

希少糖生産のためのアルドースイソメラーゼ活性を適切に評価する比色定量法

篠田小雪・鈴木琢磨・森本兼司

Colorimetric method to appropriately evaluate aldose isomerase activity for rare sugar production

Koyuki Shinoda, Takuma Suzuki and Kenji Morimoto

Summary

Aldose isomerases are beneficial enzyme for rare sugar production and their demands have increasing because some rare sugars are recently focused as functional material. On the Izumoring, a strategy of rare sugar production, aldose isomerases are used to produce aldose from ketose. Generally, aldose isomerase activity is evaluated using cysteine-carbazole method by measuring producibility of ketose from aldose. However, this method is not appropriate method for evaluation of rare sugar producibility because it evaluates reverse reaction of production for many rare sugars. In this study, the authors found that the colorimetric method, *o*-amino diphenyl-acetic acid method (ADA method), is suitable evaluation method of aldose isomerases activity for rare sugar production. ADA method showed two digits higher detection sensitivity for aldoses such as D-glucose, D-mannose, and D-allose, compared with ketoses such as D-fructose and D-allulose. Actually, L-rhamnose isomerase activity was evaluated using ADA method, resulting enzyme activities which is theoretically correct were obtained. This ADA method will be appropriate method for evaluation of aldose isomerase activity for rare sugar production.

Key words : aldose isomerase, ADA method, rare sugar production

緒 言

アルドース-ケトース間の平衡反応を触媒する酵素アルドースイソメラーゼは産業上重要な酵素である。例えばD-グルコースとD-フルクトース間の異性化を触媒するアルドースイソメラーゼの一種D-キシロースイソメラーゼは、ブドウ糖果糖液糖の生産に用いられている¹⁾。近年ではD-マンノースイソメラーゼ (DMI) を用いたD-フルクトースからのD-マンノース生産が注目されている^{2), 3)}。酵素法による希少糖の生産にこれらのアルドースイソメラーゼは欠かせない酵素群であり、他にL-ラムノースイソメラーゼ⁴⁾、L-アラビノースイソメラーゼ⁵⁾、D-アラビノースイソメラーゼ⁶⁾、L-リボースイソメラーゼ⁷⁾が報告されている。中でも当研究室ではL-ラムノースイソメラーゼ (LRhI) を用いたD-アルロースからのD-アロース生産に関して精力的に研究を進めている⁸⁾。

酵素利用の研究において酵素活性 (ユニット, U) の算出は極めて重要となる。ユニットの算出には、一般的

に比色定量法かHPLC分析が用いられる。HPLC分析による単糖の分析はスループットが低く、一検体に要する時間が30から40分ほどとなるため多検体を迅速に解析できないという問題点がある。そこで筆者らの研究室では、単糖の定量法として主にSomogyi-Nelson法^{9), 10)} やシステイン-カルバゾール法¹¹⁾ のような比色定量を用いている。前者はあらゆる還元糖に呈色を示し、後者はアルドースに対しては検出感度が低く、ケトースに対しては鋭敏に呈色を示す。この性質を利用して、システイン-カルバゾール法はアルドースからのケトースへの転換活性を算出するために広く用いられている。

希少糖生産において、アルドースイソメラーゼは主にケトースからアルドースを生産するために用いられる。ここで、アルドース-ケトース間の平衡反応はケトース側に偏ることが多いという事実に触れておかねばならない。これは糖の熱力学的安定性の差によるものであり、例えばD-アルロース-D-アロース間では平衡比は7:3、D-フルクトース-D-マンノース間では8:2と大きくケ

トース側に偏っている^{12), 13)}. DMIを用いたときのギブスの自由エネルギー ΔG はD-フルクトースからD-マンノース方向で2.8 kJ/mol, 逆反応は-2.8 kJ/molと推測されている (eQuilibrator: <https://equilibrator.weizmann.ac.il/> 2023年10月17日閲覧). これはD-フルクトース (ケトース) からD-マンノース (アルドース) への異性化には逆方向への酵素反応が進行しにくいことを示している. したがって, LRhIやDMIの酵素活性をシステイン-カルバゾール法で算出 (アルドースからケトース方向への酵素活性を算出) した数値と実際に希少糖を生産時の異性化反応, すなわちケトースからアルドースへの酵素活性の数値とは大きく解離することになる. これは異性化酵素のカイネティクスを評価できないだけでなく, 希少糖生産における条件設定が難しくなる. そこで希少糖生産反応におけるより正確なアルドースイソメラーゼの酵素活性を測定するために, ケトース存在下において迅速かつ鋭敏にアルドースを定量する方法が望まれてきた.

