
 総 説

カップリングシュガーについて

岡田茂孝*

1. はじめに

今、日本人の虫歯の様子を調べてみると、5歳児では既に97%近くが、程度の差こそあれ虫歯に侵されており日本人全体では8億本の虫歯があると云われる。この虫歯はどのような経過を経ておこるのであろうか。最近の研究を要約すると、まず蔗糖を食べると口腔細菌のうち特に *Streptococcus mutans* と呼ばれる細菌が、蔗糖から不溶性の粘質グルカン（デキストラン）を形成し、それが口腔内の食物のカスや、微生物と共に歯の表面に密着し歯垢を形成する。次にその中で酸酵酵がおこり、出来た乳酸などの有機酸により歯のカルシウムが溶解する事から始まると云われている。

著者はつい最近まで歯科とは全く無縁の人間で、主として微生物の生産する酵素の作用の解明や、その食品加工への応用利用の研究を続けて来た。その研究の過程で蔗糖とグルコースの結合した、丁度蔗糖と水飴の合いの子のような甘味物質を酵素作用によって形成出来る事を見出した¹⁾。この水飴は反応の名にちなんで、カップリングシュガーと呼ばれているが、その利用途について各種の実験を行っていた所、*St. mutans* や *Leuconostoc mesenteroides* によるデキストランの形成が、蔗糖に比べて著しく劣ることを発見した。この事実からこの水飴は蔗糖に比べ虫歯を発生させる比率が低いのではないかと考え、数ヶ所の歯科系研究機関に検討を依頼したのが、虫歯への研究の始まりである。一方歯科系研究者の中にも甘味に関与している蔗糖の構造をそのまま保持して、しかも蔗糖に比べ口腔内細菌で代謝されない（非う蝕的性質）むしろ蔗糖と共存してもその蔗糖の細菌による代謝を拮抗的に阻害する（抗う蝕的性質）のような化合物

* 大阪市立工業研究所生物化学課長

がもとめられており、両者の目的がたまたま一致して、数年間に亘る組織的な研究が、国立予防衛生研究所歯科衛生部を中心に検討される事になった。

このような経過を経てカップリングシュガーの有効性、毒性等が判明し、最近各種の食品に使用され始めている。この小文ではこれまで著者等が行って来た酵素の基礎研究を中心に、カップリングシュガーの組成や性質等について述べてみたい。

2. アミラーゼについて

本論に入る前にごく簡単にアミラーゼの作用についてふれたい。アミラーゼはでん粉を加水分解する酵素の総称であるが、作用の上から α 、 β 、グルコ-アミラーゼに大別される²⁾。このうち α -アミラーゼはでん粉のグルコシド結合を比較的ランダムに切断する。でん粉糊の粘度を低下させるので、でん粉分解産業では広大な用途がある。グルコ-アミラーゼは、でん粉の末端から作用しグルコースを生成する酵素である。この酵素はグルコースの製造に使用され、最近では更にそのグルコースの半分をフラクトースにする異性化糖工業が発展している³⁾。又 β -アミラーゼは、でん粉を末端からマルトース単位で切断する。生成するマルトースは食品用のほか、低カロリー甘味料であるマルチツールや、注射薬としての用途がある。

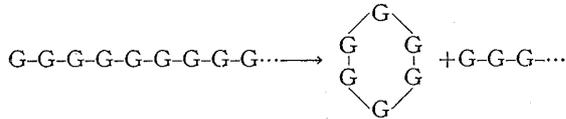
最近これ以外にでん粉からマルトテトラオース、マルトヘキサオース、シクロデキストリン等を作り出す酵素が微生物のうち特に細菌を中心に発見され、その利用が進んでいる。カップリングシュガーはこのうちサイクロデキストリン合成酵素の転移作用を応用したものである。

3. サイクロデキストリン合成酵素 (Cyclodextrin glycosyl transferase CGT-ase)

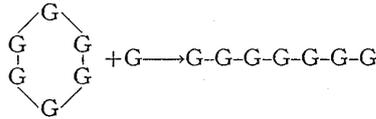
CGT-ase はでん粉に作用して、グルコース6~8個*よりなる環状デキストリン (Cyclodextrin, CD) を作る酵素である。 *Bacillus macerans* と呼ばれる細菌が、このような酵素を生産する事は、60年も以前に報告されている⁴⁾。酵素作用で出来る CD は中央に空間がありその中に各種の物質を包接する特異な作用を示すので、多くの研究者によって検討された。しかし不思議な事に酵素の精製や、その作用の研究、 *B. macerans* 以外の微生物の生産する CGT-ase についての検討等はごく近年まで放置されていた。

