

IV 微生物が生産する高機能オリゴ糖・ サイクロデキストラン (CI) の 発見から実用化に至るまで

1. はじめに

オリゴ糖は、単糖が2個から数個（20個程度までを指すこともある）重合した糖質である。ピフィズス菌増殖因子、抗う蝕性、非う蝕性、低カロリー、さわやかな甘味など、様々な優れた機能性を有するものも多い。何種類かのオリゴ糖は工業的に酵素生産され菓子や飲料に用いられている。

オリゴ糖には直鎖構造のものと、環状構造のものがある。直鎖構造のオリゴ糖は低カロリー甘味料、整腸作用、保湿作用などの有用な性質をもつものが多い。デンプンから工業生産されるイソマルトオリゴ糖（ α -1,6結合から成るイソマルトースとイソマルトトリオース、および α -1,6と α -1,4結合から成るパノースの混合物）はおなかの調子を整える作用がある。グルコース2分子が α -1,1結合したトレハロースには、さわやかな甘みや食味改善効果、保湿効果があり、加工食品などに利用されている。これら直鎖オリゴ糖で実用化されているものはほとんど2糖あるいは3糖の低分子のものである。

一方、環状オリゴ糖は環状構造の内側に種々の物質を取り込み、包接体を作る機能が知られている。サイクロデキストリン (CD)¹⁾、サイクロフルクタン (CF)²⁾、サイクロアルタナン (CTS)³⁾などが知られているが、現在産業的に広く利用されている環状オリゴ糖はCDのみで、 α -CD、 β -CD、 γ -CD（順に α -1,4結合したグルコース分子6, 7, 8個から成る）の3種類がある。

著者らの研究グループは1993年の発見から現在に至るまで、環状オリゴ糖の一種であるサイクロデキストラン (CI)⁴⁾の研究開発を行ってきた。CIはCDと同様グルコースが環状に連結した構造であるが、結合様式がCDは α -1,4結合なのに対してCIは α -1,6結合である点が異なる。発見当初の目的はCDでは包接できない難溶性物質を包接する新規の環状オリゴ糖を検索することであり、水溶性グルカンであるデキストランを炭素源とした培地を用いて新規オリゴ糖を蓄積する菌株をスクリーニングした。その結果、小熊らにより、*Bacillus circulans* T-3040株が取得された⁴⁾。本菌株はデキストランを含む培地で培養すると、7~9個のグルコースが α -1,6結合のみで環状に連結したサイクロデキストラン、順にサイクロイソマルトヘプタオース (CI-7)、サイクロイソマルトオクタオース (CI-8)、サイクロイソマルトノナオース (CI-9)を菌体外に生産する⁴⁾。後にグルコース10個以上が重合した高分子のCIも生産されることが明らかになり⁵⁾、現在のところCI-7~CI-17までの11種類のCIが構造決定されている⁶⁾。構成しているグルコー

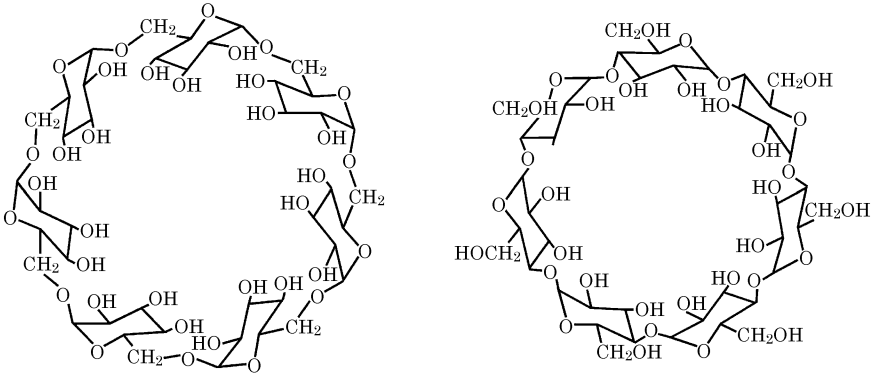


図 1 サイクロデキストリン CI-7 (左) とサイクロデキストリン β -CD (右) の構造

ス分子の数は、CI では 7 個以上と CD と比較して重合度が高い。図 1 にグルコース 7 個から成る CI-7 と、同じく 7 個のグルコースから成る β -CD の構造を示す。CI と CD は結合様式が異なり、同じ数のグルコース分子のものでも環の口径が CI のほうが大きい。また、CI は CD に比して極めて水溶性が高く、CI のみがかう蝕菌のグルカン合成酵素を阻害して歯垢の形成を防ぐ作用を持つ⁷⁾。CI の歯垢形成阻害作用は、ショ糖の存在下でも発揮されるという特徴がある。この特徴を利用して、CI を加えて歯垢をできにくくした黒糖甘味料が 2008 年に製造・販売されるに至った。また、当初から目的としていた包接剤としての機能としては、イソマルトデカオース (CI-10) 以上の高分子の CI に強い包接能が見いだされ、現在、包接剤としての実用化に向けて研究開発中である。

2. サイクロデキストリンの発見

デキストランを原料として環状オリゴ糖を生成する菌をスクリーニングするために、ブルーデキストラン 2000 (アマシャム・バイオサイエンス社製) を炭素源として加えた固体培地に土壌抽出物などを塗抹し、ハローを形成する (ブルーデキストランの分解によりハローが生じる) デキストラン資化性菌を選抜した。選抜した菌を、デキストラン 40 (アマシャム・バイオサイエンス社製) を含む培地で液体培養し、培養液を、Amide-80 カラム (Tosoh 社製) を用いて高速液体クロマトグラフィ (HPLC) で分析した。現れたオリゴ糖ピークは、すべての α -1,6 結合を分解するエンド型デキストラナーゼ処理によって消失したが、 α -1,3 グルカナーゼや α -アミラーゼでは分解されなかったことから、本オリゴ糖は α -1,6 グルコシド結合より成ると推定できた。また、エキソ型グルカナーゼでは分解せず、末端構造を持たないことが推測できた⁴⁾。次に、各オリゴ糖ピークを集めて

