

植物香気前駆体を中心とした配糖体および 誘導体の効率的酵素合成技術の開発

担当機関名	研究期間
天野エンザイム株式会社	平成14年度～平成16年度

I. 3カ年の研究成果の要約

1. 技術開発課題の目的

- (1) エンドグリコシダーゼの一種である β -プリメベロシダーゼを触媒素子として、プリメベロース二糖単位と一連のアルコール系香気成分を結合し、植物中に微量成分として存在する香気前駆配糖体を酵素合成する実践的かつ量産化可能な技術を開発する。またプリメベロシド配糖体だけでなく種々糖鎖を持つ配糖体を効率よく安価に製造することにより、様々な分野での応用を可能とする。
- (2) 合成した各種香気二糖配糖体の香気材料としての評価や応用開発、生理的役割の解明などを行い付加価値の高い糖質マテリアルの創製を行う。
- (3) β -プリメベロシダーゼのみでなく、安価な乳糖を用いてセルラーゼの縮合反応を利用して、一段階の反応でオリゴ糖をアグリコンに配糖化できる技術を用い、アグリコン部分を広範な生理活性物質に置き換えることにより、化粧品や医薬品など新たな次世代糖質マテリアル（生体関連材料）創製へ向けて応用展開を行う。

2. 担当者

天野エンザイム(株)マーケティング本部 産業用酵素開発部 チームリーダー 天野 仁
天野エンザイム(株)マーケティング本部 食品営業部 マーケティングマネージャー
森 茂治

天野エンザイム(株) マーケティング本部 産業用酵素開発部 研究員 佐藤公彦
天野エンザイム(株) マーケティング本部 産業用酵素開発部 研究員 鶴喰寿孝

3. 研究の実施場所

天野エンザイム株式会社 岐阜研究所 岐阜県各務原市須衛町四丁目 179 番 35

4. 要約

(1) 方法

β -プリメベロシダーゼ生産菌を育種することにより、酵素の生産性を向上し工業的に生産を行い、大量合成法の確立した *p*-ニトロフェニル β -プリメベロシドを糖供与体として種々香気前駆体を合成しその機能性を検討した。またセルラーゼを用いて合成したネオ糖脂質の物性や機能性を検討した。

(2) 結果

1) *Penicillium multicolor* の生産する β -プリメベロシダーゼの現場スケールによる大量生産

を3回実施し品質的にも問題なく安定的に製造できることを確認することができた。

- 2) 本酵素を用いた天然に存在する香気前駆体の大量合成法技術を確立し、合成した香気前駆体を本酵素で分解して任意に香気を発生させることができた。また本酵素はフェノール性水酸基にも糖転移できることが示され、種々生理活性を有するフェノール化合物を配糖化して、溶解度や安定性を増加させることができると考えられる。
- 3) 本酵素を用いてネオ糖脂質を合成できることも見出した。コストを低減させるため、セルラーゼを用いた乳糖縮合反応で合成できることを見出した。ネオ糖脂質には多重膜リポソーム中への薬剤封入能やネオ糖脂質のレクチン凝集活性などが認められ、また一枚膜リポソーム (GUV) の形態特性を明らかとした。DDS 素材としての応用も視野に入れて、本プロジェクト終了後もネオ糖脂質の物性を含む機能性評価にさらなる検討を重ねていく。また化粧品素材として機能試験を行った結果、Lac-DOPA に抗 UVB 及び Filaggrin 発現に有意な効果が認められた。学術的にも実用的にも非常に面白い素材であり、有用性を確認するため更に機能試験を行い、実用化に向けて検討を行っていく。またこれらネオ糖脂質の改変などを行う、各々の機能特性を明らかとすることができた。
- 4) *Penicillium multicolor* 由来の酵素の基質特異性の幅は非常に広く、物質生産において種々構造の糖鎖をもつ配糖体の物質生産に有用であることが示された。

(3) 事業化の見通し

酵素の生産については工場スケールで安定的に製造することができ、本酵素を配糖化に使用することは将来の事業化を考えた場合に目処が立ったと思われる。香気前駆体やネオ糖脂質などの機能性が一部明らかとなり、非常に有望と考えられる。しかし事業化するまでにはこれら配糖体の有用な機能を更に明らかとして、また大量合成法の改良などのコスト低減を図っていく必要がある。

(4) 特許出願

出願日：平成 17 年 3 月 4 日 出願番号：特願 2005-060559

出願人：静岡大学、天野エンザイム㈱、日本食品化工㈱

出願名称：フィラグリシン合成促進剤および紫外線傷害緩和剤

(5) 学会発表

- 1) 平成 14 年度 日本応用糖質科学会国際シンポジウム及び本大会に発表
- 2) 平成 14 年度 日本生化学会に発表
- 3) 平成 14 年度 日本応用糖質科学会中部支部会に発表
- 4) 平成 15 年度 日本農芸化学会で発表
- 5) 平成 16 年度 日本応用糖質科学会大会
- 6) 第二回静岡大学生物産業創出推進拠点シンポジウム 平成 16 年 9 月 24 日(月)
- 7) US/JAPAN GLYCO 2004 11 月 17 日
Joint meeting of the society for glycobiology and the japanese society of carbohydrate research
- 8) 平成 16 年度 日本応用糖質科学会中部支部総会・講演会
- 9) 日本農芸化学会 2005 年度大会

II.3 カ年の研究成果の本文

1. 技術開発課題の目的

- (1) エンドグリコシダーゼの一種である β -プリメベロシダーゼを触媒素子として、プリメベロース二糖単位と一連のアルコール系香気成分を結合し、植物中に微量成分として存在する香気前駆配糖体を酵素合成する実践的かつ量産化可能な技術を開発する。またプリメベロシド配糖体だけでなく種々糖鎖を持つ配糖体を効率よく安価に製造することにより、様々な分野での応用を可能とする。
- (2) 合成した各種香気二糖配糖体の香気材料としての評価や応用開発、生理的役割の解明などを行い付加価値の高い糖質マテリアルの創製を行う。
- (3) β -プリメベロシダーゼのみでなく、安価な乳糖を用いてセルラーゼの縮合反応を利用して、一段階の反応でオリゴ糖をアグリコンに配糖化できる技術を用い、アグリコン部分を広範な生理活性物質に置き換えることにより、化粧品や医薬品など新たな次世代糖質マテリアル（生体関連材料）創製へ向けて応用展開を行う。

2. 技術開発課題の内容

(1) 技術開発の実施に必要な事業

ア 基礎となる試験研究の概要及び技術開発の目的

- 1) 植物香気成分である芳香族アルコールやモノテルペンアルコールは、植物体内で香気前駆体としてその多くはプリメベロシド配糖体（Xyl β 1-6Glc β -OR）の形で存在し、開花時に植物内在性の β -プリメベロシダーゼ（糖鎖部分と香気成分であるアグリコン部分の間を加水分解するエンドグリコシダーゼの一種）により特異的に加水分解されて香気を発する。微生物から β -プリメベロシダーゼ様酵素生産菌の検索を行ったところ、カビの一菌株である *Penicillium multicolor* が本酵素を生産していることを見出した。本酵素は今までのグリコシダーゼになく高収率で糖転移反応を触媒し、香気成分のプリメベロシド配糖体を合成できることを見出し、上記の目的で本技術開発を行うに至った。
- 2) また本酵素の糖転移反応および他起源セルラーゼの縮合反応やホスホリパーゼDのホスファチジル基転移反応を用いて、ネオ糖脂質を効率よく合成することも見出し、その物理特性や化粧品素材としての機能試験を行う。
- 3) 更に配糖化技術の応用範囲を広げ、技術開発を行うために β -プリメベロシダーゼをはじめとした種々酵素を用いた種々有用物質の配糖化にも取り組んだ。
- 4) 微生物由来の β -プリメベロシダーゼの糖鎖側およびアグリコン側の基質特異性を明らかとすることは、配糖化するターゲットを探索する上でも重要なことである。また植物には2糖配糖体を特異的に分解するジグリコシダーゼが報告されており、これら酵素の存在意義を明らかとするためにも、微生物酵素との基質特異性の

違いを明らかとするため、種々基質の合成を行った。

イ 技術開発の内容

イ-1 酵素大量生産技術の確立

イ-1-1 酵素活性測定法（プリメベロシダーゼ活性測定法）

自動分析装置（東芝製、TBA-30R）を用い、*p*-ニトロフェニルβ-プリメベロシドを基質として40℃で9.75分間反応させた後、炭酸ナトリウムを加え412 nmの吸光度を測定した。この条件下で吸光度を1上昇させる酵素量を1単位 (AU) とした。

