オリゴ糖研究の最前線
 >> その1 <<
 機能性オリゴ糖の研究

エピラクトースの酵素合成と機能

佐分利 亘 (さぶり わたる)¹

田口 秀典 (たぐち ひでのり)²

鈴木 卓弥 (すずき たくや)³

¹ 北海道大学大学院農学研究院生物化学研究室 助教

² 北海道大学大学院農学研究院生物化学研究室
 博士研究員

³ 広島大学大学院生物圏科学研究科動物資源化学研究室
 室 講師

1. はじめに

エピラクトース (4-*O*-β-D-ガラクトシル-D-マンノース) は、加熱牛乳中に微量存在する希少糖である¹⁾。ラクトースのアルカリ異性化²⁾やβ-ガラクトシダーゼによる糖転移反応³⁾により本糖質を合成可能であることが示されていたが、効率の低さや基質のコストの高さから、生理機能解析を実施できるほど大量の高純度エピラクトースを合成することは困難であった。しかし、セロビオース 2-エピメラーゼ (CE) を用いることによりラクトースからエピラクトースを効率的に合成可能であることが見出され⁴⁾、当該酵素反応液からのエピラクトースの精製法が開発された⁵⁾。このことからエピラクトースの生理機能解析が比較的容易となり、様々な有益な生理機能が明らかにされてきた。本稿では、セロビオース 2-エピメラーゼを用いたエピラクトースの効率的合成方法ならびに生理機能について概説する。

2. セロビオース 2-エピメラーゼ

2.1. セロビオース 2-エピメラーゼの生化学的性質と生理学的意義

セロビオース 2-エピメラーゼ (以後 CE 略す) は、Tyler と Leatherwood が *Ruminococcus albus* の培養液中にセロビオースをエピメリ化して 4-*O*-β-D-ガラクトシル-D-マンノースを生じる活性を見出したことにより、存在が知られていたが⁶⁾、長年、活性本体の酵素に関する情報は全くなかった。約 40 年後の 2007 年に我々は *R. albus* NE 1 株の無細胞抽出液より CE を単離し、本酵素をコードする遺伝子のクローニングに成功した⁷⁾。本酵素の生化学的性質は、大腸菌による組換え酵素を用いて調べられた⁴⁾。本酵素は、43 kDa のモノマータンパク質であり、pH 7.5, 30°C において最大活性を示す。単糖には作用しないが、二糖以上のセロオリゴ糖の還元末端のグルコース残基をマンノース残基に異性化する。この反応は可逆的であり、セロビオースに対する反応では、反応平衡時にセロビオース：4-*O*-β-D-ガラクトシル-D-マンノースが 6：4 となる。基質

の還元末端側のグリコシド結合については、β-1,4 結合に高い特異性を示し、その他の結合からなる糖質には作用しない。一方、非還元性末端のグリコシル残基に対する認識は緩く、セロビオースだけでなく、ラクトースにも作用してエピラクトースを生成する。

R. albus NE 1 株の CE の遺伝子配列が明らかになったことを契機に、偏性嫌気性細菌である *Eubacterium cellulosolvens* NE 13 株および *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 株よりそれぞれ CE 遺伝子が単離され、大腸菌組換え酵素を用いて生化学的諸性質が明らかにされた^{8,9)}。最近、*B. fragilis* NCTC 9343 株の CE 遺伝子 (locus tag: BF 0774) のすぐ上流にコードされる遺伝子 (locus tag: BF 0772) が 4-*O*-β-D-マンノシル-D-グルコースを加リン酸分解し、α-D-マンノース 1-リン酸とグルコースを生じることが示された¹⁰⁾。β-マンナナーゼ様遺伝子 (BF 0771) も CE 遺伝子の近傍に存在し、これらの遺伝子がオペロンを形成していることから、CE はマンナンの代謝に寄与すると推定されている。すなわち、マンナンは菌体外で β-マンナナーゼによりマンノビオースに分解され、菌体内に取り込まれる。その後、CE により 4-*O*-β-D-マンノシル-D-グルコースに変換され、加リン酸分解を受けた後、解糖系により代謝されると考えられる。