筆者らはこの問題を解決するために還元糖の比色定量法についての報文を調査し, Timellらの α -アミノジフェニルを用いた還元糖の比色定量法 (α -アミノジフェニル-酢酸法¹⁴⁾, 以下ADA法とする) により解決されるのではないかと考えた. このADA法は α -アミノジフェニルがアルドースと縮合してグリコシルアミンおよびそのSchiff塩基を生成する反応であるが, 彼らはD-フルクトースについても調べており, ほとんど発色しないことも併せて報告している. ADA法ではアルドースから生じた生成物を比色定量することにより, 間接的にアルドースの量を定量することが可能となる. 筆者らは, このADA法がD-フルクトースだけでなく, 他の希少ケトースに対しても呈色せず, かつケトース存在下でのアルドースに対して呈色が定量可能であればシステイン-カルバゾール法と対を成す比色定量法となりうると考えた. 本稿ではADA法について紹介し, 実際にアルドースイソメラーゼのケトースからアルドースへの酵素活性を定量した例を報告する.

材料および実験方法

1. 試薬

希少糖は当研究室で調製したものをを用いた. そのほかの試薬は特に記載が無ければ富士フィルム和光純薬株式会社および東京化成工業株式会社より購入した.

2. ADA法およびシステイン-カルバゾール法

(i) ADA法

Timellらの方法の変法を用いた. α -アミノジフェニル

0.4 gを酢酸100 mLに溶解し, ADA試薬を調製した. ADA試薬2.5 mLと糖液0.5 mLを試験管中で混和し, 蒸発を防ぐためにビー玉を用いて試験管に栓をした. 沸騰水中で30分間加熱し, 水中で数分急冷したのち室温で静置した. 紫外可視近赤外分光光度計 (UV-1800, SHIMADZU) を用いて極大吸収波長を測定した. 380 nmの波長で反応液の吸光度を測定することで, D-グルコース, D-マンノース, D-アロース, D-フルクトース, D-アルロースの検量線を作成した.

(ii) システイン-カルバゾール法

糖液500 μ Lと1.5%システイン100 μ Lを試験管内で混和し, そこに70%硫酸を3 mL添加し, ボルテックスを用いてよく混和した. 水中で冷却し, 0.12%カルバゾール100 μ Lを添加してボルテックスにて混和し, 50°Cで30分間インキュベートした. この反応液の吸光度を580 nmの波長で測定した. 同様にD-フルクトース, D-アルロースの検量線を作成し, 酵素活性の算出に供した.

両法ともに, 検量線を作成する際は, 吸光度が0.1-1の間に収まるように糖液のモル濃度を調整した.

3. ADA法およびシステイン-カルバゾール法を用いたLRhIの酵素活性測定

Shinella zoogloeoides NN6をL-ラムノースを1%含む500 mLの酵母エキス培地 [酵母エキス 0.5%, ポリペプトン 0.5%, 塩化ナトリウム0.5%, pH 7.0] を用いて30°C, 200 rpmの条件で21時間培養した¹¹⁾. 培養菌体を50 mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 8.5) を用いて洗浄し, 洗浄菌体を同緩衝液25 mLで懸濁したあと超音波破碎により酵素液を抽出した. 限外ろ過膜 (Amicon Ultra-15 Ultracel-30K) を用いて酵素液を濃縮し, 以降の実験に用いた.