酵素を精製し作用を行ってみると、本酵素は一種の転移酵素で、第1図に示すようにでん粉に作用すると CD

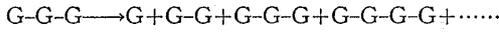
1) Cyclization



2) Coupling



3) Disproportionation



第1図 CGT-ase の作用

G: グルコース —: α-1,4 グルコシド結合

を形成するが (Cyclization)、適当な受容体が存在するとそのものに転移を行う (Coupling)。たまたま受容体として蔗糖をえらぶと蔗糖の末端にグルコースが結合し、いわゆるカップリングシュガーとなる。

著者らはこの転移作用を応用する目的で、 *B. macerans* 以外のより強力な酵素生産菌が存在するか否かを検討したところ、 *B. megaterium*⁵⁾ や、 *B. circulans*⁶⁾ にも CGT-ase 生産菌を発見した。 *B. macerans* 及び *B. megaterium* の酵素を各々精製し、でん粉に作用させると何れ

* CDにはグルコース6, 7, および8個で環状になるものが知られており、それぞれ α, β, γ-CD とよばれている。

も CD を合成したが、CD の組成を分析してみると *B. macerans* の酵素では、α:β:γ=8:1.5:0.5、 *B. megaterium* の酵素では 1:7:2 と全く異っていた⁷⁾。その後他の研究室からも CD 合成酵素の存在が報告されており、それらを一括すると第1表のようになる⁷⁾。

B. megaterium やアルカリ性細菌の酵素を使用すると CD のうち特に β-CD をでん粉から多く作ることが出来る。この物質は溶解度が低く、反応液から比較的容易に分離することが出来、製造が容易である。CD は先に述べたように包接作用を示し、包接した物質を安定化した、揮発を防止したりする。生理活性物質であるプロスタグランジンや、かとりせんこうの殺虫成分に代表されるピレスロイドの安定化のほか⁸⁾、食品の場合も“わさび”や“からし”のフレーバーの発散防止、天然色素の安定化などが報告されており、興味ある物質である。しかし著者は CD を作る現象よりは、より未知の点の多い転移反応に興味をひかれ、研究を進める事にした。

4. CGT-ase の転移作用

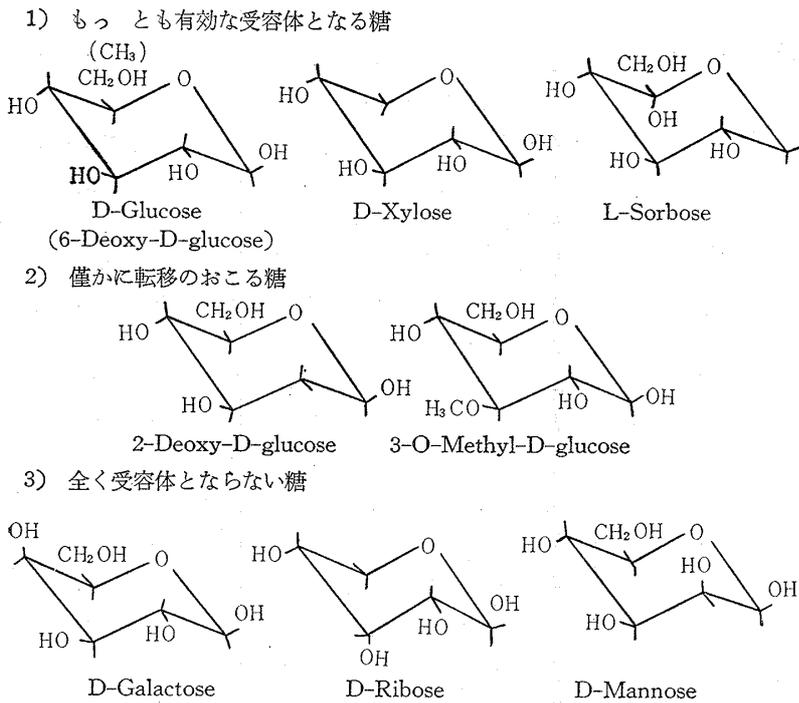
CGT-ase は適当な受容体が存在すると転移作用を行う。適当な受容体とはどう云う構造をもつものであろうか。既に、French らはグルコースないしその1位誘導体が受容体として有効であると報告している⁴⁾。その後、当研究室で数十種類の糖質などについて検討したところ、D-グルコースのほか、D-キシロース、6デオキシD-グルコース、D-ソルボースも有効であった⁹⁾。これらの糖の構造を並べてみると第2図のようで、D-グルコースとC-2,3,4位の-OHの構造が一致していることが大切である。また形成する結合は、グルコースやキシロースではα-1,4結合、L-ソルボースではα-1,3結合である。ソルボースの場合は丁度グルコースと構造が逆になっているので、α-1,3結合を形成するものと理解される。

