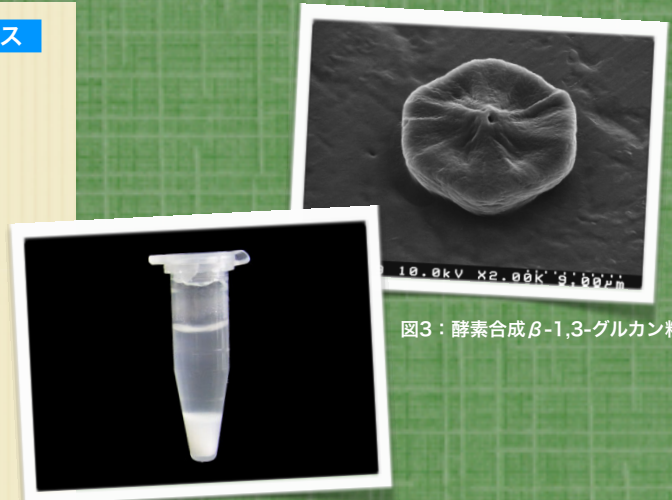
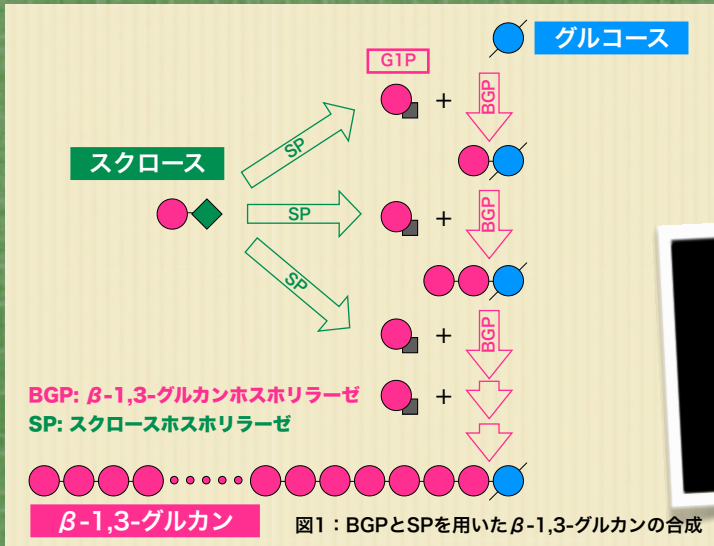


β-1,3-グルカンの人工的製造方法

三重大学大学院生物資源学研究科 磯野直人



ホスホリラーゼの反応を利用して、スクロースとグルコースから高純度のβ-1,3-グルカンを低コスト調製する方法を開発しました。

はじめに

β-1,3-グルカンは菌類や藻類が生産する多糖で、免疫賦活、抗腫瘍、抗酸化、抗炎症などの様々な有用な機能があることが知られており、機能性食品や医薬品として利用されています。β-1,3-グルカンの機能性の種類や作用の強さは多糖の構造や分子量に依存すると考えられています。また、医薬品として使用する場合は、β-1,3-グルカンの純度が重要となることがあります。

私たちは微細藻類のβ-1,3-グルカンホスホリラーゼ (BGP) を用いて、試験管内でβ-1,3-グルカンを合成する方法を開発しました (図1)。本法を利用すれば、高純度のβ-1,3-グルカンを低コストで得ることができます。また、反応条件を最適化することにより、鎖長 (重合度) をコントロールできる特長があります。

β-1,3-グルカンホスホリラーゼ

β-1,3-グルカンホスホリラーゼ (BGP, EC 2.4.1.97) は1969年にドイツのKauss博士らにより、微細藻類 *Poterochromonas malhamensis* からラミナリン (β-1,3-グルカン) を加リン酸分解する酵素として発見されました (図4)。しかし、当時の研究ではBGPの特性はほとんど明らかにされませんでした。

た。また、酵素発見以降40年間、BGPに関する報告は全くありませんでした。

私たちは黄金色藻綱の淡水性単細胞藻類 *Ochromonas danica* もBGPを生産することを見出しました。*O. danica* は増殖スピードが速く、簡単に培養できる微細藻類です (光照射不要) (図5)。

BGPによるβ-1,3-グルカン合成

ホスホリラーゼの加リン酸分解反応は可逆です。私たちはBGPとα-グルコース1-リン酸 (G1P) を混合し、合成反応を繰り返し行くと、高分子の直鎖状

β-1,3-グルカンが合成されることを発見しました (図1)。この反応ではグルコース (高濃度) やラミナリオリゴ糖がプライマー (アクセプター) となります。簡易精製したBGPを用いた場合は、プライマーを添加しなくても、β-1,3-グルカンが合成されます。また、BGPとスクロースホスホリラーゼ (SP) を併用すれば、スクロースとグルコースからβ-1,3-グルカンを合成できます (図1・図2)。

酵素合成β-1,3-グルカンは平板状六角形粒子や円形粒子を形成して沈殿する性質があります (図2・図3)。

β-1,3-グルカンホスホリラーゼ (BGP)



図5: 微細藻類 *Ochromonas danica*



図4: BGPの反応

表1: *O. danica* BGPの特性

| | |
|----------------|------------|
| 分子量 (SDS-PAGE) | 120 kDa |
| 分子量 (ゲル濾過) | 240 kDa |
| 至適pH | pH 5.5 |
| pH安定性 | pH 4.7-9.1 |
| 温度安定性 | ≤45°C |

