

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26450097

研究課題名（和文）微生物の代謝機能と酵素を利用した新しい希少糖およびヘテロ希少二糖生産技術の確立

研究課題名（英文）Study on the production of rare disaccharides and rare sugars.

研究代表者

高田 悟郎（Takata, Goro）

香川大学・国際希少糖研究教育機構・准教授

研究者番号：50322722

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：本課題は、D-アロース、D-アルトロース及びこれらの希少糖を含む二糖を新規の微生物の代謝機能と酵素を用いた新たな反応経路で生産する技術の確立のための基盤研究である。

本研究により、D-グルコシド3-デヒドロゲナーゼの大量生産に成功した。また、結晶化にも成功した。本酵素は様々な二糖類に作用し、化学的還元を組み合わせることで、 $\alpha$ -1,4結合型、 $\beta$ -1,4結合型のアロシルグルコース、 $\alpha$ -1,1結合型のアロシルアロース、 $\beta$ -1,4結合型のグルシルグルコースなど様々な希少糖含有二糖の生産が可能となった。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study is the production of D-allose, D-altrose and their disaccharides using biotechnology method.

From the result of this research, we succeeded to mass-production of recombinant D-glucoside 3-dehydrogenase and its crystalization. This enzyme showed the substrate specificity against various disaccharides. By combination of chemical hydrogenation, we achieved to produced various rare sugar containing disaccharide such as 1,4-a-allosylglucose, 1,4-b-allosylglucose, 1,1-a-allosylallose, and 1,4-b-gulosylglucose.

研究分野：応用微生物学

キーワード：希少糖 D-アロース

## 1. 研究開始当初の背景

応募者は、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。応募者らは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、微生物または酵素を用いた反応(エピメラーゼ、イソメラーゼおよびポリオールデヒドロゲナーゼの組み合わせを用いた反応で以下、従来の方法と表記)により、すべての希少糖の生産および分離法を確立する研究を行った(Granstrom ら J. Biosci. Bioeng. 2004)。最近の本学医学部との共同研究により、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、D-プシコースには、血糖値上昇抑制作用、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いる(Murata ら J. Biosci. Bioeng. 2003、Sui ら、Int. J. Oncol. 2005)。D-プシコースは、大学発のベンチャー企業への技術移転が行われて実用化の段階に入っており、希少糖含有異性化糖「レアシュガースイート」も商品化されて希少糖を一般向けの市場へも販売することができるようになった。このように希少糖に関する国内外の研究は、応募者のグループが基礎から応用に至るまでリードしているが、近年、韓国(Kim ら Appl. Environ. Microbiol. 2006)の研究グループも様々な希少糖の生産に成功しつつある。我々が、競争力を保ち続けるためには、常に新しい希少糖の生産技術の開発を続けていく必要がある。

応募者らが世界で始めて発見した2つの新規の酵素が、希少糖の研究に革新的な変化をもたらした。それは、天然に多量存在するD-フルクトースから、D-タガトース 3-エピメラーゼを用いて希少糖 D-プシコース(Takeshita ら J. Biosci. Bioeng. 2000)、D-プシコースから、L-ラムノースイソメラーゼを用いて希少糖 D-アロースの生産に成功したことである。応募者は、この研究成果が学会で認められ、日本農芸化学会中四国支部奨励賞を受賞した(2008年)。応募者らはさらに、根粒菌 *Mesorhizobium loti* が、上記の D-タガトース 3-エピメラーゼ、L-ラムノースイソメラーゼを両方生産できることを初めて発見した(研究業績 2、6)。このように天然糖の D-フルクトースから D-プシコースと D-アロースを同時に生産可能な酵素を持つ微生物は初めての発見である。応募者はすでにこれらの酵素の性質を明らかにするとともに、結晶構造解析も行っている。さらに、応募者が土壌中から分離した新規微生物から既知の D-アロースの代謝経路(リン酸化、異性化)とは異なる別経路(酸化還元)が存在することを示唆する新規の酵素、D-グルコシド 3-デヒドロ

