

ショ糖を原料としたイソマルトオリゴ糖の1ステップ生産技術の開発

木村 淳夫 [北海道大学/教授]

菊池 裕人 [日本甜菜製糖株式会社/主任研究員]

背景・目的

研究開発の背景及び目的

背景：イソマルトオリゴ糖(IMO と略)は、2~9残基のグルコースが α -1,6結合で連なった糖質である。DP=4~7(DP：構成単糖の数)の市販が中止され、糖質科学者への影響は甚大である。また、IMO は産業動物に対し羅病防止・発育促進などの作用がある。IMO の安価で効率の良い製造方法が求められている。

目的：我々は、最近に『転移を繰り返すことで長鎖 IMO を合成する新規酵素(I6GT と略)』を発見し、遺伝子単離と発現・X線構造解析を行った。極最近に、1)ショ糖を基質にする変異に成功し、2)長鎖 IMO の生産機能を強化できた。本申請の目的は、ショ糖から IMO を効率良く製造する方法の開発である。

内容・方法

内容：新規な転移酵素に「ショ糖→IMO」の1ステップ転換機能を変異付与できたことが、独創的かつ革新的な点であり、安価なショ糖からの高効率な IMO 生産が初めて可能になった(この点も画期的である)。そこで最初に酵素反応の最適化を行う。さらに工業化を意識した生産のために『ショ糖→長鎖 IMO』と『ショ糖+短鎖 IMO→長鎖 IMO』の2工程を検討する。長鎖 IMO の精製工程も大切であり、得られた IMO 混合物(グラム・オーダー)を分画し、各種重合度の精製オリゴ糖を数百 mg 取得する試験を行う。

方法：次の3つの工程を試験する。(1) 酵素反応の最適化：I6GT 変異酵素を大量調製し、反応条件の最適化。その際に受容体基質の特異性を調べ、効率の良い製造条件を決定する。(2) 工業化を意識した生産：(1)項で適正化した最適条件を用いてグラム・オーダー生産を行う。本オリゴ糖の末端にはショ糖構造があるため、フラクトース残基を分解削除し長鎖 IMO を取得する。(3) 長鎖 IMO の分画：得られた IMO 混合物から個別精製をゲル濾過法などで試す。

結果・成果

結果：以下の結果が得られた。

- 1) 酵素反応の最適化： 1) I6GT 変異酵素の大量調製：「ショ糖→IMO」を行う I6GT 変異酵素(MT-I6GT と略)を His タグ体として大腸菌の発現系で大量に生産した。His タグ体であるので、Ni-クロマト担体を用いた1ステップ法で MT-I6GT を精製した。
- 2) 反応条件の最適化：精製した MT-I6GT を用い

て温度・pH に対する安定性や至適 pH を明らかにした。比較的高い基質濃度が使用でき、その際の酵素濃度・反応時間の影響を調べ、最適条件を決定した。

3) 受容体基質：MT-I6GT が示す糖転移は「2基質反応」であるため、次に述べる2つの基質条件が想定できる。すなわち、i)ショ糖分子を供与体基質・受容体基質にする場合と ii)ショ糖分子を供与体基質にし短鎖 IMO を受容体基質にする場合である。ii)を調べた結果、MT-I6GT は受容体基質に IMO を好むことが判明した。本性質は親酵素と同様であったので、受容体サイトの特異性は変異より大きく変化していないと想定された。また、短鎖 IMO を受容体基質に用いることでより長鎖の IMO が得られた。

(2) 工業化を意識した生産： 4) グラム・オーダー生産：2)項および3)項で得られた適正化した最適条件で IMO を合計で約1グラム酵素生産した。構造を確認し、 α -1,6グルコシド結合を主鎖としていることが確かめられた。また、末端にショ糖構造があるオリゴ糖の生成も認められた。 5) ショ糖構造の分解による IMO 転換： α -1,6グルコシド結合は酸処理や加熱処理に安定であることが知られている。一方、ショ糖構造は酸・熱に対して不安定なため、4)項で得られた末端にショ糖構造があるオリゴ糖に対して、熱や酸処理を行った。その結果、 α -1,6グルコシド結合のみで構成されたオリゴ糖を(すなわち、IMO を)取得することに成功した。

(3) 長鎖 IMO の分画： 6) IMO の個別精製：Bio-Gel P4によるゲル濾過法よりも、アミドカラムによる HPLC で分離が可能であることが認められた。大量精製を行い、各種重合度のオリゴ糖の数百 mg 分離に成功した。その後に凍結乾燥を行った。

成果： 7) 学術的な公開：MT-I6GT の性質も含め、口頭報告や学術論文での結果公開を行う予定である。

8) 製品としての公開：IMO の製造や販売に対して既に関心を表明した本州メーカーがある。

今後の展望

1) 研究用試薬：IMO の4糖以上は、国内外で市販されていないため、試薬として製品化できる。 2) 医薬品原料：最近に IMO の DP=4 の硫酸誘導体に、腫瘍成長阻止の報告があり、医薬品原料となる。他の DP の IMO 硫酸誘導体にも阻止機能が見出されれば、さらに有望な医薬品原料として製品化できる。 3) 飼料：既に述べたが、ブロイラー用若鶏や養殖エビの飼料に混合し、成長促進・健康化を目的とした製品化も考えられる。この場合は、混合物で充分と予想され、酵素反応液を濃縮するだけで供給できる(さらに製造コストが低くなる)。