

希少糖比色定量法の再確認と微生物スクリーニングへの応用

森本兼司・鈴木琢磨

Colorimetric method for rare sugars to distinguish aldoses and ketoses and its application

Kenji Morimoto and Takuma Suzuki

Summary

A rapid screening method of ketose 3-epimerase, SiMo method, was developed using Si (IV)-Mo (VI) solution. This solution is a yellow color without ketoses. Ketoses except psicose (allulose) was rapidly formed blue 12-molybdsilicate anionic species by Si (IV)-Mo (VI) under acidic pH. Although cysteine-carbazole method, which was specifically detected ketose, shows same level coloration for various ketoses, colorization by Si (IV)-Mo (VI) was different depending on the species of ketoses. By contrast, the formation rate of 12-molybdsilicate anionic species for almost aldoses was very slow. The candidates possessing ketose 3-epimerase activity was screened from various samples. This activity was detected the formation of D-fructose from D-psicose using SiMo method. Positive control such as *Shinella* sp. NN-6 and recombinant D-tagatose 3-epimerase was detected enzymatic activity using this method. No activity was detected by screened samples in this study, suggesting that positive colonies were not detected in SiMo method due to low detection sensitivity.

Key words : Ketose 3-epimerase, rapid screening, SiMo method

緒 言

単糖を定量する方法は大きく2種類ある。1つは高速液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーのように直接的に目的物質を定量する方法、もう1つは比色定量法で目的物質と標準物質の濃度を主に吸光度計により比較し、目的物質を定量する分析方法である。さらに比色定量法の発色方法は、試薬と目的物質を直接化学変化させる方法といわゆる酵素法と呼ばれる目的物質を酵素によって検量が容易な物質に変換させてから定量する方法がある。代表的な例としては、前者にはフェノール-硫酸法⁽¹⁻³⁾、Somogyi-Nelson法⁽³⁻⁵⁾などが、後者にはグルコースオキシダーゼ法⁽⁶⁾などが挙げられる。

希少糖生産を研究している当研究室において、単糖の定量は非常に重要な実験方法である。基本的な生産戦略はイズモリング⁽⁷⁾にそって実施されるが、主要反応は異性化酵素を用いる。すなわち、アルドースイソメラーゼによるケトース・アルドース間の反応とケトース3-エピメラーゼによるケトース・ケトース間であり、これらの

反応産物の迅速な判別法が必要となる。

先述のSomogyi-Nelson法やフェノール-硫酸法はいわゆる還元糖を定量する方法として有名である。当研究室では還元糖量をSomogyi-Nelson法にて定量している。しかしながら、本法は全還元糖を定量するために、異性化反応後に得られる複数種の単糖が混在する場合には判別が不能であるため、酵素反応の進行状況を確認することができない。そこでシステイン-カルバゾール法を用いてケトースを定量することによって確認している⁽⁸⁾。この方法はケトースの定量として実績がある。これまでに多くの実験で使用してきたのだが、この方法でも問題点が存在する。アルドース・ケトース間の異性化酵素反応は経過を追跡できるが、ケトース3-エピメラーゼは基質も反応産物もともにケトースであるため、Somogyi-Nelson法、システイン-カルバゾール法も酵素反応の定量に使用できない。現状としてはHPLCによって酵素活性を測定しているのだが、当研究室のHPLCの感度は比色法と比して10倍程度低いこと、測定に時間を要するなど問題点がある。これを解決するべく種々の報文を調

