

平成22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

<b>研究組織</b>			
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	TEL
			e-mail
			本人 秘書等
	tokuda@med.kagawa-u.ac.jp		
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	希少糖研究センター・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	希少糖研究センター・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
	池田新矢	農学部・准教授	希少糖及びその誘導体の誘電緩和
	加藤明宏	農学部・大学院生 (M2)	デオキシ希少糖の生産の改良
	竹地紀昭	農学部・大学院生 (M2)	希少糖含有二糖の生産
	岡光政和	農学部・大学院生 (M1)	ヘキサースの溶液物性の解明
	吉澤圭祐	農学部・大学院生 (修了済)	糖化タンパク質の作製および構造解析
	O'Charoen Siwaporn	農学部・大学院生 (M2)	糖化タンパク質の構造解析
濱前 奈未	農学部・大学院生 (M1)	糖化タンパク質の食品特性の解析	

## 平成 22 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。なお、本欄は、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。

### ① 希少糖 D-グルコースの生産

希少糖には遊離型が約 50 種、1 位または 6 位がデオキシ化されたデオキシ希少糖が 48 種存在する。遊離型希少糖のうち六炭糖についてはイズモリングに基づく生産系を確立しているが、そのうち効率的な生産の難しい希少糖として D-グルコースや D-イドースが挙げられる。そこで今年度は、D-グルコースに焦点をあて、二糖を出発原料として生産することにした。ラクチトールのグルコースの第 3 位を脱水素する酵素を有する微生物 *Agrobacterium tumefaciens* M31 により 3-ケトラクトールを生産し、それを水素添加し D-グルシル-(β1,4)-D-ソルビトールを得た。さらに酸加水分解し、D-グルコースを得た。収率は従来法より 10 倍高く、原料の約 1% 程度であった。

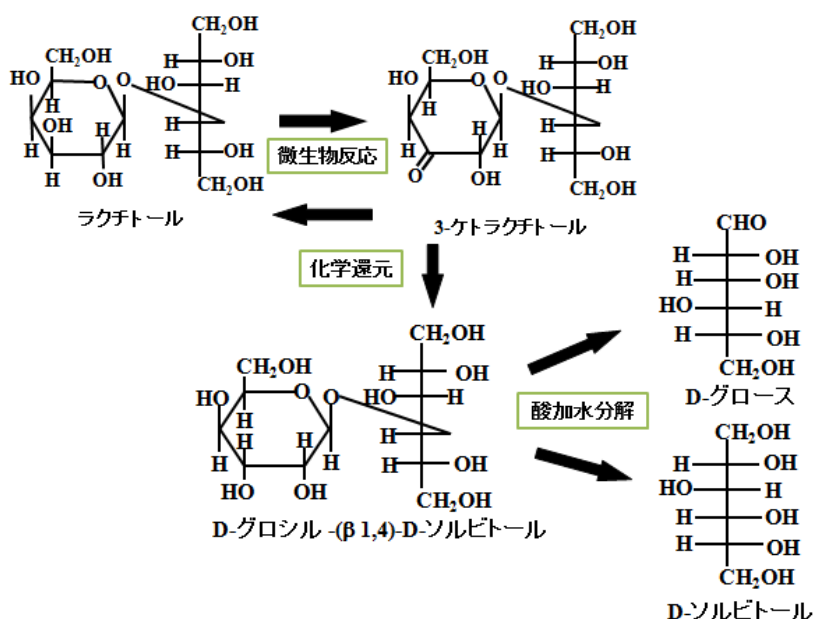


図1. 二糖を用いた希少糖D-グルコースの生産

### ② L-フコースやL-ラムノースを出発原料としたデオキシ希少糖の生産

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および金属触媒を用いた還元反応を組み合わせることで複数のデオキシ希少糖の生産に成功した。特に、生理活性が期待される 6-デオキシ-D-プシコースに関しては、出発原料として L-フコースを用いることで、従来の生産法よりも簡便で収率の高い生産方法を確立することができた。また、6-デオキシ-L-プシコース、6-デオキシ-L-アロース、6-デオキシ-L-タガトース、1-デオキシ-D-タガトースについては結晶化に成功した。