50 mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 8.5) 350 μ L, 50 mM基質溶液50 μ L, 10 mM塩化マンガン50 μ Lを試験管中で混和し, 60°Cの湯浴で5分間インキュベートした. その後, 酵素液50 μ Lを添加して酵素反応を開始し, 20分後に10%トリクロロ酢酸を50 μ L添加することで反応を停止した. D-アルロースを基質として用いたときはADA法を用いてD-アロースを定量し, D-アロースを基質として用いたときはシステイン-カルバゾール法を用いてD-アルロースを定量した. LRhIの酵素ユニットは, 60°C (50 mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液, pH 8.5), 基質濃度5mMの条件下で1分間に1 μ molの生産物を生産する酵素量を1ユニットと定義し, 特に断りのない限り酵素液1 mL当たりの酵素活性 (U/mL) で示した.

4. LRhIを用いたD-アルロースからのD-アロース生産

100 µg/mLのアンピシリンを含む3 mLのSuper Broth (SB) 培地 [ポリペプトン3.5%, 酵母エキス2.0%, 塩化ナトリウム1.0%] に *Shinella zoogloeoides* NN6由来のLRhI組換え大腸菌を接種し, 30°C, 200 rpmで12時間培養した. この培養液100 µLを同組成のSB培地100 mLに接種し同条件で12時間培養した. 続いて培養液全量を同組成のSB培地10 Lに接種し孔径0.22 µmのフィルターに通して滅菌した空気を3 L/minで通気しながら30°C, 200 rpmで7時間培養し, 菌体濁度がO.D. 600 nm=0.4–0.8であることを確認した. その後, 終濃度1 mMとなるようにIPTGを添加し, 酵素発現を4時間誘導した. 遠心分離により得られた培養菌体10 gを50 mMグリシン–水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 8.5) を用いて洗浄し, 洗浄菌体を同緩衝液100 mLで懸濁したあと超音波破碎により酵素液を抽出し, 組換えLRhIとした. 終濃度50 mM D-アルロース 500 µL, 50 mMグリシン–水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 8.5), 1 mM塩化マンガンを含む5 mLの反応液を15 mLプラスチックチューブ内で混合し, 60°Cのインキュベーターで5分間加熱した. そこにシステイン–カルバゾール法及びADA法で算出した酵素活性, 2.0 U/mL, 4.0 U/mL相当の組換えLRhIを添加することで酵素反応を開始した. 経時的にサンプリングし, 沸騰水で3分間煮沸することにより酵素反応を停止させた. 遠心分離により沈殿を除去し, その上清を配位子交換カラム (Gelpack GL-C611, Hitachi) と示差屈折率計 (Shodex RI-501EX, Shodex) を用いてHPLC分析することでD-アロース量, およびD-アルロース量を定量した.

結果と考察

ADA法の検量線

D-グルコースとD-フルクトースを用いたADA法で生じる色素の極大吸収波長を測定した (Fig.1). 1.0 mM (180 µg/mL) のD-グルコースを用いたとき, 極大吸収波長は約380 nmであり, おおよその吸光度は0.57であった. 一方, 同濃度のD-フルクトースを用いたときは可視光領域の吸収がほとんど見られなかったことからADA法はアルドースの定量に好適であることが再確認された. また, アルドペントースであるD-キシロースを同様に試験すると視覚的には赤色を呈し, その極大吸収波長は約365 nmであった (データなし). 本稿では現時点で研究が活発なヘキソースの異性化に焦点を当てるが, ヘキソース以外の糖でも同様にADA法を適用できると考えられる. ADA法を用いて様々な濃度の糖を定量したところ, 濃度依存的な呈色が確認された (Fig. 2). 本研究