査したところ, KatanoらがD-グルコースイソメラーゼのハイスループットなプレートアッセイ法を報告している⁽⁹⁾. 彼らはSi(IV)-Mo(VI)溶液が弱酸性下では黄色の12-ヘテロポリモリブデン酸(VI)となり, 単糖が添加されるとMo(VI)種を直接還元して青色の12-ヘテロポリモリブデン酸(V/V)が生成されることを見出した⁽¹⁰⁾. さらに酸および有機溶媒の濃度など溶液条件の調整によりD-フルクトースの感度をD-グルコースの20倍程度に向上させることに成功している. これだけでなく彼らが調べた単糖ではケトースが迅速に発色し, アルドースの発色が非常に遅くなる(ほとんど発色が見られない)という結果を導いている. 例外として, L-プシコースはアルドースと同レベルであった. 我々はこのD-フルクトースに強く発色しL-プシコースには発色しない現象に注目した. 一般的な単糖の比色法はエナンチオマーに関係なく同様に発色するので, D-プシコースもL-プシコース同様に発色しないだろうとの推測のもとに先の問題点をKatanoらの変法(SiMo法とする)によって解決することを試みた. まず入手可能な糖をSiMo法により網羅的に調べ, D-プシコースを基質としてケトース3-エピメラーゼ活性を有する微生物のスクリーニングに応用した例を紹介する.

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. その他の試薬は特に記載がなければ, ナカライテスク, 和光純薬株式会社(現富士フィルム和光純薬), 東京化成工業株式会社で購入したものをを用いた.

2. SiMo法

Katanoらの方法⁽⁹⁾の変法を用いた. 1 Mの Na_2MoO_4 溶液6 mlおよび0.25 Mの Na_2SiO_3 溶液2 mlを混合し, それに5Mの塩酸をゆっくり攪拌しながらpH 4.5になるように添加した. この溶液800 μl に対して各サンプルを200 μl 添加し, 70°Cで30分加熱し, 吸光度750 nmを測定した. 検量線を作成するため以下のサンプル, ケトヘキソース(D/L-フルクトース, D/L-プシコース, D/L-ソルボース, D/L-タガトースの8種), アルドヘキソース(D-グルコース, D-マンノース, D-ガラクトース, D-アロース, D-アルトロース, D-タロースの6種), ケトペントース(D/L-リブロース, D/L-キシロースの4種), アルドペントース(D-キシロース, D-リキソース, D-アラビノース, L-アラビノース, D/L-リボースの6種)を使用した. 各単糖の吸光度が1を越えないようにモル濃

度を設定し検量線を作成した.

3. ケトース3-エピメラーゼを有する微生物のスクリーニング

無機塩培地(0.26% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.24% KH_2PO_4 , 0.56% K_2HPO_4 , 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.50% Yeast extract)にL-ラムニトールを1%添加した培地3 mlを試験管に注ぎ湿熱滅菌させた. これに土壌サンプルを適量添加し, 30度で振盪培養した. 生育した微生物から超音波破砕機を用いて粗酵素液を調製した. リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)下で基質としてD-プシコースを用いて60°Cで1時間酵素反応させた. ポジティブコントロールとして当研究室でスクリーニングしたケトース3-エピメラーゼを有する*Shinella*属NN-6株⁽¹¹⁾および*Pseudomonas chiorii*由来のD-タガトース3-エピメラーゼ組換え大腸菌⁽¹²⁾を用いた. *Shinella*属NN-6株は, 無機塩培地に炭素源として1% L-ラムニトールを添加した培地3 mlで, D-タガトース3-エピメラーゼ組換え大腸菌は100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含むSB培地3 mlに植菌した. 30°Cで $\text{O.D.}_{600\text{nm}} = 0.4$ 程度になるまで培養し, 終濃度1 mMとなるようにIPTGを添加して4時間誘導した. それぞれから超音波破砕機を用いて粗酵素液を調製した. 上清180 μl に200 mM D-プシコースを20 μl 添加し, 1時間, 60°Cで酵素反応させた. 反応後, SiMo試薬800 μl を添加, 60°Cで1時間インキュベートし吸光度を測定した.