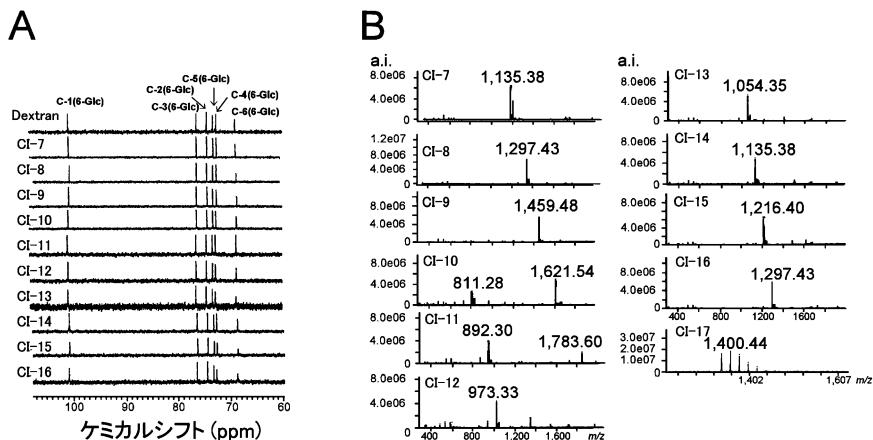


図 2 サイクロデキストラン CI-7~17 の¹³C NMR 分析 (A) と質量分析 (B)

¹³C NMR 分析, 質量分析などで CI-7~17 の構造決定を行った。¹³C NMR 分析結果を図 2A に, 質量分析結果を図 2B に示す。図 2A より, CI-7~CI-16 はいずれも基質のデキストランと同じ α -1,6 グルコシド結合を示すシグナルのみ検出されているのがわかる。図 2B では, CI-7, 8, 9, 10, 11 については $[M+H]^+$ イオン, CI-10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 については $[M+2H]^{2+}$ イオン, CI-17 については $[M+2Na]^{2+}$ イオンが観察できた。質量分析結果から CI-7~17 の推定分子量は順に 1134, 1296, 1458, 1620, 1782, 1944, 2106, 2268, 2430, 2592, 2754, 2916 となり, 同じ重合度のグルコースから成る直鎖のイソマルトオリゴ糖と比較すると水 1 分子小さい値で, CI が還元末端を持たないことが示唆された。A, B 両者により, CI-7~16 は, α -1,6 グルコシド結合をもつ環状オリゴ糖であることが確認された。

CI-17 については NMR 分析出来るだけの十分な量のサンプルが得られなかったが, 酵素消化試験結果および分子量から推測すると CI であると推測できる。

最初に CI 生産菌として分離された菌は *Bacillus circulans* T-3040 株であった⁴⁾。その後, *B. circulans* U-155 株⁸⁾, *Bacillus* sp. 330K 株⁶⁾, 同 350K 株⁶⁾, 同 360K 株⁶⁾, 同 860K 株⁶⁾, *Paenibacillus* sp. 591K 株⁶⁾, 同 598K 株⁶⁾ の合計 8 株が発見された。これらの菌株はすべてデキストランを炭素源として培養したときに菌体外液中に CI を蓄積したが, 生産する CI 鎖長の組成に違いが見られた (図 3)。*B. circulans* T-3040 株は CI-7, CI-8 および CI-9 を主として生産するが, このうち CI-8 を最も多く生産する⁹⁾。*Paenibacillus* sp. 598K 株も CI-7, CI-8 および CI-9 を主として生産するが, CI-7 を最も多く生産する。これに対して, *Bacillus* sp. 330K 株は CI-8 と CI-10, CI-11, CI-12 の生産量が多く, 同 350K 株, 同 360K 株,

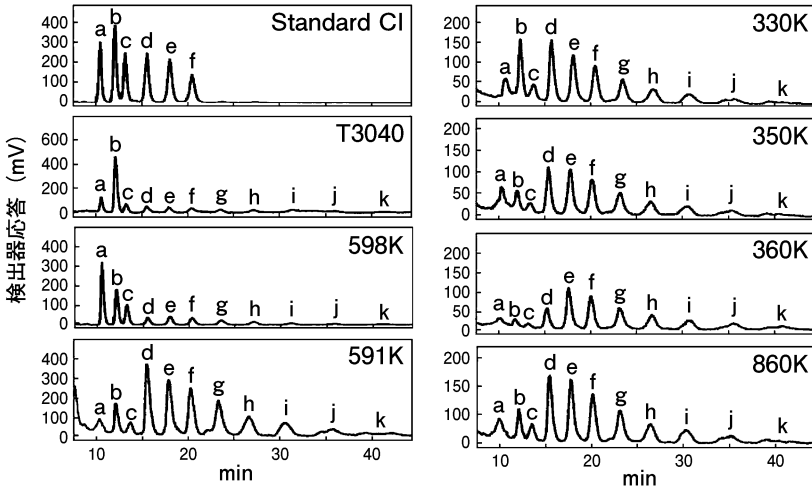


図 3 CI 生産菌がデキストランを含んだ培養液中に生産するサイクロデキストランの HPLC 分析

a: CI-7 b: CI-8 c: CI-9 d: CI-10 e: CI-11 f: CI-12 g: CI-13 h: CI-14 i: CI-15
j: CI-16 k: CI-17

同 860K 株, *Paenibacillus* sp. 591K 株は CI-7 と CI-8, および CI-9 の生産量よりも, CI-10, CI-11, CI-12 を多く生産する菌株であった⁶⁾。菌株の種類によって生産する CI の分子量分布が異なる原因は, それぞれの菌株が持つ CI 合成酵素 (cyclodisomaltooligosaccharide glucanotransferase, CITase)⁹⁾ の違いによるものであると予測している。

3. サイクロデキストランの性質と機能

3.1 サイクロデキストランの一般的物性

CI は図 1 に示すように環状構造であるため末端基を持たず, 従って還元性がなく, 加熱, 酸・アルカリにも強い安定な糖質である。また, 水溶性が極めて高く, 温度や分子量に依らず等量以下の水に溶解する。これは, α -CD, β -CD, γ -CD の水溶性が常温で順に 14.5%, 1.85%, 23.2% である¹⁰⁾ のに比べて非常に高い値である。この性質は, CD よりも高濃度での利用を可能にするため, CD では可溶化できない難水溶性の物質を可溶化・安定化できる可能性を期待させる。また, CI は糖質ではあるがほとんど無味無臭であり, 高濃度で使用しても味や風味を損なうことなく, 有効に異味・異臭をマスキングできると考えられる。

