

平成23年度特別経費（プロジェクト分）
「香川グライコリソース（希少糖・ヒト型糖鎖）を用いたナノ糖質生命科学研究推進事業」
研究グループ別研究成果報告書

（本報告書は、必要に応じてホームページ上で公開しますので、知的財産に関連する記述等については注意してください。）

研究組織			
研究グループの組織について記述してください。メンバーは教員ばかりでなく、本研究に携わっている非常勤職員・学生も記載してください。			
研究課題名	希少糖基礎研究の新展開		
グループリーダー	氏名	所属・職名	連絡先
	徳田雅明	希少糖研究センター長	e-mail
			本人
秘書等			
メンバー	氏名	所属・職名 (学年)	分担事項・役割等
	徳田雅明	希少糖研究センター長	希少糖の理化学的性質に基づく機能性のスクリーニング
	深田和宏	希少糖研究副センター長	希少糖及びその誘導体の理化学的性質の解析
	森本兼司	希少糖研究セ・准教授	イズモリング希少糖の多種・中規模量での生産
	吉原明秀	希少糖研究セ・助教	イズモリング希少糖の多種・中規模量での生産
	早川 茂	農学部・教授	食品利用に関わる希少糖の理化学的性質と機能性についての研究
	岡光政和	農学部・大学院生 (M2)	ケトヘキソースの溶液物性の解明
	藤原希規	農学部・大学院生 (M1)	ブシコースを含む複合単糖混合結晶の生成条件の検討
	濱前 奈未	農学部・大学院生 (M2)	糖化タンパク質の食品特性の解析

平成 23 年度研究成果概要

研究成果概要についてわかりやすく記載してください。できるだけ、図を挿入してください。すでに当該年度に外部に発表を行った成果については、研究業績欄の業績番号と対応させてください。

① これまで効率的な生産が困難であった希少ヘキソースの生産

昨年度は D-グルコースの生産に焦点をあて、二糖（ラクチトール）を出発原料とする方法を開発した。ラクチトール中のグルコースの 3 位を脱水素する酵素を産生する微生物 *Agrobacterium tumefaciens* M31 によって 3-ケトラクチトールを生産し、それに水素添加して D-グルシル-(β1,4)-D-ソルビトールを得た。さらに酸加水分解を行うことで D-グルコースが得られた。この方法による収率（約 1% 程度）は従来法よりは 10 倍高い。こうして得られた D-グルコースを結晶化し、X 線結晶解析を試みているが未だ十分な解析には至っていない。原因としてその純度の低さが 1 つ考えられたため、再精製やエタノールからの結晶化などを試み、より純度の高い D-グルコースの結晶を調製中である。

なお L-イドースの生産については、酵素法による良い結果が現在まで得られていない。

② デオキシ希少糖類の生産

自然界に存在するデオキシ糖である L-フコースや L-ラムノースを出発原料とし、酵素を用いた異性化反応、微生物を用いた酸化反応、ラネーニッケル触媒もしくは水素化ホウ素ナトリウムを用いた還元反応を組み合わせることで 6-デオキシ-D-アロース、6-デオキシ-D-アルトロース、1-デオキシ-L-タガトース、1-デオキシ-D-ソルボースなどのデオキシ希少糖を新たに生産した（下図参照）。以上により、イズモリング中で様々な反応を触媒する酵素や微生物は、炭素第 1 位や第 6 位がメチル基となっているデオキシ糖に対しても触媒作用を示すことが確認された。