結果および考察

SiMo法による単糖類の検量線

Table 1に各単糖の検量線および測定レンジを示した. 本報告では吸光度が1を越えないように測定レンジを設定したため, 測定レンジの数値が小さいほど感度が高いことを意味する. 他の比色法と同様にエナンチオマーは同程度の発色を示した. 大きな傾向としてケトースに強く, アルドースには弱く発色した. ケトースで最も感度良く発色した糖はD/L-キシロースであり, 次いでD/L-フルクトース, D/L-ソルボース, D/L-リブロース, D/L-タガトース, D/L-プシコースの順であった. D/L-プシコースはほかのケトースと比較して感度が非常に低く, 高濃度でないとき速やかな発色が確認されなかった. その感度はリブロースの約1/40, フルクトースの約1/20であった. これは以下で述べる大多数のアルドースの感度と同レベルであった. この結果より, 後に述べるケトース3-エピメラーゼ活性の迅速なアッセイ法にSiMo法が適応できるのではないかと考えた. D-フルクトース, D-プシコースの50 mMまでの発色の様子,

Table 1. Calibration curve and sensitivity of hexoses and pentoses by SiMo method

Monosaccharide	Formula of linear	R ²	Concentration range (mM)
Ketohexoses			
D-Fructose	$y = 0.0757x + 0.0008$	1.0000	2-10
L-Fructose	$y = 0.0738x - 0.0004$	0.9998	2-10
D-Sorbose	$y = 0.0627x - 0.0113$	0.9959	2-10
L-Sorbose	$y = 0.0685x + 0.0011$	1.0000	2-10
D-Tagatose	$y = 0.0156x - 0.0020$	0.9996	10-50
L-Tagatose	$y = 0.0164x + 0.0025$	0.9995	10-50
D-Psicose	$y = 0.0036x - 0.0067$	0.9976	40-200
L-Psicose	$y = 0.0036x - 0.0040$	0.9997	40-200
Ketopentoses			
D-Xylulose	$y = 0.1298x - 0.0054$	0.9992	1-5
L-Xylulose	$y = 0.1419x - 0.0026$	0.9974	1-5
D-Ribulose	$y = 0.0295x - 0.0031$	0.9998	5-20
L-Ribulose	$y = 0.0301x + 0.0058$	0.9995	5-20
Aldohexoses			
D-Glucose	$y = 0.0045x + 0.0049$	0.9989	30-120
D-Mannose	$y = 0.0067x + 0.0017$	0.9998	20-60
D-Galactose	$y = 0.0059x + 0.0042$	0.9979	20-60
D-Allose	$y = 0.0025x - 0.0052$	0.9990	50-250
D-Altrose	$y = 0.0094x - 0.0072$	0.9926	20-70
D-Talose	$y = 0.0145x + 0.0070$	0.9941	10-50
Aldopentoses			
D-Xylose	$y = 0.0027x + 0.0110$	0.9976	100-300
D-Lyxose	$y = 0.0016x + 0.0074$	0.9993	100-500
D-Arabinose	$y = 0.0051x - 0.0005$	0.9974	25-120
L-Arabinose	$y = 0.0052x + 0.0086$	0.9984	25-120
D-Ribose	$y = 0.0074x - 0.0007$	0.9997	20-100
L-Ribose	$y = 0.0078x - 0.0044$	0.9983	20-80

10 mMまでの検量線, および両スペクトルを測定した結果をFig. 1に示した. いずれの結果からもD-プシコースは発色がほとんど見られないことが分かった. アルドースに関してはD-タロースがケトースであるタガトースと同程度の発色を示した以外は非常に弱い発色しか示さなかった. 本SiMo法は手法が簡便で, 直線性が極めて高いこともありプシコース以外のケトースの定量に適応できることがわかった. ただし, SiMo法のD/L-フルクトースに対する感度はシステイン-カルバゾール法のそれと比べて約1/20ほどになる. 筆者らの目的とするケ