イ-1-2 生産菌株の育種

N-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (NTG) および紫外線による処理

本酵素生産菌の *Penicillium multicolor* の孢子懸濁液を調製し、NTG および紫外線で変異処理を行った孢子懸濁液を適当な平板培地に塗布し、生育した菌株を液体培地に接種後、振とう培養した後、活性を確認した。

イ-1-3 生産菌株の培養および大量生産方法の確立

育種により元株より生産性が向上した菌株を生産菌として使用し、現場スケールの55-m³容のメイン発酵槽にて培養を行った。培養後、菌体を除去した清澄液を限外濾過膜にて濃縮後、スプレードライを行い乾燥粉末を得た。

イ-2 香気前駆体（二糖配糖体）製造技術の確立および用途開発

イ-2-1 香気前駆体（二糖配糖体）製造技術の確立

イ-2-1-1 糖供与体基質（*p*-ニトロフェニルβ-プリメベロシド）大量合成法の確立

供与体基質として、キシロオリゴ糖であるキシロオリゴ95P（サントリー製）を用い、β-キシロシダーゼは天野エンザイムで調製したペクチナーゼ G (*Aspergillus pulverulentus* 起源) の部分精製品 (Lot No. XYL020930) を用いた。

イ-2-1-2 香気前駆体（二糖配糖体）製造技術の確立

Penicillium multicolor の生産するβ-プリメベロシダーゼを用い、糖供与体として *p*-ニトロフェニルβ-プリメベロシドを、糖受容体として各種アルコール性香気成分(ベンジルアルコール、2-フェニルエタノール、(Z)-3-ヘキセノール、ゲラニオール、(S)-リナロール)を糖受容体として、二糖転移反応を利用して香気配糖体を合成した。またアルコール性香気成分の他にフェノール性香気成分であるオイゲノールを用い、オイゲニルβ-プリメベロシドの合成も実施した(図-1参照)。

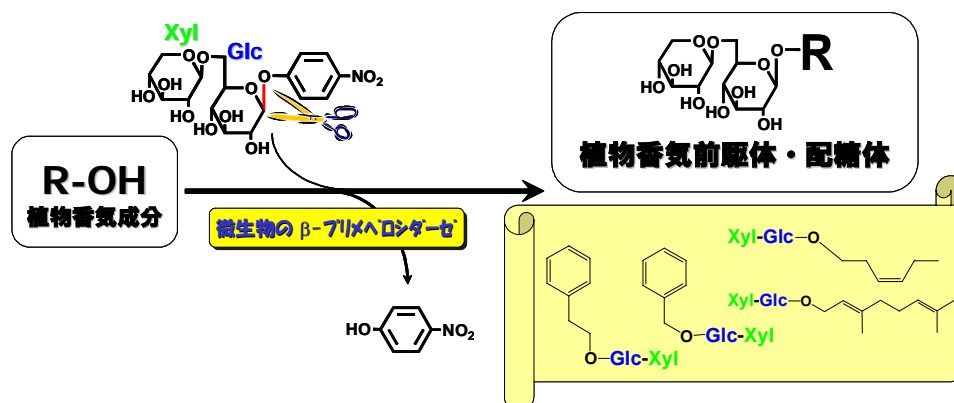


図-1 植物香気配糖体の酵素触媒合成の原理

イ-2-2 合成した香気前駆体の用途開発および種々機能の検討

イ-2-2-1 本酵素により合成した香気前駆体からの香気成分の生成

本酵素の転移反応で合成した 3-ヘキセニル β-プリメベロシド、フェニルエチル β-プリメベロシドおよびベンジル β-プリメベロシドを基質として、本酵素を作用して生成した香気成分を GC/MS で分析するとともに官能試験を行った。

イ-2-2-2 植物内在性酵素による香気前駆体からの香気成分の生成

香気前駆体が切り花に吸引された後に、実際に内在性の β-プリメベロシダーゼによって加水分解され、香気を遊離するか否かについての検討も行った。市販切り花から渡辺らの方法 (N. Watanabe *et al.*, *J. E. O. P.* 2 (3), 1999) によって粗酵素 (アセトンパウダー) を調製した。粗酵素の β-グルコシダーゼ、キシロシダーゼ及びプリメベロシダーゼ活性を *p*-ニトロフェニル β-グルコシド、*p*-ニトロフェニル β-キシロシド及び *p*-ニトロフェニル β-プリメベロシドを基質として各々測定した。

イ-2-2-3 合成香気前駆体 (二糖配糖体) の花粉管伸長試験および抗腫瘍活性

合成した香気前駆体の生理機能を検討するために、4 種類のアルコール系香気成分配糖体である、ベンジル β-プリメベロシド、(Z)-3-ヘキセニル β-プリメベロシド、2-フェニルエチル β-プリメベロシド、ゲラニル β-プリメベロシドとプリメベロースを茶花粉管伸長試験および DLD-1 ヒト大腸ガン細胞を用いた腫瘍活性試験に供した。

イ-3 ネオ糖脂質の製造技術の確立および機能試験

イ-3-1 ネオ糖脂質の製造技術の確立

イ-3-1-1 アルカノール・アルカンジオール二糖配糖体の酵素合成

糖供与体として *p*-ニトロフェニル β-プリメベロシドを、受容体として各鎖長(C₂ - C₁₂)の 1-アルカノール及びアルカンジオールを使用し、本酵素により糖転移反応を行い、アルカノール・アルカンジオール二糖配糖体の合成を TLC にて確認した。また受容体をヘキサンジオールとし、同様の条件で 6-ヒドロキシヘキシル β-プリメベロシドの合成を行った。

イ-3-1-2 1,2-ジパルミトイルホスファチジルヘキシル β -プリメベロシドの酵素合成

6-ヒドロキシヘキシル β -プリメベロシドを前駆体としてネオ糖脂質の酵素合成を行った。6-ヒドロキシヘキシル β -プリメベロシドを受容体、1,2-ジパルミトイルホスファチジルコリン (dipalmitoylphosphatidyl choline、DPPC) を供与体として、*Streptomyces* sp.由来 phospholipase D のホスファチジル基転移反応にて、1,2-ジパルミトイルホスファチジルヘキシル β -プリメベロシド (Lac-DPPA) を合成した。

イ-3-1-3 セルラーゼの縮合反応による二糖配糖体の合成

ラクトース (Gal β 1-4Glc) とヘキサンジオールをそれぞれ縮合反応の基質として、*Trichoderma reesei* 由来のセルラーゼ (ナガセケムテックス: XL-522) を用い、6-ヒドロキシヘキシル β -ラクトシドの合成を行った。またヘキサンジオールの代わりにトリエチレングリコールを用いてトリエチレングリコリル β -ラクトシドを、アリアルアルコール用いてアリアル β -ラクトシドを合成した。

イ-3-1-4 各種ヒドロキシル配糖体へのリン脂質の導入

6-ヒドロキシヘキシル β -ラクトシドを前駆体として、前述した方法によりネオ糖脂質の酵素合成を実施し、1,2-ジパルミトイルホスファチジルヘキシル β -ラクトシド (Lac-DPPA) を合成した。更に6-ヒドロキシヘキシル β -ラクトシドと、1,2-ジオレオイルホスファチジルコリンを用い、1,2-ジオレオイルホスファチジルヘキシル β -ラクトシド (Lac-DOPA) を合成し、またトリエチレングリコリル β -ラクトシドと1,2-ジパルミトイルホスファチジルコリンで同様の反応を行い、1,2-ジパルミトイルホスファチジルトリエチレングリコリル β -ラクトシド (Lac-3EG-DPPA) を合成した。

イ-3-1-5 アリアルラクトシドを利用したリン脂質の化学-酵素的導入

アリアル β -ラクトシドを前駆体として、1,2-ジパルミトイルホスファチジルエチルアミノエトキシ β -ラクトシド (Lac-DPPE) を単離した。また、アリアル β -ラクトシドと1,2-ジオレオイルホスファチジルコリンを用い、1,2-ジオレオイルホスファチジルエチルアミノエトキシ β -ラクトシド (Lac-DOPE) を合成した。