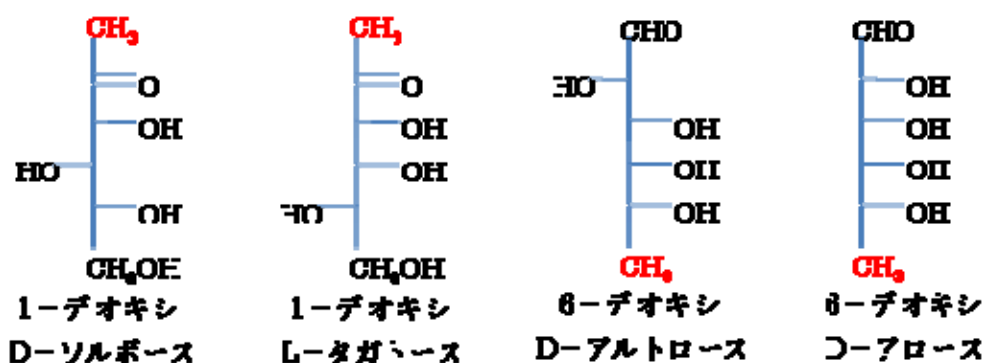


図. L-ラムノースと L-フコースから新たに生産したデオキシ希少糖

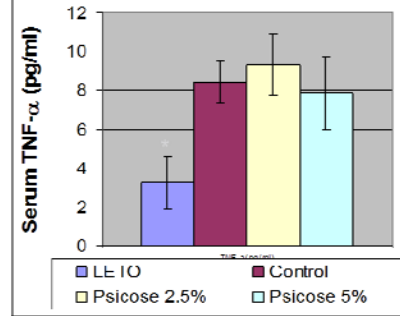
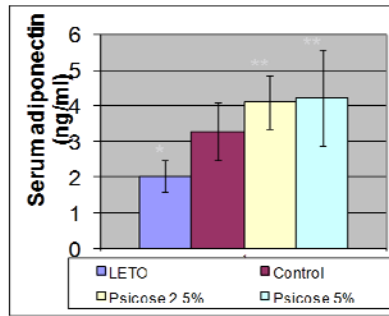
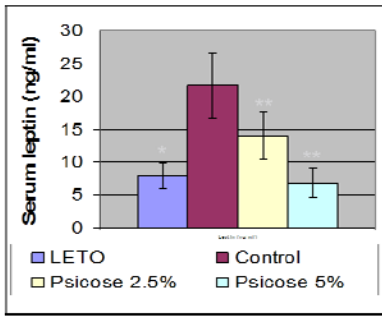
③ 希少六炭糖の互変異体の存在量の評価と熱力学的安定性/デオキシ糖の物性評価

4 種のケトースの水溶液中における互変異体の存在割合を ¹³C-NMR で詳細に測定した。特に、存在量の少ない（1% 以下）非環状体の存在割合を明らかにし、紫外吸収との関係からケトース分子中のカルボニル基のモル吸光係数を明らかにした。これらのデータから、溶液内における各種ケトース分子の互変異体の構造安定性に関する熱力学量（生成モルギブズ自由エネルギー）を求めた。

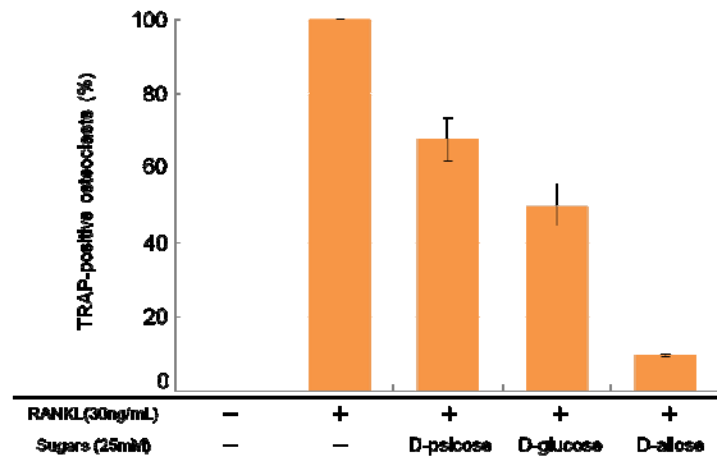
新規デオキシ希少糖の物性評価（融点・溶解度・溶解熱・旋光度・各種分光学的性質等）については、未だ試料量に制限があるため一部しか行っていない。

