

[1]

氏 名 (本籍)	秋山久美子 (栃木県)		
学 位	博士 (学術)		
学位記号番号	博甲第17号		
学位授与年月日	平成13年3月8日		
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当		
論 文 題 目	耐熱性 β -グルコシダーゼを用いた転移オリゴ糖生成に関する研究		
論文審査委員	(主査)	教授	小此木 成夫
		教授	木村 修一
		教授	谷村 顕雄
		教授	福場 博保
	東北大学大学院	助教授	齋藤 忠夫

論 文 要 旨

本研究の目的

ラクトースを素材とした機能性に富むオリゴ糖の効率的な調製方法の開発を目的とした。ラクトースからの転移オリゴ糖調製には通常、酵母やカビ由来の β -ガラクトシダーゼが用いられている。本研究では、高度好熱性である *Thermus* 属細菌由来の耐熱性酵素を用いて、70℃という高温で基質（ラクトース）に作用させる点、その酵素が β -ガラクトシダーゼ活性を有する β -グルコシダーゼである点、またその酵素は、 β 1-3結合を主体的に転移合成する点に新規性がある。この方法によって有用な転移オリゴ糖を生成させ、その化学構造と機能性の解析を行い、食品分野等での有効利用を目指した。

第1章： *Thermus* 属細菌由来 β -グルコシダーゼの大量発現と調製

遺伝子操作技術により *Thermus* 属細菌由来の β -グルコシダーゼを穏和な条件下で大腸菌に大量発現させ、その耐熱性酵素を調製することを試みた。

β -グルコシダーゼ構造遺伝子を持つプラスミドを大腸菌へ導入し、形質転換を行った。大腸菌の大量培養にあたり、培地中の炭素源および窒素源の検討を行うことによって、 β -グルコシダーゼ生産量の増加を目指した。大量培養後、菌体の採取、破壊、菌体除去、加熱による非耐熱性タンパク質の除去、イオン交換クロマトグラフィーでの分離、限外ろ過による濃縮を行って β -グルコシダーゼを得た。合成基質による酵素活性測定およびSDS-PAGEによって、 β -グルコシダーゼであることを確認した。

第2章： β -グルコシダーゼを用いた転移オリゴ糖の調製およびその効率化

第1章で調製した *Thermus* 属細菌由来の耐熱性 β -グルコシダーゼをラクトースに作用させ、加水分解と同時に起こるガラクトシル基転移反応を利用してオリゴ糖を合成した。薄層クロマトグラフィー (TLC) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって、

反応生物中にラクトース以外の二糖、三糖および四糖の生成を確認した。糖転移反応における pH の影響について検討を行った結果、加水分解が進んだ pH 6 よりも pH 7 で処理した方が、転移オリゴ糖合成の効率が良かった。

また、糖転移反応における基質濃度の影響について検討した結果、基質濃度が高い方がより多くの転移オリゴ糖を生成した。このことから、基質濃度の上昇はオリゴ糖生成量の増加に効果的であると示唆された。

反応進行中の基質濃度低下により、転移オリゴ糖合成速度が低下すると考えられたため、経時的に基質を添加したところ、反応液中における基質および転移オリゴ糖の割合は一定に保たれていた。基質添加は、効率の良い転移オリゴ糖合成に有効であると考えられた。また本酵素は、*Aspergillus oryzae* 由来の β -ガラクトシダーゼよりも転移オリゴ糖の合成量が多かった。

第3章：転移オリゴ糖の単離調製と化学構造解析

Thermus 属細菌由来の耐熱性 β -グルコシダーゼをラクトースに作用させ、生成した糖をゲル濾過で二糖画分と三糖画分に分画し、それぞれについて HPLC で分析を行った。また、ペーパークロマトグラフィー (PC) を用いて各画分の糖を分離した後、抽出したものを試料としてプロトン核磁気共鳴スペクトル法 ($^1\text{H-NMR}$) 分析を行った。二糖ではガラクトース 1 分子とグルコース 1 分子が β 1-3 結合および β 1-6 結合 (アロラクトース) しているラクトースの構造異性体と、 β 1-2 結合している二糖の存在を確認した。

また三糖で 80% 以上を占めている糖は、3'-ガラクトシルラクトース (3'-GL) であることが明らかになった。その他に、6'-GL の存在も確認したが、市場に最も多く流通している 4'-GL は確認されなかった。また、極めて低磁場にアノメリックプロトンシグナル (H-1) を持つ三糖の存在を確認した。

さらに、本研究においては数種類の糖が混在している試料を用いて $^1\text{H-NMR}$ 分析を試みたところ、プロトンシグナルの積分値から生成糖の存在比を求めることが出来た。このことは、オリゴ糖製造工程で迅速に生成糖組成を知りたい場合等の品質管理モニターとして、 $^1\text{H-NMR}$ が使用できることを示唆している。

第4章：転移オリゴ糖の機能性解析

Thermus 属細菌由来の耐熱性 β -グルコシダーゼをラクトースに作用させて得た三糖 (3'-GL を 80% 以上含む) が、生体内においてどのような機能性を有するのか、*in vitro* での検討を行った。まず、ヒト唾液 α -アミラーゼ、人工胃液、豚すい臓 α -アミラーゼおよびラットの小腸粘膜アセトン粉末を用いて、消化性の検討を行ったが、小腸粘膜で 2.5% 消化された以外は、全く消化・分解されなかった。次に、未消化のまま大腸に到達した三糖が、腸内菌叢に対してどのような働きかけをするのか、各種腸内細菌を用いて、資化性の検討を行った。3'-GL を主体とする三糖は、腸内環境の改善に有効とされているラクチュロースと同様に *Bifidobacterium sp.* によって良く資化され、増殖因子として有用であることがわかった。*Clostridium sp.* や *E. coli* などによる資化性は低かったが、*in vivo* では *Bifidobacterium sp.* の増殖に伴う腸内 pH の低下により、さらにそ