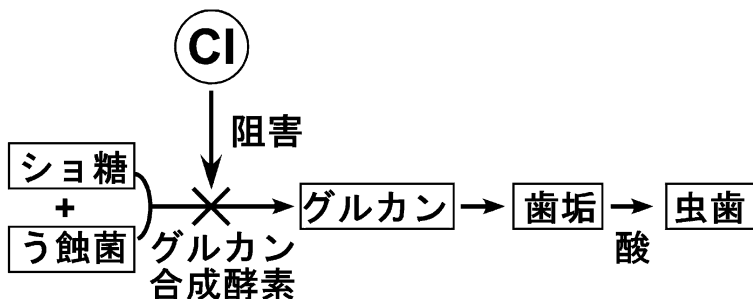


図 4 う蝕の形成とサイクロデキストランの作用点

3.2 サイクロデキストランの抗プラーク活性

図 4 に示すように、*Streptococcus mutans* や *S. sobrinus* などのヒトう蝕菌は、グルカン合成酵素の作用で、シヨ糖から非水溶性粘着性のグルカンを作る。歯の表面に固着した不溶性グルカンに菌が付着増殖し、歯垢（プラーク）を形成する。付着したう蝕菌は乳酸を生成して歯の表面のエナメル質を脱灰し、虫歯が形成される。CI はグルカン合成酵素の働きを強く阻害することによって、歯垢の原因となるグルカンの形成を抑制する作用（抗プラーク活性）がある⁷⁾。

小林ら⁷⁾による *S. mutans* 菌の酵素を用いた *in vitro* の試験では、同じくグルカン合成酵素阻害があるとされるパラチノースが 50 mM の濃度で不溶性グルカンの形成を約 7% しか阻害しなかったのに対し、CI-8 は 5 mM で約 75% 阻害した。さらに、福島、今井ら¹¹⁾により、シヨ糖の濃度 0.1%~10% で、0.1% (0.88 mM) 濃度以上の CI-7 により顕著に人工プラーク形成が抑制されると報告された。様々な分子量の CI 混合物を用いた場合でも、CI-7 と同程度の人工プラーク形成抑制が観察され、さらに 0.02% 程度まで濃度を下げても抑制効果が確認できた（今井ら、未発表データ）。また、ラットを用いた動物試験においても 0.1% 濃度の CI を添加したう蝕誘発食（56% シヨ糖含有）で飼育した *S. mutans* 感染ラットは CI 無添加飼料で飼育した同ラットのう蝕スコアより有意に低いという結果も報告されている¹¹⁾。分子量の違いによって CI のグルカン合成阻害作用に変化がみられるかどうか、CI-7~CI-12 について *S. mutans* グルカン合成酵素の活性を pH 5.5 および pH 7.0 の条件で測定した。少なくとも CI-7 から CI-12 までは分子量にかかわらず、いずれの pH においてもほとんど同じ強さのグルカン合成阻害作用が検出できた⁵⁾（図 5）。なぜ分子量が異なってもグルカン合成酵素阻害強度は同じなのか理由はまだ解明されていないが、CI がフレキシビリティーの高い構造であるために重合度が高くてもグルカン合成酵素の活性中心に結合することができるか、あるいはグルカン合成酵素の触媒部位が大きな分子を受け入れるフレキ

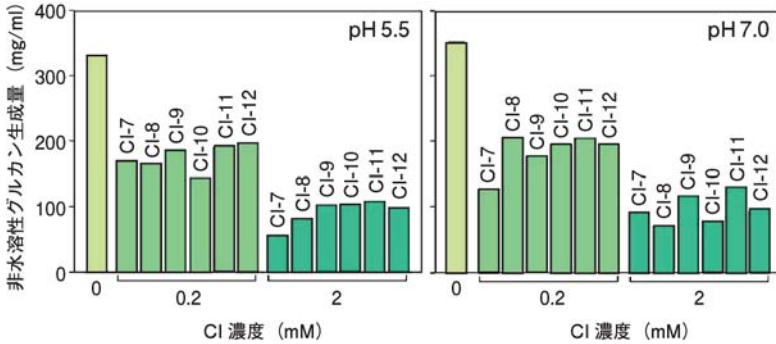


図 5 CI-7, CI-8, CI-9, CI-10, CI-11, CI-12 による *Streptococcus mutans* 由来グルカン合成酵素の阻害

シビリティーがあることが予測できる。

以上のように CI はショ糖の存在下でもグルカン合成を強く阻害する作用があり、ラットでは実際にう蝕スコアが有意に下がった¹¹⁾。CI は代替甘味料として食品に利用されている非う蝕性の糖類とは異なり甘味はないが、砂糖が存在しても歯垢をできにくくするという優れた特徴がある。この特徴を利用した食品として、最近 CI を添加した黒糖甘味料が実用化され、現在は精製糖や菓子などへの応用も検討されている。

3.3 サイクロデキストランの包接能

CI は CD 同様分子内部が疎水性になっていると考えられ、また、分子モデルから同じグルコース重合度の CD に比べて口径が大きく厚みが薄く、CD よりも分子のフレキシビリティーが非常に高いことが予想されている。CI は高いフレキシビリティーを持った構造であることが原因か、CD と比較すると包接作用は概ね弱いと言われており、CI-7, CI-8, CI-9 を用いた試験では、これまでのところ、CD をしのぐ包接性は見いだされていない⁸⁾。そこで、CI-10 以上の高分子の CI についても包接能を検定するため、CI-7 から CI-12 までの 6 種類の CI について、室温における 100 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 中での 0.032 mM ピクトリアブルー色素の変化を測定した。通常条件ではピクトリアブルー色素はリン酸緩衝液中では不安定で、すみやかに褪色する。そこで、CI (CI-7, CI-8, CI-9, CI-10, CI-11, CI-12)、および、対照としてグルコース (Glu)、またはサイクロデキストリン (α -CD, β -CD, γ -CD) を各 1.2 mM 添加して褪色による吸光度の低下を測定した。図 6 は 25°C で保温し、620 nm における吸光度を経時的に測定した結果を示す。無添加、グルコース添加、 α -CD 添加ではほぼ完全に青色が褪色し、吸光度が 0.3

