

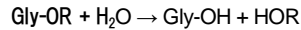
新規ホスホリラーゼを活用した機能性オリゴ糖ライブラリーの構築

新潟大学 大学院自然科学研究科 中井博之

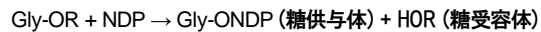


糖質は生物の生命維持に必要不可欠であり、生命現象の根幹に関わる重要な機能を果たす。その糖質の生体内での合成・分解は酵素反応により行われている。糖質グリコシド結合の消長に関与する酵素は、水の作用により分解生成物を得る糖質加水分解酵素、リン酸ジエステル結合の高エネルギー化により糖質合成を触媒する糖核酸エステル転移酵素、無機リン酸存在下での糖リン酸エステルの生産を触媒する糖質加リン酸分解酵素の3種類に分類される。

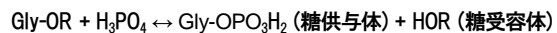
糖質加水分解酵素



糖核酸エステル転移酵素



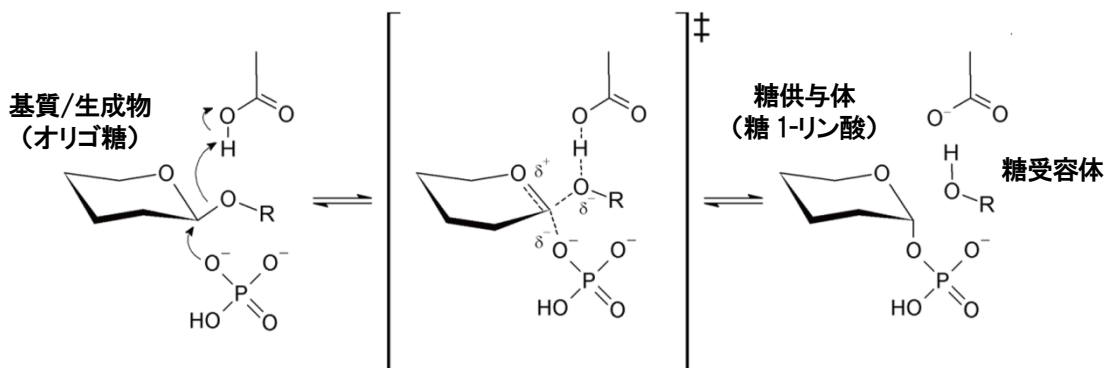
糖質加リン酸分解酵素(ホスホリラーゼ)



糖質グリコシド結合の消長に関与する酵素群

現在までに多種多様な糖質関連酵素が見出され、その生物学的意義から詳細な機能および構造解析が進められている。これら糖質関連酵素の構造および機能解明は生体内での糖質代謝機構を理解する上で学術的に非常に重要であると同時に、食品産業的にも糖質関連酵素群が担う役割は大きい。特に、糖質加水分解酵素は高分子多糖の糖化を目的として幅広く工業的に利用されている。一方で加水分解反応では生成物が複数生じることが多く、単一な糖質の大量調製法としては不向きであり、オリゴ糖をはじめとする種々の糖質の選択的な大量調製法の確立が望まれている。そこで糖核酸エステル転移酵素の糖質合成への利用が期待されるが、当該酵素の安定性および糖ヌクレオチドのコストの問題から実用的な利用には至っていないのが現状である。またオリゴ糖調製の手法として有機合成法も大変有用であるが、有機溶媒を用いた保護・脱保護を含む多段の反応段階を経る必要がある本手法は、コストおよび安全性の両面から食品用途へ応用することは困難であると言わざるを得ない。

今回、これらの問題を解決するために、糖質加リン酸分解酵素（ホスホリラーゼ）のオリゴ糖合成反応に注目した。ホスホリラーゼは、上記のように無機リン酸存在下で糖リン酸エステル（糖 1-リン酸）を生産する酵素として広く認知されているが、本反応は可逆反応であり、糖供与体（糖 1-リン酸）と糖受容体を出発材料とした際、オリゴ糖合成反応も効率良く触媒する^{1,2)}。