イ-3-2 合成したネオ糖脂質の機能性の検討

イ-3-2-1 ネオ糖脂質が持つカルセイン封入能試験

1,2-ジパルミトイルホスファチジルコリンと合成糖脂質 (1,2-ジパルミトイルホスファチジルヘキシル β -ラクトシドまたは1,2-ジパルミトイルホスファチジルエチルアミノエトキシ β -ラクトシド) との混合物、もしくは前述のコリン単体をそれぞれ減圧濃縮して脂質の薄膜を形成させて、カルセイン封入ベシクルを蛍光顕微鏡にて観察した。

イ-3-2-2 ネオ糖脂質リポソームのレクチン凝集活性

カルセイン封入を除いたイ-7-1 の手法にて、各糖脂質 (1,2-ジパルミトイルホスファチジル ヘキシル β -ラクトシド、1,2-ジパルミトイルホスファチジル エチルアミノエトキシ β -ラクトシド、ラクトシルセラミド) ベシクルを調製し、ラクトース結合レクチン RCA を混合後、405 nm における濁度を測定した。適当時間で平衡に達した濁度のデータを用い、会合常数を算出した。

イ-3-2-3 giant unilamellar vesicle (GUV) によるネオ糖脂質物性評価

1,2-ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC) をベースとして、以下の四種類のネオ糖脂質、Lac-DPPA、Lac-DOPA、Lac-DPPE、Lac-DOPE の非イオン存在下またはイオン存在下での GUV 形成能を位相差顕微鏡により観察した。

イ-3-2-4 ネオ糖脂質 GUV と蛍光標識レクチンとの結合観察

イ-3-2-5 の実験と同様に DOPC と Lac-DOPA を任意の割合で混合して GUV を形成させた後、GUV 溶液とレクチン溶液 (RCA120-FITC) を混合し、室温でさらに2時間インキュベートした。その後レクチン結合 GUV 溶液を位相差及び蛍光顕微鏡観察を行った。

イ-3-2-5 化粧品素材としての生理機能試験

昨年度合成した以下の5種のネオ糖脂質を用いて、化粧品素材の評価を専門的に行っている(株)コスモテクニカルセンターに、5種類の機能評価試験の委託を行った。

・ネオ糖脂質 (5種)

- 1) 1,2-ジパルミトイルホスファチジル ヘキシル- β -ラクトシド
(1,2-dipalmitoyl-phosphatidyl hexyl- β -lactoside、**Lac-DPPA**)
- 2) 1,2-ジパルミトイルホスファチジル トリエチレングリコイル- β -ラクトシド
(1,2-dipalmitoyl-phosphatidyl triethyleneglycolyl- β -lactoside、**Lac-3EG-DPPA**)
- 3) 1,2-ジパルミトイルホスファチジル エチルアミノエトキシ- β -ラクトシド
(1,2-dipalmitoyl-phosphatidyl ethylaminoethoxy- β -lactoside、**Lac-DPPE**)
- 4) 1,2-ジオレオイルホスファチジル ヘキシル- β -ラクトシド
(1,2-dioleoyl-phosphatidyl hexyl- β -lactoside、**Lac-DOPA**)
- 5) 1,2-ジオレオイルホスファチジル エチルアミノエトキシ- β -ラクトシド
(1,2-dioleoyl-phosphatidyl ethylaminoethoxy- β -lactoside、**Lac-DOPE**)

・機能評価試験

- 1) ヒト皮膚を用いた保湿試験
 - ・皮膚表面に試料を塗布し、水分保持能力を測定。
 - ・SDS で作成した擬似肌荒れ皮膚表面からの水分蒸散量を TEWL で測定。
- 2) 真皮繊維芽細胞における細胞賦活作用評価
 - ・細胞のエネルギー代謝過程で産生する NADPH あるいは NADH を MTT の Formazan への還元を指標に定量する (MTT 還元法)
- 3) UVB 障害に対する緩和作用評価

- ・細胞に UVB を照射し、生じる細胞死を指標に細胞障害緩和作用を検討する。
- 4) 表皮細胞の分化に対する作用評価
- ・表皮細胞分化マーカーである Filaggrin の発現を RT-PCR により評価する。
- 5) メラニン産生抑制作用評価
- ・細胞が産生するメラニン量を目視により評価する。

イ-3-3 ネオ糖脂質の改変とその機能

イ-3-3-1 レシチンを利用したネオ糖脂質の合成

ネオ糖脂質の改変による物性変化やリポソーム形成能、リポソーム形成時のレクチンとの相互作用など物性試験を行い、ネオ糖脂質の特性調査を進める。

将来的にさらなるコストの低減および量産化を見越した上で、ネオ糖脂質合成における脂質原料としてより安価な基質である卵黄または大豆レシチンについて同様に配糖化を行った。

イ-3-3-2 ネオ糖脂質のリゾ体合成

ネオ糖脂質 Lac-DPPA、Lac-DOPA の二種類について、honey bee venom 由来ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) によるグリセリン脂質の C-2 のエステル結合を加水分解することによりネオ糖脂質のリゾ体である 1-パルミトイル-2-ヒドロキシホスファチジルヘキシルβ-ラクトシド (Lac-MPPA) および 1-オレオイル-2-ヒドロキシホスファチジルヘキシルβ-ラクトシド (Lac-MOPA) を合成した (図-2 参照)。

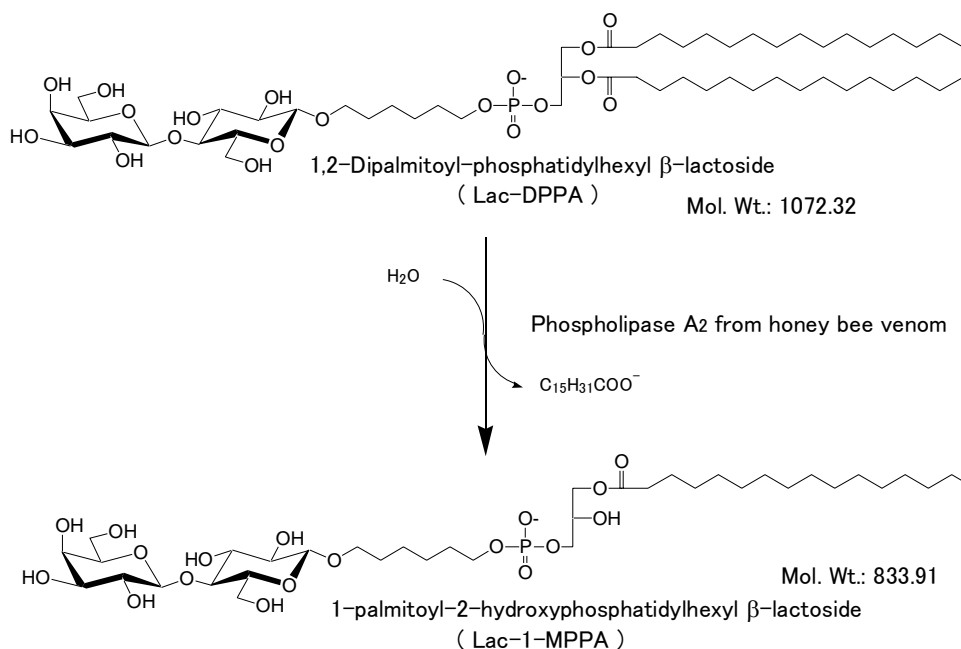


図-2 ネオ糖脂質のリゾ体合成スキーム

イ-3-3-3 Lac-MPPA 及び Lac-MOPA の物性試験

Lac-MPPA または Lac-MOPA を D_2O 、 $CDCl_3$ の各溶媒または $CDCl_3:CD_3OD=1:1$ の混合溶媒に溶解し、ネオ糖脂質と同様にリゾ体ネオ糖脂質が膜構造を形成するかどうかを確認するため、 ^1H-NMR による解析を行った。

イ-4 微生物起源および植物起源の二糖配糖体分解酵素（ジグリコシダーゼ）の基質特異性の検討

イ-4-1 供与体基質の加水分解における動力学パラメーターの検討

Penicillium multicolor の生産する酵素を用いて、*p*-ニトロフェニル β -プリメベロシドを基質としたときの動力学定数を算出した。

イ-4-2 本酵素の基質特異性の検討（各種配糖体に対する加水分解の相対活性）

各種 *p*-ニトロフェノール配糖体を基質として、*p*-ニトロフェニル β -プリメベロシドに対する水解の相対活性を 100% として各種配糖体に対する水解活性を表記した。