④

希少糖 D-プシコースを用いた抗肥満効果についてメカニズムの解析を行った。D-プシコースにより肥満に関連するホルモンであるレプチンは D-プシコースにより減少し、アディポネクチンは増加することが判った。炎症性サイトカインである TNF-α は軽度減少傾向が見られた。この成果は生理研研究会において発表した（招待講演 1, 2, 学会発表 1, 2）。



また、D-アロースの破骨細胞分化抑制作用について破骨細胞培養系において研究した。破骨細胞誘導物質（RANKL）の投与により起こる分化をD-アロースは著明に抑制した。これらの結果は論文化した(論文1, 学会発表3)。次にこの効果を検証するため骨粗鬆症モデル動物への投与実験を行った。メスのマウスを用い、卵巣摘出群と非摘出群において、飲水にD-アロースを添加（5%）したものと非添加のもので8週間飼育し、骨密度や骨強度について解析を行った。全体としてD-アロースにより骨の強度が増加していることが判った。さらに詳細な検討を行っていく予定である。



⑤ D-プシコースを食品素材・甘味料に用いた健康機能を有する食品開発のための基盤研究

希少糖の一つであるD-プシコースは、砂糖の70%の甘さがありノンカロリーという特徴を有した還元糖である。また、食後血糖値上昇抑制作用や抗肥満作用が報告されている。D-プシコースを食品加工に用いた場合、食品の加工特性を向上させるとともに食品タンパク質との間で起こるメイラード反応により、食品にアロマや色調、抗酸化活性を与える。更に糖類は食品に甘みを与えるだけでなく、風味を整える、水分を保持するなど様々な加工機能を有していることが知られている。そこで、D-プシコースをチーズケーキに用いた時に得られる食品特性について調べた。

多くの食品に用いられている糖はスクロースである。そこで、ベーカリー食品のモデルとして、スクロース100%のものをコントロールとして、20%、50%をD-プシコースに置き換えたバイクドチーズケーキを作製した。D-プシコースを添加することにより、コントロールに比べてD-プシコースの添加量が増加するにもなって褐色度合いが強くなった。さらに、D-プシコースの配合割合が増加するに従って高い抗酸化活性を有していた（下図参照）。これは、D-プシコースが還元糖のためメイラード反応が促進されて抗酸化物質がより多く生成されたためと考えられる。物性測定において、D-プシコースに置き換えることによって破断応力が上昇する一方、破断歪率はコントロールと変わらない結果となり、コントロールよりも崩れにくく、しっかりとした生地であるということがわかった。

スクロースの50%をD-プシコースに置き換えて作製したバイクドチーズケーキを用いた微生物の増殖傾向を測定した実験では、スクロースをD-プシコースに置き換えたことで栄養源が少なくなったことや、メイラード反応で生成したメラノイジンの働きによって微生物の生育に対して影響を与える結果となった。一般性細菌および *M. luteus* を用いた実験より、D-プシコースそのもの、もしくはD-プシコース添加によって生成した物質によって、微生物の生育に対して何らかの影響

を与えることがわかった。

以上の結果より、ベーカリー食品に使用されているスクロースを D-プシコースに一部置き換えることで保存による食感の損失を防ぎ、微生物による品質劣化を遅らせる働きがあることがわかった。本研究の結果から D-プシコースは特にベーカリー食品に用いると、機能性を付与させ、保存性の向上を期待できるなど様々な効果を得られると考えられる。また、D-プシコースを食品の用途により使いわけることで、食品加工において幅広い利用が期待できると考えられる。