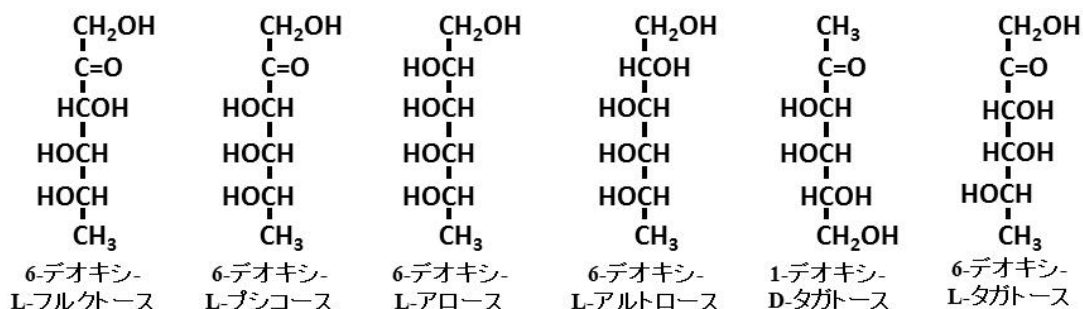
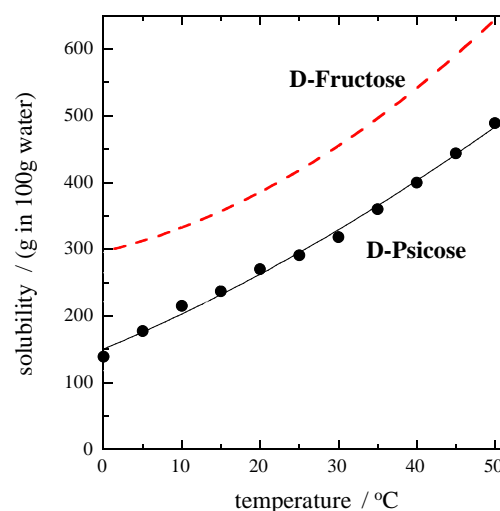


図2. L-ラムノースと L-フコースから生産したデオキシ希少糖

### ③ D-プシコースの単結晶構造解析・溶解度・偏旋光挙動

大量生産法が確立している希少糖 D-プシコースの単結晶構造を決定すると共に、水への溶解度の温度依存性 (図 3 参照), 及び溶解した後の分子構造変化を反映する偏旋光挙動を明らかにして報告した (研究業績: 原著論文 4).

図 3. D-プシコースの水中への溶解度



### ④ ヘキソース類の水溶液物性に関する研究

水溶液中での単糖の熱力学的安定性を定量的に評価するため, 主としてケトヘキソースの生成ギブズモル自由エネルギーを単糖異性化酵素反応の実験から得られた平衡定数データを活用して見積った. また, 希少糖を含む各種ヘキソース水溶液の粘度, 密度, 音速の精密測定を行い, それぞれの単糖の極限還元粘度, 部分モル体積, 部分モル断熱圧縮率を見積ると共に, 各ヘキソースの水和数を求めた. (なお, D-プシコースに対して得られた水和数は誘電緩和測定から求めた値とほぼ一致することが確かめられた).

### ⑤ 誘電緩和測定による希少糖の水和挙動に関する研究

食品への応用が期待されている希少糖 D-プシコースの水和現象を理解することを目的として, 糖水溶液の誘電緩和および水分活性を計測した. 熱力学的な考察により糖 1 分子あたりに水和している水分子の数を求めたところ, フルクトース $\approx$ D-プシコース $\approx$ グルコース $<$ スクロース $<$ マルトース $<$ トレハロースの順に大きくなった. また糖の水和反応の平衡定数の値は, グルコース $<$ フルクトース $\approx$ D-プシコース $<$ トレハロース $<$ スクロース $<$ マルトースの順に大きくなった. これらの結果から D-プシコースの水和挙動は立体異性体であるフルクトースの水和挙動と類似することが明らかとなった. 糖の水和現象は糖を含む食品の品質および保蔵性と深い関連があるため, 本研究で得られた知見は希少糖を用いた食品の製造・開発に有用な指針を与えると考えられる. 研究成果を論文としてまとめ, 当該分野の学会誌に投稿した.