イ-4-3 合成基質に対する分解様式の確認

Pen. multicolor 起源の精製酵素および *p*-ニトロフェニル β -プリメベロシド分解酵素を生産する *Aspergillus fumigatus* の遺伝子を *Aspergillus nidulans* を宿主として発現させた精製酵素や茶の β -プリメベロシダーゼ遺伝子を昆虫で発現した精製酵素の 3 種を用いて検討を行った。下記に示した各基質（図-3 参照）に反応後、生成物を TLC で確認した。

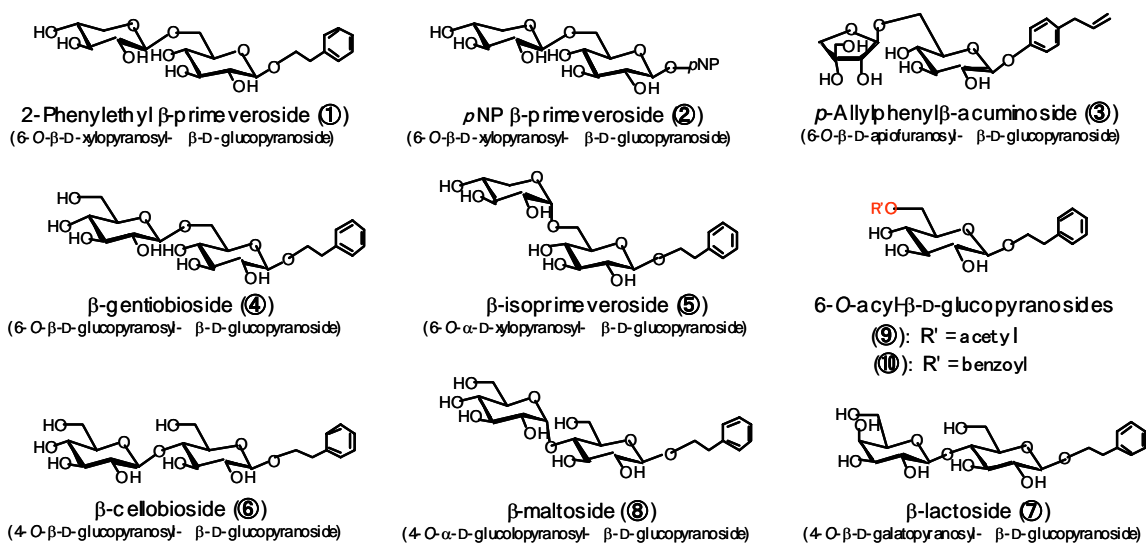


図-3 基質特異性および分解様式を検討するための基質

イ-4-4 微生物および植物起源の二糖配糖体分解酵素（ジグリコシダーゼ）の分解速度の検討

微生物 (*Penicillium multicolor* および *Aspergillus fumigatus*) 由来のエンドグリコシダーゼの1種である β -プリメベロシダーゼ様ジグリコシダーゼ (それぞれ Pm-PRD, Af-PRD) は、前年度までの予備的検討により、いずれも植物由来のジグリコシダーゼ (チャ葉 β -プリメベロシダーゼ PRD) に比べ、はるかに広い基質特異性を示すことを明らかとした。

本年度はチャ葉 β -プリメベロシダーゼに加えて植物由来のジグリコシダーゼとして、ムシカリ葉由来のフルカチンヒドロラーゼ (FH) およびカラスノエンドウ由来のビシアンヒドロラーゼ (VH) のクローニングにも成功し、その大量発現系も構築した。そこで、植物由来のジグリコシダーゼとしては、比較的大量調製が可能であったチャ葉 PRD とムシカリ葉由来の FH を用い、微生物由来の上記2種のジグリコシダーゼ (Pm-PRD と Af-PRD) のあわせて4種のジグリコシダーゼの基質特異性を比較した。特に昨年度の結果から、2つの微生物由来のジグリコシダーゼは β 1,6-結合を有する二糖配糖体ばかりでなく、6-O-置換の β -D-グルコピラノシドも基質としたことに注目して、6-位周辺の構造情報を得るための様々な β -D-グルコピラノシドを合成しこれらに対する上記ジグリコシダーゼの基質特異性を検討した (図-4 参照)。

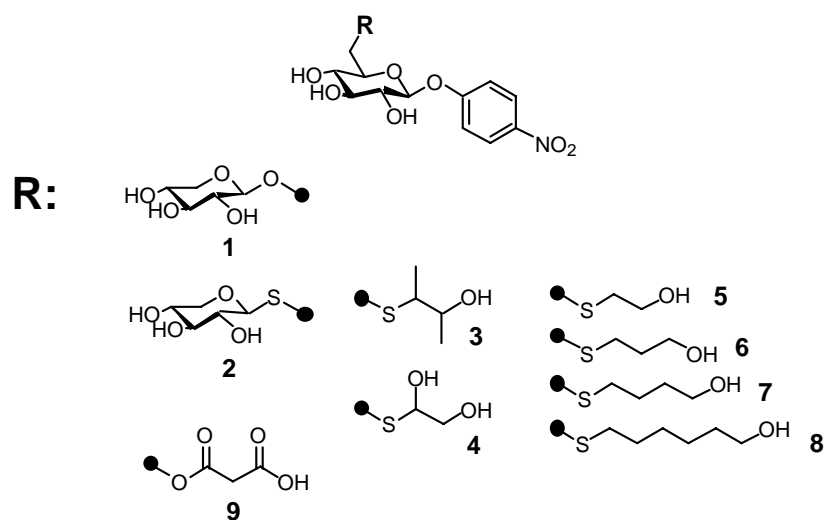


図-4 6位周辺部分の構造と活性の関係を知るための基質

ウ 技術開発の実施結果

ウ-1 酵素大量生産技術の確立

ウ-1-1 酵素活性測定法（プリメベロシダーゼ活性測定法）

自動分析装置を用いることにより迅速に効率よく酵素活性を測定することが可能であった。

ウ-1-2 生産菌株の育種

親株(2N300-41-UV3-1, 20.3 AU/mL) に変異による育種を行ったところ、酵素生産性が2倍程度に上昇した変異株 (UV3-6、42.6 AU/mL) を取得できた。

ウ-1-3 生産菌株の培養および大量生産方法の確立

55-m³ のメイン発酵槽にて、本菌株 (2N300-41-UV3-1-2-6-0129-87-MSI-13) の流加培養を行ったところ、酵素が効率よく生産され、培養終了時において 44 AU/mL 程度の酵素を生産させることに成功した (図-5 参照)。

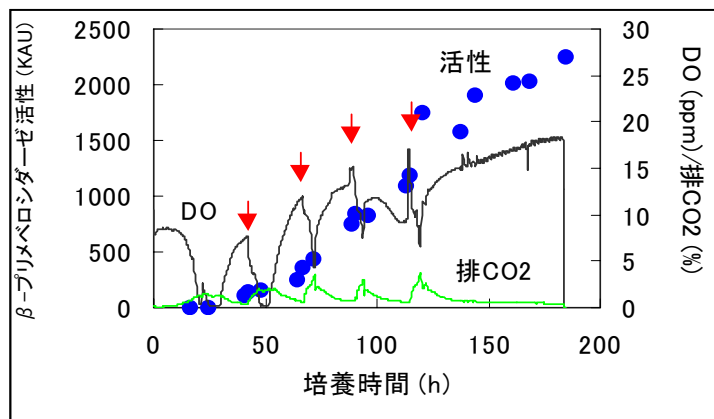


図-5 メイン培養における酵素生産性

DO; 流加培養での溶存酸素濃度 排CO₂; 流加培養での排出二酸化炭素 ↓; 栄養源添加

またメイン発酵槽で培養した培養液を用いて、酵素の粉末化を行ったところ、工程上問題となる点はなく、活性収率は70%でありスプレードライ乾燥粉末が510 kg 得られた。現場スケールでの生産を過去に3度行っているが、今回もほぼ同様の結果が得られたことから、今後も大量の酵素を安定的に供給することが可能と思われる。