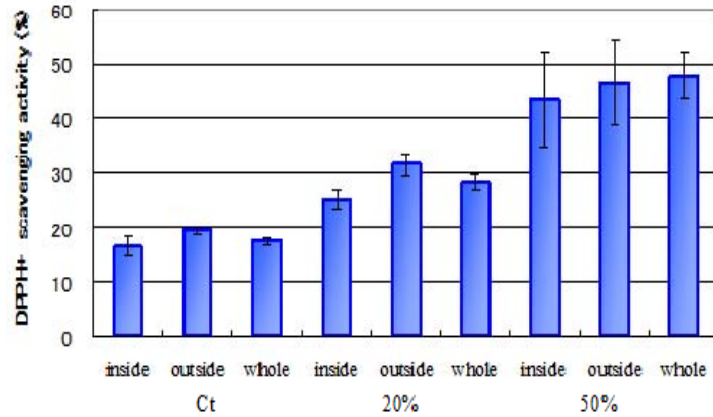


図. 砂糖の 20%、50%を D-プシコースに置き換えて焼成したチーズケーキの DPPH ラジカル消去作用

今後の研究計画

平成 23 年度に得られた研究成果を踏まえ、今後の研究計画について具体的に記載してください。図を挿入してもかまいません。

- ① D-グルコースの X 線結晶解析を実施する。また平成 23 年度中殆ど進捗のなかった L-イドースの生産を成功させて結晶化を試みる。
- ② 複数種の新規デオキシ希少糖を生産するとともに、未だ結晶化されていない試料の結晶化を試みる。
- ③ 六単糖類の溶解度と旋光度のデータを完備すると共に、新規デオキシ希少糖の物性評価を進める。得られた各種希少糖の物性値をデータベース化して WEB 上で公開する。
- ④ 肥満のメカニズム解明を継続して行う。D-プシコース以外にもその誘導体や他の希少糖も用いてより有効な糖を探すことも並行して行いたい。骨粗鬆症への影響については、D-アロースが最も強いが、未だその作用機序には不明な点も多いので、メカニズム解明を進めるとともに、動物実験により D-アロースの最適な使用量や使用方法を明らかにしていく。さらに、希少糖の抗老化作用について、長寿因子としても知られている Sirt1 の発現を中心にマウスにおいて解析を計画している。
- ⑤ 平成 23 年度の研究によってベイクドチーズケーキ中の砂糖の一部を D-プシコースに置き換えることにより、保存による食感の損失を防ぎ、微生物による品質劣化を遅らせる働きがあることがわかった。そこで平成 24 年度は保存性の悪い和菓子の一つであるワラビ餅について、砂糖の一部を D-プシコースに置き換えることにより高品質の保存性の良い和菓子を作製できるかどうか検討する。

特記すべき事項

本研究に関する受賞（学生対象の賞も含む）・プレスリリース・大型外部資金獲得につながった等、特記すべき事項があれば記述してください（ささいなことでもかまいません）。本欄は必須ではありませんので、「該当なし。」でも可ですが、できるだけ記載してください。

研究業績

本研究に関連した、平成 23 年度中の発表した、[1] 査読がある原著論文 (Corresponding Author には*印を付す。), [2] 著書, [3] 招待講演, [4] 学会発表 (発表者には○印), [5] 産業財産権 (特許等), [6] その他 (プロシーディング, 査読がない論文, 投稿記事等) を通し番号を付して記入してください。本事業の参加者にはアンダーラインを引いてください。記入欄が足りない場合は、用紙を追加してください。

[1] 査読がある原著論文

1. Takata, G, Uechi, K., Taniguchi, E., Kanbara, Y., Yoshihara, A., Morimoto, K., Izumori, K.: Characterization of *Mesorhizobium loti* L-rhamnose isomerase and its application to L-talose production. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, **75**(5), 1006-9. (2011).
2. Jenkinson, S.F., Fleet W.J.G., Nash, R.J., Koike, Y., Adachi, I., Yoshihara, A., Morimoto, K., Izumori, K., Kato, A.: Looking-Glass Synergistic Pharmacological Chaperones: DGJ and L-DGJ from the Enantiomers of Tagatose. *Organic Letters*. **13**(15), 4064-4067. (2011).
3. Ikeda, S.*, Gohtani, S., Fukada, K., and K., Amo, Y.: Dielectric Relaxation and Water Activity in Aqueous Solution of D-Psicose. *Jpn. J. Food Eng.*, **12**, 67-74 (2011).
4. Yamada K, Noguchi C, Kamitori K, Dong Y, Hirata Y, Hossain MA, Tsukamoto I, Tokuda M, Yamaguchi F*. Rare sugar d-allose strongly induces thioredoxin-interacting protein and inhibits osteoclast differentiation in Raw264 cells. *Nutr Res*. **32**(2), 116-23 (2012).

