

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06584

研究課題名(和文) 希少糖D-プシコース、D-アロースの一括生産システムの構築に関する研究

研究課題名(英文) Construction of cascade reaction system for production of D-psicose and D-allose

研究代表者

森本 兼司 (Morimoto, Kenji)

香川大学・国際希少糖研究教育機構・准教授

研究者番号：90363184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Shinella属NN-6株は、L-ラムノースで培養するとL-ラムノースイソメラーゼおよびケトース3-エピメラーゼを生産した。これから調製した固定化酵素によりD-フルクトースからD-プシコースとD-アロースを一括に生産することが確認された。この酵素反応液を前処理することなくボロン酸ゲルを用いて直接分離精製する装置を開発した。これにより酵素反応と分離を連結することが初めて可能になった。回収したD-プシコースとD-アロースの純度はほぼ100%であり、回収されたD-フルクトースは再度反応に使用可能であることも示された。以上のことから、希少糖一括生産システムの構築に目処がたった。

研究成果の概要(英文)：Shinella sp. NN-6 produced L-rhamnose isomerase and ketose 3-epimerase when it cultivated using L-rhamnose as a carbon source. Rare sugars, D-psicose and D-allose were produced from D-fructose by partial purified enzyme. Boronic acid gel separation apparatus was developed to separate them without desalting treatment, suggesting that enzyme reaction and separation process were able to connect for the first time. The purity of D-psicose and D-allose was almost 100%. Furthermore, recovered D-fructose allowed to use enzyme reaction after concentration control. Taking together, we obtain the prospect for the construction of cascade reaction system for rare sugars production.

研究分野：生物機能・バイオプロセス

キーワード：希少糖 D-プシコース D-アロース 一括生産 ボロン酸分離

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、およびその誘導体と定義されている。単糖には全部で 57 種類の異性体が存在する。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、ほとんどの単糖は希少糖となる。

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。特に D-ブシコースや D-アロースは kg レベルでの生産が実用化されており、これらの用途開発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ている。これを受け D-ブシコースや D-アロースは特定保健用食品や医薬品に向けた開発が進められている。

このように上記 2 種の希少糖の需要は今後増加すると見込まれるが、供給に問題点を抱えている。D-ブシコースは安価な果糖 D-フルクトースからケトース 3-エピメラーゼ(現在の主流は D-タガトース 3-エピメラーゼ)を用いて生産されているので比較的低コストでの供給も近々に可能になると思われている。しかしながら、D-アロースは先の D-ブシコースを基質として L-ラムノースイソメラーゼを用いる方法が主となっているため、D-アロースの製造コストの軽減は D-ブシコースのコストが律速となっている。

さらに先の酵素反応はいずれも異性化反応(平衡反応)を示すために、生産物を得るためには分離工程がそれぞれに必要な点もコスト押し上げる要因となっている。

2. 研究の目的

本研究では、上記の問題点を解決するために 2 種の酵素を同時に微生物に生産させ、D-フルクトースから同時に D-ブシコースおよび D-アロースを得ることを第一の目的とし、上記 2 種の酵素を発現する *Shinella* 属 NN-6 株による D-ブシコース、D-アロースの一括生産方法の最適化を目指した。また、この混合物から前処理を必要としない分離技術の開発と連続生産システムの構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) NN-6 株の全ゲノム配列の解析、希少糖生産酵素遺伝子のクローニングと酵素の諸性質

本菌の全ゲノム配列の解析を外部機関に委託し、希少糖生産酵素遺伝子を解析し、ケトース 3-エピメラーゼ遺伝子を全合成し大腸菌を介してクローニングした。

また、野生株由来のケトース 3-エピメラーゼの 1 種である L-リブロース 3-エピメラーゼ、D-キシロースイソメラーゼ、および L-ラムノースイソメラーゼの精製酵素の諸性質を検討した。

(2) NN-6 株由来の希少糖生産酵素を用いた

D-ブシコース、D-アロース生産の最適化

ケトース 3-エピメラーゼおよび L-ラムノースイソメラーゼを効率的に発現するために NN-6 株の培養条件を検討した。得られた菌体から調製した部分精製酵素を固定化し、それぞれの活性の至適温度、pH、安定性などを検討した。D-ブシコース、D-アロース生産に最適な反応条件を検討し、基質濃度、反応温度、最適緩衝液を決定した。