ゲナーゼ(EC 1.1.99.13)を発見した。本酵素は、D-アロースの炭素第 3 位を酸化して 3-デヒドログルコースを生成する。その後、3-デヒドログルコースは還元されて D-グルコースを生じ、代謝されていくと考えられた。このように、本酵素が希少糖代謝にどのような影響を与えるのか大変興味深く、また、本酵素を用いた新たな希少糖の生産経路の開発に発展することも期待できる。

つづいて、生理機能の研究者から単糖に機能があれば二糖にするとより安定で高い活性を期待できる可能性があるので、希少糖を用いた二糖を作って欲しいとの要請が出てきた。本酵素は、二糖から炭素第 3 位の水酸基が異なる二糖へと変換できる有用な酵素であり、例えば、グルコースはアロースに、ガラクトースはグロースに変換することができる。そこで、本酵素と糖ホスホリラーゼを用いて希少糖を含む二糖やオリゴ糖の生産にも取り組むことにした。

希少糖の中にはなお、従来の方法では多段階の反応プロセスが必要なため収率が低く、生産そのものが困難な希少糖も多数存在している。D-アロース、D-アルトロースの生産においても、D-フラクトースからの最大収率は 5-10%と大変効率が悪く、大量生産のネックとなっている。それらに対しては、生産・分離プロセスが複雑で多大な労力と時間、コストという課題を解決する必要が急務であり、本酵素を利用した新しい希少糖経路の開発への期待は大きい。

## 2. 研究の目的

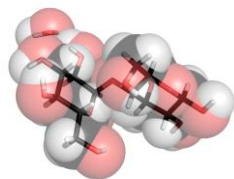
本課題では、これまでの応募者らの研究成果を発展させて、次の目標を達成させることを目的とした。

- (1) 新規 D-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼの反応機構と基質認識機構を明らかにするために、結晶構造を明らかにする。変異を導入しオリゴ糖にも作用できるスーパー酵素の作製を試みる。
- (2) 新たに分離した微生物が、二糖や希少糖をどのように代謝するかを調べるために、代謝産物の機器分析を行い、加水分解と解糖を抑える制御による希少糖生産効率の向上を目指す。
- (3) セロビオースやマンノビオース、マルトース、スクロース、トレハロース、ラクトースを出発原料に、D-アロースを含む希少二糖、D-アルトロースを含む希少二糖、D-グロースを含む希少二糖を経て D-アロース、D-アルトロース、D-グロースを生産する方法を開発する。
- (4) セロビオース 2-エピメラーゼを用いて生産する 1,4-β-グルコシルマンノースと 1,4-β-マンノシルグルコースが生産できれば、さらに、D-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼを用いて新規の希少二糖を生産する。



前ページに示したように、大腸菌はD-アロースを代謝する既存の経路を持っている。そこで、まず、D-アロースを代謝できない遺伝子破壊株、すなわち、ホスホフルクトキナーゼ遺伝子、ピルビン酸キナーゼ遺伝子を破壊した変異株を作製した。次に、D-グルコシド3-デヒドロゲナーゼ遺伝子を導入し、D-アロースを炭素源に培養を行ったところ、生育が確認され、代謝産物の分析から3-デヒドロ-D-アロースを経て代謝することが分かった。

#### (4) 未利用資源から希少糖を含む各種希少二糖の生産技術の確立



D-グルコシド3-デヒドロゲナーゼの基質特異性を調べたところ、ラクトース、セロビオース、マルトース、スクロース、トレハロースに作用

し、マンノビオースにはほとんど作用しないことが分かった。それぞれ、水素化ホウ素ナトリウムで還元したところ、グロシルグルコース、アロシルグルコース( $\beta$ -1,4)、アロシルグルコース( $\alpha$ -1,4、上図)、アロシルフルクトース、アロシルアロース( $\alpha$ -1,4)が得られ、酸加水分解により、D-グロースおよびD-アロースが得られた。しかし、D-アルトロースを得ることはできなかった。また、 $\alpha$ 型の希少糖を含む二糖は不安定で容易に分解されることが分かった。