[2] 著書

該当なし。

[3] 招待講演

森本兼司：希少糖の世界とその活用方法について。平成 23 年度みえメディカル研究会 (第 2 回), 生物資源有効活用研究会 pp 2-6 (2011).

徳田雅明：希少糖 D-プシコースの 2 型糖尿病ラット OLETF の抗糖尿・抗肥満作用 生理研研究会 「中枢・末梢臓器連関による生体恒常性と仲介分子機構」2012 年 2 月 10 日 生理学研究所岡崎コンファレンスセンター (岡崎市)

徳田雅明：D-プシコースの抗動脈硬化・抗肥満作用の展望かがわ糖質バイオフォーラム 2012 年 2 月 14 日 かがわ国際会議場 (高松市)

[4] 学会発表(○は発表者)

- 1 ○Lumyong, S., Siangsuepchart, A., Yoshihara, A., Morimoto, K., Izumori, K.: Production of D-lyxose from D-xylose by enzymatic and microbial reaction. Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, International Society of Rare Sugar, Kagawa, 26. (2011).
- 2 ○Terami, Y., Yoshihara, A., Takata, G., Morimoto, K., Izumori K.: Cloning and characterization of a novel gene encoding L-ribose isomerase from *Raoultella ornithinolytica* MB426 in *Escherichia coli*. Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, International Society of Rare Sugar, Kagawa, 61. (2011).
- 3 ○Nonogaki, Y., Hayai, Y., Yoshihara, A., Morimoto, K., Kamitori, S., Wormald, M.R., Fleet, G.W.J., Izumori, K.: D-Xylose isomerase is active on 1-deoxy-3-keto- D-galactitol. Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, International Society of Rare Sugar, Kagawa, 62. (2011).
- 4 ○Kuroda, T., Wakabayashi, T., Yoshihara, A., Morimoto, K., Fleet, G.W.J., Izumori, K.: D-Tagatose 3-epimerase is active on ketotetroses. Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, International Society of Rare Sugar, Kagawa, 63. (2011).
- 5 ○Shompoosang, S., Morimoto, K., Yoshihara, A., Wormald, M.R., Jenkinson, S.F., Fleet, G.W.J., Izumori, K.: Production of 6-deoxy-L-altrose and 6-deoxy-L-allose from L-rhamnose by enzymatic reactions. Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, International Society of Rare Sugar, Kagawa, 64. (2011).
- 6 ○Momoji, A., Yoshihara, A., Morimoto, K., Wormald, M.R., Fleet, G.W.J., Best, D., Izumori, K.: Production of novel 5-deoxy-hexose from 2-deoxy-D-glucose. Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, International Society of Rare Sugar, Kagawa, 65. (2011).
- 7 ○Uechi, K., Yoshihara, A., Morimoto, K., Takata, G., Izumori, K.: Cloning and characterization of mutant L-ribulose 3-epimerase for production of rare sugars from *Mesorhizobium loti*. Rare Sugar