(3) ボロン酸と希少糖の結合特性の解析

市販のボロン酸ゲルをカラムに充填し、pH8~9 の緩衝液(グリシン-NaOH、リン酸ナトリウム、トリス-HCl)を移動相として全ヘキソースの保持時間の比較、フロントアルファイニティークロマトグラフィーによる結合特性を調べた。

(4) D-ブシコース、D-アロースの一括生産システムの構築

方法(2)で得た酵素反応液を本研究で構築したボロン酸ゲルカラムクロマトグラフィーに直接供して各単糖を分画し回収し、その回収率を求めた。回収した低濃度 D-フルクトース溶液に高濃度の同液を追加したのち、再度固定化酵素に供し再反応可能化を検証した。

(5) ケトース 3-エピメラーゼ生産菌のスクリーニング

新たにケトース 3-エピメラーゼ活性を有する微生物を従来法によってスクリーニングした。既存菌と酵素生産性や諸性質を比較検討した。

4. 研究成果

(1) NN-6 株の全ゲノム配列の解析と希少糖生産酵素遺伝子のクローニング

NN-6 株には L-ラムノースイソメラーゼ遺伝子、少なくとも 2 種類のケトース 3-エピメラーゼ遺伝子、D-キシロースイソメラーゼ遺伝子の存在が示唆された。うちケトース 3-エピメラーゼ遺伝子を 2 種クローニングして、ともに D-ブシコースに対するケトース 3-エピメラーゼ活性を確認したが、基質特異性を精査できなかったため、正確な酵素名の特定には至らなかった。したがって以下の成果には、ケトース 3-エピメラーゼが複数混在している可能性が考慮されるため、特定不可能な条件の場合にはケトース 3-エピメラーゼと表した。

野生株より 3 種の異性化酵素を精製した。[1] L-リブロース 3-エピメラーゼは、分子量はゲルろ過クロマトグラフィーで約 70kDa で SDS-PAGE との結果からホモ二量体であることがわかった。本酵素の至適温度は 80、至適 pH はトリス-HCl の pH 7.5 であった。本酵素は金属要求性の酵素であり、CoCl₂ を添加した時に最大活性を示し、未添加時と比較して、約 160 倍高い活性を示した。基質特異

性は、L-リブロースに対する活性を 100%としたとき D-プシコース、L-プシコース、L-タガトース、D-フルクトース、D-タガトースに対する相対活性は、それぞれ 75.0%、29.2%、27.0%、26.5%、24.1%であった。

[2] L-ラムノースイソメラーゼの分子量はゲルろ過クロマトグラフィーで約 162 kDa で SDS-PAGE との結果からホモ四量体であることがわかった。本酵素の至適 pH と温度はそれぞれ pH 9.0 と 60 であり、pH 安定と温度安定性はそれぞれ pH 5.0 から 6.0 および 7.5 から 11.0 と 40 までであった。本酵素は金属要求性の酵素であり、MnCl₂を添加した時に最大活性を示し、未添加時と比較して、約 1.9 倍高い活性を示した。基質特異性は、L-ラムノースに対する活性を 100%としたとき L-リキソース、L-マンノース、D-リボース、D-アロースに対する相対活性は、それぞれ 29.5%、12.2%、5.1%、2.4%であった。特に上記 5 種に対する比活性が、これまでに報告されている L-Rhl よりも高かったため、本酵素は希少糖生産に有用な酵素であることが証明された。

[3] D-キシロースイソメラーゼの分子量はゲルろ過クロマトグラフィーで約 87 kDa で SDS-PAGE との結果からホモ二量体であることがわかった。本酵素の至適 pH と温度はそれぞれ pH 9.0 と 65 であった。本酵素は金属要求性の酵素であり、MnCl₂または CoCl₂を添加した時に最大活性を示し、未添加時と比較して、ともに約 220 倍の高い活性を示した。基質特異性は、D-キシロースに対する活性を 100%としたとき D-グルコースに対する相対活性はわずか 0.125%であり、他の単糖には作用しなかった。

