

平成24年度

酵素保護材としての利用をめざした、多糖フルクタンの高機能化

福井大学  
寺田 聡

# 研究の実施内容及び成果に関する報告書

## 酵素保護材としての利用をめざした、多糖フルクタンの高機能化

福井大学 寺田 聡

### (1) 研 究 課 題

酵素を用いた臨床診断薬が医療機関で広く利用されているが、酵素は極めて不安定なため、安定化剤としてウシ血清アルブミン (BSA) が添加されている。しかしBSE問題から人畜共通感染症が懸念され、医療現場での臨床診断では動物因子の使用が制限されるようになった。そこで、酵素の失活を防止し、人畜共通感染症の懸念のない、安全で優れた酵素安定化剤が望まれている。

今回、我々が提案するラッキョウ由来の多糖フルクタンは植物由来であるため、人畜共通感染症の懸念が無い。ポリペプチドを用いた酵素保護剤も用いられるが、ペプチドは水溶性に乏しく、また糖に比べると安定性も大きく劣っている。フルクタンは安定性にも優れ、さらに生体高分子としては例外的に、極めて溶解度が高く、40%以上の溶解度に達することから、調製も容易でかつ取り扱いやすい利点がある。加えて、栽培植物であるラッキョウから大量に取得できることから供給も安定しており、製造コストも安価であるという利点がある。

本研究開発では、ラッキョウから得られる多糖フルクタンを用いて、安価で効果の高い、「フルクタンを用いた酵素保護剤」を実現する。

そこでまず、「フルクタンの酵素保護材としての評価系」を確立し、続いて「どのような構造のフルクタンが有効か」を特定し、続いて「フルクタンを様々な糖と比較して保護材としてどれくらい有効か」を決定し、実用化に近づける。

### (2) 研究の実施内容及び成果

#### 2-1 フルクタンの酵素保護材としての評価系の構築

酵素として、安定で取り扱いやすいという点で、西洋ワサビ由来のペロキシダーゼを用いることとした。続いて、酵素の保護効果を検討するために、酵素が失活する条件を探索することとした。そして、このようにして定めた条件で、

フルクタンを共存し、実際に活性が保持されるかを検討していくことになる。そこで、酵素が大きく失活し始めるpH値を測定することとした。

具体的には、ペロキシダーゼを対象に、酸性（pH1からpH7の範囲）の条件に10分間置き、その後、中性に戻して酵素活性を測定した。ペロキシダーゼ酵素の濃度は、1.2 U/mlとした。

pH3以下で急速に酵素の活性が低下することがわかった。実験の再現性も考慮して、pH2ないしpH2.5の範囲で10分間、4℃で酵素を処理することに定めた。

続いて、この方法に従って、フルクタンが実際に酵素の失活を抑制できるかを検討した。

先の実験で、酵素溶液を酸性の緩衝液（pH=2.4）で処理したとき、大きく失活することが確認できた。そこで、今回は、pH2.3近傍で酵素を処理してフルクタンを共存させた場合に酵素を保護できるか、という観点で、検討を行う。フルクタンの濃度は、50、100、200 mg/mLで検討した。

その結果、フルクタンの添加によって、酸性の液中での酵素活性の低下が抑制された。そして、その効果は、フルクタンの濃度の上昇に伴い、高められた。本実験では、酵素活性に良い影響を与えるフルクタンの最適濃度は200 mg/mlであったが、これより濃度を大きくすることで、より高い効果が予想できるが、実験操作に関連して、溶解させることのできる最大濃度は200 mg/mlであった。

有意差検定の結果によると、「酸処理無し、かつFructan無添加」と「Fructan(200 mg/ml)中での酸性緩衝液で処理」には、有意差が確認できなかった。すなわち、フルクタンの添加により、酸処理による失活をほぼ阻害できたと考えられる。

なお、フルクタン自体は、この酵素の活性には何ら影響しなかった。

以上を踏まえ、フルクタンの200 mg/mlを最適濃度とし、検討することとする。

## 2-2 どのような構造のフルクタンが有効か

今までの検討では、「S-5フルクタン」を酵素保護剤として使用してきた、これ以外のフルクタンを酸性緩衝液で処理しその効果を比較する。すなわち、S-5フルクタンとは特に平均分子量が大きく異なっており、これらを比較して検討する。これにより、フルクタンの効果を検証する。なお、S-5、3年堀未分画(低分子)、3年堀残留画分(高分子)の平均分子量は、それぞれ、16.1、29.4、81.7 kDaである。

測定したところ、フルクタンの酵素保護効果は、分子量に依存していた。3年堀未分画(低分子)29.4kDaのものが最も強く、続いて16.1kDaのS-5であり、3年堀残留画分(高分子)81.7kDaのものは大きく劣っていた。すなわち、最適な分子量のサイズがみいだされた。

## 2-3 フルクタンを様々な糖と比較して保護材としてどれくらい有効か

フルクタンと他の糖とを比較し、その酵素保護の効果を比較する。

具体的には、フルクタンのモノマーであるフルクトース（単糖）、二糖としてスクロースとトレハロース（これら二糖は、しばしば酵素保護材として利用されている）、さらにフルクタンの仲間であるイヌリンと比較検討した。

酵素を酸性処理することによって大きく酵素活性が損なわれていた。この酸性処理の際にフルクタンを共存することによって、この失活は大きく抑制され、ほとんど酵素活性は同等であった。一方、フルクタン以外の糖、フルクトース、スクロース、トレハロース、イヌリンのいずれも、若干の保護効果は認められたものの、フルクタンに比べると大幅に小さいものであった。

このことより、酵素保護効果はフルクタンにおいて顕著であり、非常に有効性が高いと期待される。

### (3) 今後予想される効果

以上のように、フルクタンは大変に優れた酵素保護材であることが示された。すなわち、他の糖類、フルクトース、スクロース、トレハロース、イヌリンのいずれも、若干の保護効果は認められたものの、その効果ははるかに小さいものであった。

そして、フルクタンの分子量の異なるものを比較した場合、その保護効果は分子量で変化していた。今回の検討では必ずしも詳細に検討できた訳ではないため、より詳細に検討することで、酵素保護に優れたフルクタンの特性を決定していくことで、実用化に大いに貢献できると期待している。