2.2. 好気性好熱性細菌由来耐熱性セロビオース 2-エピメラーゼ

エピラクトースは後述する良好な生理機能を持つため、食品素材としての利用が期待されるが、CE を用いてエピラクトースを工業的に製造するには 2 つの大きな課題が考えられた。第一に、大規模反応で使用するための酵素の調製には、酵素生産菌の大規模培養が必要だが、偏性嫌気性細菌では大規模培養が極めて困難であること。第二に、実質的に緩衝液を使用できない大規模反応では微生物汚染による pH の変動を避けるため、少なくとも 50~60°C で反応を行わなければならないが、*R. albus* を始めとする偏性嫌気性細菌 CE では耐熱性が不十分であること。これらのことから、好気性細菌に由来する耐熱性 CE が必要と考えられた。そこで、*R. albus* 由来 CE の配列を基に配列類似

性検索を行い、好熱性好塩性細菌である *Rhodothermus marinus* DSM 4252 株のゲノム中に既知 CE との推定アミノ酸配列の同一性が 32~46% と高い CE 様遺伝子 (ACY 49317) を見出した。この相当遺伝子を *R. marinus* JCM 9785 株のゲノム DNA から PCR により取得した。*R. marinus* JCM 9785 株由来 CE (RmCE) の推定アミノ酸配列は、ゲノム既読株である *R. marinus* DSM 4252 株由来のものと同様であった¹⁾。RmCE は、大腸菌により可溶性タンパク質として生産され、熱処理により簡便に精製することが可能であった。得られた組換え RmCE を用いて酵素化学的諸性質を調べた。本酵素の最適 pH は 6.3、最適温度は 80℃ であり、pH 3.2~10.8 の範囲、80℃ 以下で安定であった。このことから、本酵素は工業利用に十分耐え得る性能を備えていると考えられた。中性以上の pH での高温反応では、非酵素的異性化 (ラクチュロースの生成) が懸念されるが、最適 pH が弱酸性であったことはこの非酵素的異性化を回避するために好都合であった。また、本酵素が既知 CE とは異なり、セロビオースよりラクトースに良く作用したこともエピラクトース合成酵素として有用な性質と考えられた。現在、RmCE を用いたバイオリクターなど、より実用的な形態での酵素の利用法の開発を進めている。

3. 高純度エピラクトースの効率的合成

高純度エピラクトースの調製には、未反応のラクトースを除去する必要があるため、この効率的な方法を検討した (図 1)⁹⁾。エピラクトースはラクトースと異なり溶解度が高いため、溶解度の差を利用して粗分画を行った。すなわち、エピラクトースを 30% 程度含む CE 反応液を固形分濃度 60% (w/v) に濃縮し、未反応のラクトースを結晶化・除去した。この操作は非常に効果的であり、エピラク

	エピラクトース純度	回収率
CE 反応液	27%	100%
↓		
ラクトース結晶化・除去	70%	70%
↓		
β-ガラクトシダーゼ処理	71%	70%
↓		
酵母処理	84%	68%
↓		
クロマト分画	91%	43%

図 1. CE 反応液からのエピラクトースの効率的精製

ラクトース 1 水和物 3 kg を 5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 15 L に懸濁し、*R. albus* NE 1 株由来 CE を 3,000 U 添加して室温に 48 時間保持した。減圧下で反応液を固形分 60% (w/v) まで濃縮し、未反応のラクトースを結晶化、除去した。これを 10% (w/v) に希釈した後、*B. circulans* 由来 β-ガラクトシダーゼを 12,600 U 添加して 53℃ に 3.5 時間保持した。加熱失活した後、冷却し、パン酵母 15 g を加えて単糖を消化した。次いで、イオン交換樹脂にて脱塩し、Na 型-カチオン交換樹脂 UBK 530 (三菱化学(株)) によるクロマト分画を行った。エピラクトースの純度は、高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