ウ-2 香気前駆体（二糖配糖体）製造技術の確立および用途開発

ウ-2-1 香気前駆体（二糖配糖体）製造技術の確立

ウ-2-1-1 糖供与体基質（*p*-ニトロフェニルβ-プリメベロシド）大量合成法の確立

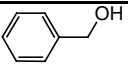
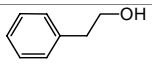
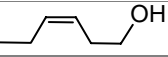
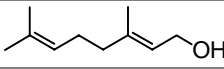
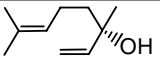
各種配糖体を酵素合成するために必要な供与体基質 *p*-ニトロフェニルβ-プリメベロシドの酵素合成法を確立した。キシロオリゴ95P(単糖0.2%、2糖40.9%、3糖15.4%、4糖以上41.3%)を精製せず、そのまま使用し、β-グルコシダーゼに対するβ-キシロ

シダーゼの活性比が、30 以上の部分精製酵素を使用することで *p*-ニトロフェニル β -プリメベロシドの生成量を増加できることを見出した。結晶 *p*-ニトロフェニル β -プリメベロシドとして 10 g を調製した。

ウ-2-1-2 香気前駆体（二糖配糖体）製造技術の確立

本酵素は、一級アルコールを有する香気成分に対し、供与体基質(*p*-ニトロフェニル β -プリメベロシド)からのプリメベロシル基の二糖転移反応を高効率で触媒し、一連の植物香気前駆体を高収率(10~70%)で合成した。(S)-リナロールに対する転移生成物は TLC 分析において認められなかった。香気配糖体は、NMR 法により、それぞれ、ベンジル、2-フェニルエチル、(Z)-3-ヘキセニル、ゲラニル β -プリメベロシドと同定された。またフェノール性水酸基を持つオイゲニル β -プリメベロシドも 9%の収率で得ることができた(表-1 参照)。この様なフェノール性香気配糖体には抗腫瘍活性を持つ化合物が存在しており、今回の結果から、抗腫瘍活性をもつ他種フェノール性香気成分の配糖化への応用が期待できる。

表-1 香気配糖体合成の収率

受容体 (香気成分)	供与体 (<i>p</i> NP β -Psd)	転移生成物 配糖体	収率(mol %)	
Benzyl alcohol 	4 M	0.08 M	1	51%
2-Phenylethanol 			2	70%
(<i>z</i>)-3-Hexenol 			3	62%
Geraniol 			4	9%
(<i>s</i>)-Linalool 				

ND, not detected

ウ-2-2 合成した香気前駆体の用途開発および種々機能の検討

ウ-2-2-1 本酵素により合成した香気前駆体からの香気成分の生成

本酵素を作用させることにより、3-ヘキセニル β -プリメベロシドから 3-ヘキセノール(緑香)の生成を、同様にフェニルエチル β -プリメベロシドからフェニルエチルアルコール(バラ様の香気)やベンジル β -プリメベロシドからベンジルアルコール(ジャスミン様の香気)の発生を GC/MS および官能的に確認し、本酵素とこれら香気前駆体を組み合わせることにより、任意に香気を発生させることが可能であった。

ウ-2-2-2 植物内在性酵素による香気前駆体からの香気成分の生成

今回検討したユリ及びバラ切り花中から調製したアセトンパウダーには、 β -グルコシダーゼが 187-225mU/5g、 β -キシロシダーゼが 25-10mU/5g 含まれていたが、 β -プリメベロシダーゼ活性は検出することができなかった。しかし微生物由来 β -プリメベロシダーゼを直接切り花に吸引させることで、その芳香の質をある程度改善でき、また

前述したように微生物起源の β -プリメベロシダーゼによりこれら香気前駆体を分解して香気を発生できることが見出されており、合成した香気前駆体を植物に吸引させる際に、同時に微生物酵素を吸引させることでさらに香気を改善できる可能性がある。

ウ-2-2-3 合成香気前駆体（二糖配糖体）の花粉管伸長試験および抗腫瘍活性

ベンジル β -プリメベロシドおよび(Z)-3-ヘキセニル β -プリメベロシドでは有意に高い花粉管伸長量を示した。しかし、2-フェニルエチル β -プリメベロシドやゲラニル β -プリメベロシドでは有意な促進は認められず、逆に高濃度処理区で花粉管伸長が阻害される傾向がみられた。合成香気前駆体の花粉管伸長に関しては一部の香気前駆体で、ある一定の濃度で成長促進が見られたが、現在のところ再現性が得られておらず、今後も検討を要する。またいずれの香気前駆体でも抗腫瘍活性については、優位な差は認められなかった。しかし現在のところ使用したガン細胞はヒト大腸ガン細胞のみであり、他の腫瘍細胞に対する効果については検討の余地を残している。

ウ-3 ネオ糖脂質の製造技術の確立および機能試験

ウ-3-1 ネオ糖脂質の製造技術の確立

ウ-3-1-1 アルカノール・アルカンジオール二糖配糖体の酵素合成

アルカノール、アルカンジオールに対しては、それぞれ C₁₀、C₁₂ まで二糖転移反応することを TLC 上で確認した。この知見に基づき、ヘキサンジオールを受容体とする 6-ヒドロキシヘキシル β -プリメベロシドを酵素合成した。収量は 212.3 mg、*p*-ニトロフェニル β -プリメベロシド当たりのモル収率は 44.6%であった。

ウ-3-1-2 1,2-ジパルミトイルホスファチジルヘキシルβ-プリメベロシドの酵素合成

NMR や FAB-Mass による分析で、転移生成物を 1,2-ジパルミトイルホスファチジルヘキシルβ-プリメベロシド と同定した。収量は 75 mg、6-ヒドロキシヘキシルβ-プリメベロシド当たりの収率は約 30%であった。

ウ-3-1-3 セルラーゼの縮合反応による二糖配糖体の合成

NMR や FAB-Mass による分析で、転移生成物を 6-ヒドロキシヘキシルβ-ラクトシド と同定し、収量は 389 mg、ラクトース当たりのモル収率は 5.1%であった。同様に、トリエチレングリコリルβ-ラクトシド (収率 1.5%) 及びアリルβ-ラクトシド (収率 2.6%)をそれぞれ同定した。

ウ-3-1-4 各種ヒドロキシル配糖体へのリン脂質の導入

NMR や FAB-Mass による分析で、転移生成物をジパルミトイルホスファチジルヘキシルβ-ラクトシドと同定した。収量は 94.3 mg、6-ヒドロキシヘキシルβ-ラクトシド当たりの収率は 26.6%であった。同様に 1,2-ジオレオイルホスファチジルヘキシルβ-ラクトシド (収率 27%) 及び 1,2-ジパルミトイルホスファチジルトリエチレングリコリルβ-ラクトシド (収率 2%)をそれぞれ同定した (図-6 参照)。

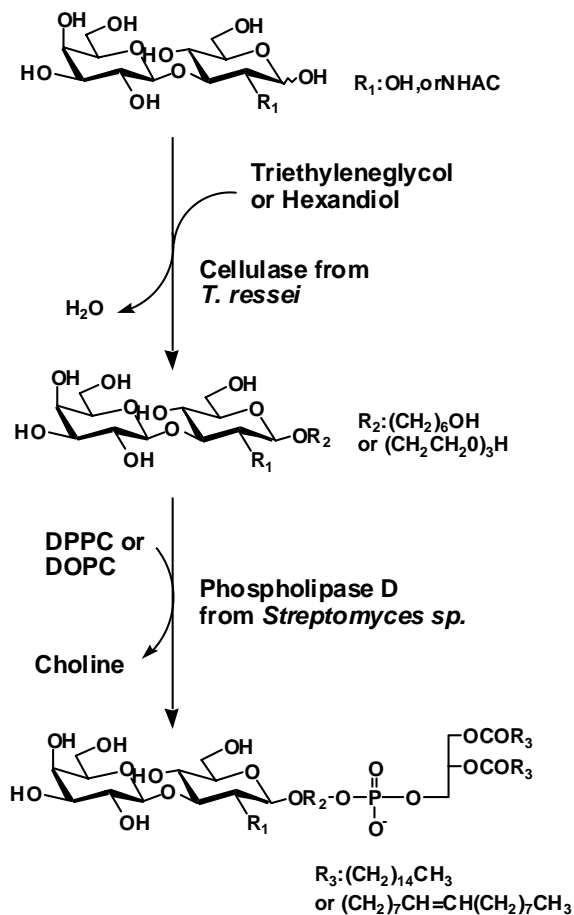


図-6 ネオ糖脂質の完全酵素

ウ-3-1-5 アリルラクトシドを利用したリン脂質の化学-酵素的導入

NMR や FAB-Mass による分析で、転移生成物を 1,2-ジパルミトイルホスファチジルエチルアミノエトキシβ-ラクトシドと同定した。収量は 24 mg、アリルβ-ラクトシド当たりの収率は約 87%であった。同様に 1,2-ジオレオイルホスファチジリエチルアミノエトキシβ-ラクトシド(収率 91%)を同定した。

