

# 機能性素材イヌリン分子種の多様化と高効率精密酵素合成法の開発

森 春 英 [北海道大学大学院農学研究院/教授]  
佐分利 巨 [北海道大学大学院農学研究院/准教授]  
城 戸 悠 輔 [日本甜菜製糖株式会社/研究所研究員]

## 背景・目的

本研究では、ショ糖の新規高度利用によるショ糖の付加価値向上を目指す一環として、ショ糖を出発材料として様々な機能が知られるイヌリンの多彩な分子種を精密に高効率で合成することを目的として行った。イヌリンは、フルクトース(Fru)が $\beta(2\rightarrow1)$ 結合したオリゴ糖・多糖である。食素材として、プレバイオティクス活性、食感改善効果はじめ多彩な機能を有す。機能性糖質(DFA-III等)製造の出発材料でもある。

イヌリンは、植物チコリ根部からの抽出やショ糖を出発物質とした酵素法合成により調製されるが、供給の安定性やイヌリン鎖長分布の限定などの問題がある。

申請者らは、単離菌より新規イヌリン合成酵素(イヌロスクラーゼ)NdISを見出した(Kidoら, 2023)。本酵素NdISは高い長鎖イヌリン合成能を有す。本申請研究では、NdISの解析と利用を、修飾酵素の探索・同定とあわせて行った。

## 内容・方法

NdISは組換え酵素を用いた。NdISは、ショ糖を基質として鎖長42程度までのイヌリンを合成する(Kodoら, 2023)。合成イヌリンの鎖長はショ糖濃度に明確な依存性を示さない。したがって、NdISはイヌリン合成反応(フルクトシル転移反応)において、フルクトシル基(Fru)供与体と糖受容体を比較的明確に区別していることが予想された。そこで、単一基質としてショ糖、オリゴ糖、および2基質としてショ糖とオリゴ糖を含む反応を行い、初期反応における生成物の解析、速度(加水分解、転移、その合計)を求めた。生成物の解析には、主にTLC、HPAEC-PADを用い、速度の解析には主にショ糖より生成するGlc、Fruを定量した。

修飾酵素については遺伝子のクローニングを行い、組換え酵素を調製した。生成物分析はNdISと同様に行った。

## 結果・成果

### 1. NdISの糖供与体・糖受容体の特異性解析:

単一基質(ショ糖、オリゴ糖)の解析により、ショ糖、オリゴ糖は単一基質でも糖転移反応が進行し、したがって糖供与体、糖受容体の両者になることが確認された。速度論的な解析により、反応は一般的な、加水分解・糖転移の反応に従うことが確認された。2基質(ショ糖+オリゴ糖)の反応では、初期反応生成物の解析により、ショ糖を供

与体、オリゴ糖を受容体とするFru転移が主反応であること、ならびに反応速度が単一基質と比べて顕著に高いことが確認された。いずれでも転移速度は速度合計の90-98%程度を占めるが、ショ糖加水分解の速度も残存した。従って、NdISは、ショ糖を糖受容体とし、Fru-酵素中間体を経て、オリゴ糖を主要な受容体としてFruを転移する。水やショ糖は受容体特異性は低いながらもFru転移受容体となることが分かった。これらの速度比率に基づき、受容体特異性の比が得られた。各糖質の受容体特異性定数(比)は、ショ糖を1としたとき、60-243倍にも達した。

### 2. NdISのオリゴ糖/多糖生産への応用

#### (1) 精製イヌリン鎖長の制御

NdISの供与体特異性、受容体特異性を活用して、出発材料として両基質(ショ糖、オリゴ糖)の濃度比を変えることにより生成イヌリンの鎖長を制御できることを見出した。ショ糖、オリゴ糖がそれぞれ供与体、受容体になるとして求めた鎖長計算値とほぼ同程度の平均鎖長の生成物の生成物が得られた(3糖1-kestose利用で平均鎖長6.4、9.2、15.3、4糖nystose利用で同鎖長+1程度)。

#### (2) 単糖への転移産物

NdISは受容体特異性(比)として、ショ糖特異性1と比べ、単糖は数十倍高い。従って、単糖を受容体としてFru転移生成物が容易に合成できることが明らかとなった。

### 3. 修飾酵素の解析と利用

修飾酵素も単一基質としてショ糖に作用するが、転移伸長は僅かであり、長鎖生成物は全く生成しない。イヌリンにも作用は認められない。しかし、ショ糖存在下ではショ糖からイヌリンへの転移活性を示し、HPAEC-PADにおいて一連の直鎖 $\beta2-1$ 結合のイヌリンとは異なる生成物を生じる。また生成物はエキソ型イヌリン分解酵素に対して耐性を示し、イヌリンが分解される一方で、分解されずに残存した。これらの修飾イヌリンは、NdISと組み合わせることにより、ショ糖を単一出発物質として合成できることが実証された。

## 今後の展望

本研究成果である簡便な鎖長制御法により、既存の3糖、4糖よりも重合度の高い特定鎖長領域のイヌリン分子種を高効率で合成できるようになった。この鎖長域に特有の機能性の開拓が期待される。

新規糖質として修飾イヌリン、および単糖のフラクトシル化二糖の簡便な合成法が見出された。これらの利用法開発が期待される。特にショ糖アナログは高エネルギー化合物である可能性が高く、ショ糖代替として、更には各種オリゴ糖やグリコシド配糖体の酵素合成においては高収率を与える潜在的糖供与体としての利用の可能性もある。