

グルコースポリマーの酵素合成と応用

鷹羽 武史

多糖は生物が作り出す天然の高分子物質で、生分解性や生体適合性などに優れる環境負荷の少ない材料である。自然界には非常に多様な多糖が存在しており、その物理化学的性質や機能もさまざまである。しかしながら商業規模で生産され、産業利用されている多糖の種類は限られている。著者らは環境にやさしい高分子材料として、多糖の重要性は今後ますます大きくなると考え、酵素を用いた多糖の生産技術と構造制御技術の開発に取り組んでいる。

自然界のデンプン系多糖

デンプンは植物が光合成により生産する物質であり、アミロースとアミロペクチンと呼ばれる2種の多糖の混合物である。通常トウモロコシ、馬鈴薯、米、小麦などのデンプンは約20%のアミロースと約80%のアミロペクチンを含んでいる。アミロースはグルコース（ブドウ糖）が α -1,4結合で多数結合した直鎖状多糖である。アミロペクチンは重合度が20程度の短いアミロースが α -1,6結合を介して多数結合した分岐状多糖で、房状の分岐パターン（クラスター構造）をとることが構造上の特徴である。アミロースとアミロペクチンは高等植物における主要なエネルギー貯蔵物質である。一方、動物や微生物はグリコーゲンと呼ばれる多糖をエネルギー貯蔵用物質として利用している。グリコーゲンもアミロペクチンと同様、低重合度のアミロースが α -1,6結合を介して多数結合した分岐状多糖であるが、アミロペクチンより単

位鎖が短く、クラスター構造をとらない点が異なっている。

自然界にはアミロースが環化した環状アミロースも存在している。重合度6-8の環状アミロースはシクロデキストリンと呼ばれている。図1に示したこれら多糖は、グルコースを構成糖とするホモポリマーであるという共通点を有しているが、構造が異なっているため、物理化学的な性質や機能に大きな違いがある。デンプンはすでに広範囲な産業に利用されている多糖であるが、構造をより精密に制御することにより、新たな用途が開発できると考えられる。特に、純粋なアミロースやグリコーゲンは天然物から安価に製造することが困難であり、産業用原料としての流通はほとんどない。このような背景のもと、筆者らはデンプン系多糖の酵素合成と構造制御に関する研究を行ってきた。

砂糖を原料としたアミロースの酵素合成

アミロースを酵素合成する方法として、砂糖を原料とする方法が考えられる。砂糖はグルコースとフルクトースが結合した2糖類で、熱帯地方ではサトウキビ、寒冷地ではサトウダイコンから抽出製造される。砂糖の年間生産量は1億5千万トンに達し、デンプンと並んで最も安価な産業原料の一つである。砂糖にスクロースホスホリラーゼ（EC 2.4.1.7）とグルカンホスホリラーゼ（EC 2.4.1.1）を作用させることにより、アミロースが合成可能である。筆者らはこの技術を利用し、純粋なアミロ