トース純度を 70% 程度まで高めることができた。回収率も約 70% と良好であった。次いで、得られた粗分画液に *Bacillus circulans* 由来 β-ガラクトシダーゼを作用させて残存したラクトースを単糖化し、酵母処理を行うことにより生じた単糖を消化させた。この操作によりエピラクトースの分解をほとんど伴わずに純度が 84% となった。さらに Na 型-カチオン交換樹脂によるクロマト分画を行うことで純度 91% のエピラクトースが得られた。CE 反応液からのエピラクトース回収率は 43% であった。この精製方法で利用した方法はいずれも工業的利用実績もあるため、大規模化が可能であり、結晶化・除去したラクトースは再び CE 反応の基質として利用可能なため経済的である。これらのことから、本精製法は工業スケールでの高純度エピラクトースの生産においても機能すると考えている。

4. エピラクトースの生理機能

4.1. エピラクトースによるプレバイオティクス効果

生理機能性オリゴ糖は、消化管内の腸内細菌叢の改善により、あるいは未分解のまま吸収されて生理機能を発揮する。このためには、オリゴ糖がホストの消化酵素に対して高い耐性を持つことが重要である。そこでまずエピラクトースの消化酵素耐性およびプロバイオティクスとして重要な細菌群の 1 つであるビフィズス菌の増殖活性について調べた。ラット小腸アセトン粉末から調製した消化酵素によりエピラクトースを処理した結果、82% のエピラクトースが分解されずに残存した⁹⁾。また、エピラクトースは、ヒトから分離されたビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* JCM1255, *Bifidobacterium breve* JCM1192, *Bifidobacterium longum* JCM1217, *Bifidobacterium adolescentis* JCM1275 および *Bifidobacterium catenulatum* JCM1194 のいずれに対しても増殖活性を示した⁹⁾。これらのことから、摂取したエピラクトースの大半は未分解のまま後腸に到達し、プレバイオティクス効果を発揮することが期待された。生体内での本効果を検証することを目的としてラットにエピラクトースを経口投与した効果について解析した。5% (w/w) エピラクトースを含有する飼料を 14 日間摂取させたラットの盲腸内の乳酸菌およびビフィズス菌量は、対照群と比較して明らかに増加した (図 2)¹²⁾。このとき、一次胆汁酸の二次胆汁酸への変換が抑制されたことから、腸内環境が改善されたと考えられた。これらの効果はプレバイオティクス効果を示す代表的なオリゴ糖であるフラクトオリゴ糖 (FOS) と同程度であり、エピラクトースの原料であるラクトースでは認められない効果であった¹²⁾。

4.2. エピラクトースによるカルシウム吸収促進メカニズム

出納試験の結果からエピラクトースの摂取によりミネラル、特にカルシウムの吸収が促進された。興味深いことに、小腸反転サック法試験においてエピラクトースの経口

図2. エピラクトースの腸内細菌叢改善作用

ラクトース、エピラクトース、フラクトオリゴ糖 (FOS) を5%添加した飼料を摂食したラットの盲腸内容物中の乳酸菌数 (A)、ビフィズス菌数 (B)、一次/二次胆汁酸比 (C) を示した。Con, 対照群; Lac, ラクトース; Epi, エピラクトース; FOS, フラクトオリゴ糖。数値は平均値±標準偏差で示した。異なるアルファベットは5%水準で有意に異なることを示す (Tukey-Kramerの多重比較)。乳酸菌とビフィズス菌数は、エピラクトースの摂取により、FOSと同程度に増加した。毒性の高い二次胆汁酸が減少したことに伴い一次/二次胆汁酸比が増大した。

