

世界に誇る日本の糖質関連酵素研究

谷口 肇

「糖質ゼロ」が現代のクールの一つである。電車の広告にもテレビにもこの言葉があふれている。飽食・超高齢社会にあってエネルギー源は敬遠すべきものとなったかの感がある。しかしデンプンを中心とする糖質が我々の主要エネルギー源であることには今も変わりはない。さらに、近年種々の生理機能を持つオリゴ糖が開発され、身近な食品に利用されるようになってきた。

戦後の高度経済成長期（1960年代）にアメリカからトウモロコシが輸入されるようになり、ここから安価なデンプンが多量に生産されるようになった。この前後から微生物由来の酵素（ α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ）を使ってデンプンをほぼ100%ブドウ糖に変換する技術が開発され、トウモロコシからのブドウ糖の工業的生産が実現した。清酒や醤油醸造などの日本の伝統的発酵技術がこれら微生物由来酵素の開発の基礎となった。高度経済成長が終わる1973年ごろブドウ糖を果糖に変換する酵素、グルコースイソメラーゼ（キシロースイソメラーゼ）が日本で開発された。本酵素はブドウ糖の約50%を果糖に変換してブドウ糖と果糖の混合物（異性化糖）を生産する。ブドウ糖の甘味度は約70%であるが異性化糖の甘味度はショ糖（砂糖）とほぼ等しい（100%）。異性化糖が砂糖の代替甘味料として使われるようになってその工業的生産が実現した。原料であるデンプンの年間生産量は、それまでの100万トン強から1980年代後半には300万トン弱に増加し、現在もほぼ同じ水準を維持している。この間にデンプンに作用して特定のオリゴ糖を生産する種々の微生物酵素が活発に研究されるようになった。デンプンから重合度2-7の特定のマルトオリゴ糖を生産する一連のアミラーゼの発見などもその一例である。デンプン以外にショ糖、乳糖などに作用する微生物酵素の開発も活発に行われた。

1985年ごろ食品の第3の働きとして体調調節機能が世界で初めて日本で見いだされ、このような機能を持つ食品が機能性食品として定義された。これを受けて厚生省（当時）は、1991年、特定保健用食品の制度を発足させ、虫歯予防、血糖調節などの体調調節機能が科学的に証明された食品が「特定保健用食品」として認可されることになった。体調調節機能が食品の3次機能として

発見された頃、日高らは特異な β -フルクトフラノシダーゼを用いてショ糖からフルクトオリゴ糖を工業的に生産する方法を開発し、この糖が人の腸内フローラを改善する（ビフィズス菌を増加させる）ことを見いだした¹⁾。オリゴ糖に体調調節機能（3次機能）があることを示した最初の例で、以後さまざまなオリゴ糖の開発とその体調調節機能の探索が、日本において精力的に進められた²⁾。

市販されているさまざまなオリゴ糖

表1に日本で市販されている主なオリゴ糖について、その年間生産量、原料、生産方法などを、生産量の多い順に示した³⁾。

これらのオリゴ糖の中でシクロデキストリンはもっとも早く（1976年）工業生産が開始されたが、当初の食品への利用はその包摂作用を利用した食品素材の物性改善剤としてであった。トレハロースは比較的最近開発されたにもかかわらず、年間生産量はもっとも多く年3万トンを超えている。現在、これらのオリゴ糖の体調調節機能としては、整腸作用、抗う蝕作用、ミネラル吸収促進作用、血糖調節作用、コレステロール低下作用などが明らかになって特定保健用食品に用いられている例が多い。表1に挙げたオリゴ糖の大部分はデンプン、ショ糖または乳糖を出発材料として微生物由来の酵素を用いて工業的に生産されている。大部分の酵素は加水分解酵素であるが、その中で転移作用の特に強い酵素の発見や高基質濃度条件下での転移反応や縮合反応を利用することにより、これらのオリゴ糖を効率的に生産する方法が開発された。

トレハロースの新しい合成経路

トレハロースは2個の α -グルコース残基が1,1結合した2糖で還元力を持たない。古くから昆虫や酵母などの微生物に存在することが知られ、これらの生物の乾燥耐性に重要な役割を演じていると考えられる。クマムシやネムリユスリカの幼虫は水が少なくなると体内にトレハロースを合成して乾燥に耐えることはよく知られている。これらの生物ではトレハロースはUDP-グルコースを介して、あるいはトレハロースホスホリラーゼ-マル