ホスホリラーゼを用いたオリゴ糖合成反応は、ホスホリラーゼ自身が持つ高い反応位置選択性により、特定のグリコシド結合を有するオリゴ糖のみ生産することが特徴である。また糖供与体と様々な糖受容体の組み合わせにより、選択的なオリゴ糖の生産が可能である^{1,2)}。しかしながら既知のホスホリラーゼ

は 14 種類のみとその報告例が少なく、生産可能なオリゴ糖のバリエーション拡大のためには新たなホスホリラーゼの発見が必須であった。そこで様々な生物種のゲノム情報を利用して新規ホスホリラーゼの網羅的スクリーニングを行い、生体内オリゴ糖代謝を理解する上で生物学的意義から学術的に重要な 8 種の新規酵素の発見に成功した。今後、当該新規ホスホリラーゼ群の糖受容体特異性を詳細に調査することで、これまでに報告例のない新規なオリゴ糖のライブラリーを構築する予定である。

さらに、加リン酸分解反応による天然糖質からの糖 1-リン酸の生産と、糖受容体とのオリゴ糖合成反応による糖質生産を組み合わせた One-pot 酵素反応法が開発され³⁻⁹⁾、高付加価値オリゴ糖の低コスト生産が可能になった。そこで、砂糖など安価に入手可能な糖質から付加価値の高い当該新規オリゴ糖への高収率変換技術の開発を目指す。今後このような独創的手法により低コスト生産を可能にした新規オリゴ糖の機能性（免疫向上およびアレルギー症状緩和作用、血圧低下作用など現代の諸疾患への改善効果）を微生物学・免疫学・食品科学的評価法で網羅的に見出すことで、将来ヒトにおける有用性試験の基礎データの蓄積を図り、且つ高機能性食品素材としての応用性を検討することで、食品・医療産業界でのホスホリラーゼの利用価値を高める。また、本研究によりオリゴ糖の構造と生理機能の相関が推測出来る様になり、特定の機能性を追求したオリゴ糖の選択が可能になる。さらに糖質科学および糖鎖工学分野での研究材料として、希少糖を含む様々なオリゴ糖の安価で持続可能な供給に繋がることが期待される。

- 1) M. Kitaoka and K. Hayashi: Carbohydrate-processing phosphorolytic enzymes. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 14, 33–50 (2002).
- 2) C. Luley-Goedl and B. Nidetzky: Carbohydrate synthesis by disaccharide phosphorylases: reactions, catalytic mechanisms and application in the glycosciences. *Biotechnol. J.*, 5, 1324–1338 (2010).
- 3) S. Murao, H. Nagano, S. Ogura and T. Nishio: Enzymatic synthesis of trehalose from maltose. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2113–2118 (1985).
- 4) H. Waldmann, D. Gygax, M.D. Bednarski, W.R. Shangraw and G.M. Whitesides: The enzymic utilization of sucrose in the synthesis of amylose and derivatives of amylose, using phosphorylases. *Carbohydr. Res.*, 157, 4–7 (1986).
- 5) M. Kitaoka, T. Sasaki and H. Taniguchi: Conversion of sucrose into cellobiose using sucrose phosphorylase, xylose isomerase and cellobiose phosphorylase. *Denpun Kagaku*, 39, 281–283 (1992).
- 6) M. Nishimoto and M. Kitaoka: Practical preparation of lacto-N-biose I, a candidate for the bifidus factor in human milk. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2101–2104 (2007).
- 7) M. Nishimoto and M. Kitaoka: One-pot enzymatic production of β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-deoxy-D-galactose (galacto-N-biose) from sucrose and 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose (N-acetylgalactosamine). *Carbohydr. Res.*, 344, 2573–2576 (2009).
- 8) M. Nakajima, M. Nishimoto and M. Kitaoka: Practical preparation of D-galactosyl- β 1 \rightarrow 4-L-rhamnose employing the combined action of phosphorylases. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 1652–1655 (2010).
- 9) H. Nakai, A. Dilokpimol, M. AbouHachem and B. Svensson: Efficient one-pot enzymatic synthesis of α -(1 \rightarrow 4)-glucosidic disaccharides through a coupled reaction catalysed *Lactobacillus acidophilus* NCFM maltose phosphorylase. *Carbohydr. Res.*, 345, 1061–1064 (2010).