

## 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27日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580088

研究課題名（和文） 微生物の生産する酵素による希少オリゴ糖合成技術の開発

研究課題名（英文） Production of Rare Oligosaccharides Using Microbial Enzymes.

研究代表者

高田 悟郎 (TAKATA GORO)

香川大学・希少糖研究センター・准教授

研究者番号：50322722

研究成果の概要（和文）：

本研究課題は、応募者らが独自に開発した希少糖およびその誘導体の生産技術を発展させて、希少糖のみを構成単位とする新規の二糖およびオリゴ糖を生産する技術を開発するための基盤研究である。本研究では、生理活性が解明され、用途開発の発展性の高い、希少糖 D-アロースから、D-アロースのみを構成単位とする新規二糖およびオリゴ糖を生産する方法を開発する。本研究では単糖から合成できるホスホリラーゼに焦点を当て、D-アロースから二糖（アロシルアロース）、オリゴ糖（アロオリゴ糖）までの一連の生産法の確立と、その技術を他の希少糖にも応用することを目指して研究を実施した。

生産に用いる材料に用いる D-アロースを十分量生産した。また、アロキナーゼによる D-アロースと ATP から D-アロース 6-リン酸の生産を試みた。しかし、D-アロース 6-リン酸から D-アロース 1-リン酸の生産では非常に効率が悪いと、D-アロース 1-リン酸を生産する微生物のスクリーニングを行った。D-グルコース 1-リン酸から D-アロース 1-リン酸に変換する微生物、D-アロースから D-アロース 1-リン酸に変換できる微生物の分離に成功した。D-アロース 1-リン酸の生産が可能となったので、既知のホスホリラーゼを用いてアロシルアロースの生産を試みたが D-アロース 1-リン酸が不安定でアロースに分解してしまうため反応が合成の方向に働かず生産物を得ることができなかった。一方、D-グルコース 1-リン酸から D-アロース 1-リン酸に変換できる微生物は *Bacillus* 属と同定し、二糖のセロビオースにも作用することがわかったので、本菌を用いてセロビオースからのアロシルアロースの生産を試みた。その結果、セロビオースをケトセロビオースに微生物酸化し、水素化ホウ素ナトリウムを用いて還元することで、高い収率でアロシルアロースが得られることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

This research objective prospected to produce rare disaccharide and oligosaccharides by biotechnological methods.

First, the material, D-allose was produced from starch by ethanol method. Although we tried to produce D-allose 1-phosphate via D-allose 6-phosphate, the efficiency was quite low. Therefore, we tried to produce this from glucose 1-phosphate using glucoside 3-dehydrogenase newly isolated by ourselves. We also investigate the oxidation of cellobiose using this microbe. As a result, we succeeded to oxidize cellobiose to ketocellobiose. By following reduction of sodium borohydride, we also succeeded to produce objective alosyl-allose at higher efficiency.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,900,000	570,000	2,470,000
23年度	700,000	210,000	910,000

24年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物酵素・糖質科学

### 1. 研究開始当初の背景

未利用のバイオマスや農産廃棄物を糖資源として有効活用するために、これらに多く含まれる多糖類を酵素で加水分解して単糖を得る研究を進めている。また、得られた単糖に酵素を作用させて、天然にはほとんど存在しないがさまざまな生理活性を有する希少糖に変換する研究も進めている。

未利用のバイオマスや農産廃棄物資源を原料にした多糖の研究は、得られる単糖をアルコール発酵して燃料に用いる方法が実用化段階まで到達している。オリゴ糖では、トレハロースやフラクトオリゴ糖は低カロリー甘味料や虫菌予防効果などの機能性が発見されて、食品添加物に用いられるようになった。一方、単糖に関する研究は、天然に大量に存在する数種類の単糖を除いて、大量生産が難しく、非常に高価であるため用途開発の研究は進んでいない。このような状況を背景にして、天然にはほとんど存在しない単糖である希少糖に着目し、すべての希少糖の生産法を確立する研究を行った(Granstromら J. Biosci. Bioeng. 2004)。最近の研究により、希少糖にはさまざまな生理活性があることがわかっており、特に、D-アロースには、臓器虚血保護作用や癌抑制作用、活性酸素の産生抑制作用といった生理活性が知られており(Murataら J. Biosci. Bioeng. 2003、Suiら、Int. J. Oncol. 2005)、医薬品や機能性食品として最も実用化のプロセスに近い希少糖であるといえる。