前回の報告では、*p*-ニトロフェニル プリメベロシドを基質としたネオ糖脂質合成を試み合成に成功したが、今回その応用としてガングリオシド等の多種の複合糖質の基本骨格でありかつ安価に入手可能なラクトースを構成成分としたネオ糖脂質の合成を検討した。前述したようにセルラーゼの縮合反応においても、ヘキサンジオールは糖アノマー位に選択的に配糖化された。本合成法は現在反応収率自体は低いだが、原料が安価でまた回収も容易なため、非常に有効な合成法であると期待される。またリン脂質導入に関しても、糖鎖の一級水酸基ではなく配糖体リンカー部分の一級水酸基選択的に導入されることが判明した。

ウ-3-2 合成したネオ糖脂質の機能性の検討

ウ-3-2-1 ネオ糖脂質が持つカルセイン封入能試験

5~100 mol%のネオ糖脂質濃度の 1,2-ジパルミトイルホスファチジル コリンベシクルを蛍光顕微鏡にて観察した結果、ジパルミトイルホスファチジル ヘキシル β -ラクトシドは 40 mol%、1,2-ジパルミトイルホスファチジル エチルアミノエトキシ β -ラクトシドは 100 mol%のカルセイン封入能を有していた。

ウ-3-2-2 ネオ糖脂質リポソームのレクチン凝集活性

ジパルミトイルホスファチジル ヘキシル β -ラクトシドでは $K_a = 1.39 \times 10^6$ (M^{-1})、 $K_d = 7.19 \times 10^{-7}$ (M)、1,2-ジパルミトイルホスファチジル エチルアミノエトキシ β -ラクトシドでは $K_a = 3.54 \times 10^6$ (M^{-1})、 $K_d = 2.82 \times 10^{-7}$ (M)、ラクトシルセラミドでは $K_a = 1.79 \times 10^6$ (M^{-1})、 $K_d = 5.59 \times 10^{-7}$ (M)、の 3 種においていずれも $K_a = 10^6$ (M^{-1})、 $K_d = 10^{-7}$ (M) オーダーの値を示した。

ウ-3-2-3 giant unilamellar vesicle (GUV) によるネオ糖脂質物性評価

結果を表-2 および表-3 に示した。リポソーム形成状況を肉眼により判断し、リポソーム形成を確認できるものを+、確認できないものを-とした。

表-2 非イオン存在下における GUV 形成

糖脂質含有率 (%)	0	20	40	60	80	100
Lac-DPPA	+	+	+	+	+	-
Lac-DOPA	+	+	+	+	+	+
Lac-DPPE	+	+	+	+	+	-
Lac-DOPE	+	+	+	+	+	+

不飽和脂肪酸を非極性部位に有する Lac-DOPA、Lac-DOPE はアルキル基の不飽和結合によって室温でも液晶相の状態をとり膜が流動的であることが予想され、糖脂質含有率が高い状態でもネオ糖脂質の主に糖骨格間の接近を軽減できるため GUV を形成すると考えられた。飽和脂肪酸を有する Lac-DPPA、Lac-DPPE については室温ではゲル相の状態をとり膜の流動性がないことが予想され、糖脂質の含有率が高すぎると糖骨格間の接近により立体的に不安定となり膜構造をとれないことを示唆する結果となった。

表-3 イオン存在下における GUV 形成

糖脂質含有率 (%)	0	20	40	60	80	100
Lac-DPPA	-	-	+	+	+	-
Lac-DOPA	-	+	+	-	-	-
Lac-DPPE	-	-	-	-	-	-
Lac-DOPE	-	-	-	-	-	-

ずかに負に帯電した酸性の糖脂質である。酸性の糖脂質は膜構造をとった状態で膜表面が

負の電荷をもっており、このことがイオン存在下でのリポソーム形成に有利な状態であると予想される。

ウ-3-2-4 ネオ糖脂質 GUV と蛍光標識レクチンとの結合観察

顕微鏡観察の結果を下記に示した。Lac-DOPA のように不飽和脂肪酸を含む糖脂質は、膜構造をとるとき膜上に流動的に分散することが予想されているが、下図ではレクチンのような糖結合性分子の存在により、膜状の糖鎖が局在化している傾向が見て取れる（図-7 参照）。生体膜モデルとしての利用に、ネオ糖脂質は十分に利用可能であることを証明した。ただし、実際の生体膜レベルで同様の現象が起こりうるかを調べるためには、GUV ではなく small unilamellar vesicle (SUV) を調製する必要があり、今後は SUV の調製と SUV における蛍光物質カルセインの封入及び放出などの試験を進めていく必要がある。

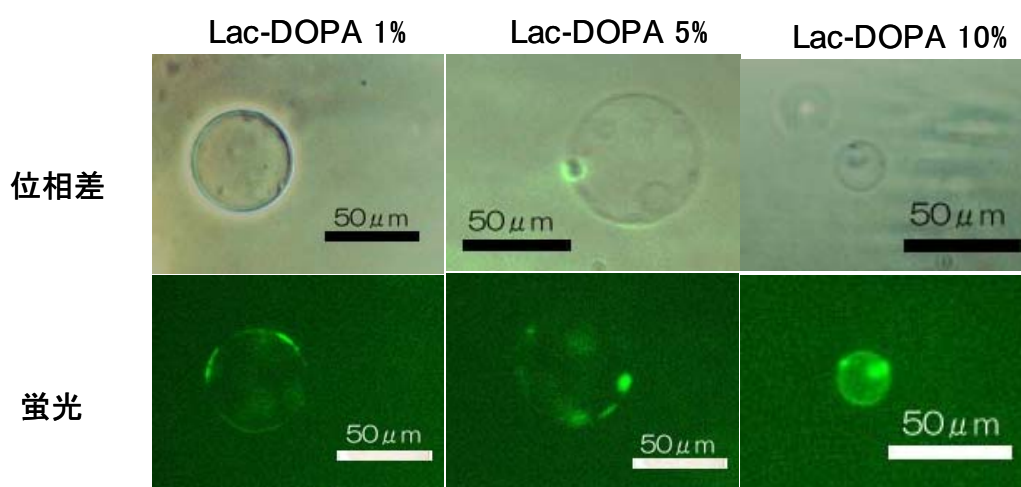


図-7 ネオ糖脂質リポソームと蛍光標識レクチンとの結合観察

ウ-3-2-5 化粧品素材としての生理機能試験

前述した機能評価を実施した結果、Lac-DOPA に抗 UVB 及び Filaggrin 発現に有意な効果が認められた。化粧品素材を専門的に評価を行っている委託試験先から水溶性セラミド様物質が抗 UVB 活性を示したことは学術的にも非常に興味深く、実用化に向けて検討を進めるべきとの評価であった（表-4 参照）。

今後更に機能性を確認するため、大量合成した Lac-DOPA を用いて下記の試験を行なう。

- ① 紫外線を照射した表皮細胞の培養上清によるメラノサイト活性化に対する作用
- ② 紫外線を照射した表皮細胞からの炎症系サイトカイン（IL-1 α 及び PGE2）リリースに対する作用
- ③ ヒトパッチテスト
- ④ 感作性試験

表-4 化粧品素材としての生理機能試験

評価 サンプル	皮膚計測		細胞を用いた機能評価				
	水分量	TEWL	細胞賦活	抗 UVB	Filaggrin	SPT	Melanin
Lac-DPP A	×	○	×	×	○	×	×
Lac-DPP E	×	○	×	○	○	×	×
Lac3EG- DPPA	○	△	×	○	◎	×	×
Lac-DOP A	×	△	○	◎	◎	×	×
Lac-DOP E	×	×	×	○	○	×	×

ウ-3-3 ネオ糖脂質の改変とその機能

ウ-3-3-1 レシチンを利用したネオ糖脂質の合成

¹H-NMR 解析や FAB-MASS 分析の結果より、レシチンの脂肪酸組成が均一ではなく、レシチン含有ネオ糖脂質は様々な脂肪酸組成のネオ糖脂質が混在した状態と予想される。本反応におけるレシチンネオ糖脂質の収量は、卵黄由来では 25 mg (Lac-HD あたりの収率 31%)、大豆由来では 29 mg (Lac-HD あたりの収率 28%) であった。