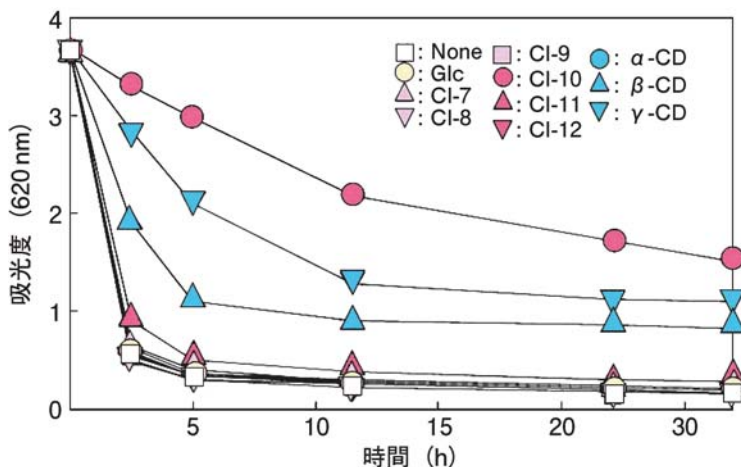


図 6 サイクロデキストランによるビクトリアブルー色素の安定化

以下に低下した。対照的に、グルコース 10 個から成る CI-10 を添加すると褪色が著しく遅れ、22 時間保温後も吸光度の低下は 50% 程度とその安定化効果は β -CD、 γ -CD よりも顕著であった⁵⁾。CI はある特定の重合度で強い包接能を持つサイクロアミロース (17~数百個のグルコースが環状につながった環状 α -1,4-グルカン)¹²⁾ のような性質を有する可能性も考えられる。CI-10 は強い包接能を持つ高水溶性環状オリゴ糖としての応用が期待されている。また、ビクトリアブルーの場合は CI-10 が最も強い包接性を示したが、水溶性の低いイソフラボン的一种であるダイゼインやゲステインについては、CI-11 および CI-12 に強い可溶化能が確認できた。CI も CD 同様、ゲスト分子の種類によって包接できる CI の種類が異なると考えられるので、さらに詳細にゲスト分子と CI 分子の関係を調べていく必要がある。一方、CI に側鎖を付加することで分子のフレキシビリティを低下させると包接能が高まったとの報告もある⁸⁾。

3.4 サイクロデキストランの安全性

CI はグルコースのみから成る単純な構造であり、同じように α -1,6 グルコシド結合から成る糖質であるデキストランおよびイソマルトオリゴ糖は既に天然物として安全性が認知されている。CI も化学構造から類推すると有害性はないと推測されるが、環状構造であるため新規物質と見なされ、食品として利用するためには安全性を立証する必要がある。

様々な分子量の CI を含んだ CI 混合物について、まず、ラットを用いて急性毒性試験、亜急性毒性試験を行った結果、CI にこれらの毒性は認められなかった。

加えて、細菌における変異原性も認められなかった。ついで 20 才以上 65 才未満の健常男女による CI 混合物のヒト安全性試験を行った。1 日 2 g または 4 g を 1 ヶ月間摂取し、身長、体重、血圧/脈拍、問診、血液学検査 (9 項目)、生化学検査 (26 項目)、特殊検査 (3 項目)、尿検査 (8 項目) などを行った結果、異常は認められなかった。

さらに、デキストランやイソマルトオリゴ糖が天然物であることから CI も天然物ではないかと予測し、古くから食品として用いられてきた黒糖から CI の検出を試みた¹³⁾。黒糖を活性炭カラム、ODS C₁₈ カラム等で処理して多糖、単糖、ショ糖などを取り除き、エキソ型グルカナーゼ処理によって直鎖のオリゴ糖を分解除去した後に残存する環状オリゴ糖を、Amide-80 カラム (Tosoh 社製) を用いて HPLC で分離した。図 7 に示すように CI-7、CI-8、CI-9、CI-10、CI-11、CI-12 と全く同じリテンションタイムに溶出するピークが黒糖抽出成分に観察された。これらのピークはエンド型デキストラナーゼによってすべての α -1,6 結合を

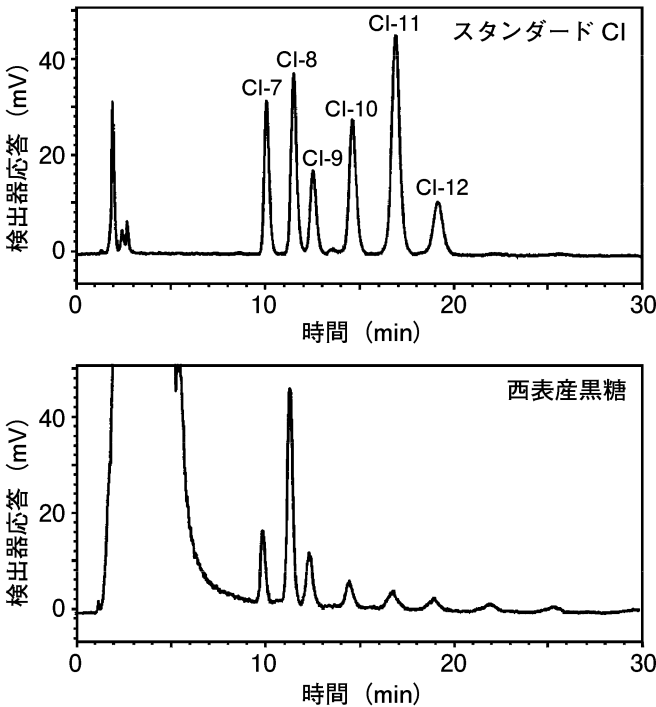


図 7 黒糖 (西表島産) 中におけるサイクロデキストランの HPLC による検出

分解すると消失したが、 α -1,3 グルカナーゼ、 α -アミラーゼ、エキソ型グルカナーゼでは分解されず、CI の酵素消化試験と全く同じ結果となり、本オリゴ糖は α -1,6 グルコシド結合より成る環状糖である CI と示唆された。また、これらのピークについて質量分析した結果、CI-7、CI-8、および CI-9 と同じ分子量を示すシグナルが確認でき（図 8）、CI は黒糖中に存在する天然物であることが示唆された¹³⁾。