(2) NN-6 株由来の希少糖生産酵素を用いた D-プシコース、D-アロース生産の最適化

研究開始当初、NN-6 はケトース 3-エピメラーゼ活性は D-プシコースを炭素源に、L-ラムノースイソメラーゼ活性は L-ラムノースを炭素源にしたときにのみ検出されていた。ところが、L-ラムノース培養時にもケトース 3-エピメラーゼ活性が見られるようになった。これはケトース 3-エピメラーゼ遺伝子の制御因子に変異が生じたものと思われる。図らずも単一炭素源での培養で D-プシコース、D-アロースの一括生産に必須となるケトース 3-エピメラーゼおよび L-ラムノースイソメラーゼを発現する変異株の取得に成功した。

L-ラムノースで培養した NN-6 株から調製した固定化酵素のケトース 3-エピメラーゼおよび L-ラムノースイソメラーゼの至適条件を検討した。固定化 L-ラムノースイソメラーゼ活性の至適 pH は 7.0 と至適温度は 55 °C、固定化ケトース 3-エピメラーゼはそれぞれ pH5.5 と 80 であった。pH と温度の安定性はそれぞれ固定化 L-ラムノースイソメラーゼが pH8.0 ~ 10.0 と 50 まで、固定化ケトース

3-エピメラーゼが pH5.5 ~ 9.0 と 70 までであった。

この L-ラムノースイソメラーゼとケトース 3-エピメラーゼ両活性を示す固定化酵素を用いて D-プシコースと D-アロースの生産性を検討した。2% D-フラクトースを基質としたとき、45、50 では副産物として D-グルコースが生産されたが、55、60 では D-グルコースをほとんど生産することなく速く平衡に達した。5%、10% D-フラクトースを基質として 55、60 で反応を行うと 10%では D-アロースとほぼ同量の D-グルコースが確認されたのに対して、55 では D-グルコースがほとんど確認されなかったことから、基質濃度は 5%が最適であると決定した。もっとも生産効率が高い条件で反応させた後の HPLC 分析結果 (図 1) から、D-グルコース、D-フルクトース、D-プシコース、D-アロースの平衡比は、1.7 : 68.6 : 21.4 : 8.2 であった。

(3) ボロン酸と希少糖の結合特性の解析

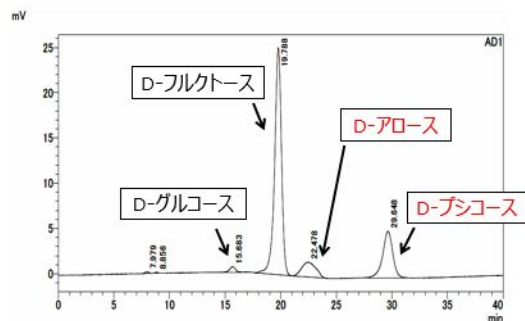


図 1. 固定化酵素によるD-フルクトースからD-プシコース、D-アロースの一括生産

ボロン酸カラム内の保持時間およびフロンタルアフィニティークロマトグラフィーを用いてヘキソースのボロン酸に対する結合力を算出した結果、プシコース > イドース、ソルボース、タガトース、タロース、フルクトース > グロース、アルトロース > アロース、ガラクトース、マンノース、グルコースとなった。プシコースは突出して結合力が高く、アロース、ガラクトース、マンノース、グルコースはほぼ同じレベルで低かった。また、緩衝液の違いによっても結合特性が異なることがわかった。表 2 はすべて pH8.0 の緩衝液での比較を示している。トリスは分子内にシスジオール構造を有するため、単糖と拮抗することにより保持時間が短くなると示唆された。グリシンもトリスと似

表 2. 緩衝液によるボロン酸とヘキソースの保持時間への影響

ヘキソース	保持時間 (min)			
	グリシン-NaOH	トリス-HCl	リン酸ナトリウム	
アルドース	グルコース	42.6	40.9	45.4
	マンノース	43.1	41.5	46.2
	アロース	43.0	42.3	52.0
	ガラクトース	43.6	41.7	48.4
	アルトロース	46.6	45.5	70.5
	グロース	48.3	45.0	71.9
	タロース	69.7	60.4	111.5
ケトース	イドース	72.3	78.0	134.8
	フルクトース	56.1	52.3	107.6
	タガトース	53.2	53.9	112.7
	ソルボース	56.5	55.7	130.7
	プシコース	85.5	99.5	900.0 <

