

# 微生物酵素の糖転移作用による有用糖質の開発

大阪市立工業研究所 北畑 寿美雄

## 1. はじめに

近年、微生物起源の新規な加水分解酵素、糖転移酵素の検索や、さらにはそれら酵素の作用機作の解明研究が活発に行われてきた。その結果、特定の位置の水酸基に特定の結合様式で糖転移作用を触媒する新しい糖転移酵素が見いだされ、また、加水分解酵素も反応条件を変えることにより、糖転移作用をも触媒することがわかり、これら微生物酵素の糖転移作用を利用した各種オリゴ糖の合成研究が活発に行われてきている。本講では、微生物酵素のうち  $\beta$ -フラクトフラノシダーゼおよび  $\beta$ -ガラクトシダーゼの糖転移反応を利用した各種機能性糖質の合成およびその性質について、概説する。

## 2. $\beta$ -フラクトフラノシダーゼによる合成

$\beta$ -フラクトフラノシダーゼは蔗糖をグルコースとフラクトースに加水分解する酵素である。しかし、高濃度の蔗糖溶液に本酵素を作用させると糖転移反応を触媒するようになる。たとえば、*Aspergillus niger*、*Penicillium* などカビ起源の酵素は蔗糖濃度 1% 以下では加水分解反応のみを触媒するが、蔗糖濃度が増すにつれ糖転移反応をも触媒し、50% 濃度になるとほぼ糖転移反応のみがおこる。すなわち、蔗糖を分解してそのフラクトシル基を蔗糖のフラクトシル残基に  $\beta$ -2,1 結合で転移しフラクトオリゴ糖 (1-ケストース、ニストース) を合成する。

最近、演者らが見いだした *Arthrobacter* sp. K-1 株の生産する  $\beta$ -フラクトフラノシダーゼはカビの酵素とは異なり、蔗糖単独に作用させた場合には、たとえ高濃度溶液でもあまり糖転移作用を触媒しない。50% 溶液で転移率は 20% と低い。しかし、乳糖やキシロースなどの受容体存在下、蔗糖に作用させると高い転移率を示し、しかも蔗糖分子には転移せず優先的に受容体分子の乳糖やキシロース分子に転移する。また、本酵素は非常に幅広い受容体特異性を有しており、D-ガラクトース、L-ソルボース、D-, L-フコース、D-, L-アラビノース、マルトース、セロビオース、イソマルトース、メリビオース、ラフィノース、メチル-グルコシド、ステビオシド、リボフラビンなどの単糖類、オリゴ糖や配糖体に転移する。また、キシリトールのような糖アルコールやエチルアルコールのような炭素数 10 までの一級の水酸基をもつアルコールにも転移する。すなわち、本酵素はヘテロフラクトオリゴ糖を合成するのに適した酵素である。

### 2.1. ラクトシュクロースの合成とその性質

*Arthrobacter* sp. K-1 株の生産する酵素を蔗糖と乳糖との混合液に作用させると、本酵素は蔗糖を分解し、そのフラクトシル基を乳糖の還元性末端の C1 位水酸基に優先的に転移し非還元性のガラクトシルシュクロース (ラクトシュクロース) を効率よく合成する。本物質は生体内の消化酵素、

胃液によってほとんど分解されない低カロリーの糖質である。したがって、経口摂取しても血糖値やインシュリン値はほとんど変化しない。また、ラクトシュクロースは大腸内のビフィズス菌を優先的に増加させ、腸内菌相を改善する、いわゆるビフィズス因子甘味料である。ラクトシュクロースを毎日 5g ずつ摂取した場合、摂取前に 10.5% であったビフィズス菌占有率が、摂取 1 週間目で 32.6% に増加し、摂取を中断すると 1 週間後には元に戻る。本物質は他のビフィズス因子甘味料のフラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、分岐オリゴ糖に比べて蔗糖に良く似た甘味を呈し、また特に高いビフィズス菌増殖効果を有している。現在、本物質は乳果オリゴ糖という商品名で市販されている。

## 2.2. フラクトシル-ステビオシドの合成とその味質

Arthrobacter sp. K-1 株または Microbacterium 起源の生産する酵素はステビオシド存在下蔗糖に作用させると、蔗糖を分解しそのフラクトシル基をステビオシドの 19 位カルボキシル基にエステル結合しているグルコシル基に選択的に  $\beta$ -2,6 結合で転移させ、フラクトシル-ステビオシドを合成する。その甘味質(苦味、残味、まろやかさ)は、もとのステビオシドより大幅に改善され、現在実用化されているグルコシル-ステビオシド、さらには天然のステビオール配糖体の中では最も甘味質が良いとされているレバウディオシド A よりも優れており、高甘味度甘味料の中で最も甘味質の良いアスパラテームに匹敵している。本物質は現在実用化にむけて用途を開発中である。