表1. 日本で市販されている主なオリゴ糖 (2009年)

オリゴ糖	生産量 (トン/年)	原料	製造方法
トレハロース	31,500	デンプン	イソメラーゼ+ α -アミラーゼ
イソマルトオリゴ糖	11,500	デンプン	トランスグルコシダーゼ
シクロデキストリン	4000	デンプン	グルカノトランスフェラーゼ
ガラクトオリゴ糖	4000	乳糖	β -ガラクトシダーゼ
フルクトオリゴ糖	3500	シヨ糖	β -フルクトフラノシダーゼ
パラチノース	3000	シヨ糖	グルコシルトランスフェラーゼ
ラクトスクロース	2000	乳糖+シヨ糖	β -フルクトフラノシダーゼ
グリコシルスクロース	1800	デンプン+シヨ糖	グルカノトランスフェラーゼ
ニゲロオリゴ糖	1500	デンプン	α -グルコシダーゼ
ゲンチオオリゴ糖	1000	デンプン	β -グルコシダーゼ
キシロオリゴ糖	600	キシラン	β -キシロシダーゼ
ラクチュロース	500	乳糖	化学的異性化
ラフィノース	250	甜菜	抽出

トースホスホリラーゼの作用により合成される。後者の系を用いてトレハロースを大量調製する研究が活発に行われたが、トレハロースの収率が低く、実用化されるには至らなかった。

1995年、林原生物化学研究所（現、株式会社林原）のグループはデンプンからトレハロースを高効率に生産する微生物、酵素系を見だし、トレハロースの工業的生産への道を開いた⁴⁾。彼らは *Arthrobacter* 属や *Sulfolobus* 属などの数種の細菌・アーキアがデンプンからトレハロースを高収率で生産する事を発見し、これらの微生物が、図1に示すように、2つの酵素、maltooligosytrehalose synthase (MTSase, EC 5.4.99.15) および maltooligosyltrehalose trehalohydrolase (MTHase, EC 3.2.1.141) の作用によってデンプンからトレハロースを生成することを明らかにした。

図1の経路の発見は糖質産業界にも糖質酵素研究者にも大きな衝撃を与えた。昆虫や酵母におけるトレハロースの合成にはグルコース-1-PやUDP-グルコースなどのリン酸化合物を中間体として必要としている。さらに、トレハロースのグルコシド結合の自由エネルギーは、シヨ糖と同様両アノマー炭素が結合に関与しているので、マルトースの自由エネルギーよりはるかに高いと推察された。そうであれば、外からのエネルギー (ATP) 投入なしにマルトースからトレハロースへの変換は熱力学的に不可能であると思われた。ところが実際にトレハロースの自由エネルギーを測定して見るとマルトースより低いことが判明した。シヨ糖の自由エネルギーの類推からトレハロースの自由エネルギーも高い、という推察が誤りであったわけである。

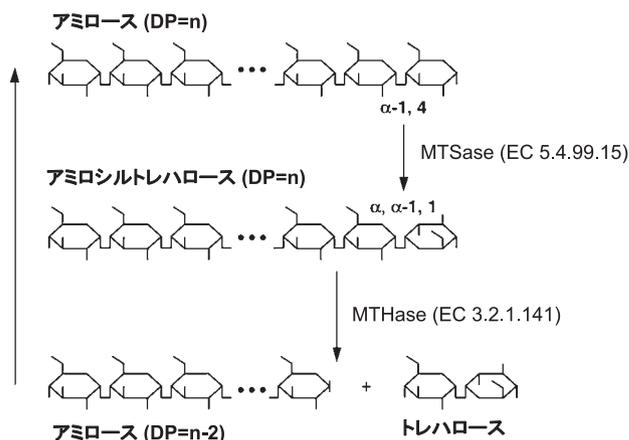


図1. アミロースからのトレハロース合成経路

推察はともかく、図1のMTSase、およびすぐ後に発見されたtrehalose synthase (EC5.4.99.16)、は共に α 1,4-結合を α 1,1-結合に異性化する反応を触媒する異性化酵素、mutaseである点も衝撃的であった。単糖や糖リン酸化合物での異性化反応は知られていたが、二糖や多糖の異性化反応を触媒する、細胞（菌体）外酵素の発見は初めてであった。さらに、MTSaseは多糖の還元末端側の結合を認識する点でも、それまでに知られていたデンプン分解酵素群の中できわめて異色であった。