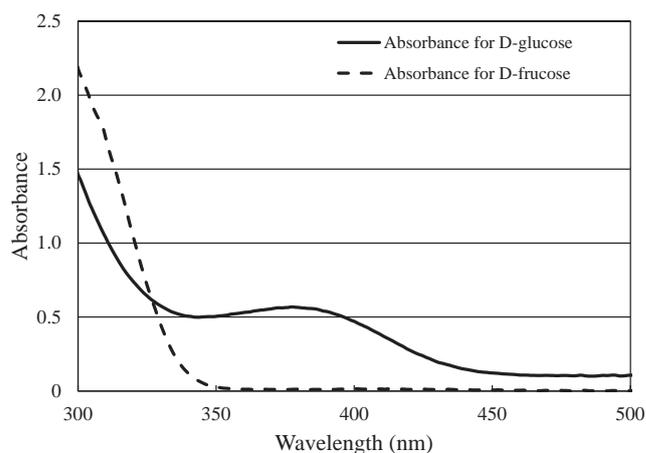


Fig. 1. Absorption spectra for D-glucose and D-fructose by ADA method. Solid line: D-glucose, dashed line: D-fructose.

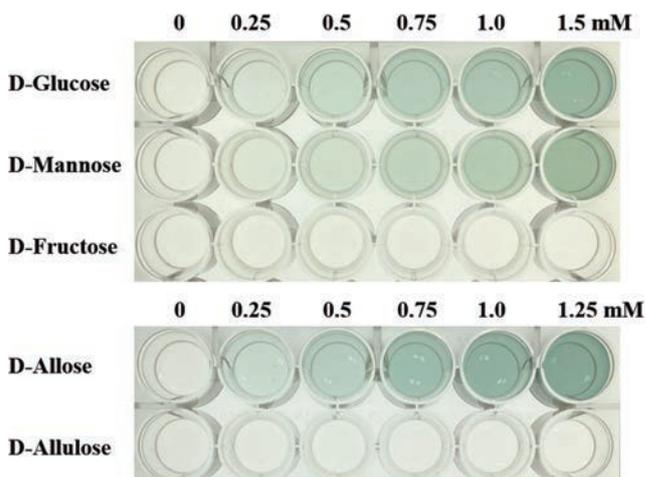


Fig. 2. Coloration for solutions of monosaccharide by ADA method.

では検量線を吸光度が0.1–1の間に収まる濃度範囲で作成したため, 検量線の濃度下限はそのまま検出感度と位置付けられる. アルドースの検出感度はケトースと比して2桁高く, アルドースの特異的検出が可能であることが強く示唆された. Fig. 3にADA法によるD-グルコース, D-マンノース, D-フルクトース D-アロース, D-アルロースの検量線の式を示した. いずれの検量線においても相関係数は0.99以上となっており, 高い直線性が確認された. 以上の結果より, アルドースに対して優れた特異性, 定量性, 検出感度を有することから, ADA法はアルドースイソメラーゼの酵素活性測定に適していることが示された.

ADA法を用いたアルドースイソメラーゼの酵素活性測定

本稿では, 当研究室で所有する細菌 *Shinella zoogloeoi-*

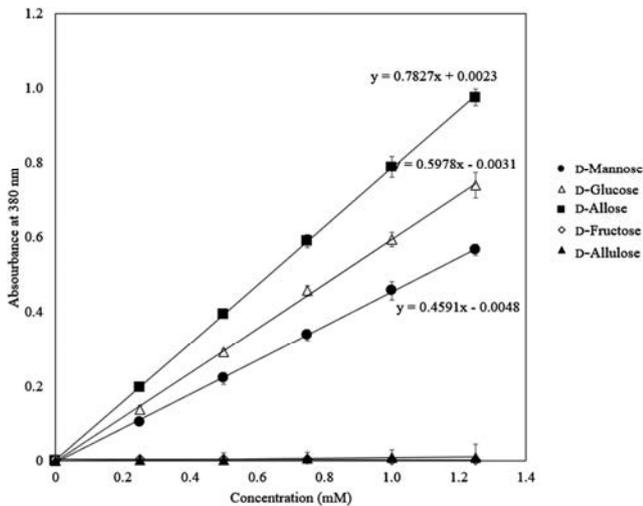


Fig. 3. Calibration curve for monosaccharides by ADA method.