以上の結果から、CI は食用として安全性が確認された天然のオリゴ糖であると考えられる。

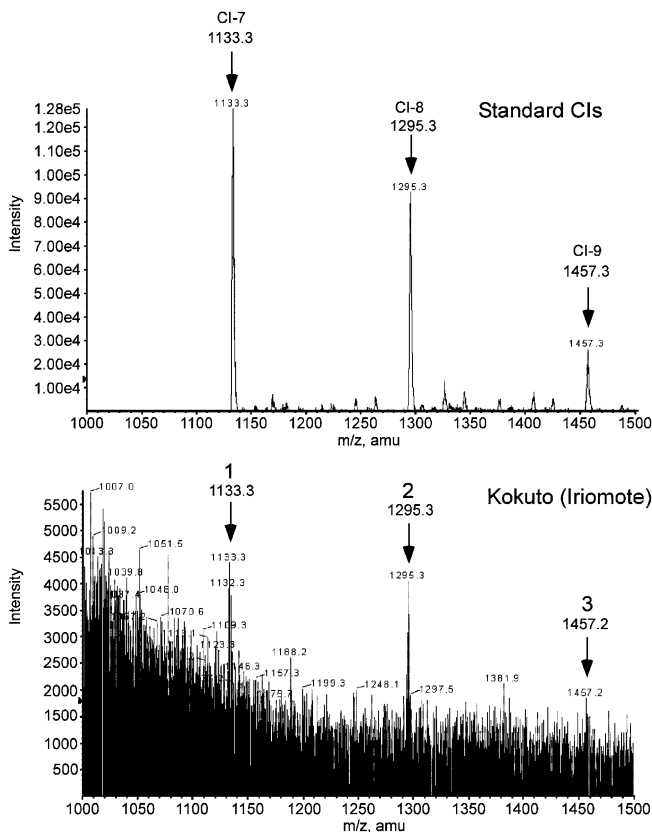


図 8 黒糖（西表島産）中におけるサイクロデキストラン（CI-7, 8, 9）の質量分析

4. サイクロデキストランの実用化技術開発

4.1 サイクロデキストランの生合成

CI はう蝕の原因となる歯垢の形成を強く阻害する作用を持つが、興味深いことに、CI の原料デキストランは、う蝕の原因といわれているショ糖から酵素合成される。代表的な CI の生合成経路を図 9 に示す。まず、*Leuconostoc* 属菌などが生産するデキストラン合成酵素（デキストランスクラーゼ）が、ショ糖を分解してフルクトースを遊離するとともに、グルコース部分を転移して α -1,6 結合鎖を主鎖とする多糖デキストランを合成する¹⁴⁾。ついで、デキストランの α -1,6 直鎖部分に *Bacillus* 属菌などが生産する CITase が作用し、分子内転移反応で環状糖 CI が合成される⁹⁾。このように、ショ糖を原料として、2 種類の菌株由来の 2 種類の酵素の作用で CI は生合成される。また、最近、デンプンを原料とした CI 合成経路も存在することが示唆され、この生合成経路の解明に向けて研究を進めている。

4.2 原料ショ糖のコスト低減とデキストラン高生産菌の取得

デキストランは、製糖工場においてはパイプを詰まらせるという問題を引き起こすが、製品としてのデキストランの場合は、ショ糖から生産されるため、デンプン、セルロースなどと比較して高価な多糖であると一般に認識されている。CI を食品として利用する場合には、その原料として高価な精製糖を用いることはコスト的に現実的でない。そこで、甘蔗汁や廃糖蜜など、ショ糖を含む安価な原料から、良好に CI 生産に適したデキストランを生産する菌株をスクリーニングした。

CITase はデキストランの α -1,6 直鎖部分からのみ CI を合成することができ、分岐構造が存在するとそこで反応が停止すると考えられる。そこで CI を効率良く生産するためには、 α -1,6 結合の割合の高いデキストランを生産することが必要である。代表的なデキストラン工業生産株 *Leuconostoc mesenteroides* NRRL

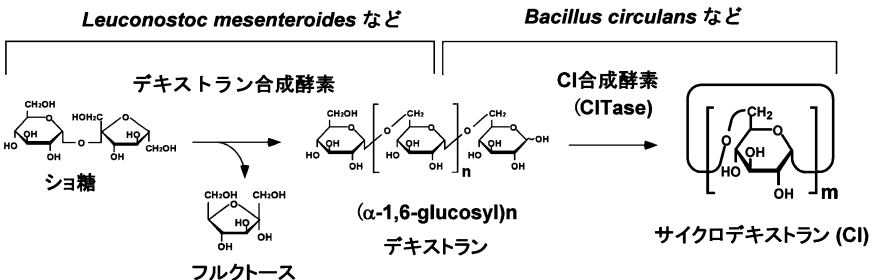


図 9 サイクロデキストランの生合成経路

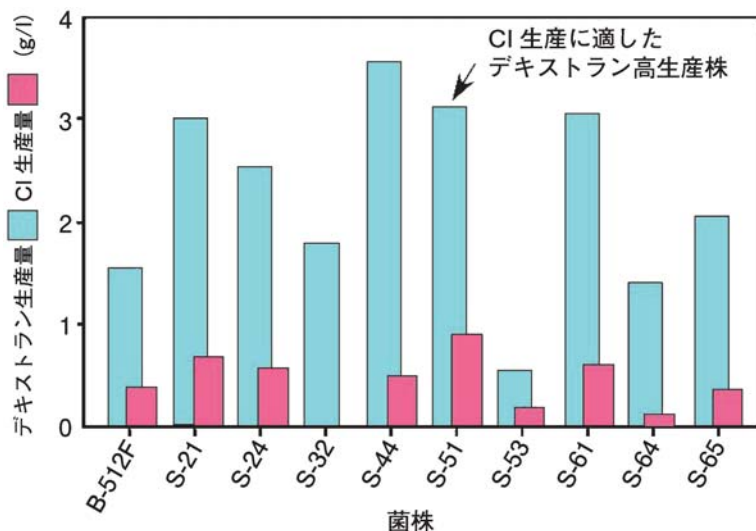


図 10 分離したデキストラン生産株が生産するデキストラン生産量と生産されたデキストランからの CI 転換量（ただし CI 生産量は CI-7+CI-8+CI-9 の合計で示す。）