## 3. $\beta$ -ガラクトシダーゼによる合成

$\beta$ -ガラクトシダーゼは乳糖を加水分解する酵素であるが、Asp. niger、Bacillus circulans、Asp. oryzae、Penicillium などの菌株の生産する酵素は高濃度の乳糖溶液に作用させると、糖転移反応を触媒しガラクトオリゴ糖を合成する。酵素の起源により生成物の構造、受容体特異性が異なる。ガラクトオリゴ糖は先に記したフラクトオリゴ糖や乳果オリゴ糖と同じくビフィズス因子甘味料として現在利用されている。

### 3.1. 血中アミラーゼ活性測定用基質の合成

臨床検査において、アミラーゼ活性の測定は膵疾患、唾液腺疾患、腹部疾患などの診断に重要な指標となる。近年、構造が明確なオリゴ糖の還元性末端を発色団で修飾した配糖体を基質に用いて、 $\alpha$ -グルコシダーゼなどの共役酵素の作用により遊離してくる発色団を定量することにより、アミラーゼの活性を測定する試薬が開発されている(たとえば、2-クロロ-4-ニトロフェニル-マルトペンタオシド、G5-CNP など)。しかし、この方法は試薬の安定性に問題がある(基質が共役酵素の  $\alpha$ -グルコシダーゼにより徐々に分解される)。そのため、化学合成的に非還元性末端を修飾した基質(たとえば 3-ケトブチリデン-G5-CNP、KB-G5-CNP)が使用されているが、血中アミラーゼによる分解性が悪くなるという欠点がある。演者らは、これを解決するため酵素的に基質の非還元性末端を修飾する方法を検討した。

*B. circulans* の  $\beta$ -ガラクトシダーゼを乳糖と G5-CNP の混合液に作用させると、反応初期には G5-CNP の非還元性末端のグルコシル基の C4 位水酸基に優先的にガラクトシル基が結合したガラクトシル-G5-CNP (Gal-4-G5-CNP) が合成された。反応が進むにつれ、それが分解され、ついで C6 位水酸基にガラクトシル基が結合した Gal-6-G5-CNP が主転移生成物として得られた。両糖質の血中アミラーゼによる分解性を、化学修飾した基質 KB-G5-CNP と比較した。その結果、Gal-6-G5-CNP のアミラーゼによる分解性は KB-G5-CNP よりも大幅に減少するが、逆に Gal-4-G5-CNP の分解性は大幅に上昇することが分かった。さらに共役酵素の  $\alpha$ -グルコシダーゼにより全く分解されず安定である。さらに共役酵素にグルコアミラーゼの使用が可能になり、測定感度が上昇する。今後、Gal-4-G5-CNP は KB-G5-CNP に代わってアミラーゼ活性測定用基質として使われるものと思われる。

### 3.2. ガラクトシル-分岐シクロデキストリンの合成

現在までに酵素法で合成されている CD および CD 誘導体は、いずれもグルコースのみより構成されているホモオリゴ糖である。演者らは、CD の新しい用途を開発する目的で CD にグルコース以外の糖質を結合させて、包接作用以外の機能を持たせた CD 誘導体を合成することを試みた。

近年、製薬業界では、薬剤の副作用を軽減するため糖質の細胞認識性に着目して、糖質をドラッグ・デリバリー・システム (DDS) の薬剤運搬体の標識細胞へのセンサーとして利用しようとする研究が活発に行われている。また、ガラクトースは生体内の肝臓組織に強い親和性を示すことが知られている。そこで CD の包接作用とガラクトースのこの特質を利用して、DDS のキャリアーとして利用することを目的に、分岐 CD にガラクトシル基を転移結合させたヘテロ分岐 CD の合成を検討した。その結果、*B. circulans* の  $\beta$ -ガラクトシダーゼを高濃度の乳糖と分岐 CD の混合液に作用させると、分岐 CD の側鎖のグルコシル基の 4 位水酸基にガラクトシル基が転移したガラクトシル-分岐 CD が合成されることが分かった。現在、その性質について検討中である。