た傾向を示したが、理由は不明である。緩衝液を使い分けることでさまざまな希少糖の分離に適応可能であることがわかった。

イズモリング内の異性化反応 10 種の反応液(表 1)がポロン酸ゲルにて分離が可能かについて検討した。その結果、ソルボース-タガトース混合液を除く 9 種の反応液において分離適用が可能であることがわかった。

表 1. イズモリング内の異性化反応10種

酵素名	基質	生産物
L-ラムノース	D-プシコース	D-アロース
イソメラーゼ	L-タガトース	L-タロース
L-リボース	D-フルクトース	D-マンノース
イソメラーゼ	L-ソルボース	L-グルコース
D-アラビノース	D-プシコース	D-アルトロース
イソメラーゼ	L-タガトース	L-ガラクトース
D-キシロース	D-グルコース	D-フルクトース
イソメラーゼ	L-ソルボース	L-イドース
D-タガトース	D-フルクトース	D-プシコース
3-エピメラーゼ	L-ソルボース	L-タガトース

(4) D-プシコース、D-アロースの一括生産システムの構築

(2) および(3)の結果を踏まえ、D-プシコース、D-アロースの一括生産システムを構築した。(2)で調製した反応液ではポロン酸ゲルの処理能力を大幅に超えるため、反応時における基質を 2% D-フルクトースに変更した。この条件で反応させた後の HPLC 分析を図 3 に示す。またこのときの平衡比 D-グルコース : D-フルクトース : D-プシコース : D-アロースは、4.1 : 62.6 : 22.2 : 10.8 であった。図 1 よりも D-プシコース、D-アロースの組成比は高いが生産効率は低下し、かつ D-グルコースの比率が高まった。今後ポロン酸分離の高濃度化を検討する必要がある。

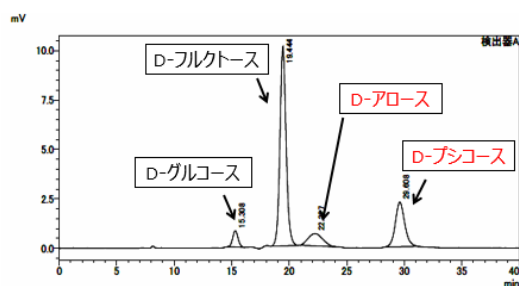
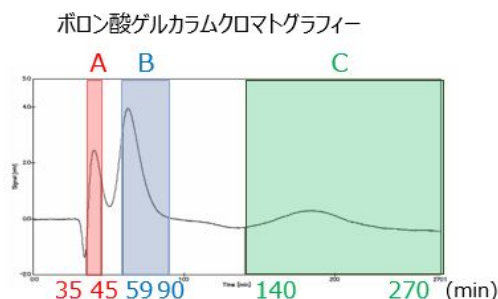


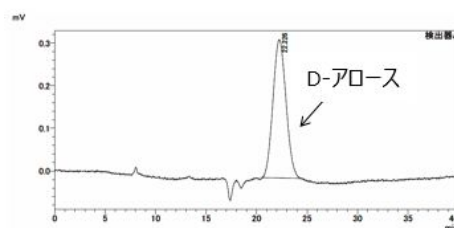
図3. D-プシコース、D-アロースの連続生産時における糖液組成

上記の反応液をフィルターを過後にポロン酸ゲル分離装置に供した。移動相にリン酸ナトリウム (pH8.0) を用い、糖濃度は 2%、100 μ L、分離に 270 分を要した。ポロン酸クロマトグラフィーの結果、分離後の 3 画分の HPLC 分析結果を図 4 に示す。副産物となる D-グルコースは確認されなかったが、主要の 3 成分は先の保持時間の結果とほぼ一致した。各画分の糖純度はほぼ 100% であり、D-プシコース、D-アロースについては脱塩処理し結晶化可能であることがわかった。各画分の回収率は、D-フルクトースが 60.5%、D-プシコースが 75.2%、D-アロースが 55.9% であった。さらに回収した D-フルクトース画分が再度反応基質としてリサイクル可能であること