ウ-3-3-2 ネオ糖脂質のリゾ体合成

合成した Lac-MPPA、Lac-MOPA の構造解析は、¹H-NMR において δ 4.10 及び δ 4.35 のシグナルがいずれも高磁場シフトしていることからグリセロールの C-2 の脂肪酸が脱離していると考えられた。また糖のアノメリック部位と脂肪酸部位の積分比が反応前の 1:70 から 1:40 まで減少していたため脂肪酸の脱離が予想され、これらの結果より目的のリゾ体ネオ糖脂質であると判断した。

ウ-3-3-3 Lac-MPPA 及び Lac-MOPA の物性試験

¹H-NMR 解析の結果、Lac-MPPA、Lac-MOPA のいずれにおいても、D₂O または CDCl₃:CD₃OD=1:1 混合溶媒中では糖に由来するシグナル、脂質に由来するシグナル共に確認されたことから、これらの液中ではリゾ体ネオ糖脂質は単分子状態で存在していると考えられ、リゾ体ではミセル構造はとれないことを示唆した。一方で、CDCl₃ 中では糖に由来するシグナルが消失したため逆ミセル状態をとることが予想された。

ウ-4 微生物および植物起源の二糖配糖体分解酵素の基質特異性の検討

ウ-4-1 供与体基質の加水分解における動力学パラメーターの検討

本酵素の、*p*-ニトロフェニル β -プリメベロシドに対する親和性は比較的低い(高 K_m)が、 V_{max} は非常に大きかった。*p*-ニトロフェニル β -プリメベロシドは非常によい基質であった (表-5 参照)。

表-5 供与体基質(*p*-ニトロフェニル β-プリメベロシド)に対する加水分解の動力学定数

Substrate	<i>K_m</i> (mM)	<i>V_{max}</i> (μmol·min ⁻¹ ·mg protein ⁻¹)	<i>V_{max}/K_m</i>	<i>k_{cat}</i> (s ⁻¹)	<i>k_{cat}/K_m</i> (s ⁻¹ ·mM ⁻¹)
pNP β-Primeveroside	15	50	3.2	41	2.7

ウ-4-2 本酵素の基質特異性の検討 (各種配糖体に対する加水分解の相対活性)

転移生成物である植物香気前駆体に対する本酵素の水解速度は、*p*-ニトロフェニル β-プリメベロシドに対する水解速度のおよそ 1/1000 であり、転移生成物は水解基質として本酵素が作用しにくいものであった。また本酵素は *p*-ニトロフェニル β-プリメベロシドだけでなく、*p*-ニトロフェニル β-グルコシドや *p*-ニトロフェニル β-ゲンチオビオシドも水解した (表-6 参照)。

表-6 各種配糖体を基質とした時の加水分解の相対活性

Substrates	Relative rate of hydrolysis (%)
pNP β-primeveroside (Xyl β 1-6Glc β)*	100
pNP β-gentiobioside (Glc β 1-6Glc β)	7
pNP β-cellobioside (Glc β 1-4Glc β)	ND
pNP β-lactoside (Gal β 1-4Glc β)	ND
pNP β-N-acetyllactosamine (Gal β 1-4GlcNAc β)	ND
pNP β-glucoside	16
pNP β-xyloside	7
pNP β-N-acetylglucosamine	ND
pNP β-galactoside	ND
Benzyl β-primeveroside*	0.12
2-Phenylethyl β-primeveroside*	0.08
(Z)-3-Hexenyl β-primeveroside*	0.11
Geranyl β-primeveroside*	0.13

* 遊離した糖とアグリコンを HPLC で分析。pNP 配糖体は 405 nm を測定。

ウ-4-3 合成基質に対する分解様式の確認

3 種酵素の分解様式を表-7 にまとめた。チャ葉由来 β-プリメベロシダーゼは、6-位置換の β-D-グルコピラノシド以外は全く基質として認識できず、その基質認識が厳しく制御されていることが明らかとなった。一方、微生物由来の二種の酵素はチャ葉 β-プリメベロシダーゼに比べて遙かに広い基質特異性を示し、二糖とアグリコン部分の間の結合を加水分解するばかりでなく、二糖の間の結合も加水分解することができることが判明した。二糖配糖体に対する基質認識は *Penicillium* 由来の酵素が最も広く、ついで *Aspergillus* 由来のもので、いずれもチャ葉 β-プリメベロシダーゼより遙かに緩やかなものであることが明らかとなった。

また、6-位の置換基は糖でなくても良い可能性があり、6-位にアシル基を導入した 2 種

の基質 (⑨、⑩) に対する基質特異性を調べたところ、チャ葉 β -プリメベロシダーゼは二糖部分に対して大変厳しい基質認識を示していたが、6-O-ベンゾイル誘導体 (⑩) をも基質とすることが判明した。一方、微生物由来の酵素は 6-O-アシル誘導体 (⑨、⑩) のいずれをも加水分解することができることが判った。この事実は、これら酵素の基質とする二糖配糖体の糖部分は 6-位置換の β -D-グルコピラノシドに置き換えられることを示している。この結果は、本プロジェクトが対象としている *Penicillium* 由来の酵素が 6-位置換の二糖配糖体ばかりでなく、6-O-アシル- β -D-グルコピラノシドを含めた 6-位置換の β -D-グルコピラノシドに対しても作用し、汎用性の高い酵素であることを示している。TLC 分析によるこれらの結果から、比較的良く加水分解された基質については、さらに詳しい基質特異性を明らかにするため、速度論的定数を求めるべく検討を行っていく。

表-7 β -プリメベロシダーゼおよび微生物由来のジグリコシダーゼの二糖配糖体および 6-置換 β -D-グルコピラノシドに対する加水分解様式

Substrate	Enzyme		
	<i>A. fumigatus</i>	<i>P. multicolor</i>	β -primeverosidase
β -primeveroside (①)			
β -isoprimeveroside (⑤)	no reaction		no reaction
β -gentiobioside (④)			no reaction
β -cellobioside (⑥)			no reaction
6-O-AcGlc (⑨)			no reaction
6-O-BzGlc (⑩)			

ウ-4-4 微生物および植物起源の二糖配糖体分解酵素 (ジグリコシダーゼ) の分解速度の検討

基質 1~4, 9 および *p*NP β -D-glucopyranoside (*p*NP-Glc) の、それぞれの酵素による加水分解反応速度の測定を行い、 β -*p*NP プリメベロシドを 100 としたときの相対速度を求めた (表-8 参照)。水溶性の低かった 5~8 に対する活性は表-9 にまとめた。このときも 17% DMSO を含む反応液中の β -*p*NP プリメベロシドに対する活性を 100 とした。なおこの DMSO 濃度においても *Af*-PRD および *Pm*-PRD は β -*p*NP プリメベロシドに対する活性を有していた。5~8 は PRD および FH によっては 4 時間後においても加水分解産物を与えないことを TLC による分析にて確認したため、データは示していない。

表-8 Relative activity of the enzymes toward the various glucosides

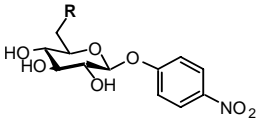
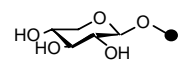
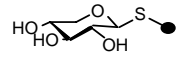
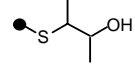
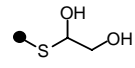
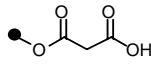

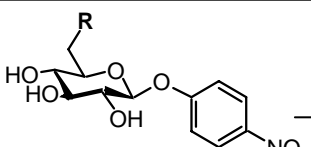
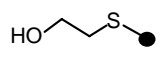
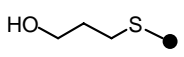
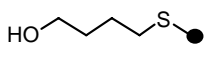
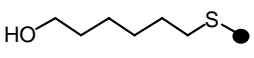
 R	Relative activity (%)			
	PRD	FH	Af-PRD	Pm-PRD
	100	100	100	100
	1.51 ± 0.05	1.80 ± 0.42	27.0 ± 0.77	32.8 ± 0.96
	0.55 ± 0.03	4.04 ± 0.24	40.4 ± 1.02	128 ± 0.18
	0.57 ± 0.03	4.77 ± 0.48	28.4 ± 0.95	84.8 ± 1.3
	0.50 ± 0.05	5.30 ± 0.41	62.7 ± 1.27	37.2 ± 1.8
	0.34 ± 0.02	2.82 ± 0.39	11.2 ± 0.79	18.4 ± 0.79

表-9 Relative activity of Af-PRD and Pm-PRD toward glucosides 5 ~ 8

 R	Relative activity (%)	
	Af-PRD	Pm-PRD
 5	5.30 ± 0.35	10.4 ± 0.33
 6	11.7 ± 0.27	22.1 ± 0.18
 7	10.9 ± 0.47	24.7 ± 0.17
 8	10.8 ± 0.39	30.6 ± 0.51

The reaction mixture contained 17% DMSO.

