

希少糖生産の新たな展開

森本 兼司

我々の研究室では、天然に微量にしか存在しない単糖およびその誘導糖を「希少糖」と定義し、天然に多く存在する単糖、D-グルコース・D-フラクトースなどから微生物反応、あるいは微生物が産出する酵素を利用して希少糖を生産する技術を確立してきた。希少糖は量こそ微量ではあるが、その種類は多く、核となる単糖だけでも50種以上にも及ぶ。近年注目を浴びているキシリトールもその範疇に入る。我々は、希少糖に関する研究を長年積み重ね、それらのうち炭素数4、5、6で修飾基のない単糖の体系化に成功し、自然界に大量に存在する天然型単糖を希少糖に変換する新規酵素の発見から、上記の単糖（アルドース、ケトースおよび糖アルコール）の生産戦略Izumoringを構築した（図1）¹⁾。なお図1は炭素数6のヘキソースを示している。それを設計図として、各種の希少糖の大量生産技術の開発が進んでいる。特にヘキソースはすべての生産が進んでおり、それらのうち、一部は、食品、医薬品、植物の分野においてさまざまな生理活性機能があることが明らかになってきている。（詳細は本特集の他の記事を参照されたい。）本稿では希少糖生産における基幹酵素D-タガトース3-エピメラーゼ（DTE）のX線構造解析の結果、また同酵素を利用した新規希少糖生産の展開について解説する。

基幹酵素DTE

全希少ヘキソースの生産が可能になったのは、基幹酵素 *Pseudomonas cichorii* ST-24株由来のDTEの発見とその基質特異性の低さ（広さ）に負うところが大きい^{2,3)}。この酵素は名称が示すようにD-タガトースに対して最も高い親和性を示し、D-ソルボースに変換する。平衡はD-タガトース：D-ソルボース=3：7であり、また幸いにして本酵素はD-フラクトース：D-プシコース間、L-タガトース：L-ソルボース間、L-フラクトース：L-プシコース間にも作用することがわかった³⁾。本酵素と化学的水素添加、酢酸菌による微生物還元によって安価なD-フラクトースからすべてのケトヘキソース、ヘキシトールの生産が可能となった。そしてケトヘキソースから各種イソメラーゼによってすべてのアルドヘキースの生産が可能となった¹⁾。

最近、我々はDTEのX線結晶構造解析に成功し、その

反応機構と基質特異性の低さを明らかにした⁴⁾。DTE、およびD-タガトース、またはD-フルクトースとの酵素-基質複合体の結晶構造をそれぞれ1.79、2.28、2.06 Å分解能にて決定した。DTEは11の α -ヘリックスと8つの β -ストランドからなり、サブユニットは $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造を取り、その活性部位には Mn^{2+} イオン（図2青丸）が見られ、DTEは安定した二量体を形成していることを明らかにした。図2にD-タガトースおよびD-フルクトースをそれぞれ基質としてソーキングした構造を示した。D-タガトース、D-フラクトースともにO2、O3は適切な共通のアミノ酸とそれぞれ水素結合しホールドされている（図2破線）。O1はD-タガトースの場合、D-フラクトースの場合とは異なるアミノ酸と水素結合している。一方で、O4、O5、O6とDTEの間には水素結合がなく、Phe7、Trp15、Trp113、Phe248によって疎水的なポケットが形成され、その結果C4位、C5位、C6位が非常に自由度の高い構造を取り得ることがわかった。すなわちDTEの基質となりうる単糖は、図3に示したようにC4位、C5位、C6位は水素基、水酸基の向きは関係なくC1位が CH_2OH 基、C2位がケト基、C3位が水素基および水酸基から構成されていることが重要であるということが推測された。DTEの反応機構は、基質のC3-O3が2つのグルタミン酸（Glu152およびGlu246）のカルボニル基の間に位置し、C3位での脱プロトン化/プロトン化機構であることが示された⁴⁾。