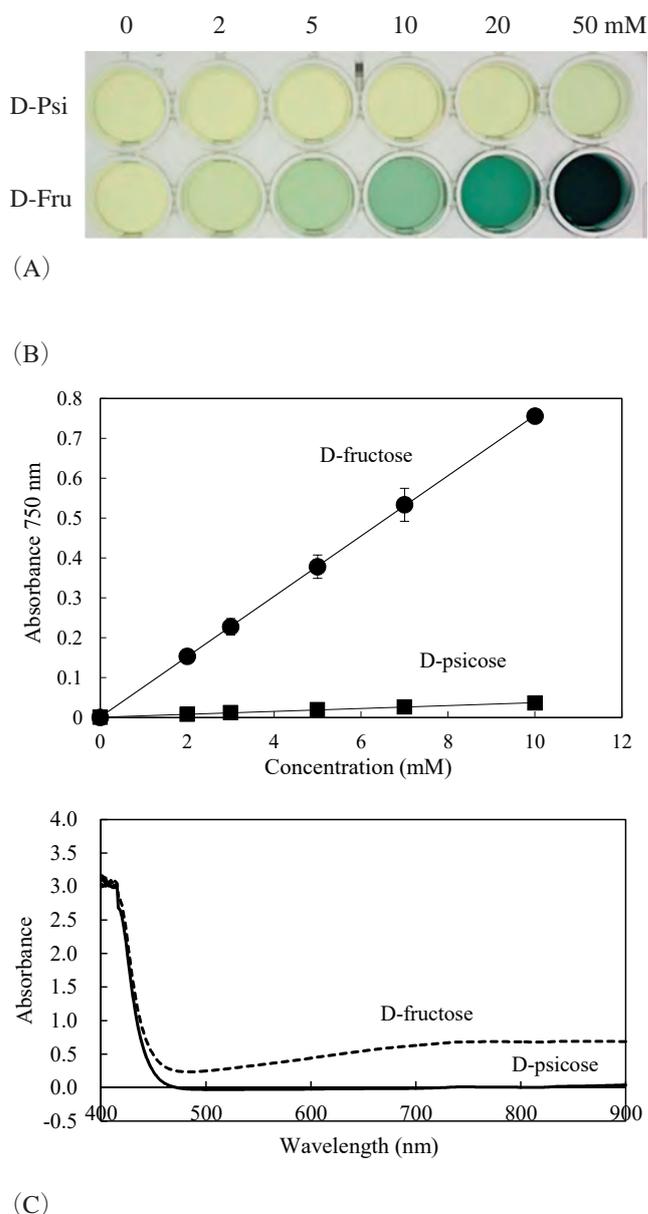


Fig. 1. Photograph (panel A), absorbance at 750 nm (panel B), and absorption spectra (panel C) of D-fructose and D-psicose.

トース3-エピメラーゼのスクリーニングにおいては, この感度の低さが寧ろ好都合となり, 酵素活性が高い酵素が優先的に検出されることになる.

SiMoの発色原理はKatanoらが記しているように青色ヘテロポリモリブデン酸 (V/VI) の生成によるが, これはソモギーネルソン法と類似した事象である. ソモギーネルソン法は還元糖により2価の銅イオンを1価にさせ, それをSiの代わりにAs (V) を用いて青色ヘテロポリモリブデン酸 (V/VI) を生成させる. この違いで大きく異なるのは二糖類以上の還元糖とアルドースの発色

がソモギーネルソン法と比較して著しく遅くなることである。なぜ発色の速度が異なるのかは不明であり、今後の研究の進展が待たれる。

ケトース3-エピメラーゼを有する微生物のスクリーニング

無機塩培地にL-ラムニトールを1%添加した培地で生育が認められた10サンプルを集菌し粗酵素液を調製し、D-プシコースを基質にして酵素反応させた。反応を停止後、SiMo法を用いてその上清の発色の有無を確認した。その結果をFig. 2に示した。ポジティブコントロールとして用いた*Shinella*属NN-6株および*Pseudomonas chichorii*由来のD-タガトース3-エピメラーゼ組換え大腸菌では発色が確認されたが、今回のスクリーニングで陽性を示した菌は得られなかった。残念な結果となっているが非組換え菌であるNN-6株から調製した粗酵素でも陽性反応が確認されたことは非常に意味を持つ。つまりケトース3-エピメラーゼ濃度が高濃度でなくとも検出されたので、今後のスクリーニングの手法として期待できる。