以下に結果をまとめた。

- 1) 微生物由来の Af-PRD と Pm-PRD は植物の酵素に比べればはるかに幅広い基質特異性を有しており、微生物由来の中でも Pm-PRD は Af-PRD に比べより幅広い基質特異性を示した。
- 2) 単糖配糖体に対する活性との比較から、微生物由来の酵素の二種とも 6-位に導入される構造は必ずしも糖の構造である必要はなく、ある程度の大きさを持ち、かつ水酸基などの極性基を有する構造であれば基質として認識し得る。

エ 考察

Penicillium multicolor の現場スケールによる大量生産を 3 回実施したが、品質的にも問題なく安定的に製造できることを確認するできた。大量に酵素を使用する糖転移反応にも対応することが可能となった。本酵素の大量培養を実施し安価に製造できる見通しをつけることができたのは、合成配糖体のコストを考える上でその意義は非常に大きいと思われる。また糖供与体である *p*-ニトロフェニルβ-プリメベロシドを大量に安定して供給できる技術を確立できたことが香気前駆体の大量合成を可能にしている。

また天然に存在する香気前駆体の大量合成法技術を確立できたことは、今後の用途開発においても意義が大きいと思われる。すなわち合成した香気前駆体を本酵素で分解して香気を発生させることができたことはこれら前駆体と本酵素を組み合わせることにより任意に香気を発生させることができることを示しており、様々な用途に応用展開が可能であると思われる。今後更なる生理機能の探索が待たれる。更に本酵素はフェノール性水酸基にも糖転移できることが示され、種々生理活性を有するフェノール化合物を配糖化して、溶解度や安定性を増加させることができると考えられる。

また本酵素を用いてネオ糖脂質を合成できることも見出した。しかし糖供与体として使用する *p*-ニトロフェニルβ-プリメベロシドは高価でありコスト的に商品化することは難しい。そこでセルラーゼ用い、安価な乳糖をヘキサンジオールなどに縮合反応で効率的に配糖化を行い、ネオ糖脂質の合成が可能であった。ネオ糖脂質には多重膜リポソーム中への薬剤封入能やネオ糖脂質のレクチン凝集活性などが認められ、また生体膜により近い形態である一枚膜リポソーム (GUV) の形態では、水中では安定だったネオ糖脂質によるリポソーム構造がイオン存在下で不安定になるなど、実際の生体環境におけるネオ糖脂質リポソームの応用にはさらなる検討の余地を残している。蛍光レクチンを用いた GUV との相互作用試験では、蛍光レクチンの結合が局在的に観察されたことから、膜が液晶相の状態においては膜上を糖鎖が自由に行き来でき、必要に応じて集合するというような現象が予想された。DDS 素材としての応用も視野に入れて、本プロジェクト終了後もネオ糖脂質の物性を含む機能性評価にさらなる検討を重ねていく。

更に 5 種のネオ糖脂質の化粧品素材として機能試験を行った結果、Lac-DOPA に抗 UVB 及び Filaggrin 発現に有意な効果が認められた。学術的にも実用的にも非常に面白い素材であり、有用性を確認するため更に機能試験を行い、実用化に向けて検討を行っていく。これらに限らず今後ネオ糖脂質の応用展開をはかり、機能性を明らかとして大量合成法を確立し、安価に供給できる体制を整えていきたい。

今回新たに卵黄由来または大豆由来レシチンをドナーとした 6-ヒドロキシヘキシル β -ラクトシドの脂質化を行い、レシチン脂質を含有したネオ糖脂質の合成に成功した。これまでドナーとしてきた脂質はいずれも高価であるため、ネオ糖脂質の実用化に向けてより安価な脂質ドナーの探索は必要であり、レシチンでの成功例は大きな前進である。レシチンの脂質については、大豆由来では不飽和脂肪酸を多く含んでいることが知られており、機能評価試験で有意性の認められた Lac-DOPA を模した機能性ネオ糖脂質の調製には最適な脂質素材であると考えられる。また、Lac-DPPA と Lac-DOPA の二種類について、脂肪酸を一つ脱離させたネオ糖脂質のリゾ体合成にも成功した。脂肪酸を一つ除去することで、水中でのミセル構造をとれなくなるなど物性の変化を $^1\text{H-NMR}$ において確認し、ネオ糖脂質の物性評価の一つの指標となる結果を得た。

微生物由来の二糖配糖体分解酵素の基質特異性の幅は、植物由来に比べて非常に広く、特に *Penicillium multicolor* 由来の酵素は糖転移能が非常に強いことが明らかになっており、基質特異性を考慮すると物質生産において基質構造に多様性を持たせることが可能であると考えられる。さらに 6-位部分の構造は糖である必要がないので、糖構造に限定されない配糖体生産への利用が可能であると思われる。特に、6-位部分へ機能性を有した置換基を導入することで、複合的な機能を持った材料の生産が期待できることが明らかとなった。

オ まとめ

- 1) *Penicillium multicolor* の生産する β -プリメベロシダーゼの現場スケールによる大量生産を 3 回実施し品質的にも問題なく安定的に製造できることを確認することができた。
- 2) 本酵素を用いた天然に存在する香気前駆体の大量合成法技術を確立し、合成した香気前駆体を本酵素で分解して任意に香気を発生させることができた。また本酵素はフェノール性水酸基にも糖転移できることが示され、種々生理活性を有するフェノール化合物を配糖化して、溶解度や安定性を増加させることができると考えられる。
- 3) 本酵素を用いてネオ糖脂質を合成できることも見出した。コストを低減させるため、セルラーゼを用いた乳糖縮合反応で合成できることを見出した。ネオ糖脂質には多重膜リポソーム中への薬剤封入能やネオ糖脂質のレクチン凝集活性などが認められ、また一枚膜リポソーム (GUV) の形態特性を明らかとした。DDS 素材としての応用も視野に入れて、本プロジェクト終了後もネオ糖脂質の物性を含む機能性評価にさらなる検討を重ねていく。また化粧品素材として機能試験を行った結果、Lac-DOPA に抗 UVB 及び Filaggrin 発現に有意な効果が認められた。学術的にも実用的にも非常に面白い素材であり、有用性を確認するため更に機能試験を行い、実用化に向けて検討を行っていく。またこれらネオ糖脂質の改変などを行う、各々の機能特性を明らかとすることができた。
- 4) *Penicillium multicolor* 由来の酵素の基質特異性の幅は非常に広く、物質生産において種々構造の糖鎖をもつ配糖体の物質生産に有用であることが示された。
- 5) 酵素の生産については工場スケールで安定的に製造することができ、本酵素を配糖化に使用することは将来の事業化を考えた場合に目処が立ったと思われる。香気前駆体やネオ糖脂質の機能性が一部明らかとなり、非常に有望と考えられる。しかし事業化

するまでにはこれら配糖体の有用な機能を更に明らかとして、また大量合成法の改良などのコスト低減を図っていく必要がある。

カ 特許出願、学会発表など

(ア) 工業所有権など

出願日：平成 17 年 3 月 4 日 出願番号：特願 2005-060559

出願人：静岡大学、天野エンザイム㈱、日本食品化工㈱

出願名称：フィラグリン合成促進剤および紫外線傷害緩和剤

(イ) 学会発表

- 1) 平成 14 年度 日本応用糖質科学会国際シンポジウム及び本大会に発表
- 2) 平成 14 年度 日本生化学会に発表
- 3) 平成 14 年度 日本応用糖質科学会中部支部会に発表
- 4) 平成 15 年度 日本農芸化学会で発表
- 5) 平成 16 年度 日本応用糖質科学会大会
- 6) 第二回静岡大学生物産業創出推進拠点シンポジウム 平成 16 年 9 月 24 日(月)
- 7) US/JAPAN GLYCO 2004 11 月 17 日
Joint meeting of the society for glycobiology and the japanese society of carbohydrate research
- 8) 平成 16 年度 日本応用糖質科学会中部支部総会・講演会