またDTEの五炭糖に対する基質特異性を検討した結果、DTEはD-キシロース：D-リブロース間、およびL-キシロース：L-リブロース間も触媒することが明らかとなった³⁾。このことも含めて考察するとDTEはC6位の存在に関係なく触媒が可能でありC1位、C2位、C3位のホールドが活性に重要であることがわかった。

希少糖誘導体に対するDTEの反応性

DTEは、非常に幅広い基質特異性を有していることからさまざまな希少糖誘導体に作用するかどうか検討した。

4-C-メチル化糖のエピ化 天然には存在しない有機合成法で得られたC4位がメチル化された五炭糖である、4-C-メチル-D-リブロース：4-C-メチル-D-キシロース

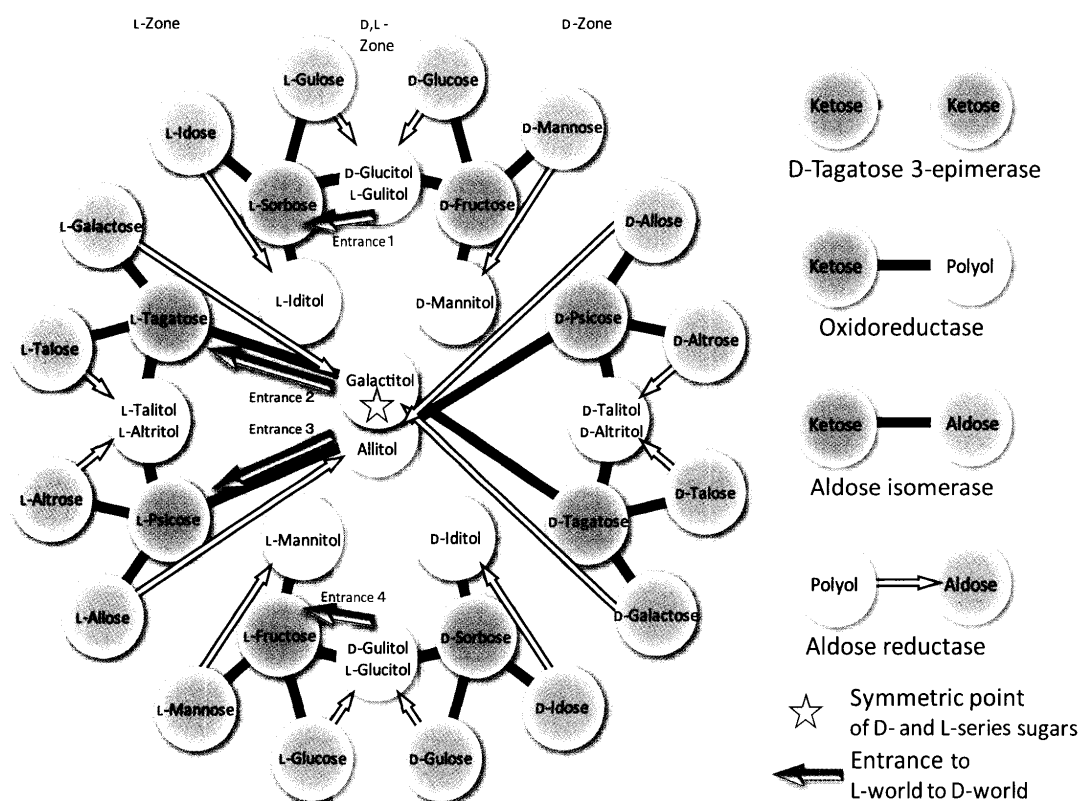
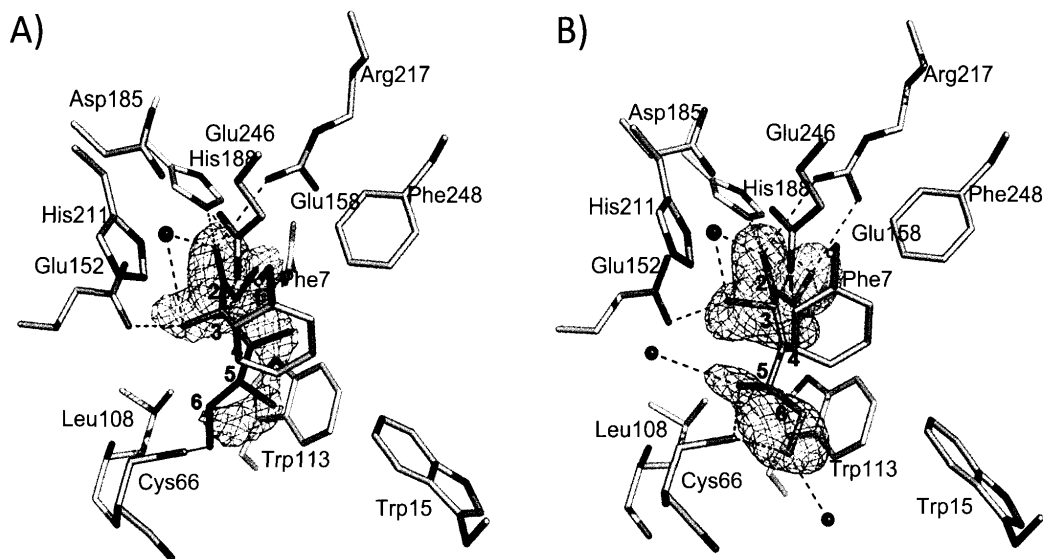