des NN6由来の組換えLRhIを用いて、ADA法がアルドースイソメラーゼの酵素活性測定に適しているかを検討した。本酵素は当研究室で既に特性評価されており、D-アロース生産に応用可能であることが示されている⁸⁾。システイン-カルバゾール法を用いてLRhIがD-アロースからD-アルロースを生産する酵素活性を測定したところ、68.4 U/mLであった。一方でADA法を用いて上記の逆反応を評価した結果、D-アルロースからD-アロースへは2.18 U/mLであった。緒言で述べたように、ここで検証した反応はD-アルロース側に平衡が大きく偏る。LRhIのシステイン-カルバゾール法による酵素活性値はADA法と比して31.4倍高く、蓋然的な結果が得られた。希少アルドヘキースはケトヘキソースを基質として生産するのでシステイン-カルバゾール法で算出した酵素活性値での生産条件ではユニット数が高く見積もられることになる。そのため、平衡に達するまでの時間に大きなずれを生じさせる。ADA法は従来法よりもアルドースイソメラーゼの希少糖生産能を正確に評価できることが強く示唆された。

システイン-カルバゾール法で算出した酵素活性とADA法で算出した酵素活性をもとに、NN6株由来LRhIを用いてD-アルロースからのD-アロース生産を実施した(Fig. 4)。同じユニット数を用いているにもかかわらず、ADA法で算出した酵素活性を採用したほうが顕著にD-アロース生産速度が高かった。この結果は、従来法では希少糖生産に必要な酵素量を低く見積もっていたことを示している。反応初期における生産物量を見てもADA法で評価したLRhIは添加した酵素のユニット数から推測される生産物量とほぼ等しいD-アロース(4Uで5 $\mu\text{mol}/\text{min}$)を生産した。一方、システイン-カルバゾール

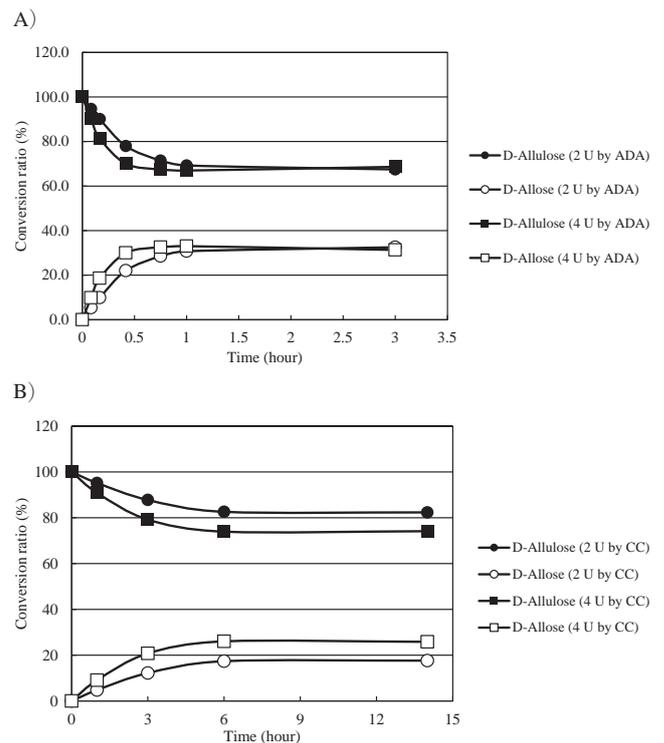


Fig. 4. Comparison of equilibrium ratios in reactions using enzyme units calculated by the ADA method and cysteine carbazole (CC) method when producing D-allose from D-allulose. A: D-Allose production using enzyme units calculated by ADA method. B: D-Allose production using enzyme units calculated by CC method.