糖転移反応の際の糖供与体としては CD のほかでん粉でも良い。この場合でん粉から一度 CD を通って転移するのであろうか。でん粉と蔗糖の混合液にごく少量の放射性炭素で標識した β-CD を添加して転移反応を行って

第1表 種々細菌の生産する CGT-ase

	<i>B. macerans</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. stearothermophilus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Alkalic Bacillus</i>
等電点	4.62	6.8	6.6	—	—	—
分子量	65,000	66,000	—	—	—	85,000
作用 pH	5.0~5.7	5.0~5.7	5.2~6.2	5.0	5.2	7.0
作用温度	55	55	55	75	—	50
pH-安定性	8.0~10.0	7.0~10.0	7.5~9.2	5.0~9.0	5.0~7.5	6.0~9.0
温度安定性	60°	55	50	70	—	60
主として生成するCD	α	β	β	α	α	β

カップリングシュガーについて



第2図 水溶液中での各種の糖の構造

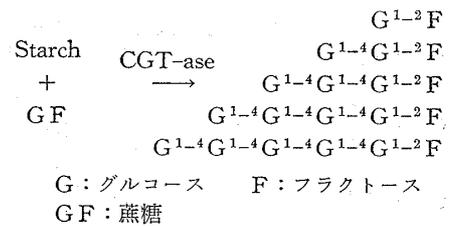
第2表 CGT-ase の転移作用と CD 形成量

基質濃度(%)	ヨード呈色度 (O.D. 660nm)	CD形成量 (mg/ml)	オリゴ糖形成量 (mg/ml)
でん粉 2.5) グルコース 0.03)	2.04	1.25	0.025
でん粉 2.5) グルコース 1.25)	1.67	1.08	0.98
でん粉 2.5) グルコース 2.5)	1.42	0.98	1.39

みると、β-CD はほとんど転移には使用されない。またでん粉に放射性グルコースを少量ないし同量加えた系に *B. megaterium* の CGT-ase を作用させ、反応液を分析してみると第2表のようであった。CD の生成量はいずれも大差ないが、グルコースが多いほどオリゴ糖の形成量は急増する。でん粉から CD を作る作用のほかに、でん粉からの直接グルコースへの転移がおこっていると考えられる¹⁰⁾。

5. 転移作用の応用

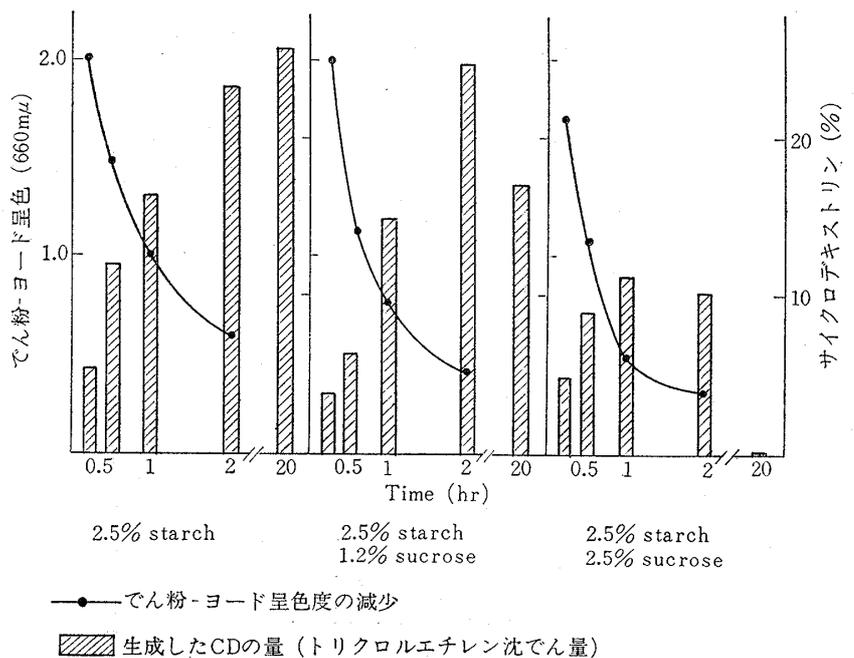
CGT-ase はでん粉から受容体へグルコースの転移を行う。受容体としては前述したように、グルコース、キシロースなど、またそれらの1位誘導体が有効であるのでそのうち2, 3のものを選んでみた。