### ⑥ メイラード反応によって糖化したタンパク質の構造と機能性に関する研究

メイラード反応はタンパク質と還元糖との間に生じる非酵素的褐変反応であり, 様々な食品の品質形成や劣化に関する最も重要な成分間反応である. 本反応は, 食品タンパク質に熱安定性, 乳化活性, 起泡性, 抗酸化性などの多くの機能性を与えることが知られている. 本研究では, 牛乳ホエータンパク質や卵白タンパク質をはじめとする食品タンパク質とプシコースやアロースといった希少糖を併用し, メイラード反応による糖化タンパク質を調製して, 様々な機能性や構造的特徴, 食品加工特性について調べた.

ホエータンパク質/卵白タンパク質混合溶液に D-ケトヘキソース 4 種および D-アロースを重量比が 100 : 16 になるように混合して凍結乾燥後, 50°C, 相対湿度 35% の条件で 48 時間保温し, 糖化ホエータンパク質/卵白タンパク質 (糖化 WPI/EWP) を調製した. 糖化 WPI/EWP では, 遊離アミノ基量の低下および褐変度と蛍光強度の上昇がみられ, メイラード反応の進行が確認できた. 糖の違いによる反応性の違いが見られ, 特にアロースおよびタガトースの高い反応性が確認できた. SDS-PAGE により, D-ケトヘキソース付加 WPI/EWP においては, 凝集体が形成されたことによる溶解度の低下が見られた.

各糖化 WPI/EWP の抗酸化性, 乳化性および起泡性について比較を行った. DPPH 法と ABTS 法における比較により, アロースおよびプシコース付加で高い抗酸化性が得られることが分かった (Fig.1). 乳化性は乳化活性と乳化安定性から評価したが, とともにプシコースおよびソルボース

付加において高い乳化性を有した。また糖化によって、特にブシコース付加で起泡超過の高い伸展性のある泡沫が形成された。起泡力に優れ、起泡安定性も維持されていたことから、卵白に匹敵する起泡性を有することが分かった。

糖化 WPI/EWP 加熱ゲルの破断強度測定と保水率測定を行った。糖化によって破断応力、破断歪率ともに上昇し、特にブシコース付加でより高い値が得られた。保水率の上昇も顕著であり、糖化によって破断強度の増した壊れにくいゲルが形成され、より保水性に優れたタンパク質素材になることが分かった。また、ホエータンパク質と卵白タンパク質を併用することで、より幅広い pH で良好なゲル化性や高い保水性が発現できることが分かった (Fig.2)。

また、実際に食品加工時に与える影響を調べるため、糖化タンパク質を用いたソーセージ加工を行い、ソーセージの物性比較を行った。糖化タンパク質添加時には、無添加のものと比較すると離水が少なくなり、わずかに柔らかいソーセージが形成された。このため、糖化タンパク質の有する保水性は、食品中においても維持されている。

以上のような様々な機能特性を有した糖化タンパク質は、食品由来の機能性タンパク質素材として食品加工、特に食品の品質改良に利用できると考えられた。

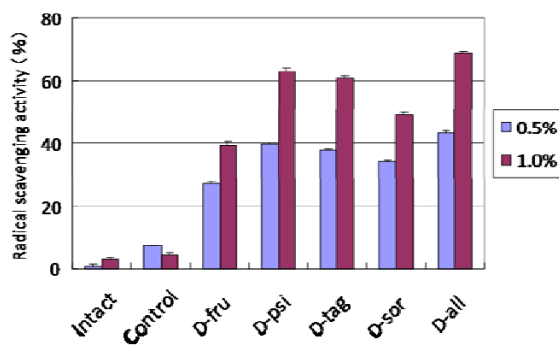


Fig. 1 Comparison of DPPH radical scavenging activity of Intact and glycosylated WPI/EWP.

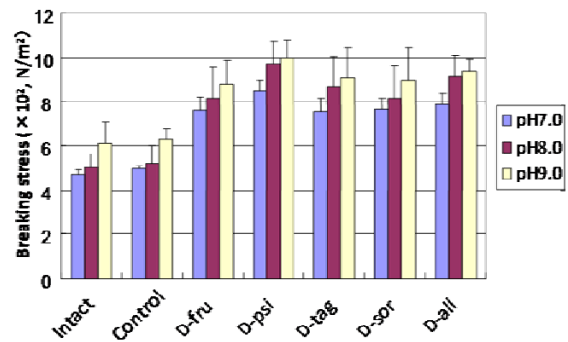


Fig.2 Breaking stress of heat-induced gels of Intact and glycosylated WPI/EWP at different pHs.