ル法から算出した活性では約10%の生産物量(4Uで0.38 $\mu\text{mol}/\text{min}$)であった。さらに、使用する酵素ユニット数が少ないと平衡比が文献値(D-アルロース:D-アロース=7:3)に到達しなかった。以上の結果は、ADA法を用いることで希少糖生産に必要な酵素添加量を正確に予測できることを示している。ADA法は希少糖生産における酵素量の過不足を回避し、より費用対効果の高い生産反応を実施する一助となるだろう。

摘 要

アルドースイソメラーゼは希少糖生産上有用であるため近年注目を集めているが、希少糖生産に向けて適切に酵素活性を測定するのは困難である。そのため、希少糖生産に必要な酵素量を正確に算出することができず、酵素の過不足が生じやすい。本稿では、ADA法がD-フルクトース存在化ではほとんど呈色しないが、アルドースは鋭敏に検出・定量できるという報告をもとに、本法のアルドースイソメラーゼ活性測定への応用を試みた。結果として、ADA法はケトース存在下でもアルドースを定

量することができ、従来法では難しかったケトースからアルドース方向への酵素活性の正確な評価を可能とした。アルドースイソメラーゼの酵素活性をADA法によ

り評価することで、希少糖生産時の酵素添加量をより精密に制御できるようになるだろう。

引用文献

- (1) Parker, K., Salas, M., Nwosu, V.C. High fructose corn syrup: Production, uses and public health concerns. *Biotec. Mol. Bio. Rev.* 5, 71-78 (2010).
- (2) Hua, X., Li, Y., Jiang, Z., Ma, J., Liu, H., Yan, Q. Biochemical properties of a novel D-mannose isomerase from *pseudomonas syringae* for D-mannose production. *Appl. Biochem. Biotech.* 193, 1482-1495 (2021).
- (3) Hu, X., Zhang, P., Miao, M., Zhang, T., Jiang, B. Development of a recombinant D-mannose isomerase and its characterizations for D-mannose synthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 89, 328-335 (2016).
- (4) Bhuiyan, S.H., Itami, Y., Izumori, K. Isolation of an L-rhamnose isomerase-constitutive mutant of *Pseudomonas* sp. strain LL172: Purification and characterization of the enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* 84, 319-323 (1997).
- (5) Rhimi, M., Ilhammami, R., Bajic, G., Boudebbouze, S., Maguin, E., et al. The acid tolerant L-arabinose isomerase from the food grade *Lactobacillus sakei* 23K is an attractive D-tagatose producer. *Bioresour. Technol.* 101, 9171-9177 (2010).
- (6) Menavuvu, B.T., Poonperm, W., Takeda, K., Morimoto, K., Granström, T.B., et al. Novel substrate specificity of D-arabinose isomerase from *Klebsiella pneumoniae* and its application to production of D-altrose from D-psicose. *J. Biosci. Bioeng.* 102, 436-44 (2006).
- (7) Morimoto, K., Terami, Y., Maeda, Y., Yoshihara, A., Takata, G., et al. Cloning and characterization of the L-rhamnose isomerase gene from *Cellulomonas parahominis* MB426. *J. Biosci. Bioeng.* 115, 377-381 (2013).
- (8) Morimoto, K., Suzuki, T., Ikeda, H., Nozaki, C., and Goto, S. One-pot multi-step transformation of D-allose from D-fructose using a co-immobilized biocatalytic system. *J. Ge. Appl. Microbiol.* 68, 1-9 (2022).
- (9) Somogyi, M.: Micromethods for the estimation of diastase. *J. Biol. Chem.*, 125, 399-414 (1938).
- (10) Nelson, N.: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153, 375-380 (1944).
- (11) Dische, Z., and Borenfreund, E.: A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. *J. Biol. Chem.*, 192, 583-587 (1951).
- (12) Morimoto, K., Park, C., Ozaki, M., Takeshita, K., Shimomishi, T., Granström, T.B., Takata, G., Tokuda, M., and Izumori, K. Large scale production of D-allose from D-psicose using continuous bioreactor and separation system. *Enzyme Microb. Technol.*, 38, 855-859 (2006).
- (13) Takasaki, Y. Kinetic and equilibrium studies on D-mannose- D-fructose isomerization catalyzed by mannose isomerase from *Streptomyces aerocolorigenes*. *Agr. Biol. Chem.*, 31, p. 435-440 (1967).
- (14) Timell, T. E., Glaudemans, C. P. J., Currie, A. L. Spectrophotometric methods for determination of sugars. *Analytical chemistry*, 28, 1916-1920 (1956).