図3. 小腸におけるカルシウム吸収促進メカニズムの探索

麻酔下のラット小腸ループにCaCl₂溶液を注入し、各エピラクトース濃度におけるCa吸収率を算出した。細胞間通過マーカーであるCr-EDTA (A)と同様にCa (B)の吸収率はエピラクトース濃度依存的に増大したため、エピラクトースによるCa吸収促進は、上皮細胞間経路を介していると考えられた。次に、小腸粘膜組織のTJ関連タンパク質についてイムノブロット法により解析した (C)。claudin, occludin, およびJAMといったTJタンパク質の局在性には変化がなく、細胞間吸収経路のもう1つの主要調節因子であるミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化 (pMLC) が確認されたため、エピラクトースによるCa吸収の促進には、細胞間経路の調節因子であるミオシン軽鎖のリン酸化が関与していると推察された。各パネルの数値は平均値±標準偏差で示した。異なるアルファベットは5%水準で有意に異なることを示す (ダンカンの多重比較)。

摂取の有無に関わらず腸管内にエピラクトースが存在するとカルシウム吸収が促進される結果が得られた。このことから、大腸と小腸において異なるメカニズムでエピラクトースによるミネラル吸収が促進されることが示唆され

た¹³⁾。すなわち、小腸ではエピラクトースは腸管上皮細胞に直接的に作用し、そして大腸ではエピラクトースは腸内細菌による発酵を受けて産生する有機酸がカルシウム吸収を促進するメカニズムが考えられた。

腸管上皮細胞間の吸収経路はタイトジャンクション (TJ) と呼ばれるタンパク質複合体によって調節されていることが知られており、このTJ経路の吸収は claudin, occludin および junctional adhesion molecule (JAM) と呼ばれる膜貫通型タンパク質によって調節される。また、これらタンパク質が結合しているアクチン細胞骨格の収縮によっても制御を受けること、この細胞骨格の収縮にはミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化が中心的な役割を果たしていることが知られている。そこでラットの腸管ループ法を用いて小腸におけるカルシウム吸収経路とその作用に関わるタンパク質、また促進作用に関わる細胞内シグナルを探索した。図3に示すようにカルシウムと細胞間通過マーカーの吸収率は共存するエピラクトース濃度依存的に増大した。このことからエピラクトースが小腸上皮細胞に直接的に作用し、細胞間経路を介して吸収促進が引き起こされることが示唆された¹⁴⁾。このとき、TJタンパク質の局在性は変化しなかったが、細胞間吸収経路のもう一つの主要な調節因子であるMLCのリン酸化が引き起こされることが明らかになった。そこで、MLCのリン酸化を担うミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) と Rho キナーゼ (ROCK) それぞれの阻害剤である ML-7 と Y 27632 を同時に添加したところ、カルシウムおよび細胞間通過マーカーの吸収率は明確に減弱した。すなわち、エピラクトースが小腸上皮細胞に直接的に作用し、MLCK および ROCK 依存的な MLC のリン酸化を引き起こすことで細胞骨格の収縮力を生み、細胞間経路を介したカルシウム吸収を促進すると考えられた (図4)¹⁴⁾。

4.3. 胃切除モデルラットを用いたエピラクトースによるミネラル吸収促進効果の検証

ここまで健常ラットにおけるエピラクトースの生理機能

図4. 腸管におけるカルシウム吸収促進メカニズム

小腸では、エピラクトースが上皮細胞に直接的に作用し、MLCKとROCK依存的にミオシン軽鎖のリン酸化を引き起こす。このミオシン軽鎖のリン酸化により、細胞骨格の収縮力が生まれ、細胞間経路のカルシウム吸収が高まる。一方、大腸ではエピラクトースは腸内細菌による代謝を受け、短鎖脂肪酸が産生、pHが低下する。短鎖脂肪酸が大腸上皮細胞の増殖を促して吸収面積を拡大すると共に、pH低下によりカルシウム、鉄の溶解度を増大させることにより大腸での吸収量を高める。