B-512F 株¹⁴⁾ は、 α -1,6 結合を 95% 含むデキストランを生産するため、CI 生産に適したデキストランを作る菌株の一つであると考えられるが、我々はさらに優秀なデキストラン高生産菌株を取得するためスクリーニングを行った。デキストラン生産菌は製糖工場内に多く生息するため、製糖工場ラインから菌をスクリーニングした。ショ糖を 2% 含む培地で培養して生産されたデキストランを比較した結果、図 10 に示すように、*L. mesenteroides* NRRL B-512F 株よりも生産量が多く、しかも CI への転換効率の高いデキストランを生産する菌株、*Leuconostoc* sp. S-51 株を得ることができた¹⁵⁾。S-51 株が生産するデキストラン合成酵素は 1 種類であり、B-512F 株の酵素と同様、主として α -1,6 結合から成るデキストランを合成する。しかも B-512F 株の酵素よりも至適温度が 5°C、温度安定性は 10°C 高く、pH 安定性も酸性側、アルカリ性側共に 0.5 ずつ広いという生産性、安定性ともに優れた性質を持っている¹⁵⁾。さらに S-51 株は原料をサトウキビ汁に替えて培養した場合も、精製ショ糖を用いた場合と同様非常に良好に α -1,6 結合の割合の多いデキストランを生産した。

4.3 サイクロデキストラン高生産変異株の取得

CI の実用化において最も大きな問題は、デキストランを CI に転換する菌株の

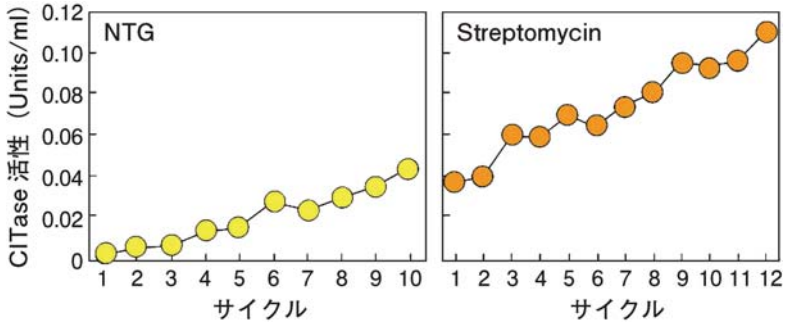


図 11 ニトロソグアニジン（左）およびストレプトマイシン（右）耐性菌選抜によるサイクロデキストラン合成酵素高生産変異株の取得

CITase 活性が極めて低いことであった。すでに CITase 遺伝子が 3 種類クローニングされ、DNA 塩基配列も明らかになっていることから^{8,16,17}、遺伝子組み換え技術を用いて CITase タンパクを大量生産することは可能である。しかし、遺伝子組み換え技術を用いる際には規制が多く、食品産業など中小の企業が多い分野での導入には困難が伴う。そこで、最初に発見され、現在最も研究が進んでいる *B. circulans* T-3040 株をもとに、ニトロソグアニジン耐性株を選抜し、図 11 左に示すように CITase 活性が野生株の 44 倍に高まった変異株を取得した¹⁸⁾。さらに、越智ら¹⁹⁾のリボゾーム工学（ストレプトマイシン等の抗生物質を添加し、リボゾームの変異を誘発することによって転写機能が改変され、有用機能が活性化されることを利用した育種法）を用いてストレプトマイシン耐性株を取得した菌株を得ることによって活性を高め、図 11 右に示すように CITase 活性が野生株の 110 倍上昇した変異株を取得することができた。現在、リボゾーム工学的手法を応用して 2 重、3 重変異株の取得を試み、より高い CITase 活性を示す変異株の育種を目指している。

4.4 サイクロデキストランの試作と CI 製品の機能

以上の技術を応用して、CI を良好に生産することが可能となったが、実際に生産される CI は、低分子から高分子まで幅広く、加えて副産物としてイソマルトオリゴ糖、および未反応のデキストランなども残存する。CI を分子量ごとに分離精製するためには副産物の分解とクロマト分離が必要になり、食品として利用するには極めてコストがかかる。そこで、未精製の状態で CI としての機能がどの程度存在するかを確認することとした。

様々な精製度の CI サンプルを試作し、それらのグルカン形成阻害活性を測定することにより、歯垢形成阻害剤として使用するためにはどの程度の純度が必要

表 1 CI サンプルに含まれる糖質成分割合 (%)

CI サンプル	CI-7~9	CI-10~12	IG-2~7	高分子成分
サンプル A	11.9	23.0	0.3	13.4
サンプル B	15.7	28.3	0.9	22.8
サンプル C	16.0	23.4	1.8	18.4
サンプル D	13.2	16.8	3.0	0.7
サンプル E	10.0	10.7	2.9	0.4

IG : イソマルトオリゴ糖

であるかを検討した²⁰⁾。調製した 5 種類の CI サンプルについて、CI (CI-7~CI-9 の低分子 CI, および CI-10~CI-12 の高分子 CI), 低分子のイソマルトオリゴ糖 (IG-2~IG-7), 高分子成分 (高分子イソマルトオリゴ糖およびデキストラン) の全重量に対する割合を表 1 に示した²⁰⁾。