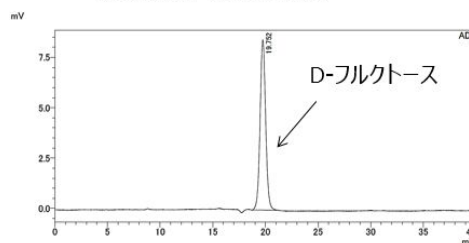
を明らかにした。このことから、ポロン酸ゲルを用いての希少糖連続生産法は実用が可能であることがわかった。



A画分のHPLC分析結果



B画分のHPLC分析結果



C画分のHPLC分析結果

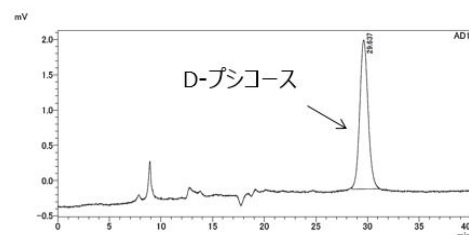


図4. ポロン酸ゲルカラムクロマトグラフィーの結果

(5) ケトース 3-エピメラーゼ生産菌のスクリーニング

本研究で新たに *Burkholderia* 属が 2 種、*Rhizobium* 属 3 種からケトース 3-エピメラーゼ活性を検出したが、*Shinella* 属 NN-6 株よりも酵素生産性が低いという理由で研究を中止した。

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 4 件)

1. Shompoosang, S., Yoshihara, A., Uechi,

K., Asada, Y., Morimoto, K.: Novel process for producing 6-deoxy monosaccharides from L-fucose by coupling and sequential enzymatic method. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(1), 1-6, 2016. 査読有.

2. Terami, Y., Uechi, K., Nomura, S., Okamoto, N., Morimoto, K., Takata, G.: Production of L-allose and D-talose from L-psicose and D-tagatose by L-ribose isomerase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(10), 1725-1729, 2015. 査読有.

3. Terami, Y., Yoshida, H., Uechi, K., Morimoto, K., Takata, G., Kamitori, S.: Essentiality of tetramer formation of *Cellulomonas parahominis* L-ribose isomerase involved in novel L-ribose metabolic pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(15), 6303-6313, 2015. 査読有.

4. Morimoto, K., Yoshihara, A., Furumoto, T., Takata, G.: Production and application of a rare disaccharide using sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(6), 652-656, 2015. 査読有.

〔学会発表〕(計 17件)

- [1] 鈴木琢磨、堀玄澄、池田光、森本兼司. *Shinella* sp. NN-6 由来 D-キシロースイソメラーゼと D-プシコース 3-エピメラーゼを用いた D-キシロースからの D-キシロース、D-リブロースの一括生産. 日本農芸化学会 2018年度、2018年3月16日、名城大学(愛知県名古屋市)
- [2] 池田光、野崎智帆、堀玄澄、鈴木琢磨、森本兼司. *Shinella* sp. NN-6 株由来のケトース3-エピメラーゼの精製、諸性質の検討とD-プシコース生産への応用. 日本農芸化学会 2018年度、2018年3月16日、名城大学(愛知県名古屋市)
- [3] 後藤成暁、野崎智帆、森本兼司. D-プシコースと D-アロースの連続生産システムの構築. 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大会 2017 年 9 月 22 日、大阪府立大学(大阪府堺市)
- [4] 池田光、野崎智帆、堀玄澄、鈴木琢磨、森本兼司. *Shinella* sp. NN-6 由来の D-プシコース 3-エピメラーゼの発現条件. 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017年度合同大阪大会 2017年9月22日、大阪府立大学(大阪府堺市)
- [5] 鈴木琢磨、堀玄澄、池田光、森本兼司. *Shinella* sp. NN-6 由来 D-キシロースイソメラーゼの精製と諸性質. 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017年

度合同大阪大会 2017年9月22日、大阪府立大学(大阪府堺市)