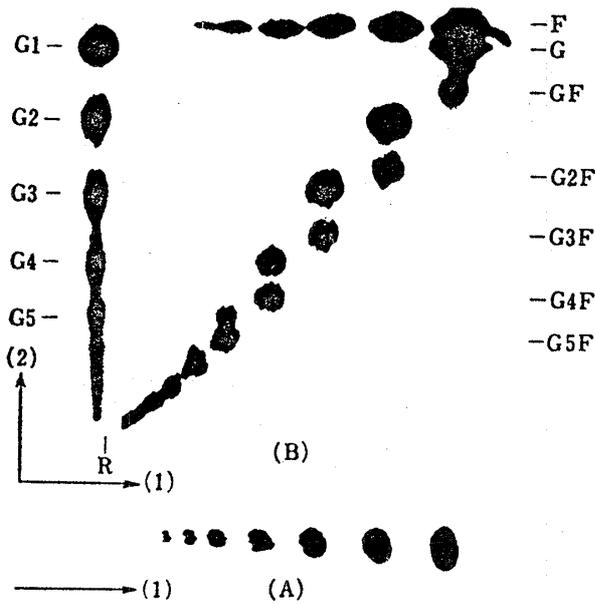
第3図 カップリングシュガーの合成

まず蔗糖を受容体とした場合、反応は第3図のようになると考えられる。しかしCGT-ase は本来 CD を作る酵素であるので、どの程度 CD が残存するであろうか。でん粉に蔗糖を等量加えた系と、でん粉のみの系に酵素を作用させ、でん粉の分解と、CD の量を測定すると第4図のようであった。でん粉のみの場合は CD が集積するが、蔗糖を含む場合、反応の初期には CD が一度生成するが、反応の後期には漸次消失した¹⁰⁾。生成した糖質の構造を決定するため

放射性蔗糖を用いて同様に反応し、最終反応液を正方形の濾紙の一端に付け、ペーパークロマトグラフィーにより展開した。次に濾紙にサッカラーゼの溶液を吹きつけ濾紙上で反応を行ってから直角方向に展開し X-線フィルムと密着してオートラジオグラムを作成した (Oligo-succharide map 法) (第6図)。図中最も Rf 値の高いスポットはサッカラーゼで、グルコースとフラクトースに分かれるので蔗糖、2番目の Rf 値のものはサッカラーゼでマルトースとフラクトースとなるのでG2F(glucosyl