林原グループは本酵素系が超好熱菌を含む多くの細菌・アーキアに存在する事を見だし、その遺伝子のクローニング、結晶構造の解析、作用メカニズムの解明など、基礎研究分野でも大学や研究機関に引けをとらない重厚な研究を展開している。その構造上からは、これらの酵

表2. デンプンから合成される新しいオリゴおよび多糖と合成に関与する酵素 (生物)

No	Oligo- and poly saccharide derived from starch	Structure	Responsible enzymes (Organisms)
1	Cyclic nigerosylnigerose	$cyclo\{\rightarrow 6\}\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow)$	6- α -glucosyl transferase (EC 2.4.1.24, GH 31) 3- α -isomaltosyl transferase (EC 2.4.1.-, GH 31) (<i>Bacillus globisporus</i> C11)
2	Cyclic maltosylmaltose	$cyclo\{\rightarrow 6\}\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow)$	6- α -maltosyl transferase (GH 13) (<i>Arthrobacter globiformis</i>)
3	Isocyclomaltpentaose	$cyclo\{\rightarrow 6\}\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow)$	isocyclomaltooligosaccharide glucanotransferase (<i>Bacillus circulans</i> AM7)
4	Cyclic pentasaccharide containing 1-3, 1-4, and 1-6 linkages	$cyclo\{\rightarrow 6\}\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow)$	6- α -glucosyl transferase (EC 2.4.1.24, GH 31) 3- α -isomaltosyl transferase (EC 2.4.1.-, GH 31) (<i>Bacillus globisporus</i> C11)
5	Cycloamylose	$cyclo\{\rightarrow 4\}\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow)n, n \geq 18$	4- α -glucanotransferase (EC 2.4.1.25, GH 13) (Potato)
6	Highly branched cyclic dextrin	Cyclic cluster dextrin, MW \approx 900	α -1,4-glucan: α -1,4-glucan-6-glycosyltransferase (EC 2.4.1.18) (<i>Bacillus stearothermophilus</i>)
7	Highly branched α -glucan	α -glucan containing 1-6 and 1-3 branching points, n \approx 25	α -1,6,-1,4, or -1,3 transferring α -glucosidase α -1,3, or -1,4 transferring α -amylase (<i>Paenibacillus</i> sp. PP710)

素は何れも α アミラーゼと同じGH 13に属し、主要ドメイン構造および触媒アミノ酸残基を共有している点も興味深い。トレハロースの大量生産が実現して、この糖の他の二糖には見られない特異な物性、機能性の解明、それに基づいた食品、医療分野への応用も進んでいる。

デンプンを起源とする新しいオリゴ糖群

最近開発されたオリゴ糖の中にはデンプン以外にショ糖 (スクロース)、乳糖 (ラクトース)、デキストラン、イヌリン、あるいは2種の糖を起源とするもの、などさまざまなものがある。表2には起源をデンプンに限って、トレハロース後に発見された主なオリゴ糖をその構造と合成酵素 (生物) と共に示した³⁾。

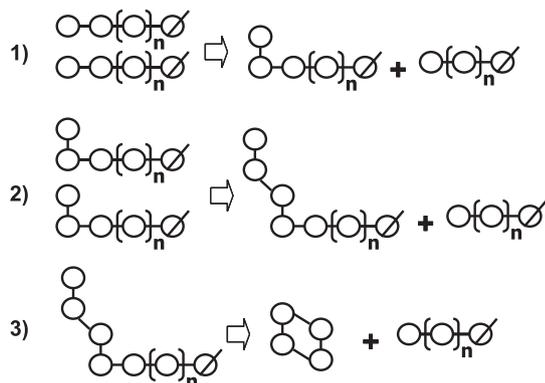


図2. Cyclic nigerosylnigerose の合成経路。○はグルコース残基、-は α -1,4結合、1は α -1,6結合、\は α -1,3結合を示す。1)は6- α -glucosyl transferase、2)と3)は3- α isomaltosyl transferase の作用。