図1. 希少糖生産戦略地図 イズモリング

図2. DTE-基質複合体モデル. A) D-タガトース, B) D-フラクトース. 赤丸, 水分子; 青丸, Mn^{2+} イオン.

間, および4-C-メチル-L-リブロース:4-C-メチル-L-キシロース間においてDTEが反応することが確認され(図4), それぞれの平衡比は, D体, L体ともに4-C-メチル-L-リブロース:4-C-メチル-キシロース間はおおよそ30:70であった⁵⁾. この平衡比は未修飾のペントースのものと一致していることから, C4位がメチル基に置換さ

れているものでもDTEは影響されことなく触媒することが可能であることがわかった.

6-デオキシ-ケトヘキソースのエピ化 6位がデオキシ化されたヘキソースのうち最も天然に豊富に存在するL-ラムノースからL-ラムノースイソメラーゼによりL-ラムニュロースを, さらにこれを基質にDTEを作用させ

特 集

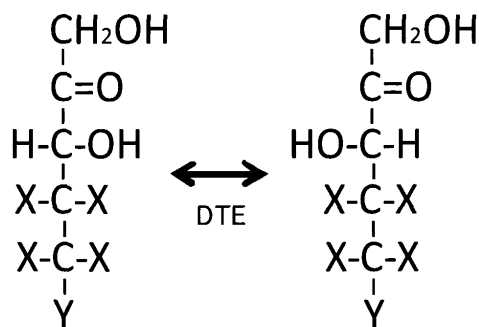


図3. DTEの基質認識モデル. X, HもしくはOH; Y, HもしくはCH₂OH.

