンター (新潟県・新潟市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西尾 俊幸 (NISHIO, Toshiyuki)  
日本大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号: 10256836

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

小田 宗宏 (ODA, Munehiro)  
日本大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号: 10508691

### (4) 研究協力者

李 秋夢 (LI, Shumou)

篠崎 佑子 (SHINOZAKI, Yuko)

高橋 愛実 (TAKAHASHI, Narumi)