- Congress 2011 in Kagawa, International Society of Rare Sugar, Kagawa, 66. (2011).
- 8 ○Mogami, K., Yoshihara, A., Kenji Morimoto, K., Fleet, G.W.J., Ken Izumori, K.: Production of novel 4-deoxy-pentoses from 2-deoxy-D-ribose. Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, International Society of Rare Sugar, Kagawa, 67. (2011).
 - 9 ○Siangsuepchart, A., Yoshihara, A., Izumori, K., Morimoto, K., Lumyong, S.: D-Lyxose production from D-xylose using D-mannose isomerase and D-xylose isomerase (sweetzyme). Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, International Society of Rare Sugar, Kagawa, 69. (2011).
 - 10 ○Fukada, K., Ogawa, T., Fukada, H., Oshima, H. and Izumori, K.: Basic solution properties of ketohexoses. Rare Sugar Congress in Kagawa 2011, 高松, 2011年11月
 - 11 ○Okamitsu, M., Fukada, K., and Sato, M.: Relation between spectroscopic property and molecular structure of ketohexoses in solution. Rare Sugar Congress in Kagawa 2011, 高松, 2011年11月
 - 12 ○Fujiwara, K., Fukada, K., and Izumori, K.: Mixed sugar crystallization from solution phase. Rare Sugar Congress in Kagawa 2011, 高松, 2011年11月
 - 13 ○Ishii, T., Tahara, Y., Yamauchi, A., Kayahara, S., Ohga, S., Fukada, K., Morimoto, K., Izumori, K., Kamitani, S., and Yoshida, H.: Crystal structures and electronic structures of rare sugar molecules and supermolecules. Rare Sugar Congress in Kagawa 2011, 高松, 2011年11月
 - 14 ○Kozakai, T., Fukada, K., and Izumori, K.: Co-crystallization of D-psicose and D-allose mixture. Rare Sugar Congress in Kagawa 2011, 高松, 2011年11月
 - 15 ○Yamauchi, A., Kayahara, S., Ohga, S., Ishii, T., Fukada, K., Morimoto, K., Izumori, K., Sato, M., and Sakane, G.: Powder pattern X-ray crystal structural analysis of β -D-gulose. Rare Sugar Congress in Kagawa 2011, 高松, 2011年11月
 - 16 ○岡光政和, 深田和宏, 佐藤正資: ケトヘキソース類の分光学的性質と水溶液内分子構造. 日本化学会西日本大会, 徳島 (徳島大学), 2011年11月
 - 17 ○Masaaki Tokuda, Ken Izumori, Kazuhiro Fukada, Shigeru Hayakawa, Mohammad Akram Hossain, Tetsuo Iida, and Kazuhiro Okuma: How the New frontier of D-psicose world has been created in Kagawa. The 5th Symposium of International Society of Rare Sugars, 高松, 2011年11月
 - 18 ○Mohammad Akram Hossain*, Yuko Hirata, Kazuyo Kamitori, Youyi Dong, Fuminori Yamaguchi, Koji Murao, Akira Nishiyama, Ikuko Tsukamoto, Yukiyasu Toyoda, Tetsuo Iida, Masaaki Tokuda: D-psicose supplementation modulates glucose homeostasis and pancreas β -islet function in type 2 diabetes model, OLETF rats. The 5th Symposium of International Society of Rare Sugars, 高松, 2011年11月
 - 19 ○Fuminori Yamaguchi, Kana Yamada, Chisato Noguchi, Kazuyo Kamitori, Youyi Dong, Yuko Hirata, Mohammad A Hossain, Ikuko Tsukamoto, Masaaki Tokuda: Rare sugar D-allose strongly induces thioredoxin interacting protein (TXNIP) and inhibits osteoclast differentiation in Raw264 cells. The 5th Symposium of International Society of Rare Sugars, 高松, 2011年11月
 - 20 ○濱前奈未, 早川 茂, 小川雅廣: 希少糖 D-プシコースを用いたチーズケーキの食品特性, 日本農芸化学会 2011年度大会 2011年3月 京都女子大学, 京都.
 - 21 ○濱前奈未, 早川 茂, 小川雅廣: 希少糖 D-プシコースを用いたチーズケーキの食品特性, 平成 23 年度日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会 2011年9月 宮崎大学, 宮崎県 講演要旨 p18.
 - 22 ○Hayakawa, S., Ogawa, M.: D-Psicose may replace sucrose for improving the quality of food products, Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, International Society of Rare Sugars, p.44, 高松, 2011年11月
 - 23 ○Hamamae, N., Hayakawa, S., Ogawa, M.: Effect of D-psicose on the quality of bakery foods, Rare Sugar Congress 2011 in Kagawa, International Society of Rare Sugars, p.90, 高松, 2011年11月

[5] 産業財産権 (特許等)

該当なし。

[6] その他 (プロシーディング, 査読がない論文, 投稿記事等)

該当なし。