まず、粗 CI サンプルの水溶性については、サンプル C は精製した CI と同等の極めて高い水溶性を示した。他のサンプルはいずれも、精製 CI よりは若干劣るものの、温度に拘わらず 100% (W/V) 程度溶解し、高い水溶性は保たれていた。

粗 CI サンプルのグルカン合成阻害作用に対する不純物の作用についても検討した。表 1 に示すようにイソマルトースなどの低分子のイソマルトオリゴ糖がいずれのサンプルにもわずかに含まれているが、これらは CI 同様グルカン形成阻害活性が確認されている。サンプル A, B, C に著量含まれている高分子のイソマルトオリゴ糖や未反応のデキストランについては、う蝕菌のグルカン合成を促進する可能性が懸念される。そこで、これら粗 CI サンプルについて、う蝕菌 *S. mutans* および *S. sobrinus* 由来のグルカン合成酵素による不溶性グルカンの合成阻害試験を行った (図 12)。対照として無添加 (粉糖のみ) およびウーロン茶エキス M 粉末 (丸善製薬株式会社より恵与, ポリフェノール 50% 以上) についても測定した。粗 CI サンプルおよびウーロン茶エキスは、有効成分 (CI またはポリフェノール) が 0.5% になるよう調整し、粉糖 1% 濃度で 37°C 1 晩または粉糖 30% 濃度で 37°C 8 日間反応を行い、阻害剤無添加で生成した不溶性グルカン量をそれぞれ 100 とした相対値を図 12 に示した。いずれの粗 CI サンプル、いずれの条件においても、粗 CI サンプルはポリフェノールよりも有効に不溶性グルカンの生成を抑制した。低分子の CI 成分の割合が高く、高分子成分の割合が低いサンプルに、より強いグルカン合成阻害作用が認められる傾向があり、特にサンプル E が、*S. mutans* 酵素、*S. sobrinus* 酵素とも顕著に強い阻害活性を示した。多少のイソマルトオリゴ糖および高分子成分の混入や、その他の不純物はグルカン合成阻害効果に大きな影響を与えないことがわかった²⁰⁾。

粗 CI サンプルの包接性に関しては、前記同様にピクトリアブルーを指標として青色の褪色による吸光度の低下を測定した。用いた粗 CI サンプルは、CI 成分が

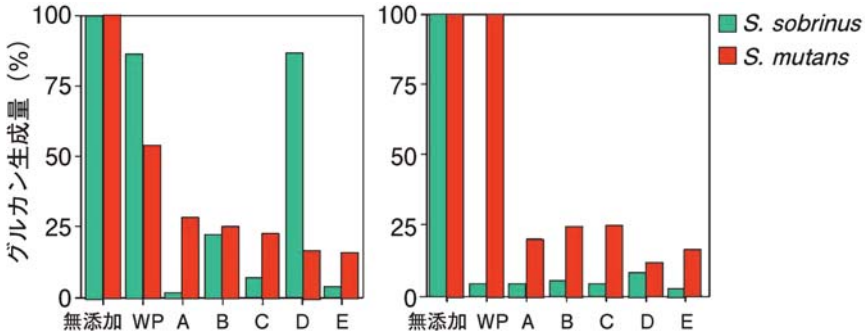


図 12 サイクロデキストラン試作品 (A~E) およびウーロン茶ポリフェノール (WP) による *Streptococcus sobrinus*, *S. mutans* 由来グルカン合成酵素阻害

左: 粉糖 1% 濃度で 37°C 1 晩反応 右: 粉糖 30% 濃度で 37°C 8 日間反応

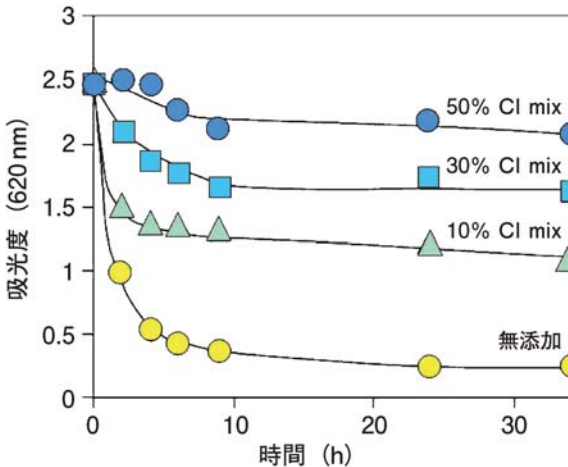


図 13 粗 CI サンプル (CI mix) によるピクトリアブルー色素の安定化

CI-7~CI-12 の合計として 14.4% (w/w) 含んだ CI mix であり, これには CI-10 は 1.4% (w/w) 含まれている。CI mix 10%, 30% 並びに 50% (w/v) の濃度での安定化能を試験したが, これらの試験液中の CI 成分濃度はそれぞれ, 1.44%, 4.32%, 7.2% であり, このうちの CI-10 濃度は, それぞれ 0.14% (0.86 mM), 0.42% (2.58 mM), 0.7% (4.32 mM) 相当である。図 13 に示すように, 粗 CI サンプルはピクトリアブルー色素の褪色を非常に有効に抑制した。高純度の CI を用

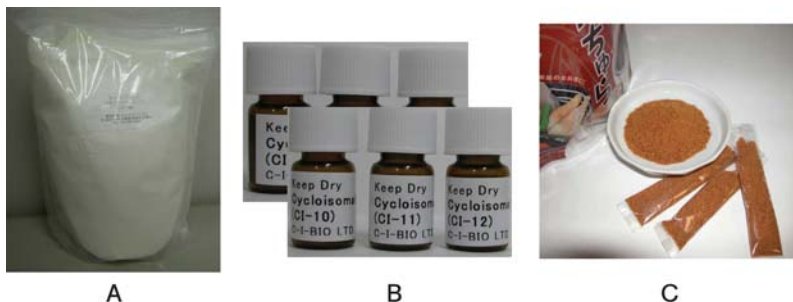


図 14 市販されているサイクロデキストラン製品（株式会社シー・アイ・バイオ 提供）

- A：サイクロデキストラン混合物。（ショ糖を原料としてサイクロデキストランを合成した後、フルクトースを除去し、脱塩した CI 粗製品。）
 B：高純度サイクロデキストラン。（CI-7, CI-8, CI-9, CI-10, CI-11, CI-12 をそれぞれ分離精製した試験研究用 CI 製品。）
 C：加工黒糖。（黒糖に製品 A を添加し、顆粒状に加工した黒糖スティックシュガー。）