## 今後の研究計画

平成 22 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 遊離型の希少六炭糖のうちでイズモリングに基づく方法では効率的生産が困難であった L-イドースを新たな手法によって生産し、その結晶化を試みる。
- ② 構造の異なるデオキシ希少糖を複数種生産し、その結晶化を試みる。
- ③ 希少六炭糖の水溶液内での互変異体の存在割合を種々の温度で測定し、溶液内における炭糖分子の構造安定性に関する熱力学量を求める。また、今後生産が見込まれる L-イドース及び新規デオキシ希少糖の基本物性（融点・溶解度・溶解熱・旋光度・各種分光学的性質等）のデータ集積を進める。
- ④ 生産できたデオキシ希少糖を用いて遺伝子発現やタンパク質発現プロファイルを解析する。
- ⑤ D-プシコースを食品素材・甘味料として用いた健康機能を有する食品開発のための基盤的研究を進める（具体的内容を以下に記す）。

D-プシコースを食品素材として加えたときの抗酸化性の上昇、加工特性の向上、不快臭の抑制などの原理を解析し、安全性・嗜好性・健康機能性を兼ね備えた新たな加工食品を生産するため、D-プシコースを添加したさまざまな食品について抗酸化性、加工特性、不快臭について解析する。D-プシコースのみがこれら加工特性についての優位性を有するかどうかについて確認するために、他のケトヘキソース 7 種類についても同様に解析する。対象食品としてはこれまでに加工特性に優れていることが分かっている、プリン、スポンジケーキ、かまぼこ、ソーセージ、パン、スポンジケーキ、ヨーグルトとする。

- 1) 食品素材として加工した時に生じるさまざまな成分間反応を解析し、製品の性質にもたらすD-プシコースの効果を調べる。食品を構成するタンパク質や炭水化物とD-プシコースの相互作用を解析し、D-プシコースの影響を明らかにする。
- 2) 食品加工工程や保存中におけるD-プシコースの安定性・量的変化を解析し、D-プシコースが食品成分とどのように反応するか解析する。
- 3) 各種食品の加工の際に生じる不快臭を機器分析し、D-プシコースがどの程度不快臭生成を抑制できるかを検定する。

中高年齢者の生活習慣病を予防する食品は既にいくつか市場に出回っているが、D-プシコースのようにノンカロリーでかつさわやかな甘みを有し、食品加工に適した糖を利用した製品は見あたらない。大量生産することが可能となったD-プシコースを用いて、健康に良く、嗜好性のある食品の開発基盤を築くことは学術的にも社会的にも価値がある。また、研究成果で得られた観点を総合化し、様々な種類のD-プシコース入り食品の開発に結びつけていく。

## 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。

該当なし。

## 研究業績

本研究に関連した，[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。なお，本欄は，必要に応じてホームページ上で公開します。

### [1] 査読がある原著論文

1. Rao D, Best D, Yoshihara A, Gullapalli P, Morimoto K, Wormald MR, Wilson FX, Izumori K, Fleet WJ. G.: A concise approach to the synthesis of all twelve 5-deoxyhexoses: D-tagatose-3-epimerase—a reagent that is both specific and general. *Tetrahedron Letters*, **50(26)**, 3559–3563, (2009).
2. Gullapalli P, Yoshihara A, Morimoto K, Rao D, Akimitsu K, Jenkinson S.F, Fleet WJ.G, Izumori K.: Conversion of L-rhamnose into ten of the sixteen 1- and 6-deoxyketohehexoses in water with three reagents: D-tagatose-3-epimerase equilibrates C3 epimers of deoxyketoses. *Tetrahedron Letters*, **51(6)**, 895–898, (2010).
3. Kazuhiro Fukada\*, Tomohiko Ishii, Katsushi Tanaka, Masatsugu Yamaji, Yuya Yamaoka, Ken-ichi Kobashi, Ken Izumori. Crystal Structure, Solubility, and Mutarotation of the Rare Monosaccharide D-Psicose. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **83(10)**, 1193–1197 (2010).
4. Ikeda, S.\*; Gohtani, S.; Fukada, K.; Amo, Y. Dielectric relaxation and water activity in aqueous solution of D-psicose. Submitted to *Jpn. J. Food Eng.*.