#### (5) グルコシルマンノースとマンノシルグルコースからの新規希少二糖の生産

D-グルコシド3-デヒドロゲナーゼがマンノビオースに作用しないことから、方針を転換し、セロビオース2-エピメラーゼ遺伝子をクローニングし組換え酵素生産を行った。次に、セロビオースとマンノビオースからそれぞれグルコシルマンノースとマンノシルグルコースを生産した。これらのヘテロ二糖にD-グルコシド3-デヒドロゲナーゼを作用させたところ、反応性が非常に低く、3-デヒドロ糖の生産までには至らなかった。今後は、変異酵素を用いてD-アルトロースを含む二糖の生産を試みる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件) すべて査読あり

① Chaikaew, S., Kanpiengjai, A., Intatep, J., Unban, K., Wongputtisai, P., **Takata, G.**, Khanongnuch, C. X-ray-induced mutation of *Bacillus* sp. MR10 for manno-oligosaccharides production from copra meal (2017) Preparative Biochemistry and Biotechnology, 47 (4), pp. 424-433.

DOI: 10.1080/10826068.2016.1252929

② Unban, K., Kanpiengjai, A., **Takata, G.**, Uechi, K., Lee, W.-C., Khanongnuch, C.

Amylolytic Enzymes Acquired from L-Lactic Acid Producing *Enterococcus faecium* K-1 and Improvement of Direct Lactic Acid Production from Cassava Starch (2017) Applied Biochemistry and Biotechnology, pp. 1-16. Article in Press.

DOI: 10.1007/s12010-017-2436-1

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 (2015) Applied Microbiology and Biotechnology, 99 (15), pp. 6303-6313.

DOI: 10.1007/s00253-015-6417-4

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

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.11.011

⑤ 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 (2015) Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 79 (10), pp. 1725-1729.

DOI: 10.1080/09168451.2015.1038215

⑥ Uechi, K., **Takata, G.**, Yoneda, K., Ohshima, T., **Sakuraba, H.** Structure of D-tagatose 3-epimerase-like protein from *Methanocaldococcus jannaschii* (2014) Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications, 70 (7), pp. 890-895.

DOI: 10.1107/S2053230X14011005

⑦ Yoshida, H., Yoshihara, A., Teraoka, M., Terami, Y., Takata, G., Izumori, K., Kamitori, S. X-ray structure of a novel L-ribose isomerase acting on a non-natural sugar L-ribose as its ideal substrate (2014) FEBS Journal, 281 (14), pp. 3150-3164.

DOI: 10.1111/febs.12850

[学会発表] (計28件)

① Elucidation of functional sugar production using enzyme and fermentation technology of microorganisms, International symposium on microbial research and biotechnology for biomass utilization, Fukuoka(JAPAN), 2015年11月.

○**Goro Takata**, Keiko Uechi, Yuji Terami, Chartchai Khanongnuch, Akane Terai, Mami Kazama, Kohei Nawa, Akkharapimon Yotsombat

② 酵素法を用いた希少糖生産の新展開, 平成 27 年度日本応用糖質科学会中国・四国支部シンポジウム, 福山大学(広島県福山市), 2015 年 11 月

**高田 悟郎**

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 悟郎 (Takata, Goro)

香川大学・国際希少糖研究教育機構・准教授  
研究者番号: 5 0 3 2 2 7 2 2

(2) 研究分担者

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: 9 0 3 6 3 1 8 4

(3) 連携研究者

櫻庭 春彦 (Sakuraba, Haruhiko)

香川大学・農学部・准教授  
研究者番号: 9 0 2 0 5 8 2 3