図5. エピラクトースの腸管におけるカルシウム・鉄吸収促進効果

開腹のみ (偽手術群), あるいは胃全摘出切除した (胃切除群) ラットにおけるカルシウム吸収率 (A), 鉄吸収率 (B), 大腿骨中のカルシウム量 (C), 大腿骨の強度 (D), 血液のヘマトクリット (E) およびヘモグロビン濃度 (F) を測定した。(A)~(D) では、黒色がエピラクトース添加食群を示し、白色が無添加の普通食群を示す。E および F では、丸が偽手術群、三角が胃切除群を示しており、黒色がエピラクトース添加食群を示し、白色が無添加の普通食群を示す。各パネルの数値は平均値±標準偏差で示した。異なるアルファベットは5%水準で有意に異なることを示す (ダンカンの多重比較)。胃切除手術によりいずれの項目も顕著に減少したが、エピラクトースの摂取により、これらは部分的 (A, C, D) あるいは完全 (B, E, F) に回復した。

について述べた。近年、加齢による骨密度の減少、鉄の不足による鉄欠乏性貧血が問題となってきた。そこで我々は、腸管におけるカルシウムと鉄の吸収不全により、骨の脆弱化や貧血を引き起こすことが知られる胃切除モデルラット^{15,16)}を用いてエピラクトースによるこれらの改善作用を調べた。すなわち、胃切除モデルにおけるエピラクトースによるCa吸収、骨形成、Fe吸収、貧血回復作用を検討した。胃切除は、Ca吸収率、Fe吸収率、大腿骨のCa量と骨強度、血液のヘマトクリットおよびヘモグロビン濃度を顕著に減少させたが、エピラクトースの摂取は、これらを部分的あるいは完全に回復した(図5)¹⁷⁾。また、エピラクトースの摂取によって、盲腸組織の拡大、盲腸内容物中の可溶性カルシウム濃度の増加が認められた。エピラクトース摂取群の盲腸内容物では、発酵産物の短鎖脂肪酸量の増加が認められ、pHも低下した。つまり、摂取されたエピラクトースが大腸に到達し、腸内細菌による代謝を受けることで短鎖脂肪酸を産生してpHの低下を引き起こしたと推察された。この短鎖脂肪酸が大腸上皮細胞の増殖を促して吸収面積を拡大するとともに、pHを低下させることで吸収可能な可溶性のカルシウムや鉄の濃度を高め、これらの吸収を促進した結果、骨の脆弱化や貧血が改善されたと考えられる¹⁷⁾。

5. 終わりに

これまで述べたようにエピラクトースは腸内細菌による発酵を介した吸収促進と小腸上皮細胞間経路を介した吸収促進の相乗効果により良好なミネラル吸収の促進機能を有しており、高齢者において問題となる骨疾患や女性に多く認められる鉄欠乏性貧血を改善する機能性食品素材としての利用が期待できると考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、北海道大学大学院農学研究院の松井博和教授には終始ご指導いただき、深く御礼申し上げます。試料の提供、動物試験においてご協力いただきました日本食品化工株式会社の山本 健博士ならびに小島 晃代氏、酪農学園大学の塩見徳夫教授、および北海道大学の西向めぐみ博士に感謝致します。その他、北海道大学大学院農学研究院生物化学研究室の卒業生、在校生の皆様、本研究の関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。本研究は、文部科学省イノベーションシステム整備事業さっぽろバイオクラスター“バイオS”の支援のもと行われました。