酵素合成 β-1,3-グルカンの特長

- ☑ 低コスト
- ☑ 高純度
- ☑ 鎖長コントロール
- ☑ 機能性

低コスト

スクロースホスホリラーゼ (SP) はバクテリアなどが生産する酵素です (市販されています)。SPはスクロースを加リン酸分解し、BGPの基質であるG1Pを生成する反応を触媒します (図6)。SPとBGPを併用すると、非常に安価なスクロースからβ-1,3-グルカンを合成することができます (図7・図8)。

また、微細藻類 *O. danica* を培養して、BGPを精製することも簡単ですが、大腸菌で生産した組換えBGPを利用することも可能です (図9)。短時間で精製BGPを得ることができます。

本法を用いたβ-1,3-グルカンの合成収率は最大80%以上と高く、簡単な方法で大量の高純度β-1,3-グルカンを調製できます。

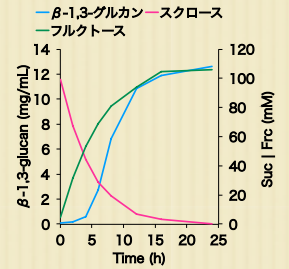
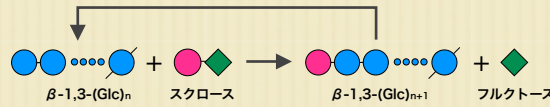
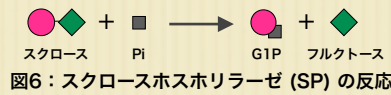


図9: 組換えBGP

表2: 酵素合成β-1,3-グルカンの鎖長調節

| G1P (mM) | L2 ¹ (mM) | 重合度 ² |
|----------|----------------------|------------------|
| 100 | 10 | 11 |
| 100 | 5.0 | 19 |
| 100 | 2.5 | 31 |
| 20 | 0.25 | 51 |
| 20 | 0.10 | 60 |
| 20 | 0.05 | 77 |
| 20 | 0.02 | 95 |

¹ラミナリビオース

²サイズ排除クロマトグラフィーのピーク位置から算出

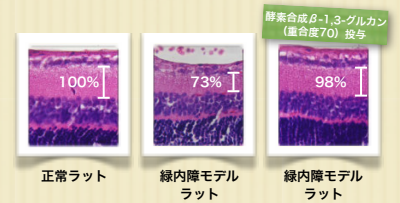


図10: 酵素合成β-1,3-グルカンによる網膜内網状層の薄化抑制

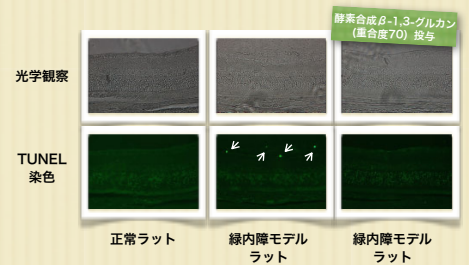


図11: 酵素合成β-1,3-グルカンによる網膜神経節細胞のアポトーシス抑制効果

特許: β-1,3-グルカンの製造方法 WO 2010/092997

日本・米国・英国・独国・仏国
へ出願中

お問い合わせ先



三重大学大学院生物資源学研究所
資源循環学専攻食品資源工学研究室
磯野直人
isono@bio.mie-u.ac.jp
http://fsb.bio.mie-u.ac.jp/

三重大学社会連携研究センター
知的財産統括室
chizai@crc.mie-u.ac.jp
http://crc.mie-u.ac.jp/

高純度

β-1,3-グルカンを酵素合成する方法はとてシンプルです。緩衝液に二種類の糖質 (例: グルコースとスクロース) と二種類の酵素 (BGPとSP) を混ぜて一晚反応するだけで、β-1,3-グルカンが合成されます。つまり、**反応液中には限られた成分しかありません**。また、β-1,3-グルカンは沈殿として得られるため、**純水で洗浄するだけで高純度に精製することが可能です**。ヒトやマウスの培養細胞を用いた実験を行ったところ、酵素合成β-1,3-グルカンに細胞増殖抑制作用はありませんでした。

鎖長コントロール

β-1,3-グルカンの機能性の種類や作用の強さは多糖の構造や分子量に依存すると考えられています。本法では、反応液のプライマー濃度とG1P濃度 (またはスクロース濃度) を変化させることにより、**酵素合成β-1,3-グルカンの鎖長 (グルコース重合度) をコントロールすることが可能です** (表2)。この技術を応用すれば、有用な機能の発揮に適した長さのβ-1,3-グルカンや、天然から得る

ことが難しい長さのβ-1,3-グルカンを簡単に合成できます。

機能性

重合度50以上の直鎖β-1,3-グルカンには強い抗腫瘍活性があることが知られています。

また、私たちは酵素合成β-1,3-グルカンが緑内障治療に役立つ可能性があることを明らかにしました。高眼圧 (緑内障モデル) のラットの硝子体に酵素合成β-1,3-グルカン (重合度70) を注入したところ、網膜内網状層の薄化が抑制され、網膜電図の維持が確認されました (図10)。また、網膜神経節細胞のアポトーシスと細胞数の減少が抑制されました (図11)。

このほか、いくつかの有用な機能性について確認済みで、現在も調査を継続しています。

おわりに

酵素合成β-1,3-グルカンの製造、機能性評価、商品開発に関心のある企業との共同研究を希望しています。