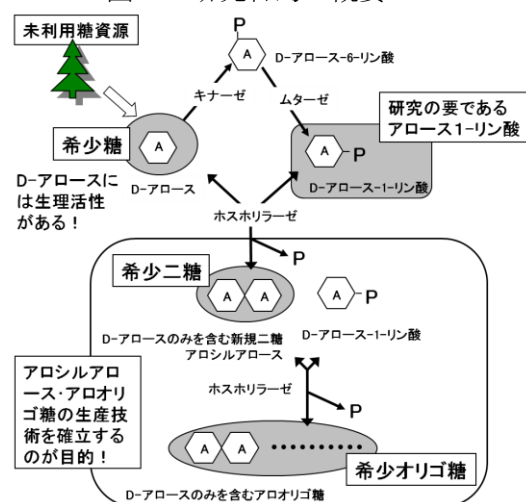
### 2. 研究の目的

本研究課題は、独自に開発した希少糖およびその誘導体の生産技術を発展させて、希少糖のみを構成単位とする新規の二糖およびオリゴ糖を生産する技術を開発するための基盤研究である。すなわち、未利用糖資源を出発原料に希少糖 D-アロースを生産し、さらに、酵素反応で D-アロース 1-リン酸を合成する。次に、ホスホリラーゼ反応の可逆性を利用して、D-アロースをアクセプターに D-アロース 1-リン酸と反応させることで、新規の糖であるアロシルアロースおよびアロオリゴ糖を生産するのが目的である。D-アロ

スには様々な生理活性があるので、これらの糖にも生理活性が期待でき、希少糖の用途開発研究のさらなる発展が期待できる。

酵素反応を用いたすべての希少糖を生産する方法を開発し、未利用のバイオマスや農産廃棄物資源を原料にした D-アロースの生産法も確立している。そこで本研究では、生理活性が解明され、用途開発の発展性の高い、希少糖 D-アロースから、D-アロースのみを構成単位とする新規二糖およびオリゴ糖を生産する方法を開発する。最近のオリゴ糖研究の動向としては、加水分解の糖転移反応を用いた生産法が主流である。しかし、酵素の基質特異性が高いためか、応募者は、この方法で希少二糖の合成には成功しなかった。本研究では単糖から合成できるホスホリラーゼに焦点を当て、酵素反応条件を工夫することで受容体として認識できることがわかった D-アロースから二糖(アロシルアロース)、オリゴ糖(アロオリゴ糖)までの一連の生産法の確立と、その技術を他の希少糖にも応用することを目指す。

図1 研究目的の概要



### 3. 研究の方法

本研究は、(1)D-アロース 1-リン酸およびアロシルアロース、アロオリゴ糖の生産に用いる組換え酵素の大量生産、(2)未利用糖資源から D-アロース・D-アロース 1-リン酸の

合成、(3)D-アロースとD-アロース 1-リン酸からホスホリラーゼを用いたアロシルアロースおよび(4)アロオリゴ糖の生産と、4段階に分けて研究を実施した。

(1) 酵素遺伝子のクローニングと組換え酵素生産

- ・大腸菌由来のアロキナーゼ、ホスホヘキソムターゼ両遺伝子(Kim ら J. Bacteriol. 1997)をPCRで増幅させ発現ベクターpQE60に連結後、形質転換し組換え大腸菌を作成した。
- ・*Clostridium thermocellum* 由来のセロビオースホスホリラーゼ、セロデキストリンホスホリラーゼ両遺伝子(Kawaguchi ら J. Ferment. Bioeng. 1998, Tanaka ら J. Ferment. Bioeng. 1995)をPCRで増幅させ発現ベクターpQE60に連結後、形質転換し組換え大腸菌を作成した。
- ・自然界から微生物をスクリーニングし、新たに、グルコシド 3-デヒドロゲナーゼを生産する微生物の分離を行った。微生物の同定は 16srRNA 解析により行った。

(2) D-アロースの生産とD-アロース 1-リン酸の合成

アロースは、以下の手順で生産した。

- ・未利用糖資源からでんぷんを熱水で抽出し、市販の耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ・グルコアミラーゼ・グルコースイソメラーゼ、D-タガトース 3-エピメラーゼ(Takeshita ら J. Biosci. Bioeng. 2000)、L-ラムノースイソメラーゼ(Morimoto ら Enz. Microb. Technol. 2005)を反応させてD-グルコース・D-フルクトース・D-プシコース・D-アロースの混合液を得た。
- ・脱塩・濃縮後、特許技術(2004-298106)によるエタノール結晶化法で、純度 99%以上のD-アロースの結晶を得た。