### [2] 著書

良くわかる食品新素材、監修 早川幸男・小林昭一、編集 榎菓子・食品新素材技術センター、食品新素材事業部幹事会、(株)食品化学新聞社 (2010)。(分担執筆:深田和宏「第3章 希少糖:D-タガトース、D-プシコース」pp 180-182.) ISBN: 978-4-916143-19-8

### [3] 招待講演

該当なし

### [4] 学会発表

1. ○加藤明宏、吉原明秀、森本兼司、高田悟郎、何森健: 6-デオキシ-D-プシコースの新規生産法の確立. 223. 2010年度日本農芸化学会(2010)
2. ○Morimoto K, Miyake S, Yoshihara A, Takata G, Izumori K.: D- glucoside 3-dehydrogenase (G3DH) from *Agrobacterium tumefaciens* M31. 3rd Joint between Chiang Mai University-Kagawa University Academic Symposium. 129. (2010)
3. ○Takechi N, Morimoto K, Yoshihara A, Takata G, Izumori, K.: Production of new disaccharides contained rare sugar D-allose. 3rd Joint between Chiang Mai University-Kagawa University Academic Symposium. 136. (2010)
4. ○松本麻里子、吉原明秀、ラオ ディベンダー、森本兼司、高田悟郎、何森健: 異性化酵素を用いた6-デオキシ-L-アロース、6-デオキシ-L-アルトロースの生産法の確立. 2010年度日本農芸化学会中四国支部大会. 40. (2010).
5. ○加藤明広、吉原明秀、森本兼司、高田悟郎、何森健: 6-デオキシ-D-プシコース及び6-デオキシ-D-アロースの新規生産法の確立. 2010年度日本農芸化学会中四国支部大会. 53. (2010).
6. ○竹地紀昭、森本兼司、吉原明秀、高田悟郎、何森健: 希少糖D-アロースを含む新規二糖の生産. 2010年度日本農芸化学会中四国支部大会. 54. (2010).

7. ○古田睦、吉原明秀、森本兼司、高田悟郎、何森健：*Enterobacter aerogenes*由来キシリトールデヒドロゲナーゼの検討。 2010年度日本農芸化学会中四国支部大会。 55. (2010).
8. ○森本兼司、吉原明秀、横田有香、古田睦、高田悟郎、何森健：*Enterobacter aerogenes* IK7由来のL-アラビノースイソメラーゼを用いたL-アルトロースの生産。 平成22年度 日本生物工学会大会、67. (2010).
9. ○吉原明秀、ラオ ディベンダー、森本兼司、フリート ジョージ WJ、何森健： 各種異性化糖を利用した6-デオキシターロースの生産。 平成22年度 日本生物工学会大会、67. (2010).
10. ○森本兼司、吉原明秀、横田有香、古田睦、高田悟郎、何森健：*Enterobacter aerogenes* IK7由来のL-アラビノースイソメラーゼ遺伝子の大量発現系の構築と組換え酵素を用いた希少糖の生産。 平成22年度 日本生物工学会大会、68. (2010).
11. ○Kazuhiro Fukada, Harumi Fukada, Ken Izumori, Thermodynamic Properties of Hexoses in Aqueous Solution. 21st IUPAC International Conference on Chemical Thermodynamics ICCT-2010 , つくば, 2010年.
12. ○Kazuhiro Fukada, Yoshiaki Furuta, Yasuhiro Kawanami, Interfacial Properties of Regioselectively Acylated Sugar-based Surfactants. International Conference on Nanoscopic Colloid and Surface Science NCSS 2010, 幕張メッセ, 2010年.
13. ○Kazuhiro Fukada, Masakazu Okamitsu, Relation between molecular structure and solution property of monosaccharides: solubility, viscosity, and compressibility of ketohexoses in aqueous solution. 2010年環太平洋国際化学会議：2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Hawaii, USA, 2010年.
14. ○Masaaki Tokuda, Mohammad Akram Hossain, Ikuko Tsukamoto, Akira Nishiyama, Koji Muraio, Youyi Dong, Fuminori Yamaguchi, Kazuyo Kamitori, Yuko Hirata, Wise usage of functional foods: Rare sugars, the new bio-materials for healthy society. The 3rd Joint Symposium between Chiang Mai University and Kagawa University (2010).
15. ○O' Charoen Siwaporn, Hayakawa Shigeru, Ogawa Masahiro, Functional Improvement of Egg White Protein by Rare Ketohexoses, 日本農芸化学会2011年度大会, 京都 (2011.3).

[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。