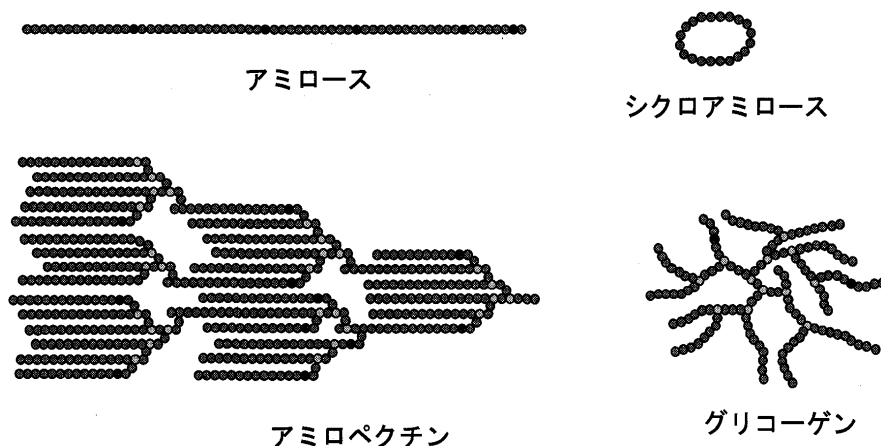


図1. デンプン系多糖の構造（イメージ図）

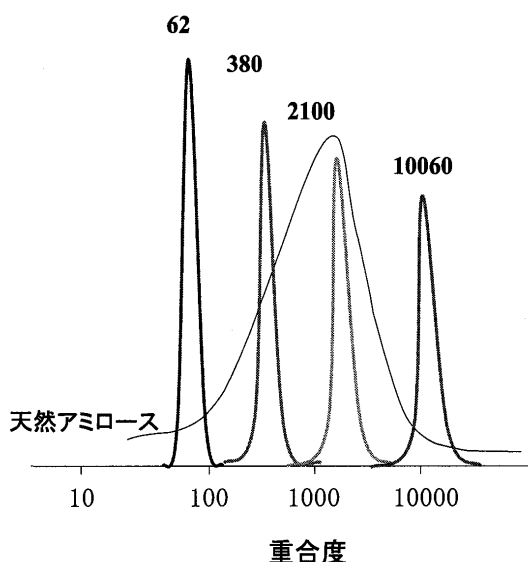


図2. 酵素合成アミロースの分子量分布. 条件を変えて合成した4種の酵素合成アミロースの分子量分布. ピークの上の数字は数平均重合度. 細い線は比較として用いた天然アミロースの分子量分布.

ス(酵素合成アミロース)の量産化体制を整えた^{1,2)}. この方法により製造した酵素合成アミロースの分子量分布を図2に示す. 酵素合成アミロースの分子量分布は非常に狭く, その大きさは厳密に制御できている. 砂糖中のグルコースの約80%が酵素合成アミロースに変換されており, 量的にも質的にも良好な結果が得られている.

これまでの研究から, アミロースは重合度に応じて物性や機能が大きく変化することがわかっている³⁾. さまざまな用途に最適となるようカスタマイズしたアミロースを製造できることはアミロースの利用範囲を広げる上で非常に重要である.

セルロースを原料としたアミロースの酵素合成

セルロースは高等植物の細胞壁の主要成分であり, 地

球上に最も大量に存在するバイオマスである. しかし, セルロースではグルコース残基間の結合が β -1,4結合であるため, 人間や動物の体内では基本的に分解されず, 栄養源にはならない. セルロースの年間生産量は1000億トンと推定されており, 石油資源の枯渇や食糧危機問題が心配される中, この膨大な未利用資源であるセルロースの有効活用技術の開発は人類共通の課題である.

セロビオースホスホリラーゼ(EC 2.4.1.20)は, セルロースの部分分解物であるセロビオースを加リン酸分解し, グルコース 1-リン酸を生成する反応を触媒する. そこでセロビオースホスホリラーゼとグルカンホスホリラーゼの反応を組み合わせることにより, 酵素合成アミロースが生産できるかどうか検討した. *Clostridium thermocellum* 由来のセロビオースホスホリラーゼおよび馬鈴薯由来耐熱化グルカンホスホリラーゼをセロビオースに作用させたところ, セロビオースは予想通り酵素合成アミロースに変換された. しかし, その収率は38.6%と低いものであった. 筆者らはこの低収率の原因がセロビオースホスホリラーゼの反応により生ずるグルコースが反応系内に蓄積することにあると考え, グルコース消去を目的としてムタロターゼとグルコースオキシダーゼを反応系に添加した. この結果酵素合成アミロースの収率を64.8%まで改善することができた. 現時点では砂糖を原料とする場合の収率には及ばないが, 更なる収率改善に向け研究を継続している. 本技術は未利用資源であるセルロースを高付加価値材料に変換する技術として, 有益なものであると考えている⁴⁾.