アロース 1-リン酸の合成は以下の2つの方法を検討した。

- ・アロキナーゼによるD-アロースとATPからD-アロース 6-リン酸を生産した。生産物をHPLCで確認後、ホスホヘキソムターゼによるD-アロース 6-リン酸からD-アロース 1-リン酸の生産を行った。
- ・でんぷんに馬鈴薯由来の $\alpha$ -グルカンホスホリラーゼを作用させてD-グルコース 1-リン酸を生産した。次に、グルコース 3-デヒドロゲナーゼによる酸化反応と水素化ホウ素ナトリウムを用いた水素添加による還元反応でD-アロース 1-リン酸の生産を行った。

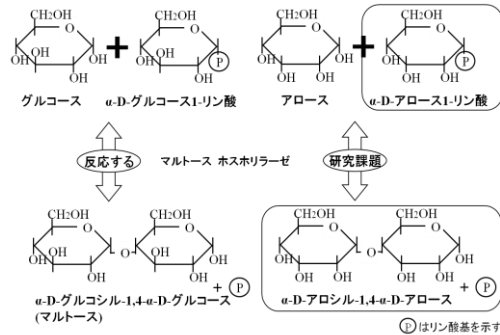
(3) アロシルアロースの生産

アロシルアロースの生産は以下の2つの方法を検討した。

- ・D-アロース 1-リン酸とD-アロースから、 $\alpha$ -1,4結合を形成するマルトースホスホリラーゼ、 $\beta$ -1,4結合を形成するセロビオ

ースホスホリラーゼも用いて2種類の結合位置の異なるアロシルアロースの生産を試みた。生産物の確認はHPLCで行った。

- ・マルトース、セロビオースからグルコシド 3-デヒドロゲナーゼを用いてケト二糖を生産後還元し、アロシルアロースの生産を試みた。



マルトースホスホリラーゼを用いた希少糖D-アロースのみを含む新規二糖類の生産戦略図

反応の補足説明  
反応には示していないが、マルトースホスホリラーゼ(市販品)だけでなくセロビオースホスホリラーゼ(*Clostridium thermocellum*由来の組換え酵素)を用いることで、 $\beta$ -D-アロシル-1,4- $\beta$ -D-アロースの生産(研究課題)を行うこともできると考えられる。

(4) アロオリゴ糖の生産

マルトースホスホリラーゼを用いて、アロシルアロースとD-アロース 1-リン酸から $\alpha$ -1,4結合型のアロオリゴ糖、セロデキストリンホスホリラーゼを用いて、アロシルアロースとD-アロース 1-リン酸から $\beta$ -1,4結合型のアロオリゴ糖の生産を試みた。生産物の確認はHPLC、比色法で行った。

4. 研究成果

(1)D-アロース 1-リン酸およびアロシルアロース、アロオリゴ糖の生産に用いる組換え酵素の大量生産

- ・pQE60を用いた組換えアロキナーゼ、ホスホヘキソムターゼの生産をSDS-PAGEで確認した。両酵素とも可溶性の画分に活性体で得ることができた。
- ・pQE60を用いた組換えセロビオースホスホリラーゼ、セロデキストリンホスホリラーゼの生産に成功した。酵素生産量は*lac*プロモーターを用いた従来の発現系より10倍増加した。
- ・後述の検討でD-アロース 1-リン酸の生産効率が悪い、アロシルアロースの合成効率が悪いことが明らかとなった。代替の方策として新たに、スクリーニングを行い、酸化還元反応でこれらの物質を生産できる微生物を2種類分離した。これらの微生物はそれぞれ、16sRNA配列の解析から、*Agrobacterium*属、*Bacillus*属と同定でき、両菌株とも基質特異性が異なるものの同じタイプの酵素グルコシド 3-デヒドロゲナーゼを生産していることがわかった。以後の実験では*Bacillus*属由来の本酵素を用いることにした。