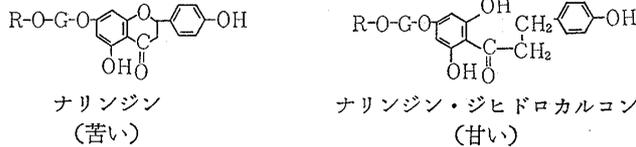


第4図 でん粉および、でん粉、蔗糖混合液への CGT-ase の作用



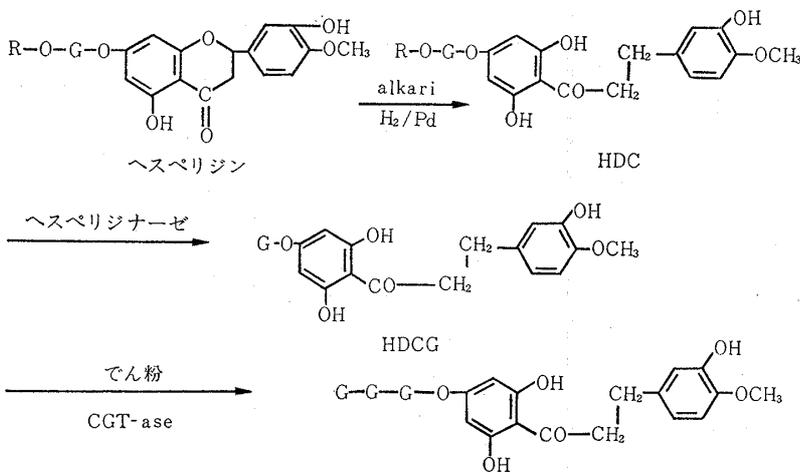
第5図 カップリングシュガーのオートラジオグラム
 A: (1)の方向へカップリングシュガーを展開
 B: サッカラーゼ作用後, 更に(2)の方向へ展開
 G. グルコース, G2. マルトース, G3. マルトテトラオース
 F. フラクトース, GF. 蔗糖, G2F. グルコシルシュクロース, G3F. マルトシルシュクロース

sucrose), 3番目のものは G3F (maltosyl sucrose) である事が確められた¹⁾。本物質はいわゆるカップリングシュガーの母体となったがその利用については次章に述



R: ラムノース, G: グルコース

第6図 ナリンジン, ナリンジン・ジヒドロカルコンの構造



第7図 ヘスペリジンからヘスペリジン・ジヒドロカルコン・マルトオリゴシドの合成

べる。

蔗糖以外のグルコース配糖体へも糖を付加する事が出来る。著者は十数年前夏みかんの苦味成分ナリンジンを酵素で分解し苦味のない夏ミカンジュースや缶詰を製造する研究を行ったが, この苦味成分をアルカリ側で還元すると非常に強い甘味を示す。まさに甘いと苦いは紙一重であり, 化学構造と呈味を考える上で興味ある材料の一つである¹¹⁾ (第6図)。さてこの系統のフラボノイド化合物の中でヘスペリジンは温州ミカンの中に含まれており, 温州ミカンの“しぼりかす”から大量に抽出する事が出来る。これをアルカリ側で還元したヘスペリジンジヒドロカルコン (HDC) は甘味を示さないが, ラムノースを酵素 (ヘスペリジナーゼ) で除去すると蔗糖の約100倍ほどの甘味を示す。安全性の点からも将来性のある甘味剤であるが, 水への溶解性が0.1%程度で使用上問題であった。構造をよく見るとグルコースを含む配糖体であるので, これに CGT-ase を使用してグルコースを付加してみた。メタノールの中に HDCG (ヘスペリジン・カルコン・モノグルコシド) を溶解し, でん粉, 酵素溶液中に投入して反応を行うと容易にグルコースが数個結合し溶解度は約10倍改良することが出来た。しかしグルコースの結合数をふやすと甘味は急速に低下するので調節して行く必要がある¹¹⁾ (第7図)。

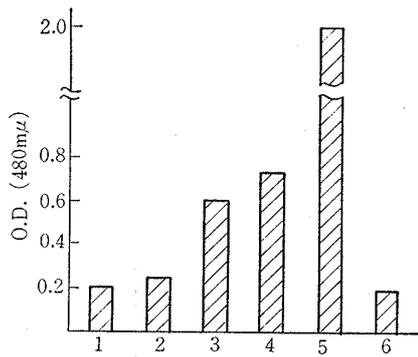
漢方薬に使用される天然生理活性物質の中には配糖体が多く含まれている。しかしその資源は限られているので, 各種のアグルコンを合成し, これに酵素作用によって糖を付加し, 各種の物質を合成する可能性はまだ残されているように思われる。

6. カップリングシュガーの利用

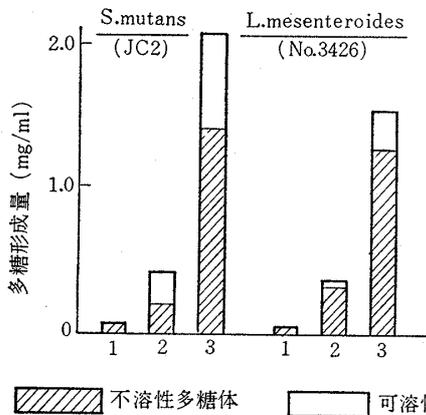
でん粉に蔗糖を加え CGT-ase を作用させると, 蔗糖にグルコースの付加した水飴状の物質が得られる事は先に述べた。この物質は強い甘味を示し濃縮すると粘調で丁度蔗糖と水飴の合いの子のような性質をもっている。応用途としてまず末端が全てフラクトースであるので, 水飴に比べて還元性を示さず, たとえば蛋白質と加熱しても変色しないものと予想される。第8図に示すように他の市販水飴, グルコースに比べ変色が少なく, 色を重んずる食品の素材に使用出来ると考えられる¹⁾。

