

# ヒトに有益な効能を示す新規希少オリゴ糖の酵素生産系の確立 及び網羅的機能性評価

中 井 博 之

新潟大学大学院自然科学研究科 助教

## 諸 言

我が国においては、急速な高齢化社会の進行に伴い、高血圧、高脂血症、糖尿病及び肥満など生活習慣病の罹患率が年々増加している。また若年層においても現在社会のストレスや環境汚染、生活の乱れなどの加齢以外の要因による健康不安も増大しており、国民の健康増進の重要性が増している。健康管理において最も基本的且つ重要な習慣の1つとして食生活が挙げられるが、食事量・食事時間・栄養バランスなどの改善に加え、ヒトの健康保持増進に有益な生理活性を示す機能性食品を摂取することで健康向上や疾患の改善・予防に繋げようとする動きがあり、機能性食品に対する国民の関心も急速に高まっている。その中でも機能性オリゴ糖は、国民の多くに認識されている機能性食品素材の一つである。

オリゴ糖とは、構成糖である単糖が2～10個結合した糖の総称であり、古くから知られるショ糖や麦芽糖などもこれに分類される。構成単糖の種類、結合様式および重合度などの違いによって、自然界には多種多様なオリゴ糖が存在しており、それらは表1に示すような様々な機能性を持ち得る。

表1 オリゴ糖の機能性

<b>一次機能</b>
易～難消化性、エネルギー値など
<b>二次機能</b>
味質、保湿性、水分活性、着色性、浸透性、粘性、皮膜性 熱安定性、pH安定性、包接性、タンパク質保護安定化作用など
<b>三次機能</b>
整腸作用、抗う蝕性、抗菌作用、血統値上昇抑制作用、 コレステロール上昇抑制作用、ミネラル吸収促進作用、 免疫賦活作用、抗酸化作用、肝機能改善作用、 アトピー性皮膚炎改善作用、潰瘍性大腸炎抑制作用など

一次機能は、易・難消化性に関わる栄養特性であり、食行為本来の目的であるエネルギー獲得に関する機能である。また二次機能は、オリゴ糖の味質、保湿性、水分活性、着色性、粘性といった物理化学的特性と、それに基づく食品の美味しさ、食感、色合いなどの嗜好性および食品の保存性などに関する特性である。そして現在最も注目されている機能性が、生体調節機能などの生物学的特性に関する三次機能である。近年、整腸作用、抗う蝕作用、ミネラル吸収促進作用、免疫賦活作用などのヒトに対して有益な生理活性を有する機能性オリゴ糖が報告されるようになり、その中の幾つかは既に特定保健用食品として認可されている。現在900品目ほど特定保健用食品として認可されているが、実にその約40%の商品が機能性オリゴ糖に関連したものであり、いかに機能性オリゴ糖が注目されているかが分かる。しかしながら、これでも自然界に多種多様に存在し得るオリゴ糖のごく一部が利用されているに過ぎず、今後より多くの機能性オリゴ糖が食品素材として利用されることが期待される。

現在食品用途としての機能性オリゴ糖の製造方法としては、植物などの天然物中に存在するオリゴ糖成分を抽出、また酸や糖質加水分解酵素によって天然多糖を分解することにより獲得しているものが多い。これらの手法は安価な天然物を原料とできる反面、有効成分の構造が自然界に大量に存在しなければならず、オリゴ糖の多様性を拡大させることは非常に困難である。また糖質加水分解酵素の糖転移能を利用し安価な天然の糖質などから効率的にオリゴ糖を生産している例も幾つかあるが、高い糖転移能を有する糖質加水分解酵素の存在は残念ながら限定的である。これら問題を解決するために、本研究では糖質加リン酸分解酵素（ホスホリラーゼ）を用い、ヒトに有益な効能を示す新規希少オリゴ糖の製造法の開発を検討した。

## 結果・考察

### 新規ホスホリラーゼの探索

ホスホリラーゼは無機リン酸存在下でオリゴ糖の加リン酸分解反応を触媒し、糖 1 リン酸を生産する酵素として認知されているが、その反応の可逆性及び厳密な反応位置選択性からオリゴ糖生産の有用な生体触媒として現在注目されている<sup>1)</sup>。