摘要

ケトース発色試薬の1つであるSi (IV)-Mo (VI) 溶液による希少糖の発色特性 (SiMo法) について調べた。本試薬はD-プシコース以外のケトースに対して速やかに

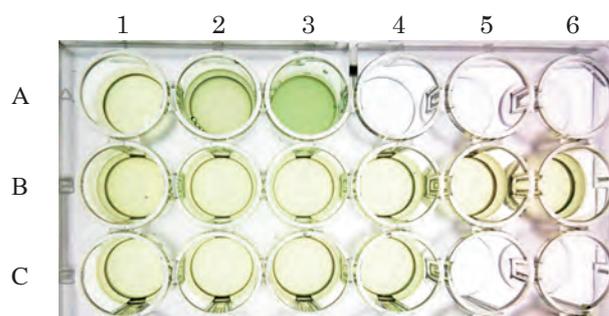


Fig. 2. Ketose 3-epimerase assay using SiMo method
A1, blank; A2, positive control (*Shinella* sp. NN-6 which was grown with D-allulose); A3, positive control (*E. coli* harboring D-tagatose 3-epimerase gene); B1 to C4, screened samples.

発色を示した。これまで問題となっていたD-フルクトースとD-プシコースの比色法による区別を可能にする方法であることがわかった。すなわち、D-プシコースを基質としてケトース3-エピメラーゼ反応により生じたD-フルクトースをSiMo法によって他検体を同時にかつ容易に分析することが可能となった。本法を用いて土壌サンプルより上記酵素を有する微生物のスクリーニングを試みたが陽性株は得られなかった。ポジティブコントロールでは発色が認められたため、本法はケトース3-エピメラーゼ活性の検出に欠かせない方法になるだろう。

引用文献

- (1) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28 (3), 350-356 (1956).
- (2) Hodge, J. E., and Hofreiter, B. T.: Methods in carbohydrate. Chem. I., In Whistler, R. L. and Wolfrom, M. L. (eds.). Determinations of reducing sugars and carbohydrates. pp. 388-390, Academic press, New Your (1962).
- (3) 福井作蔵:還元糖の定量法. 東京大学出版会, 東京 (1969).
- (4) Somogyi, M.: Micromethods for the estimation of diastase. *J. Biol. Chem.*, 125, 399-414 (1938).
- (5) Nelson, N.: A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153, 375-380 (1944).
- (6) Miwa, I.: Mutarotase effect on colorimetric determination of blood glucosinolate with β -D-glucose oxidase. *Clin. Chim. Acta*, 37, 538-540 (1972).
- (7) Izumori, K.: Izumoring: a strategy for bioproduction of all hexoses. *J. Biotechnol.*, 124, 717-722 (2006).
- (8) 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).
- (9) Katano, H., Takakuwa, M., Itoh, T., and Hibi, T. Colorimetric determination of fructose for the high-throughput microtiter plate assay of glucose isomerase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79, 1057-1060 (2015).
- (10) 平 修, 古田 泰菜, 佐藤 絢夏, 植松 宏平, 木元 久, 片野 肇: Direct molybdosilicate reduction (DMoR) 法による単糖の比色分析と糖化反応解析への応用. *日本食品工学会誌*, 15, 151-156 (2014).
- (11) 野崎智帆: *Shinella* sp. NN-6 由来の異性化酵素を用いたD-プシコースとD-アロースのワンポット生産法の開発. (2017). [香川大学修士論文]
- (12) Ishida, Y., Kamiya, T., & Izumori, K. Production of D-tagatose 3-epimerase of *Pseudomonas chichorii* ST-24 using recombinant *Escherichia coli*. *J. Ferment. Bioengineer.*, 84, 348-350 (1997).