これらの菌の増殖が押さえられるものと考えられる。これらの結果から、3'-GL を主体とする三糖は未消化のまま大腸に到達し、腸内環境改善に有用な働きをする機能性糖質（プレバイオテックス）であると考えられた。

本酵素によって効率よく合成された3'-GL は、ヒトの乳汁をはじめ、これまでに解析された哺乳動物の初乳中に、共通して認められているオリゴ糖であり、非う蝕性であるとも報告されている。

現在、基質製造等において β 1-3結合を合成するためには、動物の辜丸より発見された β -ガラクトシダーゼの糖転移反応が利用されているが、食品へ応用では安全性やコスト高の問題がある。本酵素は β 1-3結合を主として転移する耐熱性酵素として希少であり、利用範囲も広いと考えられる。

本酵素および本酵素を用いて合成される転移オリゴ糖の機能特性、利用方法および工業化等について、今後も検討を重ねていきたい。

審査報告要旨

本研究はラクトースを素材として、高度好熱性である *Thermus* 属細菌由来の耐熱性酵素を用いて、機能性に富むオリゴ糖の効率的な調製方法の開発を目的としている。

本論文の構成は4章から成っている。第1章では、『*Thermus* 属細菌由来 β -グルコシダーゼの大量発現と調製』について、次のことを述べている。 β -グルコシダーゼ構造遺伝子を持つプラスミドを大腸菌へ導入し、形質転換を行った。大腸菌の大量培養にあたり、培地組成を検討し、 β -グルコシダーゼ生産量の増加を目指した。大量培養後、菌体の採取、破壊、菌体除去、加熱による非耐熱性タンパク質の除去を行った後、酵素をイオン交換クロマトグラフィーで分離、限外ろ過により濃縮した。そして合成基質による酵素活性測定および SDS-PAGE によって、 β -グルコシダーゼであることを確認した。

第2章では、『 β -グルコシダーゼを用いた転移オリゴ糖の調製およびその効率化』について述べている。第1章で調製した β -グルコシダーゼをラクトースに作用させ、ガラクトシル基転移反応を利用してオリゴ糖を合成した。薄層クロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーによって、反応生成物中にラクトース以外の二糖、三糖および四糖の生成を確認した。気質 pH による影響では、pH 7 による処理が効率的であり、また、基質濃度が高い方がより多くの転移オリゴ糖を生成させることができた。経時的な基質添加は効率の良い転移オリゴ糖合成に有効であり、また、本酵素は *Aspergillus oryzae* 由来の β -ガラクトシダーゼよりも転移オリゴ糖の合成量が多かった。

第3章では、『転移オリゴ糖の単離調製と化学構造解析』について述べている。生成した糖をゲル濾過で二糖画分と三糖画分に分画し、それぞれについて HPLC で分析を行い、また、ペーパークロマトグラフィーを用いて各画分の糖を分離して、プロトン核磁気共鳴スペクトル法分析を行った。二糖ではガラクトース1分子とグルコース1分子が β 1-3結合および1-6結合（アロラクトース）しているラクトースの構造異性体と、 β 1-2結合して

いる二糖の存在を確認した。また、三糖で80%以上を占めている糖は、3'-ガラクトシルラクトース (3'-GL) であることが明らかになった。その他に、6'-GL の存在も確認した。

第4章では『転移オリゴ糖の機能性解析』について述べている。調製した三糖試料 (3'-GL を80%以上含む) が、生体内においてどのような機能性を有するのか、in vitro での検討を行った。まず、ヒト唾液 α -アミラーゼ、人工胃液、豚すい臓 α -アミラーゼおよびラットの小腸粘膜アセトン粉末を用いて、消化性の検討を行ったが、小腸粘膜で2.5%消化された以外は、全く消化・分解されなかった。次に、各種腸内細菌を用いて、資化性の検討を行った結果、3'-GL を主体とする三糖は、ラクチュロースと同様に *Bifidobacterium* sp. によって良く資化され、増殖因子として有用であることがわかった。*Clostridium* sp. や *E.coli* などによる資化性は低かった。それゆえ、3'-GL を主体とする三糖は未消化のまま大腸に到達し、腸内環境改善に有用な働きをする機能性糖質であると考えられた。

本研究は、主として、高度好熱性である *Thermus* 属細菌由来の耐熱性酵素を用いて70°Cでラクトースに作用させる点、その酵素が β -ガラクトシダーゼ活性を有する β -グルコシダーゼである点、また、その酵素が β 1-3結合を主体的に転移合成する点ならびに生成した糖の化学構造をプロトン核磁気共鳴スペクトル法により解析した点などに新規性が認められる。

なお、本酵素によって効率よく合成された3'-GL は、ヒトの乳汁をはじめ、これまでに解析された哺乳動物の初乳中に、共通して認められているオリゴ糖であって、非う蝕性であることが報告されていることから、本研究で得られたオリゴ糖についての機能特性、利用方法および工業化などについて、今後の研究が期待される。

以上により、審査員一同は全員一致で本論文を博士論文として価値あるものと認めた。