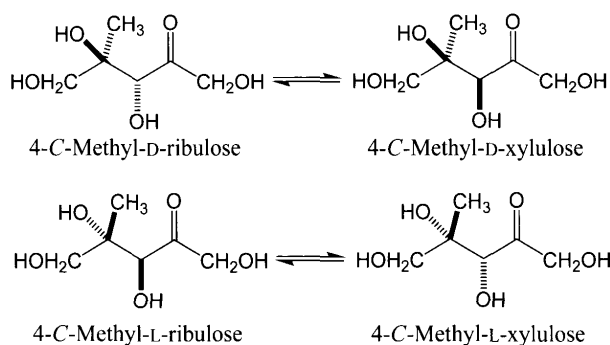


図4. 4-C-メチル化糖のエピ化

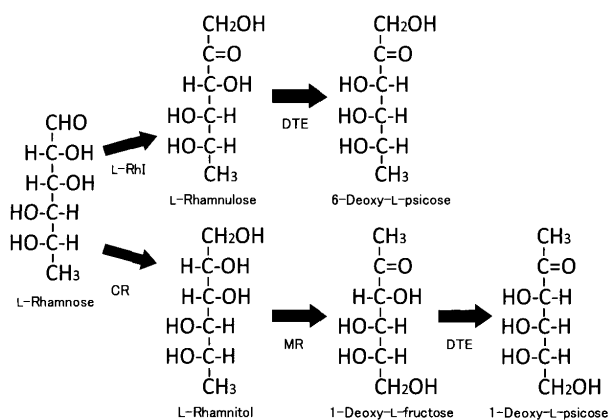


図5. 1-デオキシ-L-プシコース, 6-デオキシ-L-プシコースの合成. L-RhI, L-ラムノースイソメラーゼ; CR, chemical reduction; DTE, D-タガトース3-エピメラーゼ; MR, microbial reduction.

ることにより 6-デオキシ-L-プシコースを得ることに成功した⁶⁾。その平衡比はL-ラムニョース:6-デオキシ-L-プシコースが80:20でありL-フラクトース:L-プシコース間のそれと一致していた(図5)。またL-ラムノースに続いて多く存在するL-フコースからもD-アラビノースイソメラーゼにより6-デオキシ-L-タガトースを経てDTEにより6-デオキシ-L-ソルボースを得ることに成功した⁷⁾。以上のことから他の6-デオキシ-ケトヘキソースへの応用も可能であると考えられる。

1-デオキシ-ケトヘキソースのエピ化 L-ラムノースを水素添加法により化学的に還元してL-ラムニョールを得て、さらに*Enterobacter aerogenes* IK7株により微生物酸化によって1-デオキシ-L-フラクトースを得ることに成功し、さらにDTEを作用させることによって1-デオキシ-L-プシコースを得ることに成功した(図5)⁸⁾。このことはDTEの結晶構造解析の結果からは予想できなかった結果であり、DTEは、1位がメチル基であっても認識、触媒が可能であることに我々は非常に驚いた。先に述べたようにDTEはD-フラクトースとD-タガトースの場合とでは、基質のO1とDTEとの水素結合の形態が違っていることから、O1の構造は必須でなく、C2位とC3位の構造が非常に重要であることが考えられた。

今後の展開

希少糖生産における基幹酵素DTEはケトヘキソースのC3位をエピ化する酵素として見いだされたが、さまざまなケトースにも反応することがこれまでの研究で明らかになってきた。C6位がメチル化されたケトースやC4位にメチル基が修飾されているケトースにも作用することから、先に述べたようにDTEの活性中心内の疎水性ポケットに基質が影響することなく入り込むことが可能な構造であればどのような基質でも反応することができると推測している。このことは、DTEによってさまざまなケトースのC3位のエピ化がほぼ自由にできることを意味する。4-C-メチル化糖のように有機合成した単糖を酵素的にエピ化すること、すなわち有機化学的手法と酵素化学的手法との融合によって次々と新規の単糖を産み出すことができ、それらがどのような生理活性作用を有しているかを明らかにすることによって、今後新たな糖生命科学(ライフサイエンス)の創出が期待される。

上記研究は、オックスフォード大学のジョージ・フリート教授との共同研究、および文部科学省「知的クラスター創成事業」、農林水産省生物系特定産業技術研究支援センター「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」のサポートにより実施された。

文 献

- 1) Izumori, K.: *J. Biotechnology*, **124**, 717 (2006).
- 2) Khan, R. A. *et al.*: *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 149 (1992).
- 3) Itoh, H. *et al.*: *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 184 (1995).
- 4) Yoshida, H. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **374**, 443 (2007).
- 5) Rao, D. *et al.*: *Tetrahedron Letters*, **49**, 3316 (2008).
- 6) 志字孝之ら: 日本生物工学会大会講演要旨集, p.108 (2007).
- 7) Yoshihara, A. *et al.*: *Educational research exchange joint symposium (EDUREJS)*, p.59 (2007).
- 8) Kiran, G. *et al.*: 日本生物工学会大会講演要旨集, p.109 (2007).