(2)未利用糖資源からD-アロース・D-アロース 1-リン酸の合成

- ・約 100g のでんぷんから最終的に 1.2g の D-アロースを入れることができた。この操作を 10 回繰り返して約 10g の D-アロースを得た。
- ・1%のアロース、25mM の ATP、MgCl<sub>2</sub> を含む緩衝液 (pH7.0) にアロキナーゼ、ホスホヘキソースムターゼを加えてその反応を ATP の減少量及び HPLC で分析した。反応の進行に伴って ATP 量の減少がみられたが、反応性が低く、HPLC で D-アロース 6-リン酸、D-アロース 1-リン酸の生産は確認できたもののこの方法で生産することは断念した。
- ・約 100g のでんぷんから 5g の D-グルコース 1-リン酸を得ることができた。これを基質にし、既報を参考にした反応条件でグルコシド 3-デヒドロゲナーゼを微生物反応で作用させた。反応の進行に伴って、ケトース量が増加し、48 時間後に D-グルコース 1-リン酸がなくなったので反応を終了させた。濃縮後、イオン交換クロマトグラフィーで分離した。HPLC 分析により、様々な副産物が生成していることがわかり、D-グルコース、D-ソルビトール、D-グルコース 1-リン酸、D-アロース、D-アロース 1-リン酸などがみられた。これは 1-リン酸が不安定なためであると考えられた。最終的に約 100mg の D-アロース 1-リン酸を得ることができた。

(3) D-アロースと D-アロース 1-リン酸からホスホリラーゼを用いたアロシルアロース

・マルトースホスホリラーゼでは反応せず、HPLC で基質のみ検出された。セロビオースホスホリラーゼを作用させた後、生産物を HPLC で分析したところ、アロシルアロースと思われるピークが新たに検出された。酵素の特異性から  $\beta$ -1,4 結合型のアロシルアロースと思われた。しかし、反応が経過するとともに分解のほうに進み反応 24 時間後には検出できなかった。セロビオースホスホリラーゼが D-アロース 1-リン酸を脱リン酸化してしまふためであることがわかり、さらに、本法でのアロシルアロースの生産条件の検討を試みている。

・上記の代替法として、新たに分離した微生物 *Bacillus* 属の生産するグルコシダーゼ 3-デヒドロゲナーゼを用いたアロシルアロースの生産を試みた。酵素反応では補酵素の FAD と電子伝達物質が必要になるため、微生物反応を用い、基質にはマルトースとセロビオースを用いた。マルトースは加水分解されてしまい生産物を検出することはできなかった。セロビオースからは反応開始 6 時間後にケトセロビオース、24 時間後にはジケトセロビオースも検出することができた。そこで、反応量を増やしたのち、HPLC で生産物を分取

した。次に、分取した約 1g のジケトセロビオースを水素化ホウ素ナトリウムで還元した。生産物を HPLC で分析したところ、セロビオースのほかいくつかの 2 糖類のピークが認められ、アロシルアロースのピークも検出できた。しかし、生産量が少ないため分取を試みている段階である。

#### (4) アロオリゴ糖の生産

(3) の実験により、生産量が少ないが  $\beta$ -1,4 結合型のアロシルアロースと思われる生産物を得ることができた。しかし、生産量が少なく機器分析により構造決定ができなかった。現在さらに反応スケールを増やすとともに生産効率の改良に取り組んでいる。

生産量が少ないため、アロオリゴ糖の生産に関する研究は現在進行中である。そこで、予備的検討として、マルトースまたはセロビオースと D-アロース 1-リン酸からマルトースホスホリラーゼ、セロデキストリンホスホリラーゼを用いてオリゴ糖の生産を試みた。生産物の分析は TLC で行った。反応はセロオリゴ糖の生産条件と同様に行い、反応 6 時間後の生産物を TLC で分析した。マルトースホスホリラーゼでは分解されて D-グルコースになったが、セロデキストリンホスホリラーゼでは、3 糖以上のオリゴ糖が検出された。D-アロースは検出されず脱リン酸化も起こらなかった。

今後は、セロビオースホスホリラーゼを用いずにグルコシド 3-デヒドロゲナーゼとセロデキストリンホスホリラーゼを用いてアロオリゴ糖の合成を試みる必要があると示唆された。

#### 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 6 件)

1. 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*, 2011; 75(5), pp 1006-1009.
2. 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*, 2010; 74 (9), pp. 1807-1813.
3. Kimura, Y., Yoshimi, M., Takata, G. Enzymatic and Mutational Analyses of a Class II 3,5-Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase, PdeE, from *Myxococcus*

- xanthus*. J Bacteriol, 2011; 193(8), pp. 2053-2057.
4. 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, 2013; 77(3):511-5.
  5. 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, 2013; 77(2):253-8.
  6. 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, 2013 in press.

〔学会発表〕（計 26 件）

2010 年度 10 件

2011 年度 6 件

2012 年度 10 件

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高田悟郎 (TAKATA GORO)

香川大学・希少糖研究センター・准教授

研究者番号：50322722

### (2) 研究分担者

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

吉原明秀 (YOSHIHARA AKIHIDE)

香川大学・希少糖研究センター・助教

研究者番号：40548765