次に本水飴を用いて物性の異なるデキストランが出来ないかと実験したところ, *Leuconostoc mesenteroides* の酵素によるデキス

カップリングシュガーについて



第8図 蛋白質との加熱による着色の変化
20%糖質と20%のポリペプトンを等量混合, 120°C
15分加熱後480mμにおける吸収を測定
(1)蔗糖 (2)カップリングシュガー (3),(4)市販水飴
(5)グルコース (6)ポリペプトンのみ

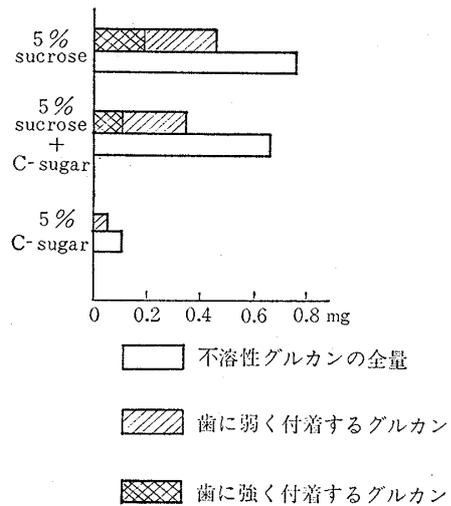


第9図 蔗糖およびカップリングシュガーからの多糖体の形成

10%糖液 10ml に培養液 1ml を加え, 30°C 1 夜反応。
1. 蔗糖を除いたカップリングシュガー
2. カップリングシュガー 3. 蔗糖

トランの形成量が蔗糖に比べて著しく劣る事実を発見した。デキストランを作る計画は失敗したがデキストランを作らない性質をもっているなら蔗糖に比べて虫歯になりにくいのではないかと想像してみた。虫歯菌と云われる *Streptococcus mutans* を入手し, デキストラン形成試験を行うと, 予想どおり(?) 第9図のようにデキストランの形成能力が蔗糖に比べて低下することが判明した。又水飴中から蔗糖をあらかじめ除去しておくこと更にデキストラン形成量は低下する。結局 *St. mutans* の酵素は蔗糖を利用出来るが, G2F や G3F は利用出来ないと考えられる。

昭和49年以来, 国立予防衛生研究所歯科衛生部を中心に多数の歯科系研究機関で, 効果, 安全性の両面から詳細な検討が行われており, その一部を借用して表示する。第10図は歯に付着するグルカン(デキストラン), とくに固く付着する rigidly adhered glucan の量が蔗糖に比べて本水飴(C-sugar)では少ないことを示している¹²⁾。第3表では一定期間各種糖質を含む飼料で rat を飼育後,



第10図 蔗糖およびカップリングシュガーからの不溶性グルカンの合成

第3表 各種糖質で飼育したラットの虫歯の判定

Carbohydrate	Caries	
	(number)	(%)
蔗糖	±	0
	C ₁	124
	C ₂	120
	C ₃	32
		82.1
カップリングシュガー	±	108
	C ₁	58
	C ₂	0
	C ₃	0
		15.1
マルトース	±	108
	C ₁	78
	C ₂	75
	C ₃	3
		48.1

C₃>C₂>C₁ はう蝕(虫歯)の程度を示す。

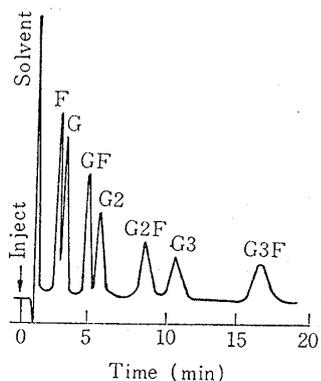
その歯を判定した動物試験の結果で, C₁, C₂, C₃ の順に虫歯の度合はひどくなる。この結果からも本水飴は蔗糖やマルトースに比べて虫歯をおこしにくい性質が示された。又この水飴の安全性についても詳細な検討が行われたほか, 主成分である G2F や G3F はハチミツ中にも存在しており¹³⁾, ヒト唾液の α-アミラーゼによってもでん粉と蔗糖から少量ではあるが合成すること¹⁴⁾出来るなど安全性の点でもまず問題はないものと考えられる。