- [6] 後藤 成暁、十川直也、千葉和也、森本兼司. *Shinella* sp. NN-6 株由来の L-ラムノースイソメラーゼの諸性質の検討および希少糖生産. 日本農芸化学会 2017年度、2017年3月19日、京都女子大学(京都府京都市)
- [7] 森本兼司. ワンポット反応でのD-プシコース、D-アロースの一括生産法の開発. かがわ糖質バイオフォーラム 第9回シンポジウム、2017年2月1日 サンポート高松(香川県高松市)
- [8] Hori, G., Nozaki, C., Takata, G., Morimoto, K. Cloning and expression of D- allulose 3-epimerase from *Shinella* sp. NN-6 in *Escherichia coli* and simultaneously production of some rare sugars by enzymatic reaction. The 6th Symposium of International Society of Rare Sugar (Rare Sugar Congress 2016 in Kagawa), International Society of Rare Sugar, Kagawa, 2016 年 11 月 26 日、サンポート高松(香川県高松市)
- [9] Nozaki, C., Morimoto, K.: Improvement of simultaneous production of D-allulose and D-allose in one-pot reaction. The 6th Symposium of International Society of Rare Sugar (Rare Sugar Congress 2016 in Kagawa), International Society of Rare Sugar, Kagawa, 2016年11月26日、サンポート高松(香川県高松市)
- [10] Goto, S., Sogawa, N., Morimoto, K.: Development of a novel separation method for rare sugar production using the boronic acid gel and investigation of affinity to a boronic acid gel of hexoses. The 6th Symposium of International Society of Rare Sugar (Rare Sugar Congress 2016 in Kagawa), International Society of Rare Sugar, Kagawa, 2016年11月26日、サンポート高松(香川県高松市)
- [11] 後藤成暁、十川直也、野崎智帆、吉原明秀、森本兼司. ボロン酸ゲルによる希少ヘキソースの新規分離法の確立. 日本生物工学会 2016年度、2016年9月29日、富山国際会議場(富山県富山市)
- [12] Goto, S., Sogawa, N., Nozaki, C., Yoshihara, A., Morimoto, K.: D-Allulose separation by boronic acid gel chromatography. The 6th Joint Symposium between Kagawa University and Chiang Mai University. 2016 年 8 月 29 日 香川大学(香川県高松市)
- [13] Nozaki, C., Shompoosang, S., Goto, S., Yoshihara, A., Morimoto, K.: D-Allulose and D-allose production by

D-allulose 3-epimerase and L-rhamnose isomerase from *Shinella* sp. NN-6 and characterization of D-allulose 3-epimerase. The 6th Joint Symposium between Kagawa University and Chiang Mai University. 2016年8月29日 香川大学 (香川県高松市)

- [14] 森本兼司. 希少糖の生産戦略について. 日本糖質学会大会 2016 年度「うどん県発!! 希少糖プロジェクト」2016 年 9 月 2 日
- [15] 野崎智帆、十川直也、後藤成暁、吉原明秀、高田悟郎、森本兼司. 酵素反応・ポリオン酸ゲルを用いた分離による D-プシコース、D-アロースの生産技術の開発. 日本農芸化学会 2016 年度、2016 年 3 月 29 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
- [16] 森本兼司. 二糖類を出発源とした希少糖生産. 日本農芸化学会中部支部 第 175 回例会 (若手シンポジウム) 2015 年 11 月 14 日、三重大学 (三重県津市)
- [17] 野崎智帆、千葉和也、Shompoosang Sirinan、吉原明秀、高田悟郎、森本兼司. *Shinella* sp. NN-6 由来 D-プシコース 3-エピメラーゼ、L-ラムノースイソメラーゼを用いた D-プシコース、D-アロース一括生産. 日本生物工学会 2015 年度、2015 年 10 月 26 日、城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

〔図書〕(計 1 件)

高田悟郎、森本兼司. 機能性糖質素材・甘味料の開発と市場, 第 2 章 希少糖 D-アロースの大量生産、2017 年 6 月 27 日発行、シーエムシー出版

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: ケトースおよび/またはアルドースの製造方法.

発明者: 森本 兼司

権利者: 国立大学法人香川大学、松谷化学工業株式会社

種類: 特許権

番号: 特許出願 2016-35597

出願年月日: 2016 年 2 月 26 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔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・国際希少糖研究教育機構・准教授

研究者番号: 90363184

(2) 研究分担者

高田 悟郎 (TAKATA GORO)

香川大学・国際希少糖研究教育機構・教授
研究者番号: 50322722

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし