

微生物由来新規ホスホリラーゼによる機能性糖質の実用的製造技術の開発

中井 博之
(新潟大学大学院 自然科学研究科)

研究の目的

我が国においては高齢化社会への突入に伴い、国民の健康管理の重要性が年々増大している。健康管理の最も基本的な事柄の一つとして食生活が挙げられるが、近年ヒトの健康保持増進に有益な効果を示す機能性食品を摂取することで、健康向上、疾患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が急速に高まっている。その中で、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の一つである。しかし、数多くある機能性オリゴ糖の内、工業生産に至っているものは数少なく、オリゴ糖の持つ有益な機能性を国民に還元しきれていないのが現状である。申請者は、それら機能性オリゴ糖の有効な製造手段として糖質加リン酸分解酵素（ホスホリラーゼ）に注目している。ホスホリラーゼは認識するオリゴ糖の種類や結合様式が厳密であり、容易に逆反応が進行することから、効率的なオリゴ糖生産のための生体触媒として評価が高い。しかし発見されている酵素が少なく、産業レベルでの実用化を限定的にしている。今後、製造可能な機能性オリゴ糖のバリエーションを拡大する上で、新たなホスホリラーゼの発見は必須である。そこで今回、ゲノムプロジェクトなどで明らかにされている多種多様な微生物ゲノム情報を活用することにより、新規な反応特異性を有するホスホリラーゼを探索し、得られた有用酵素を用いて機能性オリゴ糖の製造を行った。

方法

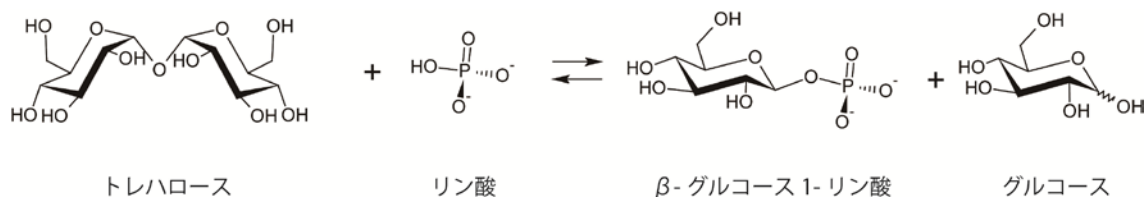
好塩性の嫌気性細菌 *Bacillus selenitireducens* のゲノム上にコードされるホスホリラーゼホモログ遺伝子をクローニングし、大腸菌による組換え酵素の異種宿主発現系を確立した。His-tag 融合タンパク質として調製した組換え酵素をニッケルキレートアフィニティークロマトグラフィーにて電気泳動的に単一に精製し、酵素化学的諸性質の解析を行った。加リン酸分解反応時の基質特異性の調査には、 α -グルコ二糖を用いた。オリゴ糖合成反応時の糖受容体特異性は、糖供与体として β -グルコース-1-リン酸の存在下で様々な単糖、二糖、アルコール、ポリオールを用いて、生成物を NMR にて同定することで調査した。

結果

既知のホスホリラーゼのアミノ酸配列を基に、好塩性の嫌気性細菌 *Bacillus selenitireducens* のゲノム上に機能性未知の 2 種のホスホリラーゼホモログ (Bsel_1207 および Bsel_2816) をコードする遺伝子の存在を確認した。当該ホスホリラーゼホモログは glycoside hydrolase family 65 に属するトレハロースホスホリラーゼおよびコージビオースホスホリラーゼとアミノ酸配列上相同性を示した。

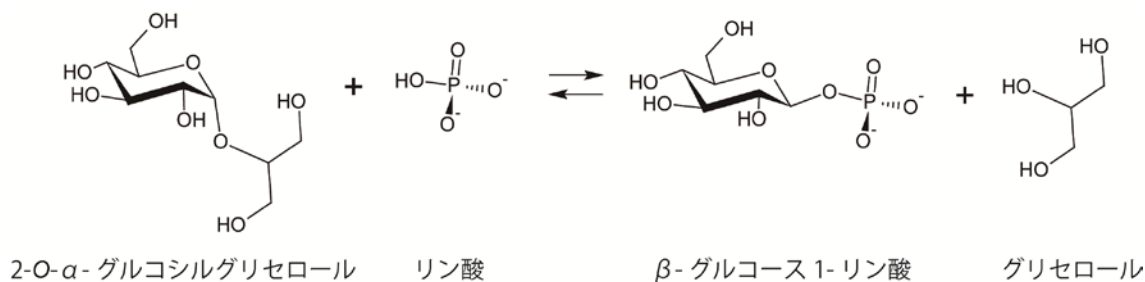
1. カリウムイオン要求性アノマー反転型トレハロースホスホリラーゼ (Bsel_1207)

大腸菌を宿主とした異種発現により、200 mL の培養菌体から 19 mg の Bsel_1207 を調製した。得られた Bsel_1207 はリン酸存在下でトレハロースに対して高い分解活性を示し、その生成物は β -グルコース 1-リン酸とグルコースであった。またオリゴ糖合成反応により、トレハロースの生成が認められた。さらにカリウムイオン濃度に依存して上記の反応を触媒する効率が向上することを見出し、Bsel_1207 がこれまでに報告例のないカリウムイオン要求性のアノマー反転型トレハロースホスホリラーゼであることを明らかにした¹⁾。



2. 2-O- α -グルコシルグリセロールホスホリラーゼ (Bsel_2816)

大腸菌を宿主とした異種発現により、200 mL の培養菌体から 14 mg の Bsel_2816 を調製した。得られた Bsel_2816 は glycoside hydrolase family 65 に属するホスホリラーゼの典型的な基質である α -グルコ二糖に対して有意な加リン酸分解活性を示さず、グリセロールを糖受容体とした際 2-O- α -グルコシルグリセロールを特異的に合成する新規酵素 2-O- α -グルコシルグリセロールホスホリラーゼであることを明らかにした²⁾。



結論

本研究により、好塩性の嫌気性細菌 *Bacillus selenitireducens* が 2 種の新規アノマー反転型ホスホリラーゼ、カリウムイオン要求性のトレハロースホスホリラーゼおよび 2-O- α -グルコシルグリセロールホスホリラーゼを生産することを明らかにした。2-O- α -グルコシルグリセロールは、日本の伝統食品である清酒や味噌、味醂に含まれる機能的オリゴ糖であり、がん細胞増殖抑制作用、抗アレルギー作用、血管内皮細胞増殖促進因子産生促進作用、血糖値上昇抑制作用、抗菌作用、細胞賦活作用、真皮マトリックス産生促進作用、中性脂肪蓄積抑制作用、メラニン産生抑制作用、皮膚刺激低減作用が報告されており、食品・化粧品・医薬品素材としての利用が期待されている。トレハロースに関しては、さっぱりとした上品な甘味を呈し、優位な水和力により乾燥や凍結からも

食品を守ることで食感を保ち、矯味矯臭効果により苦味や渋味、えぐ味、生臭み、けもの臭、レトルト臭などを抑えるなど多様な作用による複合的効果を示すことから、炭水化物、蛋白質、脂質に対して品質保持効果を発揮するオリゴ糖として、和・洋菓子、パン、惣菜、水産加工品、畜産加工品、レトルト食品、冷凍食品、飲料など様々な食品や保湿成分として各種の基礎化粧品や入浴剤、育毛剤にも使用されている。本研究で見出した新規酵素は、このような有用オリゴ糖の選択的な製造を可能とする生体触媒と言える。

文献

- 1) Nihira T., Saito Y., Chiku K., Kitaoka M., Ohtsubo K., Nakai H. (2013) Potassium ion-dependent trehalose phosphorylase from halophilic *Bacillus selenitireducens* MLS10. *FEBS Lett.* (2013) 587, 3382–3386.
- 2) Nihira T., Saito Y., Ohtsubo K., Nakai H., Kitaoka M. (2013) 2-O- α -D-glucosylglycerol phosphorylase from *Bacillus selenitireducens* MLS10 possessing hydrolytic activity on β -D-glucose 1-phosphate. *PLOS ONE* (2013) accepted.