7. カップリングシュガーの性質

これまで酵素を使って糖を合成し, 歯科領域で利用しようとした研究は皆無であったので, この研究は歯科領域からも注目されるようになった。そこでC-sugarの製造方法やその性質について再検討することとした。C-sugar はでん粉をまず糊化, 液化し, ついで蔗糖と CGT-ase を加えて作用させるが, でん粉の液化分解率, 蔗糖

第4表 カップリングシュガーの糖組成

	F	G	GF	G2	G2F	G3	G3F	G4 G4F 以上
含有量 (%)	0.9	4.6	23.4	6.3	16.1	5.0	10.1	33.6



カラム：u BONDAPAK/carbohydrate(4×300mm)
 溶媒：水：アセトニトリル=2：8
 流速：4 l/min
 検出器：RI

第11図 高速液体クロマトグラフィーによるカップリングシュガーの分析

の混合比が変化すると、生成糖の組成が大巾に変動する。第4表には研究室で作成した標準的なC-sugarの組成を示す。

蔗糖にグルコースを結合させると甘味は低下する傾向があり、G2F、G3Fの場合も甘味度は蔗糖の約50～60%と報告されている。しかし蔗糖は強い甘味を示すだけでなく甘味の質、着色性、吸湿性、非結晶性等の多くの要因の上に利用されている。C-sugarはそれらの点を考慮すれば最も蔗糖に近い甘味料であると云える。

なお価格についても、現在、蔗糖よりやや割高であるが、我国の酵素工業の技術は世界一流であり、酵素法によるブドウ糖、異性化糖製造などの技術の蓄積があるので将来、蔗糖と同価格以下で生産される日も近いと考えている。

本水飴が各種の食品に添加された場合、有効性を判定するためにも、主成分であるG2F、G3Fの定量方法を確立しておく必要がある。これまでは主としてペーパークロマトグラフィーを使用して来たが、展開に数日を要する点から、高速液体クロマトグラフィーが有効である。測定条件と分析結果を第11図に示す。各糖について面積から糖含量を測定してみると良い直線性を示す¹⁵⁾。

著者はこれまで全く歯科には無縁であったが、諸先生の意見を総合すると、歯が生え始めて3ヶ月目には虫歯は始まると云われる。しかるにこの時、まだ「くち、アーン」が出来ないため、歯科医も手をこまねいているのが現状である。この時期のために甘味はやや劣っても良いが、安全で安心出来るお菓子を開発していただきたいと言う事であった。カップリングシュガーがこの目的のために使用され、我国の虫歯予防の一助にでもなれば発明者としてこれにすぎる喜びはない。

文 献

- 岡田茂孝・北畑寿美雄：日食工誌，22，420 (1975)
- 岡田茂孝：醸協誌，70，546 (1978)
- 小巻利章：調理科学，10，211 (1977)
- French, D. : Advances in Carbohydrate Chemistry, 12, 189, Academic Press, New York and London (1950)
- 岡田茂孝・津山直人・北畑寿美雄：アミラーゼシンポジウム，7，61 (1972)
- 岡田茂孝・北畑寿美雄：アミラーゼシンポジウム，8，21 (1974)
- 岡田茂孝：醸酵工学，57，396 (1979)
- 岡田茂孝：澱粉科学ハンドブック，469，朝倉書店(東京) (1977)
- Kitahata, S.・Okada, S.・Fukui, T. : Agric. Biol. Chem., 42, 2369 (1978)
- Kitahata, S.・Okada, S. : Agric. Biol. Chem., 39, 2185 (1975)
- 岡田茂孝：化学と生物，11，712 (1973)
- 国立予防衛生研究所 歯科衛生部編：“虫歯とCoupling Sugar” 第1回 (1975)，第2回 (1976)，第3回 (1977)，第4回 (1978) 研究会議報告書
- White, J. W.・Maher, J. : J. Am. Chem. Soc., 75, 1259 (1953)
- 岡田茂孝・吉川恵温・北畑寿美雄：日本農芸化学会 講演要旨集，52，309 (1977)
- 岡田茂孝・北畑寿美雄・吉川恵温・吉田幹彦：澱粉科学，25，229 (1978)