アミロースの構造と機能

アミロースはダイナミックな構造変化を行う多糖であり, この構造変化がさまざまなアミロースの特徴や機能を生み出している. 図3は水溶液中のアミロースの挙動

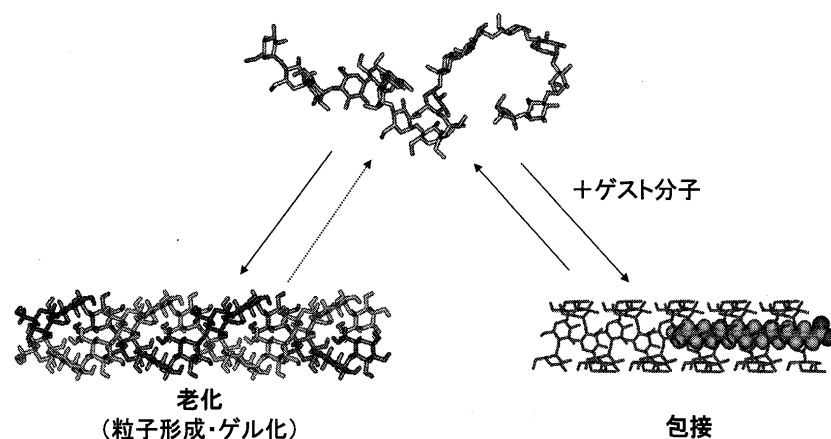


図3. 水溶液中のアミロースの構造変化

特 集

についてのイメージ図である。水溶液中のアミロース分子は、ヘリカルな基本構造を有しているが、らせんは局部的に不整合であり、分子全体としてはランダムコイル状であると考えられている⁵⁾。アミロース水溶液は不安定で、放置しておくと沈殿もしくはゲル化する。この現象はアミロースの老化と呼ばれているが、その本質はランダムコイル状で溶解していたアミロースが2重らせん構造へとコンホメーションを変化させ、さらに2重らせん構造状態のアミロースが相互集積し結晶形成に向かう自己組織化現象である(図3左)。このアミロースの自己組織化現象を利用することにより、アミロースの粒子、ゲル、フィルムなどの成型物を得ることができる⁶⁾。一方、アミロース水溶液に複合体形成剤を添加するとランダムコイル状のアミロースはらせん構造内部にこれら物質を取り込み包接化合物を形成する。デンプンにヨウ素液を加えると、デンプンが青色になることは有名であるが、これは、アミロースのヘリックス構造内部にヨウ素が包接されることによる。酵素合成アミロースはヨウ素以外にもさまざまな物質(薬剤、機能性食品成分、界面活性剤、油、色素、フレーバー物質、環境ホルモン物質など)を取り込むことが可能である。このように、アミロースは自己組織化機能や包接化合物形成機能を有する機能材料としてさまざまな用途へ利用が期待される材料である。

酵素合成アミロースの分解性や機能性、成型性を生かせる分野として医用材料は有望である。生体内に埋め込んで自己組織の再生を促し、その後分解・吸収されるような再生工学用の素材の開発が精力的に行われている。このような材料は目的の期間までは形を維持し、その後は速やかに分解されることが要求される。谷原らは、置換度を変えたアセチル化酵素合成アミロースのフィルムをラットに埋植して分解性の評価を行った⁷⁾。その結果、置換度に応じて分解性をコントロールできることが明らかになった。また、周辺組織の炎症反応などは認められなかった。酵素合成アミロースをさまざまな物質で修飾することにより、分解性の制御だけではなく温度応答性や生理活性を付与することが考えられ、組織修復材料や再生促進材料としての利用が期待できる。