文献

- 1) I. Martinez-Castro and A. Olano: Influence of thermal processing on carbohydrate composition of milk. Formation of epilactose. *Milchwissenschaft*, **35**, 5-8 (1980).
- 2) A. Olano and I. Martinez-Castro: Formation of lactulose and epilactose from lactose in basic media. A quantitative study. *Milchwissenschaft*, **36**, 533-536 (1980).
- 3) M. Miyasato and K. Ajisaka: Regioselectivity in β -galactosidase-catalyzed transglycosylation for the enzymatic assembly of D-galactosyl-D-mannose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 2086-2090 (2004).
- 4) S. Ito, H. Taguchi, S. Hamada, S. Kawauchi, H. Ito, T. Senoura, J. Watanabe, M. Nishimukai, S. Ito and H. Matsui: Enzymatic properties of cellobiose 2-epimerase from *Ruminococcus albus* and the synthesis of rare oligosaccharides by the enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**, 433-441 (2008).
- 5) W. Saburi, T. Yamamoto, H. Taguchi, S. Hamada and H. Matsui: Practical preparation of epilactose produced with cellobiose 2-epimerase from *Ruminococcus albus* NE 1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1736-1737 (2010).
- 6) T.R. Tyler and J.M. Leatherwood: Epimerization of disaccharides by enzyme preparations from *Ruminococcus albus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**, 363-367 (1967).
- 7) S. Ito, S. Hamada, K. Yamaguchi, S. Umene, H. Ito, H. Matsui, T. Ozawa, H. Taguchi, J. Watanabe, J. Wasaki and S. Ito: Cloning and sequencing of the cellobiose 2-epimerase gene from an obligatory anaerobe, *Ruminococcus albus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **360**, 640-645 (2007).
- 8) H. Taguchi, T. Senoura, S. Hamada, H. Matsui, Y. Kobayashi, J. Watanabe, J. Wasaki and S. Ito: Cloning and sequencing of the gene for cellobiose 2-epimerase from a ruminal strain of *Eubacterium cellulosolens*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **287**, 34-40 (2008).
- 9) T. Senoura, H. Taguchi, S. Ito, S. Hamada, H. Matsui, S. Fukiya, A. Yokota, J. Watanabe, J. Wasaki and S. Ito: Identification of the cellobiose 2-epimerase gene in the genome of *Bacteroides fragilis* NCTC 9343. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 400-406 (2009).
- 10) T. Senoura, S. Ito, H. Taguchi, M. Higa, S. Hamada, H. Matsui, T. Ozawa, J. Shigeki, J. Watanabe, J. Wasaki and S. Ito: New microbial mannan catabolic pathway that involves a novel mannosylglucose phosphorylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **408**, 701-706 (2011).
- 11) T. Ojima, W. Saburi, H. Sato, T. Yamamoto, H. Mori and H. Matsui: Biochemical characterization of a thermophilic cellobiose 2-epimerase from a thermohalophilic bacterium, *Rhodothermus marinus* JCM 9785. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press.
- 12) J. Watanabe, M. Nishimukai, H. Taguchi, T. Senoura, S. Hamada, H. Matsui, T. Yamamoto, J. Wasaki, H. Hara and S. Ito: Prebiotic properties of epilactose. *Journal of Dairy Science*, **91**, 4518-4526 (2008).
- 13) M. Nishimukai, J. Watanabe, H. Taguchi, T. Senoura, S. Hamada, H. Matsui, T. Yamamoto, J. Wasaki, H. Hara and S. Ito: Effects of epilactose on calcium absorption and serum lipid metabolism in rats. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 10340-10345 (2008).
- 14) T. Suzuki, M. Nishimukai, M. Takechi, H. Taguchi, S. Hamada, A. Yokota, S. Ito, H. Hara and H. Matsui: The nondigestible disaccharide epilactose increases paracellular Ca absorption via rho-associated kinase- and myosin light chain kinase-dependent mechanisms in rat small intestines. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 1927-1932 (2010).
- 15) H. Hara, T. Suzuki, T. Kasai, Y. Aoyama and A. Ohta: Ingestion of guar gum hydrolysate, a soluble fiber, increases calcium absorption in totally gastrectomized rats. *J. Nutr.*, **129**, 39-45 (1999).
- 16) K. Shiga, M. Nishimukai, F. Tomita and H. Hara: Ingestion of difructose anhydride III, a non-digestible disaccharide, prevents gastrectomy-induced iron malabsorption and anemia in rats. *Nutrition*, **22**, 786-793 (2006).
- 17) T. Suzuki, M. Nishimukai, A. Shinoki, H. Taguchi, S. Fukiya, A. Yokota, W. Saburi, T. Yamamoto, H. Hara and H. Matsui: Ingestion of epilactose, a non-digestible disaccharide, improves postgastrectomy osteopenia and anemia in rats through the promotion of intestinal calcium and iron absorption. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 10787-10792 (2010).