いた前記の実験結果（図 6）と比較すると、10%の粗 CI サンプルを加えた反応で、CI-10 含量が図 6 の場合の 7 割の濃度にもかかわらず 22 時間後の吸光度低下がほぼ 50% と、1.2 mM の純品の CI-10 を加えた場合と同等の効果を示した²¹⁾。粗 CI サンプルに含まれる CI-10 以外の成分でピクトリアブルー色素に対し包接作用のある成分が含まれている可能性、または、CI-10 の包接作用を増強する成分が含まれている可能性も考えられるため、今後検証していく必要がある。

なお、CI を加えると β -CD の水溶性が増加する現象が観察された。また、抗癌剤パクリタキセルについては、CI または CD の添加で水溶性がやや増すが、CI と CD を同時に添加すると、単独の場合よりもさらに可溶化効果上がる傾向がみられた。 β -CD の水溶性増強、パクリタキセルの可溶化、およびダイゼインやゲニステインなど難水溶性のイソフラボンの可溶化についても粗 CI サンプルを用いた場合にも純品の CI 同様の包接作用が認められた（未発表）。

以上、CI を包接剤として食品、化成品、医薬品などの用途に利用できる可能性を期待させる知見が得られており、現在引き続き CI の包接に関する研究・開発を進めているところである。

5. おわりに

表 1 に示した CI サンプル E を改良し、より高濃度の CI 成分を含み、不純物を少なくしたものが 2008 年に製品化された。この CI 製品を添加した甘味料も製作され、本製品のブランク合成阻害作用の確認を経て、これも 2009 年から市販が開

始された。また、高度に精製した CI-7, CI-8, CI-9, CI-10, CI-11, CI-12 までが試薬として 2009 年から販売されている。これらの CI 製品を図 14 に示す。

サイクロデキストランの用途については、砂糖の存在下でもグルカンの合成阻害作用を強く示す CI の性質を利用した甘味料が実用化した。包接剤としてはまだ課題を残している。不純物を完全に除去していない安価な CI 混合物にも包接性が認められているが、高濃度で使用すると不純物のために製品の物性を損なってしまう可能性がある。純度の高い CI は物性を損なわず高濃度で使用できると考えられるが、製造にコストがかかり現段階では価格が非常に高く、実用化には至っていない。今後さらにこれらの問題の解決に向けて CI の製造法開発を進め、様々な食品への応用法を開発していきたい。

(微生物利用研究領域発酵細菌ユニット 舟根 和美)

引用文献

- 1) EB. Tilden and CS. Hudson, J. Am. Chem. Soc., **63**, 2900-2902 (1939).
- 2) M. Kawamura, T. Uchiyama, T. Kuramoto, Y. Tamura and K. Mizutani, Carbohydr. Res., **192**, 83-90 (1989).
- 3) G.L. Côté and P. Biely. Eur. J. Biochem. **226**, 641-648 (1994).
- 4) T. Oguma, T. Horiuchi and M. Kobayashi, Biosci. Biochem. Biotechnol., **57**, 1225-1227 (1993).
- 5) K. Funane, K. Terasawa, Y. Mizuno, H. Ono, T. Miyagi, S. Gibu, T. Tokashiki, Y. Kawabata, YM. Kim, A. Kimura and M. Kobayashi, J. Biotechnol., **130**, 188-192 (2007).
- 6) K. Funane, K. Terasawa, Y. Mizuno, H. Ono, S. Gibu, T. Tokashiki, Y. Kawabata, YM. Kim, A. Kimura and M. Kobayashi, Biosci. Biotechnol. Biochem., **72**, 3277-3280 (2008).
- 7) M. Kobayashi, K. Funane, T. Oguma, Biosci. Biochem. Biotechnol., **59**, 1861-1865 (1995).
- 8) T. Oguma and H. Kawamoto, Trends Glycosci. Glycotechnol., **15**, 91-99 (2003).
- 9) T. Oguma, K. Tobe and M. Kobayashi, FEBS. Lett., **345**, 135-138 (1994).
- 10) 北畑寿美雄, “糖質の科学”, 新家 龍, 南浦能至, 北畑寿美雄, 大西正健編, 朝倉書店, 2000, pp. 79-81.
- 11) 福島和雄, 今井奨, GTF 阻害剤, う蝕細菌の分子生物学, クインテッセンス出版社, p 210-225 (1997).
- 12) T. Takaha, M. Yanase H. Takata, S. Okada and SM. Smith, J. Biol. Chem., **271**, 2902-2908 (1996).

- 13) 渡嘉敷唯章, 金城健作, 舟根和美, 伊藤 汎, J. Appl. Glycosci., **54**, 27-30 (2007).
- 14) E.J. Hehre, Adv. Enzymol., **11**, 297-337 (1951).
- 15) K. Funane, T. Matsuo, H. Ono, T. Ishii, S. Gibu, T. Tokashiki and Kobayashi, M., J. Appl. Glycosci., **50**, 379-382 (2003).
- 16) T. Oguma, T. Kurokawa, K. Tobe and M. Kobayashi, J. Appl. Glycosci., **42**, 415-419 (1995).
- 17) 舟根和美, 寺澤和恵, 宮城 昶, 宮城貞夫, 公開特許公報, 特許公開 2007-189905 (2007.8.2).
- 18) 川端康之, 北尾悟, 舟根和美, 渡嘉敷唯章, 儀部茂八, 宮城貞夫, 食品・臨床栄養, **1**, 43-48 (2006).
- 19) K. Ochi, S. Okamoto, Y. Tozawa, T. Inaoka, T. Hosaka, J. Xu and K. Kurokawa, Adv. Appl. Microbiol., **56**, 155-184 (2004).
- 20) 舟根和美, 食品工業, **49**, 29-37 (2006).
- 21) 舟根和美, FFI ジャーナル, **213**, 1001-1008 (2008).