一方、酵素合成アミロースはもちろん食品分野においても利用可能である。包接機能を利用して不安定な食品材料の安定化、フレーバーの揮発防止、臭いのマスキングなどの目的に利用が考えられる。加えて、酵素合成アミロースは食品においてテクスチャーや物性に大きな影響を与えると考えられ、物性改良、増粘、ゲル化、乳化、テクスチャー改善、安定化、粉末化などの目的での利用

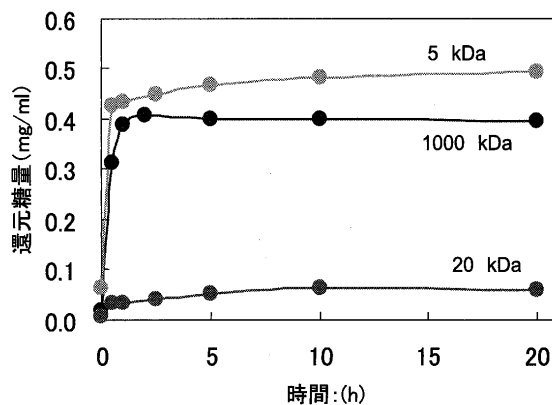


図4. 酵素合成アミロースのアミラーゼ分解性

も期待できる。また、平均分子量20,000前後の酵素合成アミロースから製造可能な結晶性の高い粒子は α アミラーゼに対し非常に高い抵抗性を示し(図4)、経口摂取しても血糖をほとんど上昇せず、食物繊維機能を発揮することが明らかとなっており、健康食品などへの利用も考えられる。

アミロース環状化と分岐構造の導入

酵素合成アミロース製造技術は重合度が制御されたアミロースを合成する方法として利用できるだけでなく、アミロース以外のデンプン系多糖を合成するためのプラットフォームとしても重要である。つまり、アミロースに作用しその構造を変化させうるグルカン鎖転移酵素を共存させることによりこれは実現できる。

アミロマルターゼ(EC 2.4.1.25)はマルトオリゴ糖に作用し、重合度の不均化を触媒する酵素であるが、アミロースに作用させると環状化反応を触媒し、環状アミロースを合成することができる。生じる環状アミロースの平均重合度は基質に用いるアミロースの重合度や酵素反応の条件により制御可能であり、最小重合度は酵素により決定される。ホスホリラーゼによるアミロースの酵素合成系にアミロマルターゼを添加することにより、重合度22以上の環状アミロース(シクロアミロース、図5)を合成できる⁸⁾。シクロアミロースはそれ自身が環状で閉じているため別のシクロアミロース分子との会合がおこらない。このためシクロアミロースの水溶液は安定で、リニアなアミロースに見られる沈殿形成(老化)は観察されない。一方シクロアミロースはアミロースと同様に包接化合物形成機能を有している。このようにシクロアミロースはリニアなアミロースと比較して取り扱いが容易であり、アミロースのモデル物質として利用されはじめている。さらに、シクロアミロースを人工シャペロンとして利用する変性タンパク質のリフォールディング技術

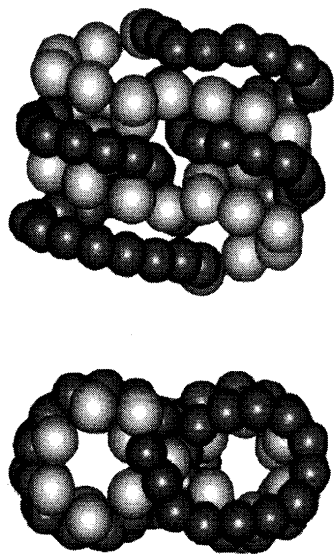


図5. シクロアミロース（重合度26）の構造

が開発され⁹⁾、大腸菌で生産された不溶性タンパク質顆粒からの活性タンパク質の製造などに利用されている。

ブランチングエンザイム (EC 2.4.1.18) はアミロースに作用し、アミロース中の一つの α -1,4結合を切断し、 α -1,6結合を形成するように再結合する反応を触媒する結果として分岐状グルカン进行合成する。アミロースへの分岐構造の導入はアミロースの物性を大きく变化させる。砂糖にスクロースホスホリラーゼ、グルカンホスホリラーゼ、ブランチングエンザイムの三種の酵素を同時に作用させることにより、天然グリコーゲンと同程度の単位鎖長分布を有する分岐多糖（酵素合成グリコーゲン）が得られている。特定の分子量の酵素合成グリコーゲンは免疫細胞を刺激し、免疫賦活作用を発揮することが明らかとなっている^{10,11)}。