しかしながら既知のホスホリラーゼはわずか 20 種しか報告されておらず、このことがホスホリラーゼを利用したオリゴ糖製造法の適用可能範囲を限定的なものにしている<sup>1)</sup>。したがって新規な反応特異性を有するホスホリラーゼの探索は、ホスホリラーゼによるオリゴ糖製造法の多様化や開発・発展に必要不可欠である。

そこで今回新規な反応特異性を有するホスホリラーゼの探索を目的とし、バチルス菌由来の機能未知なホスホリラーゼホモログの詳細な機能解析を行った。その結果、当該酵素はブドウ糖（グルコース）の 2 位にアミノ基を有するグルコサミンや N-アセチルグルコサミンなど 8 種の単糖類を糖受容体とし、 $\alpha$ -1,4-グルコ 2 糖を生産するマルトースホスホリラーゼであることが明らかになった<sup>2)</sup>。興味深いことに、既知のマルトースホスホリラーゼとは異なり、当該酵素はコウジビオースおよびソフォロースといった 1,2 結合を有するグルコ 2 糖を糖受容体として認識し、これまで報告例のない新規な分岐グルコ 3 糖（図 1）を生産する能力を持ち合わせていることが分かった<sup>2)</sup>。

### 天然糖質から機能性オリゴ糖への高収率変換

我々はこれまでに、無機リン酸存在下でブドウ糖（グルコース）2 分子が  $\alpha$ -1,3 結合した機能性オリゴ糖ニゲロースを特異的に加リン酸分解してグルコース 1 リン酸とグルコースを生産する真正細菌由来の新規ホスホリラーゼを発見している<sup>3)</sup>。さらに当該ホスホリラーゼは、グルコース 1 リン酸とグルコースをそれぞれ糖供与体と糖受容体として、オリゴ糖合成反応によりニゲロースを高収率生産することを明らかにしてきた<sup>3, 4)</sup>。そこで今回、当該新規酵素ニゲロースホスホリラーゼを用いたニゲロースの実用的生産技術開発に取り組んだ。

ニゲロースは清酒や麴汁中に微量に存在することが確認されており、非発酵性糖サケビオースとも呼ばれる。また、みりん・味噌・ビール・蜂蜜など我々が日常的に摂取する飲料や食品にも含まれており、芳醇なコク味を形成する重要なオリゴ糖として知られている。さらに、食品に添加することで、低塩化での旨味保持や高甘味度甘味料の異味改善などの味質改善、煮崩れ防止、アントシアニン系色素の退色抑制などの効果を発揮するという報告もある。加えて、口腔内のう蝕原因菌であるミュータンス菌による粘着性多糖の合成を阻害することで抗う蝕性を示し、リンパ球増殖促進物質であるマイトジェンを刺激増殖し、インターロイキン 12 やインターフェロン  $\gamma$  産生を増強するなどの免疫賦活作用を示すことも知られている。このような背景から、これまで有機合成法や糖質加水分解酵素を用いた糖転移反応法などによるニゲロースの大量生産が試みられているが、収量や純度など問題点が多く存在し、高純度のニゲロースを高収率で大量生産するに至っていない。今回上記の問題点を解決するべく、安価に入手可能な天然の糖質を高付加価値な機能性オリゴ糖ニゲロースに高収率変換する低コスト大