表2の下方3種の糖はオリゴ糖ではむしろ多糖ではあるが、デンプンから酵素の作用で生産される新しい糖としてまとめて示した。構造の欄に示したようにこれら7種の糖の構成糖はすべて、デンプンと同じく、 α -D-グルコピラノース (α -D-Glcp) のみである。1から6までの糖は環状糖である。しかし、その結合様式を見ると、1,4の環状オリゴ糖および7の多分岐グルカンには、デンプンには存在しない、 α -1,3結合が存在している。1の環状4糖は、図2に示すように、*Bacillus globisporus* C11の生産する2種のトランスフェラーゼの共同作用によってデンプンから合成される。まず6- α -glucosyl transferaseが非還元末端のグルコース残基を他の非還元末端の6位に転移する (Step 1)。生成したイソマルトース残基を3- α -isomaltosyl transferaseが他のイソマルトース残基の3位に転移する (Step 2) と共に、こうして生じた非還元末端4糖を3位に分子内転移して環状4糖を生成する。両酵素ともこれまでまったく知られていない、新しいデンプン代謝酵素である。表2の2,3の環状糖も、それぞれ、その作用が新しく見いだされた酵素のユニークな転移作用によってデンプンから作られる。表2の4の環状5糖は1の環状4糖と同じ酵素系によって合成される。

表2の5,6の糖は環状ではあるが多糖であり、したがって、分子量 (重合度) 分布に狭いながらも一定の幅がある。5のシクロアミロースは表1のシクロデキストリンとよく似た構造であるが、構成グルコース残基が18個以上という点が大きく異なる。この環状多糖は最初、馬鈴薯の不均化酵素 (D-enzyme, disproportionation enzyme)

によって合成された。D-enzymeは名前が示すようにマルトオリゴ糖の鎖長を不均化する酵素として古くから知られていた。その酵素が環化反応を触媒することはこれまでの常識を破る発見であった。その後、同じ働きをする酵素が*Thermus aquaticus*のamylomaltaseや*Saccharomyces cerevisiae*のbranching enzymeなどで見いだされた。いずれの酵素にも、それまで環化反応は知られていなかった。シクロアミロースは既知の酵素の新しい作用を発見することによりデンプンからの合成が可能になった。6の多分岐環状多糖も既知のbranching enzymeのまったく新しい作用で合成されたものであった。本酵素はデンプンの生合成において直鎖のアミロースに α -1,6の分岐を作り出す酵素として知られていたが、同じ酵素がアミロペクチンクラスターのような巨大分子に作用するとは考えられていなかった。表2の7の多糖は、それぞれ、グルコシダーゼとアミラーゼに分類される2種の酵素の共同作用によって合成される。しかし、両酵素共に3位への転移作用を持つ点がこれまでのアミラーゼ、グルコシダーゼの概念を打ち破るものである⁵⁾。

以上紹介してきたような一連のオリゴ糖や多糖の開発やそれらの合成に関与する新しい酵素（微生物）の研究は、そのほとんどが日本で行われてきた。デンプンの酵素糖化が世界で初めて日本で実用化されて以来、日本の糖質関連酵素の開発研究は世界をリードし続けているといえよう。

デンプンを分解する酵素としては α アミラーゼ、 β アミラーゼ、グルコアミラーゼ、プルラーゼが以前から知られ、それらの作用様式も解明されて、1980年代半ばにはデンプンを分解する酵素の研究は終わったかの感

があった。これに比べると近年のデンプンに作用する新しい酵素および生産物の発見・開発は、まさに瞠目すべきものがある。しかし、デンプンをエネルギー源として生存している生物の多彩さを考えれば、デンプンを代謝する酵素も、もっともっと多彩であっていい。これまでに発見された酵素はそのほんの一部に過ぎないのかもしれない。

昭和30年代、筆者が学生だった頃はまだ砂糖は貴重品だった。この砂糖をデンプンから作る事は大きな夢であり、物理化学的あるいは生物学的方法でこれを実現する試みが数多くなされたが、いずれも実現には至らなかった。この夢はその後、異性化糖の開発によりある程度実現された。しかし近年のデンプン代謝酵素の目覚ましい展開を見ていると、デンプンをショ糖に転換する酵素系の開発も夢ではないのかも知れない。

「ローマ人の物語」(塩野七生著)の中に、カエサルという言葉として「多くの人、見たいと欲する現実しか見ていない」が引かれている。ひょっとしたらこれは自然科学にも当てはまるのかも知れない。

文 献

- 1) Hidaka, H. *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1181 (1988).
- 2) Nakakuki, T.: *Pure Appl. Chem.*, **74**, 1245 (2002).
- 3) Taniguchi, H.: In *Carbohydrate-Modifying Biocatalysts* (Peter Grunwald, Ed.), p.649, Pan Stanford Publishing, Singapore (2012).
- 4) Nakada, T. *et al.*: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 2210 (1995).
- 5) Tsusaki, K. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 721 (2012).