おわりに

従来、多糖は天然物からの抽出により製造されていた。このため多糖の構造に变化を加えることには大きな限界があり、物性や機能の制御は困難であった。図6にまとめたように、異なる加リン酸分解酵素や糖鎖転移酵素を組み合わせる方法により意図した重合度、分岐の頻度を有する多糖をテラーメイドで量産することが可能である。酵素合成多糖は砂糖やセルロースなどの比較的安価かつ再生産可能な資源を原料として用いて、酵

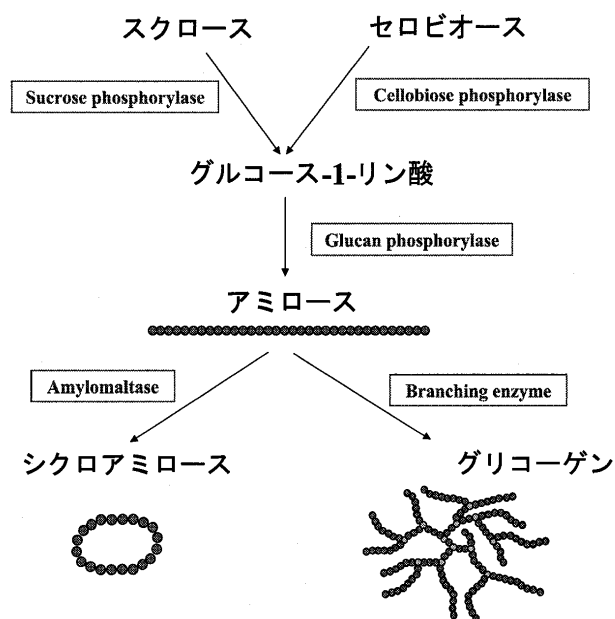


図6. 各種多糖の酵素合成

素を利用したバイオプロセスにより合成され、使用後は環境中で容易に分解され二酸化炭素と水になる。このように酵素合成多糖は環境負荷の非常に少ない高分子材料である。酵素合成多糖の有する多彩な機能や特徴は食品、医薬、化粧品、化学などの幅広い産業分野で利用可能であると考えられる。

本研究の一部は、「地域新生コンソーシアム事業」（経済産業省）および、「生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業（異分野融合研究開発型）」（独法生物系特定産業技術研究機構）の支援により行われた。

文 献

- 1) Yanase, M. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5433 (2005).
- 2) Fujii, K. *et al.*: *J. Appl. Glycosci.*, **53**, 91 (2006).
- 3) Kitamura, S.: *The Polymeric Materials Encyclopedia, Synthesis, Properties and Applications*, vol.10, p.7915, CRC Press (1996).
- 4) Ohdan, K. *et al.*: *Biocatal. Biotransform.*, **24**, 77 (2006).
- 5) 北村進一：デンブ科学, **36**, 303 (1989).
- 6) 鷹羽武史ら：ブレインテクノニュース, **111**, 27 (2005).
- 7) 谷原正夫ら：月刊バイオインダストリー, **22**, 58 (2005).
- 8) Fujii, K. *et al.*: *Biocatal. Biotransform.*, **21**, 167 (2003).
- 9) Machida, S. *et al.*: *FEBS Lett.*, **486**, 131 (2000).
- 10) Ryoyama, K. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 2332 (2004).
- 11) Kakutani, R. *et al.*: *Carbohydr. Res.*, **342**, 2371 (2007).