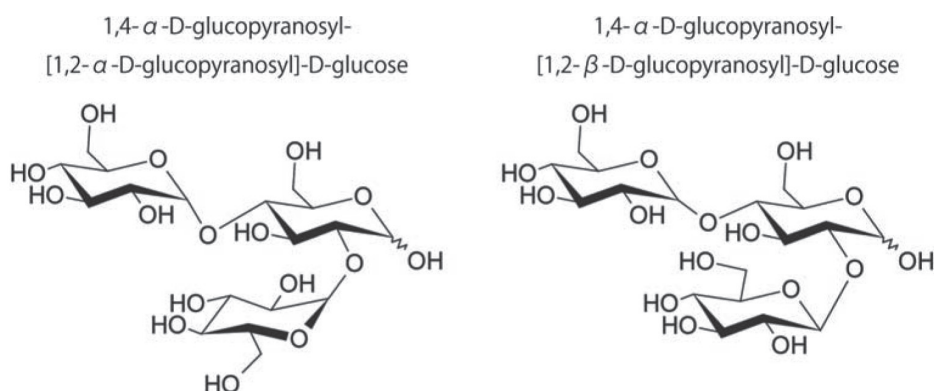


図 1 新規分岐グルゴ 3 糖

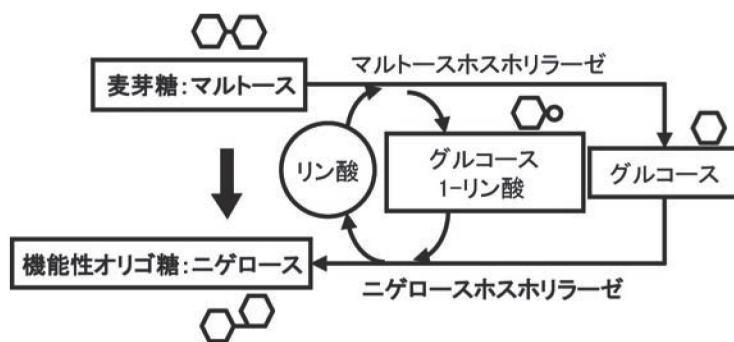


図2 機能性オリゴ糖製造のための One-pot 高収率変換技術

量生産技術を開発した。

まず当該ニゲロースホスホリラーゼが触媒するオリゴ糖合成反応によるニゲロースの調製法は高価なグルコース1リン酸を出発材料として使用するため、コスト面の問題からそのままでは産業的実用技術となり得ないと考え、グルコース1リン酸より安価に入手可能な麦芽糖(マルトース)から付加価値が高い機能性オリゴ糖ニゲロースを大量調製する低コスト大量生産系を確立した。すなわち、先に新規ホスホリラーゼの探索で報告したバチルス菌由来のマルトースホスホリラーゼにより、マルトースからグルコース1リン酸およびグルコースを生産する加リン酸分解反応系に、ニゲロースホスホリラーゼを添加することでマルトースから生成したグルコース1リン酸とグルコースを機能性オリゴ糖ニゲロースに再構築する One-Pot 高収率変換系(図2)を確立した。

上記のマルトースホスホリラーゼとニゲロースホスホリラーゼによる One-pot 高収率変換系は単なる一例にすぎず、基質特異性が異なるホスホリラーゼを組み合わせることで多種多様な有用オリゴ糖の生産に適応することができ、且反応系のスケールアップも容易なことから、工業レベルでの実用的なオリゴ糖大量製造技術となる。すなわち、本技術開発は食や生活に有益な機能性を有するオリゴ糖の高機能食品素材としての開発研究を促進するものであり、食品産業界に大きな貢献を果たすものと期待できる。

## 要約

現代の健康管理において最も基本的且つ重要な習慣の1つとして食生活が挙げられるが、食事量・食事時間・栄養バランスなどの改善に加え、ヒトの健康保持増進に有益な生理活性を示す機能性食品を摂取することで健康向上や疾患の改善・予防に繋げようとする動きがあり、

機能性食品に対する国民の関心も急速に高まっている。その中でも機能性オリゴ糖は、国民の多くに認識されている機能性食品素材の一つである。現在食品用途としての機能性オリゴ糖の製造方法としては、植物などの天然物中に存在するオリゴ糖成分を抽出、また酸や糖質加水分解酵素によって天然多糖を分解することにより獲得しているものが多い。これらの手法は安価な天然物を原料とできる反面、有効成分の構造が自然界に大量に存在しなければならず、オリゴ糖の多様性を拡大させることは非常に困難である。そこで今回上記の問題点を解決すべく、安価に入手可能な天然の糖質を高付加価値な機能性オリゴ糖に高収率変換する低コスト大量生産技術を開発した。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人三島海雲記念財団による研究助成を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

## 文献

- 1) Nakai H, Kitaoka M, Svensson B, Ohtsubo K. "Recent development of phosphorylases possessing large potential for oligosaccharide synthesis" *Current Opinion in Chemical Biology* (2013) 17, 301-309.
- 2) Nihira T., Saito Y., Kitaoka M., Ohtsubo K., Nakai H. "Identification of *Bacillus selenitireducens* MLS10 maltose phosphorylase possessing synthetic ability for branched  $\alpha$ -D-glucosyl trisaccharides" *Carbohydrate Research* (2012) 360, 25-30.
- 3) Nihira T., Nakai H., Chiku K., Kitaoka M. "Discovery of Nigerose Phosphorylase from *Clostridium phytofermentans*" *Applied Microbiology and Biotechnology* (2012) 93, 1513-1522.
- 4) 仁平高則, 中井博之, 北岡本 "ニゲロースホスホリラーゼ" 特開2012-254061